



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

Instituto de Química

Programa de Pós-Graduação em Química - Doutorado

**DETERMINAÇÃO DE ESCOPOLAMINA EM BEBIDAS E URINA EMPREGANDO
VOLTAMETRIA DE ONDA QUADRADA E ELETROFORESE CAPILAR**

THIAGO DA COSTA OLIVEIRA

Tese de Doutorado

UBERLÂNDIA

Julho

2019

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

Instituto de Química

Programa de Pós-Graduação em Química

Determinação de escopolamina em bebidas e urina empregando voltametria de onda quadrada e eletroforese capilar

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

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

Aluno: Me Thiago da Costa Oliveira

Orientador: Prof. Dr. Eduardo Mathias Richter

Coorientador: Prof. Dr. Rodrigo Alejandro Abarza Muñoz

Área de concentração: Química Analítica

Julho
2019

Ficha Catalográfica Online do Sistema de Bibliotecas da UFU
com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

O48 2019	<p>Oliveira, Thiago da Costa, 1989- DETERMINAÇÃO DE ESCOPOLAMINA EM BEBIDAS E URINA EMPREGANDO VOLTAMETRIA DE ONDA QUADRADA E ELETROFORESE CAPILAR [recurso eletrônico] / Thiago da Costa Oliveira. - 2019.</p> <p>Orientador: Eduardo Mathias Richter. Coorientador: Rodrigo Alejandro Abarza Muñoz. Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Uberlândia, Pós- graduação em Química. Modo de acesso: Internet. Disponível em: http://dx.doi.org/10.14393/ufu.te.2019.2346 Inclui bibliografia. Inclui ilustrações.</p> <p>1. Química. I. Richter, Eduardo Mathias, 1965-, (Orient.). II. Muñoz, Rodrigo Alejandro Abarza, 1980-, (Coorient.). III. Universidade Federal de Uberlândia. Pós-graduação em Química. IV. Título.</p> <p>CDU: 54</p>
-------------	--

Bibliotecários responsáveis pela estrutura de acordo com o AACR2:
Gizele Cristine Nunes do Couto - CRB6/2091
Nelson Marcos Ferreira - CRB6/3074



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

ATA DE DEFESA

Programa de Pós-Graduação em:	Química				
Defesa de:	Tese de Doutorado Acadêmico, 95, PPQUI				
Data:	trinta e um de julho de dois mil e dezenove	Hora de início:	13:30	Hora de encerramento:	18:55
Matrícula do Discente:	11523QMI012				
Nome do Discente:	Thiago da Costa Oliveira				
Título do Trabalho:	Determinação de escopolamina em bebidas e urina empregando voltametria de onda quadrada e eletroforese capilar				
Área de concentração:	Química				
Linha de pesquisa:	Eletroquímica Aplicada				
Projeto de Pesquisa de vinculação:	Desenvolvimento de métodos analíticos com características portáteis visando à identificação de falsificações em produtos farmacêuticos e drogas lícitas.				

Reuniu-se no Auditório Prof. Manuel Gonzalo Hernández Terrones, Campus Santa Mônica, da Universidade Federal de Uberlândia, a Banca Examinadora, designada pelo Colegiado do Programa de Pós-graduação em Química, assim composta: Professores Doutores: Regina Massako Takeuchi, ICENP/UFU; Djenaine de Souza, IQ/UFU; Evandro Piccin, Universidade Federal de Minas Gerais; Lúcia Helena Gomes Coelho, Universidade Federal do ABC e Eduardo Mathias Richter, orientador(a) do(a) candidato(a).

Iniciando os trabalhos o(a) presidente da mesa, Dr(a). Eduardo Mathias Richter, apresentou a Comissão Examinadora e o candidato(a), agradeceu a presença do público, e concedeu ao Discente a palavra para a exposição do seu trabalho. A duração da apresentação do Discente e o tempo de arguição e resposta foram conforme as normas do Programa.

A seguir o senhor(a) presidente concedeu a palavra, pela ordem sucessivamente, aos(às) examinadores(as), que passaram a arguir o(a) candidato(a). Ultimada a arguição, que se desenvolveu dentro dos termos regimentais, a Banca, em sessão secreta, atribuiu o resultado final, considerando o(a) candidato(a):

Aprovado(a).

Esta defesa faz parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor. O competente diploma será expedido após cumprimento dos demais requisitos, conforme as normas do Programa, a legislação pertinente e a regulamentação



Documento assinado eletronicamente por **Eduardo Mathias Richter, Professor(a) do Magistério Superior**, em 31/07/2019, às 18:57, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Lucia Helena Gomes Coelho, Usuário Externo**, em 31/07/2019, às 18:58, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Regina Massako Takeuchi, Professor(a) do Magistério Superior**, em 31/07/2019, às 19:01, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Djenaine de Souza, Professor(a) do Magistério Superior**, em 31/07/2019, às 19:10, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Evandro Piccin, Usuário Externo**, em 08/08/2019, às 09:47, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://www.sei.ufu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **1387996** e o código CRC **57D3BAD3**.

*Aos meus pais, Luzia e Marcio, pelo incentivo,
apoio, carinho e amor dedicados.
Ao meu orientador, Eduardo, pelos ensinamentos
compartilhados e pela paciência.
E aos Amigos do Xupe,
pelos dias deliciosos.
À Tia Cida e Rafael (in memoriam).*

AGRADECIMENTOS

O desenvolvimento desse trabalho pode ser comparado à uma Jornada, na qual eu nunca estive sozinho. Gostaria de agradecer a todos que colaboraram (direta e indiretamente) para que esse trabalho fosse possível. A todos que me proporcionaram momentos leves, crises de risos (você sabem que foram muitas!), me convidaram para (ou pediram que eu fizesse) um café (também foram muitos!), àqueles que torceram por mim (de perto ou de longe), meus mais sinceros agradecimentos!

Aos meus pais, Luzia (Goreth) e Márcio, que acreditaram em mim e me apoiaram em todas as conquistas de minha vida. E aos meus irmãos, Nayara e João Vitor (Danúbio), pelo apoio, e por entenderem minhas ausências.

Agradeço ao Prof. Eduardo Richter não somente pela orientação, mas pela dedicação, paciência, confiança e conhecimentos transmitidos e investidos. Um exemplo de profissional a ser seguido.

Ao professor Rodrigo Muñoz, pelos ensinamentos, apoio e aconselhamentos nas questões da pós-graduação.

Ao meu amigo, Jhonys Machado (Xonys Roberto) pela amizade inabalável e de longa data, pelo companheirismo, atenção, cuidados e incentivos constantes. Obrigado por ser minha “Âncora” em todos os momentos que eu precisei.

À Raquel, minha “Esposa Maravilhosa”, um dos muitos presentes que ganhei no período em que desenvolvi esse trabalho. Sua companhia, carinho e cuidado, foram de grande importância para a realização dessa Tese. Jamais esquecerei de nossos momentos juntos.

À Xyxelle Miranda, minha “Musa do Eletroforese do Nupe”, com quem tive o privilégio de aprender e realizar os experimentos de eletroforese capilar, e cuja amizade se aprofundou e fortaleceu. Sem você eu não teria tantos resultados, em tão pouco tempo.

À Professora Yaico D. Tanimoto de Albuquerque, a quem considero minha “mãe científica”, minha orientadora durante a iniciação científica. Uma Professora que eu sempre admirei e que considero um exemplo a ser seguido.

Às minhas amigas Nath e Polliana, pela amizade de longuíssima data, que sempre me proporcionam momentos leves, apoio e carinho (e zoeira, quase constante...).

Às “Devassas Dramáticas” Ju, Renatinha, Ana Paula e Dri (Japa), que tive o privilégio de conhecer durante a graduação, e que mesmo apesar da distância continuam presentes...

À Tushy (Pâmela, Pandora, Pandorastasia e muitos outros...) pelas boas energias, pelas conversas profundas, e pelos muitos e muitos momentos de risos, confidências, apoio e carinho.

Aos meus amigos e amigas, Samantha, Marcelo, Marco Túlio, Cláudio, Dominike, Fabi, Thiago Destro (Marido), Alex, Artur, Pedro, Teo, Bru, Rick, Victor, Paulo, Gui, Thales, Henrique e Júlia, Ana Carolina (SP) e Paulo Victor (SP), que tive a alegria de conhecer e que embarcaram nessa Jornada comigo...

Aos amigos do *XUPE*, pela amizade e momentos de descontração (no laboratório, nas viagens aos congressos, nos coffee-breaks...), além da ajuda e das discussões: Xéssica Cristina, Sr. Xeberson, Ana Paula, Xavid (Sobrinho Magro), Fernando (já é um de nós!), Xuiz, Nath, André, Diego, Alice (Aliciana Prado!), Xilvia, Rafael Melo, Iana, Xian, Xablo, Sarah, Brenda, Afonso, o Chico (o filho/mascote) e a todos que não estão citados aqui. Sem vocês, essa jornada teria sido mais extenuante e muito solitária.

À minha avó, Selma, e demais membros da ‘Família maluca’, Cairo Henrique, Cairo Vinniccius, Ana Cláudia, Gabriela... Obrigado por agitarem os almoços de domingo, e por entenderem minha ausência, principalmente na etapa final de escrita.

Ao professor Wendell Coltro, e às pesquisadoras Kemilly Pinheiro e Kariolanda, por terem me recebido afetuosamente no Laboratório de Microfluídica e Eletroforese, na UFG para os experimentos com CE em microchip.

Aos professores do IQ-UFU que contribuíram para a minha formação.

Aos técnicos e secretários do IQ-UFU e das coordenações pela ajuda sempre que necessário.

Aos membros da banca por aceitarem ao convite e pelas contribuições a serem concedidas para o aprimoramento deste trabalho.

À CAPES, ao CNPq e à FAPEMIG pelo apoio financeiro.

Ao IQ-UFU pelo espaço físico concedido.

E a mim mesmo, porque, olha... não foi nada fácil!

Muito obrigado a todos!

‘How did it go so fast?’

You'll say as we are looking back.

And then, we'll understand...

We held gold dust in our hands.

(Tori Amos)

Resumo

Oliveira, T C. **Determinação de escopolamina em bebidas e urina empregando voltametria de onda quadrada e eletroforese capilar**. 2019. 190f. Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Química, Instituto de Química, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia – MG, 2019.

A escopolamina (SCP) é um alcaloide utilizado na prevenção de enjoos e como adjuvante na aplicação de anestésias. Contudo, em função dos efeitos sobre o sistema nervoso central, esse fármaco também é adicionado a bebidas, com intenção criminosa, numa prática conhecida popularmente como “Boa Noite, Cinderela”. Nesta tese foram desenvolvidos dois métodos eletroquímicos simples e rápidos para a determinação de SCP em bebidas e urina, como um processo de triagem para a verificação de adulteração de bebidas conhecida como “Boa noite, Cinderela”. Um método foi baseado em análise por injeção em batelada com detecção por voltametria de onda quadrada (BIA-SWV) e o outro em eletroforese capilar com detecção condutométrica sem contato (CE-C⁴D). Em BIA-SWV, as amostras foram analisadas após a diluição em eletrólito de suporte (H₂SO₄ 0,5 mol L⁻¹) e um eletrodo de diamante dopado com boro (BDD) foi utilizado para promover a eletrooxidação da SCP resultando num pico de oxidação em +1,8 V (vs. Ag/AgCl_(sat)). Além da triagem rápida de SCP, a quantificação de SCP também foi possível com obtenção de valores de recuperação entre 87 e 113% e limite de detecção de 0,18 µmol L⁻¹. O método (CE-C⁴D) desenvolvido permite a detecção rápida ($t_m < 30$ s) de SCP em bebidas usando histidina 20 mmol L⁻¹ (+ NaOH até pH = 9,5) como eletrólito de corrida. A triagem e quantificação de SCP foi possível após simples diluição das amostras de bebidas em água, com recuperações entre 93 e 103% e limite de detecção de 7,8 µmol L⁻¹. Adicionalmente, o sistema CE-C⁴D também foi usado com sucesso na detecção e quantificação de SCP em urina real, utilizando histidina/DMX/NaOH (20 mmol L⁻¹/ 10 mmol L⁻¹/ 12 mmol L⁻¹; pH = 8,0) como eletrólito de corrida. A quantificação de SCP em urina foi possível empregando diluições das amostras entre 10 e 30% (v/v), com valores de recuperação entre 85 e 112 % e limite de detecção de 2,3 µmol L⁻¹.

Palavras chave: Boa noite Cinderela; Adulteração; Análise forense; Triagem rápida.

Abstract

Oliveira, T C. **Determination of scopolamine in beverages and urine using square-wave voltammetry and capillary electrophoresis**. 2019. 190p. Thesis (Doctorate) – Programa de Pós-Graduação em Química, Instituto de Química, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia – MG, 2019.

Scopolamine (SCP) is an alkaloid used to prevent motion sickness and as an adjunct to anesthesia application. However, due to the effects on the central nervous system, this drug is also added to beverages, with criminal intent, a practice commonly known as "Good evening, Cinderella". In this thesis two simple and rapid electrochemical methods for the determination of SCP in beverage and urine samples were developed as a screening process for adulteration known as "Good Night, Cinderella". One method was based on batch injection analysis with square wave voltammetric detection (BIA-SWV) and the other on capillary electrophoresis with contactless conductometric detection (CE-C⁴D). In BIA-SWV, the samples were analyzed after dilution in supporting electrolyte (H₂SO₄ 0.5 mol L⁻¹) and a boron doped diamond electrode (BDD) was used to promote the electrooxidation of SCP resulting in an oxidation peak at +1.8 V (vs. Ag/AgCl_(sat)). In addition to rapid screening of SCP, the quantification of SCP was also possible with recovery values between 87 and 113% and detection limit of 0.18 μmol L⁻¹. The developed (CE-C⁴D) method allows rapid detection (t_m <30 s) of SCP in beverages using 20 mmol L⁻¹ histidine (+ NaOH until pH = 9.5) as the background electrolyte. SCP screening and quantification was possible after simple dilution of beverage samples in water, with recovery values between 93 and 103% and detection limit of 7.8 μmol L⁻¹. In addition, the CE-C⁴D system was also successfully used in the detection and quantification of SCP in urine using histidine/DMX/NaOH (20 mmol L⁻¹/10 mmol L⁻¹/12 mmol L⁻¹; pH = 8,0) as the background electrolyte. Quantification of SCP in urine was possible using sample dilutions between 10 and 30% (v/v), with recovery values between 85 and 112% and detection limit of 2.3 μmol L⁻¹.

Keywords: Good Night, Cinderella; Adulteration; Forensic analysis; Fast screening.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Fórmulas estruturais da escopolamina (A) e da atropina (B) encontradas comumente nas plantas da família <i>Solanaceae</i>	30
Figura 2. Esquema de aplicação dos pulsos de potencial na voltametria de onda quadrada em função do tempo. Em destaque os parâmetros de amplitude dos pulsos (<i>a</i>), incremento dos pulsos de potencial (ΔE_s) além dos pontos de amostragem das correntes direta (I_d) e reversa (I_r).	42
Figura 3. Etapas de operação do sistema BIA, empregando detecção voltamétrica. (A) Momento anterior à injeção. (B) Realização da injeção, com destaque para a formação do plug de amostra. (C) Após a varredura, o eletrólito no interior da célula é agitado, com a diluição do plug de amostra injetado.	43
Figura 4. Célula de polipropileno utilizada nos experimentos estacionários. (A) eletrodo de BDD posicionado entre o <i>O-ring</i> e a placa metálica para contato. (B) vista lateral da célula. (C) vista superior: posicionamento do eletrodo no interior da célula.	61
Figura 5. Componentes do sistema BIA utilizados no trabalho: (a) Micropipeta eletrônica (Eppendorf Multipette stream®); (b) ponteira em forma de seringa (volume total: 1 mL); (c) célula de polipropileno (com o eletrodo posicionado); (d) tampa da célula (com orifícios para eletrodo auxiliar, referência e ponteira, ao centro); (e) sistema BIA montado.	62
Figura 6. Voltamogramas cíclicos obtidos em diferentes eletrólitos antes (---) e após (—) a adição de 500 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de SCP: (A) H_2SO_4 0,5 mol L^{-1} (—) e 0,1 mol L^{-1} (—); (B) tampão acetato 0,05 mol L^{-1} (—) (pH 4,7) e 0,1 mol L^{-1} tampão fosfato (—) (pH 7,2). Eletrodo de trabalho: BDD anodicamente pré-tratado; velocidade de varredura: 50 mV s^{-1} ; incremento de potencial: 5 mV.	70
Figura 7. Efeito do pré-tratamento anódico [aplicando +10 mA por 1000 s; (—)] e catódico [aplicando -10 mA por 1000 s; (—)] nas respostas voltamétricas obtidas para solução de H_2SO_4 0,5 mol L^{-1} antes (linha tracejada) e após (linha contínua) a adição de 500 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de SCP. Velocidade de varredura: 50 mV s^{-1} ; incremento de potencial: 5 mV.	71
Figura 8. (A) Comparação entre os voltamogramas cíclicos registrados para soluções tampão Britton-Robinson entre pH 2 e 4 e em solução de H_2SO_4 0,5 mol L^{-1} . (B) Comparação entre os voltamogramas obtidos para soluções entre pH 5 e 7. Condições experimentais: 500 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de SCP; velocidade de varredura: 50 mV s^{-1} ; incremento de potencial: 5 mV.	72

Figura 9. Variação do potencial de oxidação (E_{ox}) e da corrente de pico (I_p) em função do pH da solução BR, obtidos a partir dos voltamogramas da Figura 8	73
Figura 10. Voltamogramas cíclicos obtidos para oxidação de $500 \mu\text{mol L}^{-1}$ de SCP sobre eletrodo de BDD, após pre-tratamento anódico, em diferentes velocidades de varredura. Eletrólito de suporte: H_2SO_4 $0,5 \text{ mol L}^{-1}$, incremento de potencial: 5 mV	74
Figura 11. Relação entre corrente de pico e velocidade de varredura para voltamogramas cíclicos de SCP $500 \mu\text{mol L}^{-1}$ sobre BDD em H_2SO_4 $0,5 \text{ mol L}^{-1}$. (A): I_p vs. $v^{1/2}$. (B): $\log I_p$ vs. $\log v$	75
Figura 12. Relação entre potencial de pico (E_p) e o logaritmo da velocidade de varredura ($\log v$) para voltamogramas cíclicos da Figura 10	76
Figura 13. (A): Voltamogramas obtidos para oxidação de $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ de SCP em diferentes valores de incremento de varredura. (B) Relação entre a corrente de pico e a variação do incremento de varredura. (C) Relação $I_p/W_{1/2}$ vs. ΔE_s . Eletrólito: H_2SO_4 $0,5 \text{ mol L}^{-1}$. $f = 100 \text{ s}^{-1}$, $a = 50 \text{ mV}$	77
Figura 14. (A): Voltamogramas de onda quadrada obtidos para SCP, $100 \mu\text{mol L}^{-1}$, em função da variação nos valores de amplitude de pulso de potencial aplicados. (B): Relação entre corrente de pico e amplitude de pulsos. (C): Relação $I_p/W_{1/2}$ vs. Amplitude dos pulsos. $f = 100 \text{ s}^{-1}$, $\Delta E_s = 2 \text{ mV}$	78
Figura 15. Relação entre E_p e amplitude de aplicação dos pulsos de potencial para os voltamogramas da Figura 14	79
Figura 16. (A) Voltamogramas de onda quadrada obtidos para $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ SCP, em diferentes frequências de aplicação de pulsos de potencial (B) Relação entre potencial de pico e a frequência de aplicação de pulso. (C) I_p vs. $f^{1/2}$. Eletrólito: H_2SO_4 $0,5 \text{ mol L}^{-1}$; $a = 50 \text{ mV}$, $\Delta E_s = 2 \text{ mV}$	80
Figura 17. (A) Relação $I_p/W_{1/2}$ vs. f . (B e C) Relações entre potencial de pico e frequência de aplicação dos pulsos de potencial para $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ SCP, obtidas a partir dos voltamogramas da Figura 16 (A). (B): E_p vs. f , (C): E_p vs. $\log f$	81
Figura 18. Voltamogramas de onda quadrada obtidos para solução contendo $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ de SCP com a separação das componentes de corrente direta e reversa antes (A) e depois (B) da correção da linha base. Eletrodo de trabalho: BDD. Eletrólito: H_2SO_4 $0,5 \text{ mol L}^{-1}$; $f = 100 \text{ s}^{-1}$; $a = 50 \text{ mV}$; $\Delta E_s = 6 \text{ mV}$	83

Figura 19. Relações entre I_p/f vs. f para caracterização do máximo quase-reversível para 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$ SCP, obtidas a partir dos voltamogramas SWV da Figura 16 .	84
Figura 20. Mecanismo proposto para oxidação de SCP sobre o BDD em meio ácido.	85
Figura 21. (A) Voltamogramas de onda quadrada obtidos para solução contendo 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de SCP com % de whisky variando entre 1 e 20% (v/v). (B) Comparação entre as correntes de pico registradas para a oxidação de 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$ SCP nas amostras de vodka, cachaça e whisky em diluições entre 1 e 20% (v/v). Condições experimentais: Similares à Figura 18 .	86
Figura 22. Voltamogramas registrados para soluções contendo concentrações crescentes de SCP em solução padrão (A) e em soluções contendo 1% (v/v) das amostras estudadas: (B) cachaça; (C) energético; (D) Skol Beats®; (E) vodka e (F) whisky. Condições experimentais iguais à Figura 18 .	87
Figura 23. Faixas lineares obtidas para as correntes de oxidação de SCP (1 a 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$) na solução padrão (A) e nas amostras: (B) cachaça; (C) energético; (D) Skol Beats®; (E) vodka e (F) Whisky; com diluição de 1% (v/v). Condições experimentais: similares à Figura 18 .	89
Figura 24. Comparação entre as inclinações apresentadas pela a corrente de oxidação detectada para SCP na solução padrão e em 1% (v/v) das amostras estudadas.	90
Figura 25. Correntes de oxidação detectadas nas varreduras sucessivas ($n=10$) para soluções contendo 5 e 10 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de SCP em em solução padrão (A) e em soluções com 1% (v/v) das amostras em H_2SO_4 0,5 mol L^{-1} : (B) cachaça; (C) energético; (D) Skol Beats®; (E) vodka e (F) whisky; Condições experimentais: similares à Figura 18 .	92
Figura 26. Voltamogramas obtidos para varreduras de SWV de soluções contendo 1% das amostras (v/v) adulteradas com 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de SCP: (A) Vodka e (B) whisky diluídas 100 vezes em H_2SO_4 0,5 mol L^{-1} antes (---) e após adições sucessivas de 1 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de SCP, com as respectivas curvas de calibração de adição de padrão. Condições experimentais: similares às da Figura 18 .	94
Figura 27. Variação da corrente de oxidação da SCP em função da velocidade de injeção (A) e do volume injetado (B). Condições: Volume injetado: 100 μL em (A); Velocidade de injeção: 100 $\mu\text{L s}^{-1}$ em (B). Concentração de SCP: 1 $\mu\text{mol L}^{-1}$ em vodka diluída em H_2SO_4 0,5 mol L^{-1} (1% v/v).	96

Figura 28. Varreduras de SWV obtidas para soluções contendo 1% (v/v) das amostras diluídas em H_2SO_4 0,5 mol L^{-1} antes (---) e após (—) a adição de SCP 6 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Eletrodo de trabalho: BDD; eletrólito de suporte: H_2SO_4 0,5 mol L^{-1} ; $f = 100 \text{ s}^{-1}$; $a = 50 \text{ mV}$; $\Delta E_s = 6 \text{ mV}$; volume injetado: 120 μL ; velocidade de injeção: 250 $\mu\text{L s}^{-1}$	98
Figura 29. Voltamogramas de SWV obtidos para amostras de (A) Coca-Cola® e (B) energético antes (—) e após (traços coloridos) a adição de concentrações crescente CAF (25, 50 e 75 $\mu\text{mol L}^{-1}$) às soluções contendo 1% (v/v) de cada amostra em H_2SO_4 0,5 mol L^{-1} . Condições experimentais: Similares à Figura 28	99
Figura 30. Faixas lineares obtidas para soluções contendo concentrações crescentes de SCP em amostras diluídas em H_2SO_4 0,5 mol L^{-1} (1% v/v), usando o sistema BIA-SWV. Condições experimentais: Similares à Figura 28	101
Figura 31. Resultados de varreduras sucessivas usando o sistema BIA-SWV para soluções contendo SCP em 1% (v/v) para cada amostra em H_2SO_4 0,5 mol L^{-1} . Condições experimentais: Similares à Figura 28	103
Figura 32. Voltamogramas obtidos para injeção de soluções contendo 1% das amostras (v/v) em H_2SO_4 0,5 mol L^{-1} antes (---) e após adição de padrão de SCP, com as respectivas curvas de recuperação. Condições experimentais: iguais à Figura 28	106
Figura 33. Voltamogramas de onda quadrada obtidos para amostras de (A) urina sintética e (B) real, antes (---) e após oito adições de padrão de SCP. Condições experimentais: Similares à Figura 28 , exceto a velocidade de injeção, 28 $\mu\text{L s}^{-1}$. AU: ácido úrico.	108
Figura 34. Comparação entre as inclinações obtidas para as correntes de oxidação de SCP em amostras de urina real e sintética (Figura 33).	109
Figura 35. Voltamogramas obtidos para amostra de urina real antes (—) e após a adição de concentrações crescentes de ácido úrico (15, 30 e 45 $\mu\text{mol L}^{-1}$) às soluções contendo 10% (v/v) de amostra em H_2SO_4 0,5 mol L^{-1} . Condições experimentais: Similares à Figura 33	110
Figura 36. Resultados de varreduras sucessivas usando SWV de soluções contendo SCP (20 e 40 $\mu\text{mol L}^{-1}$) em amostras de urina (A) sintética e (B) real, diluídas em H_2SO_4 0,5 mol L^{-1} [10% (v/v)]. Condições experimentais: Similares à Figura 33	111
Figura 37. Varreduras de SWV obtidas para soluções de amostras de urina diluídas 10 vezes (v/v) em H_2SO_4 0,5 mol L^{-1} antes (---) e após (—) a adição de SCP 10 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Condições experimentais: Similares à Figura 33	112

Figura 38. Instrumento de CE utilizado no presente trabalho.	119
Figura 39. Representação do sistema CE utilizado no presente trabalho.	120
Figura 40. Eletroferogramas de solução padrão e amostras (diluídas 10x) contendo 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de SCP. BGE: 50 mmol L^{-1} de CHES ajustado com NaOH 15 mmol L^{-1} (pH = 9,1). Injeção hidrodinâmica: 25 kPa por 1 s; Potencial de separação: +25 kV (lado da injeção); comprimento total e efetivo do capilar: 50 e 10 cm, respectivamente; EOF: normal.	126
Figura 41. Eletroferogramas de solução padrão e amostras (diluídas 10x) contendo 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de SCP. BGE: 20 mmol L^{-1} de borato pH ajustado com NaOH 10 mmol L^{-1} (pH = 9,1). Condições experimentais: Similares à Figura 40	127
Figura 42. Eletroferogramas de solução padrão e amostras (diluídas 10x) contendo 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de SCP. BGE: 20 mmol L^{-1} de HIS ajustado com NaOH 8 mmol L^{-1} (pH = 9,1). Condições experimentais: Similares à Figura 40	128
Figura 43. Eletroferogramas de solução padrão e amostras (diluídas 10x) antes (---) e depois (—) da adição de 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de SCP. Condições experimentais: Similares à Figura 42	129
Figura 44. Eletroferogramas obtidos para injeções de soluções contendo SCP 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$ em diferentes misturas de amostras, na proporção 1:1 (e posteriormente diluídas para 10% v/v em água). (A) solução padrão; (B) whisky + energético; (C) vodka + energético e (D) vodka + Coca-cola®. Condições experimentais: Similares à Figura 42	130
Figura 45. Eletroferogramas de solução padrão contendo 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de SCP para diferentes concentrações de HIS (10; 20 e 30 mmol L^{-1}) no BGE e com o pH ajustado em 9,1 com adição de NaOH. Condições experimentais: conforme descrito na Figura 42	131
Figura 46. Estudo do pH do BGE empregando 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de solução padrão de SCP. BGE: 10 mmol L^{-1} HIS + NaOH (variando o pH de 8,3 - 10). Condições experimentais: conforme descrito na Figura 42	132
Figura 47. Estudo do tempo de injeção utilizando 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de solução padrão de SCP. BGE: 10 mmol L^{-1} HIS + 6,5 mmol L^{-1} NaOH (pH = 9,5). Injeção hidrodinâmica: 25 KPa variando de 0,5 – 2,0 s; potencial de separação: +25 kV (lado da injeção); comprimento total e efetivo do capilar: 50 e 10 cm, respectivamente; EOF: normal.	133
Figura 48. Estudo do potencial de separação utilizando 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de solução padrão de SCP. BGE: 10 mmol L^{-1} HIS + 6,5 mmol L^{-1} NaOH (pH = 9,5). Injeção hidrodinâmica: 25 KPa	

por 1,25 s; potencial de separação variando de +15 - 30 kV (lado da injeção); comprimento total e efetivo do capilar: 50 e 10 cm, respectivamente; EOF: normal.	134
Figura 49. Eletroferogramas obtidos para injeções sucessivas (n = 10) de solução padrão de SCP 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$. BGE: 10 mmol L^{-1} HIS + 6,5 mmol L^{-1} NaOH (pH = 9,5). Condições experimentais: parâmetros otimizados da Tabela 11	135
Figura 50. Eletroferogramas obtidos para injeções sucessivas (n = 10) de soluções contendo SCP 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$ em energético (A) e vodka (B) , com diluição de 10% (v/v), para as duas amostras. Condições experimentais: parâmetros otimizados da Tabela 11	136
Figura 51. Eletroferogramas obtidos em dias diferentes (n = 3) para injeções de solução padrão SCP 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Condições experimentais: parâmetros otimizados da Tabela 11	137
Figura 52. Faixa linear obtida para injeção de soluções com concentrações crescentes de SCP, no intervalo entre 25 e 2000 $\mu\text{mol L}^{-1}$ SCP. Condições experimentais: parâmetros otimizados da Tabela 11	138
Figura 53. Eletroferogramas obtidos a partir de injeções (n = 3) de soluções padrão de SCP, preparadas nas concentrações de 100 - 300 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (a – e), e as respectiva curva de calibração obtida. Condições experimentais: parâmetros otimizados da Tabela 11	139
Figura 54. Comparação dos eletroferogramas obtidos para injeções de soluções contendo SCP (a partir do Buscopan [®]) nas concentrações de (A) 0,1 mmol L^{-1} ; (B) 0,5 mmol L^{-1} e (C) 1,0 mmol L^{-1} em vodka pura. Em destaque: relação entre área do pico e concentração de SCP. Condições experimentais: parâmetros otimizados da Tabela 10	142
Figura 55. Comparação dos eletroferogramas obtidos para injeções de vodka pura após adição do fármaco Buscopan [®] ou do padrão de SCP (200 $\mu\text{mol L}^{-1}$) . Condições experimentais: parâmetros otimizados da Tabela 11	143
Figura 56. Comparação dos eletroferogramas obtidos nos dois detectores (10 e 40 cm de comprimentos efetivos) para injeções de soluções contendo SCP 200 $\mu\text{mol L}^{-1}$, preparadas a partir do Buscopan [®] ou do padrão, em misturas de vodka e energético (1:1). (A e B) misturas dopadas com Buscopan [®] ; (C e D) misturas dopadas com padrão. *Amostras injetadas sem diluição; #amostras injetadas após diluição de 10 vezes. Condições experimentais: parâmetros otimizados da Tabela 11	144

Figura 57. Eletroferogramas de solução contendo urina 10% (v/v) antes (---) e depois (—) da adição de 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de SCP. Condições experimentais: BGE: 20 mmol L^{-1} HIS + 13 mmol L^{-1} NaOH (pH = 9,5). Injeção hidrodinâmica: 25 KPa por 3 s; potencial de separação de +25 kV (lado da injeção); comprimento total e efetivo do capilar: 50 e 10 cm, respectivamente; EOF: normal.	146
Figura 58. Eletroferogramas de solução contendo urina 10% (v/v) antes (---) e depois (—) da adição de 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de SCP. Condições experimentais: BGE: 20 mmol L^{-1} CHES + 13 mmol L^{-1} NaOH (pH = 9,5). Condições experimentais: similares à Figura 57	147
Figura 59. Eletroferogramas de solução contendo urina 10% (v/v) antes (---) e depois (—) da adição de 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de SCP. Condições experimentais: BGE: 20 mmol L^{-1} HIS + DMX 10 mmol L^{-1} + 12 mmol L^{-1} NaOH (pH = 9,0). Injeção hidrodinâmica: 25 KPa por 3 s; potencial de separação de +25 kV (lado da injeção); comprimento total e efetivo do capilar: 50 e 10 cm, respectivamente; EOF: normal.	148
Figura 60. Eletroferogramas de solução contendo urina 10% (v/v) antes (---) e depois (—) da adição de 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de SCP. Com diferentes concentrações de HIS/DMX [20/10 (—); 30/15 (—) e 50/25 mmol L^{-1} (—)] no BGE, respectivamente; pH ajustado em 9,0 com adição de NaOH . Condições experimentais: conforme descrito na Figura 59	149
Figura 61. Estudo do pH do BGE empregando 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de SCP em solução contendo 10% (v/v) de urina real. BGE: 20 mmol L^{-1} HIS + 10 mmol L^{-1} de DMX + NaOH variando o pH de 6,0 – 9,0. Condições experimentais: conforme descrito na Figura 59	150
Figura 62. Estudo do tempo de injeção utilizando 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de SCP em solução contendo 10% (v/v) de urina real. BGE: 20 mmol L^{-1} HIS + 10 mmol L^{-1} de DMX + 12 mmol L^{-1} NaOH (pH = 8,0). Injeção hidrodinâmica: 25 KPa variando de 1,0 – 4,0 s; potencial de separação: +25 kV (lado da injeção); comprimento total e efetivo do capilar: 50 e 10 cm, respectivamente; EOF: normal.	151
Figura 63. Comparação dos eletroferogramas obtidos nos dois detectores para injeções de soluções contendo 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de SCP preparadas com diluições da urina entre 50 e 10% (A – E). Condições experimentais: BGE: 20 mmol L^{-1} HIS + 10 mmol L^{-1} de DMX + 12 mmol L^{-1} NaOH (pH = 8,0). Injeção hidrodinâmica: 25 kPa por 3,0 s; potencial de separação: +25 kV (lado da injeção); comprimento total e efetivo do capilar: 50 e 10 cm, respectivamente; EOF: normal.	153

Figura 64. (A) Eletroferogramas obtidos a partir de injeções ($n = 3$) de soluções padrão de SCP, preparadas em concentrações entre $10 - 200 \mu\text{mol L}^{-1}$ (A – H). (B) Curva de calibração de SCP sem uso de PI. (C) Curva de calibração de SCP com o uso de PI. PI: $\text{Li } 100 \mu\text{mol L}^{-1}$. Condições experimentais: Similares à Figura 63	154
Figura 65. (A) Eletroferogramas obtidos a partir de injeções ($n = 3$) de soluções preparadas em 30% (v/v) de urina real, contendo concentrações crescentes de SCP entre $10 - 200 \mu\text{mol L}^{-1}$ (A – H); (B) Curva de calibração (áreas dos picos vs. concentração de SCP). Condições experimentais: Similares à Figura 63	155
Figura 66. Eletroferogramas obtidos para injeções sucessivas ($n = 10$) de solução padrão de SCP nas concentrações de 15 (A) , 50 (B) e $150 \mu\text{mol L}^{-1}$ (C) , contendo $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ de Li (PI). Condições experimentais: Similares à Figura 63	156
Figura 67. (A) Áreas registradas para o pico de SCP nas concentrações de 15 (▲), 50 (●) e $150 \mu\text{mol L}^{-1}$ (■) em 10 eletroferogramas sucessivos. (B) Valores obtidos após a divisão da área do pico de SCP pela área do pico do PI, para as mesmas soluções.....	156
Figura 68. Eletroferogramas obtidos para injeções sucessivas ($n=10$) de soluções contendo SCP nas concentrações de 15 (A) , 50 (B) e $150 \mu\text{mol L}^{-1}$ (C) preparadas em 30% (v/v) de urina real. Condições experimentais: Similares à Figura 63	157
Figura 69. Áreas registradas para o pico de SCP nas concentrações de 15 (●), 50 (▲) e $150 \mu\text{mol L}^{-1}$ (■) obtidos a partir dos eletroferogramas da Figura 68	157
Figura 70. Eletroferogramas obtidos para injeções sucessivas ($n=10$) de soluções contendo SCP $25 \mu\text{mol L}^{-1}$ e $\text{Li}^+ 100 \mu\text{mol L}^{-1}$ (PI) preparadas em 10% (v/v) de urina real. Condições experimentais: Similares à Figura 63	158
Figura 71. Áreas registradas para os picos de $25 \mu\text{mol L}^{-1}$ SCP (●) e $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ de Li^+ (■) e a área corrigida obtidos a partir dos eletroferogramas da Figura 70 . (▲) Valores obtidos após a divisão da área do pico de SCP pela área do pico do PI, nas concentrações estudadas.	159
Figura 72. (A) Curva de calibração obtida para injeções ($n = 3$) de soluções padrão com concentrações crescentes de SCP entre 10 e $100 \mu\text{mol L}^{-1}$. (B) Curva de calibração obtida após a divisão da área do pico da SCP pelo pico do padrão interno (Li^+ , $100 \mu\text{mol L}^{-1}$).....	160

Figura 73. Eletroferogramas obtidos para injeções ($n = 3$) de soluções contendo 30% (v/v) urina (Amostra 1) e 10% (v/v) para as demais amostras de urina real: **(A)** branco; **(B)** amostra fortificada; **(C - E)** adições de alíquotas de solução padrão de SCP 1 mmol L^{-1} e as respectivas curvas de calibração por adição de padrão. Condições experimentais: Similares à **Figura 63**.
..... 163

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

Ag/AgCl_(sat) – Eletrodo de referência de prata/cloreto de prata, saturado

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

AU – Ácido úrico

ATR – Atropina

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

BGE – Eletrólito de corrida, do inglês, “*Background electrolyte*”

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

BR – Tampão Britton-Robinson

C⁴D – Detecção condutométrica sem contato acoplada capacitivamente, do inglês, “*Contactless Capacitive Coupled Conductivity Detection*”

CAE – Eletroforese capilar por afinidade, do inglês, “*capillary affinity electrophoresis*”

CAF – Cafeína

CE – Eletroforese capilar, do inglês, “*Capillary electrophoresis*”

CEC – Eletrocromatografia capilar, do inglês, “*capillary electrochromatography*”

CGE – Eletroforese capilar em gel, do inglês, “*capillary gel electrophoresis*”

CHES – Ácido (2-ciclohexilamino) etanosulfônico

CIEF – Focalização isoeétrica capilar, do inglês, “*capillary isoelectric focusing*”

CITP – Isotacoforese capilar, do inglês, “*capillary isotachophoresis*”

CV – Carbono vítreo

CVD – Deposição química em fase vapor, do inglês, “*Chemical vapour deposition*”

CZE – Eletroforese capilar de zona, do inglês, “*capillary zone electrophoresis*”

DC – Corrente direta, do inglês, “*direct current*”

DFSA – Crime sexual facilitado por droga, do inglês, “*Drug-facilitated sexual assault*”

DMX – Ácido 3-(3,5-dimetoxifenil) prop-2-enóico

DPV – Voltametria de pulso diferencial, do inglês, “*Differential pulse voltammetry*”

DPR – Desvio padrão relativo, do inglês, “*relative standard deviation*”

e – Carga elementar

E – Campo elétrico

EA – Eletrodo auxiliar

E_p – Potencial de pico

EOF – Fluxo eletrosmótico, do inglês, “*Electroosmotic flow*”

ET – Eletrodo de trabalho

f – Frequência de aplicação dos pulsos de potencial (voltametria de onda quadrada) ou coeficiente de atrito (eletroforese)

FL – Faixa linear

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

GC-MS – Cromatografia gasosa com detecção por espectrometria de massas, do inglês, “*Gas chromatography coupled with mass spectrometry detection*”

GHB – Ácido gamahidroxibutírico

HEPES - Ácido N-2-hidroxietil piperazina-N'-2-etanossulfônico

HIS – L-Histidina

HPLC-UV – Cromatografia líquida de alta eficiência, do inglês, “*High performance liquid chromatography with ultraviolet detection*”

HPLC-DAD – Cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por arranjo de diodos, do inglês, “*High-performance liquid chromatography coupled with photodiode array detection*”

HPLC-EC – Cromatografia líquida de alta eficiência com detecção eletroquímica, do inglês, “*High-performance liquid chromatography coupled with electrochemical detection*”

HPLC-MS – Cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por espectrometria de massas, do inglês, “*High-performance liquid chromatography coupled with mass spectrometry detection*”

I_C – Corrente capacitiva

I_F – Corrente faradaica

INMETRO - Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia

I_p – Corrente de pico

LD – Limite de detecção

L_{ef} – Comprimento efetivo do capilar

LQ – Limite de quantificação

MEKC – Cromatografia eletrocinética micelar, do inglês, “*micellar electrokinetic chromatography*”

MSTFA – N-metil-N-trimetilsilil-trifluoroacetamida

PI – Padrão interno

r – Raio de Stokes

SCE – Eletrodo de calomelano saturado, do inglês “*Saturated calomel electrode*”

SCP - Escopolamina

SPE – Eletrodos impressos, do inglês, “Screen printed electrodes”

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

t_{eof} – Tempo de migração do fluxo eletrosmótico

t_m – Tempo de migração da espécie

t_R – Tempo de retenção

TRIS – Tris-(hidroximetil)-aminometano

U.A. – Unidade arbitrária

UV-VIS – Ultravioleta / Visível

VC – Voltametria cíclica

W – Largura de base do pico

$W_{1/2}$ – Largura de pico a meia altura

z – Número de cargas

a – Amplitude de aplicação dos pulsos de potencial

α – Coeficiente de transferência de elétrons

ΔE_s – Incremento de varredura de potencial

ϵ_0 – Permitividade do vácuo

ϵ_s – Permitividade da solução

ζ – Potencial zeta

\varnothing – Diâmetro

η – viscosidade dinâmica

μ_{ef} – mobilidade efetiva

μ_{eo} – mobilidade eletrosmótica

μ_{ep} – Mobilidade eletroforética

v – Velocidade de varredura

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Comparação entre resultados de FL, LD e LQ para detecção de SCP por diferentes técnicas.	36
Tabela 2. Características dos materiais de carbono utilizados como eletrodos.	37
Tabela 3. Reagentes utilizados no presente trabalho e suas respectivas procedências.	56
Tabela 4. Composição das amostras de bebida analisadas no presente trabalho.	58
Tabela 5. Alíquotas de solução contendo SCP 1 mmol L ⁻¹ utilizadas para o estudo de linearidade para oxidação de SCP nas amostras de bebida estudadas.	67
Tabela 6. Faixa Linear (F.L) e inclinações obtidas para as amostras estudadas.	91
Tabela 7. Parâmetros analíticos do método BIA-SWV proposto para a detecção de SCP nas amostras de bebida (n=3).	104
Tabela 8. Resultados obtidos nos estudos de adição e recuperação para amostras dopadas com SCP usando o método BIA-SWV (n=3).	107
Tabela 9. Reagentes utilizados no presente trabalho e suas respectivas procedências.	117
Tabela 10. Parâmetros experimentais otimizados do método CE-C ⁴ D.	135
Tabela 11. Parâmetros analíticos do método CE-C ⁴ D proposto.	139
Tabela 12. Resultados obtidos para a determinação (n=3) de SCP em bebidas por CE-C ⁴ D.	140
Tabela 13. Resultados obtidos para a determinação (n=3) de SCP em bebidas por CE-C ⁴ D, usando BGE HIS 20 mmol L ⁻¹ + 13 mmol L ⁻¹ NaOH (pH = 9,5).	141
Tabela 14. Resultados obtidos para a determinação de SCP em bebidas por CE-C ⁴ D empregando Buscopan [®] como adulterante (n=3).	145
Tabela 15. Parâmetros analíticos do método CE-C ⁴ D proposto.	161
Tabela 16. Resultados obtidos para a determinação (n=3) de SCP em urina por CE-C ⁴ D. ..	161
Tabela 17. Resultados obtidos para a determinação (n=3) de SCP em urina por CE-C ⁴ D, com correção dos picos da SCP pelo P.I.	162
Tabela 18. Resultados obtidos para a determinação (n=3) de SCP em urina por CE-C ⁴ D, usando o método de adição de padrão.	164

Sumário

1	INTRODUÇÃO	28
1.1	Contextualização.....	28
1.2	Escopolamina	30
1.2.1	Métodos de determinação de SCP em matrizes diversas	32
1.3	Eletrodos de diamante dopado com boro	37
1.4	Voltametria de onda quadrada	41
1.5	Análise por injeção em batelada	42
1.6	Eletroforese Capilar	44
1.6.1	Breve histórico	44
1.6.2	Fundamentação teórica da eletroforese capilar de zona (CZE).....	45
1.6.3	Deteção condutométrica sem contato acoplada capacitivamente (C ⁴ D)	48
1.7	Validação dos parâmetros analíticos dos métodos	50
1.7.1.1	Repetibilidade.....	51
1.7.1.2	Sensibilidade	51
1.7.1.3	Limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ)	52
1.7.1.4	Recuperação	52
1.7.1.5	Resolução	53
 PRIMEIRA PARTE – DETERMINAÇÃO VOLTAMÉTRICA DE		
ESCOPOLAMINA EM AMOSTRAS DE BEBIDAS E URINA		54
2	OBJETIVOS.....	55
3	MATERIAIS E MÉTODOS.....	56
3.1	Soluções, reagentes e preparação das amostras.....	56
3.1.1	Preparo das amostras de bebida.....	57
3.1.2	Preparo das amostras de urina	59

3.2	Instrumentação	59
3.2.1	Detecção voltamétrica	60
3.2.1.1	Eletrodo de trabalho	60
3.2.1.2	Eletrodo de referência e eletrodo auxiliar	60
3.2.1.3	Célula eletroquímica para medidas estacionárias.....	61
3.2.1.4	Sistema BIA	61
3.3	Procedimento Experimental	63
3.3.1	Escolha do eletrólito de suporte	63
3.3.2	Efeito do Pré-tratamento do BDD	63
3.3.3	Estudo de velocidade de varredura.....	64
3.3.4	Correção da linha base	64
3.3.5	Otimização dos parâmetros da técnica de Voltametria de Onda Quadrada	65
3.3.6	Estudo de diluição e avaliação da faixa linear para oxidação da SCP nas amostras.....	66
3.3.7	Estudos de otimização do volume e da velocidade de injeção (BIA)	67
3.3.8	Estudo da faixa linear para SCP nas amostras de bebida utilizando o sistema BIA	68
3.3.9	Quantificação de SCP nas amostras de bebidas	68
3.3.10	Aplicação da metodologia a amostras de urina real e sintética.....	68
4	RESULTADOS E DISCUSSÕES	69
4.1	Parte I - Determinação de SCP em bebidas e urina empregando voltametria de onda quadrada	69
4.1.1	Estudos iniciais do comportamento eletroquímico da SCP por voltametria cíclica.....	69
4.1.2	Estudos de otimização dos parâmetros de voltametria de onda quadrada	76
4.1.2.1	Incremento de varredura de potenciais (ΔE_s).....	77
4.1.2.2	Amplitude dos pulsos de potenciais (a)	78
4.1.2.3	Frequência de aplicação dos pulsos de potencial (f)	80
4.1.2.4	Estudos sobre os componentes de corrente e a reversibilidade.....	82
4.1.3	Estudo para detecção e quantificação de SCP nas amostras de bebidas	85
4.1.3.1	Estudo da diluição e faixas lineares de resposta em diferentes amostras de bebidas.....	85

4.1.3.2	Estudo da repetibilidade	91
4.1.3.3	Quantificação de SCP nas amostras de vodka e whisky pelo método da adição de padrão	93
4.2	Parte II - Determinação de SCP em bebidas e urina empregando o sistema BIA com detecção por voltametria de onda quadrada (BIA-SWV)	95
4.2.1	Otimização do volume e da velocidade de injeção	96
4.2.2	Triagem de SCP nas amostras de bebida.....	97
4.2.3	Faixas lineares para a SCP em amostras de bebidas usando o sistema BIA-SWV	100
4.2.4	Estudo da repetibilidade na detecção de SCP em amostras de bebidas usando o sistema BIA-SWV	102
4.2.5	Quantificação de SCP em amostras de bebidas.....	105
4.2.6	Faixas lineares para as amostras de urina real e sintética.....	107
4.2.7	Estudo da repetibilidade na detecção de SCP em amostras de urina	110
4.2.8	Triagem de SCP nas amostras de urina	111
5	CONCLUSÕES PARCIAIS	114
	SEGUNDA PARTE - DETERMINAÇÃO DE ESCOPOLAMINA EM AMOSTRAS DE BEBIDAS E URINA EMPREGANDO ELETROFORESE CAPILAR.....	115
6	OBJETIVOS.....	116
7	MATERIAS E MÉTODOS	117
7.1	Soluções, reagentes e preparação das amostras.....	117
7.1.1	Preparo das amostras de bebida.....	118
7.1.2	Preparo das amostras de urina	118
7.2	Instrumentação	119
7.2.1	Eletroforese capilar.....	119
7.3	Procedimento Experimental	121
7.3.1	Escolha do BGE	121

7.3.2	Estudo da composição do BGE	121
7.3.3	Estudo da otimização do tempo de injeção e do potencial de separação	122
7.3.4	Estudo da diluição para as amostras de urina.....	122
7.3.5	Estudo da repetibilidade	122
7.3.6	Estudo da faixa linear	123
7.3.7	Aplicação da metodologia proposta às amostras de bebida e urina	123
7.3.8	Estudos de comparação entre amostras fortificadas com o padrão e com o medicamento contendo SCP.....	123
7.3.9	Quantificação de SCP na urina pelo método da adição de padrão	124
8	RESULTADOS E DISCUSSÕES	125
8.1	Parte I - Determinação de SCP em bebidas empregando eletroforese capilar com detecção condutométrica sem contato (CE-C⁴D).....	125
8.1.1	Escolha do BGE para a determinação de SCP por CE-C ⁴ D em bebidas	126
8.1.2	Otimização do tempo de injeção e do potencial de separação	132
8.1.3	Estudo da repetibilidade para solução padrão e amostras de vodka e energético	135
8.1.4	Estudo da faixa linear e curva de calibração para a determinação de SCP em bebidas por CE-C ⁴ D.	137
8.1.5	Aplicação do método proposto à análise de bebidas adulteradas com o medicamento Buscopan®	141
8.1.6	Quantificação de SCP em amostras de bebidas dopadas com Buscopan®	144
8.2	Parte II - Determinação de SCP em urina real empregando CE-C⁴D	145
8.2.1	Estudo da composição e do pH do BGE	146
8.2.2	Estudo do tempo de injeção.....	151
8.2.3	Estudo da diluição da amostra.....	152
8.2.4	Estudo das faixas lineares de resposta para SCP em solução padrão e na urina	154
8.2.5	Estudo da repetibilidade para SCP em solução padrão e amostra.....	155
8.2.6	Curva de calibração e quantificação da SCP nas amostras de urina	159
8.2.7	Quantificação de SCP nas amostras de urina usando o método da adição de padrão	162

9	CONCLUSÕES PARCIAIS	165
10	CONCLUSÕES GERAIS	166
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	168
	ATIVIDADES REALIZADAS DURANTE O DOUTORADO	188

1 Introdução

1.1 Contextualização

A adição criminosa de substâncias incapacitantes a bebidas é comumente definida, no Brasil, como “Boa noite, Cinderela”. Termos como DFSA (do inglês, “*drug-facilitated sexual assault*”), *drink spiking* e/ou *date rape* são utilizados para designar a mesma prática em diversas partes do mundo. As substâncias adicionadas são conhecidas como drogas facilitadoras de crimes, ou ainda, como drogas facilitadoras de estupros, uma vez que a vítima não apresenta capacidade de resistir à roubos ou práticas sexuais não consentidas (DEVORE; SACHS, 2011).

Em um cenário típico, o agressor adiciona a droga de estupro à bebida (alcoólica ou não) de uma pessoa, que é subsequentemente roubada ou abusada sexualmente sob a influência dessa substância. Na maioria das vezes, logo após a administração da droga, ocorre a amnésia - presumivelmente, esta é a principal razão para a seleção de substâncias como droga para estupro. Os sintomas relatados pelas vítimas desse crime incluem confusão, tontura, sonolência, julgamento prejudicado, amnésia, falta de controle muscular, perda de consciência, inibições reduzidas, náusea, hipotensão e bradicardia (BERTOL *et al.*, 2018). Diversos fármacos e drogas ilícitas podem ser utilizados com essa finalidade, de modo que os efeitos adversos (dose-dependentes) podem ser aumentados mediante ingestão de bebidas alcoólicas, e em alguns casos, até mesmo confundidos com embriaguez excessiva.

A Secretaria de Segurança Pública do Estado de São Paulo (SSP-SP) registrou 123 casos, entre janeiro de 2016 a agosto de 2017, sendo que a maioria das queixas (93%, 114 casos) foram apresentadas por homens, referindo-se aos crimes de roubo e/ou furto. Apenas 6% dos casos, o equivalente a sete registros de boletins de ocorrência, foram feitos por mulheres, e cinco delas (71%) sofreram estupro após o golpe. Tais dados podem indicar que, devido à natureza do abuso sofrido, muitas mulheres sentem medo e/ou vergonha de prestar queixa, devido, principalmente à cultura de culpabilização da vítima de violência sexual. (PAULO, 2017).

Entretanto, esse problema não é exclusivo da realidade nacional. Nos últimos anos, tem havido um número crescente de relatos de casos de DFSA na Espanha (CABALLERO; JORGE; LANDEIRA, 2017), na Holanda (BOSMAN; VERSCHRAAGEN; LUSTHOF, 2011), nos Estados Unidos (BERTOL *et al.*, 2018; GAENSSLEN *et al.*, 2010), no Reino Unido (ANDERSON; FLYNN; PILGRIM, 2017), na Irlanda (MCBRIERTY; WILKINSON;

TORMEY, 2013) e na Austrália (HURLEY; PARKER; WELLS, 2006), onde foi manifestada séria preocupação quanto à recorrência observada no papel significativo que drogas e álcool desempenham no envolvimento de pessoas em atividade sexual sem consentimento.

Muitas vítimas não relatam o incidente até vários dias depois do evento ou mesmo não o relatam em absoluto. A razão para isso pode ser uma combinação de emoções características das vítimas de agressão sexual (incluindo constrangimento, medo, rejeição, negação, desconfiança nas autoridades), além das propriedades hipnóticas e amnésicas sedativas das drogas (HALL; MOORE, 2008). Alucinações causadas pela substância dopante (ou pela mistura de substâncias) se misturam com a realidade e as vítimas, muitas vezes, não conseguem fornecer bons relatos como testemunha dos ataques. Na maioria das vezes, vestígios da presença de um dos fármacos de estupro ou seus metabólitos nos fluidos corporais (ou nos cabelos, dependendo do tempo passado entre o crime e a realização da queixa) são a única evidência contra um perpetrador (ADAMOWICZ; KAŁA, 2010).

A maioria das agressões sexuais tem sido associada ao consumo abusivo de álcool (SLAUGHTER, 2000). Nos últimos anos, no entanto, tem havido uma atenção crescente na literatura para pessoas que usam outras drogas para deixar suas vítimas inconscientes ou reduzir seu nível de resistência com o objetivo de roubá-las e/ou atacá-las sexualmente. Além do álcool, os medicamentos mais frequentemente utilizados como DFSA são GHB (ácido gama-hidroxibutírico), flunitrazepam e cetamina, embora outros benzodiazepínicos e sedativos-hipnóticos, como barbitúricos, opioides, anti-histamínicos e anticolinérgicos também sejam utilizados (BECHTEL; HOLSTEGE, 2007). Essas drogas compartilham características semelhantes para produzir sedação, hipnose e amnésia. Estes efeitos muitas vezes incapacitam rapidamente as vítimas e os efeitos podem ser intensificados quando são voluntariamente ou involuntariamente ingeridos com álcool. Por causa das propriedades sedativas e amnésicas dessas drogas, as vítimas muitas vezes não têm memória de um ataque, apenas uma consciência ou sensação de que foram violadas (GRELA; GAUTAM; COLE, 2018).

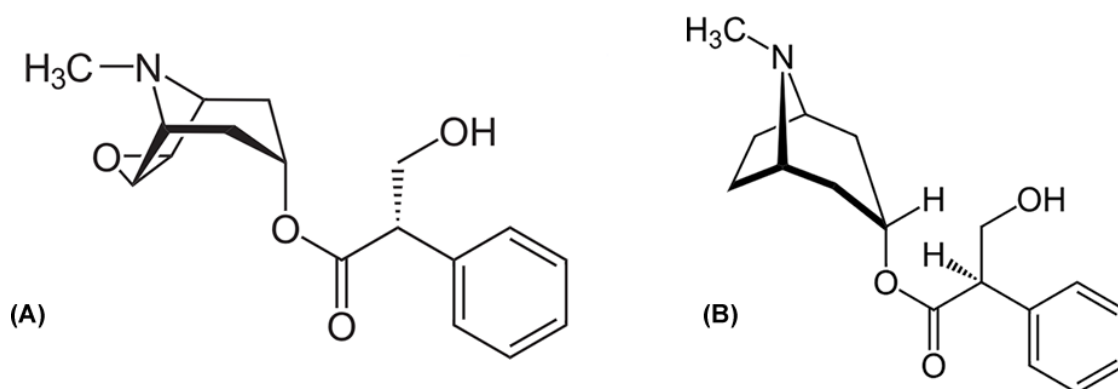
A comercialização de fármacos benzodiazepínicos exige prescrição médica, e drogas como GHB e cetamina são ilegais, de modo que certa dificuldade pode ser encontrada para a aquisição dessas substâncias. Anti-histamínicos e anticolinérgicos, entretanto, podem ser adquiridos sem nenhum tipo de controle, de modo que esses compostos, por causarem sonolência e agirem rapidamente, podem ser utilizados como substitutos na aplicação criminosa do “*Boa noite, Cinderela*”.

1.2 Escopolamina

A escopolamina ($C_{17}H_{21}NO_4$, SCP), juntamente com a atropina ($C_{17}H_{23}NO_3$, ATR), **Figura 1**, são agentes anticolinérgicos da classe dos alcaloides, presentes em diversas plantas da família *Solanaceae*, cujas representantes mais conhecidas são a *Datura stramonium* e a *Atropa belladonna* (STEENKAMP *et al.*, 2004). As plantas do gênero *A. belladonna* contém alcaloides tropânicos tóxicos em todas as partes. As partes mais perigosas, em termos de intoxicação acidental, são as bagas, devido à sua aparência atraente e sabor adocicado (KUETE, 2014; NELSON *et al.*, 2007). Além da *Atropa*, as espécies *Datura* contendo alcaloides tropânicos tóxicos também estão frequentemente envolvidas em envenenamentos. Plantas do gênero *Datura* são frequentemente utilizadas por suas propriedades alucinógenas (CALIGIANI *et al.*, 2011; HARPER-LEATHERMAN; MIECZNIKOWSKI, 2012).

Em 1819, Carl Friedrich Wilhelm Meissner (que inicialmente cunhou o termo alcaloide) foi o primeiro a perceber que os princípios ativos dessas plantas venenosas são de caráter alcalino e, portanto, podem ser isolados por técnicas de extração e, consequentemente, compostos alcaloides individuais começaram a ser isolados a partir de 1830: ATR da *Atropa belladonna* e hiosciamina de *Hyoscyamus niger* L. (por K. Mein, PL Geiger, K. Hesse, entre 1831 e 1833), seguida pela SCP (GRYNKIEWICZ; GADZIKOWSKA, 2008).

Figura 1. Fórmulas estruturais da escopolamina (A) e da atropina (B) encontradas comumente nas plantas da família *Solanaceae*.



Fonte: Adaptado de SWAIN, 2012.

Nos últimos anos, o uso de drogas fitoterápicas com propriedades psicoativas tornou-se cada vez mais popular entre usuários de drogas ilícitas (BEYER; DRUMMER; MAURER,

2009). A suposição de menor toxicidade de drogas fitoterápicas de abuso em comparação com drogas sintéticas simplesmente não é verdadeira. As plantas contêm, frequentemente, elevadas concentrações de compostos farmacologicamente ativos. Overdoses devido a um abuso de materiais vegetais podem ocorrer, particularmente, após o consumo de *A. belladonna* (DEFRADES *et al.*, 2005; HARPER-LEATHERMAN; MIECZNIKOWSKI, 2012) e *D. stramonium* (NELSON *et al.*, 2007; STEENKAMP *et al.*, 2004). Diversos casos clínicos envolvendo incidentes desse tipo são relatados na literatura (BALÍKOVÁ, 2002; CORALLO; WHITFIELD; WU, 2009; HARPER-LEATHERMAN; MIECZNIKOWSKI, 2012; KINTZ *et al.*, 2006; LAUWERS *et al.*, 1983; MARNEROS; GUTMANN; UHLMANN, 2006; NIKOLAOU *et al.*, 2012; NOGUÉ *et al.*, 1991, 1995; STEENKAMP *et al.*, 2004).

A síntese industrial dos alcaloides tropânicos só foi possível depois de 1917, quando R. Robinson sintetizou um produto de oxidação da atropina, a tropinona, através da síntese do sistema de anéis tropânicos (MAIRINK, 2013). A tropinona é um alvo sintético fundamental para numerosos alcaloides tropânicos como, por exemplo, da cocaína, um dos alcaloides com esqueleto tropânico mais conhecidos, tanto pelo seu efeito anestésico como pelo seu uso ilícito (MARTINEZ; ALMEIDA; PINTO, 2009).

A SCP é utilizada, na clínica médica, para combater enjoos e como adjuvante da anestesia para produzir sedação. A SCP produz um grau de sedação mais elevado do que a atropina, devido ao maior grau de penetração no sistema nervoso central (SNC). A alta potência, o rápido início de ação e os efeitos amnésicos da SCP levaram a sua inclusão nos testes para casos de DFSA (NEGRUSZ; JUHASCIK; GAENSSLEN, 2005) e também em testes para simular os efeitos cognitivos de doenças degenerativas, como demência (EBERT *et al.*, 1998; MINTZER; KLEYKAMP; GRIFFITHS, 2010). Os principais efeitos clínicos da SCP são sintomas anticolinérgicos clássicos, como pupilas dilatadas (midríase), boca seca, alucinações e fala arrastada. Outros efeitos clínicos são taquicardia, vômitos, confusão e amnésia. Doses elevadas podem resultar em coma, convulsões e morte. O início dos sintomas clínicos é rápido (dentro de 15 a 30 minutos) e a duração dos efeitos pode durar até 2 a 3 dias, dependendo da dose administrada (BECHTEL; HOLSTEGE, 2007).

A SCP é um alcaloide anticolinérgico (ou parassimpaticolítico) que após administração por via oral, dérmica, ou intravenosa, apresenta pico de concentração sérica 30 minutos após a ingestão, de modo que até 30% do fármaco é excretado na urina sem alteração. As doses administradas com finalidades terapêuticas apresentam valores inferiores a 10 mg de SCP, de modo a que dose terapêutica máxima diária é raramente atingida. Além disso, a ingestão de

grandes quantidades de SCP aumenta a eliminação da mesma na urina, sem nenhuma modificação (RENNER; OERTEL; KIRCH, 2005), o que possibilita a detecção do fármaco e seus metabólitos nessa matriz, como relatado por diversos autores (BAYNE; TAO; CRISOLOGO, 1975; CHEN *et al.*, 2005; LUSTHOF *et al.*, 2017; NIKOLAOU *et al.*, 2012; PUTCHA *et al.*, 1989; WHELPTON *et al.*, 1992).

1.2.1 Métodos de determinação de SCP em matrizes diversas

Diversos trabalhos na literatura relatam a quantificação de SCP em diferentes matrizes, desde amostras mais simples como formulações farmacêuticas até em amostras mais complexas como fluidos biológicos, empregando técnicas de separação. Como o intuito dessa tese envolve a determinação do composto em amostras de bebida e urina usando voltametria e eletroforese capilar, os trabalhos que utilizam esses métodos, seja em fármacos ou em amostras de fluidos biológicos serão discutidos em detalhes a seguir.

A determinação de SCP em amostras de urina, após administração através adesivos cutâneos, foi realizada por HPLC com detecção eletroquímica por Whelpton *et al.*, (1992) após realização de etapas “*clean-up*” e pré-concentração em fase sólida utilizando colunas C₁₈ (após pré tratamento alcalino) e CN (cianopropil). Utilizando metanol:acetonitrila:NH₄NO₃ pH 9,3 (20:70:10) como fase móvel, o tempo de retenção (t_R) apresentado pelo pico da SCP foi de aproximadamente 11 minutos, o limite de detecção (LD) e o limite de quantificação (LQ) obtido foram de 1 e 2 ng/mL, respectivamente, com recuperação entre 87,7 e 93,2%.

A determinação de SCP em amostras farmacêuticas e em fluidos biológicos foi realizada utilizando HPLC-UV por Papadoyannis *et al.*, (1994). O procedimento de tratamento das amostras (soro sanguíneo e urina) consistiu na precipitação das proteínas com acetonitrila, extração/clean-up através de colunas C₁₈, remoção do analito retido com metanol acidificado com HCl 0,01 mol L⁻¹ e, finalmente, evaporação do solvente com N₂. A fase móvel era composta por acetato de amônio 0,05 mol L⁻¹:metanol:acetonitrila (42:38:20 v/v), em eluição isocrática, com t_R de 7,3 minutos para o pico da SCP. Os valores de recuperação para SCP foram entre 95 e 115% nas amostras de urina e entre 94 e 105% nas amostras de soro sanguíneo, com LD de 180 µg/mL.

Um sistema composto por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas operando no modo *tandem* (GC-MS/MS) com ionização química foi utilizado por Oertel *et al.*,

(1996) para determinação de SCP no soro sanguíneo de voluntários saudáveis, após extração líquido-líquido (com diclorometano). Após evaporação do solvente orgânico foi realizada a derivatização do analito e do padrão interno (mexiletina, $C_{11}H_{17}NO$) com N-metil-N-trimetilsilil-trifluoroacetamida ($C_6H_{12}F_3NOSi$, MSTFA). O tempo de retenção para a SCP (derivatizada) foi de 6,5 minutos, com tempo de 14 minutos para o reestabelecimento da temperatura do forno entre as injeções. A recuperação média de SCP nas amostras de soro foi de 80% e o LD foi de 50 ng/mL.

Pouco depois, Bosman *et al.*, (1997) relataram a quantificação de SCP em soro sanguíneo e urina após utilização de adesivos transdermais empregando um ensaio radioreceptor. Um ensaio radioreceptor baseia-se na competição entre a espécie a ser analisada e um ligante marcado com um isótopo, no caso N-metil-escopolamina, marcada com trítio (H^3) por sítios em receptores muscarínicos, provenientes de uma suspensão com células liofilizadas. O pré-tratamento da amostra consistiu no uso de um método semiautomatizado de extração em fase sólida utilizando colunas de sílica gel com posterior hidrólise da SCP com enzima beta glucunoridase por 10 horas. A elevada especificidade do ensaio radioreceptor possibilitou LDs de $0,00153 \mu\text{mol L}^{-1}$ para as amostras de urina e $0,0004 \mu\text{mol L}^{-1}$ para as amostras de soro sanguíneo.

A determinação de SCP (e outros alcaloides tropânicos) em extrato vegetal, soro sanguíneo e urina empregando GC-MS foi relatada por Namera *et al.*, (2002). Antes das análises, as amostras foram submetidas a extração em fase sólida em colunas Extrelut[®] (NT20), das quais foram eluídas com diclorometano. Os alcaloides foram então derivatizados à compostos contendo o grupamento trimetilsilano, com a finalidade de aumentar a termolabilidade. O pico cromatográfico da SCP apresentou $t_R = 13,7$ minutos. Os resultados de recuperação foram superiores à 80% para SCP, que apresentou LD de $0,0139 \mu\text{mol L}^{-1}$ em amostras biológicas (soro sanguíneo e urina).

Amostras do estômago (e seu conteúdo), fígado e rins de uma vítima de infarto, e sementes das plantas do gênero *D. stramonium* e *D. ferox* foram analisadas por Steenkamp *et al.*, (2004) empregando um sistema HPLC-DAD/MS. As amostras foram homogeneizadas em tampão fosfato (pH 7,0) antes da extração em fase sólida. Os alcaloides foram eluídos das colunas utilizando metanol. A fase móvel para a separação cromatográfica era composta por acetonitrila:acetato de amônio 10 mmol L^{-1} pH 10,5 (10:90 v/v). O t_R apresentado pelo pico de SCP foi de 20,02 minutos. O LD calculado utilizando o detector DAD foi de $2,77 \mu\text{mol L}^{-1}$, enquanto para o sistema de detecção por espectrometria de massas, o LD foi de $0,00028 \mu\text{mol L}^{-1}$.

A detecção de SCP em amostras farmacêuticas e biológicas utilizando eletrodos de Pt e voltametria de pulso diferencial (DPV) foi relatada por Farhadi e Karimpour, (2007). O comportamento eletroquímico da SCP foi avaliado utilizando as técnicas de voltametria cíclica, voltametria com eletrodo de disco rotatório e coulometria a potencial controlado. Após cada varredura realizada, o eletrodo era condicionado em NaOH 0,1 mol L⁻¹ para renovação superficial (30 s). Além disso, os resultados apresentados pelos autores apontam para a oxidação do contra-íon Br⁻, e, portanto, trata-se de um método de quantificação indireto. A determinação de SCP nas amostras de fluidos biológicos foi realizada após remoção das proteínas com acetonitrila. Os valores de recuperação obtidos foram (96,0 ± 2,1)% para as amostras de soro sanguíneo e (93,0 ± 2,6)% para as amostras de urina, com LD de 0,2 µmol L⁻¹.

Um sistema CE-C⁴D portátil foi empregado por Sáiz *et al.*, (2013) para a avaliação qualitativa da presença de SCP em amostras de bebidas e produtos de beleza utilizando como eletrólito de corrida (BGE) uma solução composta por 10 mmol L⁻¹ HEPES (ácido N-2-hidroxietil piperazina-N'-2-etanossulfônico) / TRIS (tris-(hidroximetil)-aminometano), (pH = 7,6). Em função do comprimento efetivo do capilar empregado (65 cm), o tempo de análise para SCP foi de 3,5 minutos. Adicionalmente, entre uma corrida e outra, o capilar necessitava ser recondicionado por 4 minutos a fim de manter a estabilidade na linha base registrada pelo sistema.

No trabalho desenvolvido por Afkhami, Shirzadmehr e Madrakian, (2014), um sensor potenciométrico de pasta de carbono foi modificado com um compósito de nanotubos de carbono de paredes múltiplas e nanopartículas de dióxido de titânio (TiO₂) para a detecção de SCP em amostras farmacêuticas e fluidos biológicos. O eletrodo fabricado apresentou melhor desempenho em termos de sensibilidade, faixa dinâmica de trabalho, limite de detecção e tempo de resposta quando comparado a um sensor fabricado a partir de uma membrana de PVC. O sensor potenciométrico desenvolvido apresentou estabilidade na inclinação na curva de calibração por um período de 20 semanas. Valores de recuperação obtidos foram entre 99 e 102% para as amostras farmacêuticas, entre 96 e 101% para as amostras de soro sanguíneo e entre 96 e 103% para as amostras de urina.

A determinação de SCP em medicamento (na presença de dipirona) foi demonstrada por Marra *et al.*, (2014) utilizando um sistema CE-C⁴D. As amostras foram analisadas em uma única corrida (≤ 1 minuto) usando 10 mmol L⁻¹ de DMX e 12 mmol L⁻¹ de trietanolamina como

BGE (pH = 8,5). Resposta linear ($r \geq 0,993$) foi obtida entre 10 e 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$ para SCP, com recuperação de $(95 \pm 4)\%$ e LD de 2 $\mu\text{mol L}^{-1}$.

A detecção de SCP em medicamento, utilizando voltametria de onda quadrada (SWV) e eletrodo de diamante dopado com boro (BDD) com pré-tratamento catódico foi relatada por Santos *et al.*, (2014). O potencial de pico registrado para a SCP foi de +1,59 V (vs. Ag/AgCl(₃M)) usando uma solução de 0,5 mol L⁻¹ de H₂SO₄ como eletrólito de suporte. Nessas condições, a faixa linear para a SCP foi de 1,0 a 110 $\mu\text{mol L}^{-1}$, o LD de 0,84 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e os valores de recuperação variaram entre 95 e 103%.

Um resumo do levantamento bibliográfico sobre a detecção de SCP é apresentado na **Tabela 1**. Informações sobre o método usado, tipo de amostra analisada e parâmetros analíticos como faixa linear (FL) e limite de detecção (LD) são apresentados.

Tabela 1. Comparação entre resultados de FL, LD e LQ para detecção de SCP por diferentes técnicas.

Método	Amostra*	FL ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	LD ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	REF
CE-UV	Medicamento	2,77 – 347	2,77	(CHERKAOUI <i>et al.</i> , 1997)
CE-C ⁴ D	Bebidas	-	2,6	(SÁIZ <i>et al.</i> , 2013)
HPLC-UV	Medicamento / Fluidos biológicos	5,18 – 388	0,5	(PAPADOYANNIS <i>et al.</i> , 1994)
HPLC-UV	Medicamento	83,2 – 290	2,94	(PARISSI-POULOU; PANDERI, 1999)
CE-C ⁴ D	Medicamento	10 – 50	10	(MARRA <i>et al.</i> , 2014)
Espectrofotometria UV-VIS	Medicamento	2,77 – 55,4	0,44	(GOUDA <i>et al.</i> , 2008)
Espectrofotometria	Medicamento	0,55 – 12,5 (I) 6,94 – 29,1 (II)	-	(ERK; ONUR, 1996)
Espectrofotometria	Medicamento	0,25 – 80	0,083	(TORAL; MUÑOZ; ORELLANA, 2005)
Potenciometria	Medicamento	0,03 – 10000	0,0085	(AFKHAMI; SHIRZADMEHR; MADRAKIAN, 2014)
SWV	Medicamento	1 – 110	0,84	(SANTOS <i>et al.</i> , 2014)
DPV	Medicamento	1 – 1000	0,2	(FARHADI; KARIMPOUR, 2007)
CG-MS	Fluido biológico	0,00028 – 0,011	0,00014	(OERTEL <i>et al.</i> , 1996)
CG-MS	Fluido biológico	0,028 – 13,8	0,0139	(NAMERA <i>et al.</i> , 2002)
CG-MS	Infusão herbal / Fluido biológico	-	0,008	(BALÍKOVÁ, 2002)
HPLC-MS	Sementes / Fluido biológico	0,28 – 28	0,00028	(STEENKAMP <i>et al.</i> , 2004)
HPLC-DAD	Sementes / Fluido biológico	0,28 – 28	2,77	(STEENKAMP <i>et al.</i> , 2004)
HPLC-EC	Urina	0,003 – 0,55	2,6	(WHELPTON <i>et al.</i> , 1992)
Ensaio radioreceptor	Urina	0,0000909 – 0,036	0,00153	(BOSMAN <i>et al.</i> , 1997)
	Soro sanguíneo	0,00006 – 0,03	0,0004	

Fonte: O autor.

1.3 Eletrodos de diamante dopado com boro

Para um material sólido funcionar como um eletrodo, algumas características são necessárias: condutividade elétrica, estabilidade química e eletroquímica em uma ampla gama de condições, rápida transferência de elétrons para uma ampla variedade de sistemas redox e propriedades elétricas, microestruturais e químicas reprodutíveis (STRADIOTTO; YAMANAKA; ZANONI, 2003).

O carbono é o material de eletrodo mais comumente usado na eletroquímica/eletroanalítica e está disponível em uma variedade de microestruturas: grafite, carbono vítreo, fibra de carbono, nanotubos, pós amorfos e diamante, entre outros (GRANGER *et al.*, 1999). O carbono existe em duas estruturas cristalinas distintas: diamante e grafite. O cristal de diamante é cúbico e os átomos de carbono são dispostos em uma configuração tetraédrica com ligação híbrida sp^3 entre eles. Já o grafite consiste em uma estrutura hexagonal com os átomos de carbono dispostos em uma configuração trigonal de ligação híbrida sp^2 . Este arranjo atômico leva à formação de planos de camada ou folhas de grafeno (TAN *et al.*, 2013).

Os materiais de carbono possuem diferentes propriedades químicas em termos microestruturais e superficiais, dependendo do tipo e de como cada um foi processado. Como consequência, as propriedades eletroquímicas podem variar de um material para outro (YANG; FOORD; JIANG, 2016). Entre todos os eletrodos sólidos utilizados na química eletroanalítica, os materiais de carbono são provavelmente os mais desafiadores nessa perspectiva. As características de resistividade e densidade de diferentes materiais de carbono usados como eletrodos são exibidas na **Tabela 2**.

Tabela 2. Características dos materiais de carbono utilizados como eletrodos.

Material	Resistividade (Ωcm)	Densidade (g cm^{-3})
Carbono vítreo (Tokai GC-20)	$4,2 \times 10^{-2}$	1,5
Fibra de carbono	$(5 - 20) \times 10^{-4}$	1,8
Grafite pirolítico altamente orientado	$4,0 \times 10^{-5}$	2,26
Grafite aleatoriamente orientado	$1,0 \times 10^{-3}$	1,8
Diamante natural	$10^{13} - 10^{16}$	3,52
Diamante terminado em hidrogênio - CVD	10^6	3,52
BDD - CVD	$\sim 10^{-2}$	3,52

Fonte: Adaptado de BARROS *et al.*, 2005.

A hibridização sp^3 do carbono resulta em extensa ligação tetraédrica por toda a rede cristalina, levando a muitas propriedades excepcionais do diamante, notadamente a dureza, a condutividade térmica elevada e a resistividade elétrica extremamente alta (KRAFT, 2007). O diamante natural é um material isolante, com um “*bandgap*” de 5,47 eV (a 300 K). Contudo, pode ser dopado com boro (B), o que ocasiona uma diminuição na resistividade (**Tabela 2**) em função da inserção de lacunas, de modo que filmes de diamante com níveis de dopagem de $\sim 10^{20}$ átomos de B cm^{-3} (2.000 a 8.000 ppm) podem ser usados como materiais de eletrodo para diversas aplicações eletroquímicas (EINAGA, 2010; FREITAS *et al.*, 2019; ZOSKI, 2007).

O diamante dopado com boro (BDD, do inglês “*boron doped diamond*”) possui propriedades superiores a outras formas de carbono utilizadas como eletrodo, que incluem: (i) intervalo de potencial de trabalho amplo em solução aquosa; (ii) baixas correntes de fundo (iii) ausência de formação de óxidos na superfície; (iv) cinética relativamente rápida de transferência de elétrons para vários sistemas redox sem pré-tratamento convencional (polimento), (v) baixa adsorção molecular, (vi) estabilidade química e mecânica em ambientes agressivos, e (vii) transparência óptica (ANGUS; PLESKOV; EATON, 2004; RAO; FUJISHIMA, 2000).

A maioria dos filmes de BDD empregados como eletrodos são produzidos por deposição química em fase de vapor (CVD, do inglês “*chemical vapour deposition*”) assistido por plasma de microondas. Isso se deve à eficiência do processo no controle da incorporação de dopantes à rede cristalina e à capacidade de crescer grandes áreas sobre bases condutoras estruturadas (MACPHERSON, 2015). Nesse caso, o plasma de micro-ondas é gerado para ativar uma fonte de gás rica em carbono, produzindo um precursor de crescimento em estreita proximidade com a superfície do substrato condutor, sendo o silício mais comumente utilizado (PLESKOV, 2002). A ausência de impurezas de carbono sp^2 (grafite) é uma característica importante a ser considerada, uma vez que a presença dessa impureza aumenta a corrente de fundo e diminui o intervalo de potencial trabalho. A presença de radicais hidrogênio durante o processo de CVD é essencial porque impede seletivamente a formação de carbono não-diamante (grafite) na superfície do diamante (WATANABE *et al.*, 2014).

O boro é o dopante mais utilizado para produzir BDDs, uma vez que o boro possui energia de ativação como transportador de carga apenas 0,37 eV acima da banda de valência do diamante (HOLT *et al.*, 2004; NEBEL; RISTEIN, 2004). Desse modo, o diamante dopado obtido é um semicondutor extrínseco do tipo-p. Quando um átomo de B ($2s^2 2p^1$) substitui um átomo de C ($2s^2 2p^2$) no retículo cristalino do diamante, uma das ligações C – B é deficiente em um elétron (BRADY; HUMISTON, 2012). Os elétrons ausentes são conhecidos como lacunas

e a condutividade ocorre devido ao movimento dessas lacunas carregadas positivamente através da rede cristalina. Na prática, é um elétron de valência de um átomo vizinho que move-se a fim de preencher essa deficiência, deixando uma lacuna positiva em seu lugar, de modo que a condução elétrica resulta da migração dessas lacunas positivas (OLDHAM; MYLAND; BOND, 2011).

Para inserir átomos de boro no retículo cristalino do diamante durante o crescimento, um reagente contendo boro deve ser adicionado à mistura dos gases de deposição (KRAFT, 2007). O boro pode ser adicionado à mistura de gases de deposição na forma de diborano (B_2H_6) ou trimetilborano ($B(CH_3)_3$). O diborano é o gás mais utilizado, uma vez que o trimetilborano não só adiciona boro à mistura de gases, mas também um carbono extra, o que pode alterar a morfologia do filme obtido e diminuir sua qualidade (BARROS *et al.*, 2005). O boro, eletricamente ativo, é aquele que se insere substitutivamente na rede cristalina crescente. Os filmes tornam-se condutivos através da incorporação de átomos de boro durante a deposição, embora a condutividade elétrica dependa, de forma complexa, dos hidrogênios presentes na rede, dos defeitos existentes e ligações pendentes, além do nível de dopagem (ZOSKI, 2007).

As propriedades eletroquímicas dos eletrodos de BDD podem ser alteradas através de diferentes procedimentos, como a aquecimento em ácido forte (HAYASHI *et al.*, 1997), por polarização anódica ou catódica (GOETING *et al.*, 2000; GRANGER; SWAIN, 1999; ZHANG *et al.*, 2004), tratamento com plasma de hidrogênio (GRANGER; SWAIN, 1999), e também por exposição prolongada ao ar (KULESZA; PATYK; ROZPŁOCH, 2004). Portanto, quando eletrodos BDD são usados, cuidados especiais devem ser adotados para alcançar o melhor desempenho eletroquímico com esse material.

As características físicas, químicas e eletrônicas das superfícies do BDD e, conseqüentemente, sua resposta eletroquímica, são fortemente influenciadas pela terminação da superfície do BDD. Eletrodos de diamante, obtidos pelo método CVD, que foram arrefecidos até à temperatura ambiente em meio de plasma rico em hidrogênio, são terminados com uma monocamada de hidrogênio (COMPTON; FOORD; MARKEN, 2003).

Essas superfícies são inicialmente hidrofóbicas e apresentam uma superfície semelhante a um hidrocarboneto saturado que não é favorável à adsorção de espécies polares. Como consequência, as reações de eletrodos que envolvem a adsorção de intermediários podem ser fortemente inibidas no BDD (PLESKOV, 2000). Em contrapartida, a oxigenação da superfície do BDD pode ser alcançada por vários métodos, incluindo oxidação em fase de vapor rica em

O₂, tratamento com plasma de oxigênio, fervura em ácido forte, exposição à agentes oxidantes ou radiculares, exposição a longo prazo à oxidação por ar e oxidação eletroquímica (ANGUS; PLESKOV; EATON, 2004; PECKOVÁ; MUSILOVÁ; BAREK, 2009).

O último método é muito conveniente para a eletroanálise, pois nenhuma instrumentação específica é necessária, de modo que a oxidação da superfície é simplesmente realizada pelo tratamento anódico do BDD em elevados potenciais positivos ou realização de varreduras cíclicas na faixa de potencial positivo. Sob essas condições, os oxidantes radicais OH• são produzidos a partir da água na superfície do BDD, que precede a evolução do oxigênio com alto potencial anódico no BDD (BRILLAS; MARTÍNEZ-HUITLE, 2011; GIRARD *et al.*, 2007a). A estrutura da superfície do BDD oxidado depende da técnica de oxigenação e do tipo de suporte de Si utilizado. Com base na estrutura do diamante, espera-se que as ligações sp³ C – H sejam terminadas com grupos hidroxila, enquanto as ligações CH₂ convertem-se em grupos funcionais carbonila e éter (BARROS *et al.*, 2005; PECKOVÁ; MUSILOVÁ; BAREK, 2009). A re-hidrogenação de uma superfície de BDD oxidada só é completamente alcançada por tratamento envolvendo plasma rico em hidrogênio (MACPHERSON, 2015).

Vale salientar que inúmeros estudos foram e continuam sendo desenvolvidos a fim de elucidar os fatores que afetam o comportamento eletroquímico dos eletrodos de diamante frente aos diferentes tratamentos superficiais (BALDAN *et al.*, 2013; GIRARD *et al.*, 2007b; KONDO *et al.*, 2007; OLIVEIRA; OLIVEIRA-BRETT, 2010b; PATEL; HASHIMOTO; FUJISHIMA, 1992; PLESKOV *et al.*, 2016, 1987; RAO; FUJISHIMA, 2000; SALAZAR-BANDA *et al.*, 2006; SCHWARZOVÁ-PECKOVÁ *et al.*, 2017; SUFFREDINI *et al.*, 2004; YAGI *et al.*, 1999), bem como a morfologia dos cristais (ALEHASHEM *et al.*, 1995; GRANGER *et al.*, 1999; KROTOVA *et al.*, 2010, 2014; RALCHENKO *et al.*, 2003). Esses estudos envolvem, notadamente, a utilização de pares redox com comportamento eletroquímico bem conhecido, como [Fe(CN)₆]^{3-/4-} e [IrCl₆]^{2-/3-}, e o grau de reversibilidade (representado pela separação entre os picos anódico e catódico) é avaliado com relação à terminação superficial, nível de dopagem e cristalinidade do BDD.

Em função das características mencionadas anteriormente, eletrodos BDD são amplamente utilizados em eletroanálise, principalmente para oxidação de compostos orgânicos em função de seu amplo intervalo de potencial de trabalho na região anódica. Possibilitando, assim, a determinação direta de aminas alifáticas (SHIN *et al.*, 2004), hidrocarbonetos poliaromáticos (BOUVRETTE *et al.*, 2006) e analitos contendo enxofre, como aminotióis e dissulfetos (CHINVONGAMORN *et al.*, 2008), que são raramente detectáveis em eletrodos

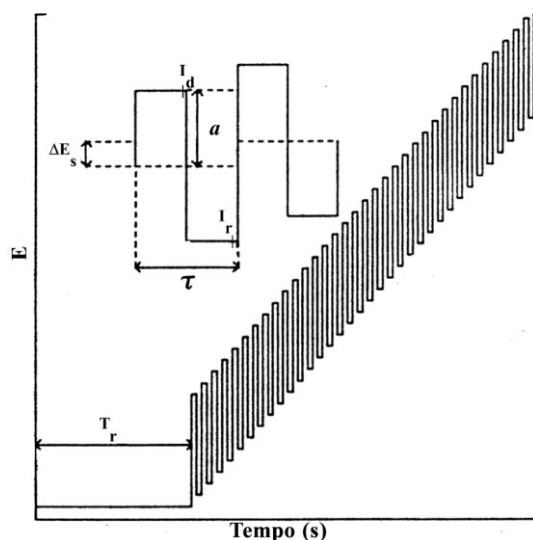
sólidos convencionais não modificados. A outra vantagem é a resistência à contaminação ou a fácil remoção de produtos e/ou subprodutos de reação adsorvidos pela lavagem do BDD com solvente apropriado ou tratamento em alto potencial anódico/catódico. Algumas revisões são encontradas no tocantes à aplicação dos BDD em eletroanalítica (BALUCHOVÁ *et al.*, 2019; FREITAS *et al.*, 2019; HE *et al.*, 2019; MÉNDEZ-TOVAR *et al.*, 2011; PECKOVÁ; MUSILOVÁ; BAREK, 2009). Dentre as técnicas analíticas empregadas, destacam-se as técnicas voltamétricas pulsadas, especialmente a voltametria de onda quadrada, em função da sensibilidade e velocidade características da técnica.

1.4 Voltametria de onda quadrada

Originados historicamente com a polarografia convencional, os métodos de análise voltamétrica incluem vários esquemas de aplicação de pulsos de potencial e de amostragem de corrente, aplicados de modo a discriminar entre processos faradaicos (relacionados à transferência de elétrons) e capacitivos (relacionados ao carregamento e descarregamento da dupla camada elétrica) (MIRCESKI; KOMORSKY-LOVRIC; LOVRIC, 2007). Dentre as técnicas voltamétricas mais utilizadas podemos citar a voltametria cíclica (para obtenção de informações qualitativas e mecanísticas do sistema redox em análise), a voltametria de pulso diferencial (do inglês ‘*differential pulse voltammetry*’, DPV) e a voltametria de onda quadrada (do inglês, ‘*square-wave voltammetry*’, SWV) empregadas com finalidade de estudar os mecanismos de oxidação e para análises quantitativas (DE SOUZA; MACHADO; AVACA, 2003).

Em voltametria de onda quadrada, duas amostragens de corrente consecutivas são coletadas para cada período (τ). O valor de corrente medido após a aplicação do pulso de potencial com amplitude a no sentido positivo ou negativo corresponde à corrente direta, enquanto o valor de corrente medido na segunda metade da etapa corresponde à corrente reversa. A corrente resultante equivale à subtração algébrica entre os valores da corrente direta e reversa. O termo f é a frequência de aplicação dos pulsos de potencial (em s^{-1}) e ΔE_s é o incremento de varredura do potencial (WANG, 2006). Uma representação do esquema de aplicação dos pulsos de potencial em uma varredura de SWV é mostrado na **Figura 2**.

Figura 2. Esquema de aplicação dos pulsos de potencial na voltametria de onda quadrada em função do tempo. Em destaque os parâmetros de amplitude dos pulsos (a), incremento dos pulsos de potencial (ΔE_s) além dos pontos de amostragem das correntes direta (I_d) e reversa (I_r).



Fonte: Adaptado de WANG (2006).

A principal vantagem da voltametria de onda quadrada é sua velocidade. A velocidade efetiva de varredura é dada por $f\Delta E_s$. A natureza diferencial da aplicação dos pulsos de potencial à superfície do eletrodo, aliada à discriminação da corrente capacitiva oriunda desses pulsos, permite que elevadas frequências sejam aplicadas, de modo que o tempo de análise é drasticamente reduzido (BARD *et al.*, 2003). Consequentemente, o voltamograma completo pode ser registrado em poucos segundos. A velocidade inerente da voltametria de onda quadrada pode aumentar grandemente as frequências analíticas em sistemas estacionários e em fluxo. Estudos cinéticos também podem se beneficiar da rápida capacidade de varredura e da natureza reversa da voltametria de onda quadrada (ZOSKI, 2007).

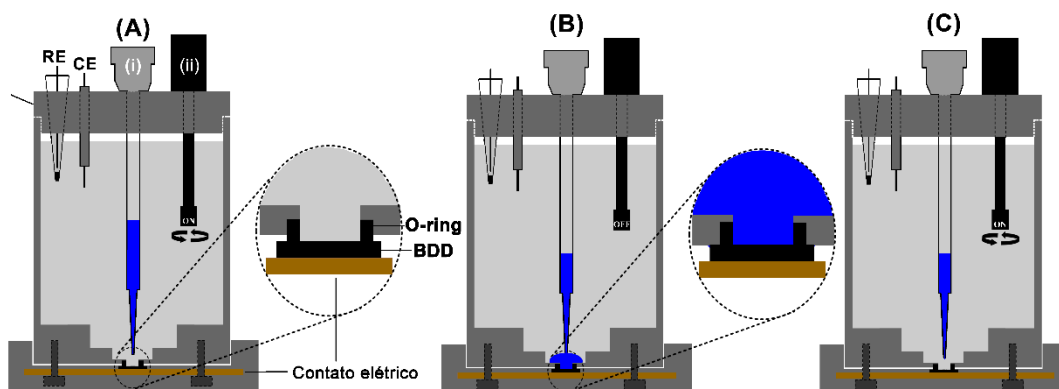
1.5 Análise por injeção em batelada

Inicialmente proposto por WANG e TAHA, (1991) o método de análise por injeção em batelada (BIA, do inglês “*Batch injection analysis*”) consiste na inserção de uma alíquota de amostra ou solução padrão, com volume de injeção entre 20 e 200 μL , com o uso de pipeta eletrônica ou seringa convencional, posicionada em configuração “*wall-jet*” diretamente sobre a superfície do eletrodo de trabalho, que encontra-se imerso em grande quantidade de eletrólito de suporte ($\sim 180\text{ mL}$)(GIMENES *et al.*, 2012; QUINTINO; ANGNES, 2004; WANG *et al.*,

1992). O sistema BIA pode ser conceitualmente comparável ao FIA, porque também se baseia no transporte controlado de uma solução de interesse em direção a um detector (QUINTINO; ANGNES, 2004; TROJANOWICZ *et al.*, 2005). A técnica BIA foi inicialmente e vem sendo mais empregada para a realização de análises amperométricas, de modo que picos transientes, similares aos detectados em FIA, eram registrados pela passagem do analito sobre a superfície do eletrodo de trabalho. Contudo, a aplicação do sistema BIA na redissolução voltamétrica de cátions também foi demonstrada nos trabalhos publicados por Brett *et al.*, (BARBOSA *et al.*, 1996; BRETT *et al.*, 1999; BRETT; BRETT; TUGULEA, 1996a, 1996b).

O procedimento para a realização das varreduras voltamétricas utilizando o sistema BIA difere daquele empregado quando a detecção amperométrica é utilizada, uma vez que o eletrodo não é mantido em potencial fixo, registrando constantemente a corrente detectada. As etapas para a realização de análises voltamétricas no sistema BIA pode ser visualizada na **Figura 3**.

Figura 3. Etapas de operação do sistema BIA, empregando detecção voltamétrica. **(A)** Momento anterior à injeção. **(B)** Realização da injeção, com destaque para a formação do plug de amostra. **(C)** Após a varredura, o eletrólito no interior da célula é agitado, com a diluição do plug de amostra injetado.



Fonte: Adaptado de OLIVEIRA *et al.*, (2016).

Num sistema BIA-SWV (**Figura 3**), as injeções são iniciadas antes da varredura de potencial, ou, em caso de redissolução, durante o tempo de aplicação do potencial de deposição (**Figura 3 (B)**). Ao término da injeção, um pequeno intervalo de tempo (~5 segundos) é aguardado para que a solução próxima ao eletrodo não apresente fluxo turbulento. Após esse período, a varredura de potencial é iniciada. O “plug” de amostra injetado estará em contato imediato com o eletrodo durante a varredura de potenciais. Ao término da varredura de potencial, (**Figura 3 (C)**), o eletrólito de suporte no interior da célula é agitado, de modo que

os componentes do “plug” injetado são diluídos cerca de 1500 vezes (com alíquotas de injeção de 100 ~120 μ L). Após a agitação da solução, a próxima injeção pode ser realizada. Um vídeo demonstrando as etapas de operação do sistema BIA pode ser encontrado online (NUPE IQ-UFU, 2015)

O sistema BIA com detecção por SWV já foi utilizado para a detecção de diversos analitos, além dos metais já mencionados anteriormente, como pesticidas, fármacos e drogas ilícitas ((BRETT *et al.*, 1999; FREITAS *et al.*, 2017; OLIVEIRA *et al.*, 2016; SILVA *et al.*, 2017; SIMÕES; VAZ; BRETT, 2007; TORMIN *et al.*, 2014a, 2015).

1.6 Eletroforese Capilar

1.6.1 Breve histórico

Os experimentos pioneiros de Arne Tiselius, em 1937, demonstraram pela primeira vez, a separação das proteínas do soro sanguíneo, albumina e α -, β -, e γ -globulina utilizando a eletroforese de fronteiras móveis (VESTERBERG, 1989), trabalho pelo qual Tiselius recebeu o prêmio Nobel em 1948. No entanto, esta abordagem à eletroforese foi limitada pela separação incompleta das proteínas, o volume de amostra necessário relativamente grande e a necessidade de campos elétricos relativamente baixos devido às correntes de convecção geradas pelo efeito Joule. Esse estudo forneceu, contudo, a primeira sugestão do uso potencial da separação eletroforética de moléculas biologicamente ativas (WEINBERGER, 2000).

Em 1967, Hjertén apresentou uma tese descrevendo um aparelho para eletroforese de zona livre em um tubo giratório. Isto permitiu estudos de íons (inorgânicos e orgânicos), peptídeos, proteínas, ácidos nucleicos, vírus e bactérias (HJERTÉN, 1967). Além disso, as determinações de mobilidade podiam ser feitas com alta precisão (VESTERBERG, 1989). Em 1974, Virtanen seguiu o trabalho de Hjertén com o uso de tubos de menor diâmetro interno (0,2 mm), o que minimizou problemas de convecção e simplificou o esquema instrumental. Contudo, foi em 1983 que Jorgenson e Lukacs definiram a eletroforese em capilares com diâmetro interno de 75 μ m (WHATLEY, 2003).

Os capilares de sílica fundida empregados na CE geralmente têm um diâmetro interno de 20–100 μ m (~375 μ m de diâmetro externo), comprimentos de 20 – 100 cm, e são revestidos externamente com poliimida, que confere flexibilidade aos capilares. A alta relação superfície-

volume dos capilares com essas dimensões permite uma dissipação eficiente do calor gerado em detrimento do efeito Joule gerado a partir da aplicação de elevados potenciais de separação (até +30 kV)(LANDERS, 2007). Além da capacidade de contornar o efeito Joule eficientemente, utilizando os capilares de eletroforese típicos, em função das dimensões internas reduzidas, pequenos volumes de solução tampão são necessárias para seu total preenchimento, além de volumes de amostra na faixa de nanolitros para a realização das análises (TAVARES, 1996). O uso de volume reduzido de amostra também pode ser uma desvantagem quando o interesse for a determinação de baixas concentrações do analito de interesse.

1.6.2 Fundamentação teórica da eletroforese capilar de zona (CZE)

A CE compreende um conjunto de técnicas relacionadas com diferentes mecanismos de separação. Os principais modos de CE que foram desenvolvidos e estão sendo explorados atualmente incluem eletroforese capilar de zona (CZE); focalização isoeletrica capilar (CIEF); eletroforese capilar em gel (CGE); eletroforese capilar por afinidade (CAE); isotacoforese capilar (CITP); cromatografia eletrocínética micelar (MEKC); e eletrocromatografia capilar (CEC) (LANDERS, 2007).

A CZE é a mais difundida das técnicas eletroforéticas, tendo se mostrado útil para a separação de um conjunto diversificado de analitos, como íons inorgânicos, peptídeos, fármacos e carboidratos. A CZE é caracterizada pelo uso de capilares abertos empregando BGE's de viscosidade relativamente baixa (WHATLEY, 2003). O mecanismo de separação baseia-se nas diferenças entre as mobilidades dos analitos, que migram em eletrólitos que podem ser aquosos ou orgânicos, e conter aditivos, como ciclodextrinas, complexantes ou ligantes, que interagem com os analitos e alteram suas mobilidades eletroforéticas (μ_{ep}) (SILVA *et al.*, 2007).

Durante a realização da separação eletroforética, as espécies iônicas no tampão migram com mobilidade eletroforética (μ_{ep}) determinada pela sua carga/massa. A mobilidade eletroforética (μ_{ep}) de uma espécie carregada pode ser estimada a partir da teoria de Debye–Huckel–Henry, pela **Equação (1)** (TAVARES, 1996):

$$\mu_{ep} = \frac{ze}{6\pi\eta r} \quad \text{Equação (1)}$$

Na qual z é a carga da espécie, e a carga unitária, η a viscosidade da solução tampão (BGE) e r o raio de Stokes da espécie.

Sob condições apropriadas, todas as espécies (de carga líquida negativa, positiva ou neutra) passam através do detector, o que indica que uma força diferente da mobilidade eletroforética está envolvida no movimento dessas espécies. Essa força, o fluxo eletrosmótico (EOF, do inglês “*electroosmotic flow*”), governa o movimento de todos os componentes no capilar em direção ao detector quando sob aplicação de um campo elétrico (LANDERS, 2007).

A dupla camada formada imediatamente entre a superfície do capilar e a solução tampão é denominada camada ou plano interno de Helmholtz e é essencialmente estático. Uma camada mais difusa formada distalmente à camada interna é denominada camada ou plano externo de Helmholtz (TAVARES, 1997). Sob um campo aplicado, os cátions na camada difusa migram na direção do cátodo carregando as águas na esfera de solvatação com eles. Devido à natureza coesiva das ligações de hidrogênio entre as moléculas de água solvatando os íons às moléculas de água do seio da solução e o pequeno diâmetro interno da coluna capilar, toda a solução tampão é arrastada em direção ao cátodo. Portanto, o EOF atua como um mecanismo de bombeamento para impulsionar todas as moléculas (catiônicas, neutras e aniônicas) em direção ao detector, com a separação, em última instância, sendo determinada por diferenças na migração eletroforética dos analitos individuais (WHATLEY, 2003).

Desse modo, tem-se que a velocidade aparente com a qual uma espécie carregada migrará sob a ação de um campo elétrico E é dada pela **Equação (2)** (TAVARES, 1996).

$$v_{ap} = (\mu_{ep} + \mu_{eo})E \quad \text{Equação (2)}$$

Sendo μ_{eo} a mobilidade eletrosmótica, que está relacionada à magnitude do EOF e pode ser calculada pela **Equação (3)** (TAVARES, 1996):

$$\mu_{eo} = -\frac{\varepsilon_s \varepsilon_0 \zeta}{\eta} \quad \text{Equação (3)}$$

Sendo ε_s a permissividade do BGE, ε_0 a permissividade do vácuo, ζ é o potencial zeta da superfície do capilar e η é a viscosidade da solução.

Caso as espécies em análise estejam apenas parcialmente ionizados (ácidos orgânicos fracos, por exemplo), tanto as espécies neutras quanto as que apresentam carga efetiva migram numa única banda, que apresenta mobilidade efetiva (μ_{ef}) dependente do grau de ionização e da mobilidade eletroforética (μ_{ep}), como representada pela **Equação (4)**:

$$\mu_{ef} = \sum_{j=1}^n \alpha_j \mu_{ep} \quad \text{Equação (4)}$$

O EOF permite a separação de cátions, ânions e espécies neutras em uma única corrida. É também o fator mais importante para o surgimento de variações do tempo de migração entre corridas. O EOF é afetado por diversos parâmetros, incluindo pH, concentração e viscosidade do BGE, temperatura, potencial aplicado, além da presença de surfactantes (possibilidade de inversão) em solução (WEINBERGER, 2000).

A inserção das amostras no interior dos capilares pode ser realizada de modo hidrodinâmico ou eletrocinético. A injeção hidrodinâmica, é realizada através da criação de um gradiente de pressão entre os reservatórios da amostra e do eletrólito de corrida, enquanto as extremidades do capilar estão mergulhadas nestes reservatórios. Utilizando a injeção eletrocinética, um determinado valor de potencial é aplicado entre os reservatórios da amostra e eletrólito durante um intervalo de tempo definido (SILVA *et al.*, 2007).

O volume injetado no capilar de forma hidrodinâmica é dado pela **Equação (5)** (TAVARES, 1996).

$$V_{inj} = \frac{\Delta P d^4 \pi t_{inj}}{128 \eta L} \quad \text{Equação (5)}$$

Sendo ΔP a pressão aplicada, d o diâmetro interno do capilar, t_{inj} é o tempo de injeção, η a viscosidade da solução amostra e L o comprimento total do capilar.

A equação que descreve a quantidade de amostra injetada realizando a injeção eletrocinética é calculada pela **Equação (6)** (DESHMANE *et al.*, 2011).

$$Q = \frac{(\mu_{ep} + \mu_{eo})Vr^2\pi t_{inj}}{L} \quad \text{Equação (6)}$$

Sendo V a voltagem aplicada para a injeção das amostras, r é o raio interno do capilar, t_{inj} é o tempo de injeção, e L o comprimento total do capilar.

A injeção hidrodinâmica introduz no capilar uma alíquota representativa da amostra, e o volume de injeção (da ordem de nL) depende do tempo de injeção, das dimensões do capilar, da viscosidade da solução tampão e da diferença de pressão empregada. Em função dessas características, a injeção hidrodinâmica é mais precisa do que a eletrocinética, uma vez que baseia-se apenas na transferência de volume, ao passo que fatores como mobilidade eletroforética, condutividade da amostra, e magnitude do fluxo eletrosmótico estão envolvidos na quantidade de amostra inserida no capilar com a injeção eletrocinética (TAVARES, 1996).

1.6.3 Detecção condutométrica sem contato acoplada capacitivamente (C⁴D)

A mobilidade eletroforética e a resposta do sinal na detecção de condutividade estão relacionadas, a condutividade equivalente de um analito. Os íons do analito substituem os co-íons do BGE de mesma carga. Como consequência, a resposta registrada é resultado da diferença na condutividade entre os analitos e os co-íons do BGE. Para uma relação sinal/ruído ótima, é necessária uma diferença da condutância do analito e do BGE (ZEMANN, 2001). Este tipo de detecção pode ser conduzido por dois modos: (i) com contato e; (ii) sem contato. No primeiro modo, os eletrodos são posicionados diretamente em contato com a solução, fato que pode gerar alguns problemas na presença de um campo elétrico, como desprendimento de bolhas e corrosão dos eletrodos. No modo sem contato, ambos os problemas citados são evitados (BRITO-NETO *et al.*, 2005).

Na detecção condutométrica sem contato, ao aplicar um sinal senoidal a um dos eletrodos, uma corrente alternada pode ser acoplada capacitivamente no eletrólito de trabalho e registrada no segundo eletrodo de medida (ZEMANN, 2003). Isso é possível, porque os eletrodos formam capacitores com a solução eletrolítica utilizada. No modo sem contato, o princípio de funcionamento não é fundamentalmente diferente da detecção condutométrica convencional (com contato). Em ambos os casos, os experimentos são conduzidos com sinais alternados de modo a garantir que as correntes não sejam limitadas pelas reações faradaicas, mas apenas pela concentração e condutividade molar das espécies iônicas presentes na solução (KUBÁŇ; HAUSER, 2013; ZEMANN, 2003).

A detecção condutométrica sem contato acoplada capacitivamente (C^4D , do inglês “*Contactless capacitive coupled conductivity detection*”) foi proposta como método de detecção para CE, de forma independente por FRACASSI DA SILVA e DO LAGO, (1998) e ZEMANN *et al.*, (1998). O sistema de detecção proposto possui configuração com dois eletrodos cilíndricos, que circundam o capilar de separação, posicionados paralelamente ao longo do eixo do capilar, sendo que o espaço entre os eletrodos (1 a 2 mm de comprimento) define o volume de detecção. O sinal senoidal é aplicado a um dos eletrodos, o outro eletrodo está conectado à entrada de um conversor corrente-tensão, portanto, a corrente que é detectada entre os dois eletrodos é proporcional à condutividade da solução que flui no interior do capilar, e ao passar pelo segundo eletrodo esta corrente é convertida em tensão. A tensão é retificada, ou seja, a tensão é transformada em corrente contínua mantendo apenas um semiciclo da onda senoidal do sinal. Ao final, o sinal é amplificado, compensando a linha base.

Em 2009, Francisco e do Lago propuseram um modelo de detector C^4D mais compacto e de alta resolução em comparação ao anterior (FRANCISCO; DO LAGO, 2009). Este modelo foi utilizado nos procedimentos descritos nesta tese. Nesta versão, a frequência e a amplitude foram otimizadas e fixadas para uma melhor performance, por uma questão de robustez e simplicidade. Os valores de frequência e amplitude foram fixados com base no uso de eletrodos de 2 mm, espaçados por 0,51 mm e capilares com diâmetro interno entre 20 μm e 100 μm preenchido com eletrólitos típicos usados em CE. O mérito do novo sistema de detecção desenvolvido é a redução do ruído, já que a característica mais desejada em um sensor não é a intensidade do sinal, mas a relação sinal/ruído. Na versão desenvolvida inicialmente, um retificador de meia onda foi usado, neste circuito, um retificador de onda completa foi implementado, dobrando o sinal na entrada do conversor. O conversor digital-analógico neste detector é de 22 bits de resolução, superior às utilizadas anteriormente (com 12 ou 16 bits). A

vantagem do conversor digital-analógico é a eliminação do sistema de compensação de linha base, uma das características mais importantes deste detector. No presente circuito não há a adição de um sistema de compensação de linha base por hardware, pois o conversor digital analógico de 21 bits detecta variações na ordem de 1 μ V. Assim, a abordagem adotada converte o sinal bruto em um valor digital que pode ser interpretado e a subtração da linha base é realizada por software.

O sistema CE-C⁴D tem sido utilizado para a separação e determinação de diversos analitos como fármacos, drogas ilícitas, cátions e ânions, dentre outros (BACHMANN *et al.*, 2007; DE CASTRO COSTA *et al.*, 2018; ELBASHIR; SCHMITZ; ABOUL-ENEIN, 2017; FREITAS *et al.*, 2016; KUBÁŇ; HAUSER, 2013, 2018; MARRA *et al.*, 2014, 2018; NUCHTAVORN *et al.*, 2013; PINHEIRO *et al.*, 2019; RIBEIRO *et al.*, 2016; SÁIZ *et al.*, 2013).

O sistema de detecção C⁴D e suas aplicações em CE tem sido o foco de artigos de revisão voltados não apenas para as diversas aplicações desse sistema de detecção universal mas também para o design do sistema, com relação aos componentes e montagem dos detectores (KUBÁŇ; HAUSER, 2004; KUBÁŇ; HAUSER, 2009; KUBÁŇ; HAUSER, 2015, 2017, 2018, 2019).

1.7 Validação dos parâmetros analíticos dos métodos

Os parâmetros normalmente avaliados para validação de métodos analíticos são: precisão (medida através dos estudos de repetibilidade intra e inter-dias); sensibilidade, limite de detecção e limite de quantificação (definidos a partir dos parâmetros da curva analítica) e exatidão (avaliada pelo estudo de adição e recuperação). Esses termos também são conhecidos como “parâmetros de desempenho analítico” ou “figuras analíticas de mérito”.

A seguir será apresentada uma breve descrição dos parâmetros analíticos utilizados no presente trabalho (ANVISA, 2017; GUSTAVO GONZÁLEZ; ÁNGELES HERRADOR, 2007; INMETRO, 2018; RIBANI *et al.*, 2004).

1.7.1.1 Repetibilidade

A precisão do método analítico, expresso em termos da repetibilidade, representa o grau de concordância entre os resultados de medições sucessivas de um analito, efetuadas sob as mesmas condições de medição, seguindo ao mesmo procedimento; realizado pelo mesmo operador; utilizando o mesmo instrumento, usado sob mesmas condições; mesmo local, e realizando repetições em curto espaço de tempo.

A repetibilidade do método é verificada na faixa de concentração dentro do intervalo linear do método e pode ser expressa como o desvio padrão relativo de para uma série de medidas ($n = 10$). O desvio padrão relativo (DPR) é calculado através da **Equação (7)**.

$$DPR (\%) = \frac{DP_x}{\bar{x}} \times 100 \quad \text{Equação (7)}$$

Sendo: DP_x o desvio padrão da concentração encontrada e \bar{x} = concentração média encontrada para a série de medidas.

1.7.1.2 Sensibilidade

A correlação entre o sinal medido (área ou altura do pico) e a concentração da espécie a ser quantificada é determinada, empiricamente, a partir de sinais medidos para concentrações conhecidas dessa espécie. Essa relação matemática, muitas vezes, pode ser expressa como uma equação de reta chamada de *curva analítica*, descrita pela **Equação (8)**.

$$y = Sx + b \quad \text{Equação (8)}$$

A sensibilidade do método analítico está relacionada à mudança nos valores de resposta do método em função da variação nas concentrações do analito. Sendo representada, portanto, pelo coeficiente angular da curva de analítica (S). Além dos coeficientes S (sensibilidade) e b (intercepto), também é possível calcular, a partir dos pontos experimentais, o coeficiente de

correlação (r). Este parâmetro permite uma estimativa da dispersão do conjunto de pontos experimentais, pois quanto mais próximo de 1,0, menor a incerteza dos coeficientes de regressão estimados.

1.7.1.3 Limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ)

O limite de detecção (LD) é a menor concentração da espécie a ser analisada que pode ser detectada, porém não necessariamente quantificada, sob as condições experimentais estabelecidas. Para os métodos que empregam curva analítica, o LD pode ser expresso pela **Equação (9)**.

$$LD = \frac{3 \times DP_b}{S} \quad \text{Equação (9)}$$

Na qual: DP_b representa o desvio padrão relativo ao intercepto (b) da curva; e S é o coeficiente angular (ou sensibilidade) da curva analítica.

O limite de quantificação (LQ) é a menor concentração da espécie analítica que pode ser determinada com um nível aceitável de precisão (concordância entre os vários resultados obtidos da mesma forma) e exatidão (a proximidade dos resultados obtidos pelo método em estudo em relação ao valor verdadeiro). O LQ pode ser calculado pela **Equação (10)**.

$$LQ = \frac{10 \times DP_b}{S} \quad \text{Equação (10)}$$

1.7.1.4 Recuperação

A recuperação (ou fator de recuperação) é avaliada adicionando-se quantidades conhecidas do analito a uma amostra desconhecida, e do aumento do sinal analítico é deduzido quanto do constituinte estava presente na amostra original. A recuperação foi avaliada com o método gráfico, no qual o eixo x fornece a concentração de padrão adicionado às soluções da amostra e a extrapolação neste eixo mostra a concentração presente na amostra. A taxa de

recuperação é calculada como a relação percentual entre as quantidades recuperadas e adicionadas, como expresso na **Equação (11)**.

$$REC = \frac{[SCP_{rec}]}{[SCP_{ad}]} \times 100 \quad \text{Equação (11)}$$

Sendo $[SCP_{rec}]$ a concentração de SCP recuperada e $[SCP_{ad}]$ a concentração de SCP inicialmente adicionada às amostras.

1.7.1.5 Resolução

A resolução mostra o quanto dois picos se distanciam um em relação ao outro em comparação com suas larguras, fornecendo uma medida quantitativa da capacidade de separação de do método com relação aos analitos. Para aplicações quantitativas, valores de R_s $> 1,5$ são recomendados.

A resolução pode ser calculada de acordo com a **Equação (12)**.

$$R_s = \frac{2[t_B - t_A]}{W_B + W_A} \quad \text{Equação (12)}$$

Sendo t_A e t_B os tempos de migração e W_A e W_B são as larguras da base dos picos para as espécies A e B, respectivamente.

**PRIMEIRA PARTE – DETERMINAÇÃO VOLTAMÉTRICA
DE ESCOPOLAMINA EM AMOSTRAS DE BEBIDAS E
URINA**

2 OBJETIVOS

Os objetivos centrais desta tese foram o desenvolvimento de métodos analíticos para a triagem e quantificação rápida de SCP em amostras de bebidas e urina empregando as técnicas de voltametria de onda quadrada (SWV) e eletroforese capilar com detecção condutométrica sem contato (CE-C⁴D).

Os objetivos específicos do método voltamétrico desenvolvido neste trabalho foram os seguintes:

- Determinação do comportamento eletroquímico da SCP sobre o BDD;
- Otimização dos parâmetros da técnica de SWV com o intuito de obter informações inerentes ao processo redox da SCP usando BDD como eletrodo de trabalho, bem como do melhor sinal voltamétrico para a realização das análises;
- Triagem e quantificação da SCP em diferentes tipos de bebidas: cachaça, cerveja, refrigerante, energético, vodka e whisky.
- Triagem e quantificação de SCP em amostras de urina real e sintética.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Soluções, reagentes e preparação das amostras

Todos os reagentes utilizados apresentavam pureza analítica e foram usados sem purificação prévia. Na **Tabela 3** são listados os reagentes usados neste estudo com sua respectiva procedência.

Tabela 3. Reagentes utilizados no presente trabalho e suas respectivas procedências.

Reagente	Fórmula química	Origem	Pureza (%)
Ácido acético	C ₂ H ₄ O ₂	Synth	99,7
Ácido bórico	H ₃ BO ₃	Panreac	99,8
Ácido cítrico	C ₆ H ₈ O ₇	Vetec	99,5
Ácido fosfórico	H ₃ PO ₄	Synth	85
Ácido láctico	C ₃ H ₆ O ₃	Vetec	85
Ácido sulfúrico	H ₂ SO ₄	Synth	98
Ácido úrico	C ₅ H ₄ N ₄ O ₃	Sigma	99
Bicarbonato de sódio	NaHCO ₃	Synth	99,7
Brometo de escopolamina triidratado (SCP)	C ₁₇ H ₂₂ NO ₄ Br.3H ₂ O	Fagron	99,5
Cafeína	C ₈ H ₁₀ N ₄ O ₂	Synth	99
Cloreto de amônio	NH ₄ Cl	Synth	99
Cloreto de cálcio diidratado	CaCl ₂ .2H ₂ O	Synth	78
Cloreto de sódio	NaCl	Synth	99
Diidrogenofosfato de potássio	KH ₂ PO ₄	Merck	99,5
Hidrogenofosfato de potássio	K ₂ HPO ₄	Merck	99,5
Hidróxido de sódio	NaOH	Panreac	98
Sulfato ferroso heptahidratado	FeSO ₄ .7H ₂ O	Synth	98
Sulfato de magnésio heptahidratado	MgSO ₄ .7H ₂ O	Cinética Química	99
Sulfato de sódio anidro	Na ₂ SO ₄	Vetec	99
Uréia	CH ₄ N ₂ O	Dinâmica	99

Fonte: O autor.

Todas as soluções foram preparadas com água deionizada (resistividade superior a 18 MΩ cm) obtida de sistema de purificação Direct-Q (Millipore). Para a preparação das soluções estoque de SCP, a quantidade adequada de sal foi dissolvida em água deionizada, obtendo uma solução estoque com concentração de 10 mmol L⁻¹. Posteriormente, as soluções padrão foram preparadas diluindo-se alíquotas da solução estoque nos eletrólitos de suporte empregados (tampão acetato 0,05 mol L⁻¹ pH 4,7), ácido sulfúrico 0,1 mol L⁻¹ e 0,5 mol L⁻¹; e tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ pH 7,2) antes de serem usadas nos estudos voltamétricos.

A solução tampão Britton-Robinson (BR) (BRITTON; ROBINSON, 1931) foi preparada pela mistura dos ácidos bórico, acético e fosfórico, com concentração de 0,04 mol L⁻¹ cada. Considerando a soma das concentrações dos componentes do tampão BR, foi estimada a concentração total de 0,12 mol L⁻¹ para esse eletrólito. O pH foi ajustado com solução de NaOH 1,0 mol L⁻¹.

3.1.1 Preparo das amostras de bebida

Todas as amostras de bebidas analisadas no presente trabalho foram utilizadas sem etapas prévias de filtração e foram adquiridas no comércio local. Entretanto, as amostras gaseificadas (Coca-Cola®, cerveja, energético, Skol Beats®) foram submetidas à banho ultrassônico por 2 minutos para a remoção dos gases dissolvidos antes de serem diluídas em água ultrapura ou eletrólito suporte.

Para a realização dos estudos de triagem no sistema estacionário, alíquotas de solução padrão foram adicionadas às amostras das bebidas puras, e após agitação ultrassônica por 2 minutos, alíquotas adequadas destas amostras foram diluídas em eletrólito de suporte para a realização subsequente das análises. Em estudos iniciais, a quantidade de amostra na célula estacionária foi avaliada no intervalo dentre 20 e 1% (v/v). Após a definição da melhor diluição, alíquotas de 100 µL de cada uma das amostras foram adicionadas à 9,9 mL de eletrólito de suporte para a realização dos experimentos voltamétricos. Quando o sistema BIA foi empregado para triagem e quantificação de SCP, alíquotas de 20 µL das amostras foram diluídas em 1980 µL de eletrólito (1% v/v), para posterior realização das injeções. A composição de cada uma das amostras de bebida analisadas no presente trabalho é apresentada na Tabela 4.

Tabela 4. Composição das amostras de bebida analisadas no presente trabalho.

Amostra	Composição declarada no rótulo
Cachaça	Destilado do mosto fermentado obtido do caldo da cana de açúcar e água. Teor alcoólico: 39% v/v.
Cerveja	Água gaseificada, malte de cevada, lúpulo e arroz. Teor alcoólico: 5% v/v.
Coca-Cola®	Água gaseificada; açúcar; extrato de noz de cola; cafeína; corante caramelo IV (INS 150D); ácido fosfórico (INS 338) e aromatizante natural.
Energético	Água gaseificada, sacarose, glucose, taurina, cafeína, inositol, vitaminas (B3, B5, B6, B2, B12), acidulante ácido cítrico (INS 330), reguladores de acidez: citrato de sódio (INS 331III) e bicarbonato de magnésio (INS 504II), aromatizante corante caramelo I (INS 150A).
Skol Beats®	Água gaseificada, açúcar, destilado alcoólico simples de cereais. Acidulantes: ácido cítrico (INS 330), ácido tartárico (INS 334), aroma natural de limão, corante caramelo III (INS 150C) e reguladores de acidez: citrato de sódio (INS 331III) e ácido málico (INS 296). Teor alcoólico: 8% v/v.
Suco	Água, açúcar, sucos de maçã, morango, groselha e cenoura, vitaminas (C, E, B3, A, D, B6 e B12), aroma sintético idêntico ao natural, acidulante: ácido cítrico (INS 330), estabilizantes: goma guar (INS 412) e acetato de isobutirato de sacarose (INS 444).
Vodka	Água e álcool etílico retificado. Teor alcoólico: 37,5% v/v.
Whisky	Destilado alcoólico de malte envelhecido e destilado alcoólico de cereais não malteados, água desmineralizada e corante caramelo I. Teor alcoólico: 40% v/v.

Fonte: O autor.

3.1.2 Preparo das amostras de urina

As amostras de urina real foram disponibilizadas por voluntários saudáveis do laboratório (de ambos os sexos), sendo coletadas em frascos plásticos individuais e armazenados na geladeira até o momento da análise, e também foram utilizadas sem etapas prévias de filtração, sendo apenas diluídas em eletrólito de suporte. Para os estudos nos quais a porcentagem de urina presente em solução ultrapassava 30% (v/v), soluções mais concentradas de eletrólito foram utilizadas afim de manter a força iônica/concentração do eletrólito relativamente constante entre os experimentos.

As amostras de urina sintética foram preparadas de acordo com o descrito na literatura (BROOKS; KEEVIL, 1997) com a seguinte composição, para 250 mL: 210 μ L de ácido láctico, 0,1 g de ácido cítrico, 0,525 g de NaHCO_3 , 2,5 g de ureia, 0,0175 g de ácido úrico, 0,01 g de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 1,3 g de NaCl , 0,353 g de Na_2SO_4 , 0,123 g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,325 g de NH_4Cl , 0,238 g de KH_2PO_4 e 0,305 g de K_2HPO_4 .

3.2 Instrumentação

Todas as pesagens foram realizadas em uma balança analítica Shimadzu®, modelo AUY220 com precisão de $\pm 0,1$ mg.

O pH das soluções empregadas como eletrólito de suporte foi ajustado utilizando-se um pHmetro de bancada Bel Engineering® modelo PHS3BW, com precisão de $\pm 0,01$ pH.

Foi utilizado um banho ultrassônico Unique®, modelo 1400 A, para a remoção dos gases dissolvidos nas amostras de Coca-Cola®, cerveja, energético e Skol Beats®.

As adições de padrão para construção das curvas analíticas e o preparo de soluções a partir de diluições da solução estoque de SCP, foram realizados utilizando micropipetas das marcas Nichiryo® e HTL®, dos modelos Labmate Pro e Nichipet EX, com volumes ajustáveis com capacidade de 0,5 a 10 μ L, 10 a 100 μ L, 100 a 1000 μ L e de 1000 a 5000 μ L.

3.2.1 Detecção voltamétrica

As análises voltamétricas foram realizadas utilizando um potenciostato/galvanostato μ AUTOLAB tipo III (Metrohm Autolab BV, Utrecht, Holanda) interfaceado a um computador e controlado através do software NOVA 1.11.

3.2.1.1 Eletrodo de trabalho

Neste trabalho foram utilizados eletrodos de diamantes dopados com boro (BDD; área geométrica = 22,9 mm²), adquiridos da empresa NeoCoat SA (La Chaux-de-Fonds, Suíça). Tratam-se de placas a base de silício (0,7 x 0,7 cm) com espessura de aproximadamente 1,0 mm e cobertas com um fino filme de diamante (~1,2 μ m) com nível de dopagem de boro de 8000 ppm (deposição química de vapor). Previamente à realização dos experimentos eletroquímicos, o eletrodo de BDD foi submetido a um processo pré-tratamento eletroquímico. Os modos de pré-tratamento utilizados nesse trabalho foram:

- Pré-tratamento catódico: aplicando corrente de -0,01 A, por 1000 segundos (0,44 A/cm²) usando solução de H₂SO₄ 0,5 mol L⁻¹ (SALAZAR-BANDA *et al.*, 2006).
- Pré-tratamento anódico: aplicando corrente de +0,01 A, também por 1000 segundos, em meio de tampão Britton-Robinson 0,12 mol L⁻¹ pH 2,0 (TERASHIMA *et al.*, 2003).

Em eletrodos novos (recém-adquiridos), o pré-tratamento anódico foi inicialmente realizado, seguido do pré-tratamento catódico. Após a escolha da melhor condição de pré-tratamento, o mesmo era realizado uma vez, ao início de cada dia de trabalho.

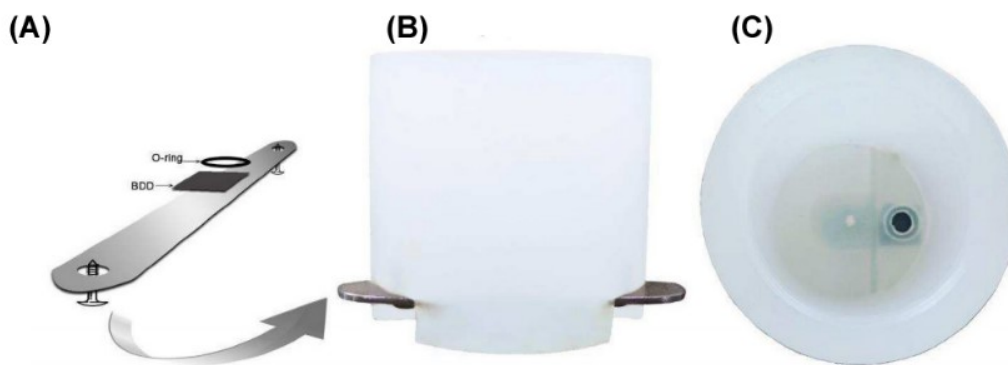
3.2.1.2 Eletrodo de referência e eletrodo auxiliar

O eletrodo de referência utilizado durante a realização do trabalho foi um mini eletrodo de Ag/AgCl (KCl_{sat.}) construído como descrito em (PEDROTTI; ANGNES; GUTZ, 1996). O eletrodo foi preparado no próprio laboratório pela eletrodeposição de AgCl sobre um fio de Ag através da aplicação de +0,3 V em meio de uma solução de HCl 0,10 mol L⁻¹ durante uma hora. Após a deposição, o fio é posicionado no interior de uma ponteira de micropipeta, preenchida com solução de KCl saturada e selada com uma membrana de bateria. Um fio de platina, com comprimento de 25 mm, foi utilizado como eletrodo auxiliar.

3.2.1.3 Célula eletroquímica para medidas estacionárias

Nas medidas voltamétricas estacionárias com o eletrodo de BDD, uma célula de polipropileno com volume ~ 12 mL foi utilizada. Nesta célula, o eletrodo de BDD ($0,7 \times 0,7$ cm) foi posicionado no fundo da mesma com auxílio de um anel de borracha (“o-ring”, $\varnothing = 5,0$ mm), e fixado (pressionado) sobre o anel com auxílio de parafusos e uma placa metálica, similar ao apresentado na **Figura 4**. Todos os experimentos foram realizados sem a remoção do O_2 dissolvido e à temperatura ambiente.

Figura 4. Célula de polipropileno utilizada nos experimentos estacionários. (A) eletrodo de BDD posicionado entre o *O-ring* e a placa metálica para contato. (B) vista lateral da célula. (C) vista superior: posicionamento do eletrodo no interior da célula.



Fonte: DA SILVA, 2017.

3.2.1.4 Sistema BIA

Nos estudos com o sistema BIA, foi utilizada uma célula construída no próprio laboratório (TORMIN *et al.*, 2011). A célula foi construída a partir de um tarugo de polipropileno com as seguintes dimensões: $\varnothing = 7,5$ cm; comprimento: 6 cm. Com auxílio de um torno (oficina da Faculdade de Mecânica – UFU), um orifício com as seguintes dimensões foi feito a partir de um lado do tarugo: $\varnothing_{\text{interno}} = 6$ cm; profundidade = 5 cm; volume total ≈ 180 mL. Uma tampa, também de polipropileno, foi feita para fechar o lado aberto do tarugo. Um orifício central foi feito tanto na tampa quanto na base do tubo.

A célula foi construída de forma que durante a injeção, a ponta da ponteira ficasse posicionada a aproximadamente 2 mm do eletrodo de BDD (QUINTINO; ANGNES, 2004), em posição *wall-jet*. Além do orifício central, a tampa superior contém mais três orifícios: dois

para alocação dos eletrodos auxiliar e referência e um para a inserção do agitador mecânico. No orifício efetuado na base do tubo ($\varnothing = 5,0$ mm) foi posicionado um *o-ring* e sob este anel, a placa de silício coberta com um filme de BDD (0,7 x 0,7 cm). A área útil do eletrodo de BDD é definida pelo diâmetro interno deste anel (5 mm; área = 22,9 mm²). Para fixação da peça de BDD e o contato elétrico, uma placa metálica foi pressionada sobre a placa de BDD através de dois parafusos colocados nas extremidades da parte inferior da célula. Para a injeção neste sistema utilizou-se uma pipeta eletrônica (Eppendorf® Multipette stream) que permite injeções de 10 a 1000 µL, usando um combitip® (ponteira) de 1 mL, com velocidades de injeção de 28 a 350 µL s⁻¹. Na **Figura 5** são mostrados os componentes do sistema BIA: célula, pipeta eletrônica e ponteira.

Figura 5. Componentes do sistema BIA utilizados no trabalho: (a) Micropipeta eletrônica (Eppendorf Multipette stream®); (b) ponteira em forma de seringa (volume total: 1 mL); (c) célula de polipropileno (com o eletrodo posicionado); (d) tampa da célula (com orifícios para eletrodo auxiliar, referência e ponteira, ao centro); (e) sistema BIA montado.



Fonte: O autor.

Para a realização das varreduras de potencial e da quantificação da SCP nas amostras de bebidas e urina, a injeção da solução foi realizada durante os 5 segundos de tempo de equilíbrio antes do início da varredura voltamétrica. Esse intervalo de 5 s é mais do que o suficiente para que a injeção seja concluída, de modo que todo o “plug” de amostra tenha sido dispensado do interior do ponteira.

3.3 Procedimento Experimental

Os estudos de otimização dos parâmetros experimentais das técnicas voltamétricas, descritos a seguir, foram realizados de forma univariada, e definidos com base nos picos com maior corrente detectada e perfil voltamétrico mais bem definidos (sem alargamento de pico). Para a realização dos estudos iniciais envolvendo voltametria cíclica (VC), foram utilizadas soluções contendo $500 \mu\text{mol L}^{-1}$ de SCP, preparada em eletrólito de suporte. Já os testes de otimização envolvendo a técnica de SWV foram realizados utilizando solução com concentração de $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ de SCP, também preparada em eletrólito de suporte.

3.3.1 Escolha do eletrólito de suporte

Inicialmente a voltametria cíclica (VC) foi utilizada para avaliar o comportamento eletroquímico da SCP sobre o BDD. Para esse teste, foram avaliados os seguintes eletrólitos de suporte: **(i)** $0,5 \text{ mol L}^{-1} \text{ H}_2\text{SO}_4$; **(ii)** $0,1 \text{ mol L}^{-1} \text{ H}_2\text{SO}_4$ **(iii)** tampão acetato $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 4,7) e **(iv)** $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ tampão fosfato (pH 7,2). As varreduras por voltametria cíclica foram realizadas entre 0 e +2,2 V (vs. $\text{Ag}/\text{AgCl}_{(\text{sat})}$), com velocidade de varredura de 50 mV s^{-1} , com pré-tratamento superficial anódico.

3.3.2 Efeito do Pré-tratamento do BDD

Para selecionar o melhor pré-tratamento eletroquímico da superfície do BDD, voltamogramas cíclicos foram registrados para varreduras de solução $0,5 \text{ mol L}^{-1} \text{ H}_2\text{SO}_4$ contendo $500 \mu\text{mol L}^{-1}$ de SCP, no intervalo de potencial entre 0 e +2,2 V (vs. $\text{Ag}/\text{AgCl}_{(\text{sat})}$), com velocidade de varredura de 50 mV s^{-1} , após tratamento catódico e anódico. Os valores de corrente e os perfis voltamétricos foram então comparados.

3.3.3 Estudo de velocidade de varredura

Após a escolha do melhor eletrólito de suporte e pré-tratamento da superfície do eletrodo, o efeito da velocidade de varredura (v) foi avaliado. A variação da velocidade de varredura permitiu estimar a quantidade de elétrons transferidos no processo redox, além de determinar se a transferência de elétrons foi governada por processo adsorptivo ou difusional. O estudo da velocidade de varredura foi realizado utilizando os seguintes valores de v : 10; 20; 30; 40; 50; 60; 70; 80; 90; 100; 120; 140; 160; 180; 200; 250; 300; 350; 400 e 450 mV s^{-1} , utilizando $0,5 \text{ mol L}^{-1} \text{ H}_2\text{SO}_4$ como eletrólito de suporte, com BDD com superfície anodicamente tratada.

As correntes (I_p) e potenciais (E_p) de pico registrados para oxidação de SCP foram analisadas, traçando-se gráficos de I_p vs. v , I_p vs. $v^{1/2}$ e E_p vs. $\log v$. Os valores de inclinação calculados a partir da linearização desses gráficos possibilitou a estimativa do número de elétrons transferidos na oxidação da SCP, bem como a natureza do processo redox.

3.3.4 Correção da linha base

A correção de linha base pode ser usada para ajustar uma curva definida pelo usuário através de pontos de dados medidos experimentalmente para definir uma linha base e para corrigir automaticamente os dados experimentais para ela. Os voltamogramas de onda quadrada exibidos nesse trabalho apresentam correção de linha base seguindo o ajuste por “*moving average*” executado da seguinte maneira, de acordo com o manual do Nova 1.11:

1. Os dados de origem foram agrupados em segmentos de n pontos; onde n corresponde ao parâmetro ‘tamanho da janela’ da ferramenta de correção da linha de base (o valor padrão de n é 2).

2. O valor médio de cada segmento foi calculado.

3. Os dados experimentais foram reduzidos de m pontos de dados para m / n médias.

4. Cada média tomada foi comparada com as médias vizinhas imediatas, e para o caso de varreduras positivas, caso determinado valor médio tomado for maior do que aqueles apresentados pelas médias vizinhas imediatas, esse valor será substituído pela média dos valores vizinhos. O passo descrito em 3 pode se repetir até que sejam realizadas mil repetições ou até que a linha base não apresente mais nenhuma alteração.

5. A linha de base foi interpolada das médias m/n finais para os m pontos de dados originais.

6. A linha base foi subtraída dos dados de origem.

Para a correção de linha base dos voltamogramas mostrados nesse trabalho, o valor padrão do *software* NOVA 1.11 foi utilizado.

3.3.5 Otimização dos parâmetros da técnica de Voltametria de Onda Quadrada

Como mencionado anteriormente, a SWV foi escolhida como a técnica voltamétrica para a realização deste trabalho em função de sua velocidade e sensibilidade analítica, quando comparada às demais técnicas de pulso. Os parâmetros voltamétricos da técnica (ΔE_s , a e f) foram otimizados de modo a proporcionar as melhores condições experimentais para detecção e quantificação de SCP em amostras de bebidas e urina. Para a otimização de cada um dos parâmetros, os valores utilizados nos estudos teóricos que possibilitaram o desenvolvimento da técnica foram empregados para os demais parâmetros. Desse modo a otimização de cada um dos parâmetros foi realizada da seguinte maneira:

- I. Otimização do incremento dos pulsos (ΔE_s): os valores de incremento de varredura de potencial foram avaliados entre 1 e 10 mV, mantendo $f = 100 \text{ s}^{-1}$ e $a = 50 \text{ mV}$;
- II. Avaliação da amplitude dos pulsos de potencial: valores de amplitude dos pulsos foram estudados entre 10 e 100 mV, com $f = 100 \text{ s}^{-1}$ e $\Delta E_s = 2 \text{ mV}$.
- III. Estudo de variação da frequência de aplicação dos pulsos de potencial: valores de frequência avaliados entre 10 e 200 s^{-1} , mantendo $\Delta E_s = 2 \text{ mV}$ e $a = 50 \text{ mV}$.

Desse modo, para a avaliação da amplitude dos pulsos de potencial (a), a frequência de aplicação dos pulsos foi fixada em 100 s^{-1} e o incremento de potencial em 2 mV. Da mesma forma, para variação da frequência de aplicação de pulsos, mantém-se constante a amplitude de potencial de 50 mV e o incremento de varredura de 2 mV.

Através dos resultados obtidos mediante a avaliação do comportamento voltamétrico da SCP frente a variação de cada um dos parâmetros da SWV, foi possível: estimar o número de elétrons transferidos no processo redox, avaliar se o processo apresenta reversibilidade e o tipo de mecanismo que governa a transferência de elétrons (processo adsorptivo ou difusional).

3.3.6 Estudo de diluição e avaliação da faixa linear para oxidação da SCP nas amostras

Em função da elevada quantidade de álcool em suas composições, amostras de cachaça, vodka e whisky foram diluídas nas proporções de 1 / 2,5 / 5 / 10 e 20% (v/v) e fortificadas com $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ de SCP. Desse modo, o efeito da quantidade dessas amostras em eletrólito de suporte sobre a corrente registrada para a oxidação do analito pode ser avaliada. A diluição que apresentou maior I_p registrada para o pico de SCP foi utilizada na determinação das faixas lineares para a oxidação de SCP nas amostras de bebida.

Para o teste da faixa linear, concentrações crescentes de SCP foram adicionadas à célula eletroquímica, contendo soluções com 1% (v/v) de cada uma das amostras diluídas em eletrólito de suporte. Para tanto, soluções de trabalho com SCP 1 mmol L^{-1} foram preparadas em soluções contendo 1% (v/v) de cada uma das amostras estudadas. Esse procedimento foi adotado para evitar a diminuição da quantidade de amostra na célula eletroquímica. As alíquotas das soluções de trabalho acrescentadas para cada amostra levaram em consideração o volume acumulado pela adição das alíquotas anteriores, de modo que o acréscimo das alíquotas é exibido na **Tabela 5**.

Tabela 5. Aliquotas de solução contendo SCP 1 mmol L⁻¹ utilizadas para o estudo de linearidade para oxidação de SCP nas amostras de bebida estudadas.

Volume de solução na célula (mL)	Concentração de SCP adicionada (μmol L⁻¹)	Aliquota adicionada (μL)
9,00	1,0	9,0
9,01	2,0	9,0
9,02	3,0	9,0
9,03	4,0	9,0
9,04	5,0	9,0
9,05	10,0	45,0
9,09	15,0	45,0
9,14	20,0	46,0
9,18	30,0	92,0
9,27	40,0	93,0
9,37	50,0	94,0
9,46	75,0	240,0
9,70	100,0	243,0

Fonte: O autor.

3.3.7 Estudos de otimização do volume e da velocidade de injeção (BIA)

Para otimização dos parâmetros de injeção, soluções preparadas com 1% (v/v) de vodka e 1 μmol L⁻¹ de SCP foram injetadas (n = 3) no sistema BIA. O efeito da velocidade de injeção sobre a corrente registrada para a oxidação de SCP foi avaliada nos seguintes valores: 28; 43; 57; 75; 100; 153; 193; 257 e 350 μL s⁻¹ (valores de injeção disponíveis no modelo de pipeta eletrônica utilizado) enquanto o volume injetado foi fixado em 100 μL. A otimização do volume injetado foi realizada mantendo-se a velocidade de injeção fixada em 100 μL s⁻¹ e os volumes de injeção avaliados (n = 3) foram: 20; 40; 60; 80; 100; 120; 140 e 160 μL.

3.3.8 Estudo da faixa linear para SCP nas amostras de bebida utilizando o sistema BIA

Para a avaliação da faixa linear da oxidação da SCP em cada uma das amostras, inicialmente foi preparada uma solução contendo $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ de SCP preparada em 1% (v/v) de cada uma das amostras. Adicionalmente, outra solução foi preparada, contendo apenas 1% (v/v) de cada uma das amostras em eletrólito de suporte. Aliquotas adequadas de cada uma das soluções foram adicionadas aos *vials* (2 mL) de modo que as soluções resultantes apresentassem concentrações entre 1 e $20 \mu\text{mol L}^{-1}$ de SCP preparada em soluções contendo 1% (v/v) de cada uma das amostras. Cada solução contendo SCP no intervalo estudado foi injetada em triplicata.

3.3.9 Quantificação de SCP nas amostras de bebidas

A quantificação de SCP nas amostras de bebida foi realizada utilizando o método de adição de padrão. As amostras foram inicialmente fortificadas com $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ de SCP. Cinco alíquotas de $20 \mu\text{L}$ das amostras foram transferidas à *vials* (2 mL), aos quais foram adicionadas alíquotas de 0; 20; 40; 60 ou $80 \mu\text{L}$ de solução padrão contendo SCP $100 \mu\text{mol L}^{-1}$. Finalmente, aos *vials* foram adicionados 1980; 1960; 1940; 1920 ou $1900 \mu\text{L}$ de eletrólito de suporte. Após agitação manual, as soluções resultantes foram injetadas no sistema BIA.

3.3.10 Aplicação da metodologia a amostras de urina real e sintética

De forma similar ao realizado para as amostras de bebida, amostras de urina real e sintética foram analisadas no sistema BIA-SWV após diluição a 10% (v/v) em eletrólito de suporte para a realização de todas as etapas experimentais (avaliação da faixa linear para oxidação de SCP, repetibilidade, e quantificação).

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

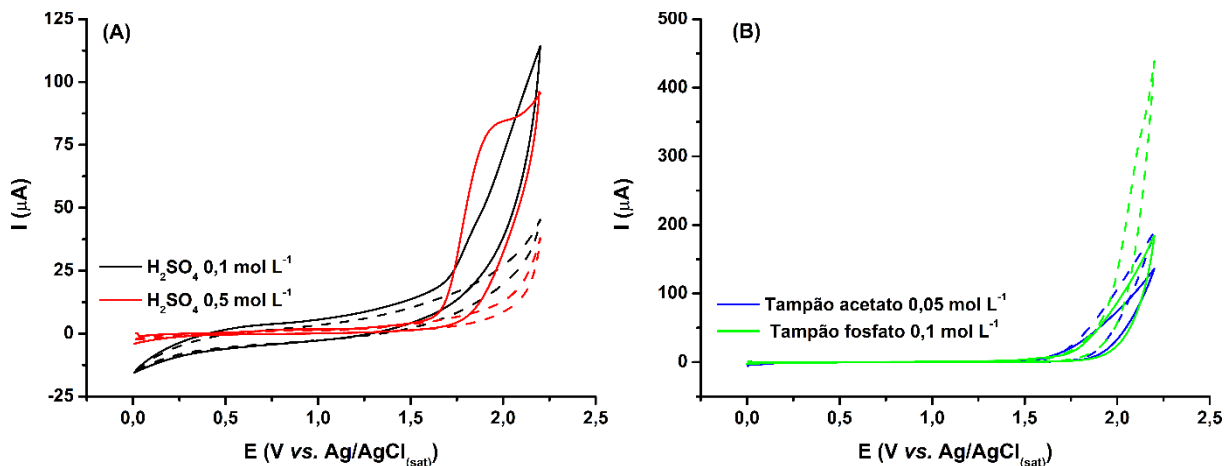
Os resultados e discussões apresentados a seguir serão divididos em duas partes. Na primeira, serão apresentados os estudos realizados para desenvolver o método de determinação SCP em amostras de bebidas e urina, empregando um sistema estacionário com detecção por voltametria de onda quadrada (SWV). Na segunda parte, serão apresentados os estudos relacionados com o desenvolvimento de um método para determinação de SCP nas amostras citadas, usando BIA com detecção por voltametria de onda quadrada (BIA-SWV).

4.1 Parte I - Determinação de SCP em bebidas e urina empregando voltametria de onda quadrada

4.1.1 Estudos iniciais do comportamento eletroquímico da SCP por voltametria cíclica

Inicialmente foram realizados estudos por voltametria cíclica, a fim de determinar qual o melhor eletrólito de suporte para a detecção de SCP. Na **Figura 6** são apresentados os voltamogramas cíclicos obtidos para soluções contendo SCP $500 \mu\text{mol L}^{-1}$, em diferentes eletrólitos de suporte (ácido sulfúrico 0,5 e 0,1 mol L^{-1} ; tampão acetato 0,05 mol L^{-1} - pH 4,7 e tampão fosfato 0,1 mol L^{-1} - pH 7,2).

Figura 6. Voltamogramas cíclicos obtidos em diferentes eletrólitos antes (---) e após (—) a adição de 500 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de SCP: (A) H_2SO_4 0,5 mol L^{-1} (—) e 0,1 mol L^{-1} (—); (B) tampão acetato 0,05 mol L^{-1} (—) (pH 4,7) e 0,1 mol L^{-1} tampão fosfato (—) (pH 7,2). Eletrodo de trabalho: BDD anodicamente pré-tratado; velocidade de varredura: 50 mV s^{-1} ; incremento de potencial: 5 mV.

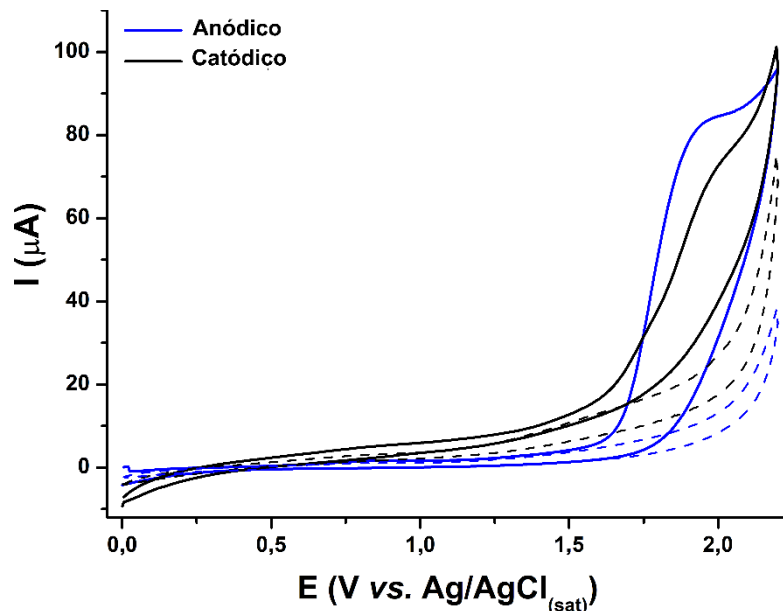


Fonte: O autor.

As respostas voltamétricas observadas em ácido sulfúrico, **Figura 6 (A)**, apresentaram pico de oxidação intenso em potenciais maiores que 1,5 V (vs. $\text{Ag/AgCl}_{(\text{sat})}$). Nenhum sinal voltamétrico é observado na varredura inversa, o que pode indicar irreversibilidade do processo eletroquímico. Apesar do sinal registrado em H_2SO_4 0,1 mol L^{-1} apresentar maiores valores de corrente em potenciais mais elevados ($>1,9$ V), a oxidação da SCP apresenta perfil voltamétrico mais definido empregando H_2SO_4 0,5 mol L^{-1} . Os sinais voltamétricos observados em tampão acetato (—) ou fosfato (—), **Figura 6 (B)** são similares àqueles obtidos para as soluções dos eletrólitos sem a adição da SCP. Dessa forma, o eletrólito escolhido para o desenvolvimento do trabalho foi H_2SO_4 0,5 mol L^{-1} .

Definido o melhor eletrólito de suporte, o efeito do pré-tratamento anódico e catódico foi investigado para a detecção de SCP, uma vez que a superfície do BDD está diretamente relacionada à sua resposta eletroquímica, determinando características como polaridade, afinidade eletrônica e condutividade (HE et al., 2019; OLIVEIRA; OLIVEIRA-BRETT, 2010a). Na **Figura 7** são mostrados os voltamogramas obtidos para a oxidação de 500 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de SCP, após os pré-tratamentos anódico e catódico.

Figura 7. Efeito do pré-tratamento anódico [aplicando +10 mA por 1000 s; (—)] e catódico [aplicando -10 mA por 1000 s; (—)] nas respostas voltamétricas obtidas para solução de H_2SO_4 0,5 mol L^{-1} antes (linha tracejada) e após (linha contínua) a adição de 500 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de SCP. Velocidade de varredura: 50 mV s^{-1} ; incremento de potencial: 5 mV.

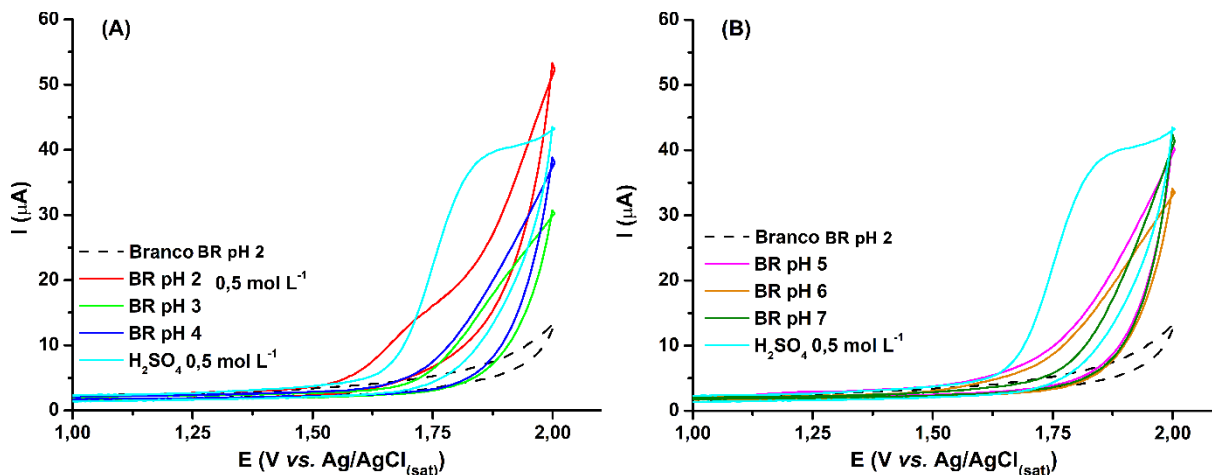


Fonte: O autor.

Comparando os voltamogramas da **Figura 7** é possível notar que a corrente registrada para oxidação da SCP é maior quando o pré-tratamento anódico é empregado, além de ser obtida uma resposta voltamétrica mais bem definida do que aquela exibida quando o pré-tratamento catódico é realizado. Além disso, a escolha do pré-tratamento anódico pode ser justificada em função do potencial de oxidação elevado apresentado pela SCP ($E_p > 1,6 \text{ V vs. Ag/AgCl}_{(\text{sat})}$), de modo que a terminação superficial rica em H, obtida no pré-tratamento catódico, seria perdida rapidamente com as sucessivas varreduras na região anódica durante a análise.

Após verificar que as respostas voltamétricas com maior sensibilidade foram detectadas com o pré-tratamento anódico, o efeito do pH do eletrólito de suporte sobre o perfil voltamétrico obtido na oxidação da SCP foi avaliado. Na **Figura 8** são apresentados os voltamogramas cíclicos obtidos para soluções contendo SCP 500 $\mu\text{mol L}^{-1}$, em solução tampão Britton-Robinson (BR) com concentração 0,12 mol L^{-1} , em diferentes valores de pH. Além dos voltamogramas em tampão BR, o voltamograma registrado em H_2SO_4 0,5 mol L^{-1} também é mostrado.

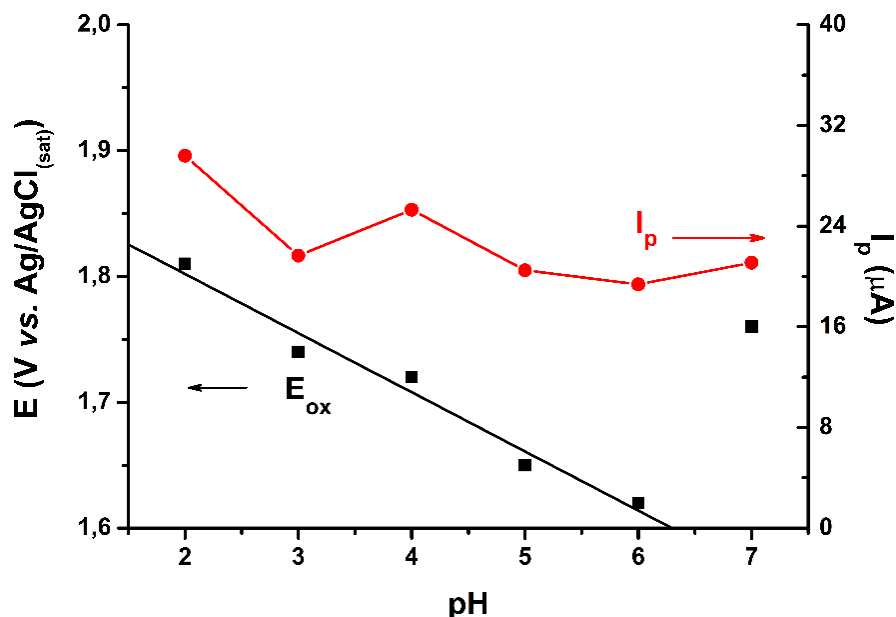
Figura 8. (A) Comparação entre os voltamogramas cíclicos registrados para soluções tampão Britton-Robinson entre pH 2 e 4 e em solução de H_2SO_4 $0,5 \text{ mol L}^{-1}$. (B) Comparação entre os voltamogramas obtidos para soluções entre pH 5 e 7. Condições experimentais: $500 \mu\text{mol L}^{-1}$ de SCP; velocidade de varredura: 50 mV s^{-1} ; incremento de potencial: 5 mV .



Fonte: O autor.

Comparando os voltamogramas da **Figura 8 (A)** e **(B)** é notável que o sinal voltamétrico mas intenso é detectado utilizando H_2SO_4 $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ como eletrólito de suporte. Entretanto, os voltamogramas registrados em tampões BR de diferentes pHs diferem consideravelmente, indicando que a oxidação de SCP deve envolver a transferência de prótons e elétrons. As variações detectadas nas correntes de pico (I_p) e nos potenciais de oxidação (E_{ox}) da SCP nos diferentes valores de pH avaliados são mostradas na **Figura 9**. Os potenciais de oxidação foram estimados a partir dos valores de potencial nos quais as correntes detectadas para oxidação da SCP apresentavam valores notadamente diferentes daquelas detectadas para as soluções dos brancos.

Figura 9. Variação do potencial de oxidação (E_{ox}) e da corrente de pico (I_p) em função do pH da solução BR, obtidos a partir dos voltamogramas da **Figura 8**.



Fonte: O autor.

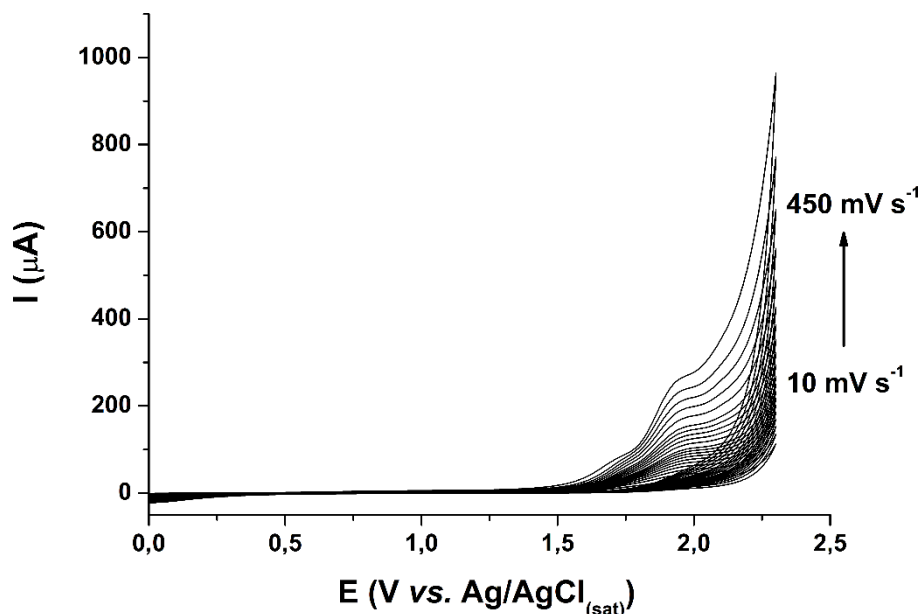
A partir da variação apresentada pelo potencial de oxidação da SCP (E_p) em função do pH, é possível determinar o número de prótons envolvidos no processo redox em estudo, utilizando a **Equação (13)**(HUYNH; MEYER, 2007):

$$E_{ox} = E^{0'} - \frac{0,059m}{n} pH \quad \text{Equação (13)}$$

Sendo m o número de prótons e n o número de elétrons envolvidos no processo redox. O coeficiente angular calculado para a reta apresentada na **Figura 9** é -0,047. Relacionando esse valor à **Equação (13)**, tem-se que m/n é igual à 0,8. Esse valor indica que o mesmo número de prótons e elétrons está envolvido no processo redox.

Em seguida estudos de velocidade de varredura (v) foram realizados no intervalo de 10 a 450 mV s^{-1} para obter informações adicionais sobre a natureza do transporte de massa que governa o processo de oxidação da SCP sobre o BDD. Os resultados desse estudo são apresentados na **Figura 10**.

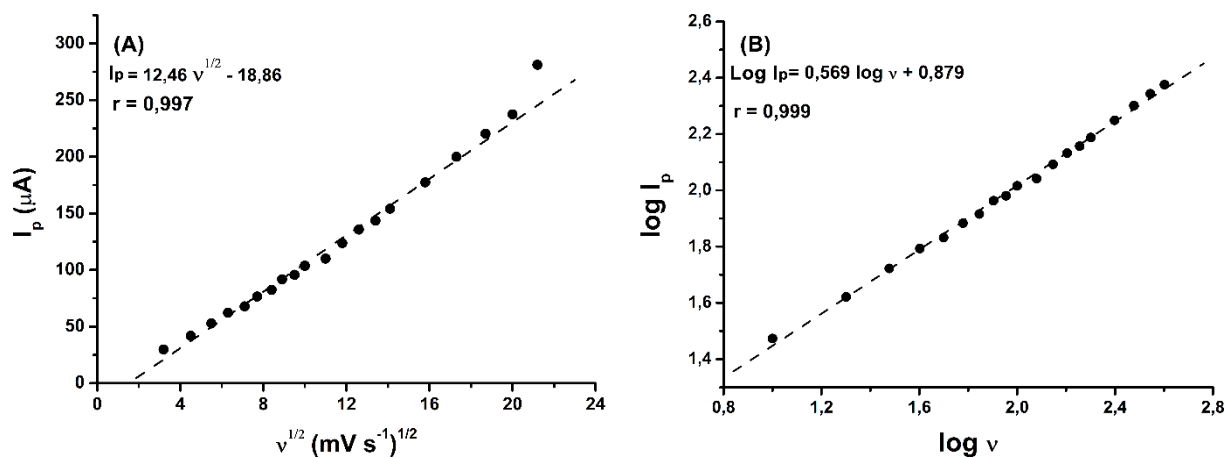
Figura 10. Voltamogramas cíclicos obtidos para oxidação de $500 \mu\text{mol L}^{-1}$ de SCP sobre eletrodo de BDD, após pré-tratamento anódico, em diferentes velocidades de varredura. Eletrólito de suporte: H_2SO_4 $0,5 \text{ mol L}^{-1}$, incremento de potencial: 5 mV .



Fonte: O autor.

A partir dos voltamogramas da **Figura 10**, foi obtida relação linear entre a corrente de pico de oxidação e a raiz quadrada da velocidade de varredura (**Figura 11 (A)**; $r = 0,997$), o que é uma indicação de que a oxidação da SCP é um processo controlado preferencialmente por difusão. Essa indicação é reforçada pela análise dos dados através de um gráfico de $\log I$ vs. $\log v$ (**Figura 11 (B)**) que apresentou inclinação de $0,57$, o que está em concordância com o valor teórico ($0,5$) para um processo controlado por difusão de moléculas orgânicas (GOSSER, 1994). Adicionalmente, é possível perceber o surgimento de um pico de oxidação próximo a $+1,6 \text{ V}$ (vs. $\text{Ag/AgCl}_{(\text{sat})}$) para $v > 100 \text{ mV s}^{-1}$, indicando processo com cinética rápida de transferência de elétrons.

Figura 11. Relação entre corrente de pico e velocidade de varredura para voltamogramas cíclicos de SCP 500 $\mu\text{mol L}^{-1}$ sobre BDD em H_2SO_4 0,5 mol L^{-1} . (A): I_p vs. $v^{1/2}$. (B): $\log I_p$ vs. $\log v$.

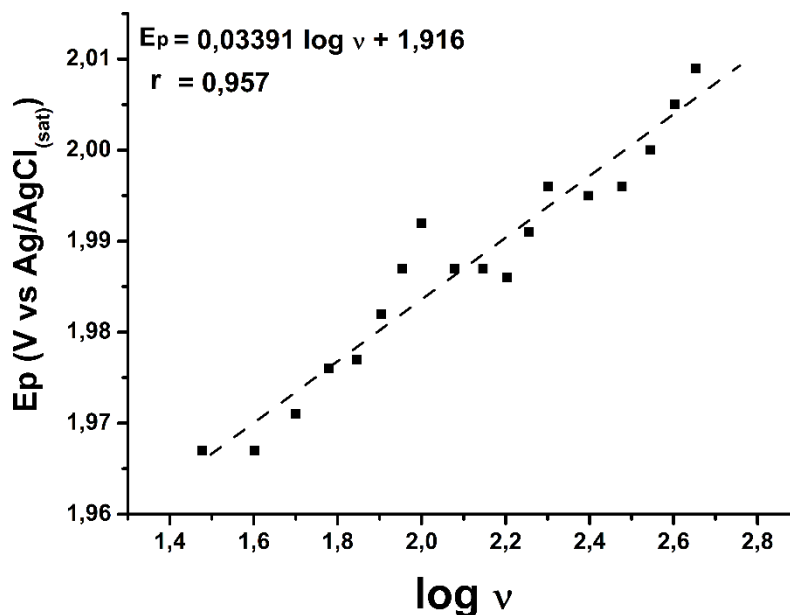


Fonte: O autor.

Além disso, o número de elétrons envolvidos na oxidação da SCP pode ser calculado a partir da inclinação de E_p vs. $\log v$ (**Figura 12**) e usando a **Equação (14)** (PLETCHER *et al.*, 2001), para sistemas irreversíveis com processos difusionais:

$$\frac{\Delta E_p}{\Delta \log v} = \frac{30 \text{ mV}}{\alpha n} \quad \text{Equação (14)}$$

Figura 12. Relação entre potencial de pico (E_p) e o logaritmo da velocidade de varredura ($\log v$) para voltamogramas cíclicos da Figura 10.



Fonte: O autor.

Neste sistema, a inclinação obtida foi de 0,0339 e o valor calculado para αn foi de 0,885. Geralmente, α é assumido como sendo 0,5 para moléculas orgânicas com processos eletroquímicos irreversíveis (BARD; FAULKNER, 2001; SPEISER, 2004). Assim, o valor calculado para o número de elétrons (n) transferidos na oxidação da SCP foi igual a 1,77; e dessa forma, considera-se que 2 elétrons são transferidos no processo redox, como proposto por Santos *et al.*, (2014).

Após a realização dos estudos iniciais por voltametria cíclica, a técnica de voltametria de onda quadrada foi utilizada para a realização dos testes de varredura para as amostras de bebidas, a fim de detectar a presença de SCP nestas amostras.

4.1.2 Estudos de otimização dos parâmetros de voltametria de onda quadrada

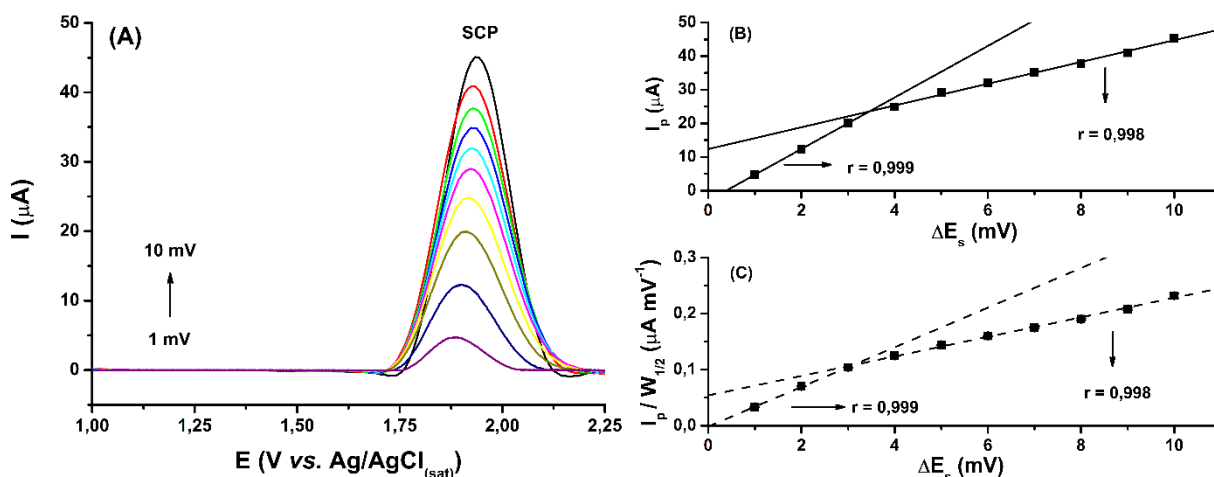
Após a elucidação do comportamento eletroquímico da SCP sobre o eletrodo de BDD pré-tratado anodicamente, os parâmetros da técnica de voltametria de onda quadrada foram otimizados: **(i)** incremento de varredura de potencial (ΔE_s), a diferença de altura entre um degrau de potencial e o degrau seguinte; **(ii)** amplitude de aplicação dos pulsos de potencial (a), relacionada à altura do pulso de potencial; e **(iii)** frequência (f) de aplicação dos pulsos de

potencial. Para a realização dos estudos subsequentes, foi empregada solução padrão contendo $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ de SCP em H_2SO_4 $0,5 \text{ mol L}^{-1}$.

4.1.2.1 Incremento de varredura de potenciais (ΔE_s)

O incremento de varredura de potenciais foi avaliado no intervalo entre 1 e 10 mV, mantendo-se fixos os valores de frequência e amplitude de aplicação de pulso em 100 s^{-1} e 50 mV, respectivamente, como demonstrado na **Figura 13**.

Figura 13. (A): Voltamogramas obtidos para oxidação de $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ de SCP em diferentes valores de incremento de varredura. (B) Relação entre a corrente de pico e a variação do incremento de varredura. (C) Relação $I_p/W_{1/2}$ vs. ΔE_s . Eletrólito: H_2SO_4 $0,5 \text{ mol L}^{-1}$. $f = 100 \text{ s}^{-1}$, $a = 50 \text{ mV}$.



Fonte: O autor.

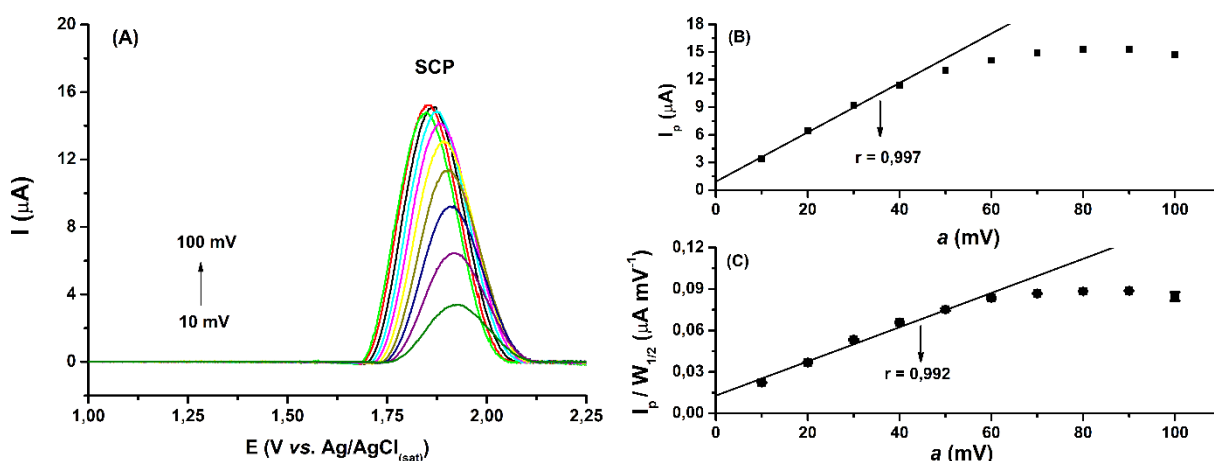
Avaliando-se os voltamogramas apresentados na **Figura 13 (A)**, é perceptível o aumento da corrente de pico com o aumento do incremento de varredura (ΔE_s) em todo intervalo estudado. Na **Figura 13 (B)** são observadas duas regiões com diferentes inclinações sendo a primeira situada entre 1 e 4 mV de incremento de pulso de potencial ($r = 0,999$), e a segunda região estende-se de 4 até 10 mV ($r = 0,998$). Esse comportamento está relacionado à cinética rápida do processo redox, com possível mudança nos mecanismos relacionadas à transferência de massa da SCP até a superfície do eletrodo. A relação entre I_p e a largura de pico a meia altura ($W_{1/2}$) foi avaliada (**Figura 13 (C)**), para verificar se o aumento no ΔE_s ocasiona alargamento dos picos voltamétricos e, conseqüentemente, perda de seletividade. Os resultados da **Figura 13 (C)** indicam que praticamente não há alargamento de pico, e portanto, perda de seletividade, com o aumento de ΔE_s . Com base nos resultados obtidos, o valor de 6

mV foi escolhido para a realização do trabalho, uma vez que foram detectados picos com perfil gaussiano e com apreciável corrente de pico.

4.1.2.2 Amplitude dos pulsos de potenciais (a)

Em seguida foi estudada a influência da amplitude de aplicação dos pulsos de potenciais na resposta voltamétrica detectada para SCP. A **Figura 14 (A)** mostra os voltamogramas obtidos mediante a variação desse parâmetro entre 10 e 100 mV, mantendo-se constantes os valores para frequência de aplicação de pulsos de potenciais e o incremento de varredura de potencial.

Figura 14. (A): Voltamogramas de onda quadrada obtidos para SCP, $100 \mu\text{mol L}^{-1}$, em função da variação nos valores de amplitude de pulso de potencial aplicados. **(B):** Relação entre corrente de pico e amplitude de pulsos. **(C):** Relação $I_p/W_{1/2}$ vs. Amplitude dos pulsos. $f = 100 \text{ s}^{-1}$, $\Delta E_s = 2 \text{ mV}$.



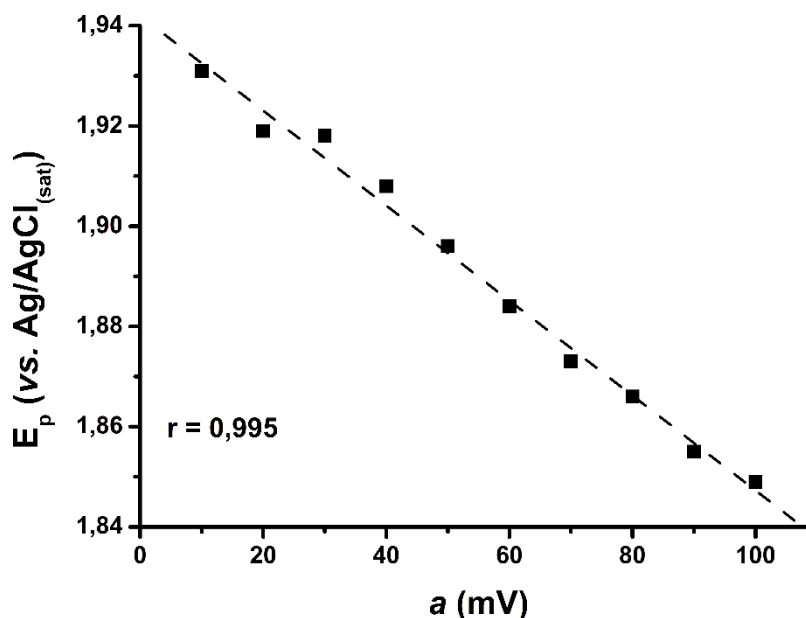
Fonte: O autor.

Avaliando-se os voltamogramas e os gráficos das **Figura 14 (A) e (B)**, nota-se que o aumento da amplitude dos pulsos de potenciais promoveu ganho linear na corrente de pico detectada na oxidação da SCP até os valores de 50 mV ($r = 0,997$), com aumento nas corrente até 70 mV de amplitude, embora esse aumento não seja linear. Para valores maiores que 70 mV, a corrente detectada atinge um patamar e não é observado aumento na corrente de pico. O efeito da amplitude dos pulsos também foi avaliado para a relação entre a corrente de pico (I_p) e a largura de pico a meia altura ($W_{1/2}$), de modo a priorizar não apenas a intensidade do sinal, mas também a seletividade. A tendência apresentada na **Figura 14 (C)** é similar àquela apresentada por I_p , mas a linearidade estende-se até amplitudes de pulsos no valor de 60 mV (r

= 0,992), de modo que valores de amplitude dentro desse intervalo não ocasionam alargamento do pico. De acordo com a teoria da SWV, valores de amplitude de $50/n$ mV são ideais para aplicações analíticas (DE SOUZA; MACHADO; AVACA, 2003; MIRCESKI; KOMORSKY-LOVRIC; LOVRIC, 2007), e com base nos resultados apresentados na **Figura 14**, o valor de 50 mV foi o valor escolhido para o desenvolvimento do trabalho.

Ademais, o efeito da variação nos valores de amplitude de aplicação dos pulsos de potencial foi avaliado para o potencial de pico detectado para oxidação da SCP, como mostrado na **Figura 15**.

Figura 15. Relação entre E_p e amplitude de aplicação dos pulsos de potencial para os voltamogramas da **Figura 14**.



Fonte: O autor.

Observando os dados da **Figura 15** é evidente a diminuição dos valores de E_p com o aumento no valor de amplitude, comportamento exibido por sistemas de esfera externa, governados preferencialmente por processos difusionais e sem complicações associadas a reações químicas acopladas ou adsorção de produtos (LABORDA *et al.*, 2011; MIRCESKI *et al.*, 2013). Numa reação redox de esfera externa, os reagentes, produtos e intermediários não interagem fortemente com o material do eletrodo e a transferência de elétrons ocorre por tunelamento em pelo menos uma monocamada de solvente, enquanto em uma reação de esfera interna há uma forte interação de reagente ou produto com a superfície do eletrodo. Assim, em

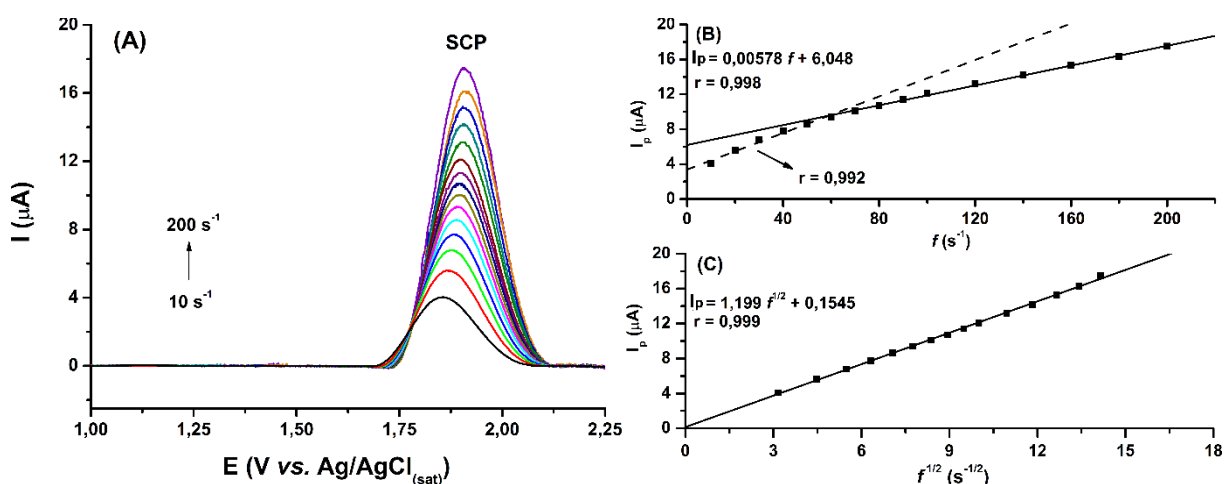
reações heterogêneas de esfera interna, os reagentes, intermediários ou os produtos são frequentemente adsorvidos a superfície do eletrodo (BARD, 2010).

Contudo, vale ressaltar que, ainda que não haja uma interação forte com o eletrodo, uma reação de esfera externa pode depender do material do eletrodo, devido aos efeitos de dupla camada ou ao efeito da energia e distribuição de estados eletrônicos no eletrodo (BARD; FAULKNER, 2001).

4.1.2.3 Frequência de aplicação dos pulsos de potencial (f)

A frequência de aplicação dos pulsos de potencial é um parâmetro crucial na técnica de SWV, uma vez que a programação da quantidade de pulsos de potencial a serem efetuadas em função do tempo é de fundamental importância para elucidar aspectos cinéticos e mecanísticos do processo redox a ser estudado (DE SOUZA; MACHADO; AVACA, 2003; MIRCESKI; KOMORSKY-LOVRIC; LOVRIC, 2007), assim como o estudo de velocidade de varredura (v) na voltametria cíclica. Desse modo, para a oxidação da SCP, a variação da frequência de aplicação dos pulsos de potencial foi estudada no intervalo entre 10 e 200 s^{-1} , conforme exibido nos nas **Figura 16 (A) e (B)**.

Figura 16. (A) Voltamogramas de onda quadrada obtidos para 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$ SCP, em diferentes frequências de aplicação de pulsos de potencial (B) Relação entre potencial de pico e a frequência de aplicação de pulso. (C) I_p vs. $f^{1/2}$. Eletrólito: H_2SO_4 0,5 mol L^{-1} ; $a = 50$ mV, $\Delta E_s = 2$ mV.



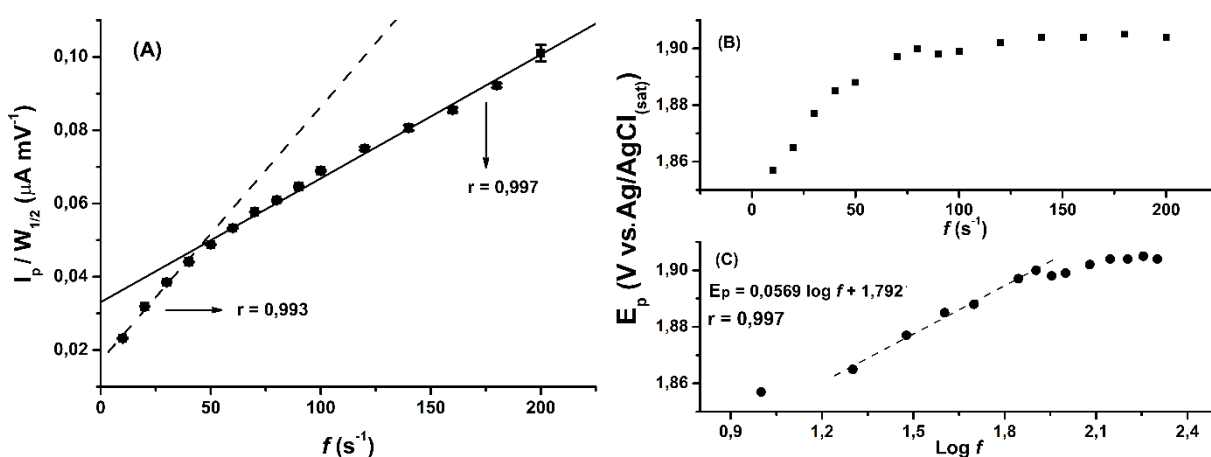
Fonte: O autor.

Com base nos resultados expostos na **Figura 16 (B)** é perceptível o aumento da corrente de pico para oxidação da SCP com o aumento nos valores de f . Contudo, esse aumento não é

linear em toda a faixa de frequência estudada, com duas regiões lineares, entre 10 e 60 s^{-1} ($r = 0,992$) e entre 60 e 200 s^{-1} ($r = 0,998$). Estudos teóricos desenvolvidos por O'Dea, Ribes e Osteryoung (1993) revelam que esse comportamento ocorre quando o processo de oxidação em questão não é governado exclusivamente pela adsorção da SCP à superfície do eletrodo. Em contrapartida, como apresentado na **Figura 16 (C)**, a corrente de pico (I_p) apresenta relação linear em com a raiz quadrada da frequência de aplicação dos pulsos de potencial em todo intervalo estudado ($r = 0,999$), indicando que a oxidação da SCP sobre o BDD é um processo difusional com cinética governada pelo transporte de massa até a superfície do eletrodo (O'DEA; RIBES; OSTERYOUNG, 1993). Portanto, com base nos resultados obtidos, tanto os fenômenos de adsorção quanto difusão estão presentes na oxidação da SCP sobre o BDD.

A relação $I_p/W_{1/2}$ vs. f também foi avaliada, como mostrado na **Figura 17 (A)**, sendo observadas duas regiões lineares (i) 10 e 50 s^{-1} ($r = 0,993$) e entre (ii) 50 e 200 s^{-1} ($r = 0,997$), de modo que não há efeito de alargamento de pico no intervalo estudado. Outras informações inerentes ao mecanismo de oxidação podem ser obtidas através do estudo da frequência de aplicação dos pulsos de potencial, notadamente, a quantidade de elétrons transferida e a reversibilidade do processo redox. A fim de obter tais informações, é necessário avaliar a variação do potencial de pico (E_p) em relação à f e $\log f$, como mostrado nas **Figura 17 (B e C)**.

Figura 17. (A) Relação $I_p/W_{1/2}$ vs. f . **(B e C)** Relações entre potencial de pico e frequência de aplicação dos pulsos de potencial para 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$ SCP, obtidas a partir dos voltamogramas da **Figura 16 (A)**. **(B):** E_p vs. f , **(C):** E_p vs. $\log f$.



Fonte: O autor.

O gráfico da **Figura 17 (B)** mostra o deslocamento gradual do potencial de pico para valores mais positivos com o aumento do valor de frequência até 75 s^{-1} . De acordo com os estudos iniciais desenvolvidos por O'Dea, Osteryoung e Osteryoung (1981), tal deslocamento

é apresentado em processos irreversíveis (O'DEA; OSTERYOUNG; OSTERYOUNG, 1981). Já o coeficiente angular (0,057) da seção linear exibida na Figura 17 (C) pode ser usado para calcular o número de elétrons envolvidos na oxidação da SCP, através da equação de Lovric, Equação (15), aplicada para sistemas com processos redox irreversíveis (DE SOUZA; MACHADO; AVACA, 2003; MIRCESKI; KOMORSKY-LOVRIC; LOVRIC, 2007):

$$\frac{\Delta E_p}{\Delta \log f} = \frac{2,3RT}{\alpha nF} \quad \text{Equação (15)}$$

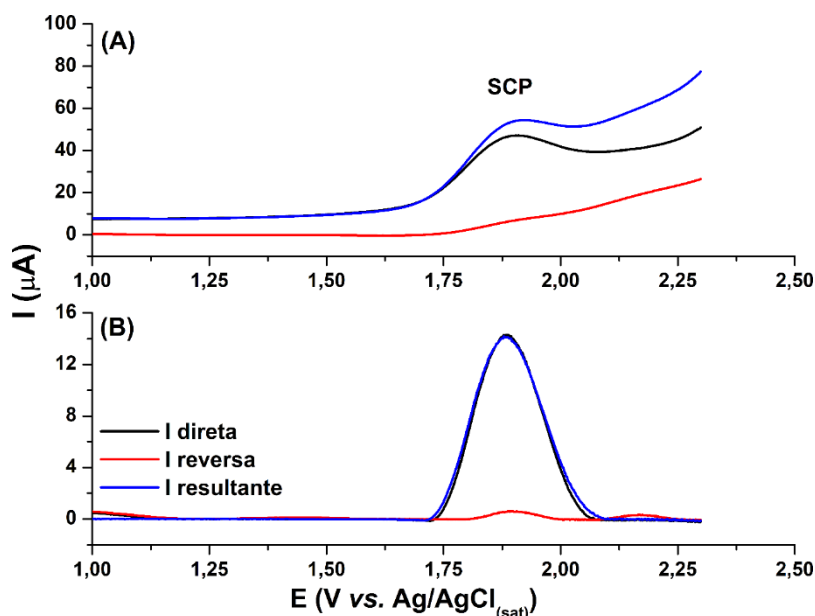
Onde R é a constante universal dos gases (8,314 J K⁻¹ mol⁻¹), T é a temperatura (298,15 K), α é o coeficiente de transferência eletrônica, n é o número de elétrons transferidos e F é a constante de Faraday (96485,3 C mol⁻¹). O valor de αn calculado foi 0,964. Assumindo $\alpha = 0,5$ (BARD; FAULKNER, 2001), o valor obtido para n é 1,93. Portanto, 2 elétrons estão envolvidos na oxidação da SCP sobre o BDD. Esses resultados estão em concordância com aqueles encontrados por voltametria cíclica e aos obtidos por Santos *et al.* (2014).

Com base nos resultados apresentados, a frequência de 100 s⁻¹ foi selecionada para ser usada nos estudos seguintes, tendo apresentado valores de corrente satisfatórios e perfil voltamétrico gaussiano para a oxidação da SCP.

4.1.2.4 Estudos sobre os componentes de corrente e a reversibilidade

Uma das características da voltametria de onda quadrada é a obtenção de voltamogramas independentes para os pulsos no sentido direto e reverso, de modo que a contribuição de cada componente para a corrente resultante pode ser explorada, afim de determinar a reversibilidade do processo (DE SOUZA; MACHADO; AVACA, 2003) e investigar comportamento quase-reversível dependente da frequência (MIRCESKI; KOMORSKY-LOVRIC; LOVRIC, 2007; O'DEA; OSTERYOUNG, 1993). Assim, o estudo das componentes de corrente nos parâmetros otimizados foi realizado a fim de elucidar o comportamento voltamétrico em termos das contribuições individuais da corrente direta e da corrente reversa. Os resultados deste estudo são mostrados na **Figura 18**, tanto antes quanto depois da correção da linha base.

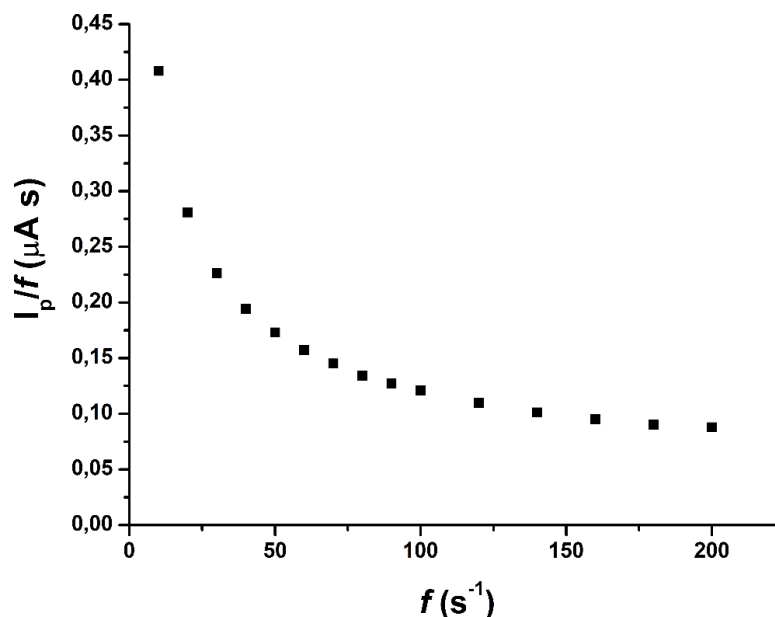
Figura 18. Voltamogramas de onda quadrada obtidos para solução contendo $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ de SCP com a separação das componentes de corrente direta e reversa antes (A) e depois (B) da correção da linha base. Eletrodo de trabalho: BDD. Eletrólito: H_2SO_4 $0,5 \text{ mol L}^{-1}$; $f = 100 \text{ s}^{-1}$; $a = 50 \text{ mV}$; $\Delta E_s = 6 \text{ mV}$.



Fonte: O autor.

Analisando os voltamogramas da **Figura 18 (A)** é possível perceber a desigualdade entre as contribuições advindas das correntes direta e reversa. Após a aplicação da correção de linha base, contudo, é possível perceber o surgimento de um pequeno pico de oxidação, na varredura reversa, como mostrado na **Figura 18 (B)**. Os voltamogramas teóricos esperados para o caso de um sistema irreversível não apresentam nenhuma contribuição da corrente proveniente da varredura reversa. O sinal obtido, entretanto, não é aquele esperado para o caso de sistemas que apresentem processos quase-reversíveis (DE SOUZA; MACHADO; AVACA, 2003). A fim de eliminar essa possibilidade, foi estudada a ocorrência do “máximo quasireversível”, exibido na **Figura 19**.

Figura 19. Relações entre I_p/f vs. f para caracterização do máximo quase-reversível para $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ SCP, obtidas a partir dos voltamogramas SWV da **Figura 16**.

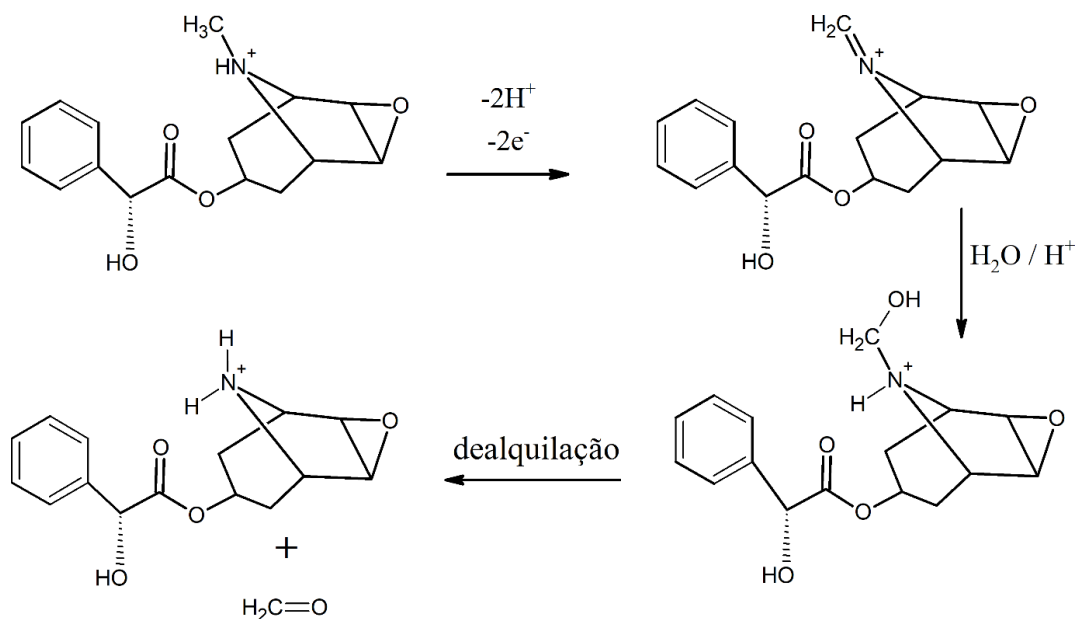


Fonte: O autor.

Avaliando a tendência apresentada pelo gráfico da Figura 19, é possível notar que não há surgimento do máximo quase-reversível para a oxidação da SCP no intervalo de frequência. Portanto, o pico de oxidação obtido na varredura reversa está relacionado à baixa velocidade de difusão da SCP, de modo que, quando o pulso reverso é aplicado, ainda ocorre a oxidação de reagentes sobre a superfície do eletrodo, fenômeno conhecido como histerese. Além disso, como o sinal observado nas varreduras direta e reversa possuem o mesmo sentido, pode-se afirmar que a oxidação da SCP sobre o BDD ocorre de forma irreversível.

Após a avaliação de todos os parâmetros voltamétricos e tendo conhecimento do número de prótons e elétrons envolvidos no processo redox, além dos resultados obtidos por Freitas *et al.*, (2017), para a determinação de cocaína, outro alcaloide tropânico, o mecanismo de oxidação proposto para a SCP em meio ácido, sobre a superfície do BDD é apresentado na **Figura 20**.

Figura 20. Mecanismo proposto para oxidação de SCP sobre o BDD em meio ácido.



Fonte: O autor.

Como mostrado na **Figura 20**, o processo de oxidação acontece através da transferência de dois elétrons e dois prótons, resultando em um íon intermediário imínio, que após hidratação e um rearranjo intramolecular, converte-se em produtos de N-dealquilação, que correspondem a uma amina secundária protonada e formaldeído.

4.1.3 Estudo para detecção e quantificação de SCP nas amostras de bebidas

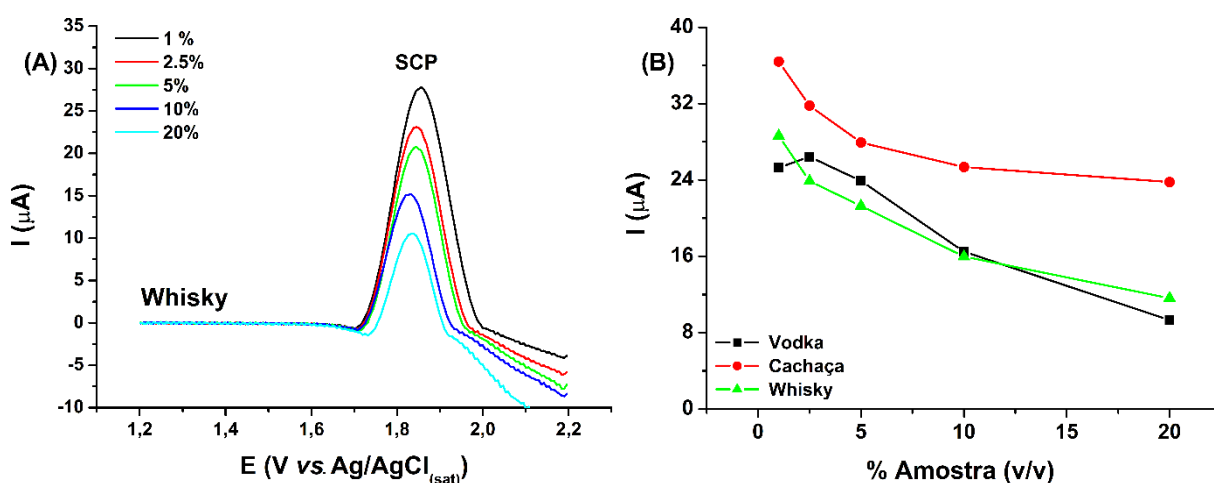
Como diversas bebidas podem ser utilizadas para a aplicação do “*Boa noite, Cinderela*” é necessário que o método desenvolvido seja robusto o suficiente para ser aplicado a amostras com diferentes composições químicas, com o mínimo possível de etapas de preparação e/ou pré-tratamento. Dessa forma, foram realizados estudos a fim de determinar a influência da diluição das amostras na corrente de oxidação registrada e as faixas lineares para a quantificação de SCP nas seguintes bebidas: cachaça, energético, Skol Beats[®], vodka e whisky.

4.1.3.1 Estudo da diluição e faixas lineares de resposta em diferentes amostras de bebidas

Após a otimização dos parâmetros da SWV, a influência da diluição das amostras na detecção da SCP foi avaliada, uma vez que a elevada concentração de álcool nas amostras de

cachaça, whisky e vodka pode ser um interferente na detecção do analito em questão. Desse modo, soluções com $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ de SCP, contendo diferentes proporções de amostra e eletrólito de suporte foram preparadas, com composição variando entre 1% e 20% (v/v) dessas amostras. A corrente de pico registrada para a oxidação da SCP em cada uma dessas soluções é apresentada na **Figura 21**.

Figura 21. (A) Voltamogramas de onda quadrada obtidos para solução contendo $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ de SCP com % de whisky variando entre 1 e 20% (v/v). (B) Comparação entre as correntes de pico registradas para a oxidação de $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ SCP nas amostras de vodka, cachaça e whisky em diluições entre 1 e 20% (v/v). Condições experimentais: Similares à **Figura 18**.



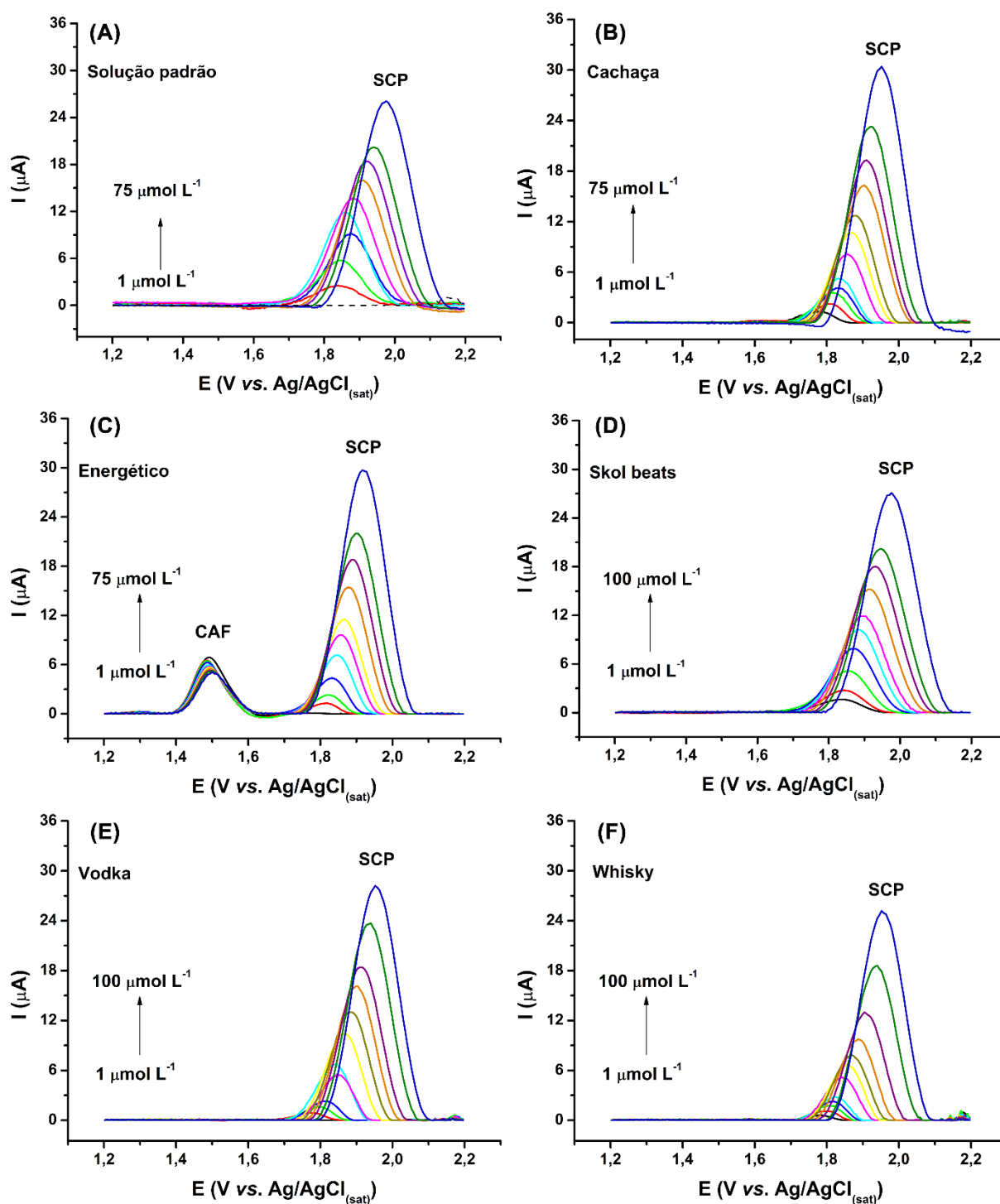
Fonte: O autor.

Observando os voltamogramas registrados para soluções contendo diferentes porcentagens de whisky (**Figura 21 A**) e os valores de corrente de oxidação exibidos na **Figura 21 (B)** podemos concluir que a corrente de oxidação da SCP diminui consideravelmente com o aumento do percentual da amostra na solução (efeito de matriz). O efeito é mais pronunciado nas amostras de vodka e whisky, nas quais a corrente de oxidação corresponde à menos de 50% da corrente registrada quando a diluição de 1% (v/v) é empregada para as mesmas amostras. Desse modo, a diluição de 1% (v/v) foi empregada para todas as amostras, para a realização das etapas subsequentes.

Uma vez otimizada a diluição das amostras a ser utilizada para a detecção de SCP nas amostras em estudo, o estudo de linearidade foi realizado, como descrito na seção **3.3.6**. Aliquotas de solução contendo 1 mmol L^{-1} SCP (preparada em 1% (v/v) das amostras investigadas, diluídas em eletrólito de suporte), foram adicionadas à célula para avaliar a linearidade entre concentração e corrente de oxidação detectada para SCP em concentrações

entre 1 e 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Os voltamogramas registrados nesse estudo são apresentados na **Figura 22**.

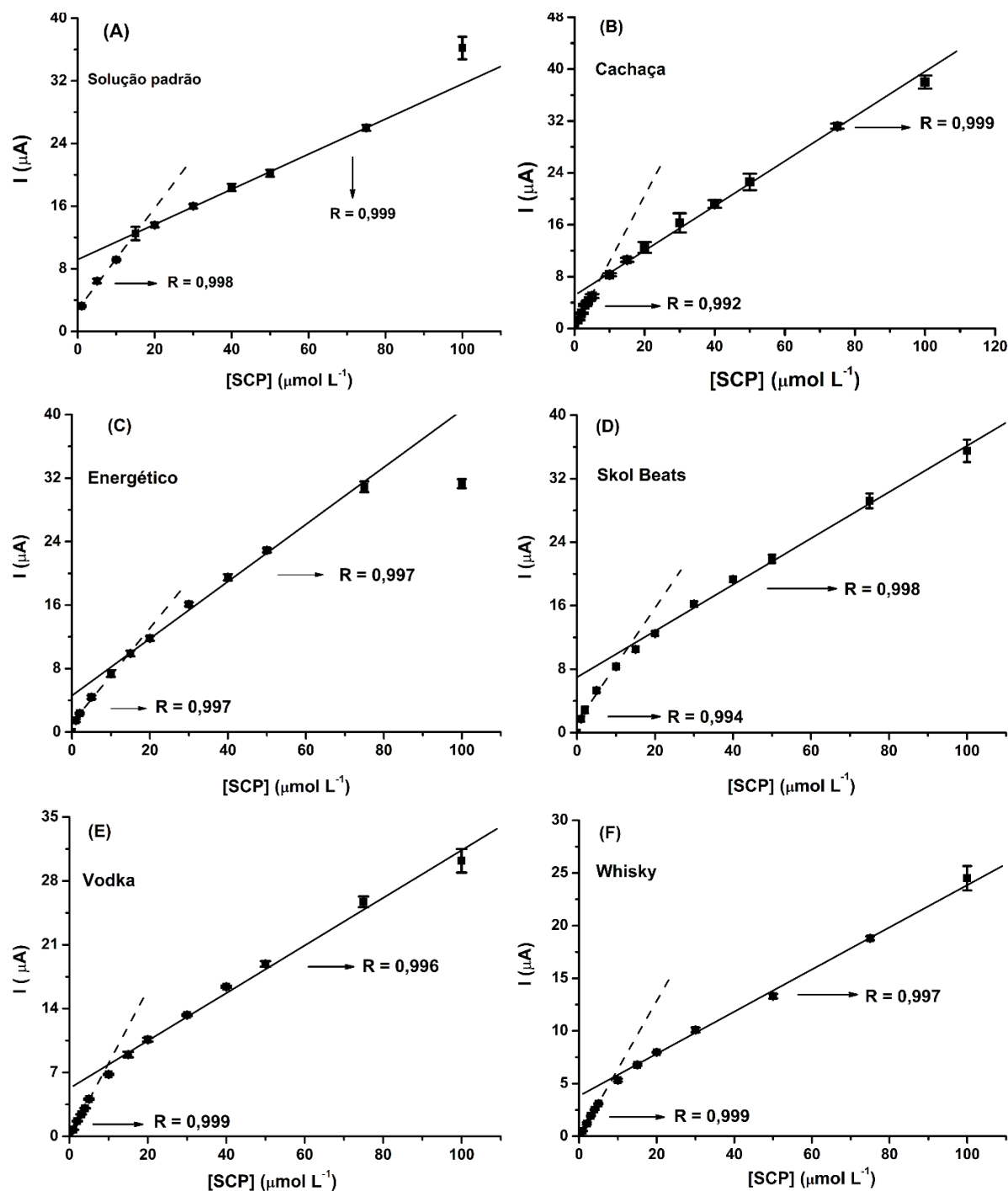
Figura 22. Voltamogramas registrados para soluções contendo concentrações crescentes de SCP em solução padrão (A) e em soluções contendo 1% (v/v) das amostras estudadas: (B) cachaça; (C) energético; (D) Skol Beats®; (E) vodka e (F) whisky. Condições experimentais iguais à Figura 18.



Fonte: O autor.

Com base nos voltamogramas da **Figura 22**, empregando soluções com 1% das amostras, a detecção de SCP em baixas concentrações ($1 \mu\text{mol L}^{-1}$) é possível, mesmo quando a amostra possui outro componente eletroativo, como a CAF, presente na amostra de energético, **Figura 22 (C)**. As curvas de calibração para SCP entre 1 e $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ (levando em consideração a diluição na célula) na ausência e presença de 1% das amostras são apresentadas na **Figura 23**.

Figura 23. Faixas lineares obtidas para as correntes de oxidação de SCP (1 a 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$) na solução padrão (A) e nas amostras: (B) cachaça; (C) energético; (D) Skol Beats[®]; (E) vodka e (F) Whisky; com diluição de 1% (v/v). Condições experimentais: similares à Figura 18.

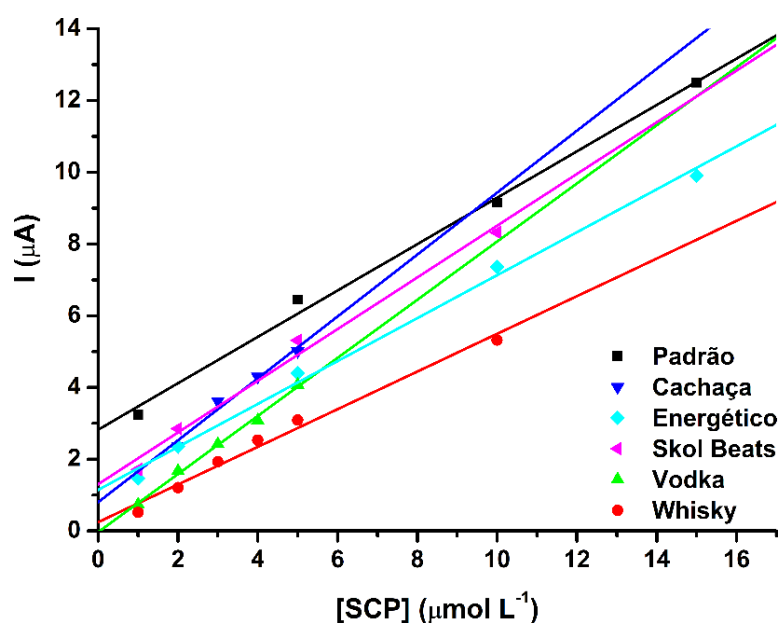


Fonte: O autor.

Com base nos gráficos de linearidade mostrados na **Figura 23** é notável que a oxidação da SCP sobre a superfície do BDD ocasiona o surgimento de duas faixas lineares em todas as soluções investigadas. A primeira faixa linear compreende valores de concentração até 15 $\mu\text{mol L}^{-1}$

L^{-1} , sendo a segunda faixa linear mais extensa, abrangendo os valores de concentração de 15 e $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ para soluções sem e com a presença de 1% das amostras. Além disso, em função da diferença de composição entre as amostras estudadas (**Tabela 4**) fica evidente a diferença entre as intensidades de corrente detectadas entre as varreduras para as soluções sem e com a presença de 1% das amostras, ou seja, nota-se o efeito de matriz. Para melhor avaliar a diferença de sensibilidade registrada as diferentes soluções, o primeiro intervalo de linearidade foi avaliado, como mostrado na **Figura 24**.

Figura 24. Comparação entre as inclinações apresentadas pela a corrente de oxidação detectada para SCP na solução padrão e em 1% (v/v) das amostras estudadas.



Fonte: O autor.

Observando as inclinações (sensibilidades) apresentadas na **Figura 24** fica evidente que o efeito matriz não está relacionado apenas à quantidade álcool presente nas bebidas analisadas. As amostras de cachaça, vodka e whisky possuem quase a mesma graduação alcoólica ($\sim 40\%$ v), contudo, as inclinações registradas para as 3 amostras são notavelmente diferentes. As amostras de vodka e cachaça apresentam inclinações mais acentuadas do que aquela calculada para a solução padrão (sem amostra), ao passo que a intensidade da corrente de oxidação detectada na amostra de whisky é bem inferior às demais amostras. As linearidades e as inclinações calculadas para os dados da **Figura 23** são apresentados na **Tabela 6**.

Tabela 6. Faixas lineares (FL) e inclinações obtidas para as soluções sem e com a presença de 1% das amostras estudadas.

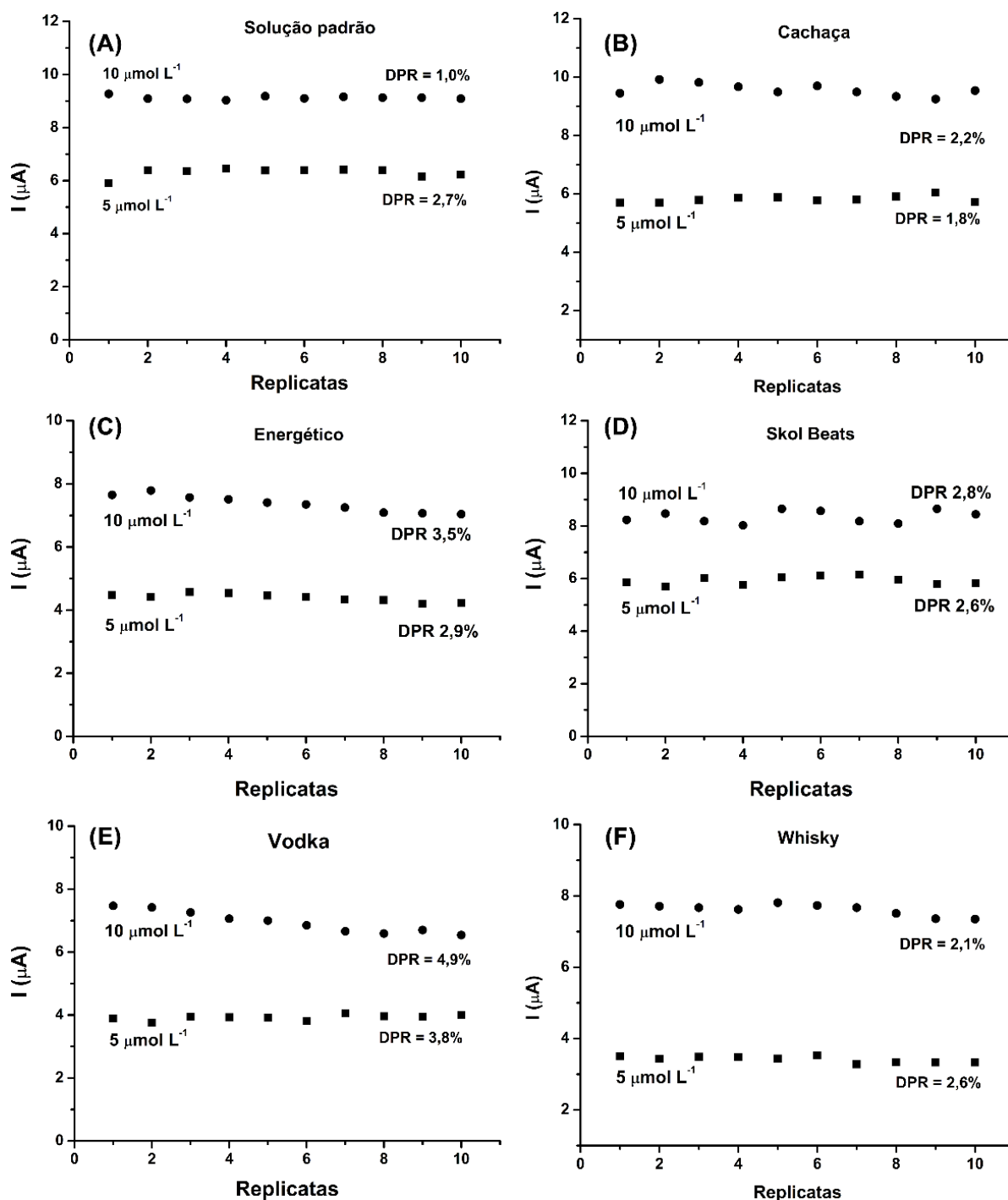
Solução	FL ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	r	Inclinação ($\mu\text{A L } \mu\text{mol}^{-1}$)	Intercepto (μA)
Padrão	1 – 15	0,998	0,647	2,8
	15 – 75	0,999	0,224	9,2
Cachaça	1 – 5	0,992	0,932	1,2
	10 – 75	0,999	0,330	5,8
Energético	1 – 15	0,997	0,598	1,2
	10 – 75	0,997	0,360	4,6
Skol Beats®	1 – 10	0,994	0,721	1,3
	15 – 100	0,998	0,292	6,9
Vodka	1 – 5	0,999	0,805	-0,02
	10 – 100	0,996	0,261	5,3
Whisky	1 – 10	0,999	0,635	-0,04
	10 – 100	0,997	0,206	3,8

Fonte: O autor.

4.1.3.2 Estudo da repetibilidade

Após determinar as faixas lineares entre as correntes de oxidação detectadas e concentração de SCP nas amostras de bebida, a precisão do método proposto foi avaliada em varreduras sucessivas ($n = 10$) de soluções contendo 5 e 10 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de SCP em soluções contendo 1% (v/v) de cada uma das amostras. As correntes detectadas nesse estudo são mostradas na **Figura 25**.

Figura 25. Correntes de oxidação detectadas nas varreduras sucessivas ($n=10$) para soluções contendo 5 e $10\ \mu\text{mol L}^{-1}$ de SCP em em solução padrão (A) e em soluções com 1% (v/v) das amostras em $\text{H}_2\text{SO}_4\ 0,5\ \text{mol L}^{-1}$: (B) cachaça; (C) energético; (D) Skol Beats[®]; (E) vodka e (F) whisky; Condições experimentais: similares à Figura 18.



Fonte: O autor.

As correntes de oxidação registradas na **Figura 25** apresentam DPR inferiores a 5% para todas amostras estudadas, mesmo quando outras espécies eletroativas encontram-se

presentes, como a cafeína presente no energético. Esses resultados demonstram que o método proposto apresenta precisão adequada para a detecção de SCP nas amostras de bebidas estudadas, sem etapas prévias de preparo de amostra e sem a necessidade de modificação da superfície do eletrodo de trabalho (BDD).

Os parâmetros analíticos do método SWV para detecção de SCP nas amostras de bebidas empregando o sistema estacionário e utilizando os dados das faixas lineares em menores valores de concentração são apresentados na **Tabela 7**.

Tabela 7. Parâmetros analíticos do método SWV proposto para a detecção de SCP nas amostras de bebida (n=3).

Parâmetros analíticos						
Amostras	Inclinação $\mu\text{A L } \mu\text{mol}^{-1}$	r	FL $\mu\text{mol L}^{-1}$	LD $\mu\text{mol L}^{-1}$	LQ $\mu\text{mol L}^{-1}$	DPR n = 10
Solução padrão	0,647	0,998	1 – 15	1,40	4,65	2,7
Skol Beats®	0,721	0,994	1 – 10	1,33	4,43	2,8
Energético	0,598	0,997	1 – 15	1,04	3,47	3,5
Cachaça	0,932	0,992	1 – 5	0,15	0,51	2,2
Vodka	0,805	0,999	1 – 5	0,23	0,78	4,9
Whisky	0,635	0,999	1 – 10	0,21	0,71	2,6

r: coeficiente de correlação; FL: faixa linear; LD: limite de detecção; LQ: limite de quantificação; DPR: desvio padrão relativo. Os valores apresentados para as faixas lineares e LD/LQ foram corrigidos para concentração de SCP obtida após a diluição de 100 vezes. **Fonte:** O autor.

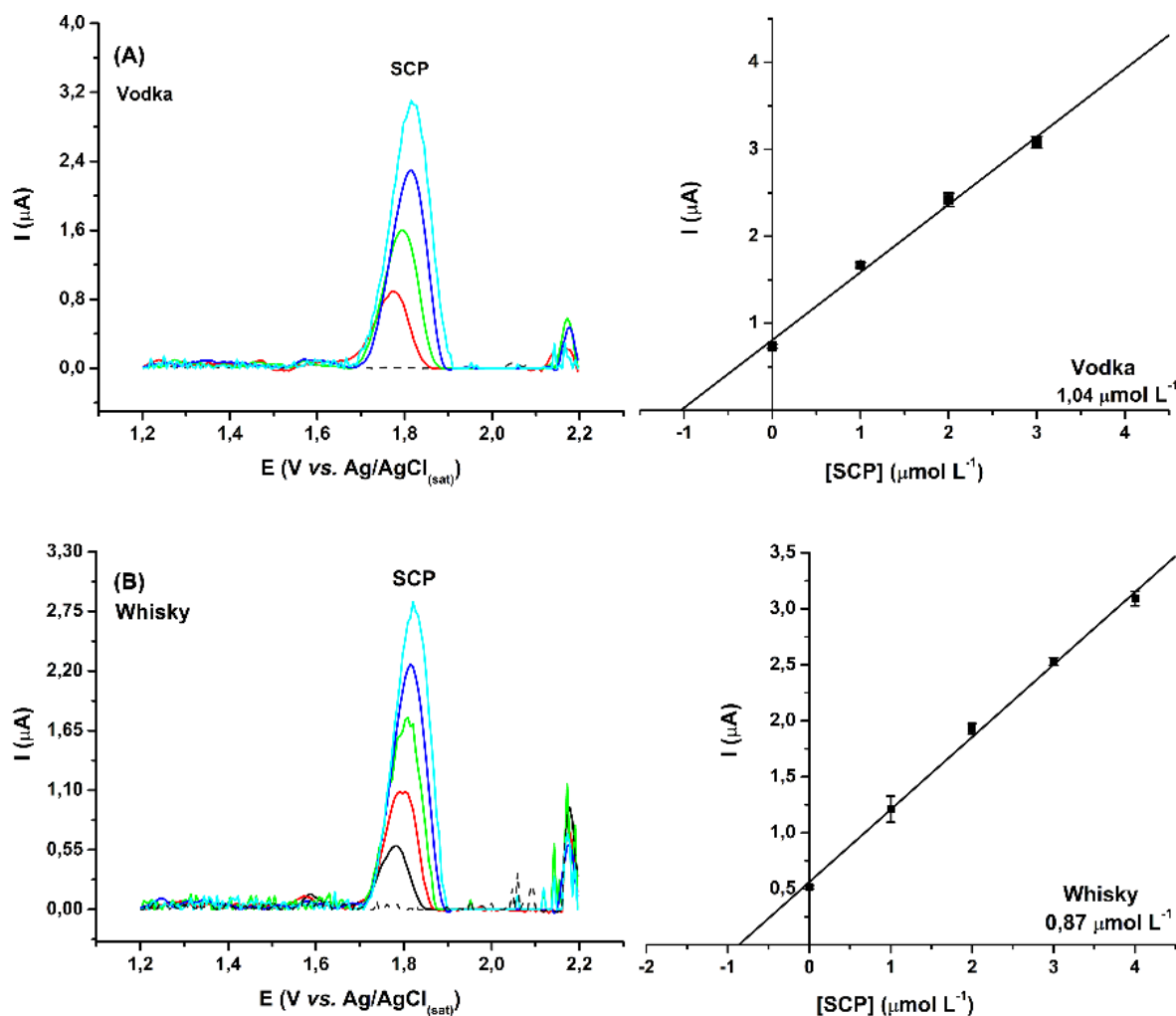
Finalmente, após a otimização de todos os parâmetros experimentais, o método proposto foi aplicado para a quantificação de SCP nas amostras de bebida em estudo.

4.1.3.3 Quantificação de SCP nas amostras de vodka e whisky pelo método da adição de padrão

Como já mostrado na **Figura 24** e **Tabela 6**, o efeito de matriz é evidente mesmo quando diluição de 1% (v/v) das amostras é utilizada. Uma vez que a construção de curvas de calibração externa que replicassem a composição de todas as amostras estudadas não é possível, o método de adição de padrão foi utilizado na quantificação de SCP em todas as amostras estudadas.

As amostras puras foram fortificadas com $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ de SCP de modo que, após a diluição em eletrólito de suporte para 1% (v/v), a concentração de SCP na célula foi de $1 \mu\text{mol L}^{-1}$. Os resultados obtidos para as amostras de vodka e whisky são mostrados na **Figura 26**.

Figura 26. Voltamogramas obtidos para varreduras de SWV de soluções contendo 1% das amostras (v/v) adulteradas com $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ de SCP: (A) Vodka e (B) whisky diluídas 100 vezes em H_2SO_4 $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ antes (---) e após adições sucessivas de $1 \mu\text{mol L}^{-1}$ de SCP, com as respectivas curvas de calibração de adição de padrão. Condições experimentais: similares às da **Figura 18**.



Fonte: O autor.

Como pode ser visto pelas curvas de calibração de adição de padrão da **Figura 26**, a quantidade de SCP recuperada foi de 87% para a amostra de whisky e 104% para a amostra de vodka. Os resultados de recuperação para as amostras de cachaça, energético e Skol Beats®, contudo, ficaram acima da quantidade máxima ($>120\%$) preconizada pela ANVISA (2018). Observando os valores de intercepto no eixo y, na **Tabela 6**, é possível notar que para essas

amostras, valores na ordem de 1,2 μA são obtidos para a faixa linear em concentrações menores, de modo que a aplicação do método para a quantificação de SCP nessas amostras não é satisfatório.

A adulteração criminosa de bebidas com SCP para aplicação de uma das versões “Boa noite, Cinderela” é mais frequente em bebidas alcoólicas, uma vez que esse tipo de bebida é o mais consumido em bares e boates (ANDERSON; FLYNN; PILGRIM, 2017; DODICH; SIEDLARZ, 2014). Vale salientar, ainda, que a simples adição de SCP a essas amostras já configura intenção criminosa, e assim, o método SWV desenvolvido para a detecção de SCP nas amostras de bebidas se mostrou eficiente para a realização de varreduras qualitativas, a fim de verificar a presença de adulteração nas amostras de estudadas, empregando o sistema estacionário (convencional). Entretanto, a quantificação da SCP adicionada à essas bebidas só foi possível para as amostras de vodka e whisky.

Contudo, o método proposto também tem como objetivo a quantificação da SCP adicionada à uma variedade maior de bebidas, e não apenas whisky e vodka. Portanto, a possibilidade de aplicação do método proposto ao sistema BIA foi avaliada. O efeito de matriz pode ser minimizado neste tipo de célula (BRETT; BRETT; TUGULEA, 1996a) de modo que a quantificação de SCP nas demais amostras pode ser possível.

4.2 Parte II - Determinação de SCP em bebidas e urina empregando o sistema BIA com detecção por voltametria de onda quadrada (BIA-SWV)

Uma vez que a quantificação da SCP em bebidas apresentou limitações usando o sistema estacionário, estudos foram realizados para adaptação da análise a um sistema por análise por injeção em batelada (BIA). Essa estratégia foi adotada com base nas vantagens inerentes à técnica: i) a solução amostra permanece em contato com o BDD apenas durante a injeção e varredura, de modo que o efeito de memória (comum em eletrodos sólidos) é reduzido; ii) portabilidade, sem necessidade de lavagem do sistema entre uma triagem e outra; iii) alta sensibilidade, elevada frequência analítica e reduzido consumo das amostras (BRETT;

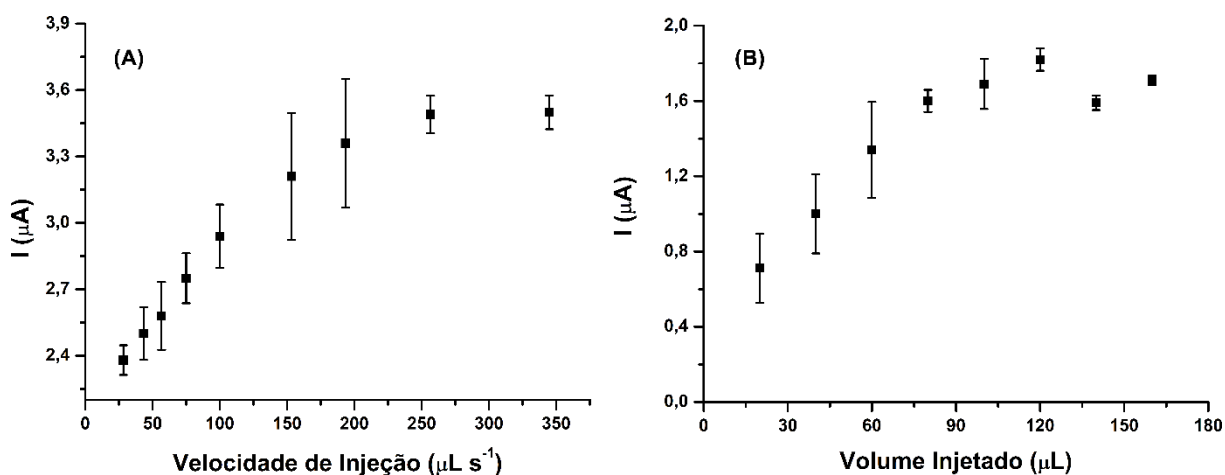
OLIVEIRA BRETT; MITOSERIU, 1994; QUINTINO; ANGNES, 2004; TORMIN *et al.*, 2014b).

O pré-tratamento anódico e os parâmetros voltamétricos otimizados anteriormente foram mantidos, de modo que apenas os parâmetros hidrodinâmicos (velocidade e volume de injeção) foram estudados. Além disso, a amostra de Skol Beats[®] foi substituída por cerveja e a amostra de Coca-Cola[®] também foi analisada.

4.2.1 Otimização do volume e da velocidade de injeção

Antes de aplicar o método BIA-SWV na determinação de SCP nas amostras de bebida foi necessário o estudo dos parâmetros de injeção do sistema BIA. Para a realização desses estudos foi utilizada uma solução contendo vodka (1% v/v) de modo a obter-se o melhor sinal analítico já na presença dos componentes da amostra. Desse modo, os parâmetros otimizados já levariam em conta o efeito de matriz (oriundo da oxidação do etanol presente na amostra), a fim de evitar os problemas enfrentados na aplicação do método ao sistema estacionário. Na otimização da velocidade de injeção, o volume foi mantido em 100 μL ; na otimização do volume injetado, a velocidade de injeção foi mantida constante em 100 $\mu\text{L s}^{-1}$. Os resultados desses testes são mostrados na **Figura 27**.

Figura 27. Variação da corrente de oxidação da SCP em função da velocidade de injeção (A) e do volume injetado (B). Condições: Volume injetado: 100 μL em (A); Velocidade de injeção: 100 $\mu\text{L s}^{-1}$ em (B). Concentração de SCP: 1 $\mu\text{mol L}^{-1}$ em vodka diluída em H_2SO_4 0,5 mol L^{-1} (1% v/v).



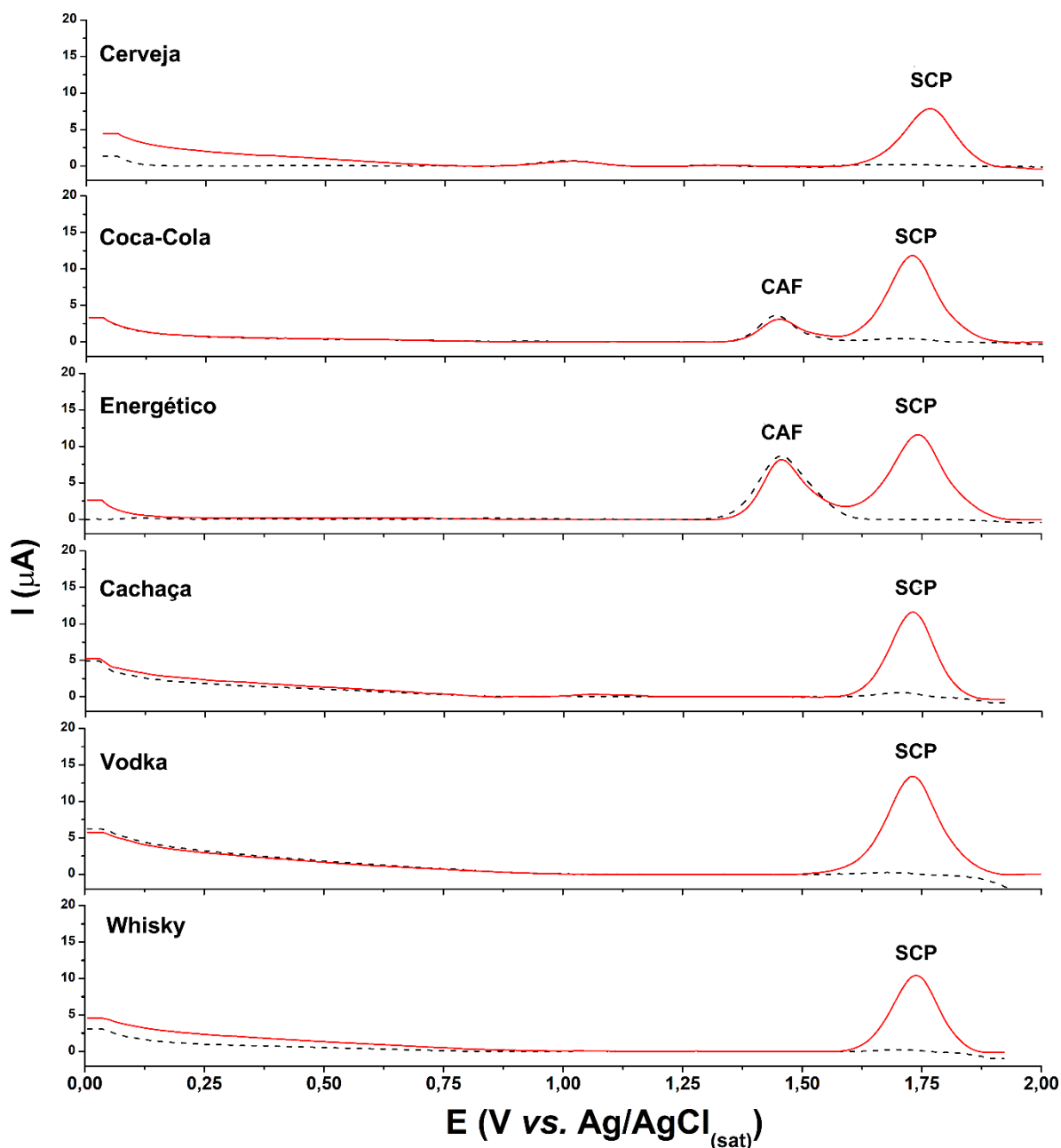
Fonte: O autor.

Com base nos resultados mostrados na **Figura 27 (A)** é perceptível que o aumento na velocidade de injeção promoveu aumento na corrente de oxidação da SCP até valores $250 \mu\text{L s}^{-1}$. Em velocidades superiores não houve aumento de corrente registrado. Para os resultados exibidos na **Figura 27 (B)**, aumento de corrente foi observado até o volume de $120 \mu\text{L}$, após o qual foi perceptível o decréscimo da corrente registrada. Assim, os valores de $250 \mu\text{L s}^{-1}$ e $120 \mu\text{L}$ foram escolhidos para velocidade e volume de injeção para a aplicação do método no sistema BIA, respectivamente.

4.2.2 Triagem de SCP nas amostras de bebida

Utilizando os parâmetros de injeção do sistema BIA otimizados, o método proposto foi empregado para a triagem rápida de SCP em amostras de bebida. Nestas análises, as amostras foram dissolvidas em eletrólito de suporte, de modo a obter-se soluções nas concentrações de 1% (v/v), e os voltamogramas obtidos são mostrados na **Figura 28**.

Figura 28. Varreduras de SWV obtidas para soluções contendo 1% (v/v) das amostras diluídas em H_2SO_4 0,5 mol L^{-1} antes (---) e após (—) a adição de SCP 6 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Eletrodo de trabalho: BDD; eletrólito de suporte: H_2SO_4 0,5 mol L^{-1} ; $f = 100 \text{ s}^{-1}$; $a = 50 \text{ mV}$; $\Delta E_s = 6 \text{ mV}$; volume injetado: 120 μL ; velocidade de injeção: 250 $\mu\text{L s}^{-1}$.



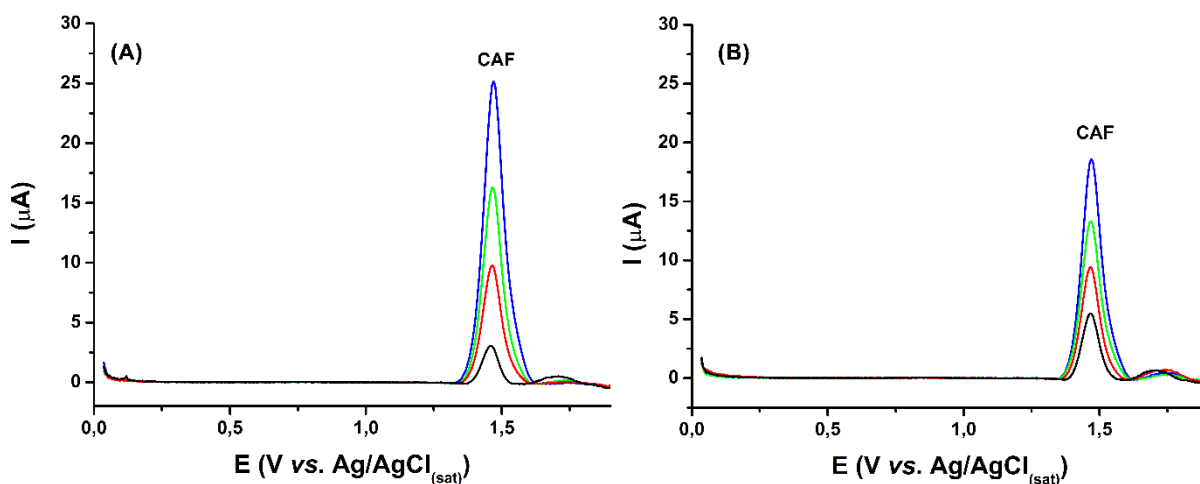
Fonte: O autor.

Como pode ser visto na **Figura 28**, apesar da composição química variada das amostras de bebidas selecionadas, um pico voltamétrico com perfil gaussiano (+1,75 V vs. $\text{Ag/AgCl}_{(\text{sat})}$) foi observado apenas nas soluções das amostras após adição de SCP (6 $\mu\text{mol L}^{-1}$). Contudo, também foi possível notar que a intensidade de corrente registrada não é a mesma para todas as amostras. Para cerveja, a corrente registrada é $\sim 8 \mu\text{A}$, enquanto para amostra de vodka, a

corrente de pico é de $\sim 13 \mu\text{A}$. Estes resultados demonstram que o método BIA-SWV é seletivo para a detecção de SCP em todas as bebidas testadas, mesmo quando outros compostos eletroativos estão presentes. Além disso, vale salientar que a triagem das bebidas foi realizada com mínima preparação das amostras, dispensando etapas de filtração.

Para as amostras de Coca-Cola® e energético foi observado um pico de oxidação em $+1,45 \text{ V}$ (vs. $\text{Ag}/\text{AgCl}_{(\text{sat})}$), que pode ser atribuído à CAF, presente em grande quantidade nas duas amostras. A fim de investigar essa hipótese foram realizadas adições de CAF às amostras, como mostrado na **Figura 29**.

Figura 29. Voltamogramas de SWV obtidos para amostras de (A) Coca-Cola® e (B) energético antes (—) e após (traços coloridos) a adição de concentrações crescente CAF ($25, 50$ e $75 \mu\text{mol L}^{-1}$) às soluções contendo 1% (v/v) de cada amostra em H_2SO_4 $0,5 \text{ mol L}^{-1}$. Condições experimentais: Similares à **Figura 28**.



Fonte: O autor.

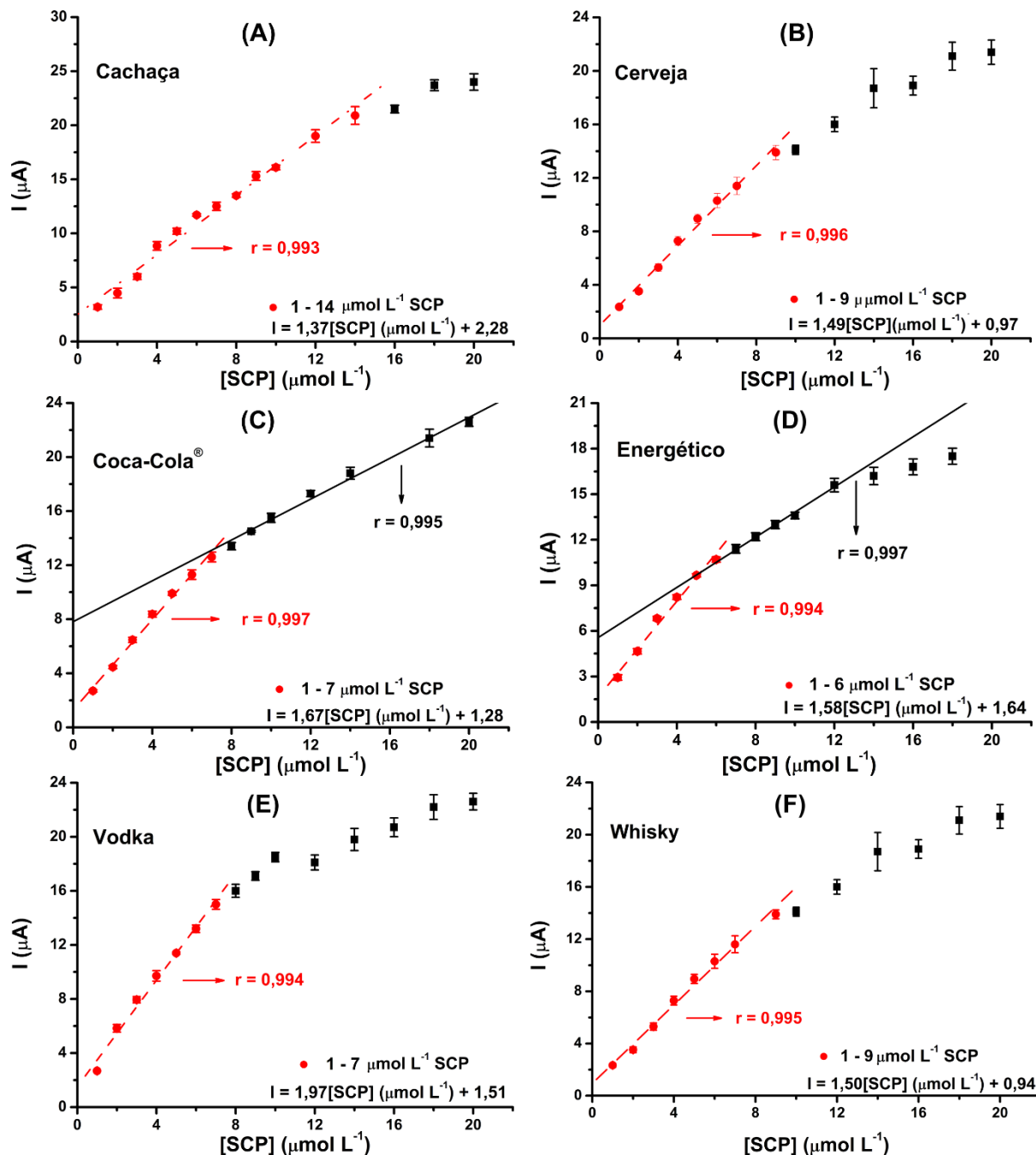
Pelos resultados mostrados na **Figura 29 (A) e (B)**, é notável o aumento do pico observado em $+1,45 \text{ V}$ com sucessivas adições de $25, 50$ e $75 \mu\text{mol L}^{-1}$ de CAF às soluções de Coca-Cola® e energético, sem o surgimento de picos adicionais ao sinal da amostra, confirmando que a origem do sinal voltamétrico pode ser atribuído à CAF.

Após a realização da triagem rápida das amostras, estudos adicionais foram realizados com o intuito de aplicar o método BIA-SWV proposto na quantificação de SCP nas bebidas adulteradas. Dessa forma, foram estudadas faixas lineares para relação entre a corrente de oxidação e a concentração de SCP adicionada a cada uma das amostras em questão.

4.2.3 Faixas lineares para a SCP em amostras de bebidas usando o sistema BIA-SWV

A faixa linear de concentração para a oxidação da SCP nas amostras de bebidas estudadas foi novamente investigada, uma vez que as características hidrodinâmicas da injeção no sistema BIA-SWV afetam a chegada de SCP à superfície do BDD, e consequentemente, a corrente registrada. De forma semelhante àquela realizada para o estudo de volume e velocidade de injeção, a diluição das amostras foi mantida em 1% (v/v) em H_2SO_4 $0,5 \text{ mol L}^{-1}$. Os resultados para esse estudo são mostrados na **Figura 30**.

Figura 30. Faixas lineares obtidas para soluções contendo concentrações crescentes de SCP em amostras diluídas em H_2SO_4 0,5 mol L^{-1} (1% v/v), usando o sistema BIA-SWV. Condições experimentais: Similares à **Figura 28**.



Fonte: O autor.

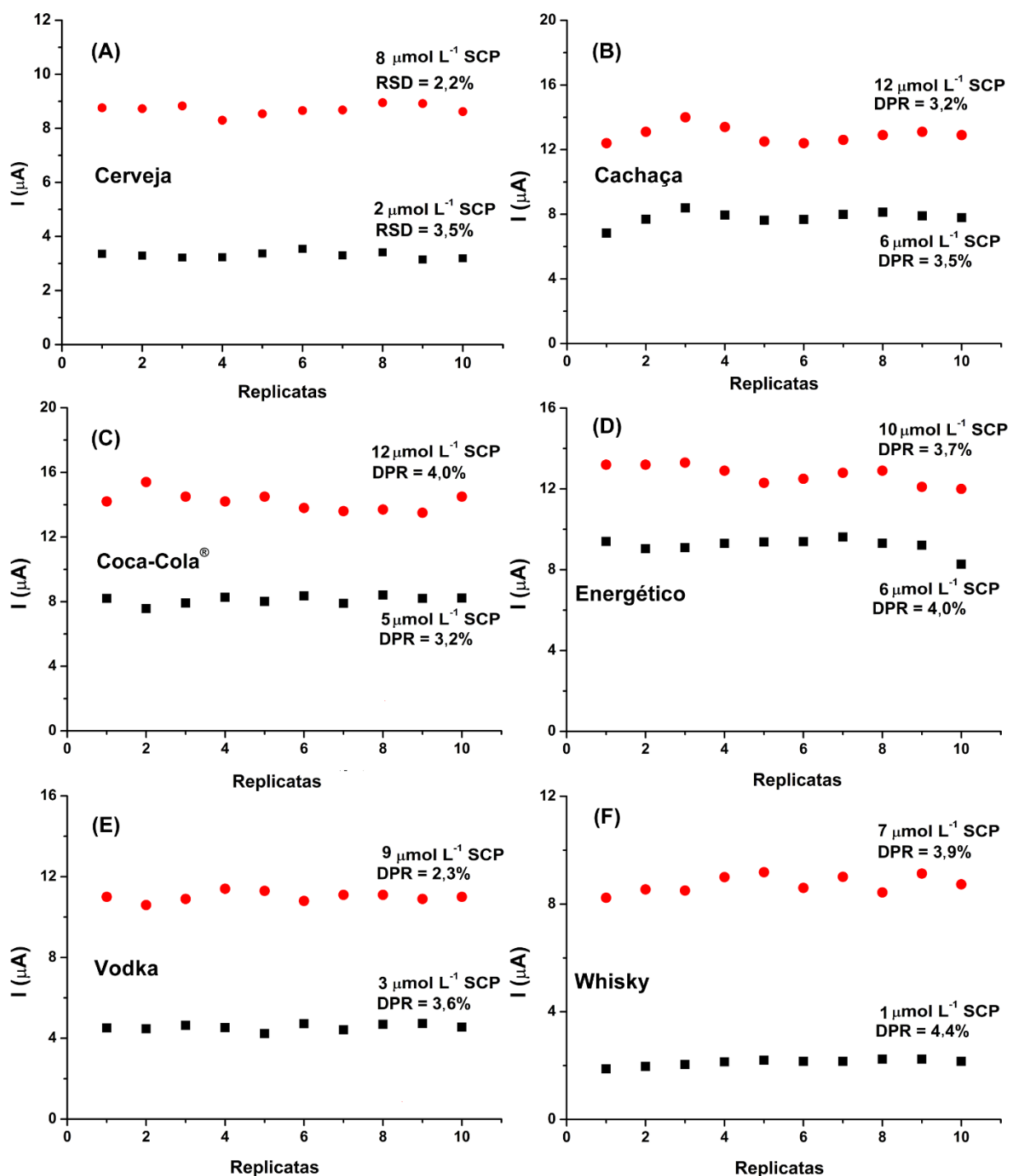
Com base nos resultados mostrados na **Figura 30**, de forma semelhante àquela observada com o sistema estacionário, a inclinação apresentada para a corrente de oxidação da SCP é afetada pela composição das bebidas, e consequentemente, a linearidade exibida difere significativamente entre as amostras (em decorrência do efeito de matriz). A amostra de cachaça (**Figura 30 A**) apresentou a faixa linear mais extensa (1 – 14 $\mu\text{mol L}^{-1}$), enquanto que a amostra

de energético (**Figura 30 D**) exibiu faixa linear menor ($1 - 6 \mu\text{mol L}^{-1}$). Um dos fatores que contribuíram para a linearidade menor obtida para essa amostra foi a oxidação da CAF, que ocorre em potencial bem próximo àquele no qual a oxidação da SCP começa a ser observado. Com o aumento na concentração de SCP, os picos tornam-se muito próximos, de modo que a corrente registrada não retorna à linha base (após o pico de CAF), impedindo a obtenção de picos com perfil gaussiano para a SCP. Contudo, vale ressaltar que para todas as amostras foi possível detectar picos de oxidação para SCP mesmo em valores de concentração tão baixos quanto $1 \mu\text{mol L}^{-1}$, sem nenhum tipo de pré-tratamento da amostra além da diluição de 100 vezes em eletrólito de suporte.

4.2.4 Estudo da repetibilidade na detecção de SCP em amostras de bebidas usando o sistema BIA-SWV

Uma vez otimizados os parâmetros experimentais do método, a repetibilidade do sinal voltamétrico detectado para a oxidação da SCP nas amostras foi avaliada. Na **Figura 31** são mostrados os resultados obtidos para varreduras sucessivas ($n = 10$) das soluções contendo 1% (v/v) das amostras com diferentes concentrações de SCP.

Figura 31. Resultados de varreduras sucessivas ($n = 10$) usando o sistema BIA-SWV para soluções contendo SCP em 1% (v/v) para cada amostra em H_2SO_4 $0,5 \text{ mol L}^{-1}$. Condições experimentais: Similares à **Figura 28**.



Fonte: O autor.

As correntes de pico registradas para a oxidação da SCP nas diferentes amostras, mostradas na **Figura 31**, exibem valores de desvio padrão relativo (DPR) inferiores a 4,5%, mesmo quando outros compostos eletroquimicamente ativos estão presentes nas amostras em elevada concentração, como ocorre com a CAF nas amostras de Coca-Cola® e energético,

Figura 31 (C) e (D), respectivamente. Os parâmetros analíticos do método proposto são mostrados na **Tabela 8**.

Tabela 8. Parâmetros analíticos do método BIA-SWV para a detecção de SCP nas amostras de bebida (n=3).

Parâmetros analíticos						
Amostras	Inclinação $\mu\text{A L } \mu\text{mol}^{-1}$	r	FL $\mu\text{mol L}^{-1}$	LD $\mu\text{mol L}^{-1}$	LQ $\mu\text{mol L}^{-1}$	DPR n = 10
Solução padrão	1,81	0,992	1 – 20	0,12	0,39	2,7
Cerveja	1,49	0,996	1 – 9	0,14	0,47	3,7
Coca-Cola®	1,67	0,997	1 – 7	0,13	0,42	4,0
Energético	1,58	0,994	1 – 6	0,13	0,44	4,0
Cachaça	1,37	0,993	1 – 14	0,15	0,51	3,4
Vodka	1,97	0,994	1 – 7	0,18	0,61	3,6
Whisky	1,50	0,995	1 – 9	0,14	0,46	4,6

r: coeficiente de correlação; FL: faixa linear; LD: limite de detecção; LQ: limite de quantificação; DPR: desvio padrão relativo. Os valores apresentados para as faixas lineares e LD/LQ foram corrigidos para concentração de SCP obtida após a diluição de 100 vezes. **Fonte:** O autor.

Comparando os resultados obtidos com o sistema estacionário (**Tabela 7**) e o sistema BIA-SWV (**Tabela 8**), é possível verificar que o sistema BIA possibilita a obtenção de LDs e LQs menores para todas as amostras estudadas, fato que pode ser atribuído à combinação da configuração *wall-jet* e da imediata remoção das amostras da superfície do BDD após a realização da varredura (menor contaminação/passivação com o tempo), atribuindo maior sensibilidade ao método. Contudo, comparando os valores de DPR (n = 10) calculados com para ambos os métodos, menores variações foram obtidas no sistema estacionário, uma vez que o sistema não é manipulado pelo operador entre as varreduras, ao passo que no sistema BIA, pequenas variações no momento da injeção podem ocasionar variações na corrente detectada. Entretanto, vale salientar que ambos os métodos propostos apresentam resultados satisfatórios para a realização de ensaios qualitativos rápidos, sem a necessidade de qualquer modificação ou condicionamento adicional da superfície do BDD ou pré-tratamento da amostra (além da diluição no eletrólito de suporte).

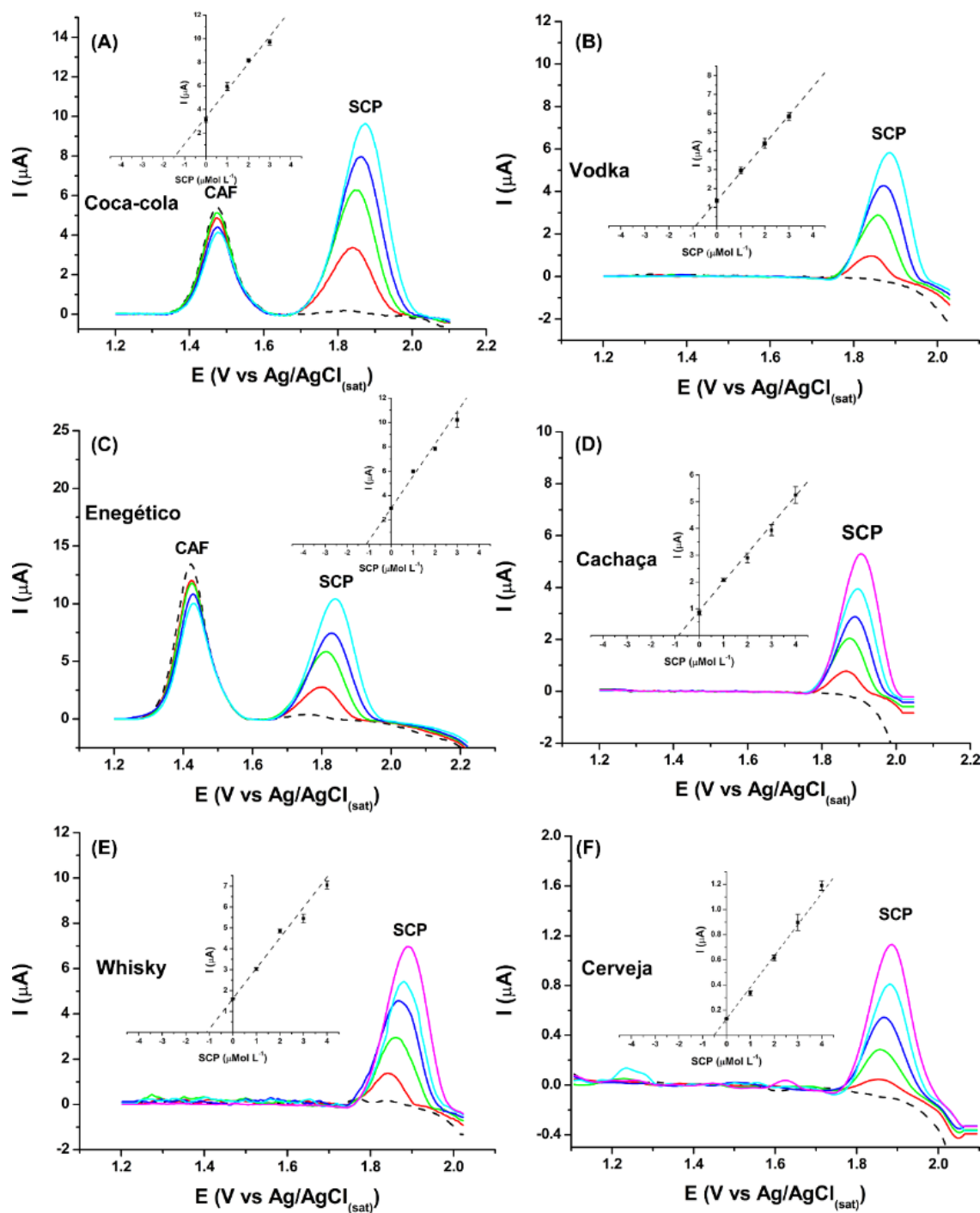
Ainda com relação aos parâmetros analíticos do método proposto, os valores dos LD calculados para o método desenvolvido no sistema BIA-SWV ($0,18 \mu\text{mol L}^{-1}$) são inferiores

aos LDs dos métodos voltamétricos relatados por Farhadi e Karimpour (2007), utilizando DPV e eletrodo de Pt ($0,2 \mu\text{mol L}^{-1}$), e por Santos e colaboradores (2014), empregando BDD como eletrodo de trabalho e SWV para detecção de SCP ($0,84 \mu\text{mol L}^{-1}$).

4.2.5 Quantificação de SCP em amostras de bebidas

Após a determinação da faixa linear e da realização do estudo de repetibilidade, o método BIA-SWV foi aplicado à quantificação de SCP nas amostras de bebidas estudadas. A **Figura 32** apresenta os voltamogramas de onda quadrada e as respectivas curvas de recuperação obtidas para soluções de amostras dopadas antes e após adição de concentrações crescentes de SCP (método de adição de padrão).

Figura 32. Voltamogramas obtidos para injeção de soluções contendo 1% das amostras (v/v) em H_2SO_4 0,5 mol L^{-1} antes (---) e após adição de padrão de SCP, com as respectivas curvas de recuperação. Condições experimentais: iguais à Figura 28.



Fonte: O autor.

Os estudos de adição e recuperação nas amostras apresentaram resultados entre 51% e 113%. Todas as amostras foram dopadas com baixas quantidades ($\sim 1 \mu\text{mol L}^{-1}$) de SCP, e o método BIA-SWV se mostrou eficiente na quantificação de pequenas concentrações de SCP

mesmo nas amostras que apresentam maior teor alcoólico, como vodka, whisky e cachaça, quanto nas amostras com CAF em concentração elevada. Os menores valores de recuperação foram encontrados para a amostra de cerveja. Diversas amostras de cerveja (diferentes marcas) foram submetidas ao estudo de adição e recuperação de SCP, sendo que resultados de recuperação em torno de 50% foram obtidos para todas as amostras. O baixo percentual de recuperação da SCP nessas amostras pode ser atribuída à composição complexa da cerveja. Os resultados para adição e recuperação de SCP nas amostras de bebida são mostrados na **Tabela 9**.

Tabela 9. Resultados obtidos nos estudos de adição e recuperação para amostras dopadas com SCP usando o método BIA-SWV (n=3).

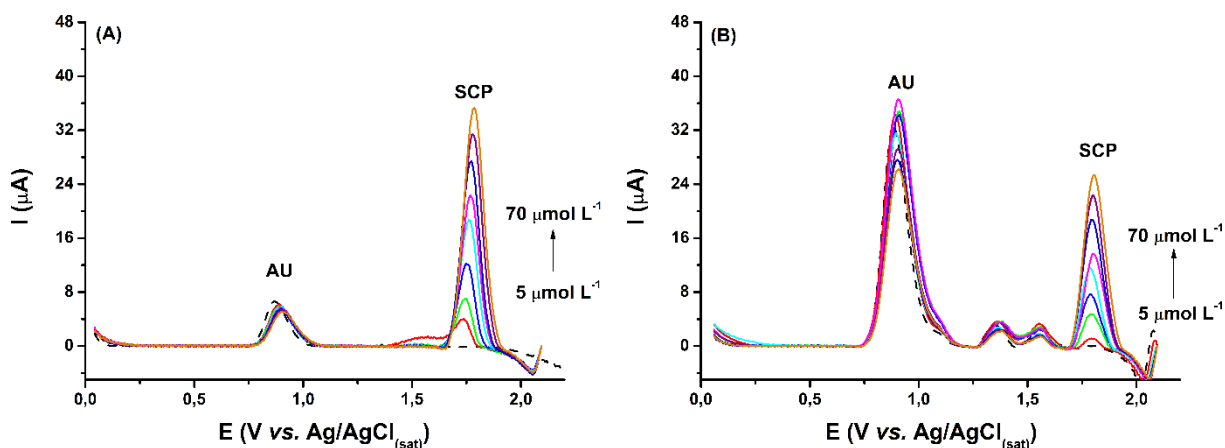
Amostra	Adicionado ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	Encontrado ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	Recuperado (%)
Coca-Cola®	1,50	$1,48 \pm 0,09$	99 ± 5
Cerveja	1,00	$0,51 \pm 0,03$	51 ± 3
Energético	1,00	$1,13 \pm 0,01$	113 ± 1
Cachaça	1,00	$0,87 \pm 0,08$	87 ± 8
Vodka	1,00	$0,89 \pm 0,05$	89 ± 5
Whisky	1,00	$1,08 \pm 0,02$	108 ± 2

Fonte: O autor.

4.2.6 Faixas lineares para as amostras de urina real e sintética

Conforme mencionado anteriormente, a ingestão de quantidades superiores à dose terapêutica máxima ocasionará o possível aparecimento do pico de oxidação da SCP na urina, o que viabiliza a investigação sobre a aplicação do método desenvolvido em amostras de urinas real e sintética, diluídas 10 vezes em eletrólito de suporte, como mostrado na **Figura 33**. O único parâmetro do método a ser modificado para a injeção das amostras de urina no sistema BIA-SWV foi a velocidade de injeção, sendo realizada a injeção das amostras na menor velocidade disponível para a pipeta utilizada.

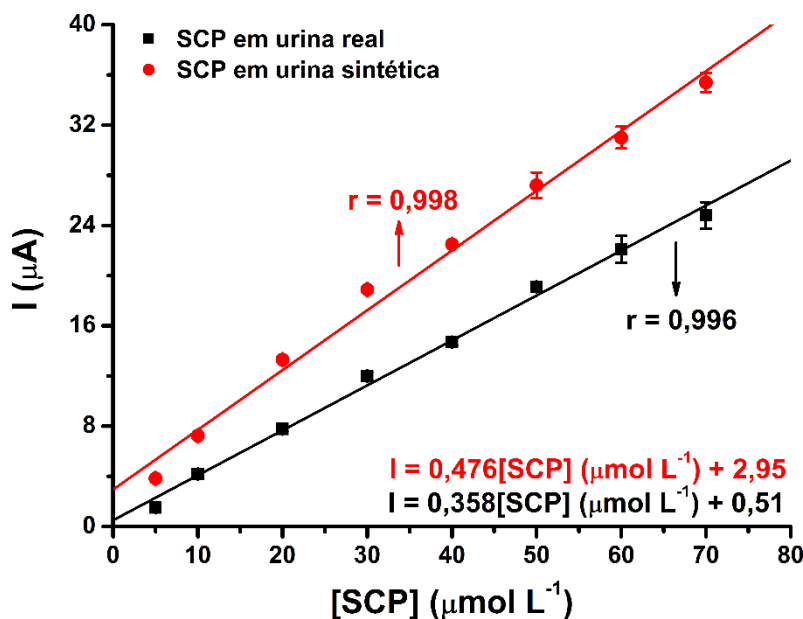
Figura 33. Voltamogramas de onda quadrada obtidos para amostras de (A) urina sintética e (B) real, antes (---) e após oito adições de padrão de SCP. Condições experimentais: Similares à **Figura 28**, exceto a velocidade de injeção, $28 \mu\text{L s}^{-1}$. AU: ácido úrico.



Fonte: O autor.

Com base nos voltamogramas da **Figura 33 (A)** e **(B)** é notável que mesmo empregando uma composição mais elaborada para a preparação da urina sintética, o voltamograma exibido por essa amostra apresenta diferenças significativas àquele apresentado pela urina real. As diferenças mais acentuadas são: i) a intensidade do pico voltamétrico observado em $+0,9 \text{ V}$ (vs. $\text{Ag/AgCl}_{(\text{sat})}$), presente nas duas amostras, e ii) a presença de dois picos voltamétricos entre $+1,25$ e $+1,6 \text{ V}$ (vs. $\text{Ag/AgCl}_{(\text{sat})}$) que não são observados na amostra de urina sintética. Contudo, apesar dessas diferenças, mesmo empregando apenas a diluição das amostras em questão no eletrólito de suporte [10% (v/v), H_2SO_4 $0,5 \text{ mol L}^{-1}$] para a injeção no sistema BIA, é possível observar que não há picos voltamétricos nas amostras em potenciais maiores que $+1,6 \text{ V}$, o que possibilita a triagem rápida dessas amostras, uma vez que a adição de SCP em concentrações tão baixas quanto $5 \mu\text{mol L}^{-1}$ promove o surgimento de pico voltamétrico na amostra real, ainda que com intensidade menor do que aquela observada na urina sintética. A linearidade da relação entre a corrente de pico e a concentração de SCP adicionada às amostras de urina é exibida na **Figura 34**.

Figura 34. Comparação entre as inclinações obtidas para as correntes de oxidação de SCP em amostras de urina real e sintética (Figura 33).

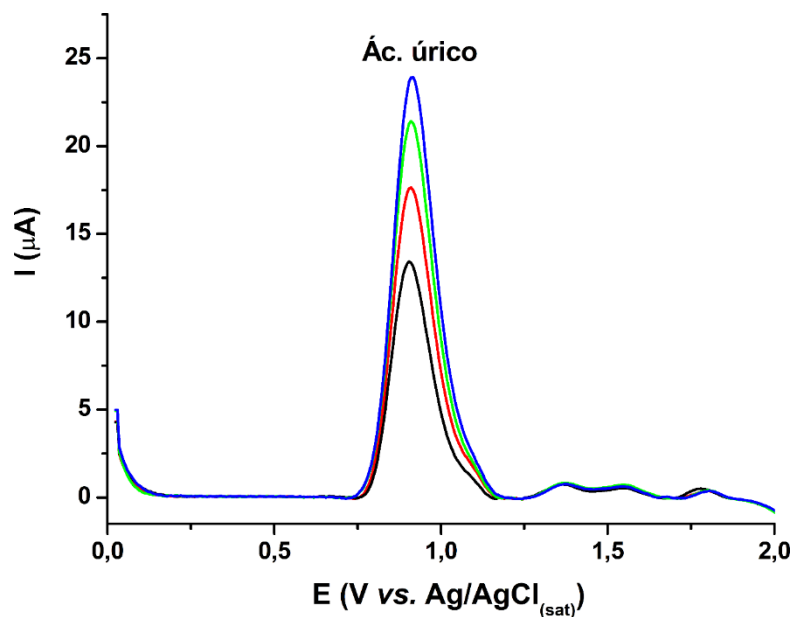


Fonte: O autor.

Comparando os dados apresentados na **Figura 34**, é notável que a corrente de oxidação da SCP apresenta relação linear em todo o intervalo de concentração estudado nas duas amostras, ainda que a inclinação (sensibilidade) apresentada pela urina sintética tenha sido maior do que aquela exibida pela amostra de urina real.

O pico voltamétrico que surge em +0,9 V (vs. Ag/AgCl_(sat)) presente nas duas amostras foi atribuído à oxidação do ácido úrico, e de forma similar àquela avaliada para CAF nas amostras de bebida, o estudo de adição de padrão foi empregado a fim de investigar essa hipótese, como mostrado na **Figura 35**.

Figura 35. Voltamogramas obtidos para amostra de urina real antes (—) e após a adição de concentrações crescentes de ácido úrico ($15, 30$ e $45 \mu\text{mol L}^{-1}$) às soluções contendo 10% (v/v) de amostra em H_2SO_4 $0,5 \text{ mol L}^{-1}$.
¹. Condições experimentais: Similares à **Figura 33**.



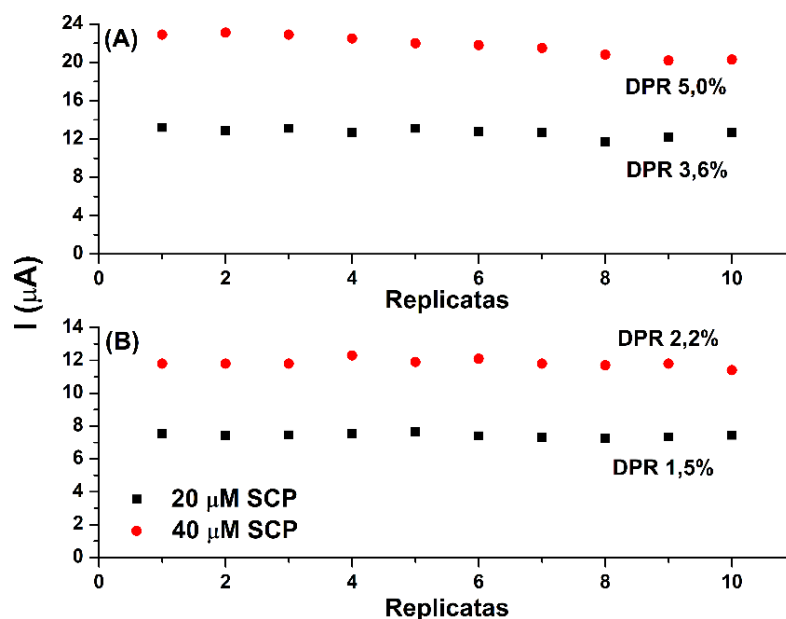
Fonte: O autor.

Pelos resultados mostrados na **Figura 35**, é notável o aumento do pico observado em $+0,9 \text{ V}$ com sucessivas adições de $15, 30$ e $45 \mu\text{mol L}^{-1}$ de ácido úrico à solução de urina real, sem o surgimento de picos adicionais ao sinal da amostra, de modo que o sinal voltamétrico em questão pode ser atribuído à presença de ácido úrico nas amostras.

4.2.7 Estudo da repetibilidade na detecção de SCP em amostras de urina

Após a determinação da faixa linear para detecção de SCP em amostras de urina real e sintética, a repetibilidade do método foi avaliada com 10 injeções sucessivas e alternadas de soluções contendo SCP nas concentrações de 20 e $40 \mu\text{mol L}^{-1}$, como mostrado na **Figura 36**.

Figura 36. Resultados de varreduras sucessivas usando SWV de soluções contendo SCP (20 e 40 $\mu\text{mol L}^{-1}$) em amostras de urina (A) sintética e (B) real, diluídas em H_2SO_4 0,5 mol L^{-1} [10% (v/v)]. Condições experimentais: Similares à **Figura 33**.



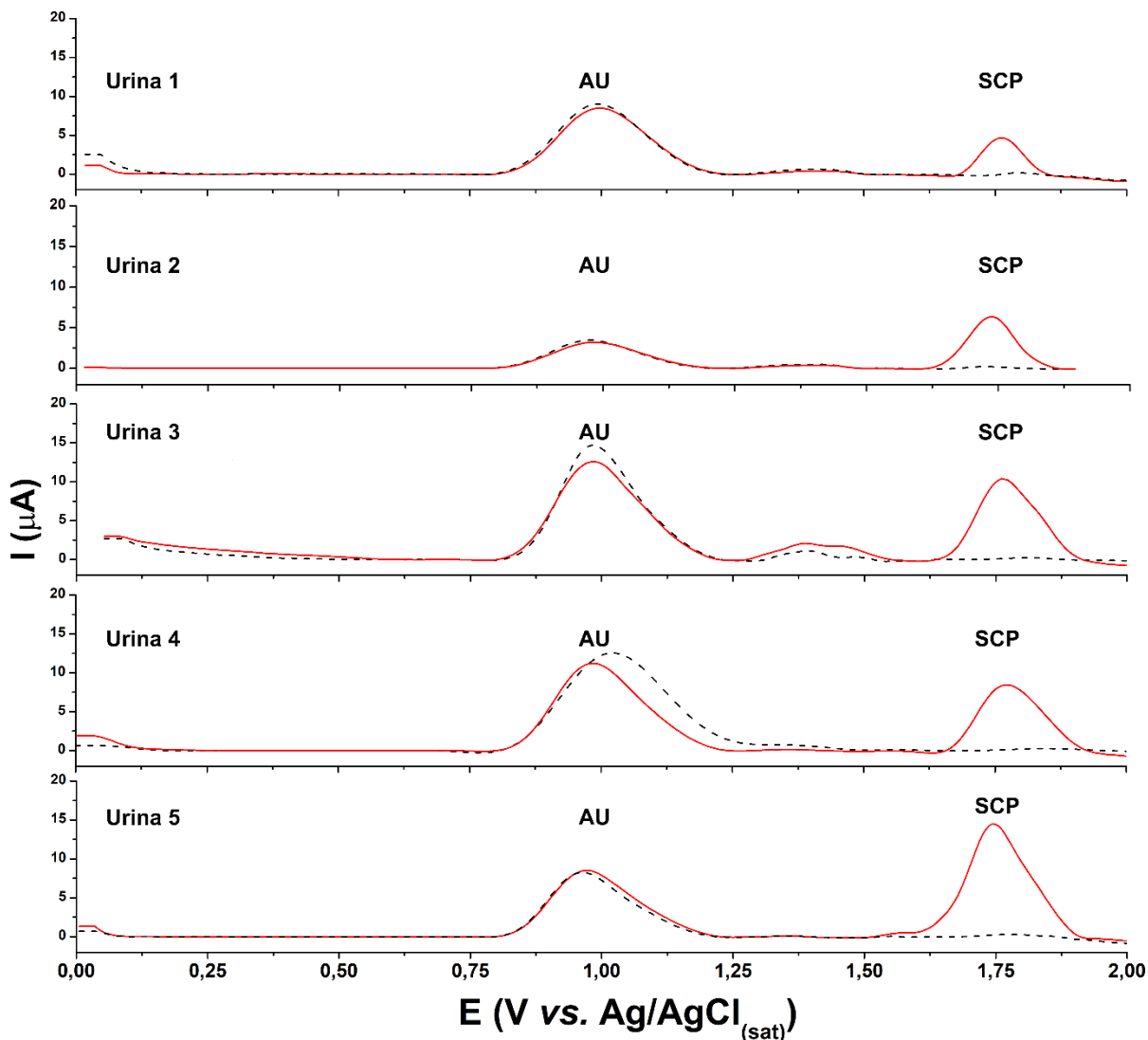
Fonte: O autor.

Com base nos dados exibidos na **Figura 36**, é perceptível que não há efeito de memória após a realização das injeções sucessivas das soluções contendo 20 e 40 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de SCP em amostras de urina sintética (A) e real (B) diluídas 10 vezes em eletrólito de suporte. Além disso, os desvios padrões relativos obtidos na detecção de SCP na urina real [**Figura 36 (B)**] foram menores que 2,5%, mesmo sem a realização de etapas prévias de preparo de amostra (além da diluição) levando em consideração a composição complexa da amostra de urina, e a presença de outros compostos eletroquimicamente ativos, como o ácido úrico.

4.2.8 Triagem de SCP nas amostras de urina

Uma vez confirmada a estabilidade do método na detecção de SCP em amostras de urina sintética e real, a triagem rápida de amostras de urina real foi avaliada. Para esse teste, foram utilizadas amostras de urina de 5 voluntários saudáveis, coletadas no período da manhã, e armazenadas na geladeira, até a realização da triagem no sistema BIA. A **Figura 37** mostra os voltamogramas de onda quadrada obtidos para cinco amostras de urina diluídas na proporção de (1:10) no eletrólito suporte, antes e após a adição de SCP 10 $\mu\text{mol L}^{-1}$.

Figura 37. Varreduras de SWV obtidas para soluções de amostras de urina diluídas 10 vezes (v/v) em H_2SO_4 0,5 mol L^{-1} antes (---) e após (—) a adição de SCP 10 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Condições experimentais: Similares à **Figura 33**.



Fonte: O autor.

Observando os voltamogramas da **Figura 37** é perceptível que, apesar da composição complexa e variada das amostras de urina (BROOKS; KEEVIL, 1997), e da ausência de pré-tratamento (somente simples diluição em eletrólito de suporte), não foram observados picos de oxidação na região potencial acima de +1,6 V (vs. $\text{Ag}/\text{AgCl}_{(\text{sat})}$) para as amostras de urina não-dopadas (---). Os perfis voltamétricos para as cinco amostras de urina na presença (—) de 10 $\mu\text{mol L}^{-1}$ SCP mostram claramente que o pico voltamétrico em torno de +1,75 V (vs. $\text{Ag}/\text{AgCl}_{(\text{sat})}$) foi observado apenas depois que as amostras foram dopadas com SCP. Esses resultados indicam que a triagem rápida de amostras de urina é possível usando o protocolo BIA-SWV proposto.

De forma similar àquela empregada para as amostras de bebidas, foram realizadas tentativas de quantificação da SCP nas amostras de urina através de testes de adição e recuperação. Contudo, resultados de recuperação de 50% foram obtidos para as amostras avaliadas, o que indica que a presença de proteínas e outras espécies presentes nas amostras de urina real interferem diretamente na quantificação da SCP adicionada.

5 CONCLUSÕES PARCIAIS

As vantagens da técnica SWV em termos de sensibilidade e rapidez, aliadas ao amplo intervalo de potencial de trabalho do BDD possibilitaram a detecção de SCP adicionada à amostras de bebidas com diferentes composições químicas, empregando inicialmente, um sistema estacionário. Após as otimizações dos parâmetros experimentais, o método desenvolvido apresentou bons resultados em termos de precisão ($DPR < 5\%$, $n = 10$) para todas as amostras estudadas, e se mostrou eficaz como método de varredura qualitativa para a verificação de adulteração dessas bebidas com o fármaco em questão. Contudo, os valores de recuperação da SCP adicionada só foram satisfatórios para as amostras de vodka (104%) e whisky (87%), o que motivou a implementação do método proposto ao sistema BIA.

Com base nos resultados obtidos para o sistema BIA-SWV é possível afirmar a aplicabilidade do método proposto para a detecção e quantificação de SCP nas amostras de bebida avaliadas (com exceção de cerveja), uma vez que os valores de recuperação obtidos ficaram entre (87 ± 8) e $(113 \pm 1)\%$. O método desenvolvido mostrou-se exato e preciso ($DPR < 5\%$, $n = 10$) mesmo sem a necessidade de empregar etapas complexas de preparo de amostra além da diluição no eletrólito de suporte. Esses resultados sustentam a portabilidade na aplicação do sistema proposto em situações forenses. Além disso, resultados satisfatórios em termos de recuperação da SCP adicionada às amostras de bebidas foram obtidos sem a necessidade de modificação superficial ou a realização de etapas adicionais de limpeza/condicionamento do BDD.

Com relação às amostras de urina, a triagem rápida para a detecção da presença de SCP se mostrou eficaz mesmo em amostras não tratadas, com composição variada e na presença de outras espécies eletroativas, como ácido úrico, mediante apenas à diluição em eletrólito de suporte previamente à realização das varreduras de potencial.

**SEGUNDA PARTE - DETERMINAÇÃO DE ESCOPOLAMINA
EM AMOSTRAS DE BEBIDAS E URINA EMPREGANDO
ELETROFORESE CAPILAR**

6 OBJETIVOS

Com relação aos métodos eletroforéticos desenvolvidos, os objetivos específicos foram:

- Otimizar as condições experimentais (composição do BGE, pH, tempo de injeção e potencial de separação) para detecção de SCP nas amostras de bebidas;
- Triagem e quantificação da SCP em amostras de bebidas com composição variada: cachaça, cerveja, refrigerante, energético, Skol Beats[®], suco, vodka e whisky.
- Comparação entre os eletroferogramas obtidos para amostras de bebidas dopadas usando padrão de SCP e o fármaco Buscopan[®].
- Otimizar as condições experimentais (composição do BGE, pH e tempo de injeção) para detecção de SCP nas amostras de urina;
- Triagem e quantificação da SCP em amostras de urina real.

7 MATERIAS E MÉTODOS

7.1 Soluções, reagentes e preparação das amostras

Todas as soluções utilizadas foram preparadas com água deionizada (resistividade superior a 18 MΩ cm) obtida de sistema de purificação Direct-Q (Millipore). Todos os reagentes utilizados apresentavam pureza analítica e foram usados sem purificação prévia. Na **Tabela 10** são listados os reagentes usados neste estudo com sua respectiva procedência.

Tabela 10. Reagentes utilizados no presente trabalho e suas respectivas procedências.

Reagente	Fórmula química	Origem	Pureza (%)
Ácido bórico	H ₃ BO ₃	Panreac	99,8
Brometo de escopolamina (SCP) triidratado	C ₁₇ H ₂₂ NO ₄ Br.3H ₂ O	Fagron	99,5
CHES	C ₈ H ₁₇ NO ₃ S	Sigma	99
DMX	C ₁₁ H ₁₂ O ₅	Sigma	99
Hidróxido de sódio	NaOH	Panreac	98
Histidina	C ₆ H ₉ N ₃ O ₂	Vetec	98,5
Sulfato de lítio	LiSO ₄	Vetec	99,0

Fonte: O autor.

Para a preparação das soluções estoque de SCP e de sulfato de lítio (padrão interno), a quantidade adequada de cada sal foi dissolvida em água deionizada, obtendo soluções estoque com concentração de 10 mmol L⁻¹. Posteriormente, as soluções padrão foram preparadas diluindo alíquotas da solução estoque em água deionizada, para a realização das análises eletroforéticas.

O preparo das soluções utilizadas como BGE também foi realizada mediante a diluição dos reagentes em água, seguido de agitação ultrassônica por 2 minutos, para promover completa dissolução dos componentes em água. Após a dissolução, o ajuste do pH da solução até o valor desejado foi realizado com adição de alíquotas de solução contendo NaOH 1,0 mol L⁻¹.

7.1.1 Preparo das amostras de bebida

Todas as soluções utilizadas nos métodos eletroforéticos foram preparadas apenas por diluição em água ultrapura. As amostras de bebidas analisadas por CE foram diluídas 10 vezes (10% v/v). Para a comparação dos eletroferogramas empregando o padrão de SCP e a formulação farmacêutica Buscopan[®], dez comprimidos do medicamento foram macerados (massa total: 1,476 g) e a quantidade adequada foi adicionada à 1 mL de vodka pura, obtendo uma amostra dopada com 1 mmol L⁻¹ de SCP. Posteriormente, alíquotas dessa solução foram utilizadas para obter amostras dopadas com 500 e 200 µmol L⁻¹ de SCP. O mesmo procedimento foi adotado para a comparação dos resultados envolvendo a mistura de amostras composta por vodka e energético (1:1) e na quantificação de SCP nas amostras adulteradas com o Buscopan[®].

Além de SCP, o medicamento ainda possui os seguintes excipientes: fosfato de cálcio dibásico, amido de milho, dióxido de silício, ácido tartárico, ácido esteárico, povidona, sacarose, talco, goma arábica, dióxido de titânio, macrogol, cera de carnaúba, cera branca de abelha, álcool etílico e água purificada.

7.1.2 Preparo das amostras de urina

A coleta e armazenamento das amostras de urina real utilizadas no trabalho foi realizada conforme descrito na seção 3.1.2. As amostras de urina foram diluídas entre 10 e 2 vezes (10% a 50% v/v) para a realização do *screening* e quantificação de SCP, sem nenhuma etapa de pré-tratamento. O padrão interno (Li⁺) só foi utilizado para a quantificação envolvendo a curva de calibração.

7.2 Instrumentação

7.2.1 Eletroforese capilar

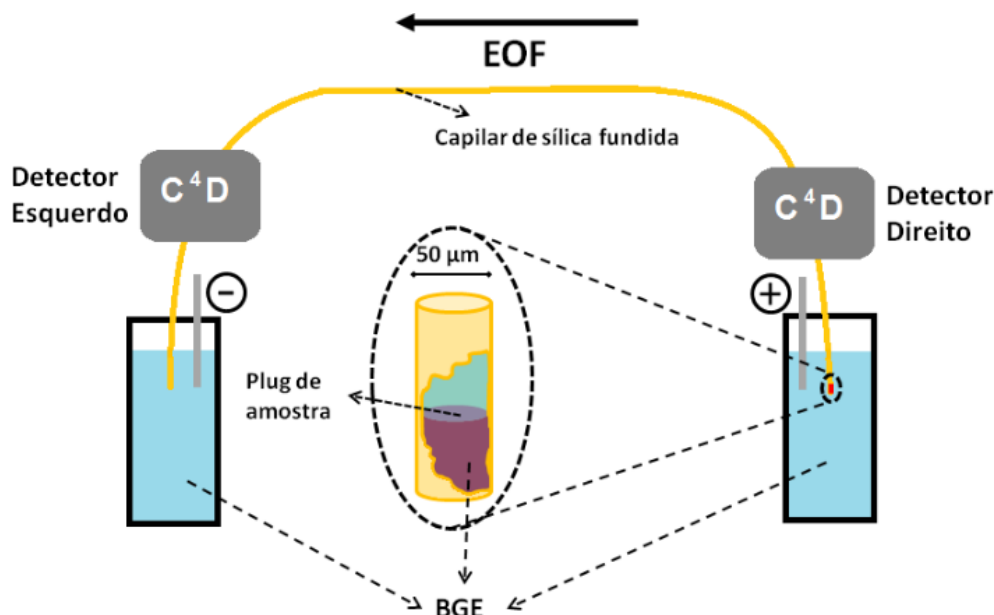
Nas análises por eletroforese capilar (CE) foi utilizado um equipamento com detecção condutométrica sem contato (C^4D) construído no laboratório do Prof. Claudimir Lúcio do Lago do Instituto de Química da Universidade de São Paulo (IQ-USP)(FRACASSI DA SILVA; DO LAGO, 1998; FRANCISCO; DO LAGO, 2009). O equipamento é composto por dois detectores condutométricos sem contato acoplados capacitivamente, de alta resolução, localizados a 10 cm das extremidades do capilar, dois reservatórios com capacidade para 1,5 mL, uma fonte de alta tensão bipolar com capacidade máxima de 30 kV (Spellman Power Supply, Hauppauge, NY, EUA) e um sistema de controle de temperatura. O equipamento usado nos trabalhos realizados e o esquema de funcionamento do sistema de CE são apresentados nas **Figura 38 e 39**.

Figura 38. Instrumento de CE utilizado no presente trabalho.



Fonte: RIBEIRO, 2017.

Figura 39. Representação do sistema CE utilizado no presente trabalho.



Fonte: Adaptado de CUNHA, 2017.

Diariamente, antes do início dos experimentos, o capilar foi pré-condicionado com a passagem de solução de $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de NaOH durante 10 minutos, seguido por água deionizada, pelo mesmo período de tempo e finalmente preenchido com o BGE de trabalho, também por 10 minutos. Ao final de cada dia de trabalho, o capilar era novamente lavado com a passagem de solução de NaOH e posteriormente com água deionizada, por 5 minutos cada. Todas as etapas de pré-condicionamento e limpeza do capilar eram realizadas através da aplicação de pressão de 25 KPa no reservatório no lado do ânodo. Um programa de computador desenvolvido em ambiente LabView 8 (National Instruments, Austin, TX, EUA) é responsável pelo controle do equipamento e aquisição dos dados.

Os detectores C⁴D utilizados no trabalho não possuem partes móveis, como potenciômetros e conectores, tornando-os compactos e robustos. Um oscilador, operando na frequência de 1,1 MHz foi otimizado para uso de capilares com diâmetro interno no intervalo de 20 até 100 µm. O sinal do oscilador é do tipo senoidal e sua amplitude é fixada no valor de 4 Vp-p.

A injeção das soluções foi realizada de modo hidrodinâmico, mediante a aplicação de pressão fixa (25 kPa) por um tempo determinado no reservatório à direita do equipamento (ânodo). Em seguida, foi aplicada a diferença de potencial entre os eletrodos de platina imersos no BGE dos dois reservatórios para a separação das espécies das soluções amostra ou padrão. O capilar de sílica fundida (Agilent, Folsom, CA, EUA) utilizado em todos os experimentos

tinha 50 cm de comprimento, 50 μm de diâmetro interno e 375 μm de diâmetro externo. Nestas condições, os comprimentos efetivos da coluna capilar para o primeiro e segundo detectores foram 10 e 40 cm, respectivamente.

7.3 Procedimento Experimental

Os estudos de otimização dos parâmetros experimentais da técnica de CE, descritos a seguir, foram realizados de forma univariada, e definidos com base na maior intensidade de pico registrada para injeções de solução contendo 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de SCP, para as amostras de bebida e 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de SCP para as amostras de urina.

7.3.1 Escolha do BGE

Para a determinação de SCP adicionada às bebidas, foram avaliados BGEs contendo **(i)** 50 mmol L^{-1} de CHES / 15 mmol L^{-1} de NaOH; **(ii)** 20 mmol L^{-1} de H_3BO_3 / 10 mmol L^{-1} de NaOH e **(iii)** 20 mmol L^{-1} de HIS / 8 mmol L^{-1} de NaOH, todos ajustados para $\text{pH} = 9,1$.

Para a realização das análises de SCP em urina, foram avaliados os BGEs com a seguinte composição: **(i)** 10 mmol L^{-1} de HIS / 6,5 mmol L^{-1} de NaOH, $\text{pH} = 9,5$; **(ii)** 10 mmol L^{-1} de CHES / 6,5 mmol L^{-1} de NaOH, $\text{pH} = 9,5$ e **(iii)** 20 mmol L^{-1} de HIS / 10 mmol L^{-1} de DMX / 15 mmol L^{-1} de NaOH, $\text{pH} = 9,0$.

7.3.2 Estudo da composição do BGE

Para o estudo da composição do BGE formado por HIS e NaOH, foram preparadas soluções contendo 10, 20 e 30 mmol L^{-1} de HIS, ajustadas com NaOH para $\text{pH} = 9,1$. Para os estudos do pH de BGE, soluções contendo 10 mmol L^{-1} de HIS foram ajustadas com NaOH para pHs nos valores de 8,3; 8,7; 9,1; 9,5 e 10,0.

Na determinação de SCP nas amostras de urina, uma vez que a linha base apresentada pelo BGE composto por HIS/DMX/NaOH apresentou melhor estabilidade do que aquela obtida para os demais BGEs, as concentrações de HIS/DMX foram estudadas em 20/10 mmol L^{-1} , e 30/15 mmol L^{-1} , e 50/25 mmol L^{-1} , respectivamente. Posteriormente, para os estudos do pH de

BGE, soluções contendo 20 mmol L⁻¹ de HIS e 10 mmol L⁻¹ de DMX foram ajustadas com NaOH para pHs nos valores de 6,0; 7,0; 8,0 e 9,0.

7.3.3 Estudo da otimização do tempo de injeção e do potencial de separação

Na otimização do tempo de injeção foram realizados experimentos nos quais o plug de amostra era inserido no capilar após injeção hidrodinâmica com duração variando entre 0,5 e 2,0 s. O estudo de potencial de separação foi realizado aplicando-se valores entre +15 e +30 kV no lado da injeção. Ambos os estudos foram realizados utilizando como BGE 10 mmol L⁻¹ de HIS / 6,5 mmol L⁻¹ de NaOH (pH 9,5).

Para a detecção de SCP nas amostras de urina, o tempo de injeção (hidrodinâmica) foi avaliado no intervalo de 1,0 a 4,0 s. O potencial de separação de 25 kV foi utilizado para todos os estudos envolvendo as amostras de urina.

7.3.4 Estudo da diluição para as amostras de urina

Soluções contendo 50 µmol L⁻¹ de SCP foram preparadas com porcentagens crescentes de urina em sua composição, nos valores de 10; 20; 30; 40 e 50% (v/v). Desse modo, alíquotas de 100; 200; 300; 400 e 500 µL de amostra foram diluídas em 850; 750; 650; 550 e 450 µL de água. Em seguida, alíquotas de 50 µL da solução de 1000 µmol L⁻¹ de SCP foram adicionadas aos *vials*.

7.3.5 Estudo da repetibilidade

O estudo de repetibilidade intra-dia foi realizado nas condições otimizadas, através de medidas injeções consecutivas (n = 10) de 100 µmol L⁻¹ de SCP em solução padrão e nas soluções contendo 10% (v/v) das amostras de vodka e energético. O estudo de repetibilidade interdias foi realizado através de injeções (n = 3) de solução padrão 100 µmol L⁻¹ de SCP em 3 dias diferentes.

Para o método de detecção de SCP nas amostras de urina, os estudos de repetibilidade intra-dia foram avaliados para injeções consecutivas (n = 10) de 15, 50 e 150 µmol L⁻¹ de SCP em solução padrão, contendo 100 µmol L⁻¹ de Li como padrão interno (PI) e em soluções

contendo 30% (v/v) de urina, também nas condições experimentais otimizadas. O estudo de repetibilidade interdias foi realizado através de injeções ($n = 3$) de soluções contendo $50 \mu\text{mol L}^{-1}$ de SCP, preparada em 10% de urina (v/v), em 3 dias diferentes.

7.3.6 Estudo da faixa linear

Neste estudo, soluções padrão contendo concentrações crescentes de SCP foram injetadas e as médias das áreas registradas foram plotadas em função da concentração.

Nas amostras de bebidas e urina, os intervalos de concentração estudados foram de 25 a $2000 \mu\text{mol L}^{-1}$ e 10 a $200 \mu\text{mol L}^{-1}$ de SCP, respectivamente. Para o método envolvendo detecção de SCP na urina, a faixa linear para a resposta do detector também foi avaliada empregando solução contendo 30% de urina (v/v), sendo estudado o mesmo intervalo de concentração.

7.3.7 Aplicação da metodologia proposta às amostras de bebida e urina

As respectivas curvas de calibração foram construídas levando em consideração a faixa linear de resposta e a quantidade de SCP em situação real de aplicação do “Boa noite Cinderela” (CORALLO; WHITFIELD; WU, 2009; DEFRATES *et al.*, 2005; SÁIZ *et al.*, 2013), tanto para as amostras de bebida, quanto de urina. As injeções das soluções padrão foram realizadas em triplicata, e a equação da curva de calibração obtida foi utilizada para quantificar a SCP adicionada às amostras. A inclinação da curva de calibração (sensibilidade) e o desvio padrão do intercepto foram utilizados para o cálculo do LD e do LQ, como recomendado pelo INMETRO, (2018).

7.3.8 Estudos de comparação entre amostras fortificadas com o padrão e com o medicamento contendo SCP

Para a fortificação das amostras de bebida utilizando o medicamento, 10 comprimidos contendo 6,89 mg de SCP cada foram pesados (massa total: 1,476 g), finamente macerados e homogeneizados. Em seguida, 0,771 g do macerado resultante foram adicionados a 1 mL de vodka pura, sendo obtida uma solução de 1 mmol L^{-1} de SCP (conforme bula do medicamento).

Posteriormente, alíquotas de 500 e 100 μL dessa solução foram diluídas em 0,5 e 0,9 mL de vodka pura, respectivamente, para a realização dos experimentos.

7.3.9 Quantificação de SCP na urina pelo método da adição de padrão

A quantificação de SCP nas amostras de urina também foi realizada utilizando o método da adição de padrão. Para isso, antes da diluição em água, diferentes amostras de urina foram fortificadas com diferentes concentrações de SCP.

As amostras de urina foram fortificadas previamente à diluição em água para a realização das análises, sendo posteriormente preparadas soluções de 1 mL para cada um dos níveis de fortificação, bem como da solução do branco. A amostra 1 foi fortificada com $100 \mu\text{mol L}^{-1}$, e analisada após diluição a 30% (v/v) em água. As amostras 2; 3; e 4 foram fortificadas com 150, 200 e $300 \mu\text{mol L}^{-1}$, sendo analisadas após diluição a 10% (v/v) em água.

As alíquotas foram adicionadas a partir de uma solução padrão de SCP com concentração de $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$. Alíquotas de 15 μL foram adicionadas às soluções das soluções preparadas a partir da amostra 1. Para as amostras 2 e 4, o volume das alíquotas da solução padrão adicionadas à solução foi de 25 μL . Finalmente, para amostra 3 foram utilizadas adições de alíquotas de 30 μL .

Uma vez que amostras de urinas diferentes e com diferentes diluições foram analisadas, o capilar foi submetido à limpeza com BGE por 45 segundos entre as análises das amostras.

8 RESULTADOS E DISCUSSÕES

Os resultados e discussões apresentados a seguir serão divididos em duas partes. Na primeira parte serão apresentados os estudos realizados para o desenvolvimento de um método de determinação SCP em amostras de bebidas. Posteriormente, serão apresentados os estudos relacionados com o desenvolvimento de um método para determinação de SCP em amostras de urina real, empregando CE-C⁴D.

8.1 Parte I - Determinação de SCP em bebidas empregando eletroforese capilar com detecção condutométrica sem contato (CE-C⁴D)

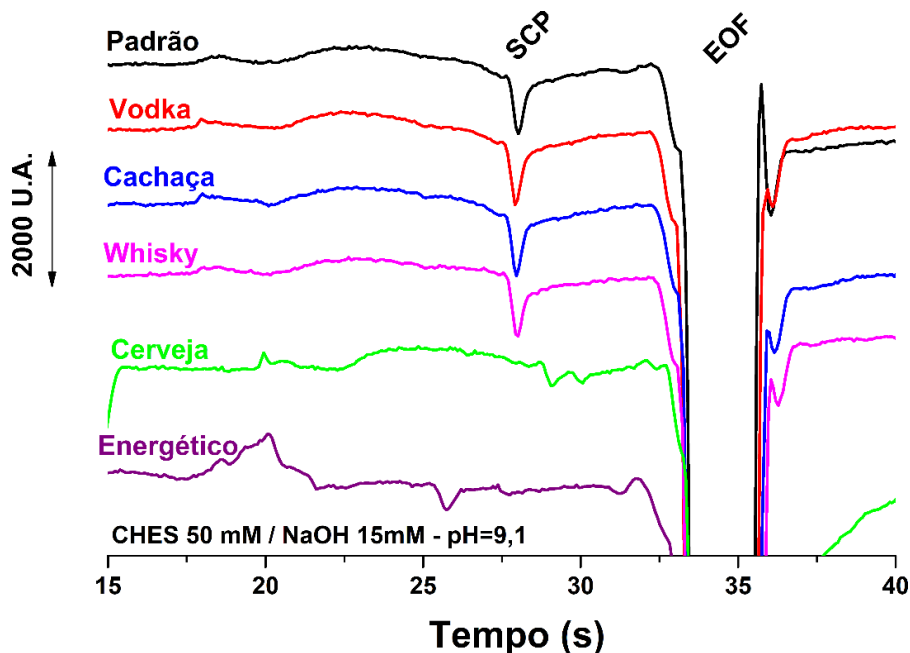
A detecção de SCP proveniente de infusão herbal em quatro amostras de bebidas alcoólicas (gim, rum, vodka e whisky, diluídas 5 vezes) utilizando eletroforese capilar com detecção condutométrica sem contato já foi realizada por Sáiz *et. al.* (2013). No método desenvolvido, a SCP foi detectada em aproximadamente 3,5 minutos e a repetibilidade somente era mantida se o capilar fosse submetido à uma limpeza (“*flush*”) por 4 minutos entre as análises das amostras. Além disso, a possibilidade de quantificação de SCP nas amostras não foi mostrada, de modo que o método em questão foi empregado de forma a realizar somente a triagem das amostras para verificar a presença/ausência da SCP.

Tendo em vista algumas limitações do trabalho supracitado e após o desenvolvimento do trabalho envolvendo a detecção voltamétrica de SCP em bebidas e urina, esforços foram realizados a fim de desenvolver um método usando o sistema CE-C⁴D. Redução do tempo de análise, maior robustez e a possibilidade de quantificação num maior número de amostras foram os principais focos deste novo estudo.

8.1.1 Escolha do BGE para a determinação de SCP por CE-C⁴D em bebidas

Inicialmente, estudos foram efetuados a fim de determinar o melhor BGE para a realização das análises, levando em consideração o formato do pico e a sensibilidade/detectabilidade obtida, tanto em solução padrão como em soluções contendo 10% (v/v) das bebidas estudadas. O valor teórico do pKa para a SCP encontrado no site do Chemicalize (6,9) não condiz com o valor verificado experimentalmente (CUNHA, 2017). Assim, o pH dos BGE's escolhidos para realização desse estudo foram ajustados levando em consideração o valor de 10,2 para o pKa da SCP. A SCP é uma base fraca e, portanto, apresenta carga líquida positiva (cátion) em soluções aquosas com $\text{pH} \leq$ a seu valor de pKa. A **Figura 40** apresenta os eletroferogramas obtidos empregando CHES e NaOH como BGE, nas concentrações de 50 e 15 mmol L⁻¹, respectivamente.

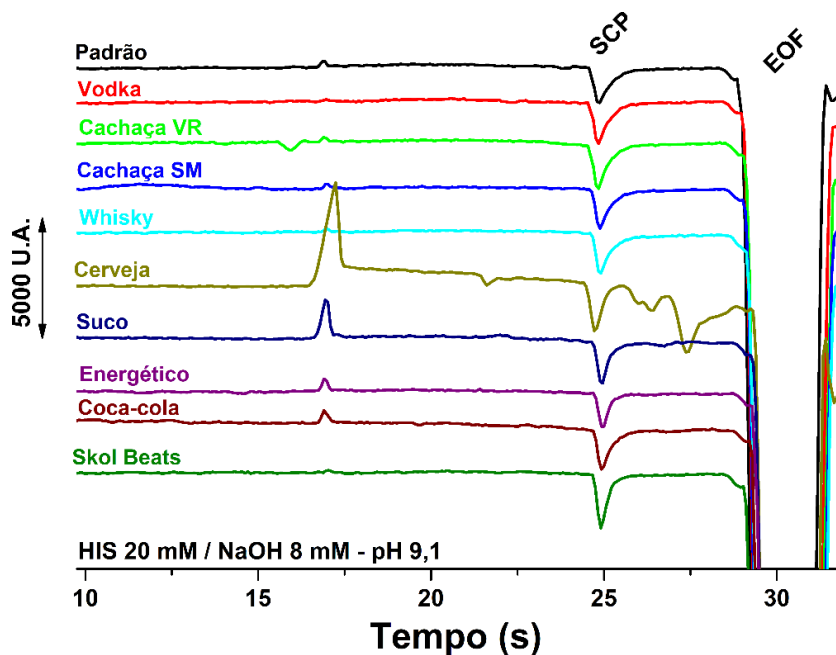
Figura 40. Eletroferogramas de solução padrão e amostras (diluídas 10x) contendo 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de SCP. BGE: 50 mmol L⁻¹ de CHES ajustado com NaOH 15 mmol L⁻¹ (pH = 9,1). Injeção hidrodinâmica: 25 KPa por 1 s; Potencial de separação: +25 kV (lado da injeção); comprimento total e efetivo do capilar: 50 e 10 cm, respectivamente; EOF: normal.



Fonte: O autor.

Os eletroferogramas apresentados na **Figura 40** para as amostras de vodka, whisky e cachaça apresentam perfil semelhante àquele obtido para injeção da solução padrão. Contudo,

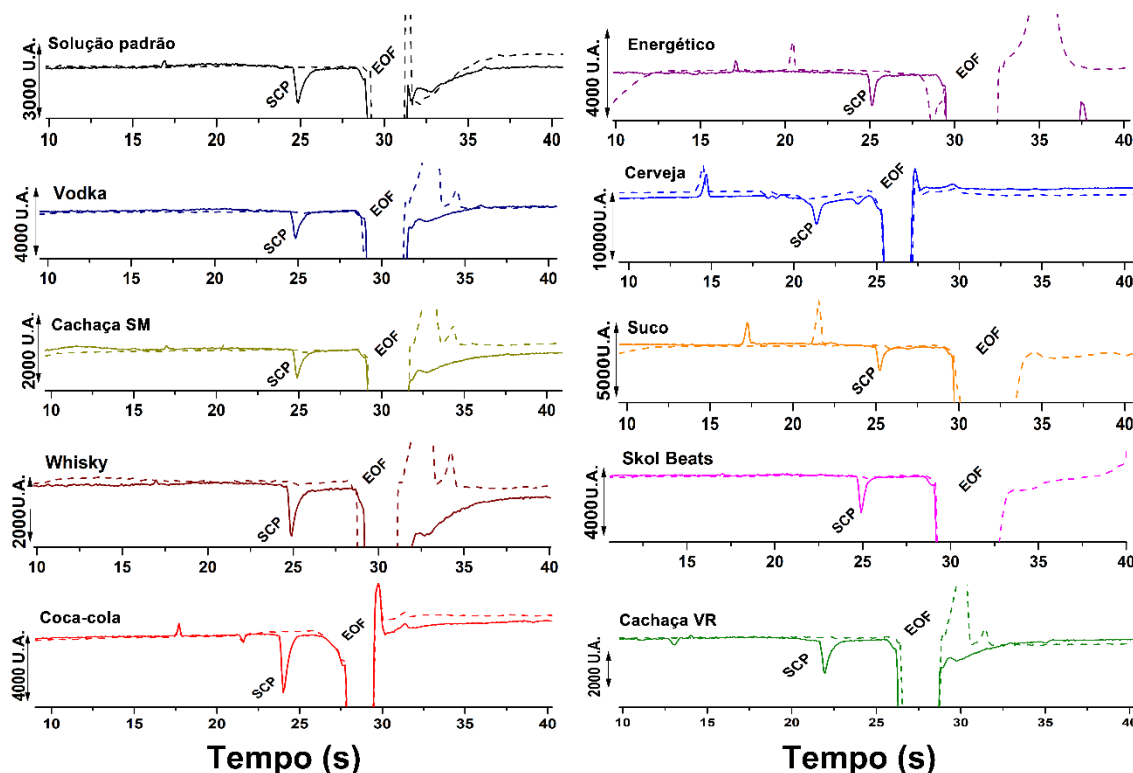
Figura 42. Eletroferogramas de solução padrão e amostras (diluídas 10x) contendo $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ de SCP. BGE: 20 mmol L^{-1} de HIS ajustado com NaOH 8 mmol L^{-1} (pH = 9,1). Condições experimentais: Similares à **Figura 40**.



Fonte: O autor.

Com base nos eletroferogramas da **Figura 42** é razoável afirmar que o BGE composto por HIS/NaOH promove maior detectabilidade para a SCP se comparado aos anteriormente testados. As linhas bases obtidas para todas as amostras são notavelmente estáveis, com pouco ruído e com o pico da SCP apresentando detectabilidade maior do que a observada para o tampão borato (**Figura 41**). Uma vez que o BGE se mostrou adequado para a realização do método aqui desenvolvido, a triagem para as amostras de bebidas foi investigada, como exibido na **Figura 43**.

Figura 43. Eletroferogramas de solução padrão e amostras (diluídas 10x) antes (---) e depois (—) da adição de $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ de SCP. Condições experimentais: Similares à **Figura 42**.

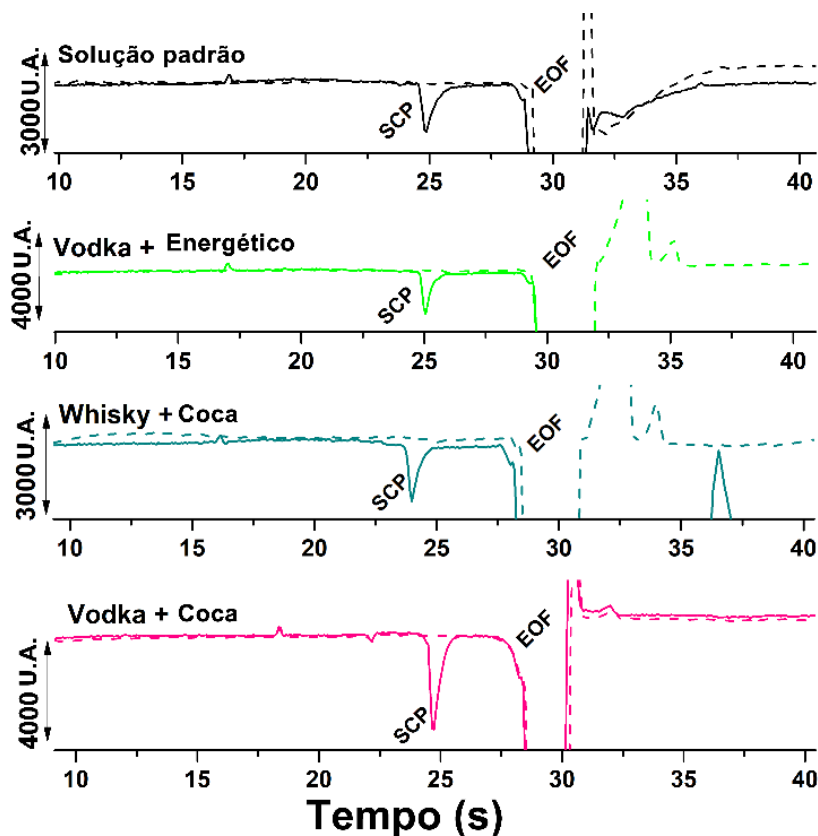


Fonte: O autor.

Observando os eletroferogramas exibidos na **Figura 43** é perceptível que na ausência de SCP, as soluções de bebidas diluídas 10 vezes não apresentam picos com condutividade inferior à do BGE (além do EOF). Após a adição de SCP às amostras, quer elas contenham álcool ou não, é notável o surgimento de um pico negativo (condutividade inferior ao BGE), como apresentado pela solução padrão, com tempo de migração de ~ 25 s. Logo, podemos concluir que é possível realizar a triagem de todas as amostras estudadas para verificar a presença de SCP empregando o BGE composto por HIS/NaOH ($\text{pH} = 9,1$).

Tendo em vista ainda que, em situações reais, as amostras podem encontrar-se misturadas, um teste foi realizado a fim de comparar o sinal obtido para o padrão contendo SCP $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ e misturas de bebidas (1:1), diluídas 10 vezes, como mostra a **Figura 44**.

Figura 44. Eletroferogramas obtidos para injeções de soluções contendo SCP 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$ em diferentes misturas de amostras, na proporção 1:1 (e posteriormente diluídas para 10% v/v em água). (A) solução padrão; (B) whisky + energético; (C) vodka + energético e (D) vodka + Coca-cola[®]. Condições experimentais: Similares à Figura 42.

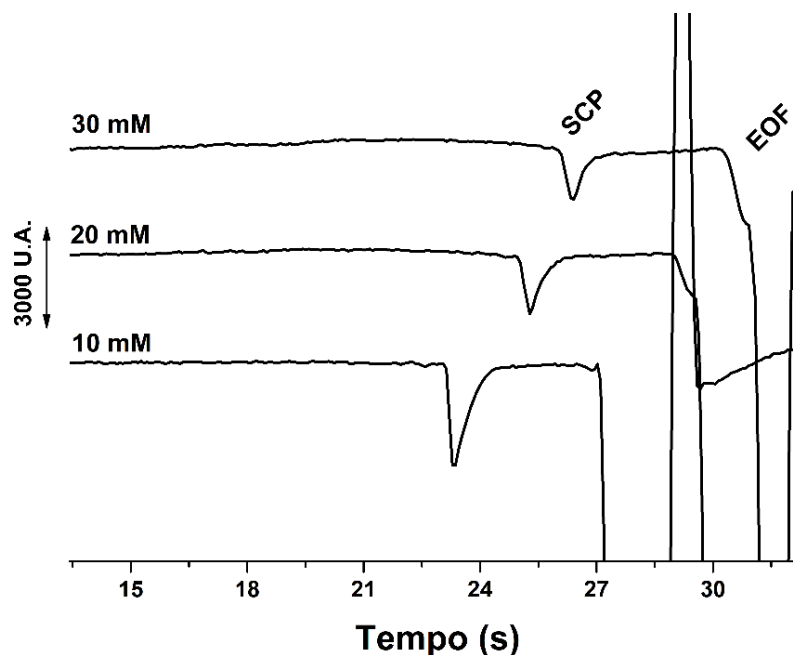


Fonte: O autor.

De forma similar ao que foi observado para os eletroferogramas das amostras analisadas individualmente (**Figura 43**), os eletroferogramas exibidos na **Figura 44**, demonstram que a triagem de SCP também pode ser realizada quando amostras (alcoólicas e não alcoólicas) encontram-se misturadas. A escolha dessas combinações de bebidas deveu-se ao fato de serem misturas comumente consumidas em casas noturnas e bares (FERREIRA; MELLO; FORMIGONI, 2005).

Após a definição dos reagentes a serem usados na composição do BGE (HIS + NaOH) para o desenvolvimento do presente método, estudos de otimização foram realizados para definir o valor de pH e a concentração de HIS a ser utilizada. Primeiramente, a concentração de HIS foi investigada, mantendo-se constante o valor do pH do BGE em 9,1 (otimização univariada). Os resultados obtidos são mostrados na **Figura 45**.

Figura 45. Eletroferogramas de solução padrão contendo $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ de SCP para diferentes concentrações de HIS (10; 20 e 30 mmol L^{-1}) no BGE e com o pH ajustado em 9,1 com adição de NaOH. Condições experimentais: conforme descrito na **Figura 42**.

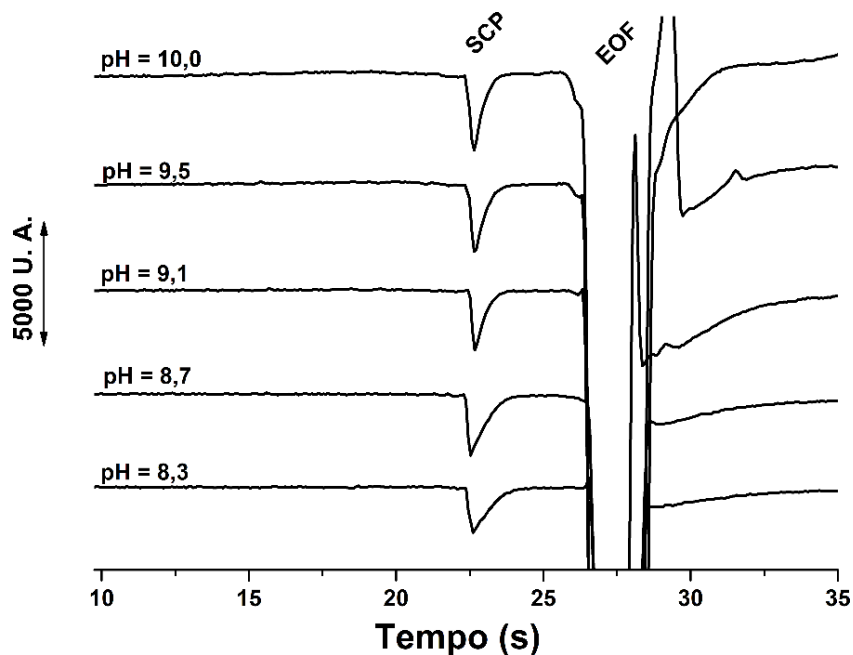


Fonte: O autor.

Analisando os eletroferogramas da **Figura 45** é possível observar que o BGE composto por 10 mmol L^{-1} de HIS com pH ajustado em 9,1 com NaOH apresentou maior detectabilidade. Na passagem do “plug” de solução contendo SCP pelo sistema C^4D ocorre acentuada diminuição da condutividade registrada pelo detector, de modo que o pico registrado para $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ de SCP apresenta intensidade de sinal bem maior do que o observado para concentrações mais elevadas de HIS. Dessa maneira, visando obter eletroferogramas com maior detectabilidade para SCP, o BGE contendo 10 mmol L^{-1} de HIS foi selecionado para as etapas subsequentes do desenvolvimento do trabalho.

Em seguida, o pH do BGE foi variado entre 8,3 até 10,0 mediante adição de NaOH à solução contendo HIS 10 mmol L^{-1} . Essa faixa de pH foi selecionada por duas razões: (i) capacidade tamponante do BGE em função dos pKas da HIS (2,01; 6,04; 9,33) e; (ii) maior velocidade de análise, uma vez que a velocidade do fluxo eletrosmótico (EOF) é máxima na região de pH entre 7,5 e 10 (capilar de sílica fundida). Nesta condição, o tempo de migração de cátions é definido pela soma das velocidades eletroforética e eletrosmótica. Os resultados desse estudo são mostrados na **Figura 46**.

Figura 46. Estudo do pH do BGE empregando $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ de solução padrão de SCP. BGE: 10 mmol L^{-1} HIS + NaOH (variando o pH de 8,3 - 10). Condições experimentais: conforme descrito na **Figura 42**.



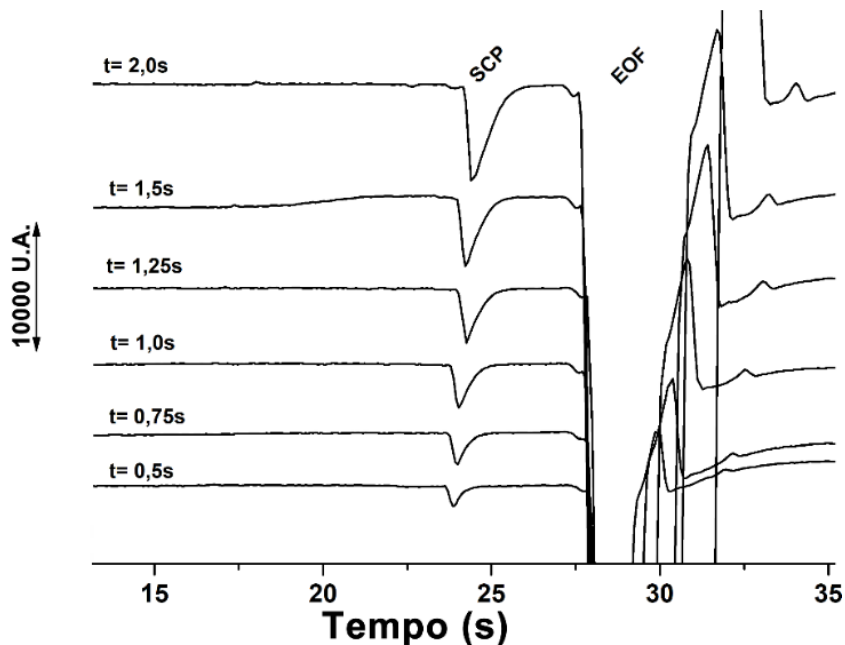
Fonte: O autor.

Os resultados mostrados na **Figura 46** indicam que o efeito do pH não altera o tempo de migração da SCP. A diminuição da velocidade eletroforética da SCP deveria ocorrer em soluções com pH próximo a seu pK_a (10,2). No entanto, a diminuição da velocidade aparente da SCP não foi observada, provavelmente, devido a velocidade do EOF ser muito superior à velocidade eletroforética da SCP. As mudanças na detectabilidade e na largura do pico são provenientes do aumento da concentração de sódio no BGE, que eleva a condutividade/mobilidade do BGE. Com o aumento na diferença de mobilidade entre o analito e o BGE, o pico obtido para a SCP torna-se mais intenso, e mais bem definido, de modo que o valor de pH de 9,5 foi escolhido para as etapas seguintes do trabalho. A capacidade tamponante da HIS também é adequado neste pH ($pK_{a_{HIS}} = 9,33$).

8.1.2 Otimização do tempo de injeção e do potencial de separação

Após a otimização da composição do BGE, os parâmetros experimentais de tempo de injeção (0,5 a 2,0 s) e potencial de separação (15 a 30 kV) foram estudados. Os resultados obtidos no estudo do tempo de injeção são mostrados na **Figura 47**.

Figura 47. Estudo do tempo de injeção utilizando $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ de solução padrão de SCP. BGE: 10 mmol L^{-1} HIS + $6,5 \text{ mmol L}^{-1}$ NaOH ($\text{pH} = 9,5$). Injeção hidrodinâmica: 25 kPa variando de $0,5 - 2,0 \text{ s}$; potencial de separação: $+25 \text{ kV}$ (lado da injeção); comprimento total e efetivo do capilar: 50 e 10 cm , respectivamente; EOF: normal.

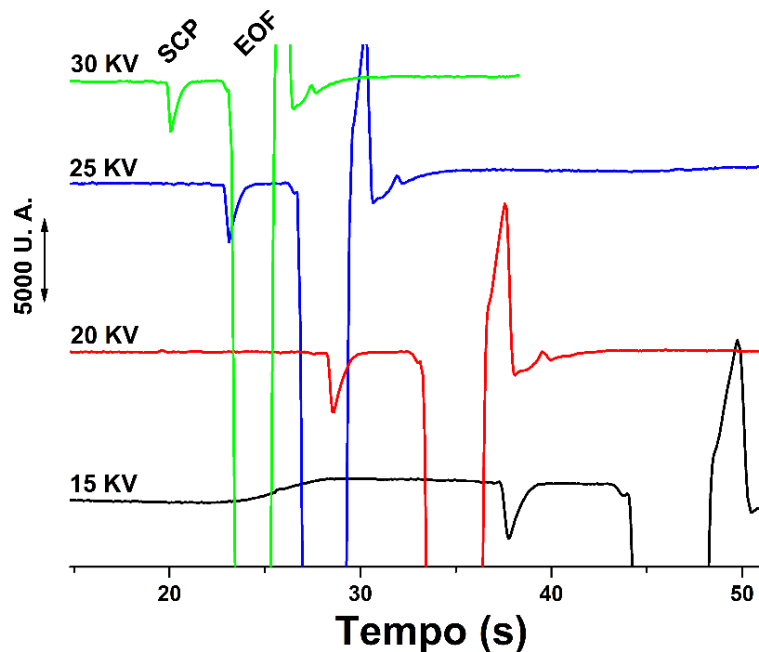


Fonte: O autor.

Tempos de injeção crescentes promoveram, como esperado, aumento na área do pico da SCP, uma vez que maiores quantidades de amostra são injetadas no capilar, como mostrado na **Figura 47**. A realização das análises (qualitativas e quantitativas) poderia ser realizada utilizando todos os tempos de injeção estudados. O tempo de injeção de $1,25 \text{ s}$ foi escolhido para os estudos posteriores.

Os resultados obtidos no estudo do potencial de separação são mostrados na **Figura 48**.

Figura 48. Estudo do potencial de separação utilizando 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de solução padrão de SCP. BGE: 10 mmol L^{-1} HIS + 6,5 mmol L^{-1} NaOH (pH = 9,5). Injeção hidrodinâmica: 25 KPa por 1,25 s; potencial de separação variando de +15 - 30 kV (lado da injeção); comprimento total e efetivo do capilar: 50 e 10 cm, respectivamente; EOF: normal.



Fonte: O autor.

Os resultados da **Figura 48** demonstram que, como esperado, potenciais de separação mais elevados aumentam a velocidade de migração da SCP. Aplicando-se +15 kV, o tempo de migração para SCP é próximo a 40 s, ficando inferior a 25 s mediante a aplicação de +25 kV. O potencial de +30 kV apresenta tempo de migração de ~20 s, entretanto, neste valor de potencial de separação, fugas de alta tensão eventualmente ocorrem com o equipamento em uso. Dessa forma, o valor de +25 kV foi escolhido para análises subsequentes.

Os parâmetros experimentais otimizados para o desenvolvimento do método proposto são apresentados na **Tabela 11**.

Tabela 11. Parâmetros experimentais otimizados do método CE-C⁴D para detecção de SCP em bebidas.

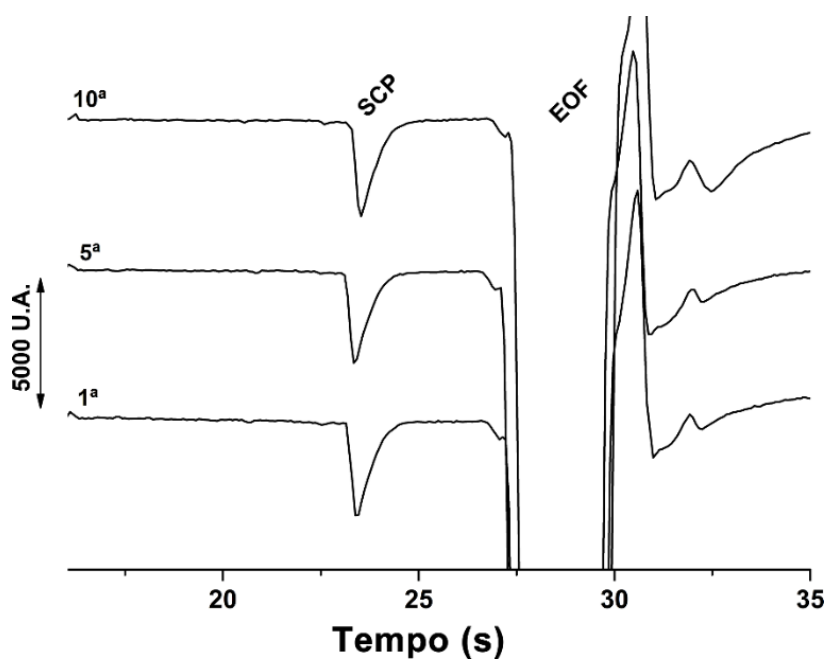
Parâmetro avaliado	Parâmetro otimizado	
	CHES/NaOH	
Composição do BGE	H ₃ BO ₃ /NaOH	HIS/NaOH
	HIS/NaOH	
Concentração de HIS	10 – 30 mmol L ⁻¹	10 mmol L ⁻¹
pH do BGE	8,3 – 10	9,5
Tempo de injeção	0,5 – 2,0 s	1,25 s
Potencial de separação	+15 kV – +30 kV	+25 kV

Fonte: O autor.

8.1.3 Estudo da repetibilidade para solução padrão e amostras de vodka e energético

Após a otimização dos parâmetros experimentais, a repetibilidade do método proposto foi investigada realizando injeções sucessivas ($n = 10$) da solução padrão de 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de SCP, como mostrado na **Figura 49**. O 1º, 5º e 10º eletroferogramas são exibidos.

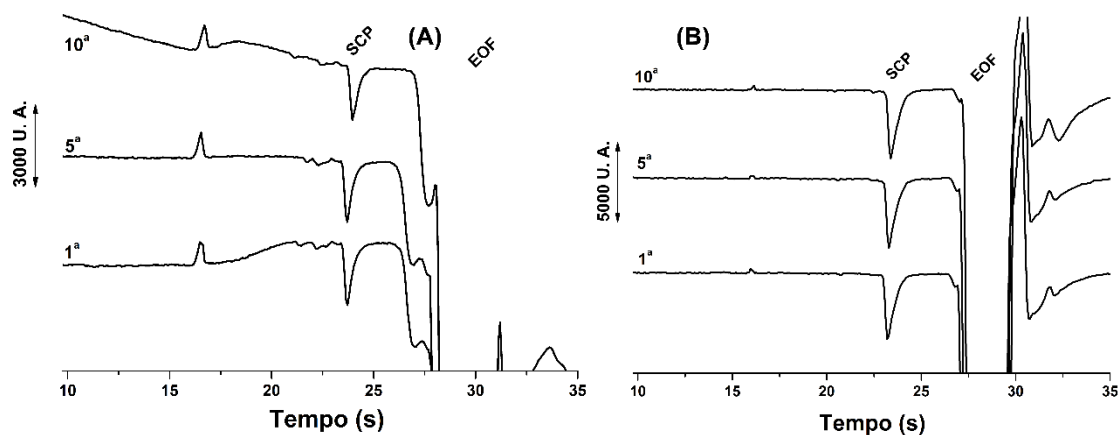
Figura 49. Eletroferogramas obtidos para injeções sucessivas ($n = 10$) de solução padrão de SCP 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$. BGE: 10 mmol L⁻¹ HIS + 6,5 mmol L⁻¹ NaOH (pH = 9,5). Condições experimentais: parâmetros otimizados da **Tabela 11**.



Fonte: O autor.

A repetibilidade de resposta do sinal da SCP no método proposto também foi avaliada pela realização de injeções sucessivas de amostras de vodka e energético, de modo que a repetibilidade do método proposto fosse avaliada não somente para a solução padrão, mas uma amostra alcoólica e outra não alcoólica. Os eletroferogramas obtidos são exibidos na **Figura 50**.

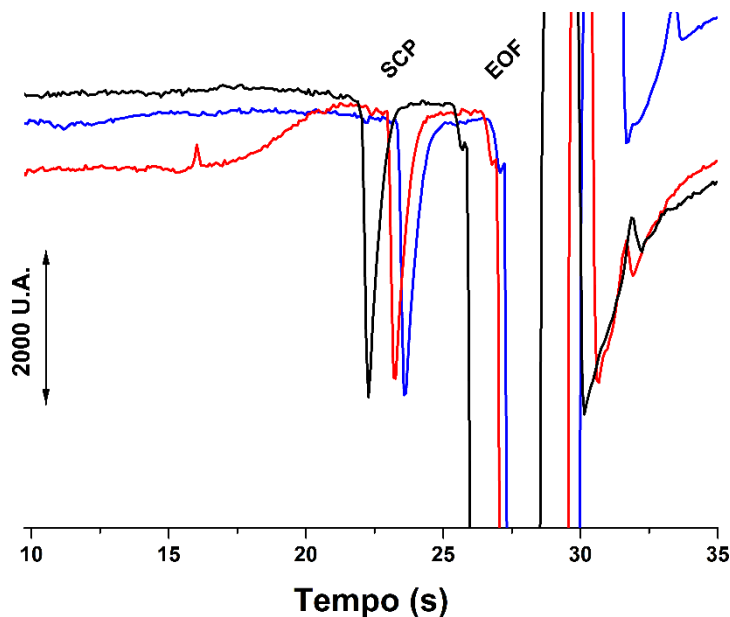
Figura 50. Eletroferogramas obtidos para injeções sucessivas ($n = 10$) de soluções contendo SCP $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ em energético (A) e vodka (B), com diluição de 10% (v/v), para as duas amostras. Condições experimentais: parâmetros otimizados da **Tabela 11**.



Fonte: O autor.

O desvio padrão relativo (DPR; $n = 10$) para as áreas e tempos de migração dos picos obtidos nas injeções de solução padrão de SCP foram de 3,5% e 0,6%, respectivamente. Os DPRs obtidos para a amostra de vodka (2,7% e 0,5%) e de energético (3,5% e 0,5%) foram similares. A repetibilidade interdias foi avaliada mediante a comparação, em triplicata, das áreas e tempos de migração da SCP em 3 dias distintos. DPRs de 8,9% e 4,0% foram obtidos, respectivamente. Os eletroferogramas obtidos em 3 dias diferentes são mostrados na Figura 51.

Figura 51. Eletroferogramas obtidos em dias diferentes ($n = 3$) para injeções de solução padrão SCP $100 \mu\text{mol L}^{-1}$.
¹. Condições experimentais: parâmetros otimizados da **Tabela 11**.



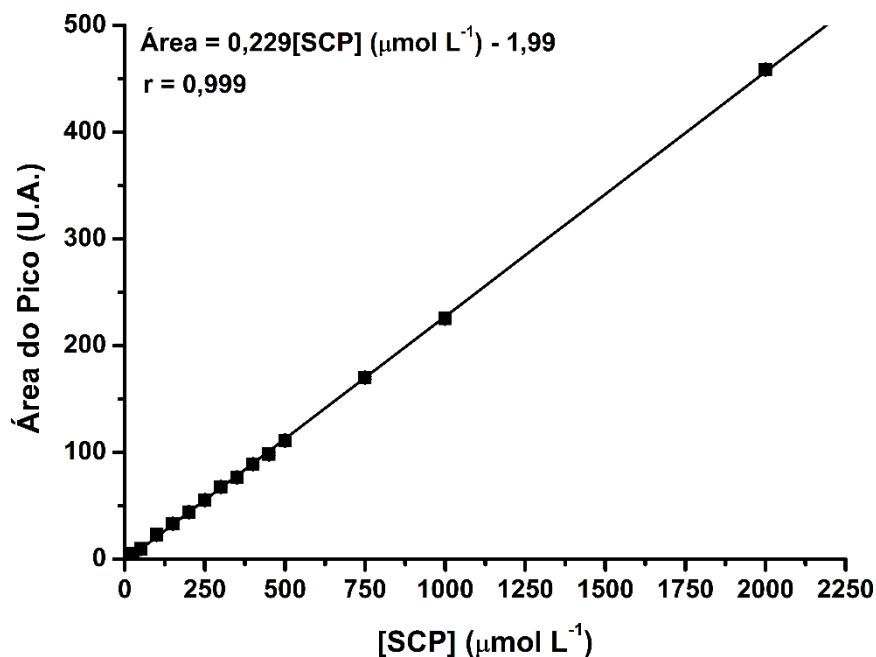
Fonte: O autor.

Os resultados obtidos nos estudos de repetibilidade intra- ($\text{DPR} \leq 3.5 \%$) e inter-dias ($\text{DPR} \leq 8.9 \%$) para o pico da SCP pelo método proposto em diferentes amostras de bebidas encontram-se dentro dos limites preconizados pela ANVISA (2018), sem a necessidade do pré-tratamento das amostras e sem realização da limpeza do capilar entre amostras. Ademais, é importante salientar que estes resultados foram obtidos sem o uso de padrão interno (comumente utilizado em CE).

8.1.4 Estudo da faixa linear e curva de calibração para a determinação de SCP em bebidas por CE- C^4D .

Uma vez otimizados todos os parâmetros experimentais do método proposto, a faixa linear de resposta para diferentes concentrações de SCP foi avaliada. A área do pico obtido para SCP foi avaliada em função da concentração, conforme demonstrado na **Figura 52**.

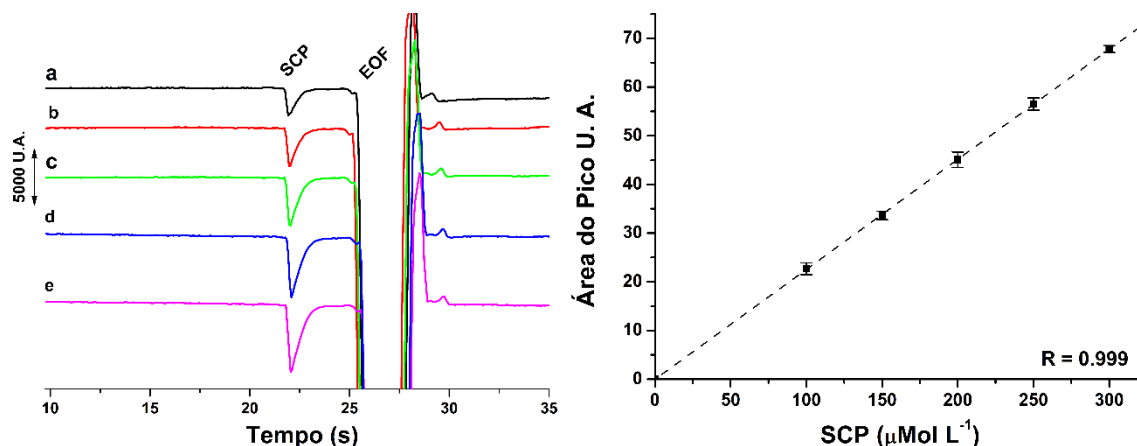
Figura 52. Faixa linear obtida para injeção de soluções com concentrações crescentes de SCP, no intervalo entre 25 e 2000 $\mu\text{mol L}^{-1}$ SCP. Condições experimentais: parâmetros otimizados da **Tabela 11**.



Fonte: O autor.

O gráfico da **Figura 52** demonstra que a área do pico obtido para SCP apresenta relação linear para uma ampla faixa de concentração de SCP (de 25 $\mu\text{mol L}^{-1}$ a 2000 $\mu\text{mol L}^{-1}$ SCP, $r = 0,999$). Essa ampla faixa linear é uma das características do detector C^4D . Na análise de amostras, um intervalo de concentração menor (100 e 300 $\mu\text{mol L}^{-1}$) foi escolhido para a realização da curva de calibração. Tendo em vista que os efeitos sedativos da SCP são dose-dependentes, e a dose diária máxima é de 80 mg, amostras dopadas com SCP no intervalo de concentração escolhido para a construção da curva analítica apresentariam valores de 1 a 3 mmol L^{-1} , que são adequados para a aplicação do método em situações envolvendo amostras reais. A **Figura 53** apresenta os eletroferogramas obtidos a partir de injeções de soluções contendo concentrações crescentes de SCP e a respectiva curva de calibração.

Figura 53. Eletroferogramas obtidos a partir de injeções ($n = 3$) de soluções padrão de SCP, preparadas nas concentrações de 100 - 300 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (a – e), e as respectiva curva de calibração obtida. Condições experimentais: parâmetros otimizados da **Tabela 11**.



Fonte: O autor.

A equação da curva analítica resultante da linearização das áreas dos picos da SCP é mostrada na **Equação (16)**:

$$\text{Área} = 0,226[\text{SCP}](\mu\text{molL}^{-1}) - 0,104 \quad \text{Equação (16)}$$

Os parâmetros analíticos do método proposto são apresentadas na **Tabela 12**.

Tabela 12. Parâmetros analíticos do método CE-C⁴D proposto para determinação de SCP em bebidas.

Parâmetro analítico	SCP
Faixa linear ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	26 – 2000
r	0,999
Tempo de migração (s)	$23,1 \pm 0,7$
Repetibilidade intra-dia (DPR%, $n = 10$)	3,5
Repetibilidade inter-dias (DPR%, $n = 3$)	8,9
LD ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	7,8
LQ ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	26,0
Resolução ($n = 10$)*	$2,53 \pm 0,12$

*calculada entre o pico da SCP e o pico do EOF. Fonte: O autor.

Após a obtenção das curvas analíticas, o método desenvolvido foi aplicado à quantificação de SCP em amostras de bebidas e algumas misturas dopadas com SCP. A

quantificação foi realizada através da curva de calibração externa, utilizando a **Equação (16)**. Os resultados obtidos para a determinação de SCP nas amostras estudadas são apresentados na Tabela 13.

Tabela 13. Resultados obtidos para a determinação (n=3) de SCP em bebidas por CE-C⁴D.

Amostra	SCP adicionada ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	SCP quantificada ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	Recuperação (%)
Skol Beats [®]	200,0	202 \pm 1	101 \pm 1
Whisky	200,0	202 \pm 9	101 \pm 4
Energético	200,0	181 \pm 6	90 \pm 3
Coca-Cola [®]	200,0	205 \pm 6	103 \pm 3
Cachaça SM	200,0	201 \pm 1	100 \pm 1
Vodka	200,0	204 \pm 4	102 \pm 2
Cerveja	200,0	165 \pm 5	83 \pm 3
Cachaça VR	200,0	201 \pm 4	101 \pm 2
Suco	200,0	199 \pm 6	99 \pm 3
Whisky + Energ.	200,0	199 \pm 6	99 \pm 3
Vodka + Energ.	200,0	203 \pm 5	101 \pm 2
Coca + Vodka	200,0	206 \pm 6	103 \pm 2

Fonte: O autor.

As amostras de cerveja e energético apresentaram valores de recuperação na faixa entre 80 - 90% que foram consideravelmente menores quando comparados com as demais amostras utilizando o BGE composto por 10 mmol L⁻¹ His/ 6,5 mmol L⁻¹ NaOH. A fim de obter melhores valores de recuperação, uma nova curva analítica foi construída utilizando o mesmo BGE na concentração de 20 mmol L⁻¹, mantendo os demais parâmetros já otimizados para o desenvolvimento do presente método. A equação da curva resultante da linearização das áreas dos picos da SCP, obtidos usando o BGE composto por HIS 20 mmol L⁻¹ + 13 mmol L⁻¹ NaOH (pH = 9,5) é mostrada na **Equação (17)**. Os resultados calculados são apresentados na **Tabela 14**.

$$\text{Área} = 0,199[\text{SCP}](\mu\text{molL}^{-1}) - 0,488$$

Equação (17)

Tabela 14. Resultados obtidos para a determinação ($n = 3$) de SCP em bebidas por CE- C^4D , usando BGE HIS 20 mmol L⁻¹ + 13 mmol L⁻¹ NaOH (pH = 9,5).

Amostra	SCP adicionada (μmol L ⁻¹)	SCP quantificada (μmol L ⁻¹)	Recuperada (%)
Cerveja	200,0	181 ± 5	90 ± 3
Energético	200,0	202 ± 6	101 ± 3

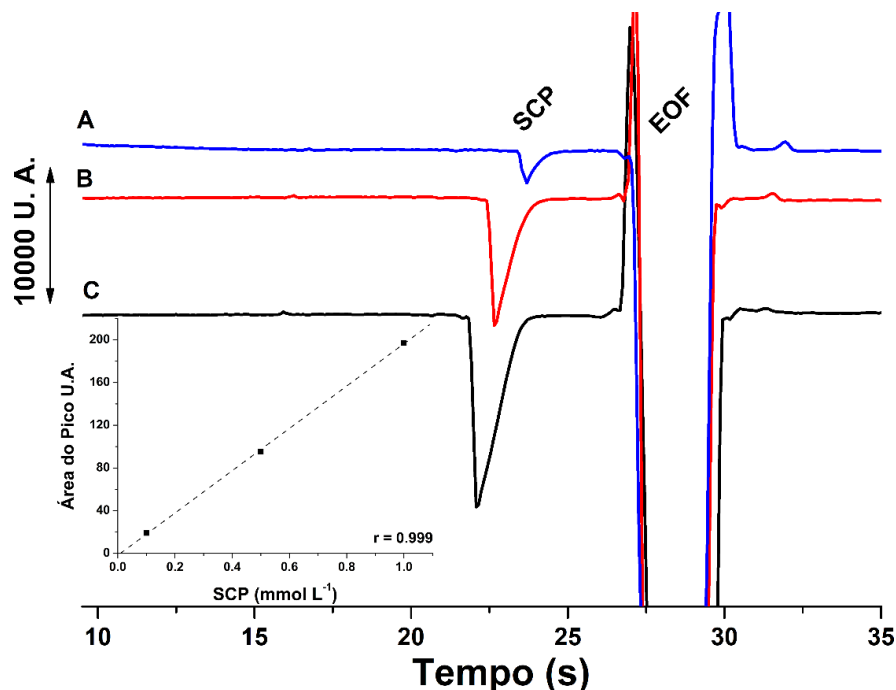
Fonte: O autor.

Os resultados de recuperação exibidos na **Tabela 14** demonstram que o simples aumento na concentração de HIS no BGE foi suficiente para melhorar os resultados de recuperação. Os resultados de recuperação obtidos para SCP na amostra de cerveja e energético aumentaram de 83 para 90% e de 90 para 101%, respectivamente. Dessa forma, pode-se afirmar que o método desenvolvido pode ser aplicado para quantificar a SCP presente em todas as amostras avaliadas.

8.1.5 Aplicação do método proposto à análise de bebidas adulteradas com o medicamento Buscopan®

A fim de testar a aplicabilidade do método, um comprimido de Buscopan® 10 mg foi dissolvido em vodka pura, e uma alíquota dessa solução foi subsequentemente diluída em bebida para a obtenção de uma solução contendo 1 mmol L⁻¹ de SCP. Os eletroferogramas obtidos a partir de injeções dessa solução e duas diluições distintas são apresentados na **Figura 54**.

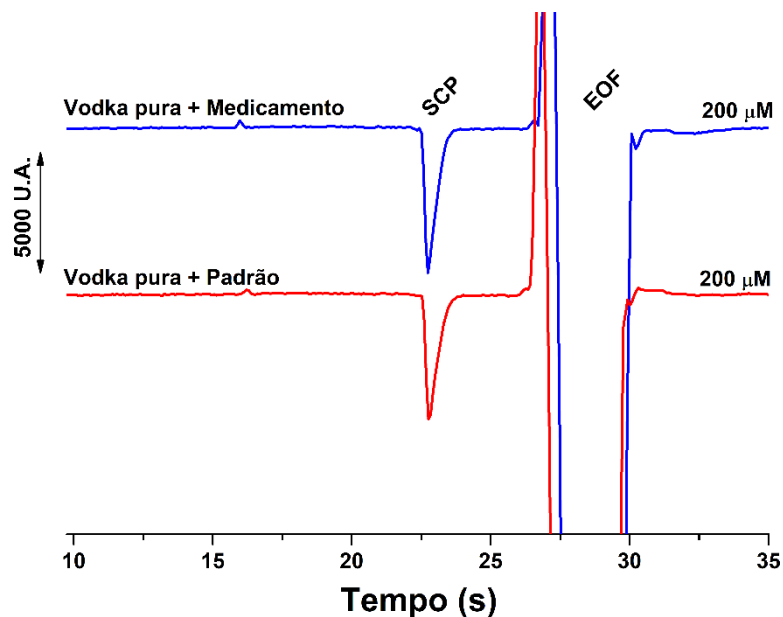
Figura 54. Comparação dos eletroferogramas obtidos para injeções de soluções contendo SCP (a partir do Buscopan®) nas concentrações de (A) 0,1 mmol L⁻¹; (B) 0,5 mmol L⁻¹ e (C) 1,0 mmol L⁻¹ em vodka pura. Em destaque: relação entre área do pico e concentração de SCP. Condições experimentais: parâmetros otimizados da Tabela 10.



Fonte: O autor.

Com base nos eletroferogramas da **Figura 54**, é possível perceber que apesar do Buscopan® conter vários compostos como excipientes (**seção 7.1.1**), não são observados outros picos além da SCP, de modo que o método proposto pode ser aplicado sem a diluição da amostra de vodka, mesmo quando o Buscopan® é utilizado como adulterante. Além disso, a área obtida para os picos e concentração de SCP presente no fármaco também apresentam relação linear, nas diferentes diluições da amostra. Visando comparar a intensidade do pico obtido para SCP proveniente de diferentes origens (padrão comercial e fármaco), uma solução foi preparada mediante a adição do padrão de SCP à vodka pura, e diluída na mesma concentração que o fármaco. Os eletroferogramas obtidos são mostrados na **Figura 55**.

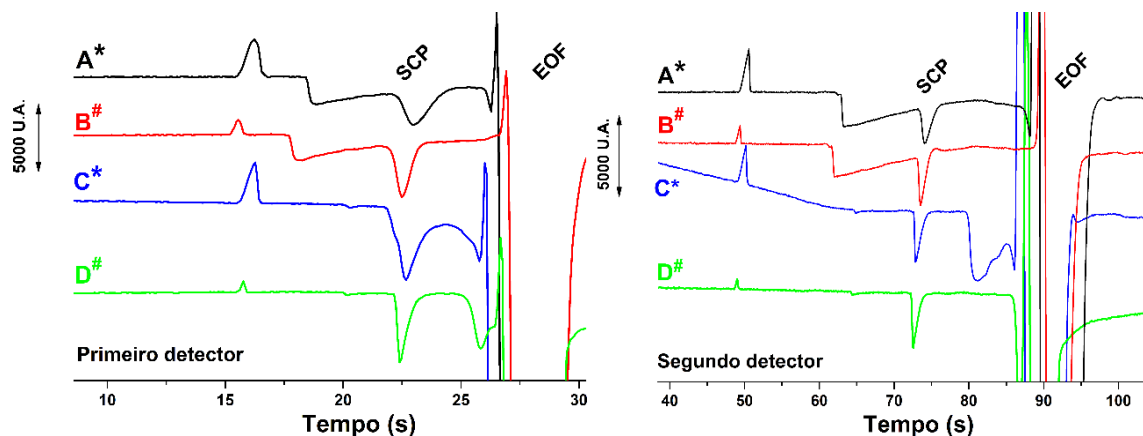
Figura 55. Comparação dos eletroferogramas obtidos para injeções de vodka pura após adição do fármaco Buscopan® ou do padrão de SCP ($200 \mu\text{mol L}^{-1}$). Condições experimentais: parâmetros otimizados da **Tabela 11**.



Fonte: O autor.

Com base nos resultados exibidos na **Figura 55**, os eletroferogramas obtidos para as amostras fortificadas com SCP proveniente de origens diferentes (padrão comercial ou fármaco) são similares, de modo que a triagem e quantificação de SCP nessas amostras pode ser realizada quer a adulteração seja cometida empregando o princípio ativo na sua forma pura ou numa formulação farmacêutica. O mesmo teste foi realizado para a mistura vodka e energético (1:1), sendo comparados os eletroferogramas obtidos para $200 \mu\text{mol L}^{-1}$ de SCP a partir do Buscopan® ou do padrão, com e sem a diluição das amostras em água, conforme mostrado na **Figura 56**.

Figura 56. Comparação dos eletroferogramas obtidos nos dois detectores (10 e 40 cm de comprimentos efetivos) para injeções de soluções contendo SCP $200 \mu\text{mol L}^{-1}$, preparadas a partir do Buscopan® ou do padrão, em misturas de vodka e energético (1:1). **(A e B)** misturas dopadas com Buscopan®; **(C e D)** misturas dopadas com padrão. *Amostras injetadas sem diluição; #amostras injetadas após diluição de 10 vezes. Condições experimentais: parâmetros otimizados da **Tabela 11**.



Fonte: O autor.

Como não foi realizada diluição das amostras em água, os eletroferogramas (**A*** e **C***) mostrados na **Figura 56** apresentam oscilações da linha de base em função da composição complexa da amostra de energético (efeito de matriz). O pico obtido para SCP nos eletroferogramas registrados pelo primeiro detector (10 cm de comprimento efetivo) não exibe boa definição, apresentando considerável alargamento. Em contrapartida, o sinal obtido no segundo detector (40 cm de comprimento efetivo), apresenta picos mais estreitos e simétricos para todas as soluções (puras ou diluídas), quer a SCP presente na amostra seja proveniente do padrão ou do medicamento Buscopan®. Esses resultados demonstram que o método pode ser aplicado sem a diluição das amostras, ainda que o tempo de análise seja ligeiramente maior, uma vez que os resultados do primeiro detector não sejam tão bem definidos quanto os eletroferogramas registrados pelo segundo detector.

8.1.6 Quantificação de SCP em amostras de bebidas dopadas com Buscopan®

De forma similar àquela realizada para a adulteração das amostras utilizando o padrão, o teste de adição e recuperação também foi realizado para amostras de vodka, suco e de vodka

misturada à energético (1:1) dopadas com SCP presente no Buscopan®. Os resultados obtidos nesse teste são exibidos na **Tabela 15**.

Tabela 15. Resultados obtidos para a determinação de SCP em bebidas por CE-C4D empregando o medicamento Buscopan® como adulterante (n = 3).

Amostra	SCP adicionada ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	SCP encontrada ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	Recuperada (%)
Vodka	200,0	205 \pm 5	103 \pm 3
Suco	200,0	200 \pm 4	100 \pm 2
Vodka + Energético	200,0	198 \pm 3	99 \pm 1

Fonte: O autor

Os valores de recuperação obtidos para SCP demonstram que o método proposto apresenta exatidão adequada para a análise de bebidas adulteradas com o medicamento, com valores de recuperação entre 99 e 103% para amostras com diferentes composições: alcoólica, não alcoólica e na mistura de vodka e energético (1:1), com necessidade de simples etapa de pré-tratamento (diluição em água).

8.2 Parte II - Determinação de SCP em urina real empregando CE-C⁴D

A urina é um importante material biológico para a análise forense, uma vez que neste material as concentrações dos fármacos e dos seus respectivos produtos de biotransformação são relativamente altas (RAIKOS *et al.*, 2003). Conforme já discutido na seção na seção 4.2.6 até 30% da SCP ingerida é eliminada na urina sem metabolização (RENNER; OERTEL; KIRCH, 2005). A ingestão de doses que excedam a dose máxima diária de 80 mg promoverá eliminação de quantidades significativas de SCP na urina.

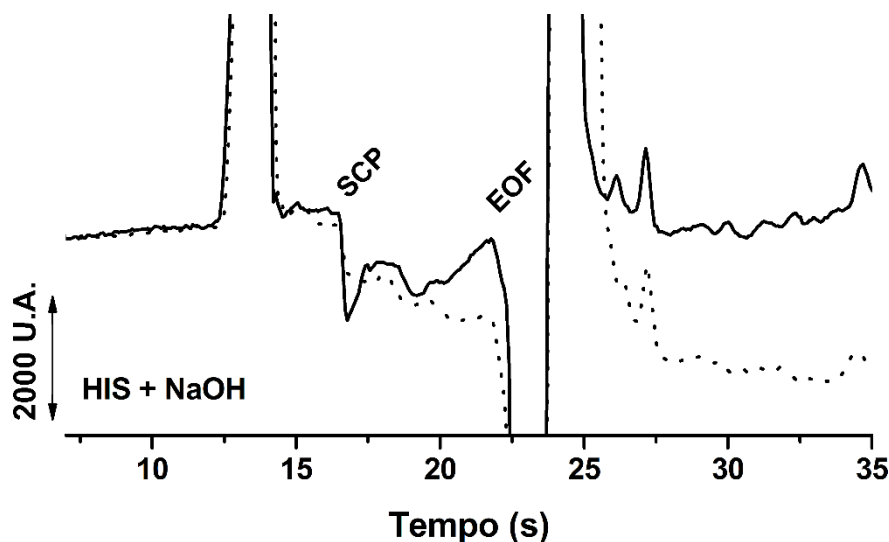
Não foram encontrados trabalhos na literatura, empregando CE-C⁴D que realizam a determinação de SCP em amostras de urina, e desse modo, estudos foram realizados com a finalidade de não apenas realizar a triagem (“*screening*”) de SCP em amostras de urina real, mas também a quantificação do analito nessas amostras.

8.2.1 Estudo da composição e do pH do BGE

Como o tampão composto por HIS/NaOH apresentou os melhores resultados para a detecção de SCP nas amostras de bebidas investigadas empregando o sistema CE-C⁴D, o mesmo BGE foi inicialmente utilizado no desenvolvimento do método para detecção de SCP em amostras de urina real. As concentrações de HIS e NaOH utilizada foram 20 e 13,0 mmol L⁻¹, respectivamente, tendo em vista que o BGE com as espécies nessa concentração se mostrou eficaz para a quantificação de SCP nas amostras de cerveja e energético, que apresentam composição mais complexa entre as bebidas estudadas, conforme descrito na **Tabela 4**.

Desse modo, foram realizadas injeções de 50 µmol L⁻¹ de SCP em solução contendo 10% (v/v) de urina, utilizando o BGE composto por 20 mmol L⁻¹ HIS/ 13,0 mmol L⁻¹ NaOH. Os eletroferogramas comparando a solução de 10% (v/v) de urina antes e após a adição de SCP são apresentados na **Figura 57**.

Figura 57. Eletroferogramas de solução contendo urina 10% (v/v) antes (---) e depois (—) da adição de 50 µmol L⁻¹ de SCP. Condições experimentais: BGE: 20 mmol L⁻¹ HIS + 13 mmol L⁻¹ NaOH (pH = 9,5). Injeção hidrodinâmica: 25 KPa por 3 s; potencial de separação de +25 kV (lado da injeção); comprimento total e efetivo do capilar: 50 e 10 cm, respectivamente; EOF: normal.

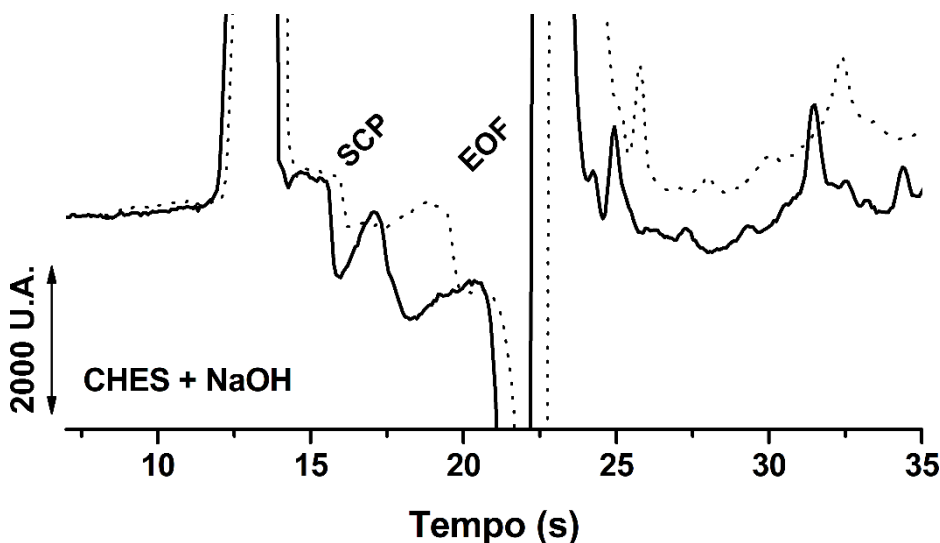


Fonte: O autor.

Com base nos eletroferogramas exibidos na **Figura 57** para soluções de 10% de urina (v/v) antes e após adição de SCP, nota-se variações consideráveis na linha base após o pico de cátions (12 s) e antes do EOF (22 s). Quando a solução de 10% (v/v) de urina (v/v) contendo

50 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de SCP é injetada, é perceptível o surgimento de um pico assimétrico e com pequena intensidade com tempo de migração de 16 s. Uma vez que o BGE previamente utilizado não apresentou resultados satisfatórios, o BGE composto por CHES e NaOH foi investigado para a realização das análises. Os eletroferogramas obtidos neste estudo são exibidos na **Figura 58**.

Figura 58. Eletroferogramas de solução contendo urina 10% (v/v) antes (---) e depois (—) da adição de 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de SCP. Condições experimentais: BGE: 20 mmol L^{-1} CHES + 13 mmol L^{-1} NaOH (pH = 9,5). Condições experimentais: similares à **Figura 57**.

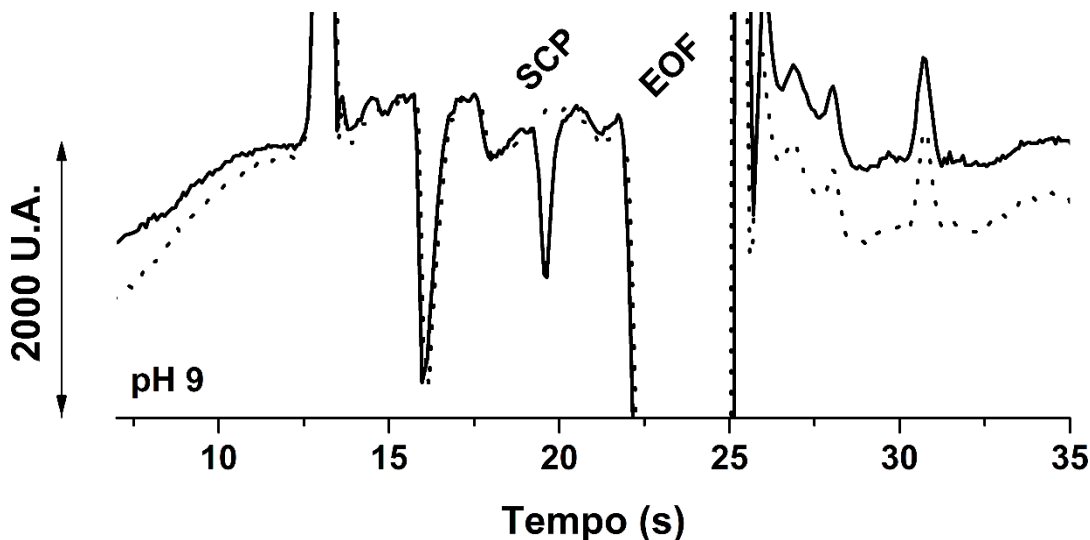


Fonte: O autor.

Assim como observado para o BGE composto por HIS/NaOH, os eletroferogramas da **Figura 58** também apresentam flutuações consideráveis na linha base e o pico para SCP (~16 s) apresenta pequena intensidade. Além disso, é evidente a eletrodispersão para o pico da SCP, de modo que esse BGE não apresentou resultados satisfatórios para o desenvolvimento do trabalho.

Desse modo, outro BGE foi investigado para a detecção de SCP nas amostras de urina, composto por HIS 20 mmol L^{-1} + DMX 10 mmol L^{-1} + 15 mmol L^{-1} NaOH. Os eletroferogramas de soluções contendo 10% (v/v) de urina antes e depois da adição de 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de SCP são mostrados na **Figura 59**.

Figura 59. Eletroferogramas de solução contendo urina 10% (v/v) antes (---) e depois (—) da adição de 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de SCP. Condições experimentais: BGE: 20 mmol L^{-1} HIS + DMX 10 mmol L^{-1} + 12 mmol L^{-1} NaOH (pH = 9,0). Injeção hidrodinâmica: 25 KPa por 3 s; potencial de separação de +25 kV (lado da injeção); comprimento total e efetivo do capilar: 50 e 10 cm, respectivamente; EOF: normal.



Fonte: O autor.

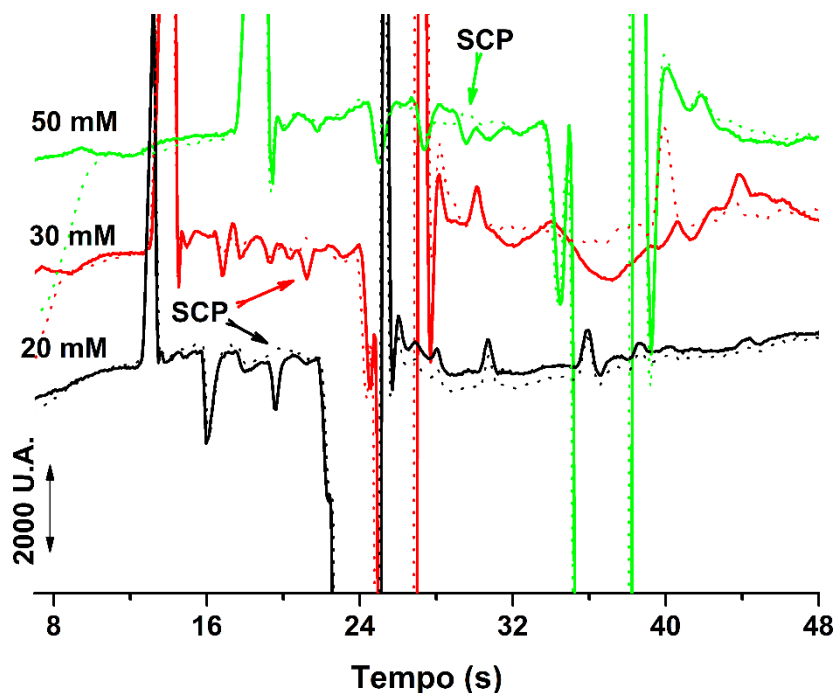
Observando os resultados exibidos na **Figura 59** nota-se melhora com relação à linha base, além do pico da SCP ($t_m = 20$ s) apresentar melhor definição em comparação com os outros BGEs previamente testados. De acordo com Tavares (1997), tampões contendo íons com mobilidade semelhante à do analito previnem os fenômenos de eletrodispersão, fornecendo picos simétricos e delgados minimizando seu alargamento (TAVARES, 1997). O ácido 3-(3,5-dimetóxfenil)prop-2-enóico, DMX ($\text{C}_{11}\text{H}_{12}\text{O}_5$), possui apenas um hidrogênio ionizável, e encontra-se completamente desprotonado em valores de $\text{pH} > 6,0$ o que poderia explicar a melhora significativa quando esse composto é utilizado no BGE.

O pico detectado para SCP, com tempo de migração em 20 s, apresenta maior simetria e intensidade, ainda que seu tempo de migração seja próximo àquele apresentado pelo pico dos cátions da amostra, com mobilidade inferior à do BGE (provavelmente Ca^{2+} e Mg^{2+} co-migrando em 16 s) e o EOF (aproximadamente 23 s). Dessa forma o BGE composto por HIS/DMX/NaOH foi escolhido para o desenvolvimento do trabalho.

Em função dos resultados mostrados na **Figura 59**, o efeito da concentração de HIS e DMX na intensidade do pico de SCP foi avaliada. A proporção de 2 HIS :1 DMX foi mantida, de modo que as demais concentrações testadas foram 30 mmol L^{-1} HIS e 15 mmol L^{-1} de DMX e 50 mmol L^{-1} HIS e 25 mmol L^{-1} de DMX, sendo o pH mantido em 9,0. Os eletroferogramas

de soluções contendo 10% (v/v) de urina antes e depois da adição de $50 \mu\text{mol L}^{-1}$ de SCP são mostrados na **Figura 60**.

Figura 60. Eletroferogramas de solução contendo urina 10% (v/v) antes (---) e depois (—) da adição de $50 \mu\text{mol L}^{-1}$ de SCP. Com diferentes concentrações de HIS/DMX [20/10 (—); 30/15 (—) e 50/25 mmol L^{-1} (—)] no BGE, respectivamente; pH ajustado em 9,0 com adição de NaOH. Condições experimentais: conforme descrito na **Figura 59**.

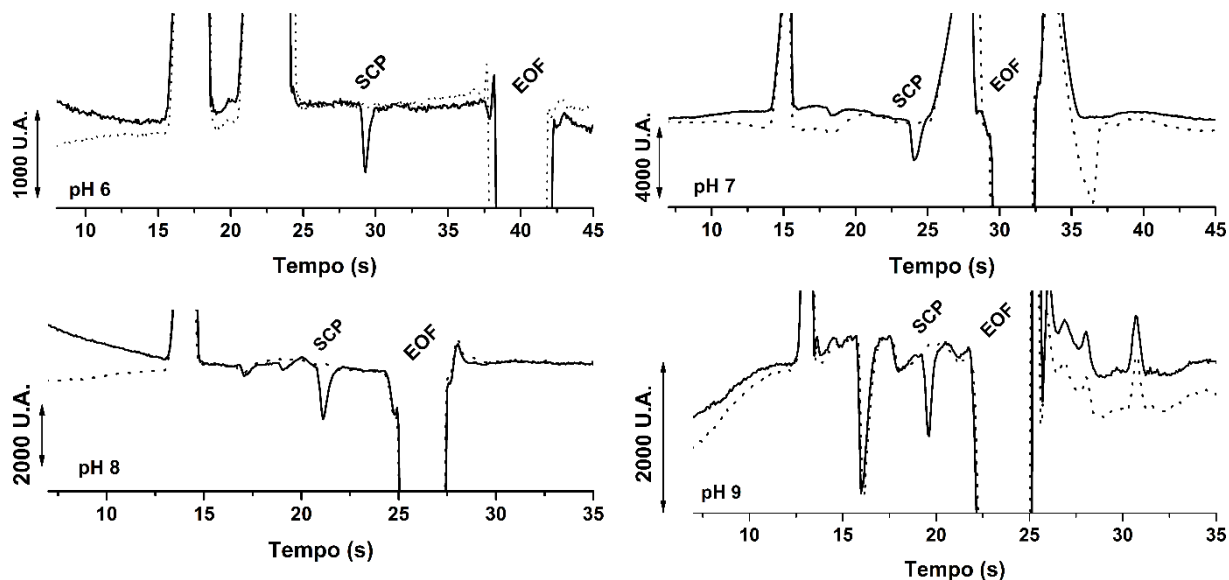


Fonte: O autor.

Os resultados exibidos na **Figura 60** seguem a mesma tendência apresentada na seção **8.1.1**. O aumento na concentração das espécies do BGE, HIS e DMX não promove melhora no sinal detectado. O efeito observado é o oposto, quanto mais concentrado o BGE mais ruidosa se torna a linha base, e menos intenso é o pico registrado para a SCP, além do fato de o EOF tornar-se mais lento, o que promove aumento no tempo de migração da SCP. Assim, as concentrações de 20 mmol L^{-1} de HIS e 10 mmol L^{-1} de DMX foram selecionadas para a o desenvolvimento das demais etapas do trabalho.

A etapa subsequente foi a otimização do pH do BGE. Neste estudo, a eficiência de BGE's compostos por 20 mmol L^{-1} HIS + 10 mmol L^{-1} de DMX, ajustados com NaOH para valores de pH entre 6 e 9, foi avaliada mediante a injeção de soluções com $50 \mu\text{mol L}^{-1}$ de SCP preparadas em 10% (v/v) de urina. O comportamento do pico de SCP nestes BGE's com diferentes valores de pH são apresentados nos eletroferogramas mostrados na **Figura 61**.

Figura 61. Estudo do pH do BGE empregando $50 \mu\text{mol L}^{-1}$ de SCP em solução contendo 10% (v/v) de urina real. BGE: 20 mmol L^{-1} HIS + 10 mmol L^{-1} de DMX + NaOH variando o pH de 6,0 – 9,0. Condições experimentais: conforme descrito na **Figura 59**.



Fonte: O autor.

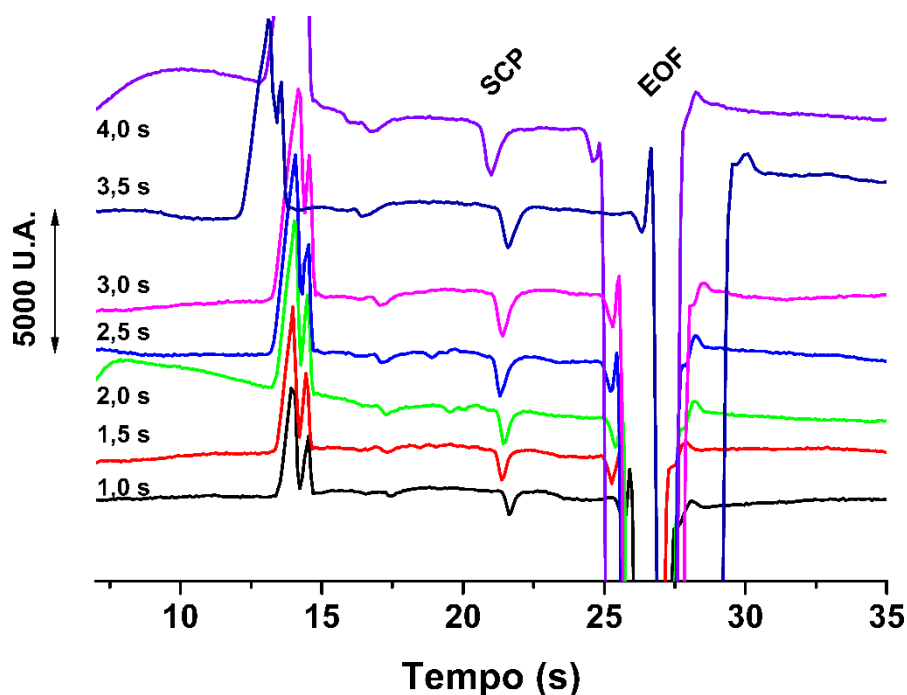
Observando os eletroferogramas da **Figura 61** é notável a diminuição do tempo de migração da SCP com o aumento do valor de pH, uma vez que em pH 6 o tempo de migração foi de ~ 29 s, com redução gradual do tempo de migração até 20 s, observado em pH 9. Esse comportamento está relacionado ao aumento de velocidade do EOF, que apresenta valor máximo em $\text{pH} > 7,5$ (para capilares de sílica fundida). Vale salientar, contudo, que em pH 6, o pico registrado para SCP é definido, mas não é tão intenso quanto o observado em pH 8, além do perceptível ruído na linha base. Já o aumento nos valores de pH ocasiona, entretanto, o aumento na mobilidade eletroforética do BGE, e desse modo, alguns componentes da amostra ocasionam o surgimento de pico intenso com tempo de migração de 15 s (possivelmente cátions Mg^{2+} e Ca^{2+}), e além disso, a diminuição da resolução entre o pico da SCP e o EOF.

Em contrapartida, observando os eletroferogramas para as soluções antes e após a adição de SCP utilizando BGE em pH 8, é possível perceber que a linha base obtida é estável (sem a presença de picos muito próximos) bem como melhor separação entre o pico de SCP e o EOF. Desse modo, o pH 8,0 foi escolhido para a realização das etapas subsequentes do trabalho.

8.2.2 Estudo do tempo de injeção

Após a determinação da composição e do pH do BGE para a separação e detecção de SCP por CE- C^4D em amostras de urina, o tempo de injeção (hidrodinâmica) foi otimizado. Para tanto, uma solução contendo $50 \mu\text{mol L}^{-1}$ de SCP preparada em 10% (v/v) de urina foi injetada com tempo de pressurização (25 KPa) variando de 1,0 a 4,0 segundos, como mostrado na **Figura 62**.

Figura 62. Estudo do tempo de injeção utilizando $50 \mu\text{mol L}^{-1}$ de SCP em solução contendo 10% (v/v) de urina real. BGE: 20 mmol L^{-1} HIS + 10 mmol L^{-1} de DMX + 12 mmol L^{-1} NaOH (pH = 8,0). Injeção hidrodinâmica: 25 KPa variando de 1,0 – 4,0 s; potencial de separação: +25 kV (lado da injeção); comprimento total e efetivo do capilar: 50 e 10 cm, respectivamente; EOF: normal.



Fonte: O autor.

Observando os eletroferogramas da **Figura 62** é perceptível o aumento na intensidade do sinal do pico de SCP com o aumento no tempo de injeção. Com maiores tempos de injeção maiores plugs de amostra são inseridos no capilar, de modo que os detectores registram maiores diferenças de condutividade entre o BGE e a banda de SCP que migra através do detector. Contudo, maiores tempos de injeção promovem redução da resolução entre o pico da SCP e o EOF, como pode ser observado quando a injeção de 4 s é realizada. Além disso, tempos de injeções maiores poderiam ocasionar problemas relacionados à presença de possíveis

interferentes na realização das análises, uma vez que proteínas presentes podem contaminar as paredes do capilar de sílica fundida.

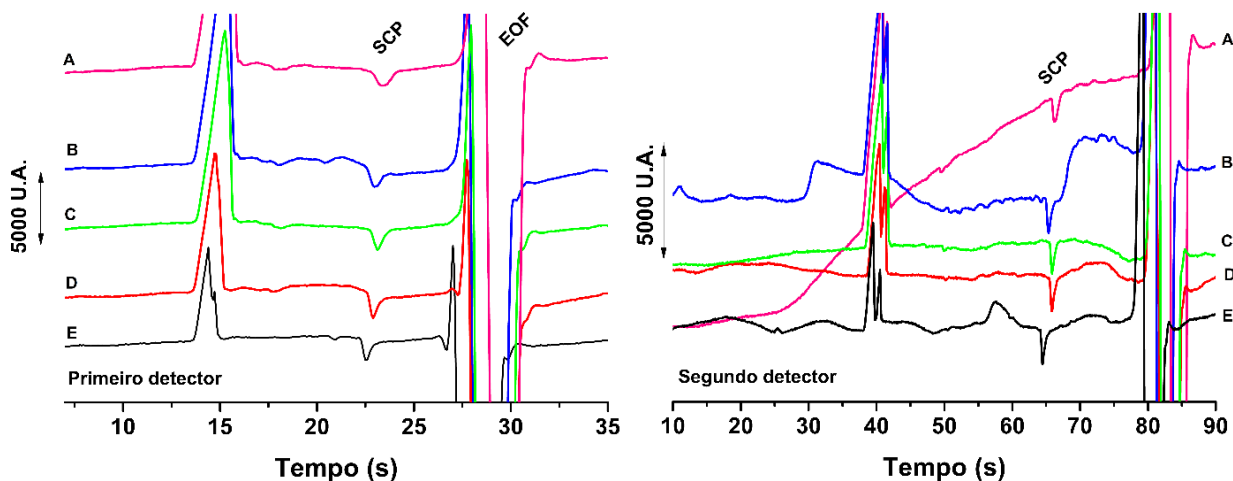
No caso de pessoas vítimas do “Boa Noite, Cinderela”, somente 30% (RENNER; OERTEL; KIRCH, 2005) da SCP ingerida será eliminada em sua forma não metabolizada. Assim, tempos de injeção muito pequenos poderiam limitar a aplicação do método em questão. Levando em consideração o aumento gradual do sinal observado para o pico de SCP, e a complexidade das amostras a serem analisadas, o tempo de injeção de 3 s foi utilizado nas demais etapas do trabalho

8.2.3 Estudo da diluição da amostra

Após definir o tempo de injeção, o próximo parâmetro experimental estudado foi o procedimento de preparo de amostra (diluição em água). Quanto menor a diluição da amostra, maior a quantidade de amostra de urina injetada, com consequente redução nos limites de detecção e quantificação do método, conferindo assim, maior aplicabilidade ao mesmo.

Desse modo, soluções de SCP $50 \mu\text{mol L}^{-1}$ foram preparadas pela diluição de alíquotas adequadas de amostra de urina em água, de modo a serem obtidas soluções contendo entre 50 e 10% (v/v) de urina. O comportamento do pico de SCP frente a diferentes diluições, registrado nos dois detectores, são apresentados nos eletroferogramas da **Figura 63**.

Figura 63. Comparação dos eletroferogramas obtidos nos dois detectores para injeções de soluções contendo 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de SCP preparadas com diluições da urina entre 50 e 10% (A – E). Condições experimentais: BGE: 20 mmol L^{-1} HIS + 10 mmol L^{-1} de DMX + 12 mmol L^{-1} NaOH (pH = 8,0). Injeção hidrodinâmica: 25 kPa por 3,0 s; potencial de separação: +25 kV (lado da injeção); comprimento total e efetivo do capilar: 50 e 10 cm, respectivamente; EOF: normal.



Fonte: O autor.

Quando utilizado uma elevada percentagem de amostra ($> 40\%$ v/v) observa-se no primeiro detector (**Figura 63 A**) flutuações na linha base e alargamento do pico de SCP. No segundo detector (**Figura 63 B**), onde o comprimento efetivo é maior (40 cm) a linha base também apresenta flutuações para todas as amostras, porém o pico detectado para SCP é simétrico e com menor efeito de eletrodispersão.

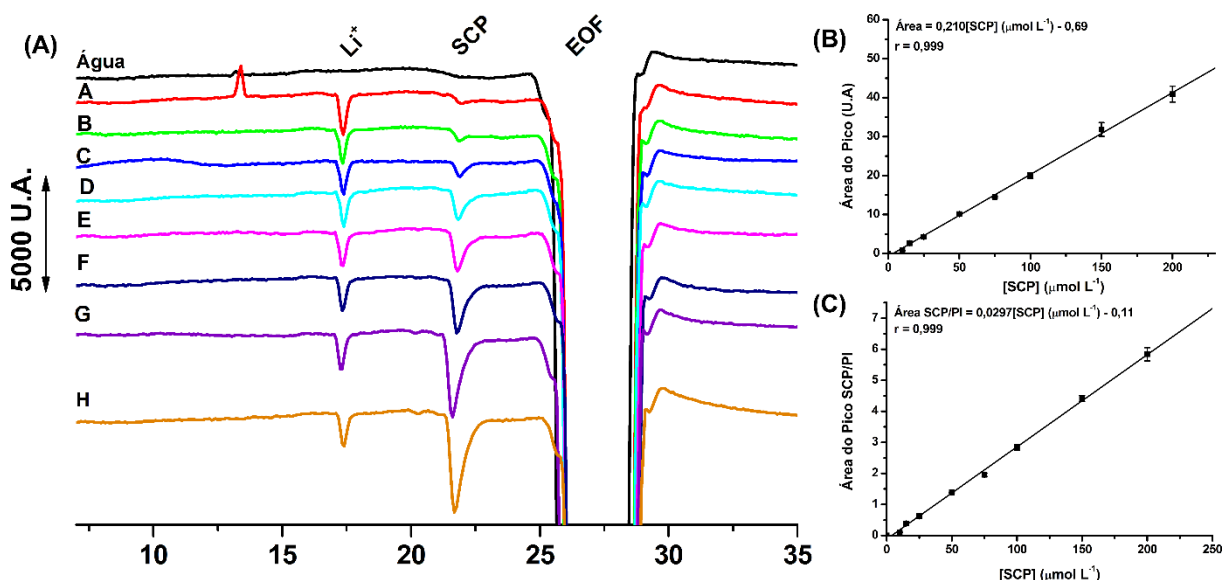
Esses resultados indicam a robustez do método quanto à quantidade de urina a ser empregada na realização da triagem (“*screening*”) de SCP nessas amostras. Atenção deve ser dada ao fato de que a possibilidade de empregar soluções menos diluídas implica na possibilidade de detecção de quantidades cada vez menores de SCP nas amostras.

Desse modo, levando em conta os resultados registrados no primeiro detector, com a finalidade de realizar rápida triagem das amostras de urina, diluições de até 50% (v/v) podem ser empregadas. Por outro lado, na quantificação de SCP em amostras de urina, diluições de até 30% (v/v) podem ser utilizadas.

8.2.4 Estudo das faixas lineares de resposta para SCP em solução padrão e na urina

Uma vez otimizados os parâmetros experimentais do método proposto, a faixa linear de resposta para diferentes concentrações de SCP foi avaliada, tanto em soluções padrão quanto soluções contendo 30% (v/v) de urina. Para as soluções padrão, o Li^+ foi utilizado como PI. Os eletroferogramas obtidos para injeções ($n = 3$) de soluções padrão com concentrações crescentes de SCP no intervalo de 10 a 200 $\mu\text{mol L}^{-1}$, e as respectivas curvas de calibração são exibidos na **Figura 64**.

Figura 64. (A) Eletroferogramas obtidos a partir de injeções ($n = 3$) de soluções padrão de SCP, preparadas em concentrações entre 10 - 200 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (A – H). (B) Curva de calibração de SCP sem uso de PI. (C) Curva de calibração de SCP com o uso de PI. PI: Li 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Condições experimentais: Similares à **Figura 63**.

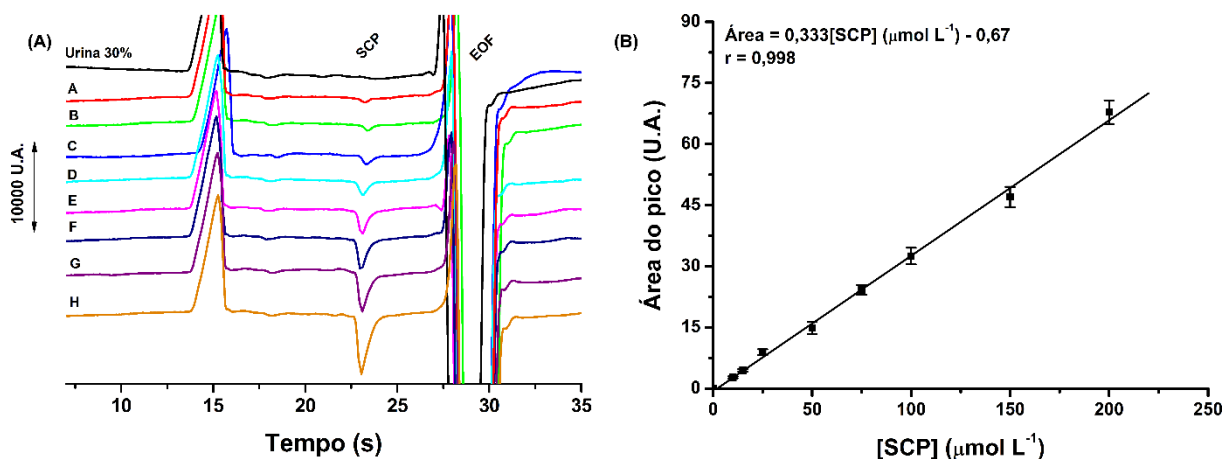


Fonte: O autor.

Como observado para os eletroferogramas da **Figura 64 (A)**, o Li^+ pode ser utilizado como PI, com tempo de migração de 17 s, sem comprometer a detecção de SCP. Além disso, como mostrado na **Figura 64 (B)**, a curva de calibração ($r = 0,999$) usando a área dos picos de SCP é linear em todo o intervalo de concentração avaliado. Concentrações maiores não foram exploradas considerando que a quantidade de SCP a ser eliminada na urina sem biotransformação (30% da dose inicial ingerida) dificilmente ultrapassaria as concentrações estudadas. Na **Figura 64 (C)** é mostrada a curva de calibração ($r = 0,999$) usando as áreas dos picos de SCP após a normalização pela área do pico do PI (SCP/PI).

A linearidade entre a área do pico de SCP e concentração também foi investigada no mesmo intervalo de concentração para soluções preparadas em meio de urina, empregando diluição de 30% (v/v), como mostrado na **Figura 65**.

Figura 65. (A) Eletroferogramas obtidos a partir de injeções ($n = 3$) de soluções preparadas em 30% (v/v) de urina real, contendo concentrações crescentes de SCP entre 10 – 200 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (A – H); (B) Curva de calibração (áreas dos picos vs. concentração de SCP). Condições experimentais: Similares à **Figura 63**.



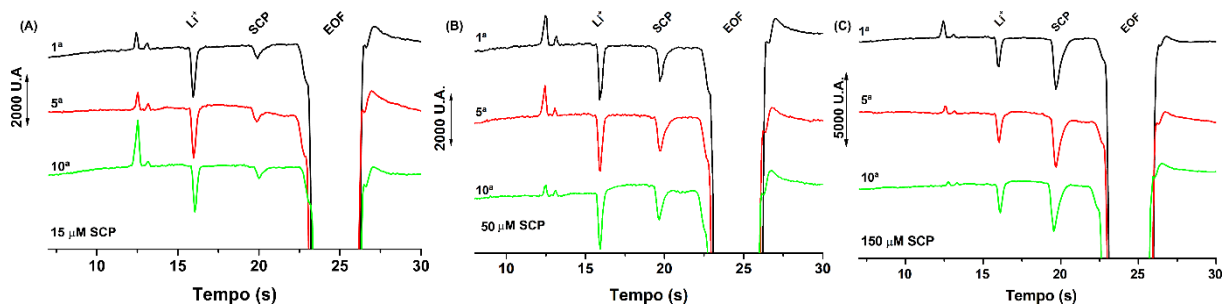
Fonte: O autor.

Como observado nas **Figura 65 (A e B)**, a curva de calibração apresenta boa linearidade ($r = 0,998$) entre a área do pico registrado para SCP e todo o intervalo de concentração avaliado (10 – 200 $\mu\text{mol L}^{-1}$), mesmo em soluções contendo 30% (v/v) de amostra de urina.

8.2.5 Estudo da repetibilidade para SCP em solução padrão e amostra

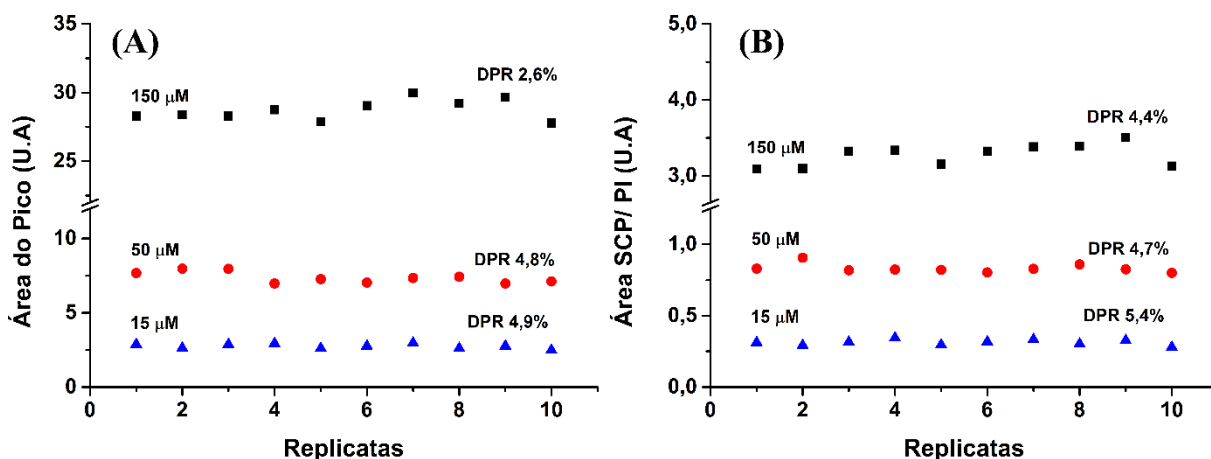
Após a otimização dos parâmetros experimentais, definição da faixa linear de resposta para a SCP, a repetibilidade do método proposto foi estudada realizando injeções sucessivas ($n = 10$) de soluções padrão de SCP nas concentrações de 15, 50 e 150 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de SCP. Na **Figura 66** são exibidos os eletroferogramas registrados após a 1ª, a 5ª e 10ª injeções. As áreas obtidas para os picos da SCP antes e após a normalização com o PI são exibidas na **Figura 67**.

Figura 66. Eletroferogramas obtidos para injeções sucessivas ($n = 10$) de solução padrão de SCP nas concentrações de 15 (A), 50 (B) e 150 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (C), contendo 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de Li (PI). Condições experimentais: Similares à **Figura 63**.



Fonte: O autor.

Figura 67. (A) Áreas registradas para o pico de SCP nas concentrações de 15 (\blacktriangle), 50 (\bullet) e 150 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (\blacksquare) em 10 eletroferogramas sucessivos. (B) Valores obtidos após a divisão da área do pico de SCP pela área do pico do PI, para as mesmas soluções.



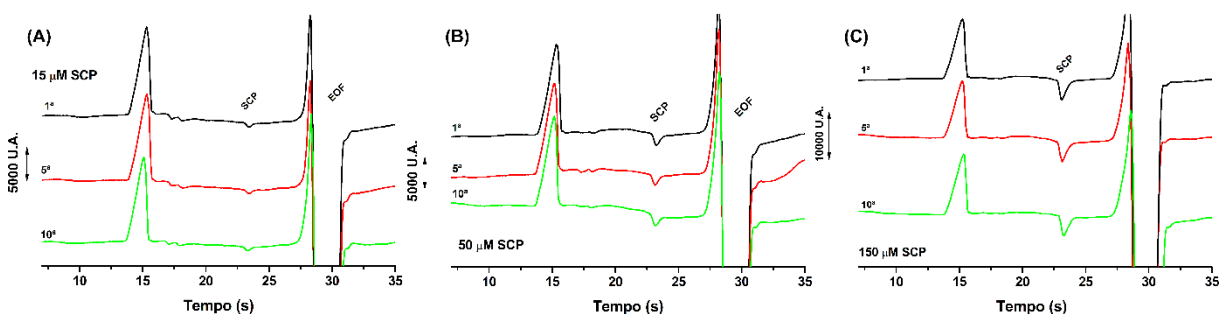
Fonte: O autor.

O desvio padrão relativo (DPR; $n = 10$) para as áreas dos picos obtidos nas injeções de solução padrão de 15; 50 e 150 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de SCP foram de 4,9, 4,8, e 2,6%, respectivamente. Para o tempo de migração, os DPR calculados foram de 0,5, 0,5 e 0,4%, respectivamente. Com relação ao pico do padrão interno utilizado em concentração fixa de 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$ o desvio padrão calculado para as áreas obtidas após 30 injeções foi de 3% com variação no tempo de migração de 0,7%. Quando o padrão interno de Li^+ é utilizado para normalizar a área do pico de SCP, os DPR calculados são de 5,4, 4,7 e 4,4% para as concentrações de 15, 50 e 150 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de SCP, respectivamente.

A repetibilidade do sinal registrado para a área do pico da SCP também foi avaliada em soluções contendo 30% (v/v) de urina. Na **Figura 68** são exibidos os eletroferogramas

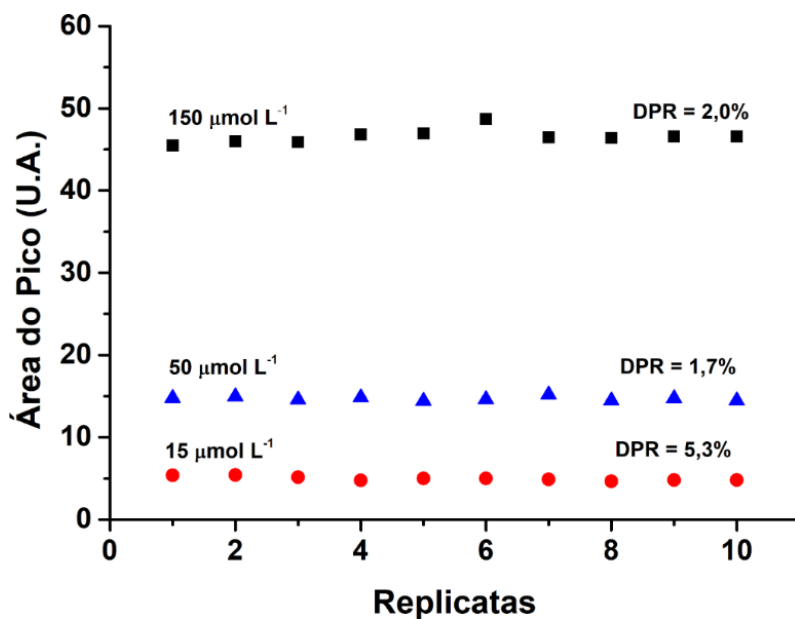
registrados para a 1^a, 5^a e 10^a injeções de soluções 15, 50 e 150 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Os valores obtidos para a área do pico da SCP nas três concentrações estudadas são mostrados na **Figura 69**.

Figura 68. Eletroferogramas obtidos para injeções sucessivas (n=10) de soluções contendo SCP nas concentrações de 15 (A), 50 (B) e 150 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (C) preparadas em 30% (v/v) de urina real. Condições experimentais: Similares à **Figura 63**.



Fonte: O autor.

Figura 69. Áreas registradas para o pico de SCP nas concentrações de 15 (●), 50 (▲) e 150 (■) $\mu\text{mol L}^{-1}$ obtidos a partir dos eletroferogramas da **Figura 68**.



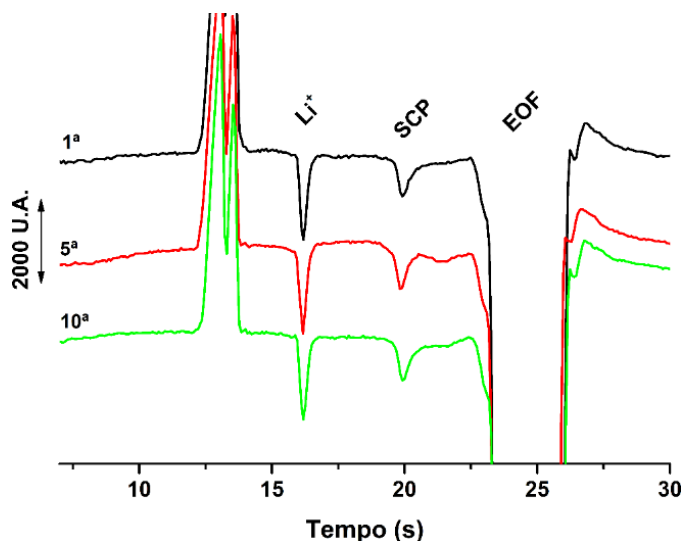
Fonte: O autor.

O desvio padrão relativo (DPR; n = 10) para as áreas dos picos obtidos nas injeções de soluções contendo SCP em 30% de urina (v/v), nas concentrações de 15, 50 e 150 $\mu\text{mol L}^{-1}$ foram de 5,3, 1,7, e 2,0%, respectivamente. Para o tempo de migração, os DPRs calculados foram de 0,5, 0,3 e 0,8%, respectivamente. Como era esperado, maior DPR é observado para o pico de SCP na concentração de 15 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Contudo, levando em consideração a faixa de

concentração utilizada para a realização do estudo de repetibilidade, o valor calculado é considerado aceitável pelo INMETRO (2018).

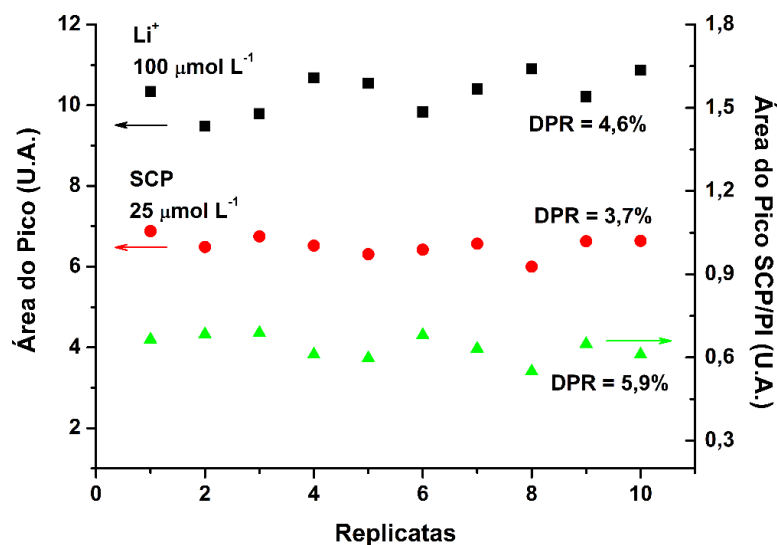
Adicionalmente, foram realizadas injeções sucessivas ($n = 10$) para avaliar a repetibilidade do sinal de $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ de Li^+ (PI) em solução contendo SCP $25 \mu\text{mol L}^{-1}$ preparada com 10% de urina (v/v). Os eletroferogramas registrados após a realização da 1ª, 5ª e 10ª injeções são mostrados na **Figura 70**. As áreas dos picos do Li e da SCP, bem como a área normalizada para SCP são mostrados na **Figura 71**.

Figura 70. Eletroferogramas obtidos para injeções sucessivas ($n=10$) de soluções contendo SCP $25 \mu\text{mol L}^{-1}$ e Li^+ $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ (PI) preparadas em 10% (v/v) de urina real. Condições experimentais: Similares à **Figura 63**.



Fonte: O autor.

Figura 71. Áreas registradas para os picos de $25 \mu\text{mol L}^{-1}$ SCP (●) e $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ de Li^+ (■) e a área corrigida obtidos a partir dos eletroferogramas da **Figura 70**. (▲) Valores obtidos após a divisão da área do pico de SCP pela área do pico do PI, nas concentrações estudadas.



Fonte: O autor.

Como mostrado na **Figura 71**, o desvio padrão relativo (DPR; $n = 10$) para as áreas dos picos de Li^+ e SCP obtidos nas injeções de solução contendo 10% de urina (v/v), nas concentrações de 100 e $25 \mu\text{mol L}^{-1}$ foram 4,6 e 3,7%, respectivamente. Para o tempo de migração, os DPRs calculados foram 0,4, e 0,3%, respectivamente.

A repetibilidade interdias foi avaliada mediante a comparação, em triplicata, das áreas e tempos de migração do Li^+ e da SCP em 3 dias distintos. Com relação ao pico do Li^+ , DPRs de 7,2 e 3,0% foram obtidos, para área e tempo de migração, respectivamente. Para o pico da SCP, DPRs de 8,6 e 3,0% foram obtidos, para área e tempo de migração, respectivamente.

Os valores de DPR calculados para SCP em solução contendo 10% (v/v) são notavelmente satisfatórios, demonstrando a estabilidade do sinal registrado, mesmo em dias diferentes, tendo em vista a ausência de etapas prévias de tratamento e a complexidade da amostra analisada.

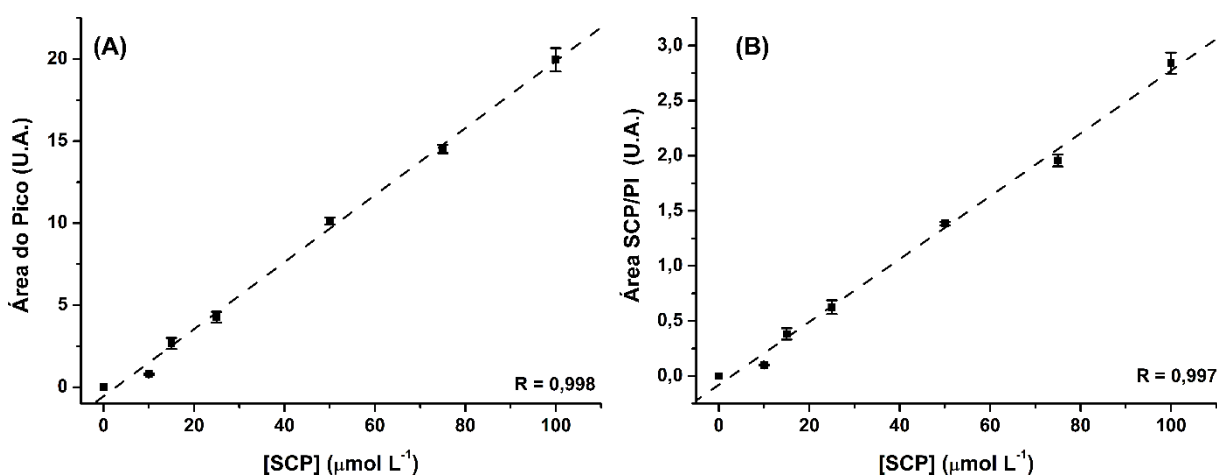
8.2.6 Curva de calibração e quantificação da SCP nas amostras de urina

Para a obtenção da curva de calibração e posterior análise de amostras de urina, um intervalo de concentração entre 10 e $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ foi escolhido. Tendo em vista que a quantidade de SCP eliminada sem metabolização é de 30%, amostras dopadas com SCP no

intervalo de concentração escolhido para a construção da curva de calibração apresentariam valores de 330 a 3300 $\mu\text{mol L}^{-1}$, para diluição das amostras de urina em 10% (v/v), que são adequados para a aplicação do método em situações envolvendo amostras reais.

A **Figura 72 (A)** apresenta as curvas analíticas obtidas a partir de injeções de soluções padrão contendo concentrações crescentes de SCP, no intervalo entre 10 e 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Na **Figura 72 (B)** o Li^+ , com concentração fixada em 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$ foi utilizado para normalizar as áreas dos picos obtidos para a SCP.

Figura 72. (A) Curva de calibração obtida para injeções ($n = 3$) de soluções padrão com concentrações crescentes de SCP entre 10 e 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$. (B) Curva de calibração obtida após a divisão da área do pico da SCP pelo pico do padrão interno (Li^+ , 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$).



Fonte: O autor.

As equações das curvas de calibração resultantes sem e com o uso do PI são mostradas nas **Equações (18)** e **(19)**, respectivamente.

$$\text{Área} = 0,204[\text{SCP}](\mu\text{molL}^{-1}) - 0,551 \quad \text{Equação (18)}$$

$$\text{Área} = 0,0285[\text{SCP}](\mu\text{molL}^{-1}) - 0,079 \quad \text{Equação (19)}$$

Os parâmetros analíticos do método desenvolvido são exibidos na **Tabela 16**.

Tabela 16. Parâmetros analíticos do método CE-C⁴D proposto para detecção de SCP em urina.

Parâmetro analítico	SCP
Faixa linear ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	10 – 200
r	0,998
Tempo de migração (s)	21,8 \pm 0,1
Repetibilidade intra-dia (DPR%, n = 10)	5,4
Repetibilidade inter-dias (DPR%, n = 3)	8,6
LOD ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	2,3
LOQ ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	10,0
Resolução (n = 10)	2,0 \pm 0,1*
	4,4 \pm 0,2 [#]

*Calculada entre o pico da SCP e o pico do EOF. [#] Calculada entre o pico do Li⁺ e o pico da SCP. **Fonte:** O autor.

O método CE-C⁴D desenvolvido foi aplicado à quantificação de SCP em diferentes amostras de urina, com diluição de 10 e 30% (v/v) como mostrado na **Tabela 17**.

Tabela 17. Resultados obtidos na determinação (n = 3) de SCP em urina por CE-C⁴D sem o uso de PI.

Amostra	SCP adicionada* ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	SCP encontrada* ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	Recuperada (%)
Amostra A	250,0	295 \pm 9	118 \pm 4
Amostra B	250,0	274 \pm 7	109 \pm 3
Amostra C	250,0	297 \pm 8	119 \pm 3
Amostra D	250,0	257 \pm 5	103 \pm 2
Amostra E	150,0	171 \pm 3	117 \pm 2
Amostra E [#]	150,0	163 \pm 7	108 \pm 4

*Valores para quantidade de SCP utilizada para fortificar a urina antes da diluição de 10% (v/v). [#] Diluição de 30% (v/v). **Fonte:** O autor.

Os valores de concentração exibidos na **Tabela 17** são aqueles calculados levando em consideração as porcentagens de diluição das amostras. Os valores de recuperação calculados para SCP nas amostras A e C ficam muito próximos do limite máximo tolerado estipulado pelo INMETRO (120%), excedendo-o quando os valores de desvio são considerados. Desse modo, os cálculos de recuperação foram refeitos levando em conta o pico do Li como PI. Os valores de concentração calculados levando em consideração essa correção são mostrados na **Tabela 18**.

Tabela 18. Resultados obtidos para a determinação ($n = 3$) de SCP em urina por CE-C⁴D, com o uso do PI.

Amostra	SCP adicionada* ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	SCP encontrada* ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	Recuperada (%)
Amostra A	250,0	213 ± 7	85 ± 3
Amostra B	250,0	224 ± 8	89 ± 3
Amostra C	250,0	244 ± 4	97 ± 4
Amostra D	250,0	247 ± 4	99 ± 2
Amostra E	150,0	168 ± 3	112 ± 1
Amostra E [#]	150,0	155 ± 7	103 ± 1

Valores para quantidade de SCP utilizada para fortificar a urina antes da diluição de 10% (v/v). # Diluição de 30% (v/v). **Fonte:** O autor.

Comparando os resultados exibidos nas **Tabelas 17** (sem PI) e **18** (com PI), é possível perceber que os valores de recuperação para as amostras A, C e E (com PI) são mais próximos de 100 % do que aqueles demonstrados na **Tabela 17** (sem PI). Estes valores estão dentro dos limites recomendados pelo INMETRO. Os resultados obtidos para a SCP presente nas amostras de urina com e sem a utilização do PI foram comparados utilizando o teste t pareado (t crítico = 2,57, para 5 graus de liberdade). O valor de t calculado foi 2,62, de modo que os valores de SCP encontrados não são estatisticamente similares, com intervalo de confiança de 95%.

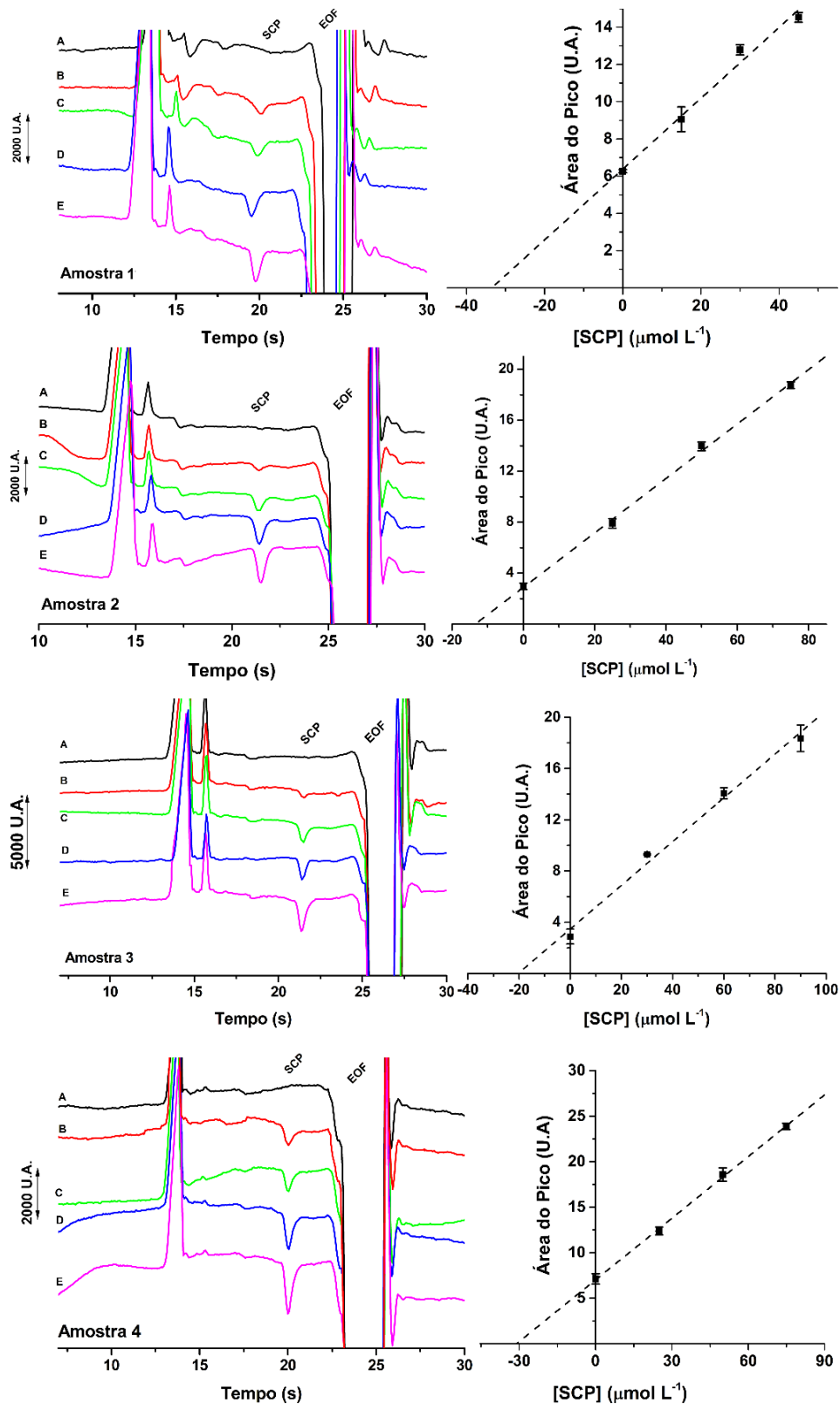
Dessa forma, o método desenvolvido apresenta a exatidão necessária para a quantificação de SCP nas amostras de urina, empregando o PI, sem a necessidade de preparo das amostras, além da dissolução em água.

Adicionalmente, a quantificação da SCP em diferentes amostras de urina também foi realizada empregando o método de adição de padrão, sem o PI.

8.2.7 Quantificação de SCP nas amostras de urina usando o método da adição de padrão

Para a realização dos testes de adição de padrão, 4 amostras de urina real, diferentes daquelas previamente analisadas, foram fortificadas com diferentes concentrações de SCP. Afim de testar a exatidão e aplicabilidade do método em questão, uma das amostras foi analisada empregando diluição de 30% (v/v) enquanto as demais foram analisadas após diluição a 10% (v/v). Os eletroferogramas obtidos nesse estudo são mostrados na **Figura 73**, com suas respectivas curvas de calibração por adição de padrão.

Figura 73. Eletroferogramas obtidos para injeções ($n = 3$) de soluções contendo 30% (v/v) urina (Amostra 1) e 10% (v/v) para as demais amostras de urina real: (A) branco; (B) amostra fortificada; (C - E) adições de alíquotas de solução padrão de SCP 1 mmol L^{-1} e as respectivas curvas de calibração por adição de padrão. Condições experimentais: Similares à Figura 63.



Fonte: O autor.

Conforme descrito na seção 7.3.9, as amostras de urina real analisadas pelo método de adição de padrão foram fortificadas com concentrações de SCP variando entre 100 e 300 $\mu\text{mol L}^{-1}$, e diluídas a 10% (v/v) no caso das amostras 2, 3 e 4 e 30% (v/v), para amostra 1. Os resultados calculados a partir das curvas de adição de padrão são mostrados na **Tabela 19**.

Tabela 19. Resultados obtidos para a determinação ($n = 3$) de SCP em urina por CE- C^4D , usando o método de adição de padrão.

Amostra	SCP adicionada ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	SCP encontrada ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	Recuperada (%)
Amostra 1	100,0	112 ± 5	112 ± 5
Amostra 2	150,0	135 ± 4	90 ± 3
Amostra 3	200,0	204 ± 3	102 ± 2
Amostra 4	300,0	311 ± 5	103 ± 2

Fonte: O autor.

Os valores de recuperação mostrados na **Tabela 19** atestam a exatidão do método proposto para a quantificação de SCP em urina real, mesmo quando a proporção de urina na solução injetada é de 30% (v/v), de modo que, de acordo com as recomendações do INMETRO (2018) recuperações entre 80 e 120% são aceitáveis na faixa de concentração trabalhada. Vale salientar ainda que, apesar da complexidade das amostras em questão, o método proposto foi aplicado sem a realização de etapas prévias de preparo de amostra além da diluição em água.

9 CONCLUSÕES PARCIAIS

As análises qualitativas mostraram-se possíveis mesmo nas etapas iniciais da rotina experimental do trabalho, com o pico de SCP apresentando tempo de migração de 23 s. Após a otimização de todos os parâmetros experimentais, a quantificação de SCP foi realizada para todas as amostras testadas, com valores de recuperação entre 93 e 103%. O método CE-C4D desenvolvido apresentou-se ainda, notavelmente robusto, mesmo quando amostras de vodka e energético foram injetadas sem diluição em água.

A possibilidade de quantificação de rápida SCP ($t_m = 22$ s) em amostras de urinas utilizando CE-C⁴D foi mostrada pela primeira vez neste trabalho empregando o BGE composto por HIS/DMX/NaOH. O uso do Li⁺ como padrão interno possibilitou melhora na exatidão do método, de modo que os resultados de quantificação utilizando a curva de calibração externa apresentaram valores de recuperação entre 85 e 112%. Adicionalmente, o método de adição de padrão também foi testado, com valores de recuperação entre 90 e 112%.

10 CONCLUSÕES GERAIS

Os métodos analíticos desenvolvidos nessa tese tiveram como objetivo a detecção e quantificação de SCP utilizada como droga incapacitante no “Boa Noite, Cinderela”, em amostras de bebida e urina.

Na primeira parte dessa tese foram utilizados métodos voltamétricos, utilizando BDD como eletrodo de trabalho, a fim de determinar o comportamento eletroquímico do composto em questão, bem como obter as condições otimizadas para a realização das análises do fármaco nas amostras de bebidas. O BDD utilizado apresentou amplo intervalo de potencial de trabalho, permitindo a varredura das amostras em potenciais elevados, possibilitando a oxidação da SCP sem a necessidade de modificação e/ou limpeza superficial do eletrodo. As análises foram realizadas com mínima manipulação das amostras (mediante a simples dissolução em eletrólito de suporte). A quantificação da SCP adicionada às amostras foi satisfatória para todas as bebidas estudadas, excetuando-se apenas as amostras de cerveja, que apresentaram valores de recuperação inferiores a 80%.

Uma vez que a ingestão de quantidades elevadas de SCP ocasionaria eliminação de até 30% do composto sem biotransformação, o método voltamétrico proposto também foi aplicado para a avaliação da presença do fármaco em questão na urina. Em função da elevada complexidade das amostras, a quantificação de SCP nessas amostras apresentou valores de recuperação consideravelmente abaixo do esperado (~50%). A avaliação qualitativa das amostras foi possível mediante a diluição de 10% (v/v) das amostras em eletrólito de suporte, sem a necessidade de etapas prévias de extração/pré-concentração.

A segunda parte dessa tese tratou do desenvolvimento de métodos empregando eletroforese capilar com detecção condutométrica sem contato acoplada capacitivamente (CE-C⁴D) para a determinação de SCP em amostras de bebidas e posteriormente, em amostras de urina. O método desenvolvido mostrou-se eficaz para a avaliação qualitativa fármaco em todas as amostras de bebidas estudadas (alcoólicas e não alcoólicas) com composição complexa. Ademais, o método apresentou boa repetibilidade, não apenas para soluções padrão, como também para soluções contendo amostras com elevado teor alcoólico (vodka, 38% álcool) e com grande quantidade de corantes/acidulantes orgânicos (energético), que porventura poderiam interferir na detecção da SCP nessas amostras. A quantificação de SCP em todas as amostras avaliadas foi realizada utilizando curva de calibração externa, com valores de

recuperação variando entre (93 ± 3) e $(103 \pm 3)\%$. Novamente, todas as bebidas foram analisadas com mínima manipulação da amostra, sendo necessária apenas a diluição em água para a análise no sistema CE-C⁴D. Além disso, o método desenvolvido mostrou-se robusto o suficiente para a detecção de SCP em amostras de vodka, e da mistura de vodka + energético, sem diluição.

Posteriormente, um método CE-C⁴D inédito foi desenvolvido para análise de SCP presente em urina. Ao BGE empregado para a determinação de SCP nas amostras de bebidas adicionou-se DMX, a fim de evitar a eletrodispersão da SCP nas amostras de urina. Nas condições experimentais otimizadas, o método CE-C⁴D mostrou-se robusto para a detecção qualitativa de SCP em amostras de urina em concentrações de até 50% (v/v), ainda que para isso, fosse utilizado o eletroferograma registrado pelo segundo detector (40 cm de comprimento efetivo). O método apresentou boa repetibilidade para o sinal do pico registrado para SCP não apenas em soluções padrão, como em soluções contendo até 30% (v/v) de amostra. Por fim, a quantificação de SCP nas amostras de urina mostrou-se possível, não apenas pelo método de adição de padrão, mas também empregando curva de calibração externa, com diferentes diluições da amostra, mediante a utilização do Li⁺ como padrão interno.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 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**, v. 198, n. 1–3, p. 39–45, 20 maio 2010. <<http://doi.org/10.1016/j.forsciint.2010.02.012>>
- AFKHAMI, A.; SHIRZADMEHR, A.; MADRAKIAN, T. Improvement in performance of a hyoscine butylbromide potentiometric sensor using a new nanocomposite carbon paste: a comparison study with polymeric membrane sensor. **Ionics**, v. 20, n. 8, p. 1145–1154, 4 ago. 2014. <<http://doi.org/10.1007/s11581-014-1078-3>>
- ALEHASHEM, S.; CHAMBERS, F.; STROJEK, J. W.; SWAIN, G. M.; RAMESHAM, R. Cyclic Voltammetric Studies of Charge Transfer Reactions at Highly Boron-Doped Polycrystalline Diamond Thin-Film Electrodes. **Analytical Chemistry**, v. 67, n. 17, p. 2812–2821, set. 1995. <<http://doi.org/10.1021/ac00113a014>>
- 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**, v. 47, p. 46–54, abr. 2017. <<http://doi.org/10.1016/j.jflm.2017.02.005>>
- ANGUS, J. C.; PLESKOV, Y. V.; EATON, S. C. Chapter 3 Electrochemistry of diamond. In: NEBEL, C. E.; RISTEIN, J. (Eds.). **Semiconductors and Semimetals**. Elsevier, 2004. p. 97–119. <[https://doi.org/10.1016/S0080-8784\(04\)80015-2](https://doi.org/10.1016/S0080-8784(04)80015-2)>
- ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução da Diretoria Colegiada - RDC Nº 166, 24/07/2017, sobre a validação de métodos analíticos e outras providências. **Diário Oficial da União**, v. 141, p. 87, 2017.
- BACHMANN, S.; HUCK, C. W.; BAKRY, R.; BONN, G. K. Analysis of flavonoids by CE using capacitively coupled contactless conductivity detection. **ELECTROPHORESIS**, v. 28, n. 5, p. 799–805, mar. 2007. <<http://doi.org/10.1002/elps.200600228>>
- BALDAN, M. R.; AZEVEDO, A. F.; COUTO, A. B.; FERREIRA, N. G. Cathodic and anodic pre-treated boron doped diamond with different sp² content: Morphological, structural, and impedance spectroscopy characterizations. **Journal of Physics and Chemistry of Solids**, v. 74, n. 12, p. 1830–1835, 2013. <<http://doi.org/10.1016/j.jpcs.2013.07.015>>
- BALÍKOVÁ, M. Collective poisoning with hallucinogenous herbal tea. **Forensic Science International**, v. 128, n. 1–2, p. 50–52, 14 ago. 2002. <[http://doi.org/10.1016/S0379-0738\(02\)00162-7](http://doi.org/10.1016/S0379-0738(02)00162-7)>

BALUCHOVÁ, S.; DAÑHEL, A.; DEJMKOVÁ, H.; OSTATNÁ, V.; FOJTA, M.; SCHWARZOVÁ-PECKOVÁ, K. Recent progress in the applications of boron doped diamond electrodes in electroanalysis of organic compounds and biomolecules – A review. **Analytica Chimica Acta**, v. 1077, p. 30–66, 2019. <<http://doi.org/10.1016/j.aca.2019.05.041>>

BARBOSA, R. M.; ROSÁRIO, L. M.; BRETT, C. M. A.; BRETT, A. M. O. Electrochemical studies of zinc in zinc–insulin solution. **The Analyst**, v. 121, n. 12, p. 1789–1793, 1996. <<http://doi.org/10.1039/AN9962101789>>

BARD, A. J.; STRATMANN, M.; GILEADI, E.; URBACH, M.; CALVO, E. J.; UNWIN, P. R.; FRANKEL, G. S.; MACDONALD, D.; LICHT, S.; SCHÄFER, H. J. **Encyclopedia of Electrochemistry, Volume 3, Instrumentation and Electroanalytical Chemistry**. Wiley New York, 2003.

BARD, A. J. Inner-sphere heterogeneous electrode reactions. Electrocatalysis and photocatalysis: The challenge. **Journal of the American Chemical Society**, v. 132, n. 22, p. 7559–7567, 2010. <<http://doi.org/10.1021/ja101578m>>

BARD, A. J.; FAULKNER, L. R. **Electrochemical Methods**. 2. ed. New York: Wiley, 2001.

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

BAYNE, W. F.; TAO, F. T.; CRISOLOGO, N. Submicrogram Assay for Scopolamine in Plasma and Urine. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 64, n. 2, p. 288–291, fev. 1975. <<http://doi.org/10.1002/jps.2600640220>>

BECHTEL, L. K.; HOLSTEGE, C. P. Criminal Poisoning: Drug-Facilitated Sexual Assault. **Emergency Medicine Clinics of North America**, v. 25, n. 2, p. 499–525, maio 2007. <<http://doi.org/10.1016/j.emc.2007.02.008>>

BERTOL, E.; DI MILIA, M. G.; FIORAVANTI, A.; MARI, F.; PALUMBO, D.; PASCALI, J. P.; VAIANO, F. Proactive drugs in DFSA cases: Toxicological findings in an eight-years study. **Forensic Science International**, v. 291, p. 207–215, out. 2018. <<http://doi.org/10.1016/j.forsciint.2018.08.032>>

BEYER, J.; DRUMMER, O. H.; MAURER, H. H. Analysis of toxic alkaloids in body samples. **Forensic Science International**, v. 185, n. 1–3, p. 1–9, mar. 2009. <<http://doi.org/10.1016/j.forsciint.2008.12.006>>

BOSMAN, I. J.; DOUMA, W. R.; ENSING, K.; DE ZEEUW, R. A. A semi-automated solid-phase extraction and radioreceptor assay for the analysis of scopolamine in urine and plasma. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 5, n. 6, p. 315–325, nov. 1997. <[http://doi.org/10.1016/S0928-0987\(97\)00058-4](http://doi.org/10.1016/S0928-0987(97)00058-4)>

BOSMAN, I. J.; VERSCHRAAGEN, M.; LUSTHOF, K. J. Toxicological Findings in Cases of Sexual Assault in the Netherlands*. **Journal of Forensic Sciences**, v. 56, n. 6, p. 1562–1568, 1 nov. 2011. <<http://doi.org/10.1111/j.1556-4029.2011.01888.x>>

BOUVRETTE, P.; HRAPOVIC, S.; MALE, K. B.; LUONG, J. H. T. Analysis of the 16 Environmental Protection Agency priority polycyclic aromatic hydrocarbons by high performance liquid chromatography-oxidized diamond film electrodes. **Journal of Chromatography A**, v. 1103, n. 2, p. 248–256, jan. 2006. <<http://doi.org/10.1016/j.chroma.2005.11.028>>

BRADY, J. E.; HUMISTON, G. E. **Química Geral**. 2. ed. Rio de Janeiro: LTC, 2012.

BRETT, C. M. .; FUNGARO, D. A.; MORGADO, J. M.; GIL, M. H. Novel polymer-modified electrodes for batch injection sensors and application to environmental analysis. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 468, n. 1, p. 26–33, jun. 1999. <[http://doi.org/10.1016/S0022-0728\(99\)00061-3](http://doi.org/10.1016/S0022-0728(99)00061-3)>

BRETT, C. M. A.; BRETT, A. M. O.; TUGULEA, L. Anodic stripping voltammetry of trace metals by batch injection analysis. **Analytica Chimica Acta**, v. 322, n. 3, p. 151–157, abr. 1996a. <[http://doi.org/10.1016/0003-2670\(95\)00588-9](http://doi.org/10.1016/0003-2670(95)00588-9)>

BRETT, C. M. A.; BRETT, A. M. O.; TUGULEA, L. Batch injection analysis with adsorptive stripping voltammetry for the determination of traces of nickel and cobalt. **Electroanalysis**, v. 8, n. 7, p. 639–642, jul. 1996b. <<http://doi.org/10.1002/elan.1140080707>>

BRETT, C. M. A.; OLIVEIRA BRETT, A. M.; MITOSERIU, L. C. Amperometric and Voltammetric Detection in Batch Injection Analysis. **Analytical Chemistry**, v. 66, n. 19, p. 3145–3150, out. 1994. <<http://doi.org/10.1021/ac00091a024>>

BRILLAS, E.; MARTÍNEZ-HUITLE, C. A. **Synthetic Diamond Films: Preparation, Electrochemistry, Characterization, and Applications**. First Edit ed. Hoboken, NJ, EUA: John Wiley & Sons, Inc., 2011. <<https://doi.org/10.1002/9781118062364>>

BRITO-NETO, J. G. A.; FRACASSI DA SILVA, J. A.; BLANES, L.; DO LAGO, C. L. Understanding Capacitively Coupled Contactless Conductivity Detection in Capillary and Microchip Electrophoresis. Part 1. Fundamentals. **Electroanalysis**, v. 17, n. 13, p. 1198–1206, 1 jul. 2005. <<http://doi.org/10.1002/elan.200503237>>

BRITTON, H. T. S.; ROBINSON, R. A. CXCVIII.—Universal buffer solutions and the dissociation constant of veronal. **Journal of the Chemical Society**, n. 0, p. 1456–1462, 1931. <<http://doi.org/10.1039/JR9310001456>>

BROOKS, T.; KEEVIL, C. W. W. A simple artificial urine for the growth of urinary pathogens. **Letters in Applied Microbiology**, v. 24, n. 3, p. 203–206, mar. 1997. <<http://doi.org/10.1046/j.1472-765X.1997.00378.x>>

CABALLERO, C. G.; JORGE, Ó. Q.; LANDEIRA, A. C. Alleged drug-facilitated sexual assault in a Spanish population sample. **Forensic Chemistry**, v. 4, p. 61–66, jun. 2017. <<http://doi.org/10.1016/j.forc.2017.02.009>>

CALIGIANI, A.; PALLA, G.; BONZANINI, F.; BIANCHI, A.; BRUNI, R. A validated GC-MS method for the detection of tropane alkaloids in buckwheat (*Fagopyron esculentum* L.) fruits, flours and commercial foods. **Food Chemistry**, v. 127, n. 1, p. 204–209, 2011. <<http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.11.141>>

CHEN, H.; CHEN, Y.; WANG, H.; DU, P.; HAN, F.; ZHANG, H. Analysis of scopolamine and its eighteen metabolites in rat urine by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Talanta**, v. 67, n. 5, p. 984–991, 31 out. 2005. <<http://doi.org/10.1016/j.talanta.2005.04.026>>

CHERKAoui, S.; MATEUS, L.; CHRISTEN, P.; VEUTHEY, J.-L. Development and validation of a capillary zone electrophoresis method for the determination of atropine, homatropine and scopolamine in ophthalmic solutions. **Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications**, v. 696, n. 2, p. 283–290, ago. 1997. <[http://doi.org/10.1016/S0378-4347\(97\)00255-7](http://doi.org/10.1016/S0378-4347(97)00255-7)>

CHINVONGAMORN, C.; PINWATTANA, K.; PRAPHAIRAKSIT, N.; IMATO, T.; CHAILAPAKUL, O. Amperometric determination of sulfite by gas diffusion-sequential injection with boron-doped diamond electrode. **Sensors**, v. 8, n. 3, p. 1846–1857, 17 mar. 2008. <<http://doi.org/10.3390/s8031846>>

COMPTON, R. G.; FOORD, J. S.; MARKEN, F. Electroanalysis at diamond-like and doped-diamond electrodes. **Electroanalysis**, v. 15, n. 17, p. 1349–1363, 2003. <<http://doi.org/10.1002/elan.200302830>>

CORALLO, C. E.; WHITFIELD, A.; WU, A. Anticholinergic syndrome following an unintentional overdose of scopolamine. **Therapeutics and clinical risk management**, v. 5, n. 5, p. 719–23, out. 2009. <<https://doi.org/10.2147/TCRM.S6732>>

CUNHA, R. R. **Desenvolvimento de métodos simples rápidos para determinação de paracetamol e outros fármacos em formulações farmacêuticas por eletroforese capilar com detecção condutométrica sem contato (CE-C⁴D)**. 2017. 192 f. Tese (Doutorado em Química) – Instituto de Química, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2017.

DA SILVA, W. P. **Determinação simultânea de propifenazona, paracetamol e cafeína utilizando eletrodo de diamante dopado com boro**. 2017. 96 f. Dissertação (Mestrado em Química) - Instituto de Química, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2017.

DE CASTRO COSTA, B. M.; MARRA, M. C.; DA COSTA OLIVEIRA, T.; MUNOZ, R. A. A.; BATISTA, A. D.; DO LAGO, C. L.; RICHTER, E. M. Ultrafast capillary electrophoresis method for the simultaneous determination of ammonium and diphenhydramine in pharmaceutical samples. **Journal of Separation Science**, v. 41, n. 14, p. 2969–2975, jul. 2018. <<http://doi.org/10.1002/jssc.201800273>>

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

DEFRATES, L. J.; HOEHNS, J. D.; SAKORNBUT, E. L.; GLASCOCK, D. G.; TEW, A. R. Antimuscarinic Intoxication Resulting from the Ingestion of Moonflower Seeds. **Annals of Pharmacotherapy**, v. 39, n. 1, p. 173–176, jan. 2005. <<http://doi.org/10.1345/aph.1D536>>

DESHMANE, S. L.; MUKERJEE, R.; FAN, S.; SAWAYA, B. E. High-performance capillary electrophoresis for determining HIV-1 Tat protein in neurons. **PLoS ONE**, v. 6, n. 1, p. 2–7, 2011. <<http://doi.org/10.1371/journal.pone.0016148>>

DEVORE, H. K.; SACHS, C. J. Sexual Assault. **Emergency Medicine Clinics of North America**, v. 29, n. 3, p. 605–620, ago. 2011. <<http://doi.org/10.1016/j.emc.2011.04.012>>

DODICH, C.; SIEDLARZ, M. Date rape drugs. **International Journal of Child and Adolescent Health**, v. 7, n. 4, p. 355–368, 2014.

DOQ-CGCRE-008, INMETRO. Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia. **Orientações sobre validação de métodos analíticos**. Rio de Janeiro. Brasil (2018), Revisão 7.

EBERT, U.; SIEPMANN, M.; OERTEL, R.; WESNES, K. A.; KIRCH, W. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of scopolamine after subcutaneous administration. **The Journal of Clinical Pharmacology**, v. 38, n. 8, p. 720–726, 1998. <<https://doi.org/10.1002/j.1552-4604.1998.tb04812.x>>

EINAGA, Y. Diamond electrodes for electrochemical analysis. **Journal of Applied Electrochemistry**, v. 40, n. 10, p. 1807–1816, 30 out. 2010. <<http://doi.org/10.1007/s10800-010-0112-z>>

ELBASHIR, A. A.; SCHMITZ, O. J.; ABOUL-ENEIN, H. Y. Application of capillary electrophoresis with capacitively coupled contactless conductivity detection (CE-C4D): An update. **Biomedical Chromatography**, v. 31, n. 9, 2017. <<http://doi.org/10.1002/bmc.3945>>

ERK, N.; ONUR, F. Spectrophotometric Simultaneous Determination of Analgin and Hyoscine N-Butyl Bromide in Sugar-Coated Tablets. **Analytical Letters**, v. 29, n. 3, p. 369–380, fev. 1996. <<http://doi.org/10.1080/00032719608000404>>

FARHADI, K.; KARIMPOUR, A. Electrochemical Behavior and Determination of Hyoscine-N-Butylbromide from Pharmaceutical Preparations. **Journal of the Chinese Chemical Society**, v. 54, n. 1, p. 165–172, fev. 2007. <<http://doi.org/10.1002/jccs.200700026>>

FERREIRA, S. E.; MELLO, M. T. DE; FORMIGONI, M. L. O. DE S. O efeito das bebidas alcoólicas pode ser afetado pela combinação com bebidas energéticas? Um estudo com usuários. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 50, n. 1, p. 48–51, 2005. <<http://doi.org/10.1590/s0104-42302004000100034>>

FRACASSI DA SILVA, J. A.; DO LAGO, C. L. An Oscillometric Detector for Capillary Electrophoresis. **Analytical Chemistry**, v. 70, n. 20, p. 4339–4343, 1 out. 1998. <<http://doi.org/10.1021/ac980185g>>

FRANCISCO, K. J. M.; DO LAGO, C. L. A compact and high-resolution version of a capacitively coupled contactless conductivity detector. **ELECTROPHORESIS**, v. 30, n. 19, p. 3458–3464, out. 2009. <<http://doi.org/10.1002/elps.200900080>>

FREITAS, C. B.; MOREIRA, R. C.; DE OLIVEIRA TAVARES, M. G.; COLTRO, W. K. T. Monitoring of nitrite, nitrate, chloride and sulfate in environmental samples using electrophoresis microchips coupled with contactless conductivity detection. **Talanta**, v. 147, p. 335–341, jan. 2016. <<http://doi.org/10.1016/j.talanta.2015.09.075>>

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**, v. 243, p. 557–565, maio 2017. <<http://doi.org/10.1016/j.snb.2016.12.024>>

FREITAS, J. M.; OLIVEIRA, T. DA C.; MUNOZ, R. A. A.; RICHTER, E. M. Boron Doped Diamond Electrodes in Flow-Based Systems. **Frontiers in Chemistry**, v. 7, n. April, 3 abr. 2019. <<http://doi.org/10.3389/fchem.2019.00190>>

GAENSSLEN, R. E.; LEDRAY, L.; JUHASCIK, M. P.; LINDNER, A.; NEGRUSZ, A.; HANER, B.; GREENE, P.; FAUGNO, D. An Estimate of the Proportion of Drug-Facilitation of Sexual Assault in Four U.S. Localities*. **Journal of Forensic Sciences**, v. 52, n. 6, p. 1396–1400, 2010. <<http://doi.org/10.1111/j.1556-4029.2007.00583.x>>

GIMENES, D. T.; PEREIRA, P. F.; CUNHA, R. R.; BEZERRA DA 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**, v. 24, n. 9, p. 1805–1810, set. 2012. <<http://doi.org/10.1002/elan.201200254>>

GIRARD, H.; SIMON, N.; BALLUTAUD, D.; HERLEM, M.; ETCHEBERRY, A. Effect of anodic and cathodic treatments on the charge transfer of boron doped diamond electrodes. **Diamond and Related Materials**, v. 16, n. 2, p. 316–325, 2007a. <<http://doi.org/10.1016/j.diamond.2006.06.009>>

GIRARD, H. A.; SIMON, N.; BALLUTAUD, D.; DE LA ROCHEFOUCAULD, E.; ETCHEBERRY, A. Effects of controlled anodic treatments on electrochemical behaviour of boron doped diamond. **Diamond and Related Materials**, v. 16, n. 4- 7 SPEC. ISS., p. 888–891, 2007b. <<http://doi.org/10.1016/j.diamond.2006.12.002>>

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**, v. 9, n. 3–6, p. 390–396, abr. 2000. <[http://doi.org/10.1016/S0925-9635\(99\)00267-8](http://doi.org/10.1016/S0925-9635(99)00267-8)>

GOSSER, D. K. **Cyclic Voltammetry; Simulation and Analysis of Reaction Mechanisms**. 1. ed. New York: VCH Publishers, Inc., 1994.

GOUDA, A. A.; SHAFÉY, Z. EL; HOSSNY, N.; EL-AZZAZY, R. Spectrophotometric determination of hyoscyne butylbromide and famciclovir in pure form and in pharmaceutical formulations. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 70, n. 4, p. 785–792, 1 set. 2008. <<http://doi.org/10.1016/j.saa.2007.09.010>>

GRANGER, M. C.; XU, J.; STROJEK, J. W.; SWAIN, G. M. Polycrystalline diamond electrodes: basic properties and applications as amperometric detectors in flow injection analysis and liquid chromatography. **Analytica Chimica Acta**, v. 397, n. 1–3, p. 145–161, out. 1999. <[http://doi.org/10.1016/S0003-2670\(99\)00400-6](http://doi.org/10.1016/S0003-2670(99)00400-6)>

GRANGER, M. C.; SWAIN, G. M. The Influence of Surface Interactions on the Reversibility of Ferri/Ferrocyanide at Boron-Doped Diamond Thin-Film Electrodes. **Journal of The Electrochemical Society**, v. 146, n. 12, p. 4551–4558, dez. 1999. <<http://doi.org/10.1149/1.1392673>>

GRELA, A.; GAUTAM, L.; COLE, M. D. A multifactorial critical appraisal of substances found in drug facilitated sexual assault cases. **Forensic Science International**, v. 292, p. 50–60, 2018. <<http://doi.org/10.1016/j.forsciint.2018.08.034>>

GRYNKIEWICZ, G.; GADZIKOWSKA, M. Tropane alkaloids as medicinally useful natural products and their synthetic derivatives as new drugs. **Pharmacological reports : PR**, v. 60, n. 4, p. 439–63, 2008.

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

HALL, J. A.; MOORE, C. B. T. Drug facilitated sexual assault – A review. **Journal of Forensic and Legal Medicine**, v. 15, n. 5, p. 291–297, jul. 2008. <<http://doi.org/10.1016/j.jflm.2007.12.005>>

HARPER-LEATHERMAN, A. S.; MIECZNIKOWSKI, J. R. O true apothecary: How forensic science helps solve a classic crime. **Journal of Chemical Education**, v. 89, n. 5, p. 629–635, 2012. <<http://doi.org/10.1021/ed200289t>>

HAYASHI, K.; YAMANAKA, S.; WATANABE, H.; SEKIGUCHI, T.; OKUSHI, H.; KAJIMURA, K. Investigation of the effect of hydrogen on electrical and optical properties in chemical vapor deposited on homoepitaxial diamond films. **Journal of Applied Physics**, v. 81, n. 2, p. 744–753, jan. 1997. <<http://doi.org/10.1063/1.364299>>

HE, Y.; LIN, H.; GUO, Z.; ZHANG, W.; LI, H.; HUANG, W. Recent developments and advances in boron-doped diamond electrodes for electrochemical oxidation of organic pollutants. **Separation and Purification Technology**, v. 212, p. 802–821, abr. 2019. <<http://doi.org/10.1016/j.seppur.2018.11.056>>

HJERTÉN, S. Free zone electrophoresis. **Chromatographic Reviews**, v. 9, n. 2, p. 122–219, dez. 1967. <[http://doi.org/10.1016/0009-5907\(67\)80003-6](http://doi.org/10.1016/0009-5907(67)80003-6)>

HOLT, K. B.; BARD, A. J.; SHOW, Y.; SWAIN, G. M. Scanning electrochemical microscopy and conductive probe atomic force microscopy studies of hydrogen-terminated boron-doped diamond electrodes with different doping levels. **Journal of Physical Chemistry B**, v. 108, n. 39, p. 15117–15127, 2004. <<http://doi.org/10.1021/jp048222x>>

HURLEY, M.; PARKER, H.; WELLS, D. L. The epidemiology of drug facilitated sexual assault. **Journal of Clinical Forensic Medicine**, v. 13, n. 4, p. 181–185, maio 2006. <<http://doi.org/10.1016/j.jcfm.2006.02.005>>

HUYNH, M. H. V.; MEYER, T. J. Proton-Coupled Electron Transfer. **Chemical Reviews**, v. 107, n. 11, p. 5004–5064, nov. 2007. <<http://doi.org/10.1021/cr0500030>>

KINTZ, P.; VILLAIN, M.; BARGUIL, Y.; CHARLOT, J.-Y.; CIRIMELE, V. Testing for atropine and scopolamine in hair by LC-MS-MS after Datura inoxia abuse. **Journal of analytical toxicology**, v. 30, n. 7, p. 454–7, 2006. <<https://doi.org/10.1093/jat/30.7.454>>

KONDO, T.; ITO, H.; KUSAKABE, K.; OHKAWA, K.; EINAGA, Y.; FUJISHIMA, A.; KAWAI, T. Plasma etching treatment for surface modification of boron-doped diamond electrodes. **Electrochimica Acta**, v. 52, n. 11, p. 3841–3848, 2007. <<http://doi.org/10.1016/j.electacta.2006.11.001>>

KRAFT, A. Doped Diamond: A Compact Review on a New, Versatile Electrode Material. **International Journal of Electrochemistry**, v. 2, p. 355–385, 1 set. 2007.

KROTOVA, M. D.; PLESKOV, Y. V.; VARNIN, V. P.; TEREMETSKAYA, I. G. The effect of CVD-diamond film thickness on the electrochemical properties of synthetic diamond thin-film electrodes. **Journal of Applied Electrochemistry**, v. 40, n. 10, p. 1839–1844, out. 2010. <<http://doi.org/10.1007/s10800-010-0111-0>>

KROTOVA, M. D.; PLESKOV, Y. V.; KHOMICH, A. A.; RALCHENKO, V. G.; SOVYK, D. N.; KAZAKOV, V. A. Semiconductor properties of nanocrystalline diamond electrodes. **Russian Journal of Electrochemistry**, v. 50, n. 2, p. 101–107, fev. 2014. <<http://doi.org/10.1134/S1023193514020013>>

KUBÁŇ, P.; HAUSER, P. C. Contactless conductivity detection in capillary electrophoresis: A review. **Electroanalysis**, v. 16, n. 24, p. 2009–2021, 2004. <<http://doi.org/10.1002/elan.200403125>>

KUBÁŇ, P.; HAUSER, P. C. Ten years of axial capacitively coupled contactless conductivity detection for CZE - a review. **ELECTROPHORESIS**, v. 30, n. 1, p. 176–188, 1 jan. 2009. <<http://doi.org/10.1002/elps.200800478>>

KUBÁŇ, P.; HAUSER, P. C. Contactless conductivity detection for analytical techniques: Developments from 2010 to 2012. **ELECTROPHORESIS**, v. 34, n. 1, p. 55–69, jan. 2013. <<http://doi.org/10.1002/elps.201200358>>

KUBÁŇ, P.; HAUSER, P. C. Contactless conductivity detection for analytical techniques- Developments from 2012 to 2014. **ELECTROPHORESIS**, v. 36, n. 1, p. 195–211, jan. 2015. <<http://doi.org/10.1002/elps.201400336>>

KUBÁŇ, P.; HAUSER, P. C. Contactless conductivity detection for analytical techniques- Developments from 2014 to 2016. **ELECTROPHORESIS**, v. 38, n. 1, p. 95–114, jan. 2017. <<http://doi.org/10.1002/elps.201600280>>

KUBÁŇ, P.; HAUSER, P. C. 20Th Anniversary of Axial Capacitively Coupled Contactless Conductivity Detection in Capillary Electrophoresis. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, v. 102, p. 311–321, 2018. <<http://doi.org/10.1016/j.trac.2018.03.007>>

KUBÁŇ, P.; HAUSER, P. C. Contactless conductivity detection for analytical techniques: Developments from 2016 to 2018. **ELECTROPHORESIS**, v. 40, n. 1, p. 124–139, jan. 2019. <<http://doi.org/10.1002/elps.201800248>>

KUETE, V. Physical, Hematological, and Histopathological Signs of Toxicity Induced by African Medicinal Plants. In: KUETE, V. (Ed.). . **Toxicological Survey of African Medicinal Plants**. 1st Editio ed. London: Elsevier Inc., 2014. p. 635–657. <<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800018-2.00022-4>>

KULESZA, S.; PATYK, J.; ROZPŁOCH, F. Spontaneous decrease of high surface electrical conductivity in diamond exposed to atmospheric air. **Chemical Physics Letters**, v. 391, n. 1–3, p. 56–59, 2004. <<http://doi.org/10.1016/j.cplett.2004.04.075>>

LABORDA, E.; WANG, Y.; HENSTRIDGE, M. C.; MARTÍNEZ-ORTIZ, F.; MOLINA, A.; COMPTON, R. G. Quantitative weaknesses of the Marcus-Hush theory of electrode kinetics revealed by Reverse Scan Square Wave Voltammetry: The reduction of 2-methyl-2-nitropropane at mercury microelectrodes. **Chemical Physics Letters**, v. 512, n. 1–3, p. 133–137, ago. 2011. <<http://doi.org/10.1016/j.cplett.2011.07.008>>

LANDERS, J. P. **Handbook of Capillary and Microchip Electrophoresis and Associated Microtechniques**. 3. ed. Boca Raton: CRC Press, 2007.

LAUWERS, L. F.; DAELEMANS, R.; BAUTE, L.; VERBRAEKEN, H. Scopolamine intoxications. **Intensive Care Medicine**, v. 9, n. 5, p. 283–285, set. 1983. <<http://doi.org/10.1007/BF01691256>>

LUSTHOF, K. J.; BOSMAN, I. J.; KUBAT, B.; VINCENTEN-VAN MAANEN, M. J. Toxicological results in a fatal and two non-fatal cases of scopolamine-facilitated robberies. **Forensic Science International**, v. 274, p. 79–82, maio 2017. <<http://doi.org/10.1016/j.forsciint.2017.01.024>>

MACPHERSON, J. V. A practical guide to using boron doped diamond in electrochemical research. **Physical Chemistry Chemical Physics**, v. 17, n. 5, p. 2935–2949, 2015. <<http://doi.org/10.1039/C4CP04022H>>

MAIRINK, S. Z. **Síntese de novos alcalóides tropânicos utilizando reações de cicloadição [4+3]**. 2013. 154 f. Dissertação (Mestrado em Agroquímica orgânica) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2013.

MARNEROS, A.; GUTMANN, P.; UHLMANN, F. Self-amputation of penis and tongue after use of Angel's Trumpet. **European Archives of Psychiatry and Clinical Neuroscience**, v. 256, n. 7, p. 458–459, 16 out. 2006. <<http://doi.org/10.1007/s00406-006-0666-2>>

MARRA, M. C.; SILVA, P. L.; MUÑOZ, R. A. A.; RICHTER, E. M. Ultra-Fast Determination of Scopolamine, Orphenadrine, Mepyramine, Caffeine, Dipyrone, and Ascorbic Acid by Capillary Electrophoresis with Capacitively Coupled Contactless Conductivity Detection. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 25, n. 5, p. 913–919, 2014. <<http://doi.org/10.5935/0103-5053.20140061>>

MARRA, M. C.; DE CASTRO COSTA, B. M.; MUNOZ, R. A. A.; SANTANA, M. H. P.; MALDANER, A. O.; BOTELHO, É. D.; COLTRO, W. K. T.; RICHTER, E. M. Fast determination of cocaine and some common adulterants in seized cocaine samples by capillary electrophoresis with capacitively coupled contactless conductivity detection. **Analytical Methods**, v. 10, n. 24, p. 2875–2880, 2018. <<http://doi.org/10.1039/c8ay00795k>>

MARTINEZ, S. T.; ALMEIDA, M. R.; PINTO, A. C. Alucinógenos naturais: um voo da Europa Medieval ao Brasil. **Química Nova**, v. 32, n. 9, p. 2501–2507, 2009. <<http://doi.org/10.1590/S0100-40422009000900047>>

MCBRIERTY, D.; WILKINSON, A.; TORMEY, W. A review of drug-facilitated sexual assault evidence: An Irish perspective. **Journal of Forensic and Legal Medicine**, v. 20, n. 4, p. 189–197, maio 2013. <<http://doi.org/10.1016/j.jflm.2012.09.009>>

MÉNDEZ-TOVAR, M.; NAVA, J. L.; MARTÍNEZ-HUITLE, C. A.; GUERRA-SÁNCHEZ, R.; PERALTA-HERNÁNDEZ, J. M. A Brief Review on Environmental Application of Boron Doped Diamond Electrodes as a New Way for Electrochemical Incineration of Synthetic Dyes. **International Journal of Electrochemistry**, v. 2012, p. 1–18, 2011. <<http://doi.org/10.1155/2012/154316>>

MINTZER, M. Z.; KLEYKAMP, B. A.; GRIFFITHS, R. R. Dose effects of triazolam and scopolamine on metamemory. **Experimental and clinical psychopharmacology**, v. 18, n. 1, p. 17–31, fev. 2010. <<http://doi.org/10.1037/a0018061>>

MIRCESKI, V.; GULABOSKI, R.; LOVRIC, M.; BOGESKI, I.; KAPPL, R.; HOTH, M. Square-Wave Voltammetry: A Review on the Recent Progress. **Electroanalysis**, v. 25, n. 11, p. 2411–2422, nov. 2013. <<http://doi.org/10.1002/elan.201300369>>

MIRCESKI, V.; KOMORSKY-LOVRIC, S.; LOVRIC, M. **Square-Wave Voltammetry**. 1. ed. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2007.

NAMERA, A.; YASHIKI, M.; HIROSE, Y.; YAMAJI, S.; TANI, T.; KOJIMA, T. Quantitative analysis of tropane alkaloids in biological materials by gas chromatography-mass spectrometry. **Forensic science international**, v. 130, n. 1, p. 34–43, 5 nov. 2002.

NEBEL, C. E.; RISTEIN, J. **Thin-Film Diamond II: (part of the Semiconductors and Semimetals Series)**. 1st. ed. Oxford: Elsevier Ltd, 2004.

NEGRUSZ, A.; JUHASCIK, M.; GAENSSLEN, R. E. **Estimate of the incidence of drug-facilitated sexual assault in the U.S**. Estimate of the incidence of drug-facilitated sexual assault in the U.S. Chicago, IL, USA: [s.n.].

NELSON, L. S.; SHIH, R. D.; BALICK, M. J.; LAMPE, K. F. **Handbook of Poisonous and Injurious Plants**. 2. ed. Boston: Springer US, 2007.

NIKOLAOU, P.; PAPOUTSIS, I.; STEFANIDOU, M.; DONA, A.; MARAVELIAS, C.; SPILIOPOULOU, C.; ATHANASELIS, S. Accidental poisoning after ingestion of “aphrodisiac” berries: Diagnosis by analytical toxicology. **Journal of Emergency Medicine**, v. 42, n. 6, p. 662–665, 2012. <<http://doi.org/10.1016/j.jemermed.2011.03.023>>

NOGUÉ, S.; SANZ, P.; MUNNÉ, P.; DE LA TORRE, R. Acute scopolamine poisoning after sniffing adulterated cocaine. **Drug and Alcohol Dependence**, v. 27, n. 2, p. 115–116, mar. 1991. <[http://doi.org/10.1016/0376-8716\(91\)90028-W](http://doi.org/10.1016/0376-8716(91)90028-W)>

NOGUÉ, S.; PUJOL, L.; SANZ, P.; TORRE, R. DELA. Datura Stramonium Poisoning. Identification of Tropane Alkaloids in Urine by Gas Chromatography–Mass Spectrometry. **Journal of International Medical Research**, v. 23, n. 2, p. 132–137, 25 mar. 1995. <<http://doi.org/10.1177/030006059502300208>>

NUCHTAVORN, N.; RYVOLOVA, M.; BEK, F.; MACKA, M.; PHECHKRAJANG, C.; SUNTORNSUK, L. Potential of Capillary Electrophoresis (CE) and Chip-CE with Dual Detection (Capacitively-Coupled Contactless Conductivity Detection (C4D) and Fluorescence Detection) for Monitoring of Nicotine and Cotinine Derivatization. **Analytical Sciences**, v. 29, n. 3, p. 339–344, 2013. <<http://doi.org/10.2116/analsci.29.339>>

NUPE IQ-UFU. **BIASPE Cell - A Portable Electrochemical System for On-site Analysis. - YouTube**. . Acesso em: 31 jul. 2017.

O'DEA, J. J.; OSTERYOUNG, J. G. Characterization of quasi-reversible surface processes by square-wave voltammetry. **Analytical Chemistry**, v. 65, n. 21, p. 3090–3097, nov. 1993. <<http://doi.org/10.1021/ac00069a024>>

O'DEA, J. J.; OSTERYOUNG, J.; OSTERYOUNG, R. A. Theory of square wave voltammetry for kinetic systems. **Analytical Chemistry**, v. 53, n. 4, p. 695–701, abr. 1981. <<http://doi.org/10.1021/ac00227a028>>

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

OERTEL, R.; RICHTER, K.; EBERT, U.; KIRCH, W.; OERTEL. Determination of scopolamine in human serum by gas chromatography-ion trap tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications**, v. 682, n. 2, p. 259–264, 1996. <[https://doi.org/10.1016/0378-4347\(96\)00095-3](https://doi.org/10.1016/0378-4347(96)00095-3)>

OLDHAM, K. B.; MYLAND, J. C.; BOND, A. M. **Electrochemical Science and Technology**. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd, 2011.

OLIVEIRA, S. C. B.; OLIVEIRA-BRETT, A. M. Voltammetric and electrochemical impedance spectroscopy characterization of a cathodic and anodic pre-treated boron doped diamond electrode. **Electrochimica Acta**, v. 55, n. 15, p. 4599–4605, jun. 2010a. <<http://doi.org/10.1016/j.electacta.2010.03.016>>

OLIVEIRA, S. C. B.; OLIVEIRA-BRETT, A. M. Boron doped diamond electrode pre-treatments effect on the electrochemical oxidation of dsDNA, DNA bases, nucleotides, homopolynucleotides and biomarker 8-oxoguanine. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 648, n. 1, p. 60–66, set. 2010b.
<<http://doi.org/10.1016/j.jelechem.2010.06.020>>

OLIVEIRA, T. D. 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**, v. 152, p. 308–313, maio 2016.
<<http://doi.org/10.1016/j.talanta.2016.02.031>>

PAPADOYANNIS, I.; ZOTOU, A.; SAMANIDOU, V.; GEORGARAKIS, M. Solid-Phase Extraction and RP-HPLC Analysis of Atropine Sulphate and Scopolamine-N-Butylbromide in Pharmaceutical Preparations and Biological Fluids. **Instrumentation Science & Technology**, v. 22, n. 1, p. 83–103, fev. 1994. <<http://doi.org/10.1080/10739149408003023>>

PARISSI-POULOU, M.; PANDERI, I. Determination of hyoscine n-butyl-bromide, lidocaine hydrochloride, and paracetamol in injection forms using solid-phase extraction, high-performance liquid chromatography, and UV-VIS spectrophotometry. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**, v. 22, n. 7, p. 1055–1068, 6 jan. 1999.
<<http://doi.org/10.1081/JLC-100101717>>

PATEL, K.; HASHIMOTO, K.; FUJISHIMA, A. Photoelectrochemical investigations on boron-doped chemically vapour-deposited diamond electrodes. **Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry**, v. 65, n. 3, p. 419–429, 1992.
<[http://doi.org/10.1016/1010-6030\(92\)80023-O](http://doi.org/10.1016/1010-6030(92)80023-O)>

PAULO, P. P. Golpe “boa noite, Cinderela” em SP: maior parte das vítimas é homem e objetivo do crime é roubo | São Paulo | G1. **G1 SP**, 27 out. 2017.

PECKOVÁ, K.; MUSILOVÁ, J.; BAREK, J. Boron-Doped Diamond Film Electrodes—New Tool for Voltammetric Determination of Organic Substances. **Critical Reviews in Analytical Chemistry**, v. 39, n. 3, p. 148–172, 6 jul. 2009.
<<http://doi.org/10.1080/10408340903011812>>

PEDROTTI, J. J.; ANGNES, L.; GUTZ, I. G. R. Miniaturized reference electrodes with microporous polymer junctions. **Electroanalysis**, v. 8, n. 7, p. 673–675, 1996.
<<http://doi.org/10.1002/elan.1140080713>>

PINHEIRO, K. M. P.; MOREIRA, R. C.; REZENDE, K. C. A.; TALHAVINI, M.; LOGRADO, L. P. L.; BAIO, J. A. F.; LANZA, M. R. V.; COLTRO, W. K. T. Rapid separation of post-blast explosive residues on glass electrophoresis microchips. **ELECTROPHORESIS**, v. 40, n. 3, p. 462–468, fev. 2019. <<http://doi.org/10.1002/elps.201800245>>

PLESKOV, Y. V. Synthetic diamond, a new electrode material for electroanalysis. **Journal of Analytical Chemistry**, v. 55, n. 11, p. 1045–1050, nov. 2000. <<http://doi.org/10.1007/BF02757329>>

PLESKOV, Y. V.; KROTOVA, M. D.; ELKIN, V. V.; EKIMOV, E. A. Electrochemical Behaviour of Boron-doped Diamond Compacts - A New Electrode Material. **Electrochimica Acta**, v. 201, p. 268–273, 2016. <<http://doi.org/10.1016/j.electacta.2015.09.075>>

PLESKOV, Y. V. Electrochemistry of Diamond: A Review. **Russian Journal of Electrochemistry**, v. 38, n. 12, p. 1275–1291, 2002. <<http://doi.org/10.1023/A:1021651920042>>

PLESKOV, 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**, v. 228, n. 1–2, p. 19–27, ago. 1987. <[http://doi.org/10.1016/0022-0728\(87\)80093-1](http://doi.org/10.1016/0022-0728(87)80093-1)>

PLETCHER, D.; GREFF, R.; PEAT, R.; PETER, L. M.; ROBINSON, J. **Instrumental methods in electrochemistry**. Cambridge: Woodhead Publishing Limited, 2001.

PUTCHA, L.; CINTRÓN, N. M.; TSUI, J.; VANDERPLOEG, J. M.; KRAMER, W. G. Pharmacokinetics and Oral Bioavailability of Scopolamine in Normal Subjects. **Pharmaceutical Research**, v. 6, n. 6, p. 481–485, jun. 1989. <<http://doi.org/10.1023/A:1015916423156>>

QUINTINO, M. S. M.; ANGNES, L. Batch Injection Analysis: An Almost Unexplored Powerful Tool. **Electroanalysis**, v. 16, n. 7, p. 513–523, abr. 2004. <<http://doi.org/10.1002/elan.200302878>>

RAIKOS, N.; CHRISTOPOULOU, K.; THEODORIDIS, G.; TSOUKALI, H.; PSAROULIS, D. Determination of amphetamines in human urine by headspace solid-phase microextraction and gas chromatography. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 789, n. 1, p. 59–63, 2003. <[http://doi.org/10.1016/S1570-0232\(03\)00047-3](http://doi.org/10.1016/S1570-0232(03)00047-3)>

RALCHENKO, V. G.; PLESKOV, Y. V.; POLYAKOV, V. I.; KHOMICH, A. V.; EVSTEFEEVA, Y. E.; KROTOVA, M. D.; LOUBNIN, E. N.; VLASOV, I. I. Comparative measurements of acceptor concentration at the growth and nucleation side of microwave plasma CVD polycrystalline diamond films. **Diamond and Related Materials**, v. 12, n. 3–7, p. 531–537, mar. 2003. <[http://doi.org/10.1016/S0925-9635\(02\)00299-6](http://doi.org/10.1016/S0925-9635(02)00299-6)>

RAO, T. N.; FUJISHIMA, A. Recent advances in electrochemistry of diamond. **Diamond and Related Materials**, v. 9, n. 3, p. 384–389, 2000. <[http://doi.org/10.1016/S0925-9635\(99\)00234-4](http://doi.org/10.1016/S0925-9635(99)00234-4)>

RENNER, U. D.; OERTEL, R.; KIRCH, W. Pharmacokinetics and Pharmacodynamics in Clinical Use of Scopolamine. **Therapeutic Drug Monitoring**, v. 27, n. 5, p. 655–665, out. 2005. <<http://doi.org/10.1097/01.ftd.0000168293.48226.57>>

RIBANI, M.; BOTTOLI, C. B. G.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I.; MELO, L. F. C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, v. 27, p. 771–780, 2004. <<https://doi.org/10.1590/S0100-40422004000500017>>

RIBEIRO, M. M. A. C.; OLIVEIRA, T. C.; BATISTA, A. D.; MUÑOZ, R. A. A.; RICHTER, E. M. A sub-minute electrophoretic method for simultaneous determination of naphazoline and zinc. **Journal of Chromatography A**, v. 1472, p. 134–137, 11 nov. 2016. <<http://doi.org/10.1016/j.chroma.2016.10.031>>

RIBEIRO, M. M. A. C. **Desenvolvimento de métodos rápidos de análise de fármacos por eletroforese capilar com detecção condutométrica sem contato (CE-C⁴D)**. 2017. 119p. Dissertação (Mestrado em Química) - Instituto de Química, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2017.

SÁIZ, J.; MAI, T. D.; LÓPEZ, M. L.; BARTOLOMÉ, C.; HAUSER, P. C.; GARCÍA-RUIZ, C. Rapid determination of scopolamine in evidence of recreational and predatory use. **Science & Justice**, v. 53, n. 4, p. 409–414, dez. 2013. <<http://doi.org/10.1016/j.scijus.2013.08.001>>

SALAZAR-BANDA, G. R.; ANDRADE, L. S.; NASCENTE, P. A. P.; PIZANI, P. S.; ROCHA-FILHO, R. C.; AVACA, L. A. On the changing electrochemical behaviour of boron-doped diamond surfaces with time after cathodic pre-treatments. **Electrochimica Acta**, v. 51, n. 22, p. 4612–4619, 2006. <<http://doi.org/10.1016/j.electacta.2005.12.039>>

SANTOS, S. B.; VALEZI, C. F.; SCREMIN, J.; SALAMANCA-NETO, C. A. R.; DALL'ANTONIA, L. H.; SARTORI, E. R. A simple square-wave voltammetric method for the determination of scopolamine in pharmaceuticals using a boron-doped diamond electrode. **Química Nova**, v. 37, n. 10, p. 1579–1583, 2014. <<http://doi.org/10.5935/0100-4042.20140278>>

SCHWARZOVÁ-PECKOVÁ, K.; VOSÁHLOVÁ, J.; BAREK, J.; ŠLOUFOVÁ, I.; PAVLOVA, E.; PETRÁK, V.; ZAVÁZALOVÁ, J. Influence of boron content on the morphological, spectral, and electroanalytical characteristics of anodically oxidized boron-doped diamond electrodes. **Electrochimica Acta**, v. 243, p. 170–182, 2017. <<http://doi.org/10.1016/j.electacta.2017.05.006>>

SHIN, D.; TRYK, D. A.; FUJISHIMA, A.; MUCK, A.; CHEN, G.; WANG, J. Microchip capillary electrophoresis with a boron-doped diamond electrochemical detector for analysis of aromatic amines. **ELECTROPHORESIS**, v. 25, n. 17, p. 3017–3023, 1 set. 2004. <<http://doi.org/10.1002/elps.200305965>>

SILVA, J. A. F. DA; COLTRO, W. K. T.; CARRILHO, E.; TAVARES, M. F. M. Terminologia para as técnicas analíticas de eletromigração em capilares. **Química Nova**, v. 30, n. 3, p. 740–744, jun. 2007. <<http://doi.org/10.1590/S0100-40422007000300040>>

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**, v. 29, n. 8, p. 1860–1866, 2017. <<http://doi.org/10.1002/elan.201700160>>

SIMÕES, F. R.; VAZ, C. M. P.; BRETT, C. M. A. Electroanalytical Detection of the Pesticide Paraquat by Batch Injection Analysis. **Analytical Letters**, v. 40, n. 9, p. 1800–1810, jun. 2007. <<http://doi.org/10.1080/00032710701380806>>

SLAUGHTER, L. Involvement of drugs in sexual assault. **The Journal of reproductive medicine**, v. 45, n. 5, p. 425–30, maio 2000.

SPEISER, B. Methods to investigate mechanisms of electroorganic reactions. **Encyclopedia of electrochemistry**, 2004.

STEENKAMP, P. A.; HARDING, N. M.; VAN HEERDEN, F. R.; VAN WYK, B.-E. Fatal Datura poisoning: identification of atropine and scopolamine by high performance liquid chromatography/photodiode array/mass spectrometry. **Forensic Science International**, v. 145, n. 1, p. 31–39, out. 2004. <<http://doi.org/10.1016/j.forsciint.2004.03.011>>

STRADIOTTO, N. R.; YAMANAKA, H.; ZANONI, M. V. B. Electrochemical sensors: a powerful tool in analytical chemistry. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 14, n. 2, p. 159–173, abr. 2003. <<http://doi.org/10.1590/S0103-50532003000200003>>

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**, v. 49, n. 22–23, p. 4021–4026, set. 2004. <<http://doi.org/10.1016/j.electacta.2004.01.082>>

SWAIN, M. chemicalize.org. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 52, n. 2, p. 613–615, 27 fev. 2012. <<http://doi.org/10.1021/ci300046g>>

TAN, S. M.; POH, H. L.; SOFER, Z.; PUMERA, M. Boron-doped graphene and boron-doped diamond electrodes: detection of biomarkers and resistance to fouling. **The Analyst**, v. 138, n. 17, p. 4885, 2013. <<http://doi.org/10.1039/c3an00535f>>

TAVARES, M. F. M. Eletroforese capilar: conceitos básicos. **Química Nova**, v. 19, n. 2, p. 173–181, 1996.

TAVARES, M. F. M. Mecanismos de Separação em Eletroforese Capilar. **Química Nova**, v. 20, n. 5, p. 493–511, out. 1997. <<http://doi.org/10.1590/S0100-40421997000500010>>

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**, v. 75, n. 7, p. 1564–1572, 25 abr. 2003. <<http://doi.org/10.1021/ac020583q>>

TORAL, M. I.; MUÑOZ, M. A.; ORELLANA, S. L. Simultaneous Determination of N-Butylscopolamine and Oxazepam in Pharmaceutical Formulations by First-Order Digital Derivative Spectrophotometry. **Journal of AOAC International**, v. 88, n. 4, p. 1173–1178, 2005.

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**, v. 85, n. 3, p. 1274–1278, set. 2011. <<http://doi.org/10.1016/j.talanta.2011.06.008>>

TORMIN, T. F.; NARCISO, L. C. D.; RICHTER, E. M.; MUNOZ, R. A. A. Batch-injection stripping voltammetry of metals in fuel bioethanol. **Fuel**, v. 117, n. 0, p. 952–956, jan. 2014a. <<http://doi.org/10.1016/j.fuel.2013.10.038>>

TORMIN, T. F.; CUNHA, R. R.; DA SILVA, R. A. B.; MUNOZ, R. A. A.; RICHTER, E. M.; FARIA TORMIN, T.; CUNHA, R. R.; AMORIM, R.; DA SILVA, B.; ALEJANDRO, R.; MUNOZ, 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**, v. 202, n. 0, p. 93–98, out. 2014b. <<http://doi.org/10.1016/j.snb.2014.04.096>>

TORMIN, T. F.; NARCISO, L. C. D.; RICHTER, E. M.; MUNOZ, R. A. A. Batch-injection stripping voltammetry of zinc at a gold electrode: application for fuel bioethanol analysis. **Electrochimica Acta**, v. 164, p. 90–96, maio 2015. <<http://doi.org/10.1016/j.electacta.2015.02.172>>

TROJANOWICZ, M.; KOŹMIŃSKI, P.; DIAS, H.; BRETT, C. M. A.; KOZMINSKI, P.; DIAS, H.; BRETT, C. M. A. Batch-injection stripping voltammetry (tube-less flow-injection analysis) of trace metals with on-line sample pretreatment. **Talanta**, v. 68, n. 2, p. 394–400, 6 dez. 2005. <<http://doi.org/10.1016/j.talanta.2005.08.065>>

VESTERBERG, O. History of electrophoretic methods. **Journal of Chromatography A**, v. 480, n. C, p. 3–19, 1989. <[http://doi.org/10.1016/S0021-9673\(01\)84276-X](http://doi.org/10.1016/S0021-9673(01)84276-X)>

WANG, J.; CHEN, L.; ANGNES, L.; TIAN, B. Computerized pipettes with programmable dispensation. **Analytica Chimica Acta**, v. 267, n. 1, p. 171–177, 1992. <[http://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/0003-2670\(92\)85020-7](http://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/0003-2670(92)85020-7)>

WANG, J. **Analytical electrochemistry**. 3. ed. New York: John Wiley & Sons, 2006.

WANG, J.; TAHA, Z. Batch injection analysis. **Analytical Chemistry**, v. 63, n. 10, p. 1053–1056, maio 1991. <<http://doi.org/10.1021/ac00010a025>>

WATANABE, T.; HONDA, Y.; KANDA, K.; EINAGA, Y. Tailored design of boron-doped diamond electrodes for various electrochemical applications with boron-doping level and sp²-bonded carbon impurities. **Physica Status Solidi A**, v. 211, n. 12, p. 2709–2717, dez. 2014. <<http://doi.org/10.1002/pssa.201431455>>

WEINBERGER, R. **Practical Capillary Electrophoresis**. 2nd. ed. Orlando: Elsevier, 2000. <<https://doi.org/10.1016/B978-012742356-2/50005-5>>

WHATLEY, H. Basic Principles and Modes of Capillary Electrophoresis. In: **Clinical and Forensic Applications of Capillary Electrophoresis**. New Jersey: Humana Press, 2003. p. 21–58. <<https://doi.org/10.1385/1-59259-120-5:2>>

WHELPTON, R.; HURST, P. R.; METCALFE, R. F.; SAUNDERS, S. A. Liquid chromatographic determination of hyoscine (scopolamine) in urine using solid phase extraction. **Biomedical Chromatography**, v. 6, n. 4, p. 198–204, jul. 1992. <<http://doi.org/10.1002/bmc.1130060410>>

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**, v. 473, n. 1–2, p. 173–178, set. 1999. <[http://doi.org/10.1016/S0022-0728\(99\)00027-3](http://doi.org/10.1016/S0022-0728(99)00027-3)>

YANG, N.; FOORD, J. S.; JIANG, X. Diamond electrochemistry at the nanoscale: A review. **Carbon**, v. 99, p. 90–110, 1 abr. 2016. <<http://doi.org/10.1016/j.carbon.2015.11.061>>

ZEMANN, A. J.; SCHNELL, E.; VOLGGER, D.; BONN, G. K. Contactless Conductivity Detection for Capillary Electrophoresis. **Analytical Chemistry**, v. 70, n. 3, p. 563–567, 1 fev. 1998. <<http://doi.org/10.1021/ac9707592>>

ZEMANN, A. J. Conductivity detection in capillary electrophoresis. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 20, n. 6–7, p. 346–354, 2001. <[http://doi.org/10.1016/S0165-9936\(01\)00076-0](http://doi.org/10.1016/S0165-9936(01)00076-0)>

ZEMANN, A. J. Capacitively coupled contactless conductivity detection in capillary electrophoresis. **ELECTROPHORESIS**, v. 24, n. 1213, p. 2125–2137, jul. 2003. <<http://doi.org/10.1002/elps.200305476>>

ZHANG, Y.; SURYANARAYANAN, V.; NAKAZAWA, I.; YOSHIHARA, S.; SHIRAKASHI, T. Electrochemical behavior of Au nanoparticle deposited on as-grown and O-terminated diamond electrodes for oxygen reduction in alkaline solution. **Electrochimica Acta**, v. 49, n. 28, p. 5235–5240, nov. 2004. <<http://doi.org/10.1016/j.electacta.2004.07.005>>

ZOSKI, C. G. **Handbook of Electrochemistry**. Amsterdam: Elsevier, 2007.

ATIVIDADES REALIZADAS DURANTE O DOUTORADO

Publicação de artigos relacionados à tese:

- DA COSTA OLIVEIRA, Thiago *et al.* Electrochemical Portable Method for *on-site* Screening of Scopolamine in Beverage and Urine Samples. **Electroanalysis**, v. 31, n. 3, p. 567-574, 2019.
- RICHTER, EDUARDO *et al.* Boron doped diamond electrodes in flow-based systems. **Frontiers in chemistry**, v. 7, p. 190, 2019.

Artigos em redação:

- Artigo de comparação entre os sistemas CE-C⁴D e MCE-C⁴D para a determinação de SCP em amostras de bebidas.

Outras publicações no período:

- OLIVEIRA, Thiago C. *et al.* A batch injection analysis system with square-wave voltammetric detection for fast and simultaneous determination of naphazoline and zinc. **Talanta**, v. 152, p. 308-313, 2016.
- OLIVEIRA, Thiago C. *et al.* Development of a Novel Versatile Method for Determination of two Antihistamines in Association with Naphazoline Using Cathodically Pretreated Boron-doped Diamond Electrode. **Electroanalysis**, v. 30, n. 5, p. 868-876, 2018.
- FREITAS, Jhonys M. *et al.* A simple and fast-portable method for the screening of the appetite-suppressant drug sibutramine in natural products and multivitamins supplements. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 282, p. 449-456, 2019.
- FREITAS, Jhonys M *et al.* Simultaneous determination of three species with a single-injection step using batch injection analysis with multiple pulse amperometric detection. **Talanta**, v. 146, p. 670-675, 2016.

- FREITAS, Jhonys M. *et al.* Amperometric determination of 8- chlorotheophylline, caffeine, and diphenhydramine in a single run. **Química Nova**, v. 40, n. 7, p. 739-744, 2017.
- COSTA, Brenda MC *et al.* Fast methods for simultaneous determination of arginine, ascorbic acid and aspartic acid by capillary electrophoresis. **Talanta**, 2019.
- RIBEIRO, Michelle MAC *et al.* A sub-minute electrophoretic method for simultaneous determination of naphazoline and zinc. **Journal of Chromatography A**, v. 1472, p. 134-137, 2016.
- RIBEIRO, Michelle MAC *et al.* Sub-Minute Method for Determination of Naphazoline in the Presence of Diphenhydramine, Pheniramine or Chlorpheniramine by Capillary Electrophoresis. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 29, n. 9, p. 1959-1964, 2018.
- DE CASTRO COSTA, Brenda Maria *et al.* Ultrafast capillary electrophoresis method for the simultaneous determination of ammonium and diphenhydramine in pharmaceutical samples. **Journal of separation science**, v. 41, n. 14, p. 2969-2975, 2018.