

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

WEBERSON PEREIRA DA SILVA

**DESENVOLVIMENTO DE MÉTODOS ELETROANALÍTICOS PARA A
DETERMINAÇÃO DE TIBOLONA E METABÓLITOS EM SALIVA E 1-(3-
CLOROFENIL)PIPERAZINA (mCPP) EM AMOSTRAS APREENDIDAS**

UBERLÂNDIA

2021

WEBERSON PEREIRA DA SILVA

DESENVOLVIMENTO DE MÉTODOS ELETROANALÍTICOS PARA A DETERMINAÇÃO DE TIBOLONA E METABÓLITOS EM SALIVA E 1-(3-CLOROFENIL)PIPERAZINA (mCPP) EM AMOSTRAS APREENDIDAS

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química do Instituto de Química da Universidade Federal de Uberlândia como requisito para a 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

Área de concentração: Química Analítica

Orientador: Prof. Dr. Eduardo Mathias Richter

Uberlândia

2021

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

S586 2021	<p>Silva, Weberson Pereira da, 1991- Desenvolvimento de métodos eletroanalíticos para a determinação de tibolona e metabólitos em saliva e 1-(3-clorofenil)piperazina (mCPP) em amostras apreendidas [recurso eletrônico] / Weberson Pereira da Silva. - 2021.</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://doi.org/10.14393/ufu.te.2021.357 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 style="text-align: right;">CDU: 54</p>
--------------	--

Bibliotecários responsáveis pela estrutura de acordo com o AACR2:

Gizele Cristine Nunes do Couto - CRB6/2091



ATA DE DEFESA - PÓS-GRADUAÇÃO

Programa de Pós-Graduação em:	Química				
Defesa de:	Tese de Doutorado Acadêmico, 116, PPGQUI				
Data:	Quinze de julho de dois mil e vinte e um	Hora de início:	14:00	Hora de encerramento:	18:57
Matrícula do Discente:	11713QMI011				
Nome do Discente:	Weberson Pereira da Silva				
Título do Trabalho:	Desenvolvimento de métodos eletroanalíticos para a determinação de tibolona e metabólitos em saliva e 1-(3-clorofenil)piperazina (mCPP) em amostras apreendidas				
Área de concentração:	Química				
Linha de pesquisa:	Eletroquímica Aplicada				
Projeto de Pesquisa de vinculação:	Desenvolvimento de procedimentos analíticos simples e rápidos para triagens de amostras de interesse forense				

Reuniu-se por meio de webconferência, Plataforma Google Meet, link meet.google.com/zex-wthz-zcz, a Banca Examinadora, designada pelo Colegiado do Programa de Pós-graduação em Química, assim composta: Professores Doutores Regina Massako Takeuchi e Edson Nossol, da Universidade Federal de Uberlândia; Magno Aparecido Gonçalves Trindade, da Universidade Federal Grande Dourados; Iranaldo Santos da Silva, da Universidade Federal do Maranhão e Eduardo Mathias Richter, orientador do candidato.

Iniciando os trabalhos o presidente da mesa, Dr. Eduardo Mathias Richter, apresentou a Comissão Examinadora e o candidato, 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.

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 interna da UFU.



Documento assinado eletronicamente por **Eduardo Mathias Richter, Professor(a) do Magistério Superior**, em 19/07/2021, às 09:55, 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 **Edson Nossol, Professor(a) do Magistério Superior**, em 19/07/2021, às 10:02, 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 **Magno Aparecido Gonçalves Trindade, Usuário Externo**, em 19/07/2021, às 12:11, 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 19/07/2021, às 13:03, 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 **Iranaldo Santos da Silva, Usuário Externo**, em 19/07/2021, às 14:01, 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 **2913872** e o código CRC **87469C2B**.

AGRADECIMENTOS

- ✚ *À toda a minha família pelo apoio, carinho, motivação em todos os momentos que precisei.*
- ✚ *Ao meu orientador Prof. Dr. Eduardo Mathias Richter, por todos os ensinamentos, orientações, confiança e incentivo sempre oferecidos em todos esses anos.*
- ✚ *A todos os companheiros do Núcleo de Pesquisa em Eletroanalítica (NuPE), pela ajuda, paciência, discussões e inúmeros momentos de descontrações e risadas: André Luiz, Jéssica, Diego, Raquel, Thiago Costa, Jhonys, Rafael Dornellas, Ana Paula, David, Luiz André, Alice, Sarah, Rafael Melo, Iana, Pablo, Afonso e a todos que não estão citados aqui, mas que contribuíram com essa jornada.*
- ✚ *Aos meus amigos e companheiros pela amizade, apoio, ajuda, e pelos vários momentos de descontração: Andrei, Adriana, Camila, Carlos, Cinthya, Emilsom, Felipe, Hitala, Michelle, Samuel, Silvana e Valdislaine.*
- ✚ *Ao Prof. Dr. Rodrigo Alejandro Abarza Muñoz pelos conhecimentos e contribuições para o meu crescimento durante todo esse período.*
- ✚ *À Profa. Dr. Raquel Sousa e ao Prof. Dr. Wallans Torres pelas contribuições para o desenvolvimento desta tese.*
- ✚ *À Universidade Federal de Uberlândia e ao Instituto de Química.*
- ✚ *À CAPES, CNPq e à FAPEMIG, pelo apoio financeiro.*
- ✚ *Aos examinadores da banca, por aceitarem o convite e por dedicarem seu tempo à leitura e contribuição para o aprimoramento desta tese.*
- ✚ *A todos que não foram citados, mas que de forma direta ou indiretamente contribuíram para o desenvolvimento dessa tese.*

*A reação mais comum da mente humana a uma conquista
não é satisfação, e sim o anseio por mais.*

Yuval Noah Harari

RESUMO

da Silva, W. P. **Desenvolvimento de métodos eletroanalíticos para a determinação de tibolona e metabolitos em saliva e 1-(3-clorofenil)piperazina (mCPP) em amostras apreendidas.** 2021. 121f. Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Química, Instituto de Química, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia – MG, 2021.

A Tibolona (TIB) é um esteroide sintético que apresenta eficácia na prevenção da perda de massa óssea (osteoporose) pós-menopausa e nos sintomas climatéricos. Este fármaco foi incluído no ano de 2006 no grupo de agentes anabólicos na lista anual de substâncias consideradas doping pela WADA. Nesta tese são apresentados métodos eletroquímicos para a determinação de TIB e os metabólitos 3 α -hidroxitibolona (3 α -OHTIB) e 3 β -hidroxitibolona (3 β -OHTIB) em amostras reais de saliva empregando voltametria de onda quadrada (SWV) e diamante dopado com boro (BDD) como eletrodo de trabalho. As amostras de saliva foram diluídas em eletrólito de suporte (tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹, pH = 7) e o valor médio de recuperação foi de 104 \pm 3% para TIB e 98 \pm 5% para 3 α -OHTIB e 3 β -OHTIB. O limite de detecção (LD) foi de 0,3 μ mol L⁻¹ para os três compostos. O método também foi aplicado na quantificação de TIB em formulações farmacêuticas com a obtenção de resultados estatisticamente semelhantes aos obtidos por HPLC com nível de confiança de 95%. Os metabólitos 3 α -OHTIB e 3 β -OHTIB também foram determinados em urina sintética utilizando voltametria de pulso diferencial e BDD como eletrodo de trabalho. Tampão BR 0,04 mol L⁻¹ (pH = 3) foi otimizado como eletrólito suporte e a faixa linear de resposta foi de 1 a 35 μ mol L⁻¹ com LD = 0,1 μ mol L⁻¹. A quantificação dos metabólitos foi possível após simples diluição da amostra em eletrólito suporte (1:1) com valor médio de recuperação de 101 \pm 5%. A 1-(3-clorofenil)piperazina (mCPP) faz parte do grupo de novas substâncias psicoativas, apresenta entre outros efeitos, os de estimulante e alucinógeno. Um método eletroquímico empregando SWV foi desenvolvido para a detecção de mCPP em amostras apreendidas empregando eletrodo impresso de carbono (SPCE). A detecção da mCPP foi realizada pelo método *drop-casting* e apresentou faixa linear de resposta de 1 a 30 μ mol L⁻¹ com LD = 0,1 μ mol L⁻¹. O método se mostrou eficiente em detectar a mCPP em amostras apreendidas contendo outros compostos eletroativos (metanfetamina ou ecstasy).

Palavras-chave: Voltametria de onda quadrada. Voltametria de pulso diferencial. Análise forense. Esteroide. Triagem rápida. Drogas de abuso. Novas Substâncias Psicoativas.

ABSTRACT

da Silva, W. P. **Development of electroanalytical methods for determination of tibolone and metabolites in saliva and 1- (3-chlorophenyl) piperazine (mCPP) in seized samples.** 2021. 121f. Thesis (Doctorate) – Programa de Pós-Graduação em Química, Instituto de Química, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia – MG, 2021.

Tibolone (TIB) is a synthetic steroid that is effective in preventing postmenopausal bone loss (osteoporosis) and climacteric symptoms. This drug has been included since 2006 in the group of anabolic agents in the annual list of substances considered doping by WADA. In this thesis we describe electrochemical methods for the determination of TIB and the metabolites 3 α -hydroxytibolone (3 α -OHTIB) and 3 β -hydroxytibolone (3 β -OHTIB) in real saliva samples using square wave voltammetry (SWV) and boron doped diamond (BDD) as the working electrode. Saliva samples were only diluted in supporting electrolyte (0.1 mol L⁻¹ phosphate buffer, pH 7) and the mean recovery values were 104 \pm 3% for TIB and 98 \pm 5% for 3 α -OHTIB and 3 β -OHTIB. A limit of detection (LOD) of 0.3 μ mol L⁻¹ was obtained for the three compounds. The method was also applied to the quantification of TIB in pharmaceutical formulations and the results obtained were statistically similar to those obtained by HPLC (95% confidence interval). The metabolites, 3 α -OHTIB and 3 β -OHTIB, were also determined in synthetic urine using differential pulse voltammetry and BDD electrode as the working electrode. BR buffer 0.04 mol L⁻¹ (pH = 3) was used as a supporting electrolyte and a linear response range of 1 to 35 μ mol L⁻¹ and a LOD of 0.1 μ mol L⁻¹ were found. The quantification of the metabolites was possible after simple dilution of samples (1: 1) in support electrolyte (mean recovery value of 101 \pm 5%) with 1- (3-chlorophenyl) piperazine (mCPP) is part of the group of new psychoactive substances, with other effects, such as stimulant and hallucinogenic. Electrochemical method using SWV was developed for the detection of mCPP in seized samples using a screen-printed carbon electrode (SPCE). The detection of mCPP was performed by the drop-casting method and presented a linear response range from 1 to 30 μ mol L⁻¹ with LOD = 0.1 μ mol L⁻¹. The method proved to be efficient for the detection of mCPP in seized samples contained other electroactive compounds (methamphetamine or ecstasy).

Keywords: Square-wave voltammetry. Differential pulse voltammetry. Forensic analysis. Steroid. Fast screening. Drugs of abuse. New Psychoactive Substances.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1.** Estrutura molecular da TIB, 3 α -OHTIB, 3 β -OHTIB e Δ 4-TIB.21
- Figura 2.** Estrutura molecular da mCPP.25
- Figura 3.** Célula eletroquímica convencional para uso de BDD como eletrodo de trabalho: (A) Esquema de fixação e contato elétrico do eletrodo de BDD na célula eletroquímica; (B) Vista lateral da célula eletroquímica e; (C) Vista superior da célula com o eletrodo de trabalho de BDD posicionado no fundo da mesma (área geométrica definida pelo O-ring - 0,13 cm²).34
- Figura 4.** Célula eletroquímica impressa (impressão 3D) para uso de BDD como eletrodo de trabalho: (A) Esquema de fixação de contato elétrico do eletrodo na célula eletroquímica; (B) célula eletroquímica; (C) parafusos; (D) Célula eletroquímica obtida por impressão 3D montada (área geométrica definida pelo O-ring - 0,18 cm²).35
- Figura 5.** Voltamogramas cíclicos obtidos para uma solução de TIB 0,5 mmol L⁻¹ em tampão BR (pH = 2,0 a 10,0) e acetonitrila (75:25, v/v). (A) Ativação anódica e, (B) ativação catódica. Eletrodo de trabalho: BDD; (C) relação entre corrente de pico e pH obtidas após pré-tratamento anódico; incremento de potencial: 5 mV; velocidade de varredura 50 mV s⁻¹.43
- Figura 6.** Voltamogramas cíclicos obtidos antes (linha preta) e após a adição (linha vermelha) de TIB 0,5 mmol L⁻¹ em tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ em pH 7 com acetonitrila (75:25, v/v). Incremento de potencial: 5 mV; velocidade de varredura 50 mV s⁻¹.44
- Figura 7.** Relação de E_p vs. pH para a oxidação eletroquímica de TIB. Eletrodo de trabalho: BDD; incremento de potencial: 5 mV; velocidade de varredura 50 mV s⁻¹.45
- Figura 8.** Voltamogramas cíclicos obtidos em diferentes velocidades de varredura para TIB 0,5 mmol L⁻¹. Eletrólito suporte: tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ em pH 7 com acetonitrila (75:25, v/v); incremento de potencial: 5 mV; velocidade de varredura 50 mV s⁻¹.46
- Figura 9.** Relação entre corrente de pico de oxidação da TIB e $v^{1/2}$ para (A) pico 1 e (B) pico 2. Outras condições, ver Figura 8.47

Figura 10. Relação entre I_p vs $\log \nu$ para o (A) pico 1 e (B) pico 2 provenientes da oxidação da TIB.....	47
Figura 11. Relação entre E_p vs. $\log \nu$ para a oxidação eletroquímica da TIB (dados obtidos da Fig. 8).	49
Figura 12. (A) Voltamogramas de onda quadrada obtidos para $30 \mu\text{mol L}^{-1}$ de TIB em diferentes frequências de aplicação de pulsos de potenciais. (B) Relação I_p vs. f ($n = 3$). Eletrólito de suporte: tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ em pH 7; $a = 50 \text{ mV}$ e $\Delta E = 2 \text{ mV}$	51
Figura 13. Relação entre E_p vs. $\log f$ para (A) pico 1 e (B) pico 2 de oxidação observados nos voltamogramas de onda quadrada da Figura 12 para o TIB.....	52
Figura 14. Estrutura molecular da (A) TIB e da (B) testosterona.	53
Figura 15. Voltamogramas cíclicos obtidos antes (linha preta) e após a adição (linha vermelha) de TIB $0,5 \text{ mmol L}^{-1}$ em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ em pH 7 com metanol (75:25, v/v). Incremento de potencial: 5 mV ; velocidade de varredura 50 mV s^{-1}	54
Figura 16. Mecanismo para a oxidação eletroquímica da TIB utilizando metanol na composição do eletrólito de suporte.	55
Figura 17. Mecanismo para a oxidação eletroquímica da TIB sobre o eletrodo de BDD quando acetonitrila é usada na composição do eletrólito de suporte.....	56
Figura 18. (A) Voltamogramas de onda quadrada obtidos para a variação da amplitude de aplicação dos pulsos de potenciais para solução de TIB $30 \mu\text{mol L}^{-1}$. (B) Relação entre corrente de pico e variação da amplitude ($n = 3$). (C) Relação entre largura de meia altura de pico e variação da amplitude. Eletrólito de suporte: tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ em pH = 7; $f = 30 \text{ s}^{-1}$ e $\Delta E = 2 \text{ mV}$	57
Figura 19. (A) Voltamogramas de onda quadrada obtidos para a variação do incremento de potencial de 1 a 10 mV . (B) Relação entre corrente de pico e incremento de potencial para solução contendo TIB $30 \mu\text{mol L}^{-1}$ ($n = 3$); Eletrólito de suporte: tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ em pH = 7; $f = 30 \text{ s}^{-1}$ e $a = 50 \text{ mV}$	58
Figura 20. (A) Voltamogramas de onda quadrada obtidos para concentrações crescentes de TIB ($1 - 140 \mu\text{mol L}^{-1}$). (B) Respectiva curva de calibração obtida a partir dos voltamogramas	

apresentados (n = 3). Condições experimentais: $a = 60 \text{ mV}$; $f = 40 \text{ s}^{-1}$; $\Delta E = 4 \text{ mV}$. Eletrólito de suporte: tampão fosfato $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ $\text{pH} = 7,0$ 59

Figura 21. Voltamogramas obtidos por SWV para medidas sucessivas (n = 20) de soluções contendo TIB **(A)** $10 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ e **(B)** $50 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$. **(C)** Relação entre corrente de pico e número de medidas realizadas. Condições experimentais, ver Figura 20. 60

Figura 22. **(A)** Voltamogramas de onda quadrada obtidos para solução amostra de saliva fortificada com TIB e **(B)** Curva de adição de padrão obtida a partir dos voltamogramas de SWV apresentados (n = 3). Condições experimentais, ver Figura 20. 61

Figura 23. Voltamogramas de onda quadrada obtidos para amostras de saliva antes (linha preta) e após (linha vermelha) adição de TIB $10 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$. Condições experimentais, ver Figura 20. 63

Figura 24. Voltamogramas de SWV obtidos para amostras de saliva **(A)** antes (linha preta) e após (linha vermelha) adição de TIB $10 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ e (linha azul) adição de AA $20 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$. **(B)** antes (linha preta) e após (linha vermelha) adição de TIB $10 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ e (linha azul) adição de AU $20 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$. Condições experimentais, ver Figura 20. 64

Figura 25. **(A)** Voltamogramas de onda quadrada obtidos para solução amostra e adições crescentes de TIB. **(B)** curva de adição de padrão obtida a partir dos voltamogramas (n = 3). Condições experimentais, ver Figura 20. 65

Figura 26. Redução química da TIB em $3\alpha\text{-OHTIB}$ 68

Figura 27. Espectro RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) da $3\alpha\text{-OHTIB}$ 70

Figura 28. Voltamogramas cíclicos obtidos após a adição de 3α e $3\beta\text{-OHTIB}$ $0,5 \text{ mmol L}^{-1}$ em tampão BR ($\text{pH} = 2,0$ a $10,0$) com acetonitrila (75:25, v/v) sobre o eletrodo de BDD. **(A)** Ativação anódica e **(B)** ativação catódica. Incremento de potencial: 5 mV ; velocidade de varredura 50 mV s^{-1} 71

Figura 29. Voltamogramas de SWV obtidos antes (linha preta) e após (linha laranja) a adição de 3α e $3\beta\text{-OHTIB}$ $20 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ e de DPV obtidos antes (linha vermelha) e após (linha azul) a adição de 3α e $3\beta\text{-OHTIB}$ sobre o eletrodo de BDD em tampão BR $0,04 \text{ mol L}^{-1}$ em **(A)** $\text{pH} =$

3, **(B)** pH = 4 e **(C)** pH = 5 com tratamento anódico e **(D)** pH = 3, **(E)** pH = 4 e **(F)** pH = 5 com tratamento catódico.....72

Figura 30. Relação entre E_p vs pH para a 3α e 3β -OHTIB. Outras condições, ver Figura 28.73

Figura 31. Voltamogramas cíclicos obtidos em diferentes velocidades de varredura para 3α e 3β -OHTIB $0,5 \text{ mmol L}^{-1}$. Eletrólito suporte: tampão BR $0,04 \text{ mol L}^{-1}$ em pH 3 com acetonitrila (75:25, v/v); incremento de potencial: 5 mV;74

Figura 32. Relação entre corrente de pico de oxidação e a variação da velocidade de varredura para **(A)** pico 1 e **(B)** pico 2 de solução contendo 3α e 3β -OHTIB.75

Figura 33. Relação entre I_p vs. $\log v$ para o **(A)** pico 1 e **(B)** pico 2 provenientes da oxidação da 3α e 3β -OHTIB.....76

Figura 34. **(A)** Voltamogramas de pulso diferencial obtidos para $20 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ de 3α e 3β -OHTIB para aplicação de diferentes tempos de modulação; **(B)** Relação entre corrente de pico e tempo de modulação ($n = 3$). Eletrólito de suporte: tampão BR $0,04 \text{ mol L}^{-1}$ em pH 3; $a = 80 \text{ mV}$; $\Delta E = 5 \text{ mV}$78

Figura 35. **(A)** Voltamogramas de DPV obtidos para solução de 3α e 3β -OHTIB $20 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ com variação da amplitude de modulação. **(B)** Relação entre corrente de pico e amplitude de modulação ($n = 3$). **(C)** Relação entre largura de meia altura de pico e amplitude de modulação. Eletrólito de suporte: tampão BR $0,04 \text{ mol L}^{-1}$ em pH 3, $t_m = 25 \text{ ms}$; $\Delta E = 5 \text{ mV}$79

Figura 36. **(A)** Voltamogramas de DPV obtidos para solução de 3α e 3β -OHTIB $20 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ com a variação do incremento de potencial (1 a 10 mV); **(B)** Relação entre corrente de pico e incremento de potencial ($n = 3$). Eletrólito de suporte: tampão BR $0,04 \text{ mol L}^{-1}$ em pH 3, $t_m = 25 \text{ ms}$; $a = 80 \text{ mV}$80

Figura 37. **(A)** Voltamogramas de DPV obtidos para concentrações crescentes de 3α e 3β -OHTIB ($1 - 50 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$). **(B)** respectiva curva analítica obtida a partir dos voltamogramas apresentados ($n = 3$). Condições experimentais: $a = 60 \text{ mV}$; $t_m = 25 \text{ ms}$ e $\Delta E = 6 \text{ mV}$. Eletrólito de suporte: tampão BR $0,04 \text{ mol L}^{-1}$ (pH = 3,0) e urina sintética (1:1).81

Figura 38. Resultados obtidos por DPV para análises sucessivas de soluções contendo 3α e 3β -OHTIB (A) $25 \mu\text{mol L}^{-1}$ e (B) $15 \mu\text{mol L}^{-1}$. (C) Relação entre corrente de pico e número de medidas realizadas. Condições experimentais, ver Figura 37.	82
Figura 39. (A) Voltamogramas de pulso diferencial obtidos para solução amostra de urina sintética fortificada com 3α e 3β -OHTIB $10 \mu\text{mol L}^{-1}$ (diluição de 1:1 em eletrólito suporte); (B) curva de calibração pelo método de adição de padrão obtida a partir dos voltamogramas apresentados ($r = 0,999$) ($n = 3$). Condições experimentais, ver Figura 37.	83
Figura 40. (A) Voltamogramas de SWV obtidos para solução amostra de saliva fortificada com 3α e 3β -OHTIB ($20 \mu\text{mol L}^{-1}$); (B) curva de calibração pelo método de adição de padrão obtida a partir dos voltamogramas apresentados ($n = 3$). Condições experimentais: $a = 60 \text{ mV}$; $f = 40 \text{ s}^{-1}$; $\Delta E = 4 \text{ mV}$. Eletrólito de suporte: tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH = 7,0.	84
Figura 41. (A) Voltamogramas cíclicos obtidos após adição de $250 \mu\text{mol L}^{-1}$ de mCPP em tampão BR $0,04 \text{ mol L}^{-1}$ (pH = 2,0 - 10,0). Velocidade de varredura: 50 mV s^{-1} ; Incremento de potencial: 5 mV . (B) Relação entre potencial e corrente em função do pH para o processo de oxidação eletroquímica mCPP.	87
Figura 42. Voltamogramas cíclicos obtidos usando SPCE antes (linha vermelha) e após (linha preta) adição de mCPP $250 \mu\text{mol L}^{-1}$ em solução tampão BR (pH = 7). Velocidade de varredura: 50 mV s^{-1} ; Incremento de potencial: 5 mV	88
Figura 43. Voltamogramas cíclicos obtidos em diferentes velocidades de varredura para mCPP 250 mmol L^{-1} . Eletrólito suporte: tampão BR $0,04 \text{ mol L}^{-1}$ em pH 7; incremento de potencial: 5 mV ; velocidade de varredura 50 mV s^{-1} ; eletrodo: SPCE.	89
Figura 44. (A) Relação entre corrente de pico de oxidação e a variação da velocidade de varredura; (B) Relação entre $\log I$ vs. $\log v$ para mCPP 250 mmol L^{-1}	89
Figura 45. Mecanismo de reação para oxidação eletroquímica de mCPP em SPCE.	91
Figura 46. (A) Voltamogramas de onda quadrada obtidos para solução de mCPP $30 \mu\text{mol L}^{-1}$ em diferentes frequências de aplicação de pulso de potenciais. (B) Relação entre I vs. f para os respectivos voltamogramas ($n = 3$). Eletrólito suporte: tampão BR $0,04 \text{ mol L}^{-1}$ pH 7. Parâmetros SWV: a : 50 mV ; ΔE : 4 mV ; eletrodo: SPCE.	92

Figura 47. (A) Voltamogramas de SWV obtidos para a variação da amplitude de pulsos de potenciais para solução de mCPP 30 $\mu\text{mol L}^{-1}$. (B) Relação entre corrente de pico e variação da amplitude ($n = 3$). Eletrólito de suporte: BR 0,04 mol L^{-1} em pH 7; $f = 30 \text{ s}^{-1}$ e $\Delta E = 2 \text{ mV}$; eletrodo: SPCE.	93
Figura 48. (A) Voltamogramas obtidos para a variação do incremento de potencial de 1 a 10 mV. (B) Relação entre corrente de pico e incremento de potencial para solução contendo mCPP 30 $\mu\text{mol L}^{-1}$ ($n = 3$); Eletrólito de suporte: tampão BR 0,04 mol L^{-1} em pH = 7; $f = 30 \text{ s}^{-1}$ e $a = 50 \text{ mV}$; eletrodo: SPCE.	94
Figura 49. Voltamogramas de SWV obtidos para concentrações crescentes de mCPP (1 – 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$); (B) Respectiva curva de calibração obtida ($n = 3$). Condições experimentais: $a = 40 \text{ mV}$; $f = 50 \text{ s}^{-1}$; $\Delta E = 3 \text{ mV}$. Eletrólito de suporte: tampão BR 0,04 mol L^{-1} pH = 7,0.	95
Figura 50. Voltamogramas obtidos por SWV para mediadas sucessivas de soluções contendo mCPP 30 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Condições experimentais, ver Figura 49.	96
Figura 51. Voltamogramas de SWV obtidos para solução contendo mCPP 30 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (linha preta) e possíveis interferentes (30 $\mu\text{mol L}^{-1}$): (A) CAF; (B) anfetamina; (C) MA; (D) metilona; (E) mefedrona; (F) MDMA; (G) BZP; (H) etilona; (I) MDPV. Outras condições experimentais, ver Figura 49.	97
Figura 52. Voltamogramas obtidos por SWV para solução contendo solução padrão de mCPP 30 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (linha preta) e amostra de referência de mCPP (linha vermelha). Outras condições experimentais, ver Figura 49.	99
Figura 53. Voltamogramas de SWV obtidos para duas amostras reais apreendidas de (A) MA antes (linha vermelha) e após (linha azul) a adição de mCPP e (B) MDMA antes (linha vermelha) e após (linha azul) a adição de mCPP. Sinal obtido para solução de mCPP 30 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (linha preta) é mostrado em ambas as figuras. Outras condições experimentais, ver Figura 49.	100

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Reagentes utilizados e suas respectivas especificações.....	36
Tabela 2. Resultados (média \pm DP) obtidos para análises de amostras de saliva após a adição de TIB.....	62
Tabela 3. Resultados obtidos (média \pm DP) para determinação da TIB em amostras farmacêuticas por SWV e HPLC (n = 3).....	65
Tabela 4. Deslocamentos químicos de RMN- ¹³ C (δ) da hidroxitolona comparados com a literatura (mistura de epímeros).....	69

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E SIGLAS

3 α -OHTIB – 3 α -hidroxitibolona

3 β -OHTIB – 3 β -hidroxitibolona

a – Amplitude de aplicação do pulso de potencial

AA – Ácido ascórbico

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

AU – Ácido úrico

b – Inclinação da curva analítica

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

BR – Britton-Robinson

BZP – Benzilpiperazina

CAF – Cafeína

DNA – Ácido desoxirribonucleico, do Inglês, “*deoxyribonucleic acid*”

DPb – Desvio Padrão do branco

DPR – Desvio padrão relativo

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

E^0 – Potencial formal

E_p – Potencial de pico

F – Constante de Faraday

f – Frequência de aplicação do pulso de potencial

GC-MS – Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa, do inglês, “*gas chromatography/mass spectrometry*”

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

I_p – Corrente de pico

LC-MS – Cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massa, do inglês, “*liquid chromatography/tandem mass spectrometry*”

LC-Q-TOF-MS – Cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massa quadruplo-tempo de voo, do inglês, “*liquid chromatography quadrupole time-of-flight mass spectrometry*”

LD – Limite de detecção

LQ – Limite de quantificação

m – Número de prótons

MA – Metanfetamina

mCPP – 1-(3-clorofenil)piperazina

MDMA – Metilenodioximetanfetamina

MDPV – 3,4-metilenodioxipirovalerona, do inglês, “*3, 4-methylenedioxypropylone*”

MeOPP – 1-(4-metoxifenil)piperazina

MS – Espectrometria de massa, do inglês, “*mass spectrometry*”

n – Número de elétrons

NPSs – Novas substâncias psicoativas, do inglês, “*new psychoactive substances*”

OMS – Organização Mundial da Saúde

r – Coeficiente de correlação linear

R – Constante dos gases

RMN – Ressonância magnética nuclear

SPCE – Eletrodo impresso de carbono, do inglês, “*Screen-printed Carbon Electrode*”

SPE – extração em fase sólida, do inglês, “*solid phase extraction*”

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

TEMPP – 3-trifluorometilfenilpiperazina

TIB – Tibolona

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

UV-Vis – Ultravioleta-visível

v – Velocidade de varredura

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

α – Coeficiente de transferência de carga

ΔE – Incremento de potencial

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	19
1.1	Tibolona e metabólitos.....	20
1.2	Métodos para a determinação de tibolona (TIB) e seus metabólitos	22
1.3	Drogas de abuso – 1-(3-clorofenil)piperazina (mCPP)	24
1.4	Técnicas eletroquímicas.....	27
1.5	Eletrodo de diamante dopado com boro	28
2	OBJETIVOS.....	31
2.1	Objetivos específicos	31
3	PARTE EXPERIMENTAL.....	32
3.1	Instrumentação.....	32
3.1.1	Detecção eletroquímica	32
3.1.2	Eletrodos utilizados	32
3.1.3	Células eletroquímicas.....	33
3.2	Análises por cromatografia líquida de alta eficiência.....	35
3.3	Soluções e reagentes	36
3.4	Síntese do 3- α Hidroxitibolona e 3 β -hidroxitibolona	38
3.5	Amostras	38
4	RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	40
4.1	Considerações gerais.....	40
	Parte 1: Determinação de TIB em amostras de saliva	41
4.2	Comportamento eletroquímico da TIB em eletrodo de BDD.....	42
4.3	Otimização dos parâmetros da voltametria de onda quadrada.....	50
4.3.1	Otimização da frequência de aplicação dos pulsos de potenciais da SWV e estudo do mecanismo de oxidação do TIB.....	50
4.3.2	Otimização da aplicação da amplitude de pulsos de potenciais	56

4.3.3	Otimização do incremento de potencial	58
4.4	Estudo da faixa linear de reposta	59
4.5	Repetibilidade do método	60
4.6	Análises de TIB em amostras de saliva	61
4.7	Análise de TIB em amostras farmacêuticas.....	64
4.8	Conclusões parciais.....	66
Parte 2: Determinação de 3 α -OHTIB e 3 β -OHTIB em amostras de saliva e urina		67
4.9	Síntese e espectroscopia de RMN do 3 α -OHTIB e 3 β -OHTIB.....	68
4.10	Comportamento eletroquímico da 3 α -OHTIB e 3 β -OHTIB sobre eletrodo de BDD70	
4.11	Otimização dos parâmetros da voltametria de pulso diferencial	76
4.11.1	Otimização do tempo de modulação	77
4.11.2	Otimização da amplitude de modulação.....	78
4.11.3	Otimização do incremento de potencial	80
4.12	Estudo da faixa linear de resposta.....	81
4.13	Repetibilidade do método	82
4.14	Análise de amostra de urina sintética	83
4.15	Análise da amostra de saliva.....	84
4.16	Conclusões parciais.....	85
Parte 3: Detecção e triagem rápida de 1- (3-clorofenil)piperazina (mCPP) em amostras apreendidas		86
4.17	Comportamento eletroquímico da mCPP	87
4.18	Otimização dos parâmetros da voltametria de onda quadrada.....	91
4.18.1	Otimização da frequência de aplicação do pulso de potencial	91
4.18.2	Otimização da aplicação da amplitude de pulso de potencial	92
4.18.3	Otimização do incremento de potencial	93
4.19	Estudo da faixa linear de resposta da mCPP.....	94
4.20	Repetibilidade do método	95

4.21	Estudo de interferentes na detecção de mCPP	96
4.22	Determinação de mCPP em amostra de referência e amostras apreendidas.....	98
4.23	Conclusões parciais.....	100
5	CONCLUSÕES GERAIS	101
	REFERÊNCIAS	102
	ATIVIDADES DESENVOLVIDAS DURANTE O DOUTORADO	117

1 INTRODUÇÃO

Esteroides são compostos orgânicos derivados do colesterol que apresentam estrutura molecular básica composta por quatro anéis fundidos, dos quais três são anéis de ciclohexano e um de ciclopentano. A presença de diversos grupos funcionais e sua configuração ligados a esse grupo de quatro anéis, estado de oxidação, presença de cadeia lateral e insaturações presentes na estrutura básica dos esteroides determinam sua função biológica em animais, plantas e microrganismos. Entre os esteroides que normalmente são encontrados em humanos e animais estão o colesterol, estradiol, progesterona, testosterona e epitestosterona (KLOUDA et al., 2017; YADAV et al., 2013).

Os esteroides podem ser classificados em endógenos (são produzidos pelo corpo humano) e exógenos (que são administrados de fora do corpo). A administração de esteroides exógenos pode produzir diversos efeitos positivos como o crescimento muscular, estimulação do apetite, produção de glóbulos vermelhos e aumento da densidade dos ossos (BHASIN et al., 1996; FRISOLI et al., 2005; KINTZ et al., 2001). Além disso, os esteroides são utilizados no tratamento de diversas doenças tais como câncer de mama, inflamação, reconstrução dos músculos após doença debilitante e da osteoporose em mulheres pós-menopausa (BASARIA; WAHLSTROM; DOBS, 2001; MODELSKA; CUMMINGS, 2002). Entretanto, os esteroides podem apresentar perigos à saúde, causando problemas reprodutivos, imunológicos, de desenvolvimento e ao sistema nervoso central, além de doenças cardiovasculares e também trazer prejuízos ao meio ambiente (BASARIA, 2010; BHASIN et al., 1996).

Além dos problemas anteriormente mencionados, uma das principais preocupações relacionadas ao consumo de esteroides é o uso indevido destes em esportes competitivos. Os esteroides podem: (1) aumentar a massa muscular, melhorar artificialmente o desempenho físico dos atletas (BHASIN et al., 1996; TSITSILONIS; PERREA, 2009; YAMADA et al., 2007); (2) provocar efeitos que sejam prejudiciais à saúde do atleta e a seus adversários e; (3) contra a ética do esporte. De acordo com a Agência Mundial Antidoping (WADA, do inglês, "*World Anti-Doping Agency*"), o doping se caracteriza quando duas dessas três condições estão presentes (DE ROSE et al., 2006; EIDELWEIN; DECKER, 2013). Por essa razão, o uso de inúmeros esteroides e diversas outras substâncias são proibidos tanto pelo Comitê Olímpico Internacional (COI) quanto pela WADA. Anualmente, a WADA em conjunto com o COI preparam uma lista contendo as substâncias consideradas "doping" na prática de esporte profissional (THE WORLD ANTI-DOPING AGENCY, 2020) e que também é

utilizada pela Federação Internacional de Futebol Associação (FIFA, do francês, “*Fédération Internationale de Football Association*”) (HUDARI; ZANONI, 2017), na qual se encontram uma grande quantidade de esteroides.

As amostras biológicas recolhidas para a análise e detecção de possíveis substâncias proibidas pela WADA são normalmente analisadas por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (GC-MS) ou cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massa (LC-MS) ou ainda técnicas semelhantes hifenizadas (KLOUDA et al., 2017; WOLTERS; KRAAN, 1999). As análises por meio dessas técnicas normalmente consomem muito tempo, necessitam de laboratórios com infraestrutura adequada, analistas treinados e em diversos casos requerem pré-tratamento da amostra como derivatização, hidrólise, etc. Entretanto, essas técnicas apresentam alta sensibilidade, seletividade e permitem a análise de diferentes tipos de amostras (sangue, urina, plasma e etc.) (VENUGOPAL et al., 2019). Em função das desvantagens citadas, nos últimos anos, se tem visto o interesse no desenvolvimento de métodos eletroquímicos para a análise de diversos compostos que são proibidos pela WADA, inclusive esteroides, já que a maioria são eletroativos (KLOUDA et al., 2017; LEVENT et al., 2015; LINO et al., 2013).

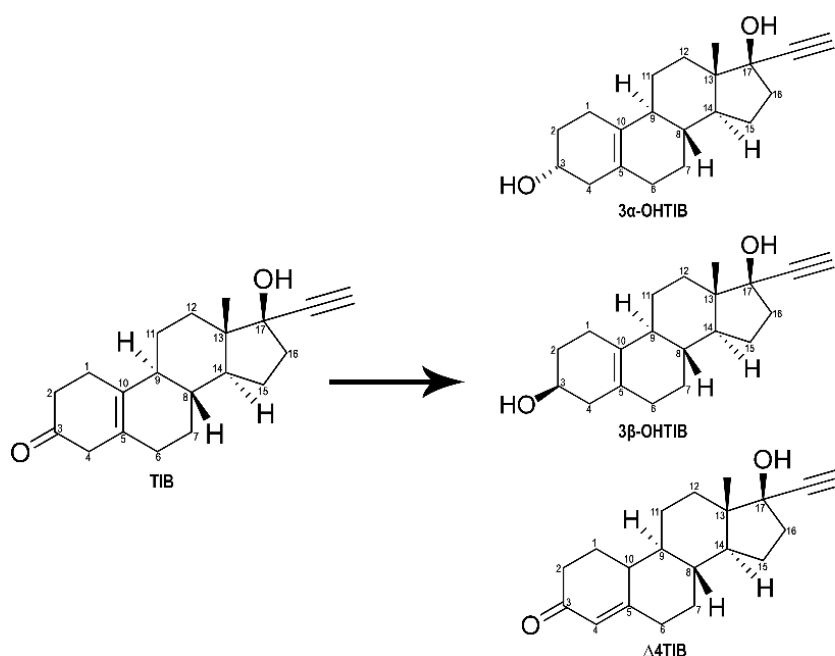
O emprego de técnicas eletroquímicas se apresenta como boa alternativa devido a características como facilidade de operação, menor custo, portabilidade, sensibilidade adequada e ausência ou necessidade de etapas simples de preparo de amostra (DE ARAUJO et al., 2018; SOUSA et al., 2019). Além disso, a detecção pode ser realizada em menos tempo em relação à GC-MS e LC-MS e em razão dessas características é esperado que estas técnicas passem ser utilizadas como uma primeira ferramenta para a detecção de esteroides em amostras em casos de suspeita de “doping” no local de jogos competitivos (YADAV et al., 2013).

1.1 Tibolona e metabólitos

A tibolona ($C_{21}H_{28}O_2$, TIB) é um esteroide sintético que apresenta eficácia na prevenção da perda de massa óssea (osteoporose) pós-menopausa e dos sintomas climatéricos (sintomas que surgem antes da menopausa), porém, não apresenta efeito que estimule o endométrio (tecido que reveste o interior do útero). Além disso, as propriedades androgênicas promovem efeitos favoráveis ao humor e bem-estar sexual em mulheres pós-menopausa, (VOS et al., 2002).

A TIB não apresenta atividade biológica e os efeitos no organismo são alcançados devido a atividade de seus metabólitos cada qual com propriedades particulares em vários tecidos diferentes do corpo (CARDOSO et al., 2013; MODELSKA; CUMMINGS, 2002). A TIB é metabolizada no fígado e excretada na urina e nas fezes. Os metabólitos 3α -hidroxitibolona (3α -OHTIB) e 3β -hidroxitibolona (3β -OHTIB) se ligam aos receptores de estrogênio, já o $\Delta 4$ -isômero tibolona ($\Delta 4$ -TIB) se liga aos receptores de progesterona e ainda apresenta efeitos androgênicos (MODELSKA; CUMMINGS, 2002). A Figura 1 apresenta a estrutura molecular da TIB e seus metabólitos.

Figura 1. Estrutura molecular da TIB, 3α -OHTIB, 3β -OHTIB e $\Delta 4$ -TIB.



Fonte: O autor.

Devido aos efeitos que a TIB apresenta e para impedir que seja utilizada por atletas para aumentar seu desempenho em esportes competitivos, a TIB está incluída desde o ano de 2006 no grupo de agentes anabólicos na lista anual de substâncias proibidas pela WADA (THE WORLD ANTI-DOPING AGENCY, 2020). Neste grupo de agentes anabólicos estão as substâncias que são utilizadas para melhorar o desempenho atlético, pois promovem o aumento de massa muscular por meio do aumento da síntese proteica, da inibição do catabolismo proteico (quebra de proteínas para a obtenção de energia), do aumento da retenção de nitrogênio e da estimulação da produção de hemácias. Além disso, estas

substâncias também favorecerem o aumento da agressividade e motivação (CELOTTI; CESI, 1992; KENNEDY; O'SULLIVAN, 1997; SILVA; DANIELSKI; CZEPIELEWSKI, 2002).

1.2 Métodos para a determinação de tibolona (TIB) e seus metabólitos

Na literatura são reportados alguns trabalhos que relatam a quantificação de TIB e seus metabólitos por meio de técnicas de separação em diversas matrizes, que podem ser amostras mais simples como formulações farmacêuticas e amostras mais complexas como fluidos biológicos. Esses trabalhos serão discutidos em detalhes a seguir.

A determinação de TIB foi realizada em amostras farmacêuticas por HPLC com detecção UV-Vis ($\lambda = 204$ nm) e usando coluna C8 (DA ROSA et al., 2012). A fase móvel empregada era constituída de metanol/água (65:35 v/v). O tempo de retenção (t_R) da TIB foi de 6,61 min com limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) de 2,9 e 9,8 $\mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente. Os resultados obtidos nos estudos de recuperação realizadas com amostras farmacêuticas ficaram entre 100 e 101%.

O metabolismo da TIB foi estudado *in vivo* em diferentes espécies animais (ratos e coelhos) para investigar a distribuição do fármaco em diferentes tecidos e órgãos (cérebro, cerebelo, glândulas mamárias, etc) (VERHOEVEN; VOS; DELBRESSINE, 2002). Já o padrão metabólico foi determinado em urina e fezes após a administração prévia de TIB em ratos e cães fêmeas. As diversas amostras analisadas passaram por processos distintos de extração em fase sólida (SPE, do inglês, “*solid phase extraction*”) em colunas C18 de 3 mL. Os componentes das amostras foram separados e analisados por HPLC-UV e, em seguida, as frações foram coletadas, purificadas e analisadas por RMN-H (ressonância magnética nuclear de hidrogênio) e por espectrometria de massa (MS). Os resultados apresentados mostram que em ratos houve a preferência pela formação do metabólito 3α -OHTIB e em cães do 3β -OHTIB. Foi observado ainda que diferentes tecidos apresentam perfis metabólitos quantitativamente diferentes.

A farmacocinética da TIB e de seus metabólitos também foi estudada em mulheres no início da pós-menopausa (45-55 anos) e em mulheres já em um estágio tardio da pós-menopausa (65-75 anos) (TIMMER; VERHEUL; DOORSTAM, 2002). As determinações de TIB e seus metabólitos em plasma foram feitas por GC-MS (LQ = 0,1 ng mL^{-1}) da forma que foi descrita anteriormente por Verhoeven e colaboradores (VERHOEVEN; VOS; DELBRESSINE, 2002). Os resultados mostraram que a farmacocinética da TIB e seus metabólitos é semelhante nos dois grupos de mulheres estudados e que há bioequivalência das

doses de 1,25 e 2,5 mg de TIB no que diz respeito a extensão da absorção. Timmer e colaboradores também publicaram um outro estudo onde avaliaram a proporcionalidade de 3 doses de comprimidos de TIB (TIMMER; HOUWING, 2002). A determinação de TIB e seus metabólitos no plasma foi realizada por GC-MS (LQ = 0,1 ng mL⁻¹). Os resultados mostraram que a bioequivalência proporcional foi estabelecida para as doses de 1,25 e 2,5 mg, mas não entre estas e a dose de 5,0 mg.

A farmacocinética da TIB e de seus metabólitos também foi estudada após a administração de TIB em macacos e determinação de seus níveis de concentração em fezes, bile, urina e plasma por GC-MS e cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massa em *tandem* (LC-MS/MS) (VERHEUL et al., 2007). A TIB, 3 α -OHTIB e 3 β -OHTIB foram extraídas destas amostras por meio da extração em fase sólida. A TIB foi quantificada sem a necessidade de derivatização e os metabólitos 3 α -OHTIB, 3 β -OHTIB foram quantificados após derivatização usando o reagente Tri-Sil HTP em condições alcalinas e temperatura ambiente por GC-MS. O metabólito Δ 4-TIB foi quantificado por meio da LC-MS/MS após extração líquido-líquido com acetato de etila/hexano (50:50 v/v). Os valores do LD foram de 0,1 e 0,5 ng mL⁻¹ em amostras de urina e plasma e 0,5 a 2 ng/g em fezes e bile.

A combinação da espectrometria de massa de alta resolução com GC também foi empregada no estudo farmacocinético da TIB. Os principais metabólitos, 3 α -OHTIB e 3 β -OHTIB, foram monitorados em plasma após processo de extração líquido-líquido utilizando éter metil-terc-butílico e derivatização com trimetilsilano. O LD para ambos os metabólitos foi de 0,02 ng mL⁻¹ e os valores obtidos nos estudos de recuperação ficaram entre 82,5 e 108,0 %.

A cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massa (LC-MS) com ionização por electrospray foi empregada em um método para a determinação dos metabólitos da TIB e diversos outros hormônios *in vitro* e *in vivo* (PENNING et al., 2010). O método apresentou sensibilidade suficiente (LQ = 5 pg mL⁻¹) para quantificar hormônios esteroides em tumores de próstata e de mama, o que pode ajudar no diagnóstico e tratamento.

Um método para a determinação de somente 3 α -OHTIB por LC-MS/MS em plasma humano também foi localizado na literatura (CARDOSO et al., 2013). Segundo os autores, a opção por quantificar somente a 3 α -OHTIB é devido esta molécula ser considerada o metabólito majoritário ativo da TIB. Além disso, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) recomenda a quantificação desse metabólito no plasma de indivíduos para estudos de farmacocinética e/ou bioequivalência (ANVISA, 2020). A 3 α -OHTIB foi extraída por meio da extração líquido-líquido usando 1-clorobutano como solvente de extração e acetato

de ciproterona como padrão interno. Antes das análises, as amostras passaram por um processo de derivatização com isocianato de cloreto de 4-toluenossulfonila. Esse processo de derivatização já havia sido anteriormente descrito (ZUO et al., 2005) para a determinação dos isômeros 3 α -OHTIB e 3 β -OHTIB em plasma, com o intuito de melhorar a ionização por electrospray. As separações foram realizadas com uma coluna C18 e fase móvel composta de acetonitrila e água (72:28 v/v). Os autores concluíram que o método se mostrou específico, preciso e exato, com uma taxa de recuperação média de 94%.

O metabolismo da TIB em mulheres pós-menopausa também foi avaliado em outro estudo (VOS et al., 2002). Os metabólitos da TIB foram quantificados em amostras de urina, fezes e plasma usando HPLC-UV empregando uma coluna C18 e fase móvel composta por um gradiente de tampão acetato de amônio 0,1 mol L⁻¹ (pH = 4,2) (solvente A) e metanol (solvente B). A eluição foi realizada com gradiente linear de 25 a 90% do solvente B por 20 min e detecção em comprimento de onda fixado em 254 nm. Os resultados apresentados mostraram que o metabolismo da TIB em humanos é comparável ao observado em espécies animais. Além disso, o estudo mostrou que a TIB apresenta mais de uma via de metabolização, sendo que as principais vias metabólicas envolvem a redução no carbono 3 (Figura 1) e sulfatação dos metabólitos 3-hidroxi e da função hidroxi no carbono 7.

1.3 Drogas de abuso – 1-(3-clorofenil)piperazina (mCPP)

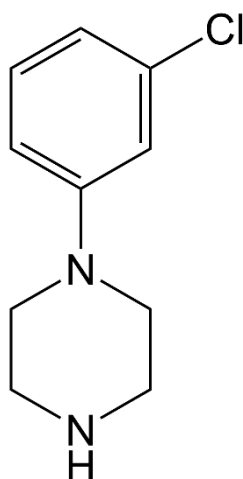
Nos últimos anos, houve um aumento na produção e consumo de drogas de abuso, também conhecidas como novas substâncias psicoativas (NPSs, do inglês, *new psychoactive substances*) ou ainda, “*designer drugs*”(KIRLA et al., 2018; LANARO et al., 2010). Entre as NPSs, os estimulantes do grupo das anfetaminas são um dos mais consumidos no mundo segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS) (LANARO et al., 2010). Entretanto, outros tipos de drogas vêm ganhando espaço como no caso das substâncias que pertencem ao grupo das piperazinas (STAACK et al., 2007).

As piperazinas são uma classe de compostos que contém como grupo funcional central uma piperazina, que consiste em um anel de seis membros contendo dois átomos de nitrogênio em posições opostas. Muitos desses compostos apresentam propriedades farmacológicas e são biologicamente ativos, sendo utilizados como antifúngicos, antidepressivos, medicamentos antivirais e atuam ainda sobre os receptores de serotonina (KOVALEVA et al., 2008; LANARO et al., 2010; STAACK et al., 2007). As piperazinas são divididas em dois subgrupos: benzilpiperazinas, sendo a 1-benzilpiperazina a mais comumente

encontrada e, as fenilpiperazinas, onde as mais proeminentes desse grupo são a 3-trifluorometilfenilpiperazina (TEMPP), 1-(3-clorofenil)piperazina (mCPP), e 1-(4-metoxifenil)piperazina (MeOPP) (BARROSO et al., 2010; WOHLFARTH; WEINMANN, 2010).

A mCPP é uma piperazina sintética, N-substituída de fórmula molecular $C_{10}H_{13}ClN_2$ com pKa de 8,87 (BOSSONG; VAN DIJK; NIESINK, 2005). Esse composto também é um metabólito ativo produzido após o metabolismo de fármacos antidepressivos (fármaco sujeito a controle especial) como a trazodona, nefazodona e etoperidona (DORTA et al., 2018; LANARO et al., 2010). A estrutura molecular da mCPP é apresentada na Figura 2.

Figura 2. Estrutura molecular da mCPP.



Fonte: O autor.

A mCPP apresenta efeitos de estimulante com sensação de euforia e alucinação, muito similares aos efeitos causados pela 3,4-metilenodioximetanfetamina (MDMA, ecstasy) devido ao seu mecanismo de ação. Por isso, esse composto vem sendo introduzido no mercado de drogas ilícitas como uma alternativa ao MDMA devido a seus efeitos, porém, sem apresentar potencial neurotóxico (BOSSONG et al., 2010; EL-NABY, 2019; KOVALEVA et al., 2008). Além disso, a mCPP apresenta efeitos subjetivos ansiogênicos, sedativos e de disforia (TANCER; JOHANSON, 2001).

A mCPP geralmente é encontrada na forma de comprimidos ou cápsulas e pode ser consumida oralmente, entretanto, também pode ser obtida na forma de pó e ser inalada ou ainda injetada (KOVALEVA et al., 2008). A maioria das amostras apreendidas são na forma de comprimidos que são vendidos como “ecstasy” que em muitos casos, inclusive, também

contém MDMA em sua composição juntamente com a mCPP (BOSSONG et al., 2010). A mCPP é comercializada com diferentes nomes, tais como “*Arlequin*”, “*smarties*”, “*rainbow*”, “*Rolls Royce*”, “*regenboogies*”, “*arc-en-ciel*” e “X4” (KOVALEVA et al., 2008). Os comprimidos de mCPP são similares em tamanho ao de um analgésico e, frequentemente, possuem desenhos e apresentam brilho, de forma semelhante aos comprimidos do MDMA fazendo com que não seja possível a distinção pela aparência entre estes dois tipos de drogas (ROCHA et al., 2020a).

As primeiras apreensões de mCPP ocorreram em 2004 na Suíça e na Holanda e, em seguida, essa droga passou a ser encontrada em quantidades significativas no mercado de substâncias ilícitas de diversos outros países da Europa como França, Bélgica e Áustria (BOSSONG; VAN DIJK; NIESINK, 2005; KOVALEVA et al., 2008). A primeira apreensão de mCPP no Brasil ocorreu no estado de Goiás em 2007 (LEITE; SANTOS, 2007) e, no ano seguinte, entre janeiro e maio, em São Paulo quando ainda não fazia parte das substâncias controladas no Brasil (LANARO et al., 2010). A mCPP, por meio da Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) n.79, publicada no Diário Oficial da União em 04/11/2008, passou a integrar a lista F2 da Portaria nº 344-98 da ANVISA, que elenca as substâncias psicotrópicas de uso proscrito no Brasil da qual também fazem parte substâncias como a MDMA e o tetra-hidrocanabinol, princípio ativo da maconha (LANARO et al., 2010; LEIS, 2009).

Na literatura estão disponíveis alguns trabalhos que propõe métodos analíticos empregando diversas técnicas para a determinação de mCPP em várias matrizes diferentes. Um destes trabalhos propõe a determinação de impurezas de mCPP em ingredientes farmacêuticos empregando LC-MS/MS (VENUGOPAL et al., 2019). O método apresentou linearidade entre 0,03 e 1,5 mg L⁻¹ com LD e LQ de 0,01 e 0,03 mg L⁻¹, respectivamente. Foram encontrados trabalhos que fazem a determinação de mCPP em amostras de fluidos biológicos utilizando GC-MS (REN et al., 2019). A faixa linear obtida foi de 0,1 a 100 µg mL⁻¹ com LD de 0,08 µg mL⁻¹ e LQ 0,1 µg mL⁻¹.

Também foram encontrados trabalhos que propõe métodos para a determinação de mCPP em cabelo humano (BARROSO et al., 2010) e urina de ratos (STAACK; MAURER, 2003). Métodos usando HPLC com detecção UV-Vis para a determinação de mCPP em amostras de plasma (HOLLAND; HEEBNER, 1991; WONG; MARZOUK, 1985) e em urina humana (MORENO et al., 2012) também foram encontrados. Além disso, HPLC com detecção coulométrica (FRANKLIN, 1992) também foi empregado.

Empregando técnicas eletroquímicas são encontrados três trabalhos que relatam métodos para a detecção de mCPP. Em um desses trabalhos, a detecção da mCPP é feita por

meio de um sensor potenciométrico (EL-NABY, 2019) que apresentou alta seletividade para a detecção de mCPP em relação a outras drogas psicoativas em amostras reais contendo na faixa de 10 a 200 mg de mCPP. Os outros dois trabalhos utilizaram técnicas voltamétricas para a detecção de mCPP, em um dos trabalhos (ROCHA et al., 2020a) foi usando eletrodo de BDD em uma célula convencional de três eletrodos. A faixa linear obtida foi de 3,5 a 400 $\mu\text{mol L}^{-1}$ com LD de 1,1 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Em outro trabalho, os autores (MARTINS et al., 2021) mostraram e estudaram o perfil eletroquímico de diversas substâncias psicoativas, entre elas, a mCPP. Além disso, foram realizados estudos para esclarecer o mecanismo de oxidação de compostos derivados da piperazina sobre o eletrodo de carbono vítreo.

1.4 Técnicas eletroquímicas

Existem várias técnicas eletroquímicas que são utilizadas em caracterizações ou determinações analíticas, dentre essas, a voltametria cíclica que é uma técnica muito utilizada devido a sua facilidade de utilização e versatilidade, para diversos fins. Frequentemente, a voltametria cíclica é empregada para se obter diversas informações importantes, tais como: (i) região de potencial onde determinada reação de oxidação e/ou redução ocorre para espécies eletroativas; (ii) mecanismo dessas reações, como reversibilidade do processo redox e número de prótons e elétrons envolvidos na reação redox e; (iii) informações sobre fenômenos que ocorrem na superfície do eletrodo de trabalho (GOSSER, 1993; PLETCHER et al., 2001).

Outra técnica eletroquímica bastante utilizada, é a voltametria de pulso diferencial (DPV, do inglês, “*differential pulse voltammetry*”), que é uma técnica onde são aplicados pulsos de potenciais com amplitudes fixas sobre uma rampa crescente de potenciais no eletrodo de trabalho. A corrente é medida antes e ao final da aplicação de cada pulso de forma a minimizar a contribuição da corrente capacitiva, sendo essa diferença registrada como resultado e usada para construção do voltamograma (DE SOUZA; MACHADO; AVACA, 2003; WANG, 2006).

Já a voltametria de onda quadrada (SWV, do inglês “*square-wave voltammetry*”) é uma das técnicas eletroquímicas mais utilizadas devido a sua sensibilidade e rapidez nas análises, além de permitir estudos cinéticos e de mecanismos de reações que ocorrem no eletrodo de trabalho (BARD; FAULKNER, 1980; ZACHOWSKI; WOJCIECHOWSKI; OSTERYOUNG, 1986). Na SWV é aplicada uma onda quadrada de amplitude simétrica no eletrodo de trabalho sobreposta a degraus de potenciais com incrementos definidos. As

correntes diretas e reversas são amostradas ao final de cada pulso de potencial aplicado para que o valor obtido tenha maior contribuição da corrente faradaica do que da corrente capacitiva. Isso ocorre devido a corrente capacitiva decair muito mais rapidamente com o tempo do que a faradaica. O voltamograma é obtido por meio da subtração do valor de corrente medido ao final do pulso direto (direção do pulso igual à direção da varredura) e do valor amostrado ao final do pulso reverso (direção do pulso contrária à direção da varredura). Como a corrente reversa na maioria dos casos tem sinal oposto ao da corrente direta ocorre uma somatória das correntes o que proporciona o aumento da sensibilidade da técnica para processos redox reversíveis (BARD; FAULKNER, 1980; DE SOUZA; MACHADO; AVACA, 2003; WANG, 2006).

1.5 Eletrodo de diamante dopado com boro

Diferentes tipos de materiais podem ser utilizados na produção de eletrodos de trabalho, dentre os quais carbono (diversos tipos), platina, ouro, prata e cobre se tornaram bastante populares para este fim. Isso se deve as características que esses materiais apresentam como versatilidade, adequação para serem usados como sensores em diversas aplicações, alta condutividade, baixa corrente de fundo, quimicamente inertes, faixa de potenciais de trabalho adequada para muitas aplicações e baixo custo (STRADIOTTO; YAMANAKA; ZANONI, 2003; WANG, 2006).

Entre os diversos eletrodos a base de carbono que são utilizados na eletroquímica, o eletrodo de diamante dopado com boro (BDD, do inglês, “*boron doped diamond*”) vem tendo certo destaque devido a suas características, tais como: corrente de fundo baixa e estável, faixa de potenciais de trabalho ampla em meio aquoso, cinética de transferência de elétrons relativamente rápida em relação a outros eletrodos e pouco suscetível a adsorção molecular (contaminação). Estes eletrodos são fabricados como um filme de diamante sobre um substrato condutor adequado, comumente Si e/ou Au (BALUCHOVÁ et al., 2019; ZOSKI, 2006).

O diamante é um material que apresenta rede cristalina onde os átomos de carbono estão ligados entre si por meio de ligações covalentes do tipo sp^3 com estrutura tetraédrica, o que confere ao diamante dureza, condutividade térmica e o torna eletricamente isolante devido ao seu *band-gap* da ordem de 5 eV. Entretanto, quando devidamente dopado, o diamante passa a apresentar características condutoras devido a diminuição de sua resistividade e se torna um material promissor para ser utilizado como eletrodo. O dopante mais comum é o boro

(semicondutor tipo p) por apresentar energia de ativação menor como transportador de carga (0,37 eV). O boro é adicionado à níveis de dopagem de 1×10^{-19} de átomos de boro por cm^3 ou superior e, geralmente o boro é obtido de fontes como o diborano (B_2H_6) ou o trimetilborano $\text{B}(\text{CH}_3)_3$, entretanto, a utilização desse último adiciona átomos de carbono extra à estrutura cristalina do diamante podendo causar mudanças em sua morfologia diminuindo sua qualidade, sendo assim, o emprego de B_2H_6 é preferido. A utilização de nitrogênio, fósforo e enxofre como dopantes também é possível, entretanto, todos apresentam baixa solubilidade ou alta energia de ativação (KRAFT, 2007; ZOSKI, 2006).

Os eletrodos de BDD podem ser produzidos pelo crescimento à alta-pressão/alta-temperatura (HPHT, do inglês “*high-pressure/high-temperature*”), no entanto, o método da deposição química a partir da fase vapor (CVD, do inglês, “*chemical vapor deposition*”) é mais empregado por ser mais econômico e difundido, além de permitir a produção de filmes de diamante em vários substratos e com tamanhos e formatos diferentes (BALUCHOVÁ et al., 2019; PLESKOV, 2002; ZOSKI, 2006).

O comportamento eletroquímico dos filmes de diamante foi descrito primeiramente em 1987 (PELSKOV et al., 1987). Neste estudo foi observado que as propriedades eletroquímicas do eletrodo de BDD poderiam ser alteradas por meio de pré-tratamentos. Posteriormente, diversos outros trabalhos relataram que a terminação da superfície do BDD resultante do processo de pré-tratamento eletroquímico é um fator crucial para a transferência de elétrons heterogênea e adsorvidade de compostos orgânicos, o que impacta diretamente no desempenho do BDD em medidas eletroanalíticas (GOETING et al., 2000; GRANGER, 1999; NOTSU et al., 2000; RAMESHAM, 1998; SWAIN, 2007; TERASHIMA et al., 2003). O pré-tratamento eletroquímico anódico promove a incorporação de átomos de oxigênio e radicais OH^\bullet na superfície do eletrodo devido a decomposição da água em potenciais superiores a +2,0 V ou altas densidades de correntes (BALUCHOVÁ et al., 2019; ENACHE et al., 2009; HOFFMANN et al., 2012). O pré-tratamento catódico realizado por meio da aplicação de potenciais de -2,0 V ou altas densidades negativas de corrente resulta na presença de átomos de H na superfície do BDD, o que o torna mais hidrofóbico do que quando com terminações em oxigênio, além de apresentar maior condutividade superficial (ANDRADE et al., 2011; HOFFMANN et al., 2010; MAIER et al., 2000; SUFFREDINI et al., 2004).

Em razão das características já mencionadas, os eletrodos de BDD ganharam uma gama de aplicações, sendo empregados na determinação de neurotransmissores (LOURENCAO et al., 2017; SMIRNOV et al., 2011; WONG; SANTOS; FATIBELLO-

FILHO, 2018), hidrocarbonetos aromáticos (CHÝLKOVÁ et al., 2017; ŠVORC et al., 2014; ZAVAZALOVA et al., 2015), constituintes do DNA e RNA (LUO; WU; ZHI, 2009; ŠVORC; KALCHER, 2014), fármacos (OLIVEIRA et al., 2016; PEREIRA et al., 2016; SILVA et al., 2017), componentes de bebidas e/ou alimentos (ALI et al., 2017; DEROCO et al., 2015; SANTOS; RANGEL, 2015), drogas de abuso (DA COSTA OLIVEIRA et al., 2019; ROCHA et al., 2020b), pesticidas (RIBEIRO et al., 2018; SELVA; REIS DE ARAUJO; CESAR DA PAIXÃO, 2015; SILVA et al., 2014), compostos presentes em matrizes biológicas (ASAI; IVANDINI; EINAGA, 2016; HAYASHI et al., 2012) e em biodiesel (DA SILVA et al., 2011; TORMIN et al., 2012), além de muitas outras aplicações disponíveis na literatura (BALUCHOVÁ et al., 2019; FREITAS et al., 2019; KRAFT, 2007; LOURENCAO et al., 2020; SOUSA et al., 2019). É importante salientar que como é observado nesses trabalhos, a escolha do pré-tratamento a ser empregado ao eletrodo de BDD dependerá da espécie química estudada.

2 OBJETIVOS

Os objetivos gerais são o desenvolvimento de métodos eletroanalíticos rápidos, simples e de baixo custo para determinação de analitos de interesse forense. Neste contexto, na Parte 1 da Tese, o foco foi direcionado na determinação do esteroide tibolona em amostras de saliva humana e farmacêuticas. Na Parte 2, a detecção dos metabólitos da tibolona (3α -hidroxitibolona e 3β -hidroxitibolona) em amostras de saliva humana e em urina sintética também foi estudada. Finalmente, na Parte 3, o desenvolvimento de um método para a triagem rápida e detecção de 1-(3-clorofenil)piperazina em amostras de interesse forense também foi desenvolvido.

2.1 Objetivos específicos

Os objetivos específicos do trabalho apresentados na Parte 1:

- Estudo do comportamento eletroquímico da tibolona em eletrodo de BDD;
- Proposição do mecanismo de oxidação eletroquímica da tibolona em eletrodo de BDD;
- Desenvolvimento de método para a determinação de tibolona empregando SWV;
- Aplicação do método desenvolvido em amostras de saliva e farmacêuticas.

Os objetivos específicos do trabalho apresentados na Parte 2:

- Estudo do comportamento eletroquímico da 3α -OHTIB e 3β -OHTIB em eletrodo de BDD;
- Desenvolvimento de método para a determinação da 3α -OHTIB e 3β -OHTIB usando DPV.
- Aplicação do método desenvolvido em amostras de saliva humana e urina sintética.

Os objetivos específicos do trabalho apresentados na Parte 3:

- Estudo do comportamento eletroquímico da mCPP usando SPCE como sensor;
- Propor o mecanismo de oxidação eletroquímica da mCPP usando SPCE como sensor.
- Desenvolvimento e aplicação do método desenvolvido para a triagem rápida de mCPP em amostras de referência e apreendidas.

3 PARTE EXPERIMENTAL

3.1 Instrumentação

3.1.1 Detecção eletroquímica

Todas as medidas eletroquímicas foram realizadas usando o potenciostato PGSTAT 128 N (Metrohm Autolab, The Netherlands) interfaceado a um computador e controlado pelo software NOVA 1.11. Os voltamogramas de SWV e DPV apresentados nessa tese tiveram a linha de base tratada para que a visualização dos picos ficasse mais evidente. O tratamento empregado foi o “*moving average*” presente no software NOVA 1.11.

3.1.2 Eletrodos utilizados

Nos trabalhos apresentados na Partes 1 e 2, o material de BDD foi utilizado como eletrodo de trabalho. O eletrodo de BDD foi adquirido da empresa NeoCoat SA - La Chaux-de-Fonds, Suíça). O eletrodo é uma placa a base de silício (0,7 x 0,7 cm) com espessura de aproximadamente 1,2 mm coberta com fino filme de diamante (1,2 μm) com nível de dopagem de boro de 8000 ppm. Sempre antes de ser utilizado para a realização das medidas eletroquímicas, o eletrodo de BDD era submetido a um processo de limpeza e/ou ativação eletroquímica. Esses procedimentos de limpeza podem ser realizados das seguintes formas:

- Ativação anódica – Aplicação de densidade de corrente de $+20,4 \text{ mA cm}^{-1}$ durante 1000 s em meio de solução tampão Britton-Robinson $0,04 \text{ mol L}^{-1}$ (pH = 2,0);
- Ativação catódica – Aplicação de densidade de corrente de $-20,4 \text{ mA cm}^{-1}$ durante 1000 s em meio de solução de H_2SO_4 $0,1 \text{ mol L}^{-1}$.

Estes procedimentos são semelhantes aos encontrados na literatura (OLIVEIRA et al., 2016; SALAZAR-BANDA et al., 2006). A ativação anódica sempre era realizada diariamente previamente ao uso do eletrodo de BDD. Após a realização desta, para o trabalho apresentado na Parte 1, a ativação catódica também era realizada. No trabalho apresentado na Parte 2 apenas a ativação anódica foi realizada diariamente antes do início dos estudos.

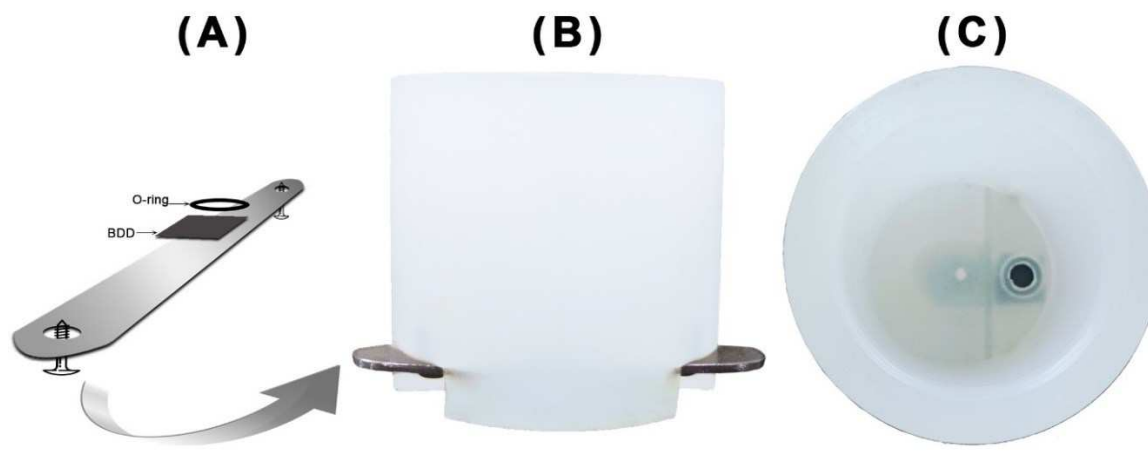
Em todos os experimentos usando BDD como eletrodo de trabalho, $\text{Ag}/\text{AgCl}|\text{KCl}_{\text{sat}}$ foi utilizado como eletrodo de referência. Este eletrodo foi preparado no próprio laboratório por meio da deposição de um filme de AgCl sobre um fio de Ag através da aplicação do potencial de +0,30 V em meio a uma solução de HCl 0,10 mol L⁻¹ durante 2,0 horas (PEDROTTI; ANGNES; GUTZ, 1996). O eletrodo auxiliar (contra-eletrodo) utilizado nestes estudos foi um fio de platina.

No trabalho apresentado na Parte 3 foi utilizado como eletrodo de trabalho o eletrodo impresso (SPCE, do inglês, *Screen-printed carbon electrode*) de carbono comercial, DRP 110 (Metrohm-DropSens – Oviedo, Espanha). O dispositivo consiste em uma placa de cerâmica com dimensões de 3,3 x 1,0 x 0,05 cm (comprimento x largura x espessura), onde estão impressos um disco de 4 mm de diâmetro constituído por carbono (eletrodo de trabalho – área = 0,13 cm²), o eletrodo auxiliar de carbono e um eletrodo de pseudo-referência de prata. As medidas voltamétricas utilizando este eletrodo foram realizadas empregando o método drop-casting, onde um volume de 100 µL de solução foi colocada diretamente sobre o SPCE.

3.1.3 Células eletroquímicas

As medidas eletroquímicas utilizando o eletrodo de BDD foram realizadas utilizando duas células eletroquímicas distintas, sendo as medidas por voltametria cíclica com o eletrodo de BDD realizadas usando a célula eletroquímica apresentada na Figura 3.

Figura 3. Célula eletroquímica convencional para uso de BDD como eletrodo de trabalho: **(A)** Esquema de fixação e contato elétrico do eletrodo de BDD na célula eletroquímica; **(B)** Vista lateral da célula eletroquímica e; **(C)** Vista superior da célula com o eletrodo de trabalho de BDD posicionado no fundo da mesma (área geométrica definida pelo O-ring - $0,13 \text{ cm}^2$).

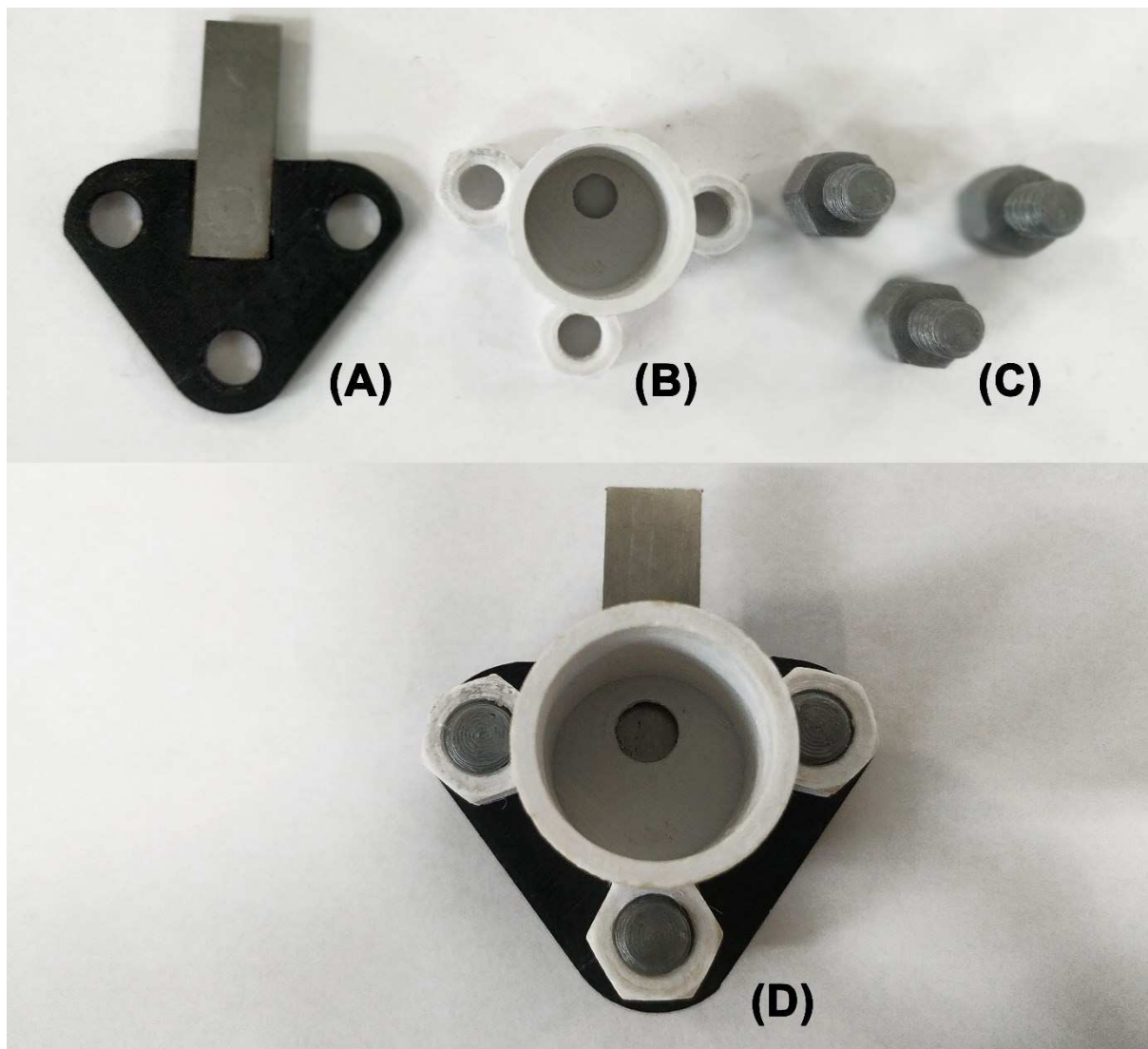


Fonte: O autor.

A célula eletroquímica apresentada na Figura 3 é construída com material de polipropileno possuindo diâmetro externo de 5 cm, diâmetro interno de 3,5 cm, altura de 4,5 cm e volume total de 25 mL. Como pode ser observado na Figura 3A, o eletrodo de trabalho de BDD (placa de 0,7 cm x 0,7 cm) foi posicionado na parte inferior da célula com a utilização de um anel de borracha (área do eletrodo = $0,13 \text{ cm}^2$) que delimitava a área geométrica do eletrodo. A placa de BDD foi fixada com o auxílio de uma placa metálica (contato elétrico) e parafusos.

Para a análise de amostras de saliva foi utilizada uma célula eletroquímica que permite a utilização de volumes reduzidos ($\sim 3 \text{ mL}$) construída por meio da impressão 3D utilizando o filamento de PLA (poliácido láctico) (CARDOSO et al., 2018). Cada parte da célula eletroquímica foi impressa separadamente e, posteriormente, montada para a realização das análises. Nesta célula, a área geométrica do eletrodo também é definida por um anel de borracha (área do eletrodo = $0,18 \text{ cm}^2$). Uma pequena placa metálica é utilizada como base para a realização do contato elétrico com o eletrodo de BDD. A Figura 4 apresenta a célula eletroquímica obtida por impressão 3D e utilizada nas análises de amostras de saliva. Em ambas as células (Figuras 3 e 4), os eletrodos auxiliar e referência foram posicionados na parte de cima das células com auxílio de garras ou suportes comuns de laboratório.

Figura 4. Célula eletroquímica impressa (impressão 3D) para uso de BDD como eletrodo de trabalho: **(A)** Esquema de fixação de contato elétrico do eletrodo na célula eletroquímica; **(B)** célula eletroquímica; **(C)** parafusos; **(D)** Célula eletroquímica obtida por impressão 3D montada (área geométrica definida pelo O-ring - 0,18 cm²).



Fonte: O autor.

3.2 Análises por cromatografia líquida de alta eficiência

As análises de amostras farmacêuticas de TIB também foram feitas por cromatografia líquida de alta eficiência com um detector de ultravioleta (HPLC-UV-Vis) com metodologia adaptada de um trabalho já disponível na literatura (DA ROSA et al., 2012). O sistema de HPLC era composto por uma bomba Hitachi L-2130, detector Hitachi LC-4250 UV-VIS e uma coluna Shim-pack CLC-ODS (octadecilsilano) (25 mm x 4,6 mm; Shimadzu). A fase

móvel foi composta por acetonitrila e água (70:30, v/v) a uma vazão de 1,0 mL min⁻¹. O detector foi fixado em 204 nm e o tempo de retenção de TIB foi de 3,45 min.

3.3 Soluções e reagentes

Todas as soluções aquosas utilizadas foram preparadas em água deionizada obtida de sistema de purificação (Millipore Bedford, MA, USA) com resistividade superior ou igual a 18 MΩ cm.

Todos os reagentes utilizados nos trabalhos descritos nessa tese eram de grau analítico e foram utilizados sem purificação prévia. A Tabela 1 apresenta todos os reagentes utilizados neste trabalho com sua respectiva procedência e pureza.

Tabela 1. Reagentes utilizados e suas respectivas especificações.

Reagente	Procedência	Pureza
1- (3-clorofenil)piperazina	UNODC	P.A.
3,4-metilenodioxipirovalerona	UNODC	P.A.
Acetato de etila	Synth	P.A.
Acetonitrila	Synth	P.A.
Ácido acético	Synth	99,7%
Ácido ascórbico	Vetec	99%
Ácido bórico	Sigma-Aldrich	99,8%
Ácido cítrico	Vetec	99,5%
Ácido clorídrico	Synth	37%
Ácido clorídrico	Synth	37%
Ácido fosfórico	Synth	85%
Ácido láctico	Vetec	85%
Ácido sulfúrico	Vetec	98%
Ácido úrico	Sigma-Aldrich	99%
Anfetamina	UNODC	P.A.
Benzilpiperazina	UNODC	P.A.
Bicarbonato de sódio	Synth	99,7%
Borohidreto de sódio	Sigma-Aldrich	99%
Cafeína	Sigma-Aldrich	99,99%
Cloreto de amônio	Synth	99%
Cloreto de cálcio dihidratado	Synth	78%

Cloreto de sódio	Synth	99%
Clorofórmio	Vetec	99,8%
Dihidrogenofosfato de potássio	Merck	99,5%
Etanol	Vetec	99,5%
Etilona	UNODC	P.A
Hidrogenofosfato de potássio	Merck	99,5%
Hidróxido de sódio	Vetec	98%
Mefedrona	UNODC	P.A
Metanfetamina	UNODC	P.A
Metanol	Vetec	99,8%
Metilendioximetanfetamina	UNODC	P.A
Metilona	UNODC	P.A
Sulfato de magnésio heptahidratado	Cinética Química	99%
Sulfato de sódio	Sigma-Aldrich	98%
Tetracloroeto de carbono	Dinâmica	99,5%
Tibolona	Pharma Mostra	98%
Ureia	Dinâmica	99%

As soluções estoques de TIB, 3 α -OHTIB e 3 β -OHTIB foram preparadas a partir da dissolução de quantidades adequadas de cada um de seus compostos em acetonitrila. A preparação das soluções estoque em acetonitrila foi necessária devido à baixa solubilidade destes compostos em água. Já a solução estoque de mCPP foi preparada por meio da diluição do padrão analítico de mCPP doado pelo Escritório das Nações Unidas sobre Drogas e Crime (UNODC, do inglês, *United Nations Office on Drugs and Crime*) em metanol.

As soluções de tampão Britton-Robinson (BR) de diversos pHs (2,0 a 10,0) utilizadas em experimentos descritos nessa tese foram preparadas pela mistura dos ácidos acético, fosfórico e bórico, todos em concentração de 0,04 mol L⁻¹. As soluções tampão BR nos diferentes pHs foram obtidas mediante adição de NaOH 1,0 mol L⁻¹ até valor de pH de interesse (medido com pHmetro Bel Engineering PHS3BW).

No estudo do comportamento eletroquímico da TIB, 3 α -OHTIB e 3 β -OHTIB por voltametria cíclica (uso de concentrações mais elevadas; ~ 0,5 mmol L⁻¹), as soluções de tampão BR foram preparadas com diferentes pHs e em seguida foi feita a adição de acetonitrila com proporção final de 75:25 (v/v) de tampão BR e acetonitrila, respectivamente. Isso foi necessário devido à baixa solubilidade da TIB, 3 α e 3 β -OHTIB em meio aquoso. Nos demais estudos por voltametria de onda quadrada e de pulso diferencial, tanto para TIB

quanto para 3 α -OHTIB e 3 β -OHTIB, a adição de acetonitrila ao tampão BR não foi necessária em função das concentrações empregadas nestes estudos (menores que 140 $\mu\text{mol L}^{-1}$).

3.4 Síntese do 3- α Hidroxitibolona e 3 β -hidroxitibolona

A 3 α -OHTIB e 3 β -OHTIB foram obtidas por síntese com a adição de 150 mg de borohidreto de sódio (NaBH_4) a uma solução de TIB 32,4 mmol L^{-1} (preparada em metanol). A mistura obtida foi agitada à temperatura ambiente por 24 h em frasco fechado. Em seguida, 5 mL de água deionizada foram adicionados na solução e o metanol foi evaporado sob pressão reduzida. O resíduo de água foi extraído com acetato de etila (3 x 50 mL). O resíduo obtido foi seco sobre sulfato de sódio, filtrado e concentrado sob vácuo.

A purificação do resíduo foi feita por cromatografia em coluna (sílica 60G 70-230 mesh; hexano: acetato de etila, 3:7, v/v) sendo obtida uma mistura de epímeros de 3 α e 3 β -hidroxitibolona com massa total de 285 mg. O produto foi caracterizado por RMN ^{13}C usando o espectrômetro Bruker Ascend™ 400 Avance III HD (9,4 Tesla) e o espectro obtido foi comparado com a literatura (COLOMBO et al., 2002). A síntese e purificação dos metabólitos da TIB foi realizada no laboratório do Núcleo de Pesquisa em Produtos Naturais (NuPPeN) da Universidade Federal de Uberlândia.

3.5 Amostras

As amostras de saliva foram coletadas de pessoas saudáveis (após higiene bucal) usando o dispositivo Salivette (Sarstedt AG & Co; Nümbrecht - Alemanha). Salivette é um swab sintético que é inserido na boca e mantido abaixo da língua por cerca de dois minutos para estimular a salivação (BEZERRA DA SILVA et al., 2011). Depois disso, o swab com a saliva absorvida foi colocado de volta ao tubo Salivette para centrifugação a 5000 rpm por 2 minutos. Neste procedimento, os volumes coletados estavam na faixa entre 1 a 2 mL. As amostras de saliva foram fortificadas com TIB ou 3 α - e 3 β -OHTIB (estudos de recuperação) e em seguida diretamente diluídas duas vezes no eletrólito de suporte. Todo o procedimento de coleta de amostras de saliva foi realizado conforme aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Uberlândia (CEP-UFU N° 37370920.6.0000.5152).

As amostras de urina sintética foram preparadas conforme descrito na literatura (BROOKS; KEEVIL, 1997), apresentando a seguinte constituição para o volume de 250 mL:

210 µL de ácido láctico, 0,1 g de ácido cítrico, 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, 0,525 g de NaHCO_3 , 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 , 2,5 g de ureia.

As amostras farmacêuticas contendo TIB foram adquiridas em farmácias locais (Uberlândia - MG) na forma de comprimidos. Na análise dessas amostras, 10 comprimidos contendo TIB foram pesados e triturados até a obtenção de um pó fino e homogêneo. Posteriormente, uma quantidade adequada do pó obtido foi dissolvida em acetonitrila para preparo da solução amostra. Em seguida, alíquotas dessa solução foram diluídas no eletrólito de suporte para posterior análise.

A amostra de referência contendo mCPP (40,1% e 59,9% m/m de excipientes) foi doada pela UNODC. A solução estoque da amostra referência foi preparada por meio da dissolução da amostra em metanol e para a realização das análises, esta amostra foi adequadamente diluída no eletrólito de suporte.

A identificação de mCPP também foi realizada em amostras apreendidas contendo MA ou MDMA (comprimidos) por meio da adição de mCPP. A presença de MA ou MDMA nessas amostras foi previamente confirmada por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas do tipo quadrupolo-tempo de voo (LC-Q-TOF-MS, do inglês, *liquid chromatography quadrupole time-of-flight mass spectrometry*). Todas as amostras foram obtidas após extração realizada no Instituto de Criminalística da Polícia Civil do Distrito Federal. Cada amostra (aproximadamente 100 mg) foi triturada, homogeneizada, diluída em 1 mL de metanol, sonicada por 10 min e, finalmente, diluída em metanol (para análise LC-Q-TOF-MS) ou em eletrólito de suporte (método proposto).

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 Considerações gerais

Os resultados e discussões dessa tese foram divididos em três partes. Na primeira parte serão apresentados e discutidos os resultados referentes ao estudo do comportamento eletroquímico da TIB por voltametria cíclica e método desenvolvido para a determinação de TIB e de seus principais metabólitos, 3 α -OHTIB e 3 β -OHTIB por SWV em amostras de saliva empregando o eletrodo de BDD e o método de adição de padrão. Para o TIB serão ainda apresentados os resultados para as análises de amostras farmacêuticas.

Na segunda parte da tese serão discutidos os resultados obtidos para o estudo do comportamento eletroquímico dos metabólitos da TIB (3 α -OHTIB e 3 β -OHTIB) e no desenvolvimento de um método de determinação dos metabólitos da TIB por DPV em amostras de urina usando o eletrodo de BDD como eletrodos de trabalho e o método de adição de padrão.

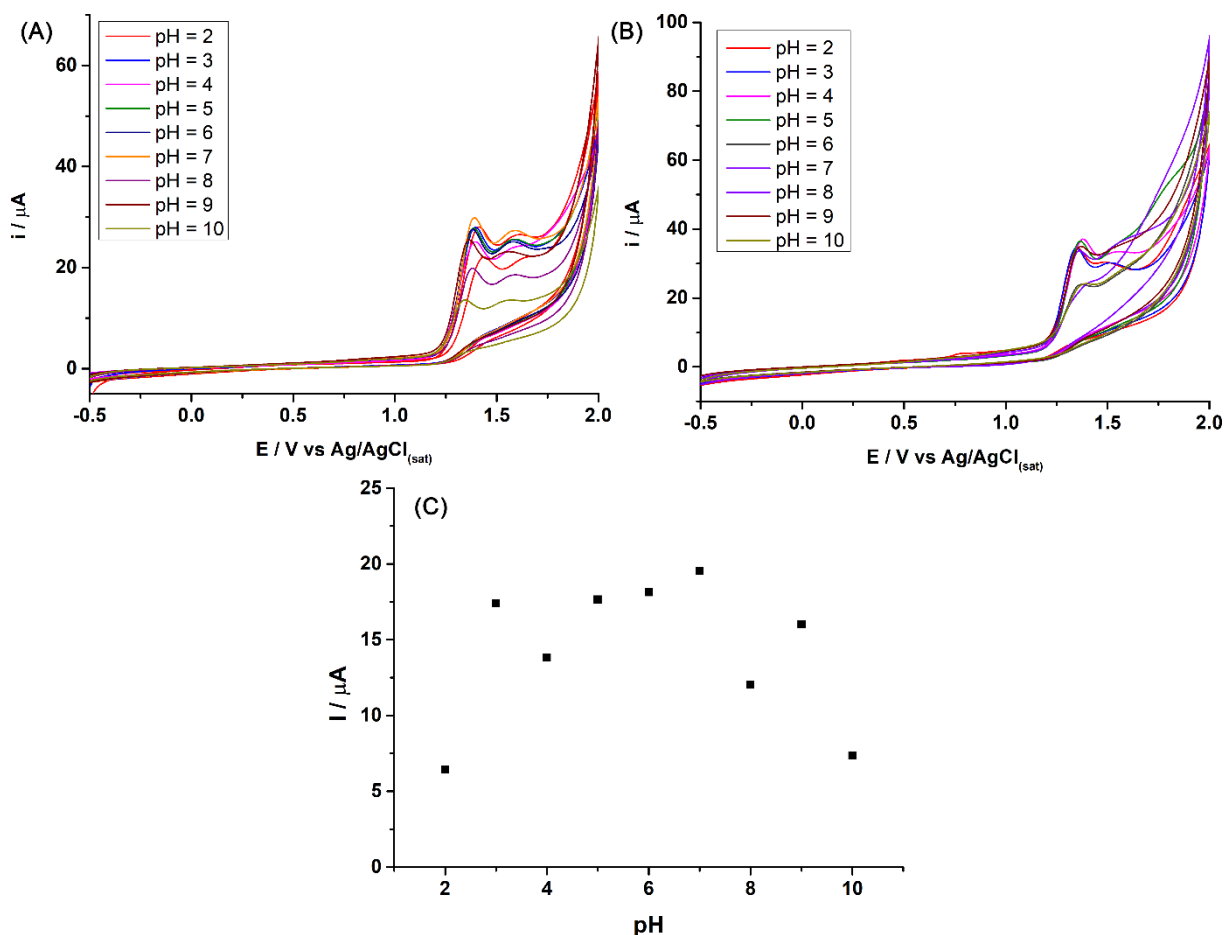
Na terceira parte serão apresentados os estudos realizados por voltametria cíclica para o estudo do comportamento eletroquímico da mCPP e os resultados relacionados com o desenvolvimento do método para a determinação de mCPP em amostras de referência e apreendidas empregando SPCEs de carbono e SWV.

Parte 1: Determinação de TIB em amostras de saliva

4.2 Comportamento eletroquímico da TIB em eletrodo de BDD

Inicialmente, o comportamento eletroquímico da TIB foi estudado por meio da voltametria cíclica empregando BDD como eletrodo de trabalho em eletrólito suporte composto por tampão BR $0,04 \text{ mol L}^{-1}$ e acetonitrila (75:25 v/v) com diferentes valores de pH (2,0 a 10,0). A adição de acetonitrila se fez necessária devido à baixa solubilidade da TIB em solução aquosa. Os estudos foram realizados após pré-tratamento anódico ou catódico do eletrodo de BDD. Os voltamogramas cíclicos na faixa de potencial de $-0,5$ a $+2,0$ V obtidos após os dois pré-tratamentos mostraram que o comportamento eletroquímico da TIB é irreversível, com dois picos de oxidação em $+1,38$ e $+1,60$ V (vs. $\text{Ag/AgCl}|\text{KCl}_{\text{sat.}}$) na varredura direta e sem picos catódicos na varredura reversa, como pode ser observado na Figura 5.

Figura 5. Voltamogramas cíclicos obtidos para uma solução de TIB $0,5 \text{ mmol L}^{-1}$ em tampão BR (pH = 2,0 a 10,0) e acetonitrila (75:25, v/v). **(A)** Ativação anódica e, **(B)** ativação catódica. Eletrodo de trabalho: BDD; **(C)** relação entre corrente de pico e pH obtidas após pré-tratamento anódico; incremento de potencial: 5 mV; velocidade de varredura 50 mV s^{-1} .



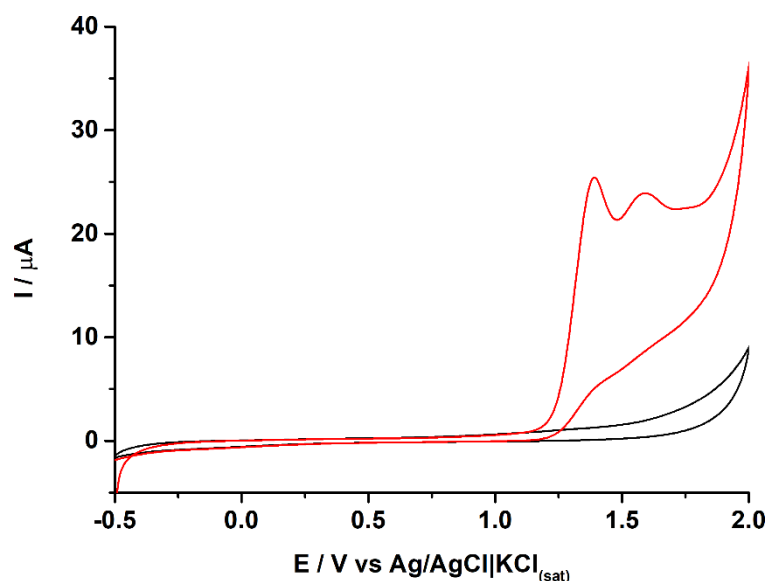
Fonte: O autor.

Como pode ser visto nos voltamogramas cíclicos da Figura 5, maiores correntes de pico para a oxidação da TIB foram obtidas utilizando a ativação catódica do eletrodo de BDD, entretanto, a estabilidade em medidas sucessivas foi menor (queda de 41%) do que as obtidas empregando o tratamento anódico (queda de 18%). Dessa forma, o pré-tratamento anódico do eletrodo de BDD foi utilizado para os estudos subsequentes. Nesta condição, os sinais voltamétricos eram mais estáveis e os picos de oxidação melhor definidos.

A partir dos resultados obtidos, o eletrólito suporte com pH = 7 foi selecionado para os testes posteriores devido a apresentar pico bem definido e elevado valor de corrente de pico (Figura 5C). Por esta razão, o comportamento voltamétrico da TIB também foi verificado no eletrólito suporte composto por tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH = 7,0) contendo acetonitrila

(75:25 v/v). A Figura 6 ilustra os voltamogramas cíclicos obtidos antes (linha preta) e após a adição (linha vermelha) de TIB $0,5 \text{ mmol L}^{-1}$. Em ambas as soluções tampão (BR e fosfato pH 7,0), resultados semelhantes foram encontrados, dessa forma, o tampão fosfato foi usado em estudos subsequentes.

Figura 6. Voltamogramas cíclicos obtidos antes (linha preta) e após a adição (linha vermelha) de TIB $0,5 \text{ mmol L}^{-1}$ em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ em pH 7 com acetonitrila (75:25, v/v). Incremento de potencial: 5 mV ; velocidade de varredura 50 mV s^{-1} .



Fonte: O autor.

Na literatura não foram encontrados trabalhos que abordam o mecanismo de oxidação eletroquímica da TIB. Dessa forma, alguns estudos foram realizados com o intuito de investigar como ocorre esse processo. As primeiras informações sobre o mecanismo de oxidação podem ser obtidas do estudo de pH apresentado na Figura 5 onde a relação do E_p com o pH fornece a quantidade de prótons envolvidos na reação de oxidação por meio da equação 1.

$$E_p = E^{0'} + \frac{0,059 m}{n} pH \quad Eq. (1)$$

Sendo,

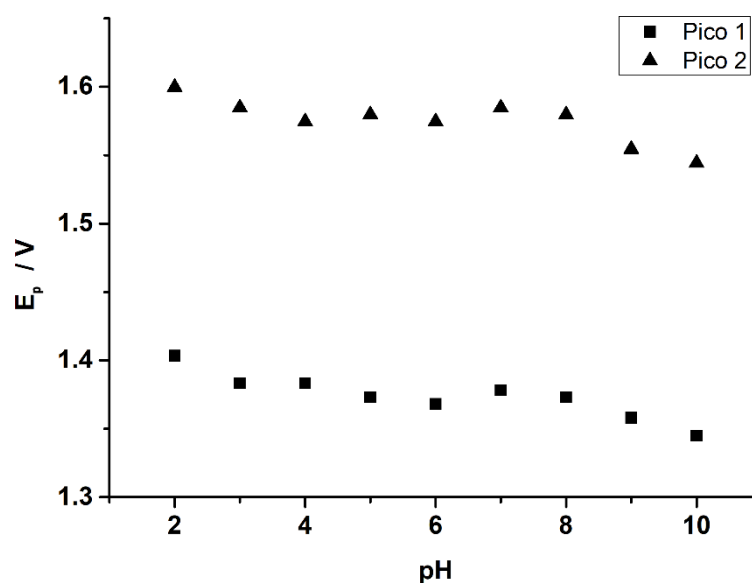
$E^{0'}$ – potencial formal;

m – número de prótons envolvidos no processo de oxidação eletroquímico;

n – número de elétrons envolvidos no processo de oxidação eletroquímico.

A Figura 7 apresenta as relações E_p vs pH obtidas por meio dos voltamogramas da Figura 5 para ambos os picos de oxidação da TIB.

Figura 7. Relação de E_p vs. pH para a oxidação eletroquímica de TIB. Eletrodo de trabalho: BDD; incremento de potencial: 5 mV; velocidade de varredura 50 mV s⁻¹.

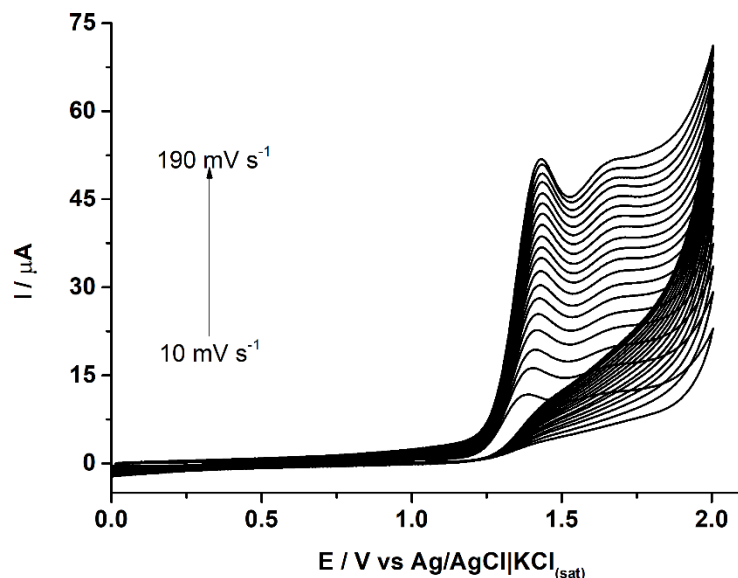


Fonte: O autor.

A partir do gráfico apresentado na Figura 7 é possível obter a relação E_p/pH e utilizá-la por meio da Equação 1 para determinar o número de prótons envolvidos no processo de oxidação. Porém, como pode ser verificado na Figura 7, os potenciais de pico de oxidação da TIB se apresentaram relativamente constantes em toda a faixa de pH estudada. Logo, esses resultados indicam que o mecanismo de oxidação eletroquímica do TIB independe do pH (SILVA et al., 2017; SU; CHENG, 2008).

Em seguida, o efeito da variação da velocidade da varredura da voltametria cíclica foi estudado, pois este estudo nos permite obter várias informações sobre o processo de oxidação da TIB. A Figura 8 apresenta os voltamogramas cíclicos obtidos para solução de TIB 0,5 mmol L⁻¹ com o aumento da velocidade de varredura de 10 a 190 mV s⁻¹.

Figura 8. Voltamogramas cíclicos obtidos em diferentes velocidades de varredura para TIB $0,5 \text{ mmol L}^{-1}$. Eletrólito suporte: tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ em pH 7 com acetonitrila (75:25, v/v); incremento de potencial: 5 mV ; velocidade de varredura 50 mV s^{-1} .

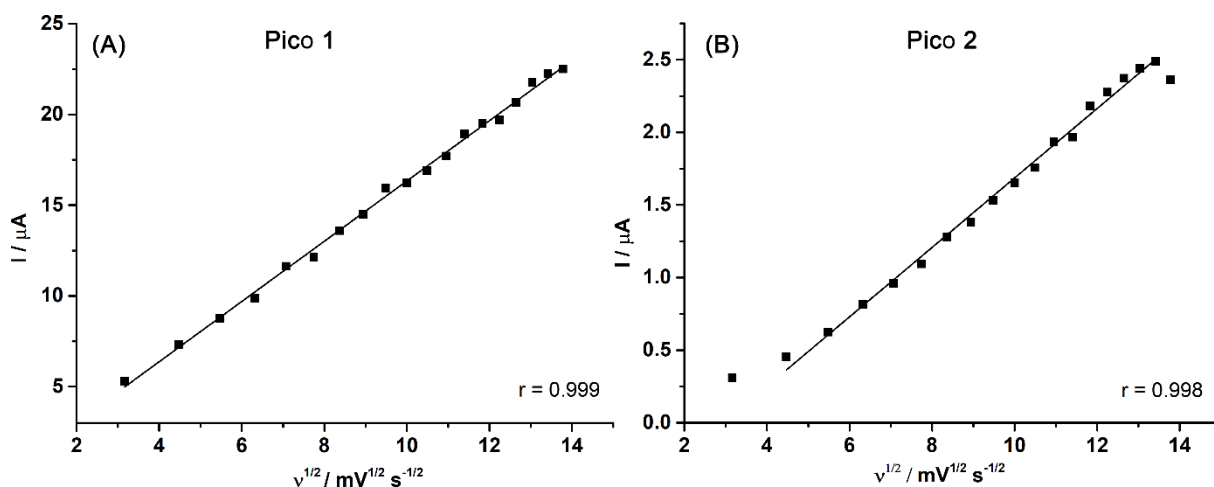


Fonte: O autor.

Como pode ser observado na Figura 8, não há a presença de picos na varredura catódica em todo o intervalo de potencial estudado, o que indica que o processo de oxidação é irreversível. A relação obtida entre I_p vs. $v^{1/2}$, apresentada na Figura 9, confirma essa informação, pois a relação é linear para ambos os picos de oxidação, como o previsto para sistemas irreversíveis pela equação de Randles-Sevcik (BARD; FAULKNER, 1980; EKLUND et al., 1999; PEREIRA et al., 2018).

Também é observado na Figura 8 que há uma pequena variação do potencial de pico para valores mais positivos com o aumento da velocidade de varredura, o que também é esperado para moléculas que apresentam processo de oxidação irreversível (BARD; FAULKNER, 1980). Entretanto, esta variação do E_p ocorre somente nas menores velocidades de varredura, provavelmente devido a cinética da velocidade da reação de oxidação da TIB ser lenta. Em velocidades maiores do que 80 mV s^{-1} , este fenômeno não é mais observado.

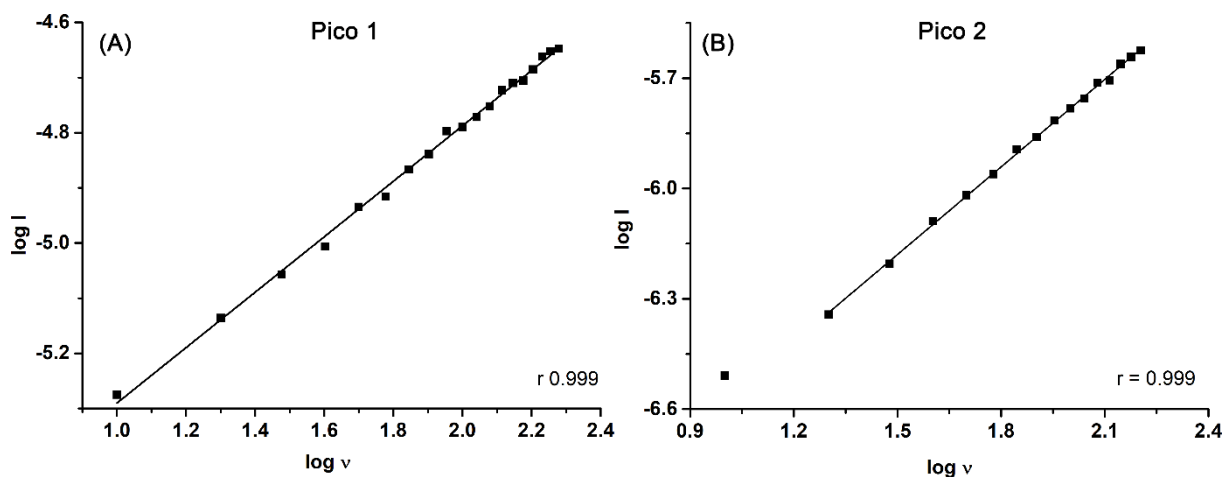
Figura 9. Relação entre corrente de pico de oxidação da TIB e $v^{1/2}$ para (A) pico 1 e (B) pico 2. Outras condições, ver Figura 8.



Fonte: O autor.

Por meio da variação da velocidade de varredura também é possível obter informações relacionados a cinética do processo eletroquímico. É possível identificar se a cinética de transferência de elétrons da reação de oxidação é controlada pelo processo de difusão das moléculas de TIB da solução para a interface eletrodo/solução ou pela adsorção das moléculas de TIB sobre o eletrodo de trabalho. Para essa finalidade foram plotados os gráficos que são apresentados na Figura 10 e que mostram a relação entre $\log I_p$ vs. $\log v$ para o pico 1 e 2 provenientes da oxidação da TIB.

Figura 10. Relação entre I_p vs $\log v$ para o (A) pico 1 e (B) pico 2 provenientes da oxidação da TIB.



Fonte: O autor.

Relações lineares foram obtidas para o pico 1 e 2 ($r = 0,999$) para os gráficos de $\log I_p$ vs. $\log v$ com coeficientes angulares de 0,502 e 0,794, respectivamente. Segundo a literatura, coeficientes angulares próximos a 0,5 indicam que a cinética da reação eletroquímica é preferencialmente controlada pelo processo de difusão das moléculas da solução até a superfície do eletrodo de trabalho. Já coeficientes angulares próximo a 1 indicam que a cinética do processo de oxidação é controlada preferencialmente pela adsorção das moléculas sobre o eletrodo (GOSSER, 1994).

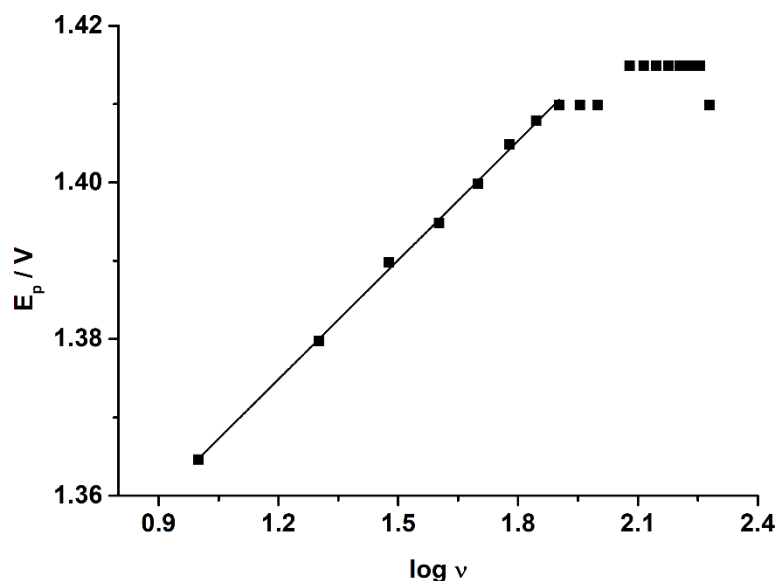
Para o primeiro pico de oxidação da TIB, o coeficiente angular de 0,502 indica que a cinética da oxidação eletroquímica da TIB tem maior influência do processo de difusão das moléculas até a interface eletrodo/solução. Já o pico 2 apresentou coeficiente angular igual a 0,794, o que sugere que a cinética do processo de transferência de elétrons tem influência tanto da difusão quanto da adsorção das moléculas sobre o eletrodo de trabalho. Essa mudança no fator predominante que controla a cinética de reação pode ser entendida e até mesmo esperada, pois como o pico 2 é proveniente do primeiro processo de oxidação, as moléculas de TIB inicialmente oxidadas continuam próximas a interface eletrodo/solução quando o segundo processo de oxidação ocorre, logo, é esperado que a difusão das espécies exerça uma influência pequena nesse segundo processo de oxidação.

Sabendo que o processo de oxidação da TIB é irreversível e conhecendo o fator que exerce maior influência na cinética de cada etapa do processo de oxidação, o número de elétrons envolvidos na oxidação eletroquímica da TIB pode ser determinado. Para processos eletroquímicos irreversíveis, a relação entre potencial de pico e a velocidade de varredura pode ser usada para estimar o número de elétrons envolvidos usando a Equação 2 (PLETCHER et al., 2001; SILVA et al., 2017):

$$E_p / \log v = 30 \text{ mV} / \alpha n \quad \text{Eq. (2)}$$

Onde E_p é o potencial de pico, v é a velocidade de varredura, α é o coeficiente de transferência de carga, e n é o número de elétrons transferidos. A Figura 11 mostra a relação entre E_p e o logaritmo da velocidade de varredura do pico 1 de oxidação da TIB presente nos voltamogramas cíclicos apresentados na Figura 8.

Figura 11. Relação entre E_p vs. $\log v$ para a oxidação eletroquímica da TIB (dados obtidos da Fig. 8).



Fonte: O autor.

Pode-se observar um comportamento linear com coeficiente de correlação igual a 0,999 para o intervalo de velocidade de varredura de 10 a 80 mv s^{-1} , como já discutido anteriormente. Por esta razão apenas este intervalo foi considerado para a estimativa do número de elétrons a partir da seguinte equação de reta (Equação 3):

$$E_p = 1,3139 + 0,0507 (\log v) \quad \text{Eq. (3)}$$

Portanto, o número de elétrons envolvidos na oxidação da TIB pode ser calculado por meio da Equação 2, usando o valor da inclinação da reta obtida na Equação 3 e considerando o valor do coeficiente de transferência de carga igual a 0,5. O valor de $\alpha = 0,5$ é normalmente utilizado para moléculas orgânicas em solução aquosa ou quando não se conhece o valor experimental (BARD; FAULKNER, 1980). O valor de αn foi então calculado e o valor de $n = 1,2$, o que indica que no primeiro pico de oxidação apresentado pela TIB ocorre a transferência de 1 elétron.

Como pode ser observado nas Figuras 6 e 8, a TIB apresenta um segundo pico de oxidação pouco definido, muito largo e com baixa intensidade de corrente de pico em comparação ao primeiro pico de oxidação. Em função disso, não foi possível construir o gráfico de E_p vs. $\log v$ com os resultados obtidos por voltametria cíclica a fim de se conhecer

o número de elétrons transferidos nesse segundo processo. Dessa forma, não é possível ainda propor um mecanismo para a oxidação da TIB. Outros experimentos que serão posteriormente discutidos nesta tese irão permitir que este cálculo seja realizado e, enfim, um mecanismo de reação eletroquímica proposto.

4.3 Otimização dos parâmetros da voltametria de onda quadrada

O desenvolvimento de um método analítico empregando a técnica de SWV requer a otimização de alguns parâmetros para que possa ser obtida a melhor resposta possível em relação a sensibilidade, perfil voltamétrico e reprodutibilidade dos resultados. Os parâmetros otimizados foram os seguintes: frequência de aplicação dos pulsos de potenciais (f), amplitude de pulso de potencial (a) e incremento de potencial (ΔE).

Antes de cada varredura de SWV, a solução foi agitada durante 15 s sem a aplicação de potencial, para apenas garantir a homogeneização da solução. Após esse tempo, a solução foi deixada em repouso para que a varredura da SWV ocorresse sem influência do processo de convecção. Os voltamogramas de SWV apresentados a partir desse tópico tiveram a linha de base tratada para que a visualização dos picos ficasse mais evidente. O tratamento empregado foi o “*moving average*” presente no software NOVA 1.11. O eletrólito suporte utilizado em todos os estudos por SWV era composto por tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ em pH 7. A adição de acetonitrila não foi necessária devido ao fato de que as concentrações de TIB empregadas eram baixas ($< 140 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$) e, portanto, solúveis no eletrólito usado nos estudos.

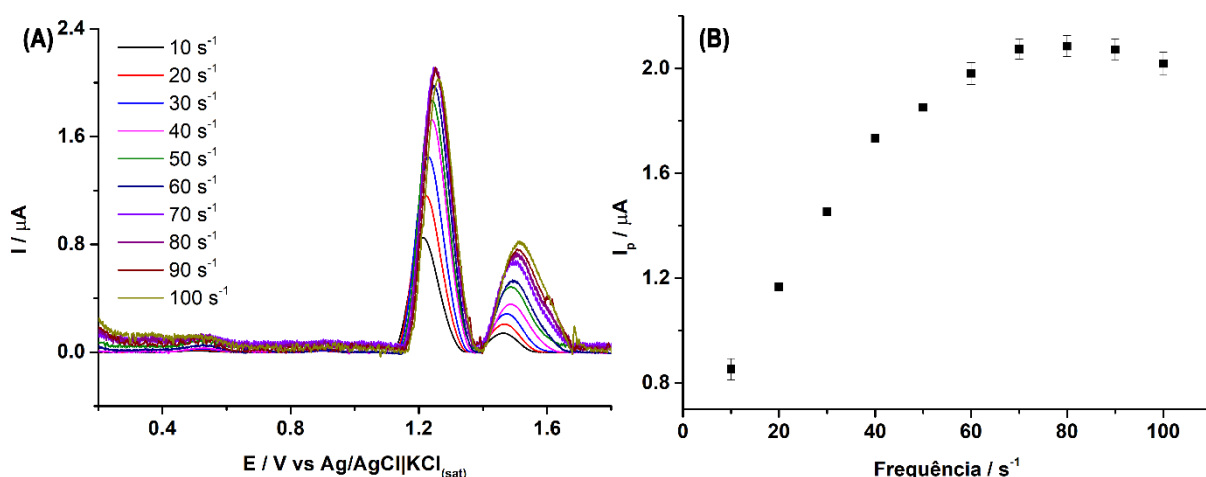
4.3.1 Otimização da frequência de aplicação dos pulsos de potenciais da SWV e estudo do mecanismo de oxidação do TIB

A otimização da frequência de aplicação dos pulsos de potenciais a ser usada na SWV não é apenas útil para obtenção de melhor resposta em termos de corrente de pico como também pode oferecer informações importantes sobre a reversibilidade do processo de oxirredução, cálculo de parâmetros como constante de transferência de carga (α) e número de elétrons transferidos (LOVRIC; KOMORSKY-LOVRIC, 1988).

O estudo para a seleção da frequência a ser utilizada foi realizado no intervalo de 10 a 100 s^{-1} , sendo a escolha realizada levando-se em consideração características como intensidade da corrente de pico, ruído da linha de base e alargamento (formato) do pico. A

Figura 12 mostra os voltamogramas obtidos nos estudos de variação da frequência de aplicação dos pulsos de potenciais para uma solução contendo $30 \mu\text{mol L}^{-1}$ de TIB, onde a amplitude de pulso foi fixada em 50 mV e o incremento de potencial em 2 mV .

Figura 12. (A) Voltamogramas de onda quadrada obtidos para $30 \mu\text{mol L}^{-1}$ de TIB em diferentes frequências de aplicação de pulsos de potenciais. (B) Relação I_p vs. f ($n = 3$). Eletrólito de suporte: tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ em pH 7; $a = 50 \text{ mV}$ e $\Delta E = 2 \text{ mV}$.



Fonte: O autor.

Como pode ser observado na Figura 12A, na SWV, a TIB apresenta dois picos de oxidação, o que condiz com os resultados obtidos por voltametria cíclica. É possível observar também que o aumento dos valores da frequência provocou o aumento da corrente e largura de pico e um pequeno deslocamento do potencial de pico da TIB para potenciais mais positivos. Em frequências mais altas podem ser verificados que os valores de corrente de pico se mantem relativamente constantes, entretanto, o ruído da linha de base aumenta e, por esta razão, a frequência de 40 s^{-1} foi selecionada para os estudos posteriores.

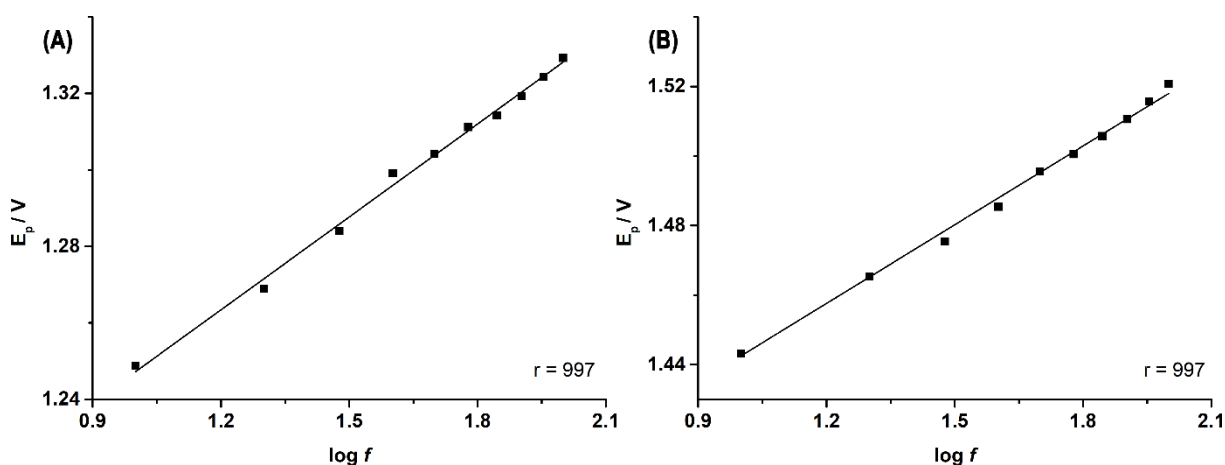
O estudo da variação da frequência também foi realizado com o intuito de se obter mais informações sobre o mecanismo de oxidação da TIB sobre eletrodo de BDD em meio de tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ em pH 7. Como também observado nos resultados obtidos por voltametria cíclica, o aumento da frequência (e, conseqüentemente, da velocidade de varredura da SWV) provocou o deslocamento dos potenciais de pico da TIB para valores mais positivos, o que é esperado para processos irreversíveis (DE SOUZA; MACHADO; AVACA, 2003). A partir dessa informação é possível determinar o número de elétrons envolvidos no processo de oxidação da TIB, já que nos processos totalmente irreversíveis existe uma relação

entre E_p vs. $\log f$ dada pela equação 4 (DE SOUZA; MACHADO; AVACA, 2003; SCHOLZ, 2010).

$$\frac{E_p}{\log f} = \frac{-2,3RT}{\alpha nF} \quad Eq. (4)$$

Onde E_p (V) é o potencial de pico, f é a frequência (s^{-1}), R é a constante dos gases $8,314 \text{ J K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$), T a temperatura (K), F a constante de Faraday ($96485 \text{ C mol L}^{-1}$), α é o coeficiente de transferência de carga e n é o número de elétrons transferidos no processo de oxidação. A Figura 13 mostra os gráficos obtidos para a relação entre E_p vs. $\log f$ para ambos os picos presentes nos voltamogramas observados na Figura 12A, sendo que para o gráfico apresentado na Figura 13A foi obtido coeficiente angular = 0,08139 (pico 1) e para o gráfico mostrado na Figura 13B o valor foi de 0,07693 (pico 2).

Figura 13. Relação entre E_p vs. $\log f$ para (A) pico 1 e (B) pico 2 de oxidação observados nos voltamogramas de onda quadrada da Figura 12 para o TIB.

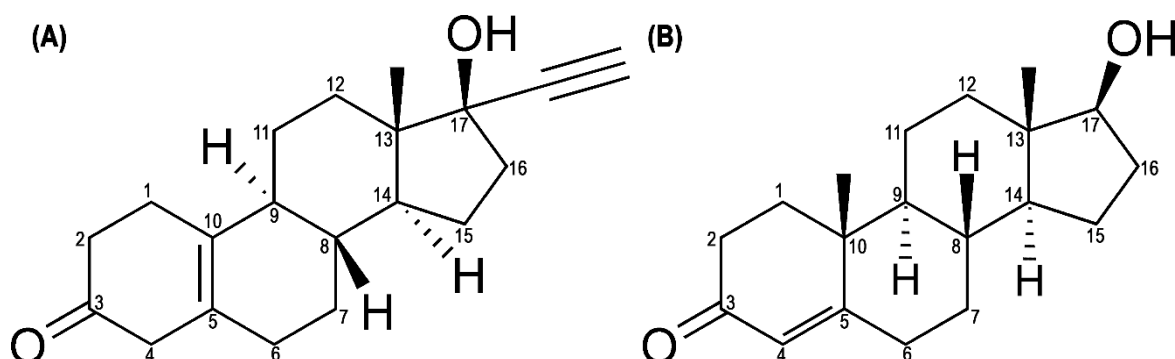


Fonte: O autor.

Como pode ser observado na Figura 13 existe uma relação linear ($r = 0,997$) entre o deslocamento dos potenciais de pico e o logaritmo da frequência de varredura. Dessa forma substituindo o valor dos coeficientes angulares obtidos a partir da Figura 13 para cada um dos picos de oxidação da TIB (0,08139 para o pico 1 e 0,07693 para o pico 2) na Equação 4 obtém-se o valor de $n = 1,4$. A partir destes valores, estamos sugerindo que em cada um dos processos de oxidação observados para a TIB há a transferência de 1 elétron. Essa informação está em acordo com o valor de n calculado por voltametria cíclica para o pico 1. Sabendo

quantos elétrons são transferidos no processo eletroquímico e que não há transferência de prótons em nenhum dos dois processos redox, pode-se começar a propor um possível mecanismo de oxidação. Além disso, deve ser levado em consideração também as estruturas das moléculas TIB e testosterona mostradas na Figura 14A.

Figura 14. Estrutura molecular da (A) TIB e da (B) testosterona.



Fonte: O autor.

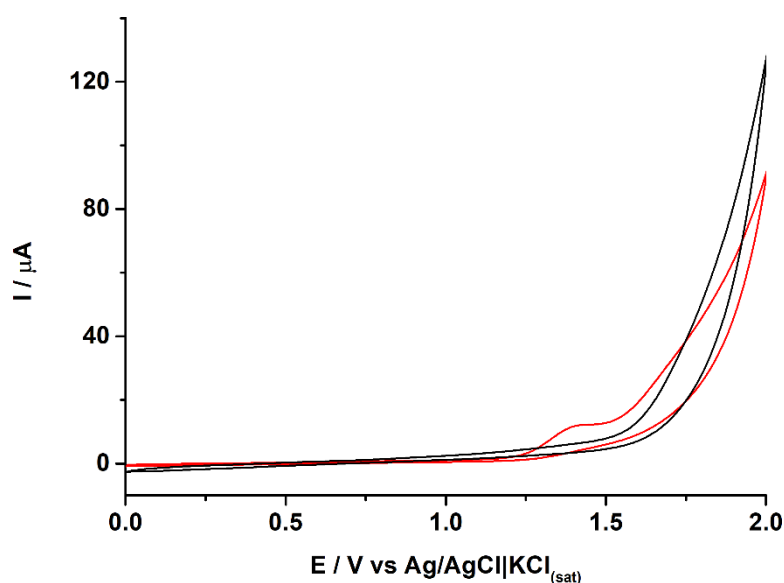
Como pode ser observado na Figura 14, a TIB, por se tratar de um esteroide, tem estrutura molecular semelhante à da testosterona. Ambas as moléculas apresentam um grupo cetona no carbono 3 e uma hidroxila no carbono 17. Essas semelhanças podem ajudar a compreender o mecanismo de oxidação da TIB já que estudos eletroquímicos sobre a testosterona são encontrados em alguns trabalhos na literatura (GOYAL; GUPTA; CHATTERJEE, 2010; LEVENT et al., 2015). A partir desses trabalhos pode-se verificar que a testosterona apresenta somente um processo de redução do grupo cetona do carbono 3. No entanto, nos estudos eletroquímicos sobre a TIB, a redução do grupo cetona não foi observada na faixa de potencial estudada.

No grupo hidroxila do carbono 17 existe a possibilidade de ocorrência de um processo de oxidação, entretanto, os resultados experimentais já apresentados mostram que não há transferência de prótons no processo de oxidação da TIB. O que também corrobora com esta conclusão é a testosterona, apesar de possuir o mesmo grupamento, também não apresenta processo de oxidação. Outra informação importante é que a TIB não apresenta pK_a , o que indica que na faixa de pH entre 0 e 14 não há a protonação ou desprotonação na molécula.

A partir dessas observações, outros fatores que podem influenciar no processo de oxidação da TIB foram estudados, como a possível influência da acetonitrila presente no eletrólito de suporte. Para verificar se a presença da acetonitrila exerceu influência nos resultados até então apresentados para o comportamento eletroquímico da TIB, a acetonitrila

foi substituída por metanol no eletrólito de suporte e novos estudos foram realizados. Nesses estudos, a solução padrão de TIB foi preparada apenas em metanol e no eletrólito de suporte foi adicionado 25% (v/v) de metanol ao invés de acetonitrila. Em seguida, o comportamento eletroquímico da TIB $0,5 \text{ mmol L}^{-1}$ foi estudado por voltametria cíclica em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ em pH 7 com metanol (75:25, v/v). Os resultados são apresentados na Figura 15.

Figura 15. Voltamogramas cíclicos obtidos antes (linha preta) e após a adição (linha vermelha) de TIB $0,5 \text{ mmol L}^{-1}$ em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ em pH 7 com metanol (75:25, v/v). Incremento de potencial: 5 mV ; velocidade de varredura 50 mV s^{-1} .



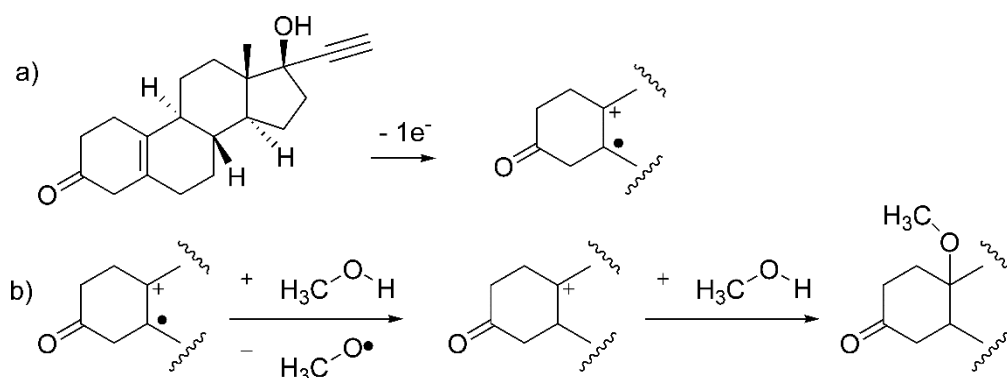
Fonte: O autor.

A Figura 15 mostra que nessas condições a TIB apresenta um pico de oxidação em $+1,38 \text{ V}$ conforme também foi observado quando acetonitrila foi utilizada como solvente e adicionada ao eletrólito de suporte (ver Figura 6). Entretanto, com o emprego de metanol, apenas um pico é observado, o que indica que apenas um processo de oxidação ocorre. Além disso, pode-se concluir que a presença da acetonitrila é fundamental para que o mecanismo de reação ocorra em dois processos distintos como observados nos voltamogramas das Figuras 6 e 12.

Com as informações obtidas da literatura (KLOUDA et al., 2017) e resultados apresentados até aqui, o mecanismo de oxidação eletroquímica da TIB em eletrodo de BDD foi proposto. Foi sugerido que o processo de oxidação observado em $+1,38 \text{ V}$ ocorre na ligação dupla na molécula da TIB (carbono 4) através da transferência de um elétron

resultando em um cátion radical, não dependendo do pH, como já discutido. Conforme descrito na literatura (KLOUDA et al., 2018), o cátion radical gerado pode reagir de maneira diferente em solvente prótico (metanol) ou aprótico (acetonitrila), o que explica os resultados diferentes observados quando um composto é substituído pelo outro. Enquanto com uso de metanol como solvente um pico de oxidação é observado, dois picos de oxidação são observados quando acetonitrila é usada na composição do eletrólito de suporte. Nos dois processos, ocorre um primeiro passo envolvendo a perda de um elétron na ligação dupla (Figura 16a). Em meio de metanol (Figura 16b), o hidrogênio do hidroxil é transferido por uma reação radicalar ao cátion radical formado, seguido pela adição nucleofílica de metanol, gerando o grupo funcional éter correspondente. A Figura 16 apresenta o mecanismo proposto para a oxidação da TIB emegando metanol na composição do eletrólito de suporte.

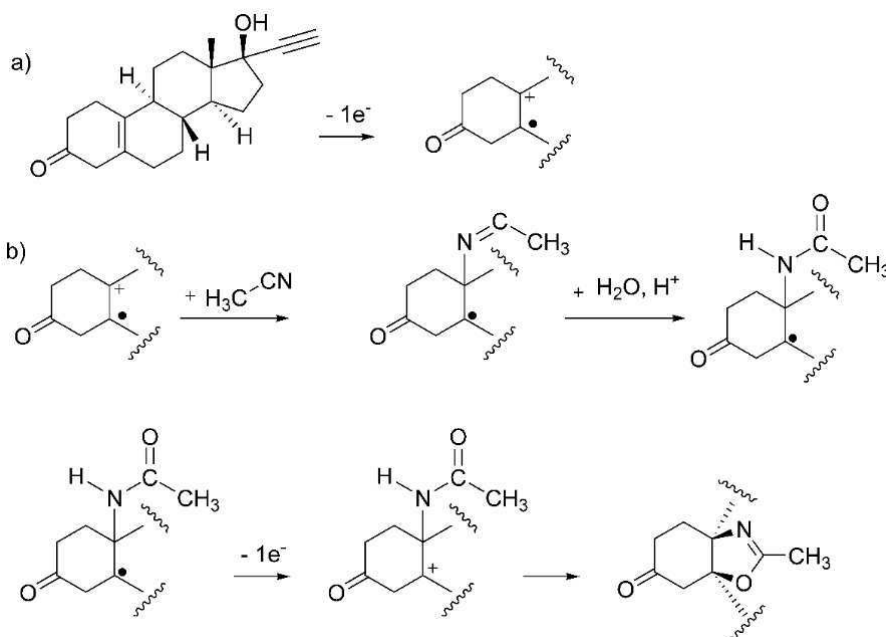
Figura 16. Mecanismo para a oxidação eletroquímica da TIB utilizando metanol na composição do eletrólito de suporte.



Fonte: O autor.

Quando a acetonitrila é usada na composição do eletrólito de suporte, ocorre o inverso, pois inicialmente acontece uma adição nucleofílica da acetonitrila ao cátion radical pela reação de Ritter (KLOUDA et al., 2018) e, o nitrogênio básico (base de Lewis) da acetonitrila ataca as espécies catiônicas seguida de hidrólise. Assim, ocorre um segundo processo de oxidação (em +1,60 V) com a perda de um elétron dando origem a um carbocátion (produto da segunda oxidação). A Figura 16 apresenta o mecanismo de oxidação para a TIB quando utilizado acetonitrila na composição do eletrólito de suporte.

Figura 17. Mecanismo para a oxidação eletroquímica da TIB sobre o eletrodo de BDD quando acetonitrila é usada na composição do eletrólito de suporte.



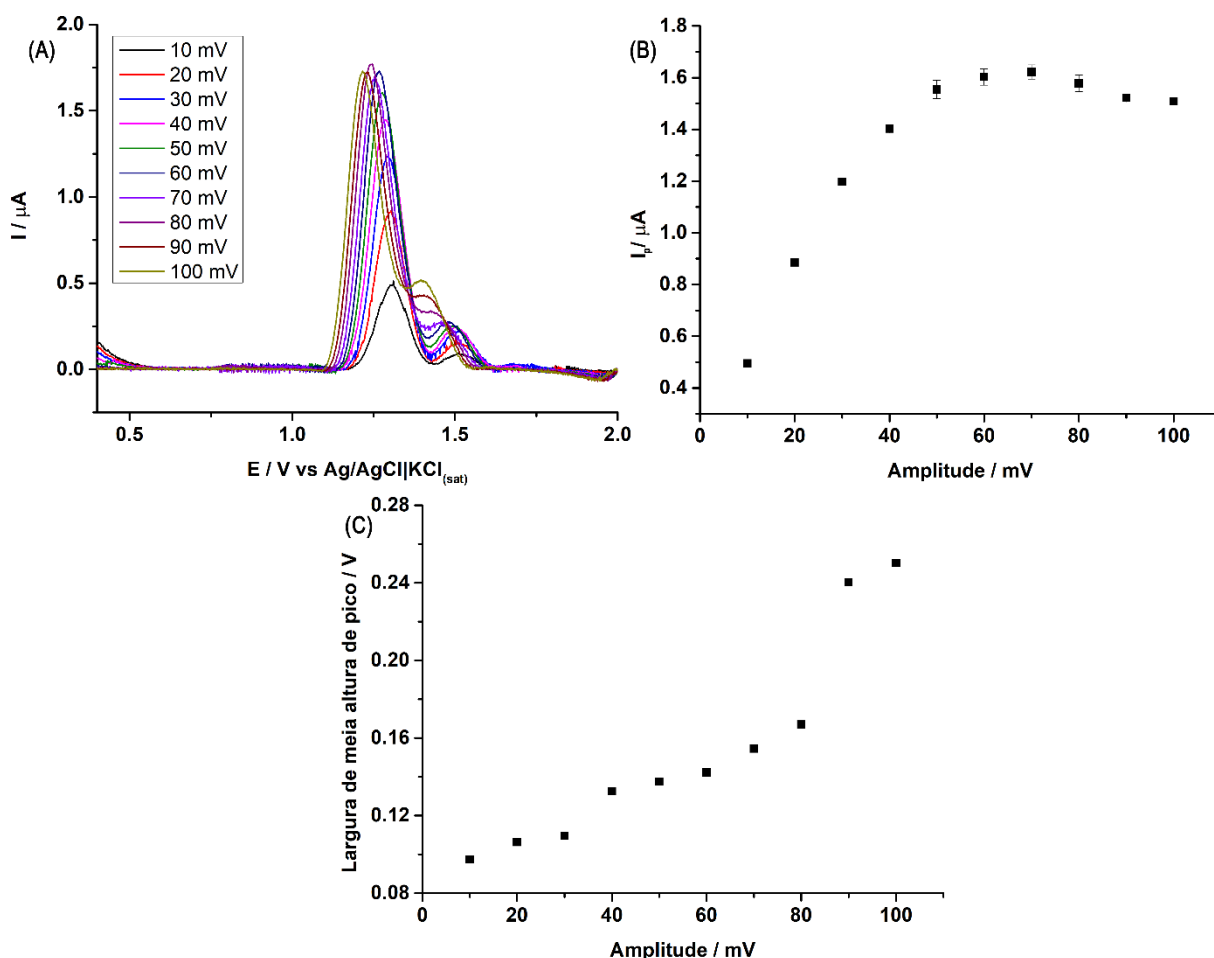
Fonte: O autor.

Comparando os dois mecanismos propostos pode-se perceber que com metanol a quebra homolítica ocorre primeiro, enquanto com acetonitrila primeiro ocorre a adição nucleofílica. A explicação para o mecanismo diferente é devido a entalpia da quebra homolítica da ligação para o grupo OH ($+21,0 \text{ kJ mol}^{-1}$) que é menor que a do CH da acetonitrila que é igual a $252,6 \text{ kJ mol}^{-1}$ (LUO, 2007).

4.3.2 Otimização da aplicação da amplitude de pulsos de potenciais

O efeito da variação da amplitude de aplicação dos pulsos de potenciais (a) no intervalo de 10 a 100 mV também foi estudado, sendo mantido constantes a frequência e o incremento de potencial em 30 s^{-1} e 2 mV, respectivamente. A Figura 18 apresenta os voltamogramas de onda quadrada obtidos, a variação da I_p e da largura de pico à meia altura com o aumento da amplitude de pulso de potencial aplicado para solução contendo TIB $30 \mu\text{mol L}^{-1}$.

Figura 18. (A) Voltamogramas de onda quadrada obtidos para a variação da amplitude de aplicação dos pulsos de potenciais para solução de TIB $30 \mu\text{mol L}^{-1}$. (B) Relação entre corrente de pico e variação da amplitude ($n = 3$). (C) Relação entre largura de meia altura de pico e variação da amplitude. Eletrólito de suporte: tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ em $\text{pH} = 7$; $f = 30 \text{ s}^{-1}$ e $\Delta E = 2 \text{ mV}$.



Fonte: O autor.

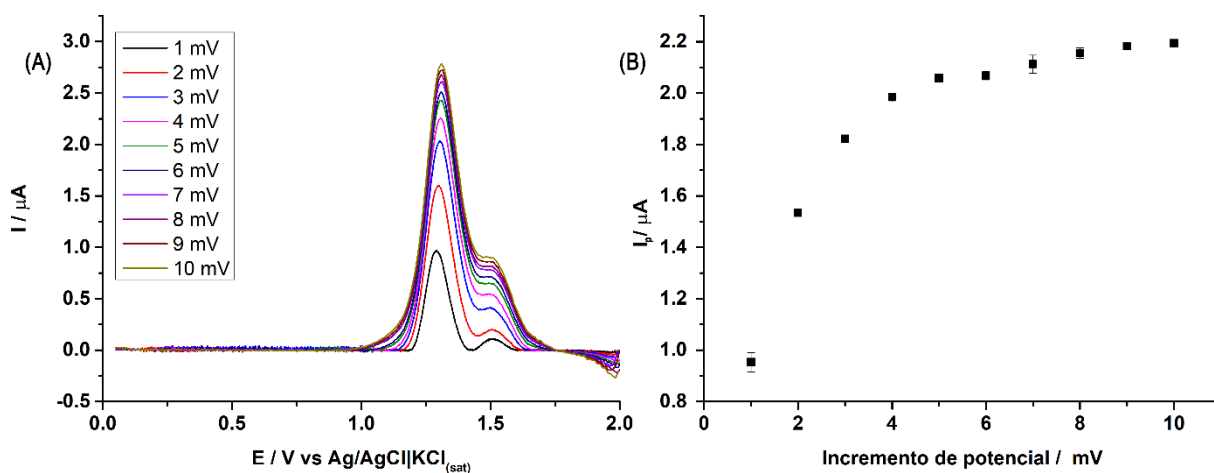
Como pode ser observado na Figura 18B, as correntes de pico obtidas para o TIB aumentam com o aumento da amplitude de 10 a 60 mV. Para valores acima de 40 mV, as correntes de pico se mantêm relativamente constantes. Além disso, o aumento nos valores de amplitude também provoca o alargamento do pico como pode ser observado na Figura 18C. Por essas razões, a amplitude de pulso de potencial selecionada para os estudos posteriores foi de 60 mV.

4.3.3 Otimização do incremento de potencial

O último parâmetro avaliado foi o incremento de potencial (ΔE), que é a diferença da altura de um degrau de potencial e o degrau seguinte em uma escada crescente de potenciais aplicadas ao eletrodo de trabalho. Além disso, a velocidade de varredura na SWV é dada pelo produto do incremento de potencial e a frequência de aplicação dos pulsos de potenciais (NUWER; O'DEA; OSTERYOUNG, 1991).

Mantendo a frequência e a amplitude fixas em 30 s^{-1} e 50 mV , respectivamente, o incremento de potencial foi estudado na faixa de 1 a 10 mV . A Figura 19 mostra (A) os voltamogramas obtidos e (B) a relação entre corrente de pico e a variação do ΔE .

Figura 19. (A) Voltamogramas de onda quadrada obtidos para a variação do incremento de potencial de 1 a 10 mV . (B) Relação entre corrente de pico e incremento de potencial para solução contendo TIB $30 \mu\text{mol L}^{-1}$ ($n = 3$); Eletrólito de suporte: tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ em $\text{pH} = 7$; $f = 30 \text{ s}^{-1}$ e $a = 50 \text{ mV}$.



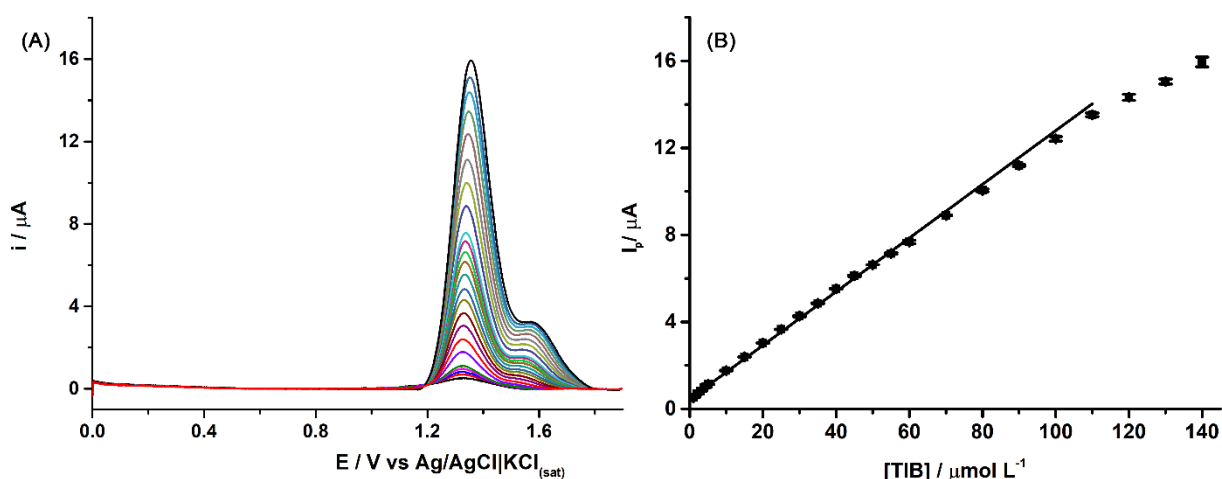
Fonte: O autor.

Observando o efeito da variação do incremento de potencial, pode ser verificado que com o aumento dos valores de incremento de potencial (1 a 4 mV) ocorre o aumento da corrente de pico, sendo esses valores tornando-se relativamente constantes a partir de 4 mV . Isso ocorre pelo conseqüente aumento da velocidade de varredura que promove a oxidação de uma quantidade maior de moléculas de TIB em um intervalo menor de tempo. A partir de 4 mV , a variação da corrente de pico é pequena, em virtude disso, o incremento de potencial selecionado para os estudos posteriores foi de 4 mV .

4.4 Estudo da faixa linear de resposta

Após a definição dos parâmetros otimizados para a técnica de SWV ($f = 40 \text{ s}^{-1}$; $a = 60 \text{ mV}$ e $\Delta E = 4 \text{ mV}$), estudos para determinar a faixa linear de resposta da TIB sobre o eletrodo de BDD foram realizados. A Figura 20A mostra os voltamogramas de SWV obtidos na análise de soluções contendo concentrações crescentes de TIB de 1 a $140 \mu\text{mol L}^{-1}$. A Figura 20B apresenta a relação entre correntes de pico e concentrações crescentes de TIB.

Figura 20. (A) Voltamogramas de onda quadrada obtidos para concentrações crescentes de TIB ($1 - 140 \mu\text{mol L}^{-1}$). (B) Respectiva curva de calibração obtida a partir dos voltamogramas apresentados ($n = 3$). Condições experimentais: $a = 60 \text{ mV}$; $f = 40 \text{ s}^{-1}$; $\Delta E = 4 \text{ mV}$. Eletrólito de suporte: tampão fosfato $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ pH = 7,0.



Fonte: O autor.

Observando os resultados apresentados na Figura 20, observa-se que há uma relação linear entre a I_p e a concentração de TIB ($r = 0,999$) para a faixa de 1 a $110 \mu\text{mol L}^{-1}$. O limite de detecção (LD) e o limite de quantificação (LQ) foram calculados em $0,3 \mu\text{mol L}^{-1}$ e $1,0 \mu\text{mol L}^{-1}$, respectivamente. O LD e o LQ foram calculados de acordo com as recomendações da IUPAC (MOCÁK et al., 1997). Sendo o cálculo do LD realizado por meio da Equação 5.

$$LD = \frac{3 \times DPb}{b} \quad Eq. (5)$$

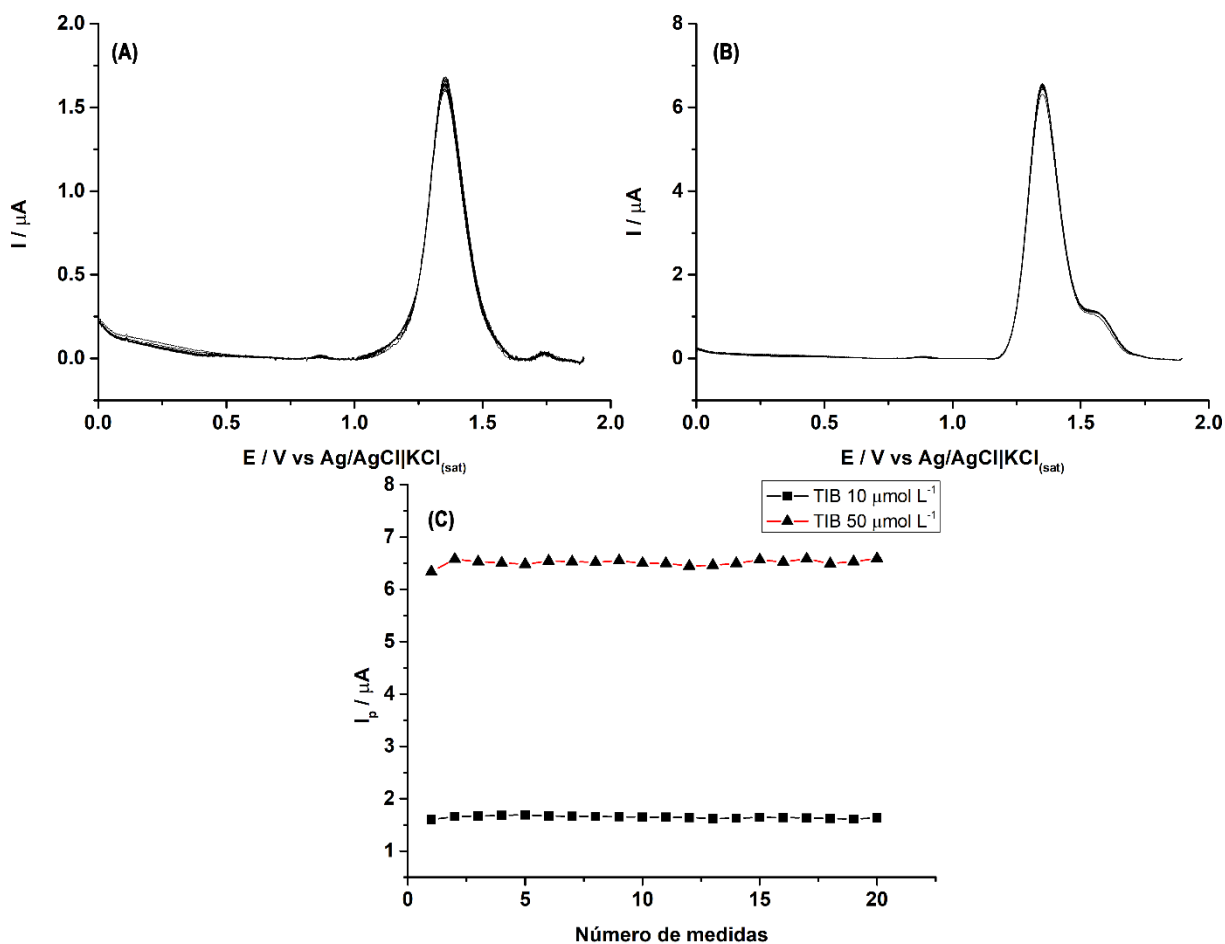
Onde, DPb é desvio padrão do ruído da linha de base do branco ($n = 10$) e b é a sensibilidade da curva de calibração (inclinação). Para o cálculo do LQ foi utilizada a Equação 6:

$$LQ = \frac{10 \times DPb}{b} \quad \text{Eq. (6)}$$

4.5 Repetibilidade do método

Após serem realizadas todas as otimizações da SWV e a definição da faixa linear de resposta da TIB, os estudos de repetibilidade do método proposto foram realizados. A Figura 21A e 21B apresenta os voltamogramas de SWV obtidos para medidas sucessivas (precisão intra-dia) para soluções contendo TIB 10 e 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$, respectivamente.

Figura 21. Voltamogramas obtidos por SWV para medidas sucessivas ($n = 20$) de soluções contendo TIB (A) 10 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e (B) 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$. (C) Relação entre corrente de pico e número de medidas realizadas. Condições experimentais, ver Figura 20.



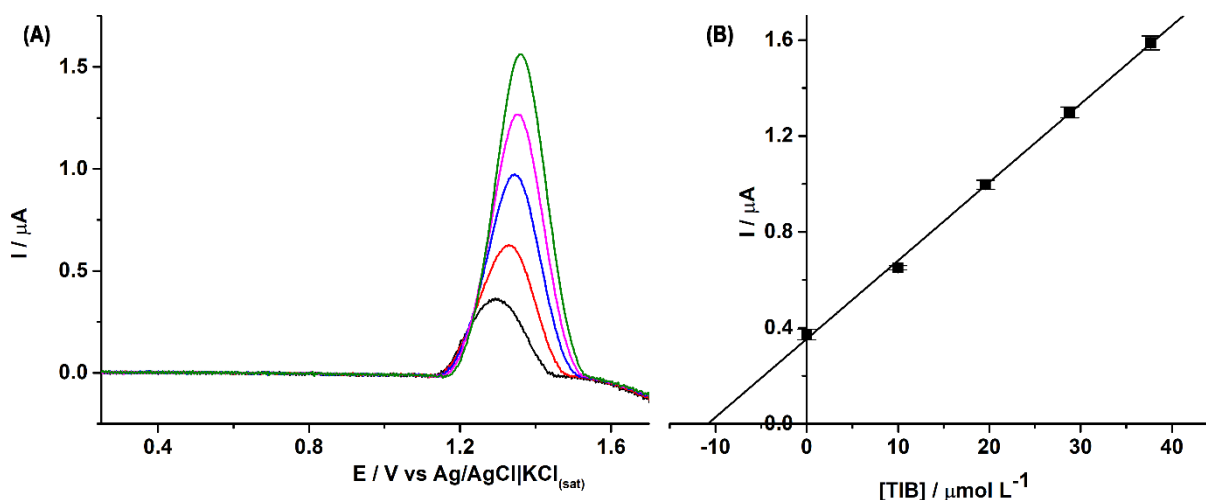
Fonte: O autor.

A Figura 21 mostra que as correntes de pico da TIB variam pouco ao longo das medidas, mantendo-se relativamente constante. É possível ainda perceber que não existe qualquer tendência de contaminação da superfície do eletrodo de BDD. Os valores de desvio padrão relativo (DPR) calculados foram de 2,4 e 1,0% para TIB 10 e 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$, respectivamente.

4.6 Análises de TIB em amostras de saliva

O desempenho do método de determinação de TIB por SWV foi empregado para as análises de amostras de saliva humana. Para a realização desse teste foram recolhidas diversas amostras de salivas de pessoas saudáveis com o auxílio do dispositivo Salivette® (tubo de coleta com swab sintético). Após a centrifugação, uma alíquota de 1 mL da saliva recolhida foi diluída (1:1) em tampão fosfato 0,1 mol L^{-1} com $\text{pH} = 7$. Em seguida foram feitas as análises de amostras de saliva pelo método de adição de padrão após fortificação com TIB. A Figura 22A mostra os voltamogramas de onda quadrada obtidos para uma amostra de saliva fortificada com 20 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de TIB e quatro adições de concentrações crescentes de TIB. A Figura 22B mostra a respectiva curva de calibração usando o método de adição padrão.

Figura 22. (A) Voltamogramas de onda quadrada obtidos para solução amostra de saliva fortificada com TIB e (B) Curva de adição de padrão obtida a partir dos voltamogramas de SWV apresentados ($n = 3$). Condições experimentais, ver Figura 20.



Fonte: O autor.

A Tabela 2 mostra os resultados obtidos nos testes de recuperação realizados com amostras de saliva dopadas com TIB $20 \mu\text{mol L}^{-1}$. Os valores médios de recuperação ($104\% \pm 3$) obtidos para as amostras de saliva indicam que o método proposto possui boa precisão para a determinação de TIB em amostras de saliva. Este resultado também mostra que os efeitos de matriz foram contornados pelo método de calibração por adição de padrão.

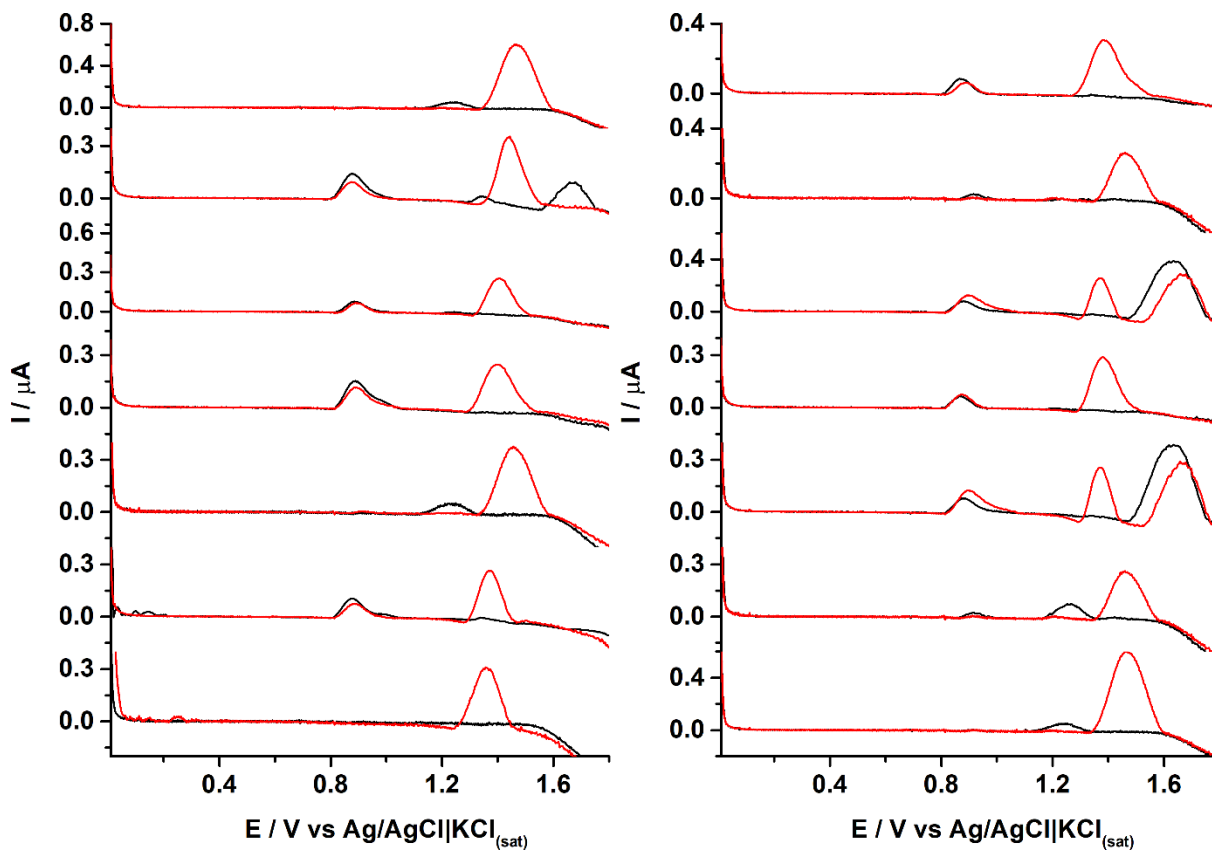
Tabela 2. Resultados (média \pm DP) obtidos para análises de amostras de saliva após a adição de TIB.

Amostra	[TIB] adicionada $\mu\text{mol L}^{-1}$	Encontrado $\mu\text{mol L}^{-1}$	Recuperado %
Saliva 1	20	$21,4 \pm 0,7$	107 ± 4
Saliva 2	20	$20,1 \pm 2,1$	101 ± 10
Saliva 3	20	$21,3 \pm 0,8$	106 ± 4

A Tabela 2 mostra que foram obtidos bons resultados de recuperação para as amostras de saliva analisadas empregados o método proposto. Como é proibido pela WADA o consumo de TIB por atletas, o método proposto pode apresentar aplicabilidade para a triagem rápidas (pré-análises) de amostras, por meio da simples detecção de TIB.

Entretanto, devido à grande variação na composição da saliva que pode ocorrer de um indivíduo para outro (HUMPHREY; WILLIAMSON, 2001), experimentos adicionais foram realizados para verificar a aplicabilidade do método proposto para a detecção seletiva de TIB em um número variado de amostras de saliva proveniente de pessoas diferentes e saudáveis (composição variada). A Figura 23 mostra os voltamogramas de SWV obtidos para a análise de 14 amostras de saliva (2 vezes diluídas em eletrólito de suporte) coletadas de diferentes pessoas saudáveis antes (linha preta) e após (linha vermelha) fortificadas com $10 \mu\text{mol L}^{-1}$ de TIB.

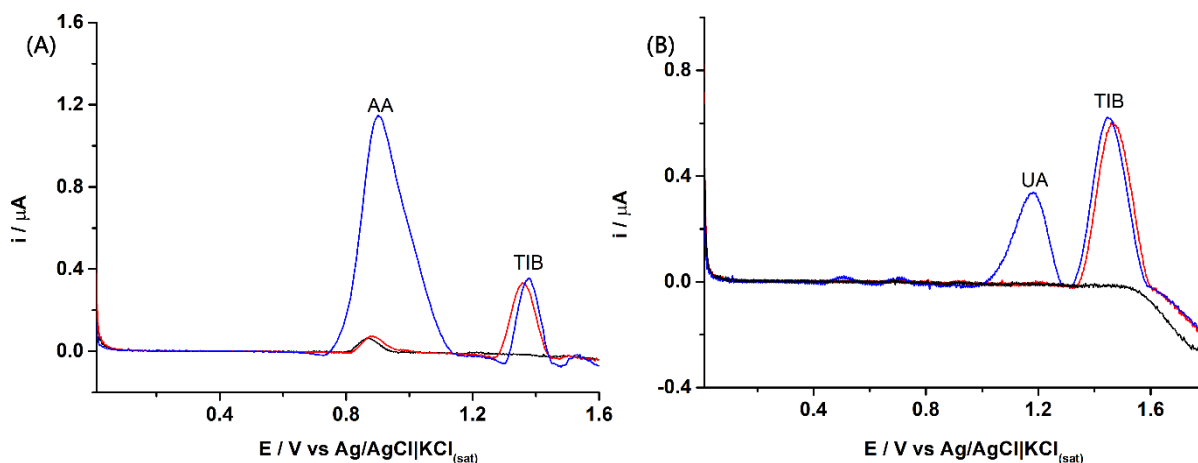
Figura 23. Voltamogramas de onda quadrada obtidos para amostras de saliva antes (linha preta) e após (linha vermelha) adição de TIB $10 \mu\text{mol L}^{-1}$. Condições experimentais, ver Figura 20.



Fonte: O autor.

Como pode ser observado na Figura 23, nas soluções amostras sem adição de TIB (linhas pretas), nenhum pico foi observado nos voltamogramas de SWV em todas as amostras testadas no intervalo de potencial onde a TIB é oxidada. O pico voltamétrico da TIB foi observado apenas após a adição de TIB em cada amostra. Esses resultados mostram que a triagem rápida e a quantificação seletiva de TIB em amostras de saliva é possível usando o procedimento proposto. Além disso, compostos eletroativos comumente encontrados em amostras de saliva humana como ácido ascórbico (AA) e ácido úrico (AU) (DEMKOWSKA et al., 2010; NGAMCHUEA; BATCHELOR-MCAULEY; COMPTON, 2018) foram avaliados como possíveis interferentes. A Figura 24 apresenta os voltamogramas de SWV obtidos antes e após a adição de AA e AU em solução contendo amostra de saliva diluída duas vezes em eletrólito de suporte com TIB $10 \mu\text{mol L}^{-1}$.

Figura 24. Voltamogramas de SWV obtidos para amostras de saliva **(A)** antes (linha preta) e após (linha vermelha) adição de TIB $10 \mu\text{mol L}^{-1}$ e (linha azul) adição de AA $20 \mu\text{mol L}^{-1}$. **(B)** antes (linha preta) e após (linha vermelha) adição de TIB $10 \mu\text{mol L}^{-1}$ e (linha azul) adição de AU $20 \mu\text{mol L}^{-1}$. Condições experimentais, ver Figura 20.



Fonte: O autor.

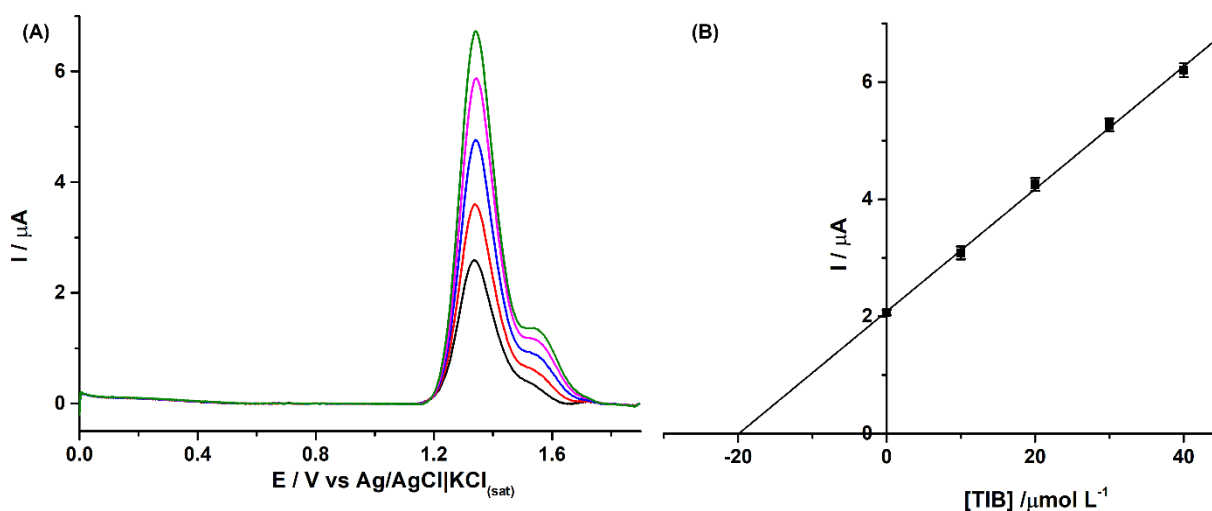
Como pode ser observado na Figura 24A, o AA apresenta pico de oxidação em +0,90 V enquanto o AU em +1,17 V que são potenciais menos positivos que o potencial de oxidação da TIB ($> +1,30$ V). Além disso, não foi observada variação significativa na resposta eletroquímica da TIB após a adição de AA ou AU. Pode-se observar também que os picos voltamétricos em +0,88 V e +1,20 V observados em algumas amostras reais de saliva (Figura 23), provavelmente, podem estar relacionados à presença de AA e AU nas amostras de saliva analisadas, respectivamente. Esses resultados também mostram que a concentração AA e AU em amostras reais provavelmente é menor que o valor de concentração adicionado às amostras fortificadas que foi de $20 \mu\text{mol L}^{-1}$ para ambos os compostos.

4.7 Análise de TIB em amostras farmacêuticas

Como a TIB é um fármaco vendido comercialmente e o método proposto se mostrou adequado para a quantificação de TIB, também foi proposto a aplicação do mesmo para a quantificação de TIB em amostras farmacêuticas. Para essas análises, as amostras foram adequadamente dissolvidas em eletrólito de suporte e o método de adição de padrão foi empregado nas análises. A Figura 25A apresenta os voltamogramas de SWV obtidos na análise de uma amostra adequadamente diluída em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ e a adição de

concentrações crescentes de TIB. A Figura 25B mostra a respectiva curva de calibração por adição de padrão obtida.

Figura 25. (A) Voltamogramas de onda quadrada obtidos para solução amostra e adições crescentes de TIB. (B) curva de adição de padrão obtida a partir dos voltamogramas ($n = 3$). Condições experimentais, ver Figura 20.



Fonte: O autor.

Os resultados obtidos com o método proposto na análise de duas formulações farmacêuticas contendo TIB foram comparados com os obtidos por HPLC (DA ROSA et al., 2012), que é a técnica comumente utilizada para estas análises. Os resultados obtidos são apresentados na Tabela 3.

Tabela 3. Resultados obtidos (média \pm DP) para determinação da TIB em amostras farmacêuticas por SWV e HPLC ($n = 3$).

Amostras	Valor da bula de TIB (mg/comprimido)	Valor obtido por SWV (mg/comprimido)	Valor obtido por HPLC (mg/comprimido)
Amostra 1	2,5	2,4 \pm 0,1	2,4 \pm 0,3
Amostra 2	2,5	2,4 \pm 0,2	2,3 \pm 0,4

O teste-t de Student para amostras pareadas foi utilizado para fazer a comparação entre os resultados obtidos pelo método proposto e HPLC. A partir dos resultados apresentados na Tabela 3, os valores de $t_{\text{calculado}}$ obtidos foram menores que o valor crítico teórico (2,78, para n

= 3), o que indica que os resultados obtidos com os dois métodos são estatisticamente semelhantes, com nível de confiança de 95%.

4.8 Conclusões parciais

O trabalho apresentado nessa primeira seção demonstrou, pela primeira vez, um método eletroquímico para a determinação de TIB em amostras de saliva humana de forma rápida e simples. A aplicabilidade do método proposto para a determinação seletiva de TIB em amostras de saliva foi cuidadosamente avaliada através de testes de triagem para TIB em catorze amostras reais de saliva. A detecção seletiva foi possível em todas as amostras após uma etapa simples de preparação da amostra (apenas diluição no eletrólito de suporte). O método é simples, de baixo custo, estável ($DPR < 2,4\%$; $n = 20$), preciso (valores médios de recuperação = $104\% \pm 3$) e pode ser usado em laboratórios com requisitos mínimos de infraestrutura. Além disso, o mecanismo para a oxidação eletroquímica da TIB foi proposto.

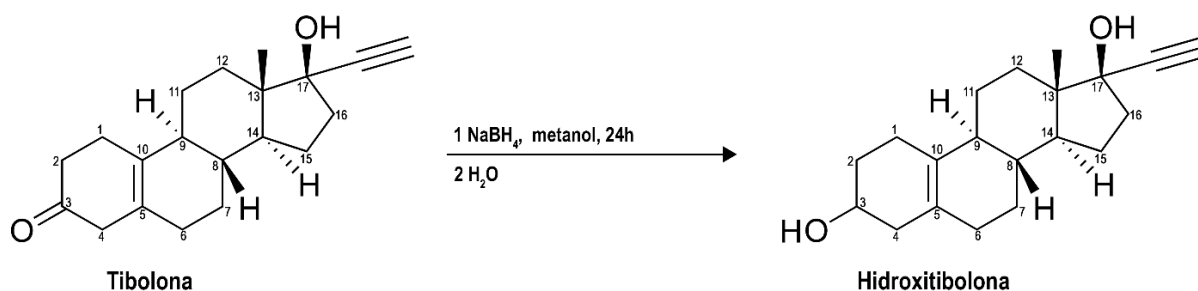
Finalmente, o método também se mostrou eficiente e preciso na determinação de TIB em formulações farmacêuticas. O método apresenta características como uso de pequenos volumes de amostras e reagentes e preparo de amostras simplificado (dissolução e diluição). Os resultados obtidos foram semelhantes aos obtidos por HPLC com nível de confiança de 95%.

**Parte 2: Determinação de
3 α -OHTIB e 3 β -OHTIB em
amostras de saliva e urina**

4.9 Síntese e espectroscopia de RMN do 3 α -OHTIB e 3 β -OHTIB

A TIB possui dois produtos (metabólitos) principais de seu metabolismo no organismo, os isômeros 3 α -OHTIB e 3 β -OHTIB, sendo que a diferença entre estas moléculas está apenas na configuração do grupo hidroxila do carbono 3. Esse grupo OH por sua vez é gerado por meio da redução do grupo cetona presente no carbono 3 da TIB. Dessa forma, para o desenvolvimento de um método de análise de amostras de urina com o intuito de verificar se houve o consumo de TIB se faz necessário a análise de seus metabólitos. Por esta razão, a obtenção dos principais metabólitos da TIB foi providenciada por meio de uma reação de síntese. A Figura 26 apresenta a reação simplificada de redução da TIB.

Figura 26. Redução química da TIB em 3 α -OHTIB.



Fonte: O autor.

Como pode ser visto na Figura 26, a síntese foi realizada em duas etapas, onde a primeira ocorreu por meio da reação química entre a TIB e NaBH₄ com o intuito de adicionar um átomo de hidrogênio ao carbono 3. Em seguida foi feita a adição de água ao meio para promover a formação da hidroxila no carbono 3 dando origem ao hidroxitibolona. Entretanto, o grupo OH pode apresentar duas configurações distintas, o que dá origem aos metabólitos 3 α -OHTIB e 3 β -OHTIB (TIMMER; HOUWING, 2002).

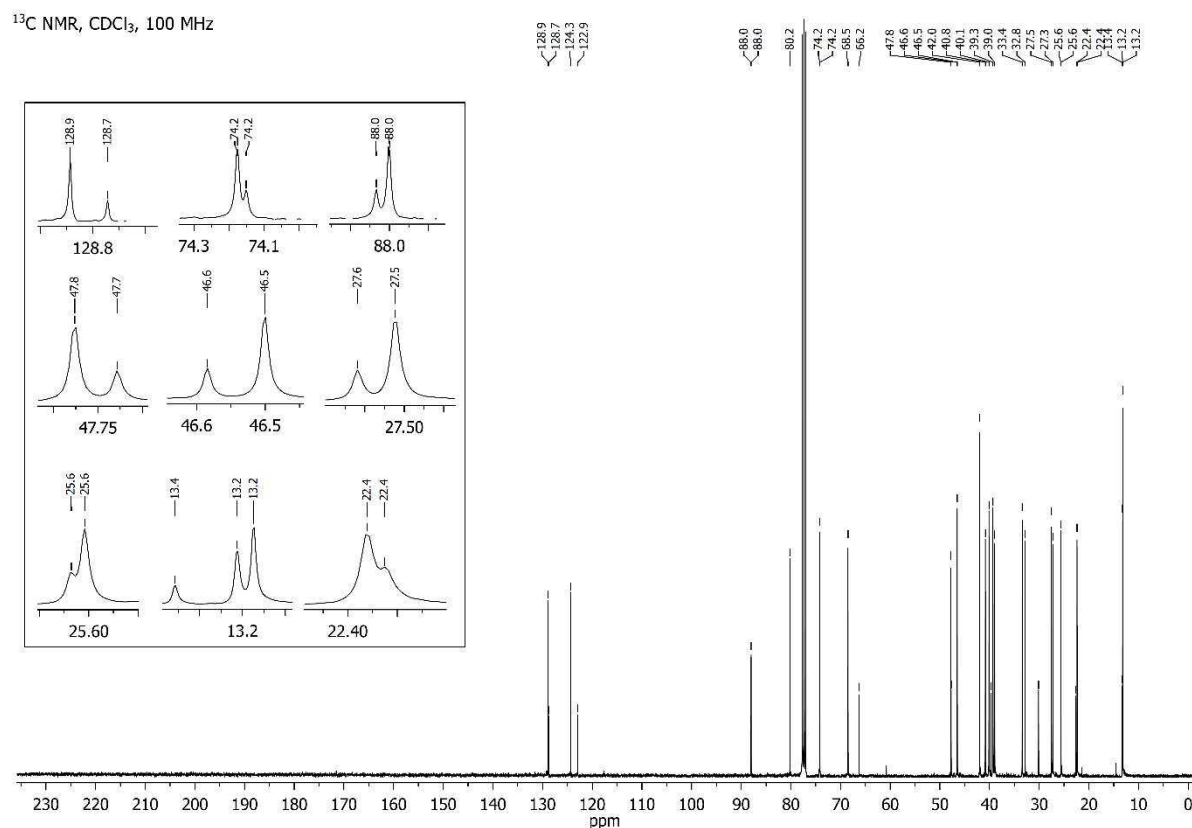
Após a síntese foi necessário determinar a estrutura do produto obtido na reação. Esse estudo foi realizado por meio da espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN) que permite determinar a estrutura completa de um composto. Empregando a RMN foram obtidos espectros de ¹³C que forneceram os deslocamentos químicos dos átomos de ¹³C que nos permitem identificar a quantidade e os tipos de átomos de carbono (metila, carbonila, aromático e outros) na molécula (PAVIA et al., 2010). A Tabela 4 apresenta os deslocamentos

químicos obtidos experimentalmente para o sólido obtido na síntese e os valores dos deslocamentos químicos dos núcleos de ^{13}C para o 3α -OHTIB e 3β -OHTIB disponíveis na literatura (COLOMBO et al., 2002).

Tabela 4. Deslocamentos químicos de RMN- ^{13}C (δ) da hidroxitibolona comparados com a literatura (mistura de epímeros).

N° C	Experimental δ (CDCl_3)		δ l (CDCl_3 - piridina)(COLOMBO et al., 2002)	
	3α	3β	3α	3β
1	27.5	22.6	27.1	23.2
2	32.8	30.1	33.1	30.8
3	68.5	66.2	67.3	65.1
4	40.8	40.1	41.2	40.1
5	124.3	122.9	124.6	123.4
6	38.9	39.7	38.9	39.5
7	27.2	27.5	27.5	27.5
7'	13.1	13.3	13.0	13.2
8	41.9	41.9	42.0	41.9
9	40.1	40.0	40.2	39.9
10	128.9	128.7	128.7	128.6
11	25.6	25.6	25.7	25.6
12	33.4	33.4	33.6	33.6
13	47.7	47.7	47.8	47.7
14	46.5	46.6	46.3	46.4
15	22.4	22.3	22.3	22.3
16	39.2	39.4	39.5	39.4
17	80.2	80.2	79.0	79.0
17'	88.0	88.0	89.5	89.6
17''	74.2	74.1	73.2	73.2
18	13.2	13.2	13.3	13.2

Como pode ser observado na Tabela 4, os resultados experimentais para os deslocamentos químicos obtidos para o produto da síntese estão em acordo com os valores disponíveis na literatura para o 3α -OHTIB e 3β -OHTIB. Esses resultados indicam que foi obtida uma mistura de epímeros como produto da reação, entretanto, a intensidade dos deslocamentos químicos do 3α -OHTIB no espectro indicam que o isômero 3α foi obtido em proporção muito superior ao 3β . A Figura 27 mostra os espectros de RMN obtidos para o produto da síntese do 3α -OHTIB.

Figura 27. Espectro RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) da 3α -OHTIB

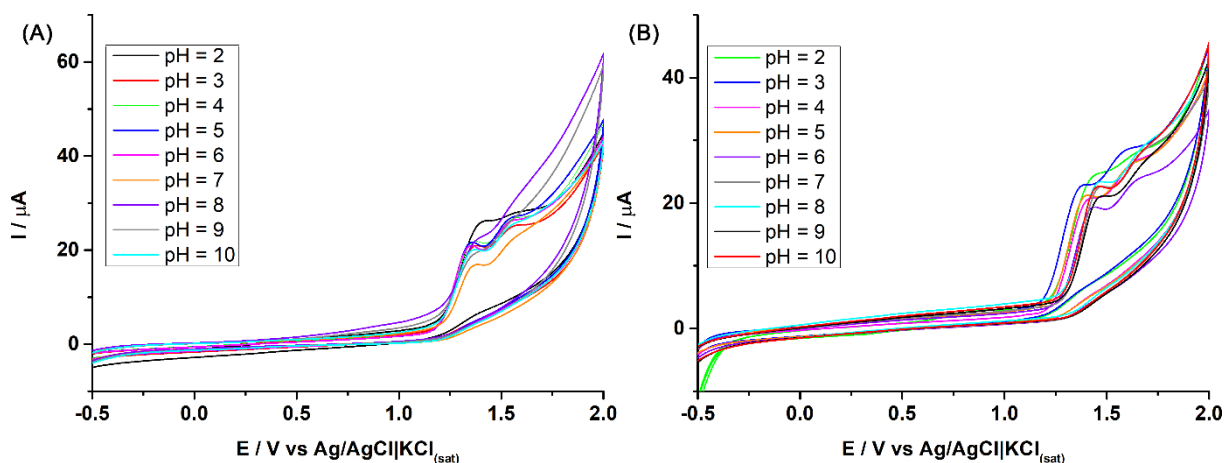
Fonte: O autor.

4.10 Comportamento eletroquímico da 3α -OHTIB e 3β -OHTIB sobre eletrodo de BDD

O comportamento eletroquímico da 3α -OHTIB juntamente com a 3β -OHTIB foi estudado inicialmente por meio da voltametria cíclica empregando eletrodo de BDD como eletrodo de trabalho em eletrólito suporte composto por tampão BR $0,04 \text{ mol L}^{-1}$ com acetonitrila (75:25 v/v) em diferentes valores de pH (2,0 a 10,0). Devido a solubilidade baixa do 3α -OHTIB em água, neste caso também foi adicionado acetonitrila ao eletrólito de suporte. Os estudos foram realizados após pré-tratamento anódico ou catódico do eletrodo BDD. Os voltamogramas cíclicos na faixa de potencial de -0,5 a +2,0 V obtidos após os dois pré-tratamentos mostraram que o comportamento eletroquímico da 3α e 3β -OHTIB $0,5 \text{ mmol L}^{-1}$ é irreversível, sem picos catódicos na varredura reversa e com dois picos de oxidação semelhante ao da TIB, sendo o primeiro em aproximadamente +1,40 V e outro em +1,60 V (vs. $\text{Ag}/\text{AgCl}/\text{KCl}_{\text{sat.}}$). A Figura 28 apresenta os voltamogramas cíclicos obtidos para uma

solução contendo 3α e 3β -OHTIB $0,5 \text{ mmol L}^{-1}$ em eletrólito de suporte composto por tampão BR $0,04 \text{ mol L}^{-1}$ com acetonitrila (75:25 v/v e $\text{pH} = 2,0$ a $10,0$).

Figura 28. Voltamogramas cíclicos obtidos após a adição de 3α e 3β -OHTIB $0,5 \text{ mmol L}^{-1}$ em tampão BR ($\text{pH} = 2,0$ a $10,0$) com acetonitrila (75:25, v/v) sobre o eletrodo de BDD. **(A)** Ativação anódica e **(B)** ativação catódica. Incremento de potencial: 5 mV ; velocidade de varredura 50 mV s^{-1} .



Fonte: O autor.

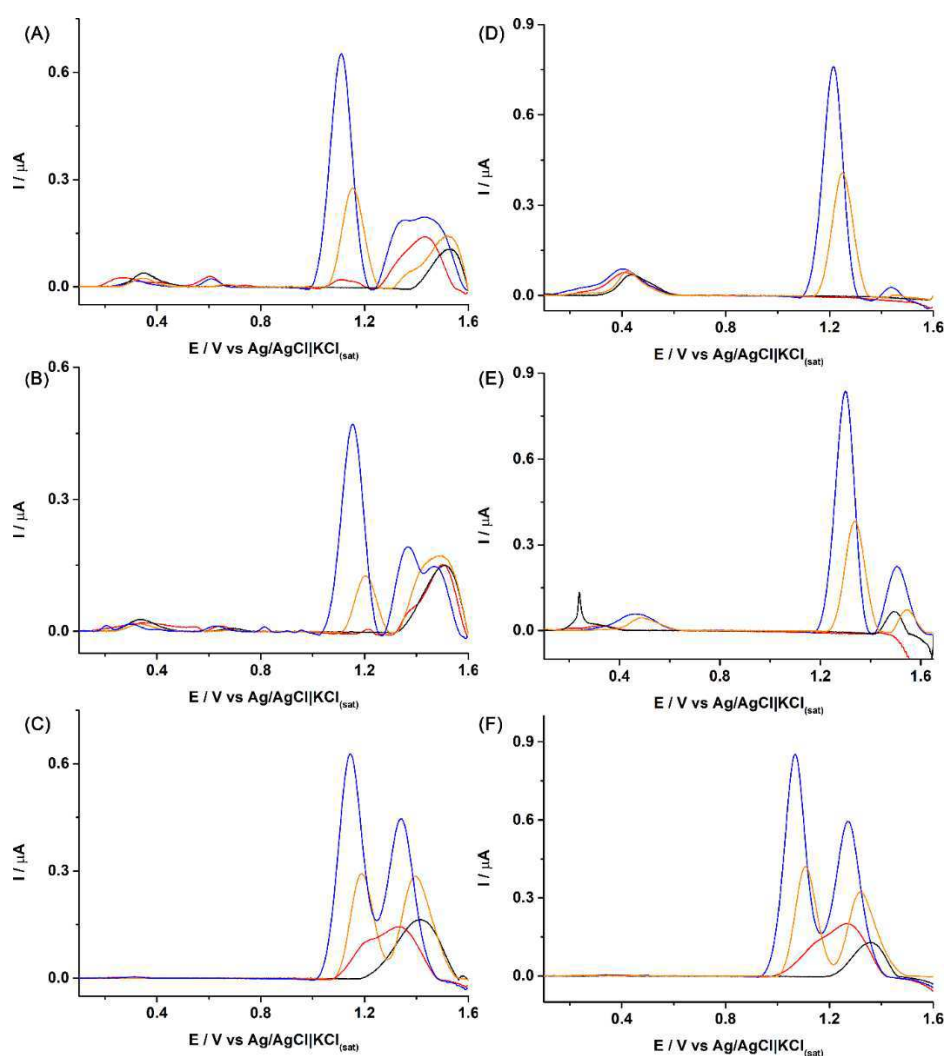
Observa-se nos voltamogramas cíclicos da Figura 28 que os valores de corrente de pico obtidos para a 3α e 3β -OHTIB foram semelhantes após o tratamento anódico ou catódico. Também pode ser observado para as duas ativações que a variação do potencial de pico com a variação do pH é muito pequena. A partir desses resultados podemos concluir que tanto o BDD com ativação anódica quanto com a catódica, a princípio, poderiam ser empregados para os estudos posteriores.

Em razão disso foram realizados estudos para selecionar qual o eletrólito de suporte mais adequado para esses estudos, sendo os testes realizados com as soluções de pH 3, 4 e 5. O pico do 3α -OHTIB em pH 2 não apresentou perfil bem definido em ambas as ativações e, por esta razão, não foi selecionado. Também foram realizados estudos para verificar se o mais adequado seria utilizar a detecção dos epímeros 3α e 3β -OHTIB pela técnica de SWV ou de DPV. Neste estudo, ambas as técnicas foram avaliadas empregando uma velocidade de varredura de 10 mV s^{-1} . A escolha desse valor de velocidade de varredura ocorreu em razão de ser uma velocidade de varredura comum às duas técnicas, já que com a DPV normalmente se trabalha com velocidades de varredura bem menores do que na SWV. Para a realização

desses estudos, tanto a ativação catódica quanto a anódica foram empregadas já que ambas apresentaram resultados semelhantes nos estudos por voltametria cíclica.

A Figura 29 mostra os voltamogramas de SWV e de DPV obtidos para soluções contendo 3α e 3β -OHTIB $20 \mu\text{mol L}^{-1}$ em tampão BR (pH = 3 a 5). Para esses estudos não foi adicionado acetonitrila ao eletrólito suporte, pois assim como acontece com a TIB, nas concentrações utilizadas o metabólito é solúvel nos eletrólitos de suporte empregados.

Figura 29. Voltamogramas de SWV obtidos antes (linha preta) e após (linha laranja) a adição de 3α e 3β -OHTIB $20 \mu\text{mol L}^{-1}$ e de DPV obtidos antes (linha vermelha) e após (linha azul) a adição de 3α e 3β -OHTIB sobre o eletrodo de BDD em tampão BR $0,04 \text{ mol L}^{-1}$ em (A) pH = 3, (B) pH = 4 e (C) pH = 5 com tratamento anódico e (D) pH = 3, (E) pH = 4 e (F) pH = 5 com tratamento catódico.



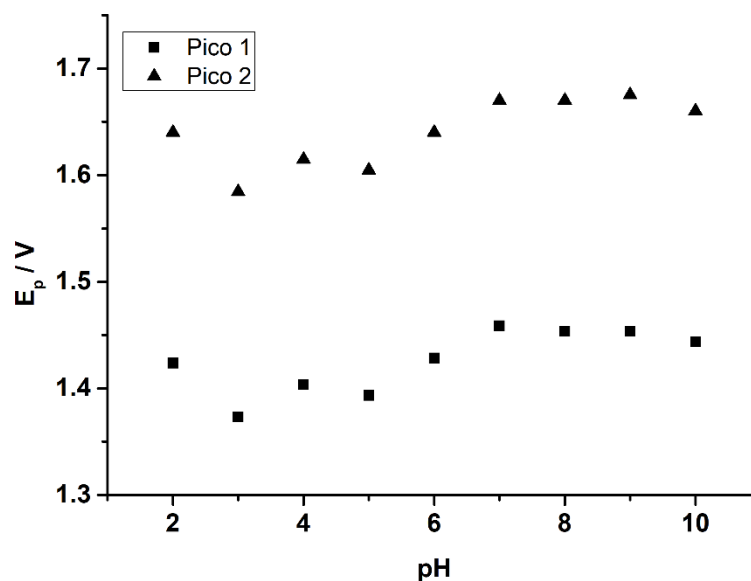
Fonte: O autor.

Os resultados da Figura 29 mostram que maiores picos de oxidação foram obtidos quando a técnica de DPV foi empregada. Isso ocorreu para o eletrodo de BDD com os dois tipos de pré-tratamento (anódico e catódico). Além disso, pode-se observar que na ativação catódica não há a presença de picos nas varreduras realizadas para o branco em soluções de pH 3 e 4, como acontece para a ativação anódica. Pode-se observar também que à medida que o pH aumenta, a intensidade de corrente do pico de oxidação adicional próximo a +1,50 V também aumenta. Por esta razão estudos em pHs maiores do que 5 não foram realizados.

A partir dos resultados observados, o tratamento catódico do eletrodo de BDD foi escolhido para ser utilizado já que a linha de base se mostrou mais estável. A escolha da solução de pH = 3 foi feita pelo fato de que a intensidade de corrente de oxidação do segundo pico ($\approx +1,5$ V) da 3α -OHTIB e 3β -OHTIB ser muito menor em comparação com os observados em soluções de pH = 4 e 5, sendo a detecção dos metabólitos realizada por meio do pico de oxidação detectado em $\approx +1,2$ V.

Assim como ocorreu para a TIB, na literatura não foram encontrados outros trabalhos que descrevem o mecanismo de oxidação eletroquímica para o 3α -OHTIB. Por esta razão, também foram realizados estudos com o intuito de investigar como ocorre esse processo. As primeiras informações sobre o mecanismo de oxidação foram obtidas do estudo de pH apresentado na Figura 28 onde, a relação do E_p com o pH fornece a quantidade de prótons envolvidos na reação de oxidação por meio da equação 1. A Figura 30 apresenta a relação entre E_p vs pH para a os dois picos referentes a oxidação da 3α e 3β -OHTIB.

Figura 30. Relação entre E_p vs pH para a 3α e 3β -OHTIB. Outras condições, ver Figura 28.

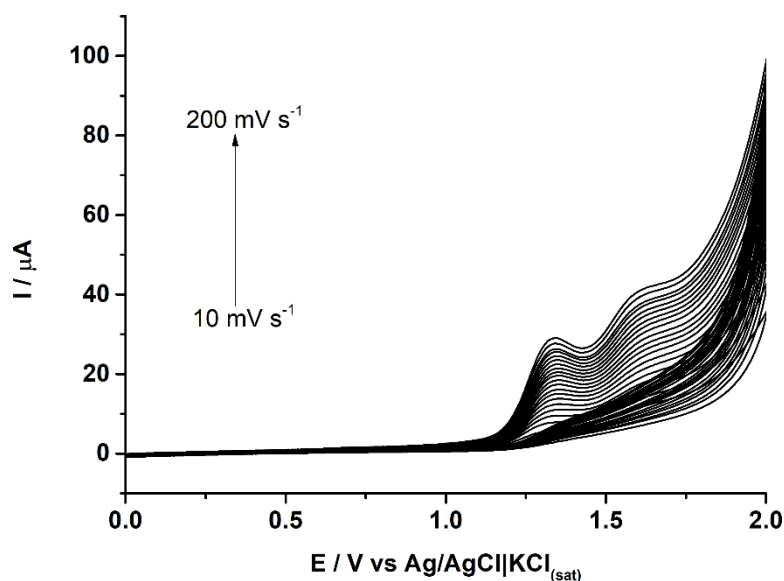


Fonte: O autor

A Figura 28 mostra que os potenciais de pico de oxidação da 3α e 3β -OHTIB se apresentaram relativamente constantes para toda a faixa de pH estudada. O que indica que o mecanismo de oxidação eletroquímica da 3α e 3β -OHTIB não depende do pH pois não ocorre a transferência de H^+ (SILVA et al., 2017; SU; CHENG, 2008).

Após a definição do eletrólito de suporte a ser empregado (tampão BR $0,04 \text{ mol L}^{-1}$ pH = 3), o estudo do efeito da velocidade da varredura foi realizado por voltametria cíclica para que mais informações sobre o processo de oxidação da 3α e 3β -OHTIB fossem obtidas. A Figura 31 mostra os voltamogramas cíclicos obtidos para 3α e 3β -OHTIB $0,5 \text{ mmol L}^{-1}$ em diferentes velocidades de varredura (10 a 200 mV s^{-1}).

Figura 31. Voltamogramas cíclicos obtidos em diferentes velocidades de varredura para 3α e 3β -OHTIB $0,5 \text{ mmol L}^{-1}$. Eletrólito suporte: tampão BR $0,04 \text{ mol L}^{-1}$ em pH 3 com acetonitrila (75:25, v/v); incremento de potencial: 5 mV ;

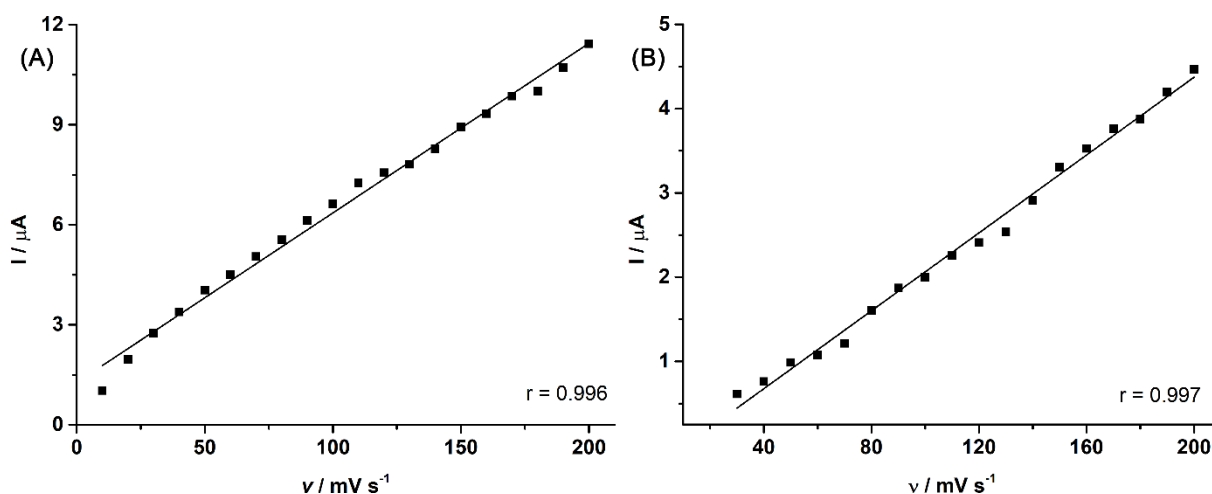


Fonte: O autor.

Observa-se na Figura 31 que em todo o intervalo de potencial estudado, não há picos na varredura catódica, indicando que o processo de oxidação do 3α e 3β -OHTIB é irreversível. Pode-se observar também que assim como ocorre com a TIB, os potenciais de pico se deslocam para potenciais mais positivos com o aumento da velocidade de varredura como é esperado para processos irreversíveis. Porém, a variação é mais significativa apenas nas velocidades de varredura menores (até 50 mV), assim como também foi observado para a TIB. Por essa razão não foi possível obter um resultado conclusivo da relação de E_p vs. $\log v$ que permitisse o cálculo do número de elétrons envolvidos no processo de oxidação

eletroquímica do 3 α e 3 β -OHTIB. Entretanto, por meios dos resultados obtidos foi possível obter informações se a cinética de transferência de elétrons da reação de oxidação é controlada pelo processo de difusão ou de adsorção das moléculas de 3 α e 3 β -OHTIB sobre o eletrodo de trabalho. Com esse intuito, gráficos de I_p vs v foram plotados (Figura 32) para os dois processos de oxidação da 3 α e 3 β -OHTIB mostrados na Figura 31.

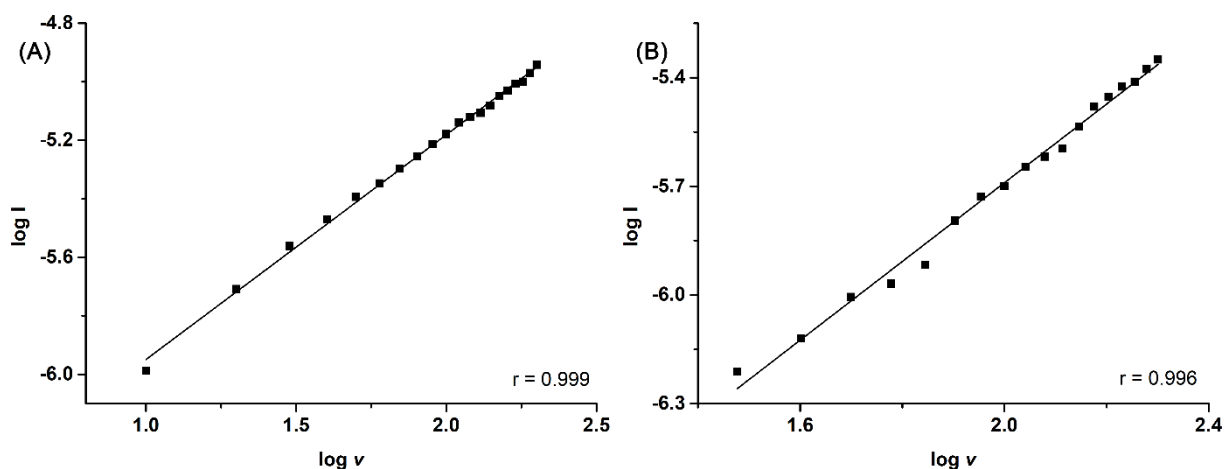
Figura 32. Relação entre corrente de pico de oxidação e a variação da velocidade de varredura para (A) pico 1 e (B) pico 2 de solução contendo 3 α e 3 β -OHTIB.



Fonte: O autor.

Os resultados apresentados na Figura 32 mostram que existe uma relação linear entre a corrente de pico e a velocidade de varredura, o que é esperado para processos irreversíveis onde a cinética de transferência de elétrons é controlada preferencialmente por adsorção (BARD; FAULKNER, 1980). Outra forma de verificar essa informação é por meio dos gráficos que mostram a relação entre $\log I_p$ vs. $\log v$ (Figura 33) para ambos os picos de oxidação da 3 α e 3 β -OHTIB.

Figura 33. Relação entre I_p vs. $\log v$ para o (A) pico 1e (B) pico 2 provenientes da oxidação da 3α e 3β -OHTIB.



Fonte: O autor.

Como já discutido anteriormente, coeficientes angulares próximos a 0,5 indicam que a cinética da reação eletroquímica é preferencialmente controlada pelo processo de difusão das moléculas presentes na solução até a superfície do eletrodo de trabalho. Já o coeficiente angular próximo a 1 significa que a cinética do processo de oxidação é controlada preferencialmente pela adsorção das moléculas sobre o eletrodo. Os resultados obtidos a partir da Figura 33 mostram uma relação linear entre I_p vs. $\log v$ para ambos os picos de oxidação. Onde, para o pico 1 ($r = 0,999$) foi obtido o coeficiente angular de 0,768, o que indica que além da adsorção, a difusão tem influência considerável no processo de oxidação eletroquímica dos metabólitos. Já o coeficiente angular de 1,09 para o pico 2 ($r = 0,996$) confirma que a cinética de transferência de elétrons é preferencialmente controlada por adsorção.

Como já discutido anteriormente, não foi possível determinar o número de elétrons envolvidos no processo de oxidação eletroquímica da 3α e 3β -OHTIB por voltametria cíclica.

4.11 Otimização dos parâmetros da voltametria de pulso diferencial

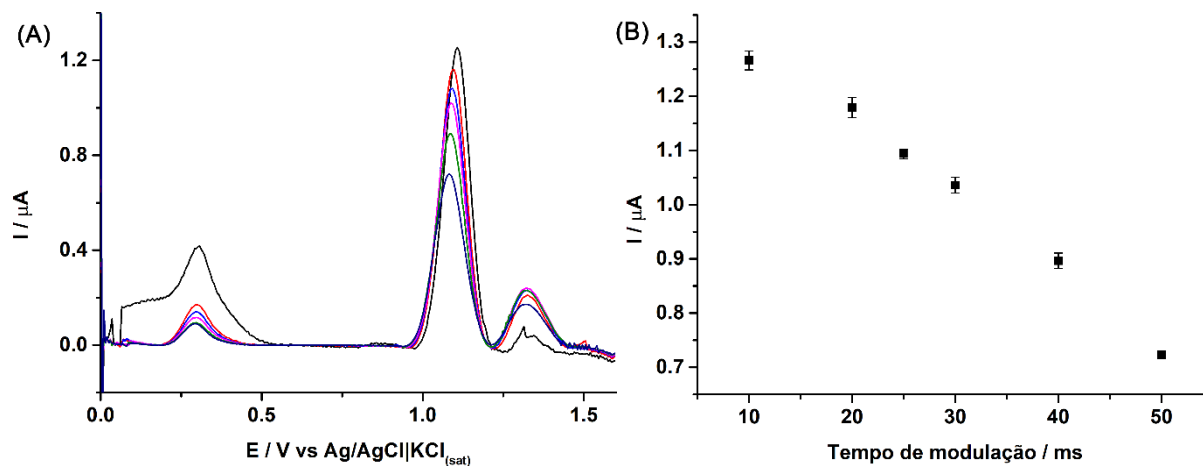
No desenvolvimento de um método analítico empregando a DPV é necessário a otimização de alguns parâmetros que forneçam resultados com a melhor resposta possível em termos de intensidade de corrente e picos bem definidos para que se possa obter sensibilidade e reprodutibilidade adequada para a aplicação proposta. Os parâmetros otimizados foram os seguintes: amplitude de modulação, tempo de modulação e incremento de potencial.

Antes de cada varredura de DPV, a solução foi agitada durante 15 s sem a aplicação de potencial para garantir a homogeneização da solução. Após esse tempo, a solução foi deixada em repouso (10 s) para que a varredura da DPV ocorresse sem influência do processo de convecção. Os voltamogramas de DPV apresentados tiveram a linha de base tratada para que a visualização dos picos ficasse mais evidentes. O tratamento empregado foi o “*moving average*” presente no software NOVA 1.11. O eletrólito suporte utilizado em todos os estudos por DPV era composto por: tampão BR 0,04 mol L⁻¹ em pH 3, não sendo necessário a adição de acetonitrila devido ao fato de que nas concentrações empregadas (< 50 μmol L⁻¹) os isômeros 3α e 3β-OHTIB são solúveis.

4.11.1 Otimização do tempo de modulação

Na DPV são aplicados pulsos de amplitude constantes, sendo que a corrente é amostrada imediatamente antes e ao final do pulso, registrando-se a diferença como resultado. O tempo de modulação (t_m) é o tempo de duração da aplicação desse pulso de potencial (WANG, 2006). Como o tempo de modulação determina o momento em que irá ocorrer a medida do valor de corrente após a aplicação do pulso de potencial, este é um parâmetro essencial a ser otimizado. Inicialmente, foi então realizado um estudo para verificar a influência do tempo de modulação na corrente de pico de oxidação da 3α e 3β-OHTIB. A Figura 34 apresenta os resultados obtidos para a variação da corrente de pico em função do tempo de modulação (10 – 50 ms) para uma solução contendo 20 μmol L⁻¹ de 3α e 3β-OHTIB. Neste sentido, a amplitude de modulação foi fixada em 80 mV e o incremento de potencial em 5 mV.

Figura 34. (A) Voltamogramas de pulso diferencial obtidos para $20 \mu\text{mol L}^{-1}$ de 3α e 3β -OHTIB para aplicação de diferentes tempos de modulação; (B) Relação entre corrente de pico e tempo de modulação ($n = 3$). Eletrólito de suporte: tampão BR $0,04 \text{ mol L}^{-1}$ em pH 3; $a = 80 \text{ mV}$; $\Delta E = 5 \text{ mV}$.



Fonte: O autor.

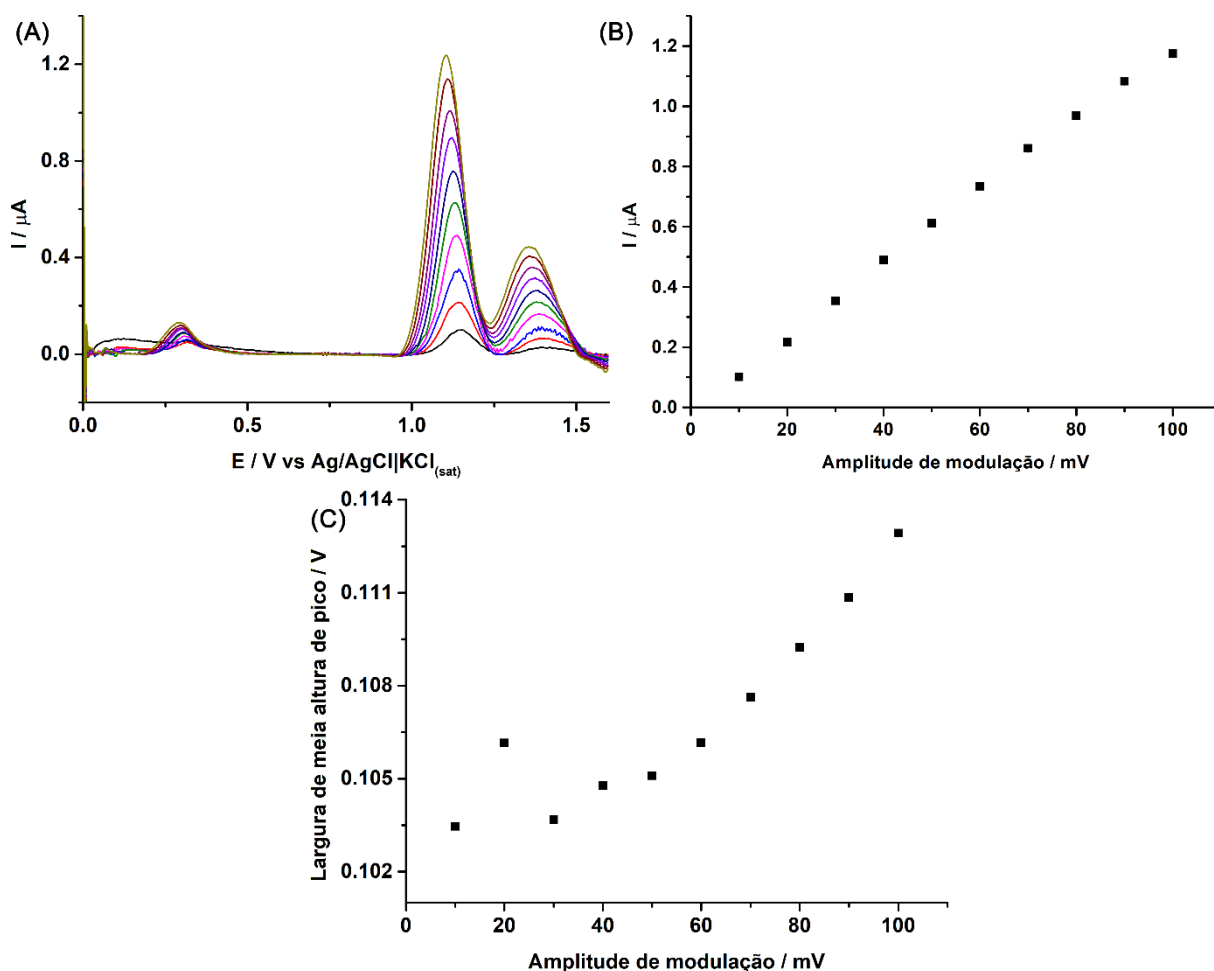
Como pode ser observado na Figura 34, o valor da corrente de pico diminui com o aumento do tempo de modulação. Também pode-se observar que os voltamogramas com tempos de modulação de 10 e 20 ms apresentam maiores sinais de ruídos na linha base e maiores desvios. Isso ocorre porque em tempos de modulações menores a corrente é medida pouco tempo após a aplicação do pulso de amplitude de modulação, onde ainda existe grande contribuição da corrente capacitiva na corrente total medida (WANG, 2006). Como o valor da corrente capacitiva decresce exponencialmente com tempo enquanto a corrente faradaica decresce de forma linear, o uso de tempos de modulação maiores são convenientes pois estes minimizam a contribuição da corrente capacitiva (DE SOUZA; MACHADO; AVACA, 2003; WANG, 2006). Entretanto, o uso de tempos muito longos contribui para o decréscimo da corrente faradaica a ser detectada. Dessa forma, com base nos resultados apresentados na Figura 34, o tempo de modulação selecionado foi de 25 ms, por apresentar pequenos ruídos na linha base do voltamograma e intensidade de corrente de pico próxima aos obtidos quando utilizado tempos de 10 e 20 ms.

4.11.2 Otimização da amplitude de modulação

A amplitude de modulação é a magnitude do pulso de potencial aplicado a uma rampa linear de potencial, sendo que a corrente é medida antes e no final da aplicação de cada pulso

(SCHOLZ, 2010; WANG, 2006). É um parâmetro importante a ser estudado pois o uso de valores de amplitudes elevados dão origem a correntes maiores, porém, na forma de picos mais largos (WANG, 2006). A Figura 35 mostra o efeito da variação da amplitude de modulação no intervalo de 10 a 100 mV para uma solução contendo 3α e 3β -OHTIB $20 \mu\text{mol L}^{-1}$, onde o tempo de modulação foi fixado em 25 ms e o incremento de potencial em 5 mV.

Figura 35. (A) Voltamogramas de DPV obtidos para solução de 3α e 3β -OHTIB $20 \mu\text{mol L}^{-1}$ com variação da amplitude de modulação. (B) Relação entre corrente de pico e amplitude de modulação ($n = 3$). (C) Relação entre largura de meia altura de pico e amplitude de modulação. Eletrólito de suporte: tampão BR $0,04 \text{ mol L}^{-1}$ em pH 3, $t_m = 25 \text{ ms}$; $\Delta E = 5 \text{ mV}$.



Fonte: O autor.

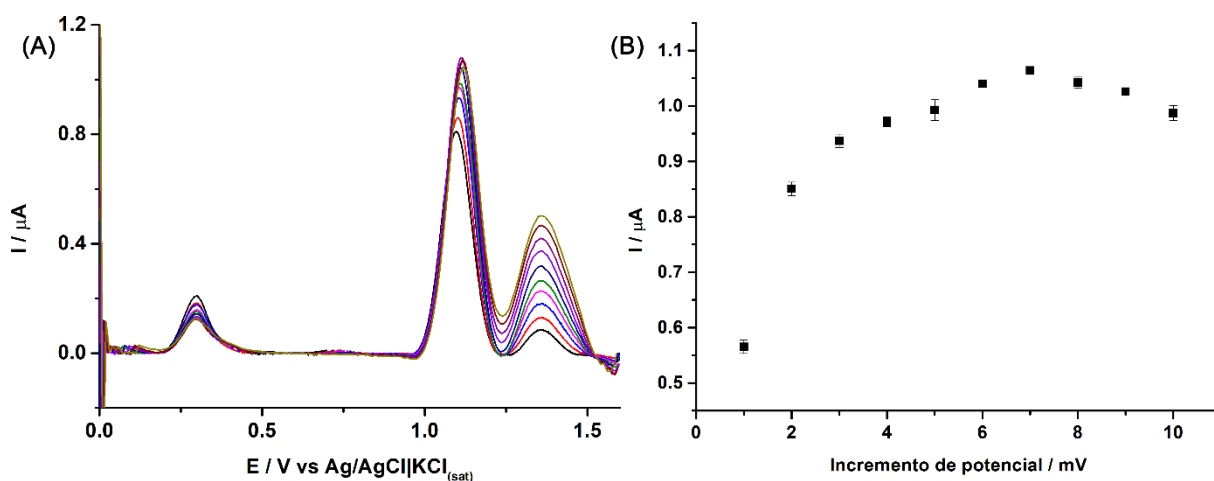
A Figura 35 mostra que o aumento da amplitude de modulação provoca o aumento da corrente e da largura de pico como já discutido anteriormente. A partir desses resultados, o pulso de amplitude de 60 mV foi selecionado pelo fato de que em amplitudes maiores ocorre

o alargamento dos picos de oxidação da 3α e 3β -OHTIB fazendo com que não se tenha uma separação entre os dois picos de oxidação observados para esses compostos.

4.11.3 Otimização do incremento de potencial

O incremento de potencial (ΔE) é a altura de cada degrau da rampa de potenciais em forma de escada sobre a qual são aplicados pulsos de potenciais de amplitude (BARD; FAULKNER, 1980; WANG, 2006). É outro parâmetro importante a ser otimizado, pois também exerce influência sobre a intensidade de corrente e largura dos picos. Além disso, a velocidade de varredura da DPV é definida pela razão entre o ΔE e o intervalo de tempo. A Figura 36 apresenta os voltamogramas obtidos para solução contendo 3α e 3β -OHTIB $20 \mu\text{mol L}^{-1}$ com a variação do incremento de potencial de 1 a 10 mV, onde o tempo de modulação foi fixado em 25 ms e a amplitude de modulação em 80 mV.

Figura 36. (A) Voltamogramas de DPV obtidos para solução de 3α e 3β -OHTIB $20 \mu\text{mol L}^{-1}$ com a variação do incremento de potencial (1 a 10 mV); (B) Relação entre corrente de pico e incremento de potencial ($n = 3$). Eletrólito de suporte: tampão BR $0,04 \text{ mol L}^{-1}$ em pH 3, $t_m = 25 \text{ ms}$; $a = 80 \text{ mV}$.



Fonte: O autor.

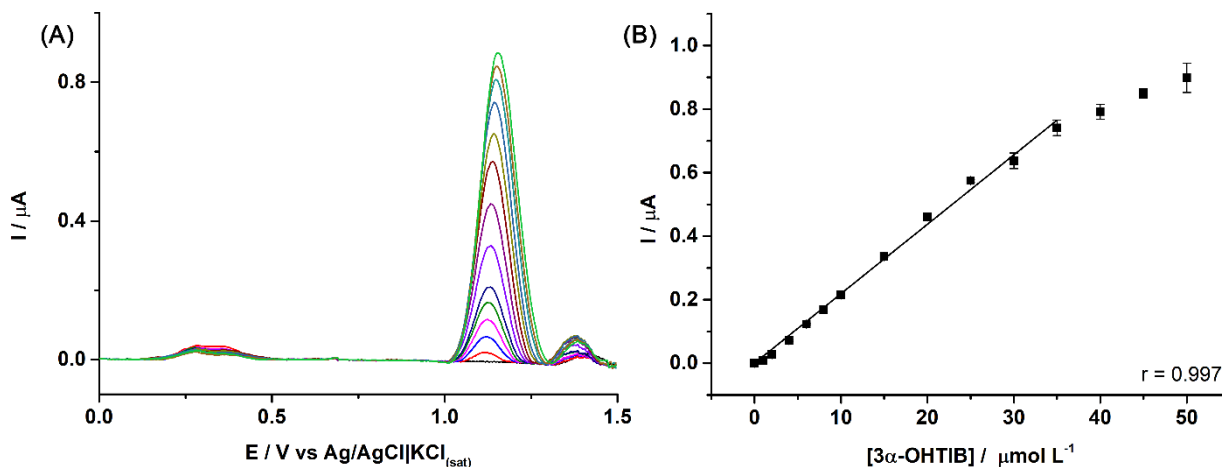
Como pode ser observado na Figura 36, o aumento do incremento de potencial e, consequentemente, da velocidade de varredura da DPV provoca o aumento da corrente de pico de oxidação do 3α -OHTIB até $\Delta E = 7 \text{ mV}$; em valores maiores ocorre a diminuição da

corrente de pico. Pode-se observar também que o aumento do ΔE provoca o alargamento dos picos, o que também diminui a separação entre os picos. A partir dessas observações, o $\Delta E = 6$ mV foi selecionado para os estudos posteriores.

4.12 Estudo da faixa linear de resposta

Depois de definidos os parâmetros otimizados para a DPV, $a = 60$ mV; $t_m = 25$ ms e $\Delta E = 6$ mV, estudos foram realizados para determinar a faixa linear de resposta da 3α e 3β -OHTIB sobre o eletrodo de BDD em urina sintética. A Figura 37A mostra os voltamogramas de DPV obtidos para soluções contendo concentrações crescentes de 3α e 3β -OHTIB de 1 a $50 \mu\text{mol L}^{-1}$ em eletrólito composto por tampão BR $0,04 \text{ mol L}^{-1}$ (pH = 3,0) e urina sintética (1:1). A Figura 37B apresenta a relação entre corrente de pico e concentrações crescentes de 3α e 3β -OHTIB.

Figura 37. (A) Voltamogramas de DPV obtidos para concentrações crescentes de 3α e 3β -OHTIB ($1 - 50 \mu\text{mol L}^{-1}$). (B) respectiva curva analítica obtida a partir dos voltamogramas apresentados ($n = 3$). Condições experimentais: $a = 60$ mV; $t_m = 25$ ms e $\Delta E = 6$ mV. Eletrólito de suporte: tampão BR $0,04 \text{ mol L}^{-1}$ (pH = 3,0) e urina sintética (1:1).



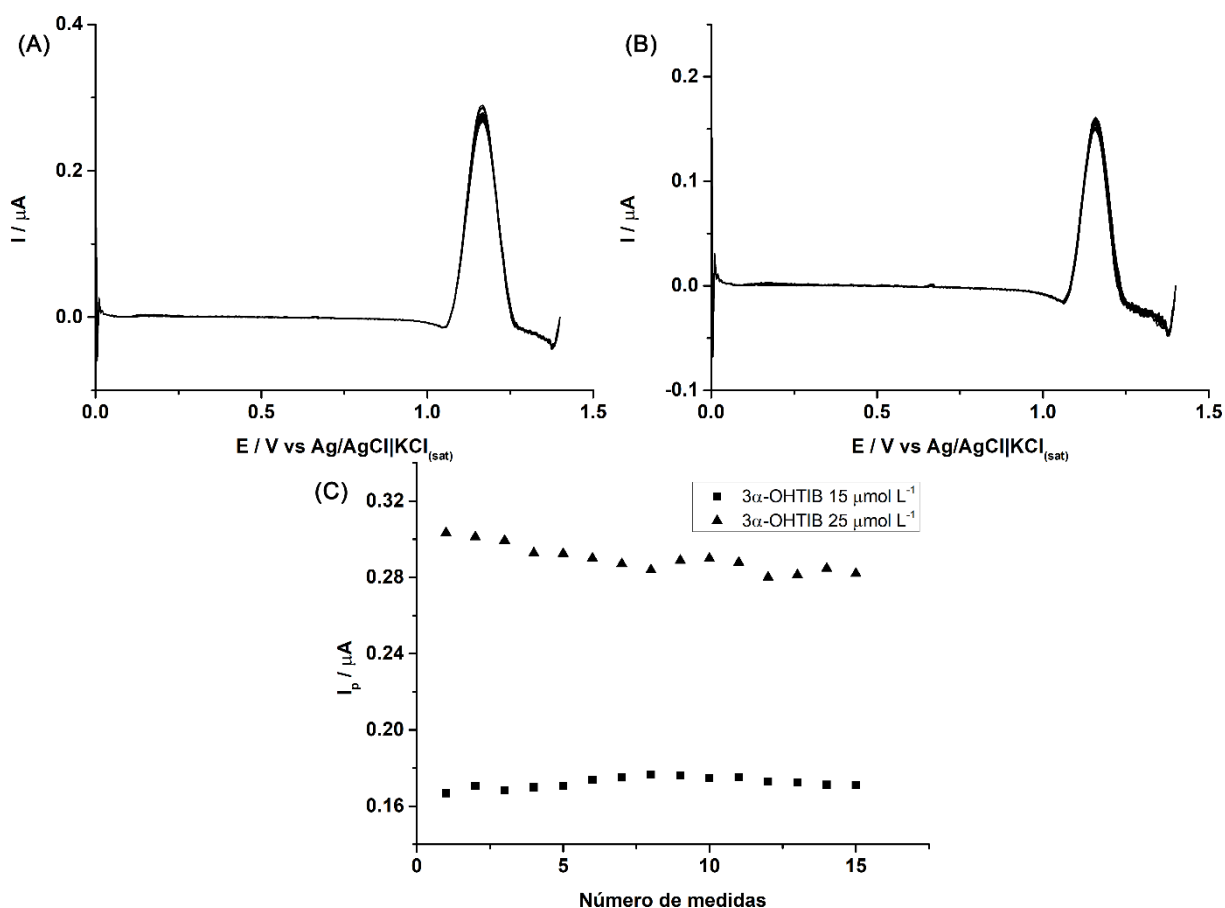
Fonte: O autor.

Observando os resultados apresentados na Figura 37, pode-se notar que há uma relação linear entre a I_p e a concentração de TIB ($r = 0,997$) para a faixa de 1 a $35 \mu\text{mol L}^{-1}$. O LD e o LQ foram calculados por meio das Equações 5 e 6, respectivamente. Os valores obtidos foram de $0,1 \mu\text{mol L}^{-1}$ para o LD e $0,3 \mu\text{mol L}^{-1}$ para o LQ.

4.13 Repetibilidade do método

Depois de realizadas todas as otimizações da DPV e a determinação da faixa linear de resposta para os metabólitos 3α e 3β -OHTIB, os estudos de repetibilidade do método proposto foram realizados. A Figura 38A e 38B apresentam os voltamogramas de DPV obtidos para medidas sucessivas (precisão intra-dia) para amostra de urina sintética contendo 3α e 3β -OHTIB 15 e $25 \mu\text{mol L}^{-1}$, respectivamente.

Figura 38. Resultados obtidos por DPV para análises sucessivas de soluções contendo 3α e 3β -OHTIB (A) $25 \mu\text{mol L}^{-1}$ e (B) $15 \mu\text{mol L}^{-1}$. (C) Relação entre corrente de pico e número de medidas realizadas. Condições experimentais, ver Figura 37.



Fonte: O autor.

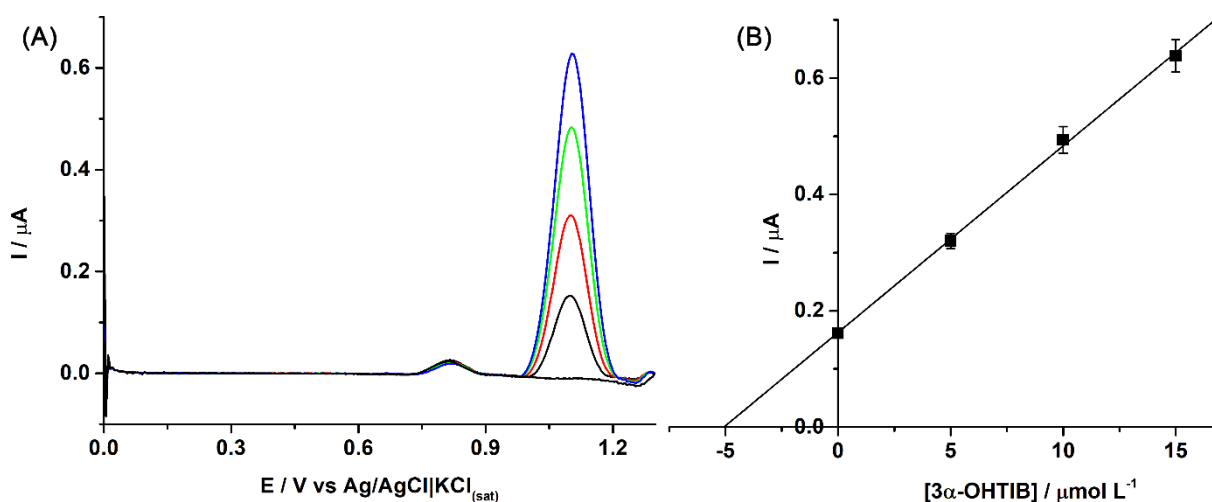
Os resultados na Figura 38 mostram que a corrente de pico detectada para solução contendo 3α e 3β -OHTIB tem pequenas variações ao longo das medidas. É possível ainda perceber que não existe qualquer tendência de contaminação do eletrodo de BDD. Os valores

de DPR calculados foram de 1,7 e 2,5% para 3α e 3β -OHTIB 15 e 25 $\mu\text{mol L}^{-1}$, respectivamente.

4.14 Análise de amostra de urina sintética

O desempenho do método desenvolvido por DPV foi avaliado na detecção de 3α e 3β -OHTIB em urina sintética. Antes da análise, a amostra foi diluída na proporção 1:1 em eletrólito de suporte e a determinação foi realizada pelo método de adição de padrão. A Figura 39A apresenta os voltamogramas de pulso diferencial obtidos para uma amostra de urina dopada com 10 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de 3α e 3β -OHTIB e três adições de concentrações crescentes dos respectivos compostos. A Figura 39B mostra a respectiva curva de calibração usando o método de adição padrão.

Figura 39. (A) Voltamogramas de pulso diferencial obtidos para solução amostra de urina sintética fortificada com 3α e 3β -OHTIB 10 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (diluição de 1:1 em eletrólito suporte); (B) curva de calibração pelo método de adição de padrão obtida a partir dos voltamogramas apresentados ($r = 0,999$) ($n = 3$). Condições experimentais, ver Figura 37.



Fonte: O autor.

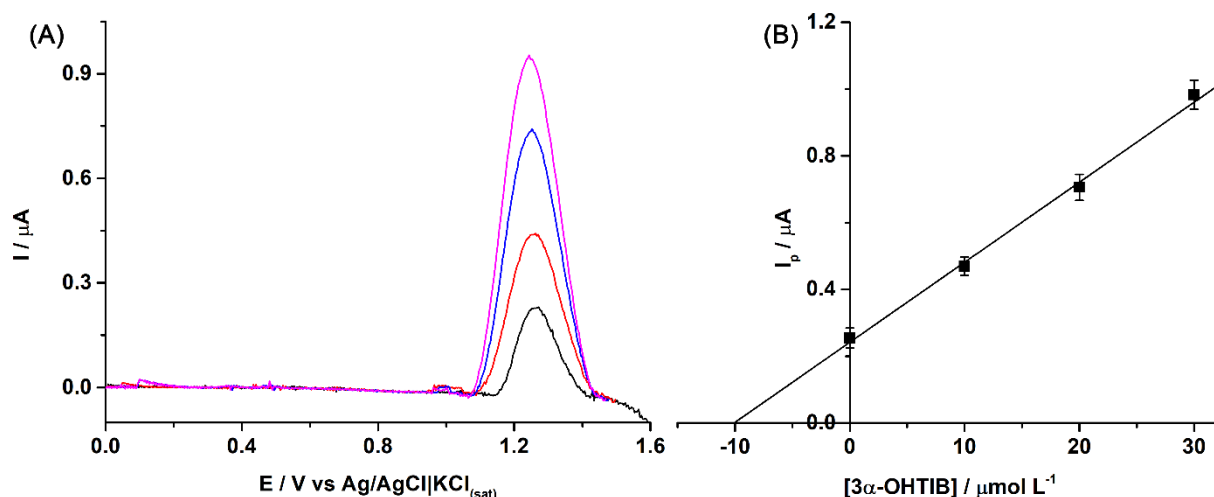
Pode-se observar na Figura 39 que a detecção e quantificação da 3α e 3β -OHTIB em urina sintética foi possível. O método se mostrou eficiente na quantificação dos metabólitos com valor médio de recuperação foi de $101\% \pm 5$. Também pode ser observado que há um pico de oxidação próximo a +0,80 V de algum constituinte da amostra, todavia, este não interfere na detecção dos metabólitos 3α e 3β -OHTIB. Entretanto, as diferenças entre os

valores de corrente de pico observadas na determinação da faixa linear e da análise da amostra de urina sintética para uma mesma concentração indicam a ocorrência de efeito de matriz da amostra, porém, a curva de calibração pelo método de adição de padrão foi eficiente em contornar esse efeito.

4.15 Análise da amostra de saliva

O método desenvolvido para a análise de TIB por SWV (Parte 1) também foi aplicado para detecção e determinação do 3α e 3β -OHTIB em saliva. Como os dois compostos apresentaram comportamentos eletroquímicos semelhantes, o objetivo desse estudo foi verificar se o método já desenvolvido para a TIB também seria eficiente em determinar seu metabólito em amostras de saliva. A Figura 40A mostra os voltamogramas obtidos por SWV para $20 \mu\text{mol L}^{-1}$ 3α e 3β -OHTIB em amostras de saliva (diluída 1:1 em eletrólito de suporte) e três adições de concentrações crescentes de 3α e 3β -OHTIB. A Figura 40B mostra a respectiva curva de calibração usando o método de adição de padrão.

Figura 40. (A) Voltamogramas de SWV obtidos para solução amostra de saliva fortificada com 3α e 3β -OHTIB ($20 \mu\text{mol L}^{-1}$); (B) curva de calibração pelo método de adição de padrão obtida a partir dos voltamogramas apresentados ($n = 3$). Condições experimentais: $a = 60 \text{ mV}$; $f = 40 \text{ s}^{-1}$; $\Delta E = 4 \text{ mV}$. Eletrólito de suporte: tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ $\text{pH} = 7,0$.



Fonte: O autor.

Os resultados na Figura 40 mostram que uma solução contendo 3α e 3β -OHTIB tem um perfil voltamétrico semelhante a solução contendo TIB. Este resultado mostra que a

triagem e detecção de TIB ou dos metabólitos por meio do método desenvolvido na Parte 1 é possível. O valor de recuperação obtido foi de $98\% \pm 5$ indicando que o método proposto também é eficiente para a determinação de 3α e 3β -OHTIB em amostras de saliva. Como a estrutura do TIB e seu metabólito são muito parecidas entre si e apresentam o mesmo grupo que sofre oxidação, isso justifica que o comportamento eletroquímico da 3α e 3β -OHTIB sejam muito semelhantes ao da TIB. Além disso, os resultados mostram que o comportamento eletroquímico do 3β -OHTIB é semelhante ao 3α -OHTIB por serem isômeros (a diferença está apenas na configuração do grupo hidroxila no carbono 3).

4.16 Conclusões parciais

O trabalho apresentado na segunda parte da tese demonstrou que foi possível obter os metabólitos 3α e 3β -OHTIB por meio de síntese a partir da TIB. Também mostrou pela primeira vez métodos eletroquímicos para a determinação desses metabólitos em amostras de saliva humana por SWV e em urina sintética por DPV, de forma rápida e simples. A detecção da 3α e 3β -OHTIB foi possível após uma etapa simples de preparação das amostras (apenas diluição no eletrólito de suporte). Os resultados apresentados mostram que o método proposto permite a triagem rápida de amostras de saliva para detecção da presença do TIB ou dos metabólitos, 3α e 3β -OHTIB. A quantificação também foi possível usando o método de adição de padrão.

A voltametria de pulso diferencial se mostrou mais adequada para a detecção do metabólito e, por essa razão, foi utilizada no desenvolvimento do método de análise de urina sintética. O método é simples, de baixo custo, estável e preciso ($DPR < 2,5\%$; $n = 15$) com valores médios de recuperação = $101\% \pm 5$ pode ser usado em laboratórios com requisitos mínimos de infraestrutura.

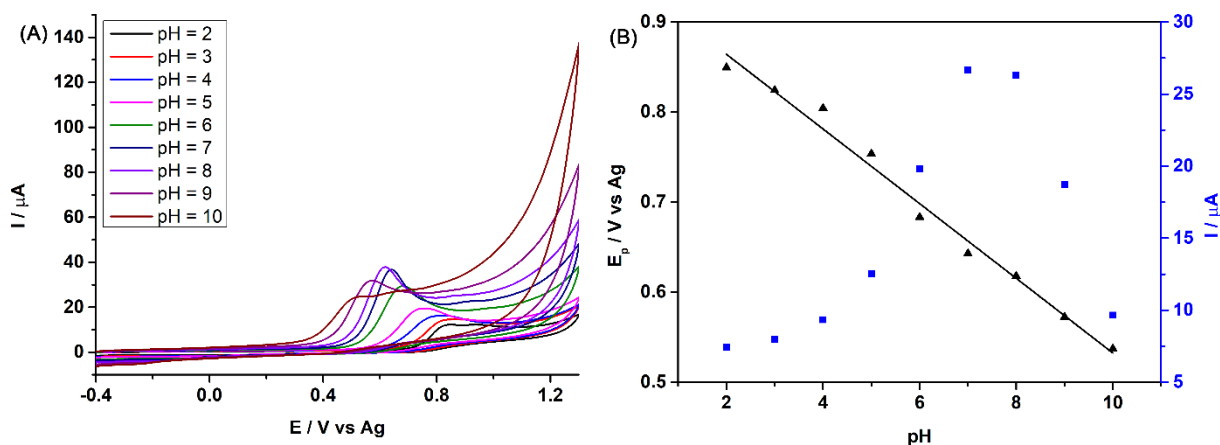
**Parte 3: Detecção e triagem
rápida de 1- (3-
clorofenil)piperazina
(mCPP) em amostras
apreendidas**

4.17 Comportamento eletroquímico da mCPP

Inicialmente, o comportamento eletroquímico da mCPP foi avaliado por voltametria cíclica usando o método drop-casting (devido ao menor consumo de reagentes e visando maior portabilidade do método). Este estudo foi realizado empregando eletrodo impresso de carbono (*screen-printed carbon electrode*, SPCE) como eletrodo de trabalho e em eletrólito suporte composto por tampão BR $0,04 \text{ mol L}^{-1}$ com diferentes valores de pH (2,0 a 10,0).

Neste estudo, foi observado que a mCPP apresentou pico de oxidação irreversível em toda a faixa de pH estudada. Além disso foi observado que o valor do potencial de pico variou para potenciais menos positivos com o aumento do pH demonstrando que o processo de oxidação eletroquímica do mCPP em SPCE é dependente do pH (Figura 41).

Figura 41. (A) Voltamogramas cíclicos obtidos após adição de $250 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ de mCPP em tampão BR $0,04 \text{ mol L}^{-1}$ (pH = 2,0 - 10,0). Velocidade de varredura: 50 mV s^{-1} ; Incremento de potencial: 5 mV. (B) Relação entre potencial e corrente em função do pH para o processo de oxidação eletroquímica mCPP.

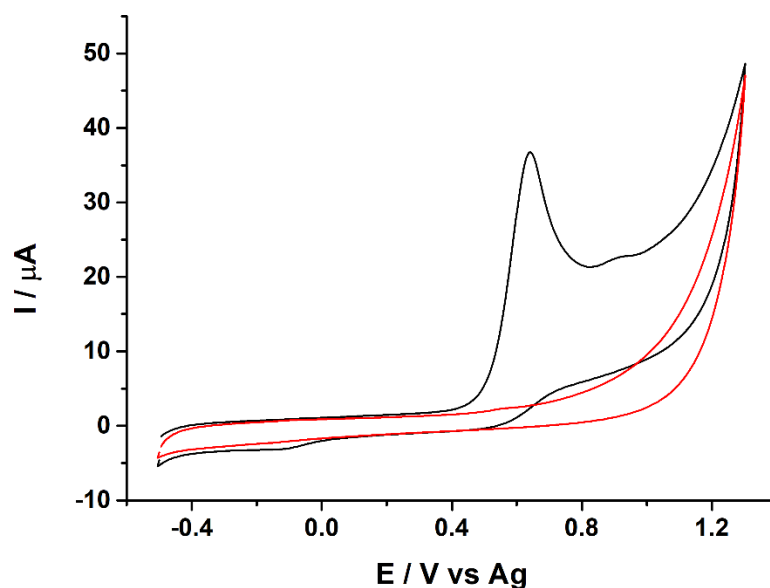


Fonte: O autor.

Na Figura 41B pode ser observado que a relação entre E_p vs pH é linear ($r = 0,996$) com coeficiente angular de $0,041 \text{ V/pH}$. O eletrólito composto por tampão BR $0,04 \text{ mol L}^{-1}$ com pH = 7 foi escolhido para os estudos subsequentes por apresentar pico de oxidação melhor definido (formato do pico), menor potencial de pico (minimização de interferências em amostras). Além disso, as correntes detectadas nas soluções de pH 7 e 8 são similares, mas o formato de pico é mais bem definido em pH 7. A Figura 42 mostra os voltamogramas

cíclicos obtidos antes e após a adição de mCPP $250 \mu\text{mol L}^{-1}$ em solução tampão BR (pH = 7).

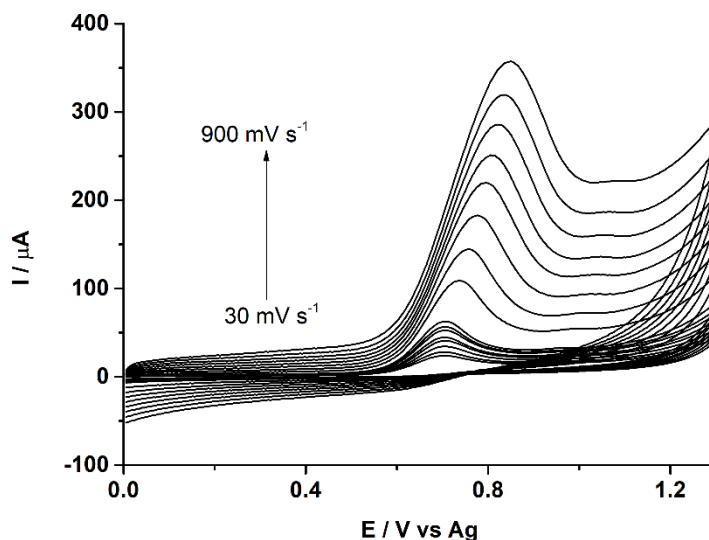
Figura 42. Voltamogramas cíclicos obtidos usando SPCE antes (linha vermelha) e após (linha preta) adição de mCPP $250 \mu\text{mol L}^{-1}$ em solução tampão BR (pH = 7). Velocidade de varredura: 50 mV s^{-1} ; Incremento de potencial: 5 mV.



Fonte: O autor.

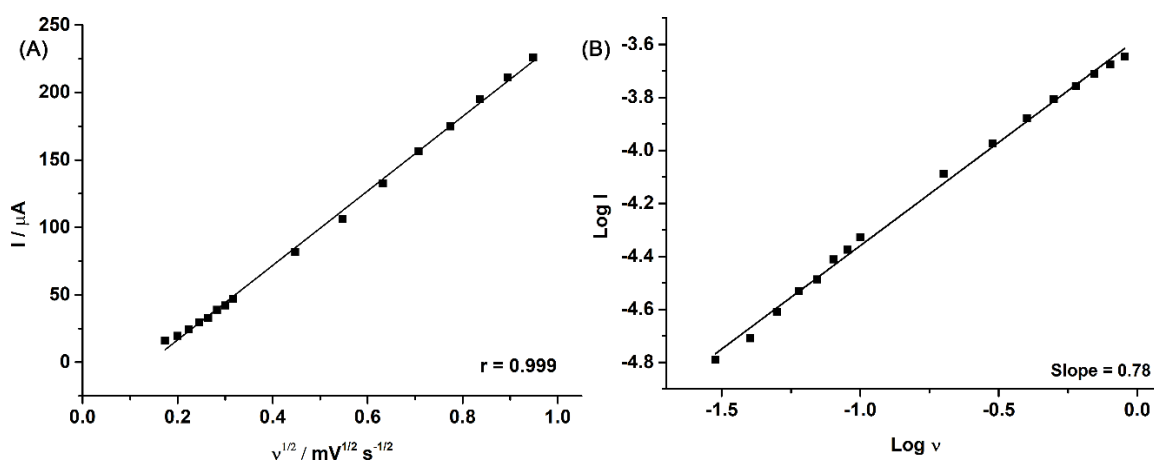
Com o intuito de se obter mais informações sobre o mecanismo de oxidação da mCPP, novos estudos foram realizados empregando a técnica de voltametria cíclica. Na Figura 43 é mostrado o efeito da velocidade de varredura ($30 - 900 \text{ mV s}^{-1}$) na oxidação da mCPP $250 \mu\text{mol L}^{-1}$ empregando SPCE como sensor e tampão BR pH 7 como eletrólito de suporte.

Figura 43. Voltamogramas cíclicos obtidos em diferentes velocidades de varredura para mCPP 250 mmol L⁻¹. Eletrólito suporte: tampão BR 0,04 mol L⁻¹ em pH 7; incremento de potencial: 5 mV; velocidade de varredura 50 mV s⁻¹; eletrodo: SPCE.



Os resultados apresentados na Figura 43 mostram que o potencial de pico variou para potenciais mais positivos com o aumento da velocidade de varredura, como esperado para processos irreversíveis (BARD; FAULKNER, 1980; PLETCHER et al., 2001). A partir dos resultados apresentados na Figura 43 foram obtidos os gráficos que mostram a relação entre I vs. $v^{1/2}$ e I vs. $\log v$ para mCPP e são mostrados na Figura 44.

Figura 44. (A) Relação entre corrente de pico de oxidação e a variação da velocidade de varredura; (B) Relação entre $\log I$ vs. $\log v$ para mCPP 250 mmol L⁻¹.



Fonte: O autor.

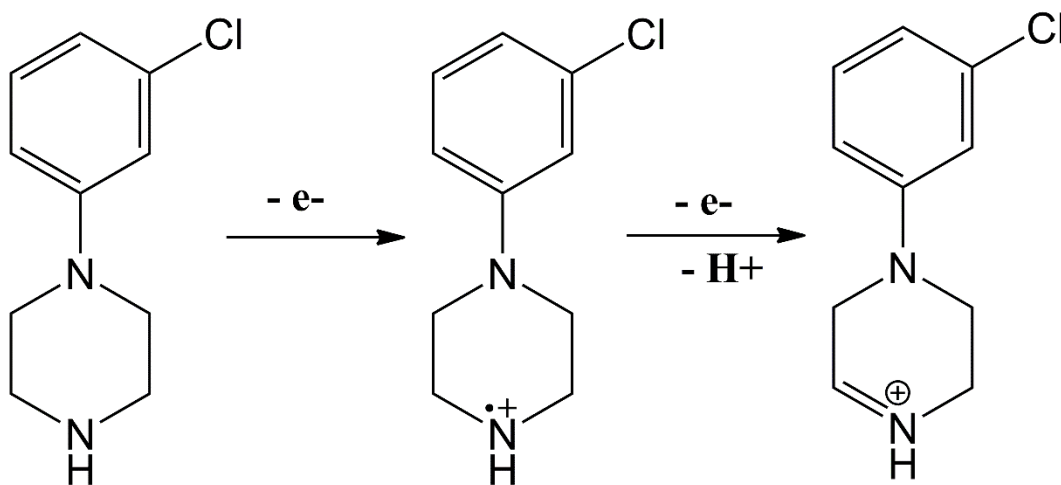
Como pode ser observado na Figura 44 foi obtida uma relação linear entre I_p vs. $v^{1/2}$ ($r = 0,999$) conforme previsto pela equação de Randles-Sevcik para processos eletroquímicos irreversíveis (BARD; FAULKNER, 1980; HUYNH; MEYER, 2007). Além disso, uma relação linear também foi obtida para $\log I_p$ vs. $\log v$ ($r = 0,998$) com coeficiente angular de 0,78. Este é um valor intermediário para o esperado para um processo eletroquímico controlado por difusão (0,5) e para um processo eletroquímico controlado por adsorção (1,0) (GOSSER, 1994), indicando que ambos influenciam na oxidação eletroquímica da mCPP sobre SPCE (comportamento intermediário).

Após esses estudos foi possível determinar o número de elétrons envolvidos na oxidação eletroquímica da mCPP por meio da Equação 7 para processos irreversíveis.

$$E_p - E_{1/2} = \frac{47.7}{\alpha n} \quad \text{Eq. 7}$$

Sendo $E_{1/2}$, o potencial quando a corrente está na metade do valor da corrente de pico e o valor de α utilizado foi de 0,5 (BARD; FAULKNER, 1980). O valor de n obtido foi de 1,7, o que indica que 2 elétrons são transferidos na oxidação eletroquímica de mCPP. A determinação do número de prótons envolvidos foi realizada por meio da Equação 1 utilizando o coeficiente angular do gráfico da Figura 41B (0,041 V/pH) e o número de elétrons anteriormente calculado. (HUYNH; MEYER, 2007). O valor obtido foi de 1 próton. Os resultados obtidos sugerem que a oxidação eletroquímica da mCPP envolve a transferência de 2 elétrons e 1 próton. Esses valores estão em acordo com os disponíveis na literatura para a oxidação da mCPP sobre a superfície do BDD (ROCHA et al., 2020a). O mecanismo de oxidação da mCPP empregando SPCE como sensor foi proposto e é apresentado na Figura 45.

Figura 45. Mecanismo de reação para oxidação eletroquímica de mCPP em SPCE.



Fonte: O autor.

Como pode ser observado, o grupo amina é oxidado em vez do nitrogênio ligado ao anel aromático. O mecanismo proposto está de acordo com o já relatado para a mCPP e também para a benzilpiperazina (estrutura molecular semelhante) em trabalhos anteriores (ROCHA et al., 2020a; WADDELL et al., 2017).

4.18 Otimização dos parâmetros da voltametria de onda quadrada

Assim como já discutido na Parte 2 da tese, o desenvolvimento de um método analítico empregando a SWV requer a otimização de alguns parâmetros a fim de se obter melhor sensibilidade e reprodutibilidade dos resultados. Dessa forma, os parâmetros f , a e ΔE foram otimizados.

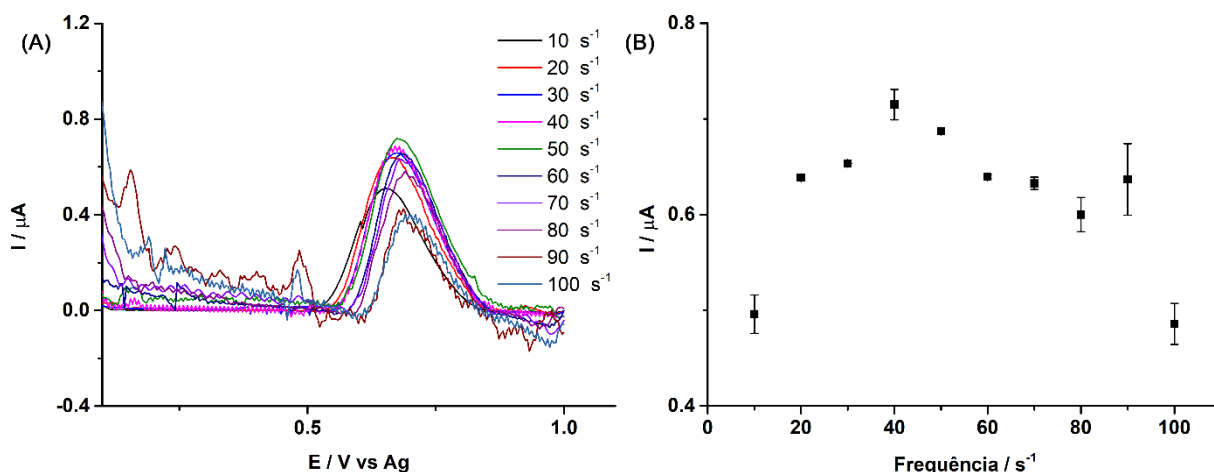
Os voltamogramas de SWV apresentados a partir desse tópico tiveram a linha de base tratada para que a visualização dos picos ficasse mais evidentes. Foi empregado o tratamento “*moving average*” presente no software NOVA 1.11. Como eletrólito suporte, foi utilizado em todos os estudos por SWV tampão BR 0,04 mol L⁻¹ em pH 7.

4.18.1 Otimização da frequência de aplicação do pulso de potencial

Como já mencionado anteriormente, o estudo para a seleção do valor de frequência a ser empregada na SWV é muito importante. Em razão disso, para o desenvolvimento do método proposto para a detecção de mCPP foi realizado um estudo no intervalo de 10 a 100 s⁻¹

¹. A escolha do valor de frequência foi realizada levando-se em consideração a intensidade da corrente de pico, ruídos da linha de base e alargamento do pico. A Figura 46 apresenta os voltamogramas de SWV obtidos em função da variação da aplicação da frequência dos pulsos de potenciais. Nesse estudo, a amplitude e o incremento de potencial foram fixados em 50 mV e 4 mV, respectivamente.

Figura 46. (A) Voltamogramas de onda quadrada obtidos para solução de mCPP 30 $\mu\text{mol L}^{-1}$ em diferentes frequências de aplicação de pulso de potenciais. (B) Relação entre I vs. f para os respectivos voltamogramas ($n = 3$). Eletrólito suporte: tampão BR 0,04 mol L^{-1} pH 7. Parâmetros SWV: a : 50 mV; ΔE : 4 mV; eletrodo: SPCE.



Fonte: O autor.

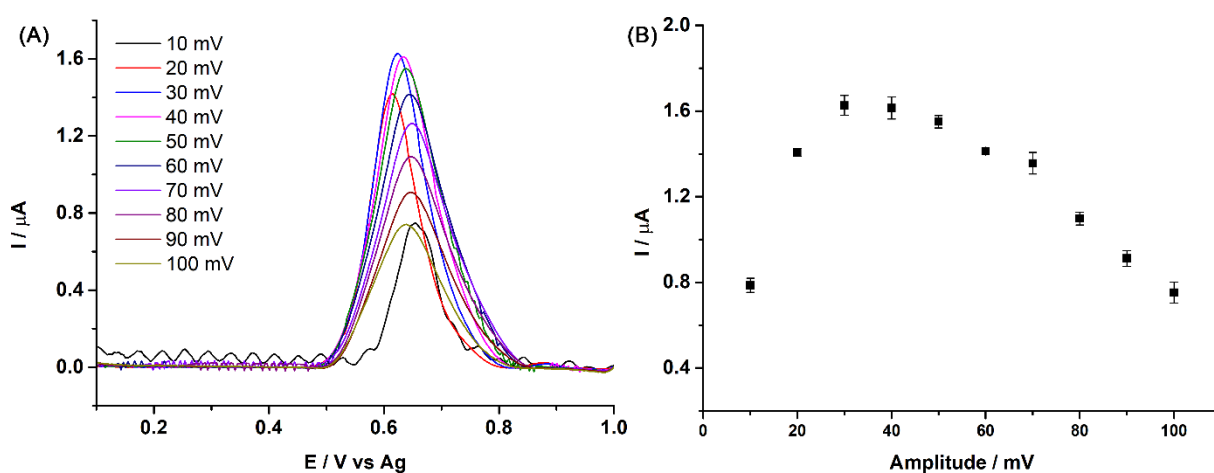
Como pode ser observado na Figura 46, o aumento da frequência provoca o aumento na corrente de pico de oxidação da mCPP até a frequência de 40 s^{-1} . Valores maiores de frequência causam grande aumento do ruído da linha base e, conseqüentemente, maior imprecisão nas medidas. A partir dessas observações, o valor de frequência de 50 s^{-1} foi selecionado para os estudos posteriores.

4.18.2 Otimização da aplicação da amplitude de pulso de potencial

Após a otimização da frequência foi realizada a otimização da amplitude de pulso a ser empregada na SWV. Os estudos foram realizados no intervalo de 10 a 100 mV com a manutenção da frequência e o incremento de potencial em 30 s^{-1} e 4 mV, respectivamente. A Figura 47 mostra os voltamogramas de SWV obtidos e a variação da I_p com o aumento da

amplitude de pulso de potencial aplicado ao sensor sob o qual continha a solução de mCPP 30 $\mu\text{mol L}^{-1}$.

Figura 47. (A) Voltamogramas de SWV obtidos para a variação da amplitude de pulsos de potenciais para solução de mCPP 30 $\mu\text{mol L}^{-1}$. (B) Relação entre corrente de pico e variação da amplitude ($n = 3$). Eletrólito de suporte: BR 0,04 mol L^{-1} em pH 7; $f = 30 \text{ s}^{-1}$ e $\Delta E = 2 \text{ mV}$; eletrodo: SPCE.



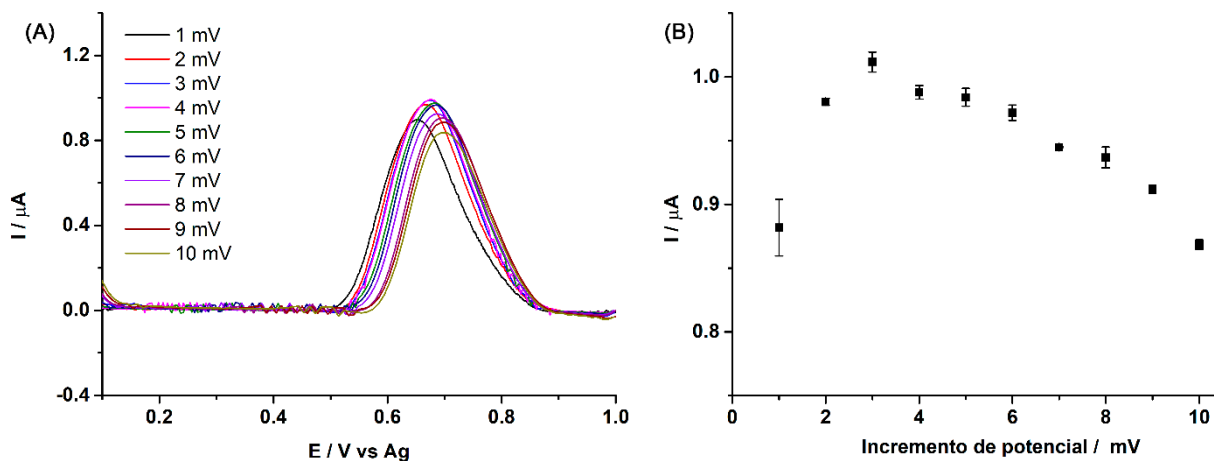
Fonte: O autor.

Os resultados apresentados na Figura 47 mostram que a corrente de pico da mCPP aumenta significativamente variando a amplitude de 10 a 30 mV. Para valores maiores do que 40 mV ocorre o decréscimo da corrente de pico. Dessa forma, o valor de amplitude de pulso de potencial selecionado para os estudos posteriores foi de 40 mV.

4.18.3 Otimização do incremento de potencial

Como já mencionado anteriormente na Parte 1 da tese, a otimização do incremento de potencial é de grande importância já que este parâmetro influencia diretamente na velocidade de varredura da SWV (NUWER; O'DEA; OSTERYOUNG, 1991). Na otimização desse parâmetro, o valor de f foi fixado em 30 s^{-1} e o de a em 50 mV. A Figura 48 apresenta os voltamogramas de SWV obtidos e a relação entre corrente de pico e a variação do incremento de potencial para uma solução contendo mCPP 30 $\mu\text{mol L}^{-1}$.

Figura 48. (A) Voltamogramas obtidos para a variação do incremento de potencial de 1 a 10 mV. (B) Relação entre corrente de pico e incremento de potencial para solução contendo mCPP $30 \mu\text{mol L}^{-1}$ ($n = 3$); Eletrólito de suporte: tampão BR $0,04 \text{ mol L}^{-1}$ em $\text{pH} = 7$; $f = 30 \text{ s}^{-1}$ e $a = 50 \text{ mV}$; eletrodo: SPCE.



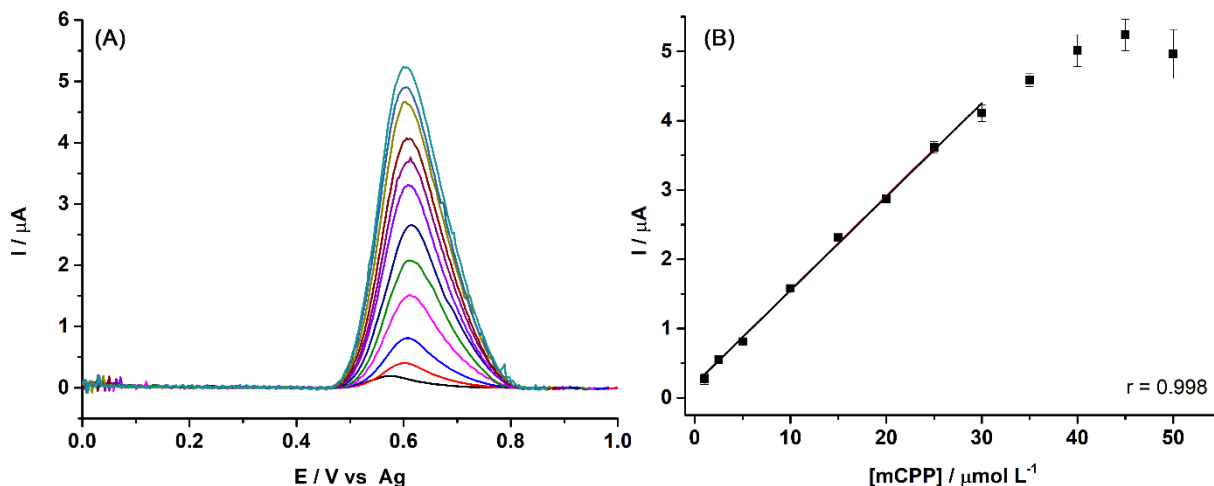
Fonte: O autor.

Os resultados apresentados na Figura 48 mostram um comportamento semelhante ao observado para variação da amplitude. A corrente de pico aumenta até a aplicação de 3 mV, após esse valor ocorre o decréscimo do valor de corrente de pico à medida que a velocidade de varredura aumenta. Em razão disso, o incremento de potencial de 3 mV foi selecionado para os estudos posteriores.

4.19 Estudo da faixa linear de resposta da mCPP

Utilizando os parâmetros otimizados para a SWV ($f = 50 \text{ s}^{-1}$; $a = 40 \text{ mV}$ e $\Delta E = 3 \text{ mV}$), estudos foram realizados para a determinação da faixa linear de resposta da mCPP em SPCE. A Figura 49A mostra os voltamogramas de SWV obtidos na análise de soluções contendo concentrações crescentes de mCPP de $1 - 50 \mu\text{mol L}^{-1}$. A Figura 49B apresenta a curva de calibração obtida a partir dos voltamogramas apresentados.

Figura 49. Voltamogramas de SWV obtidos para concentrações crescentes de mCPP ($1 - 50 \mu\text{mol L}^{-1}$); **(B)** Respectiva curva de calibração obtida ($n = 3$). Condições experimentais: $a = 40 \text{ mV}$; $f = 50 \text{ s}^{-1}$; $\Delta E = 3 \text{ mV}$. Eletrólito de suporte: tampão BR $0,04 \text{ mol L}^{-1}$ $\text{pH} = 7,0$.



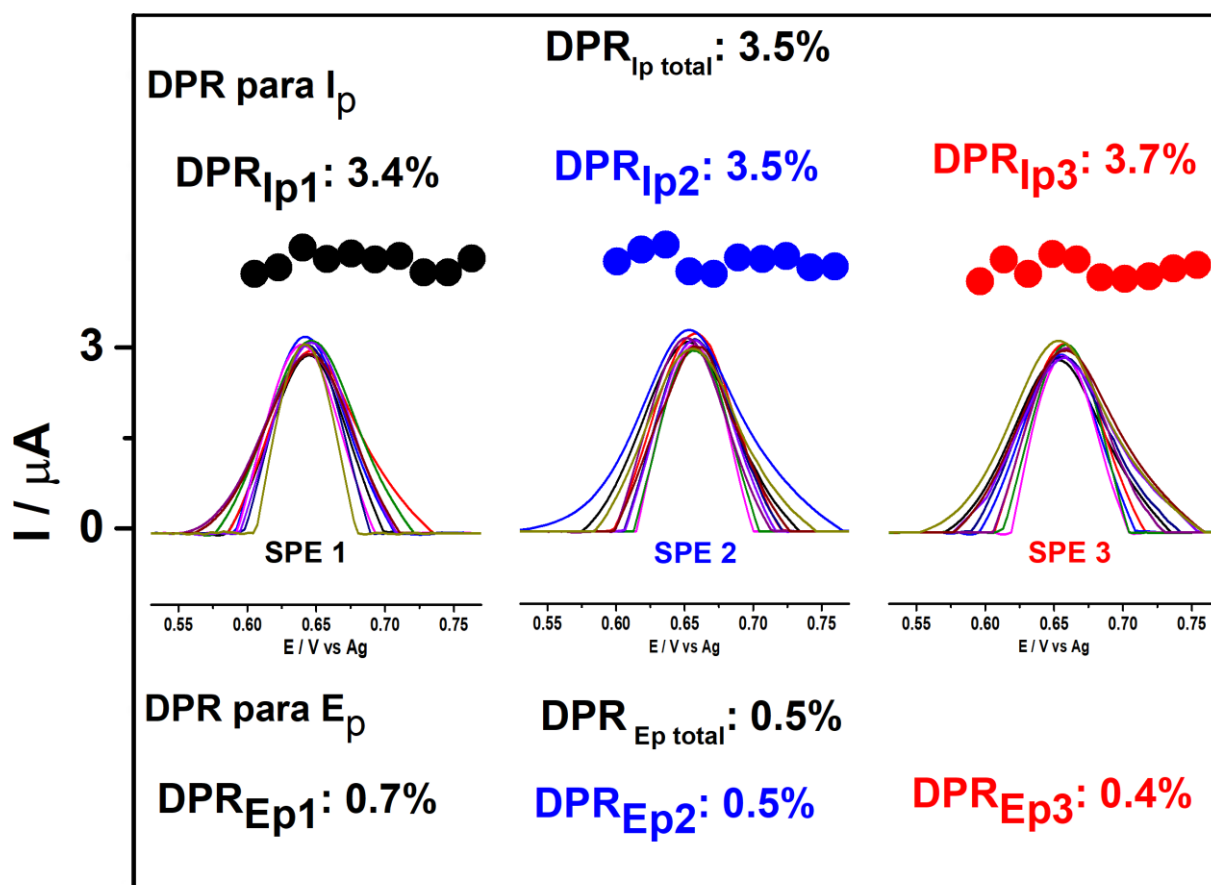
Fonte: O autor.

É possível observar na Figura 49 que existe uma relação linear entre a corrente de pico e a concentração de mCPP adicionada na faixa de 1 a $30 \mu\text{mol L}^{-1}$. Empregando as Equações 5 e 6 os valores de LD e LQ foram calculados como sendo de $0,1$ e $0,3 \mu\text{mol L}^{-1}$, respectivamente.

4.20 Repetibilidade do método

Após a determinação da faixa linear, a repetibilidade e a reprodutibilidade do método foram avaliadas empregando-se os parâmetros otimizados. Para a avaliação da repetibilidade foram realizadas medidas sucessivas ($n = 10$) em uma solução contendo mCPP $30 \mu\text{mol L}^{-1}$. A reprodutibilidade do método foi estudada realizando-se 10 medidas sucessivas empregando 3 eletrodos diferentes e solução contendo mCPP $30 \mu\text{mol L}^{-1}$. A Figura 50 apresenta os voltamogramas obtidos e os respectivos valores de DPR para os valores de corrente e potencial de pico dos 3 SPCEs utilizados.

Figura 50. Voltamogramas obtidos por SWV para mediadas sucessivas de soluções contendo mCPP 30 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Condições experimentais, ver Figura 49.



Fonte: O autor.

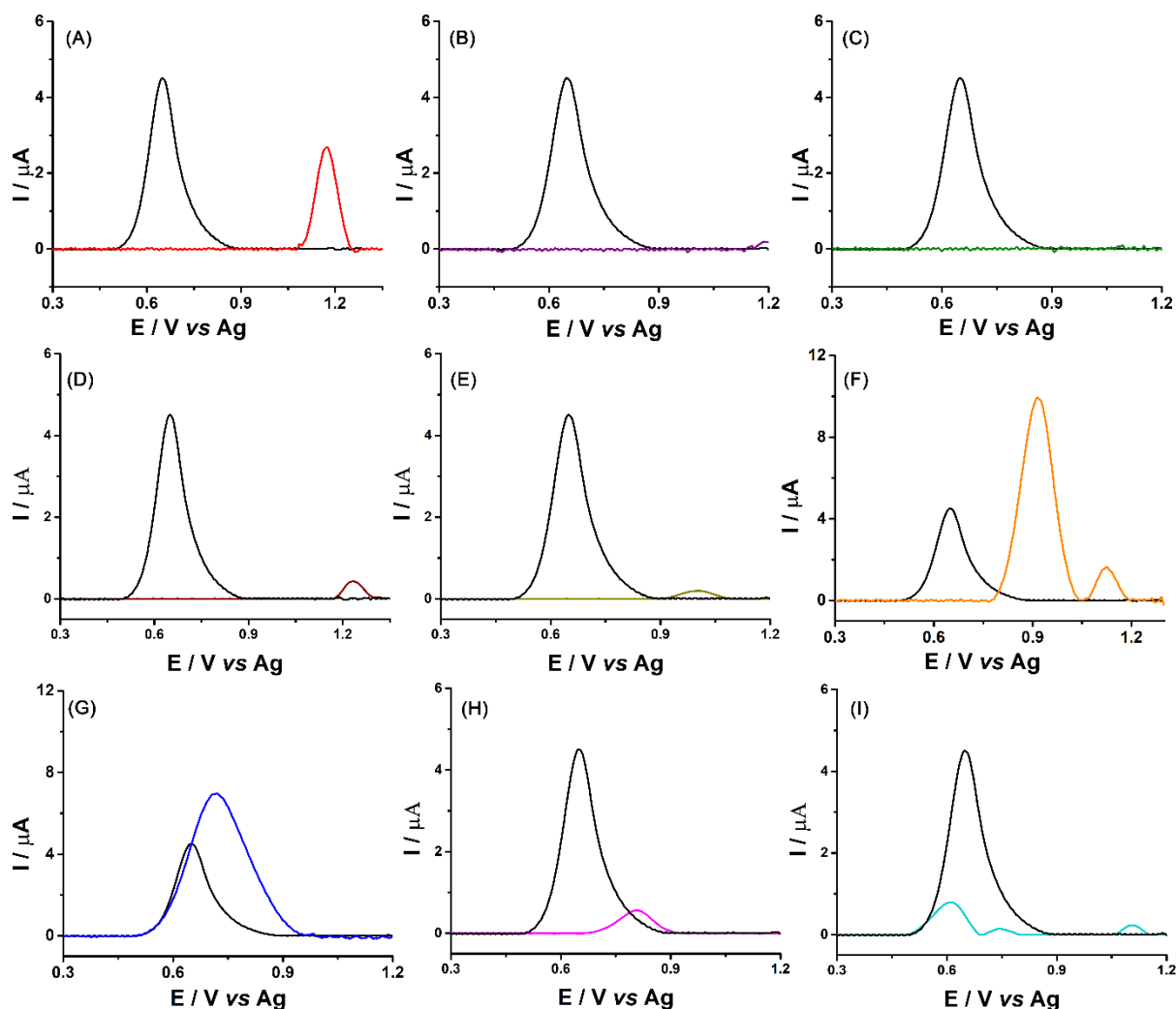
Os resultados apresentados na Figura 50 mostram que os valores de I_p ($DPR \leq 3,7\%$) e E_p ($DPR \leq 0,7\%$) apresentaram pequenas variações ao longo das medidas sucessivas para cada eletrodo. Além disso, o método se mostrou reprodutivo entre eletrodos diferentes ($n = 3$) para I_p ($DPR \leq 3,5$) e E_p ($DPR \leq 0,5\%$).

4.21 Estudo de interferentes na detecção de mCPP

Após a identificação da faixa linear de resposta da mCPP foram realizados alguns estudos para verificar a possível interferência de alguns compostos em sua detecção empregando o método proposto. A cafeína (CAF) é uma droga lícita que frequentemente é encontrada associada à mCPP com o intuito de potencializar seus efeitos ou então de diluir a droga e aumentar seu valor agregado. Drogas ilícitas como anfetamina, MA, metilona, mefedrona, etilona, 3,4-metilenodioxipirovalerona (MDPV), BZP e MDMA também são

comumente encontradas associadas à mCPP com os mesmos objetivos já mencionados (“*DrugsData.org (formely EcstasyData): Lab Test Results for Ecstasy/Molly and other Recreational Drugs*”, 2021). Em razão disso, estudos para verificar a possível interferência de CAF, anfetamina, MA, MDMA e BZP foram realizados e os resultados obtidos são apresentados na Figura 51.

Figura 51. Voltamogramas de SWV obtidos para solução contendo mCPP 30 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (linha preta) e possíveis interferentes (30 $\mu\text{mol L}^{-1}$): (A) CAF; (B) anfetamina; (C) MA; (D) metilona; (E) mefedrona; (F) MDMA; (G) BZP; (H) etilona; (I) MDPV. Outras condições experimentais, ver Figura 49.



Fonte: O autor.

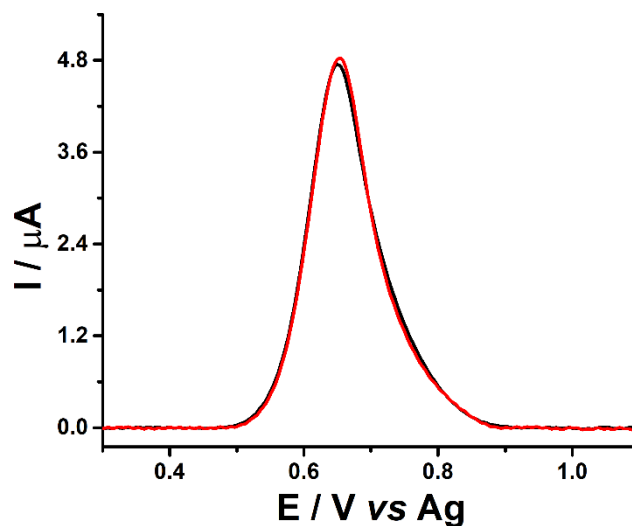
Os resultados apresentados na Figura 51A mostram que a CAF apresenta pico de oxidação em +1,10 V (linha vermelha) no SPCE enquanto a mCPP apresenta pico de

oxidação em +0,65 V (linha preta). Dessa forma, os resultados mostram que é possível realizar a detecção seletiva de mCPP em amostras forenses apreendidas que também contenham CAF. Para amostras contendo mCPP juntamente com anfetamina (Figura 51B) e MA (Figura 51C), a detecção de mCPP pode ser realizada sem interferência, uma vez que nenhum dos dois compostos apresenta pico de oxidação na faixa de potencial estudada em SPCE. Já a metilona (Figura 51D) e a mefedrona (Figura 51E) apresentam picos de oxidação em +1,23 e +1,01 V, respectivamente, permitindo a detecção seletiva de mCPP em amostras contendo esses compostos. No caso de amostras contendo mCPP e MDMA, que é outra anfetamina bem conhecida, podem ser observados dois picos de oxidação eletroquímica (Figura 51F, linha laranja). Entretanto, ambos os picos ocorrem em potenciais mais positivos (+0,95 e +1,1 V) do que para a mCPP, ou seja, a detecção de mCPP é possível de ser realizada em amostras que contenha a mistura de ambos os compostos. Por outro lado, os processos de oxidação para BZP (Figura 51G, linha azul), etilona (Figura 5H, linha magenta), MDPV (Figura 5I, linha ciano) e mCPP são praticamente sobrepostos sobre SPCE, indicando que BZP, etilona e MDPV são espécies interferentes para o método proposto. No entanto, vale ressaltar que levando em consideração a aplicação do método para análise forense e que BZP, etilona e MDPV também são drogas ilegais, a detecção desses compostos também é importante em investigações forenses.

4.22 Determinação de mCPP em amostra de referência e amostras apreendidas

O método proposto foi empregado para detectar a mCPP e verificar sua concentração em uma amostra de referência fornecida pela UNODC. A amostra foi diluída em eletrólito de suporte para a obtenção da concentração final de $30 \mu\text{mol L}^{-1}$. A Figura 52 mostra dois voltamogramas de SWV sobrepostos contendo solução padrão de mCPP $30 \mu\text{mol L}^{-1}$ (linha preta) e amostra de referência (linha vermelha).

Figura 52. Voltamogramas obtidos por SWV para solução contendo solução padrão de mCPP $30 \mu\text{mol L}^{-1}$ (linha preta) e amostra de referência de mCPP (linha vermelha). Outras condições experimentais, ver Figura 49.

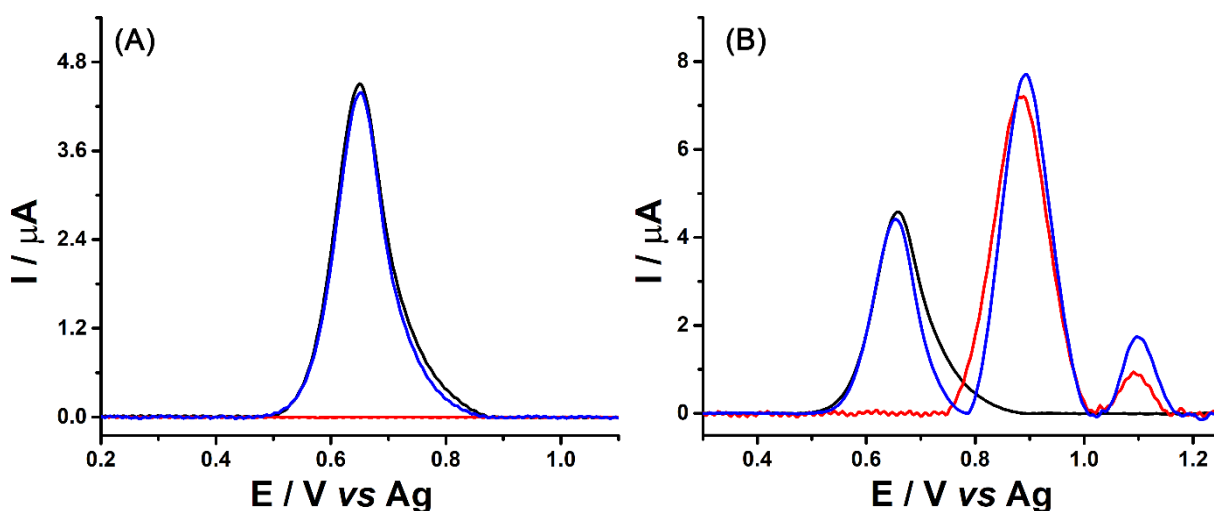


Fonte: O autor.

Os resultados apresentados na Figura 52 mostram que a mCPP presente na amostra apreendida apresentou comportamento eletroquímico muito similar ao da solução padrão de mCPP $30 \mu\text{mol L}^{-1}$.

Como já mencionado anteriormente, a mCPP pode ser encontrada juntamente com outras anfetaminas. Por essa razão foram realizados estudos de adição de mCPP em amostras apreendidas que continham MA ou MDMA. A Figura 53 mostra os voltamogramas obtidos em amostras de MA ou MDMA diluídas em eletrólito de suporte antes e após a adição de $30 \mu\text{mol L}^{-1}$ de mCPP. Além disso, o sinal obtido para solução padrão de mCPP $30 \mu\text{mol L}^{-1}$ em eletrólito de suporte também é mostrado.

Figura 53. Voltamogramas de SWV obtidos para duas amostras reais apreendidas de **(A)** MA antes (linha vermelha) e após (linha azul) a adição de mCPP e **(B)** MDMA antes (linha vermelha) e após (linha azul) a adição de mCPP. Sinal obtido para solução de mCPP 30 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (linha preta) é mostrado em ambas as figuras. Outras condições experimentais, ver Figura 49.



Fonte: O autor.

Como pode ser observado na Figura 53, o método proposto se mostrou eficiente em detectar de forma seletiva a mCPP em amostras apreendidas que apresentem em sua composição outras anfetaminas, tais como MA ou MDMA.

4.23 Conclusões parciais

O trabalho desenvolvido na Parte 3 da tese apresentou um método simples, rápido e de baixo custo para detecção de mCPP em amostras apreendidas utilizando a técnica de SWV e o sensor SPCE. Os resultados mostraram que drogas comumente encontradas em associação com mCPP, como CAF, MA, MDMA e anfetamina, não são potenciais interferentes na triagem de amostras apreendidas. Além disso, o método proposto apresentou LD e LQ de 0,1 e 0,3 $\mu\text{mol L}^{-1}$ respectivamente, e foi eficiente na detecção de mCPP em amostras reais apreendidas contendo MA ou MDMA. Portanto, o método proposto é uma alternativa barata para a triagem rápida de amostras apreendidas para detecção da presença de mCPP.

5 CONCLUSÕES GERAIS

Na Parte 1 dessa tese o comportamento eletroquímico da TIB utilizando BDD como eletrodo de trabalho foi estudado, assim como as condições otimizadas para o desenvolvido um método eletroquímico empregando SWV para a determinação de TIB em amostras de saliva e amostras farmacêuticas. O método faz uso de pequenos volumes de amostras e reagentes além de poder ser utilizado em laboratórios com requisitos mínimos de infraestrutura. Os resultados apresentados para a triagem de TIB em amostras de saliva reais foram satisfatórios (valores médios de recuperação = $104\% \pm 3$) com etapas simples de preparo de amostras (diluição em eletrólito de suporte). Além disso, o método também se mostrou adequado para a determinação de TIB em amostras farmacêuticas com obtenção de resultados estatisticamente semelhantes aos obtidos por HPLC com nível de confiança de 95%.

Na Parte 2 da tese, o eletrodo de BDD foi utilizado com sucesso no estudo do comportamento eletroquímico dos epímeros 3α e 3β -OHTIB e o mecanismo de oxidação eletroquímica foi proposto. Além disso, um método eletroquímico simples e rápido usando DPV foi desenvolvido para a determinação dos metabólitos da TIB (3α e 3β -OHTIB) em amostra de urina sintética. O método se mostrou eficiente (recuperação = $98\% \pm 5$) e estável (DPR < 2,5%; n = 15). Além disso, foi também mostrado que o método proposto para a detecção de TIB por SWV (Parte 1) também permite a triagem rápida de amostras de salivas para detecção dos metabólitos 3α e 3β -OHTIB.

Na Parte 3 da tese, foi mostrado que o sensor SPCE foi usado com sucesso no estudo do comportamento eletroquímico da mCPP, inclusive com a proposição de um mecanismo de oxidação eletroquímica. Além disso, um método eletroquímico simples e portátil foi desenvolvido para a determinação de mCPP em amostras apreendidas. A interferência de compostos eletroativos comumente presentes neste tipo de amostras (CAF, BZP, MA, MDMA e anfetamina) foram avaliadas e, somente a BZP apresentou pico de oxidação próximo (interferente) ao da mCPP. O método empregando SPCE se mostrou eficiente para a triagem rápida de amostras para a detecção de mCPP em amostras apreendidas contendo MA e MDMA.

REFERÊNCIAS

- ALI, H. S.; ABDULLAH, A. A.; PINAR, P. T.; YARDIM, Y.; ŞENTÜRK, Z. Simultaneous voltammetric determination of vanillin and caffeine in food products using an anodically pretreated boron-doped diamond electrode: Its comparison with HPLC-DAD. **Talanta**, v. 170, p. 384–391, 1 ago. 2017. <<http://doi.org/10.1016/j.talanta.2017.04.037>>
- ANDRADE, L. S.; SALAZAR-BANDA, G. R.; ROCHA-FILHO, R. C.; FATIBELLO-FILHO, O. Cathodic Pretreatment of Boron-Doped Diamond Electrodes and their Use in Electroanalysis. In: **Synthetic Diamond Films: Preparation, Electrochemistry, Characterization, and Applications**. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc., 2011. p. 181–212.
- ANVISA. Lista 2 - Analito para Estabelecimento da Biodisponibilidade Relativa/Bioequivalência Resolução - RE nº 1170, de 19 de abril de 2006. 2020.
- ASAI, K.; IVANDINI, T. A.; EINAGA, Y. Continuous and selective measurement of oxytocin and vasopressin using boron-doped diamond electrodes. **Scientific Reports**, v. 6, n. 1, p. 1–10, 7 set. 2016. <<http://doi.org/10.1038/srep32429>>
- 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>>
- BARD, A. J.; FAULKNER, L. R. **Electrochemical Methods: Fundamentals and Applications**. New York: wiley, 1980. v. 30
- BARROSO, M.; COSTA, S.; DIAS, M.; VIEIRA, D. N.; QUEIROZ, J. A.; LÓPEZ-RIVADULLA, M. Analysis of phenylpiperazine-like stimulants in human hair as trimethylsilyl derivatives by gas chromatography-mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1217, n. 40, p. 6274–6280, 2010. <<http://doi.org/10.1016/j.chroma.2010.08.001>>
- BASARIA, S. Androgen abuse in athletes: Detection and consequences. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 95, n. 4, p. 1533–1543, 2010. <<http://doi.org/10.1210/jc.2009-1579>>

BASARIA, S.; WAHLSTROM, J. T.; DOBS, A. S. Clinical review 138: Anabolic-androgenic steroid therapy in the treatment of chronic diseases. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 86, n. 11, p. 5108–5117, 2001. <<http://doi.org/10.1210/jc.86.11.5108>>

BEZERRA DA SILVA, R. A.; RODRIGUES CUNHA, R.; COELHODA SILVA, A. T.; BESSADE OLIVEIRA, A. L.; SALMEN ESPINDOLA, F.; ABARZA MUNOZ, R. A.; RICHTER, E. M. Development of a simple and fast electrochemical method to evaluate physical stress in athletes. **Electroanalysis**, v. 23, n. 11, p. 2601–2606, 2011. <<http://doi.org/10.1002/elan.201100326>>

BHASIN, S.; STORER, T. W.; BERMAN, N.; CALLEGARI, C.; CLEVINGER, B.; PHILLIPS, J.; BUNNELL, T. J.; TRICKER, R.; SHIRAZI, A.; CASABURI, R. The effects of supraphysiologic doses of testosterone on muscle size and strength in normal men. **New England Journal of Medicine**, v. 335, n. 1, p. 1–7, 1996. <<http://doi.org/10.1056/NEJM199607043350101>>

BOSSONG, M. G.; BRUNT, T. M.; VAN DIJK, J. P.; RIGTER, S. M.; HOEK, J.; GOLDSCHMIDT, H. M. J.; NIESINK, R. J. M. MCPP: An undesired addition to the ecstasy market. **Journal of Psychopharmacology**, v. 24, n. 9, p. 1395–1401, 2010. <<http://doi.org/10.1177/0269881109102541>>

BOSSONG, M. G.; VAN DIJK, J. P.; NIESINK, R. J. M. Methylone and mCPP, two new drugs of abuse? **Addiction Biology**, v. 10, n. 4, p. 321–323, 2005. <<http://doi.org/10.1080/13556210500350794>>

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

CARDOSO, F. F. D. S. E S.; CÉSAR, I. C.; MUNDIM, I. M.; DE SOUZA TEIXEIRA, L.; DA SILVA, E. P.; BONFIM, R. R.; GOMES, S. A.; FERREIRA, D. P.; LOPES, A. R. B.; PASCOAL, H. D.; DE SOUZA, W. C.; PIANETTI, G. A. Determination of 3- α -hydroxytibolone in human plasma by LC-MS/MS: Application for a pharmacokinetic study after administration of a tibolone formulation. **Biomedical Chromatography**, v. 27, n. 11, p. 1457–1462, 2013. <<http://doi.org/10.1002/bmc.2943>>

CARDOSO, R. M.; MENDONÇA, D. M. H.; SILVA, W. P.; SILVA, M. N. T.; NOSSOL, E.; DA SILVA, R. A. B.; RICHTER, E. M.; MUÑOZ, R. A. A. 3D printing for electroanalysis:

From multiuse electrochemical cells to sensors. **Analytica Chimica Acta**, v. 1033, p. 49–57, nov. 2018. <<http://doi.org/10.1016/j.aca.2018.06.021>>

CELOTTI, F.; CESI, P. N. Anabolic steroids: a review of their effects on the muscles, of their possible mechanisms of action and their use in athletics. **Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 43, n. 5, p. 469–477, 1992. <[http://doi.org/https://doi.org/10.1016/0960-0760\(92\)90085-w](http://doi.org/https://doi.org/10.1016/0960-0760(92)90085-w)>

CHÝLKOVÁ, J.; TOMÁŠKOVÁ, M.; JEHLIČKA, V.; ŠELEŠOVSKÁ, R.; HLAVATÁ, P. Voltammetric determination of plant growth stimulants based on organic acids. **Monatshefte für Chemie**, v. 148, n. 3, p. 473–479, 1 mar. 2017. <<http://doi.org/10.1007/s00706-016-1863-y>>

COLOMBO, D.; FERRABOSCHI, P.; RONCHETTI, F.; TOMA, L. Stereochemical analysis of the 3 α - and 3 β -hydroxy metabolites of tibolone through NMR and quantum-chemical investigations. An experimental test of GIAO calculations. **Magnetic Resonance in Chemistry**, v. 40, n. 9, p. 581–588, 2002. <<http://doi.org/10.1002/mrc.1064>>

DA COSTA OLIVEIRA, T.; SANTANA, M. H. P.; BANKS, C. E.; MUNOZ, R. A. A.; RICHTER, E. M. Electrochemical Portable Method for on site Screening of Scopolamine in Beverage and Urine Samples. **Electroanalysis**, v. 31, n. 3, p. 567–574, 2019. <<http://doi.org/10.1002/elan.201800707>>

DA ROSA, H. B.; TOLOTTI, R. C.; MIRON, D. D. S.; DE SOUZA, K. C. B. Desenvolvimento e validação de método para o doseamento de tibolona em cápsulas por cromatografia líquida de alta eficiência. **Química Nova**, v. 35, n. 5, p. 1030–1035, 2012. <<http://doi.org/10.1590/S0100-40422012000500030>>

DA SILVA, R. A. B.; GIMENES, D. T.; TORMIN, T. F.; MUNOZ, R. A. A.; RICHTER, E. M. Batch injection analysis with amperometric detection: application for simultaneous analysis using a single working electrode. **Analytical Methods**, v. 3, n. 12, p. 2804, 2011. <<http://doi.org/10.1039/c1ay05395g>>

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

DE ROSE, E. H.; FEDER, M. G.; BENTO, R. M. A.; AQUINO NETO, F. R. Informações

sobre o uso de medicamentos no esporte. **Rio de Janeiro**, 2006.

DE SOUZA, D.; MACHADO, S. A. S.; AVACA, L. A. Voltametria de onda quadrada. Primeira parte: Aspectos teóricos. **Quimica Nova**, v. 26, n. 1, p. 81–89, 2003. <<http://doi.org/10.1590/s0100-40422003000100015>>

DEMKOWSKA, I.; POLKOWSKA, Z.; KIELBRATOWSKA, B.; NAMIÉSNIK, J. Application of ion chromatography for the determination of inorganic ions, especially thiocyanates, in human saliva samples as biomarkers of environmental tobacco smoke exposure. **Journal of Analytical Toxicology**, v. 34, n. 9, p. 533–538, 2010. <<http://doi.org/10.1093/jat/34.9.533>>

DEROCO, P. B.; MEDEIROS, R. A.; ROCHA-FILHO, R. C.; FATIBELLO-FILHO, O. Simultaneous voltammetric determination of aspartame and acesulfame-K in food products using an anodically pretreated boron-doped diamond electrode. **Analytical Methods**, v. 7, n. 5, p. 2135–2140, 7 mar. 2015. <<http://doi.org/10.1039/c4ay03047h>>

DORTA, D. J.; YONAMINE, M.; DA COSTA, J. L.; DE MARTINIS, B. S. **Toxicologia forense**. Editora Blucher, 2018.

DrugsData.org (formely EcstasyData): Lab Test Results for Ecstasy/Molly and other Recreational Drugs. . Acesso em: 2 mar. 2021.

EIDELWEIN, I.; DECKER, J. R. A legislação internacional e nacional antidoping que regula os atletas profissionais brasileiros. **Revista Destaques Acadêmicos**, v. 5, n. 2, p. 111–121, 2013.

EKLUND, J. C.; BOND, A. M.; ALDEN, J. A.; COMPTON, R. G. Perspectives in Modern Voltammetry: Basic Concepts and Mechanistic Analysis. **Advances in Physical Organic Chemistry**, v. 32, n. C, p. 1–120, 1999. <[http://doi.org/10.1016/S0065-3160\(08\)60006-4](http://doi.org/10.1016/S0065-3160(08)60006-4)>

EL-NABY, E. Potentiometric Signal Transduction for Selective Determination of 1-(3-Chlorophenyl)piperazine “Legal Ecstasy” Through Biomimetic Interaction Mechanism. **Chemosensors**, v. 7, n. 3, p. 46, 2019. <<http://doi.org/10.3390/chemosensors7030046>>

ENACHE, T. A.; CHIORCEA-PAQUIM, A. M.; FATIBELLO-FILHO, O.; OLIVEIRA-BRETT, A. M. Hydroxyl radicals electrochemically generated in situ on a boron-doped diamond electrode. **Electrochemistry Communications**, v. 11, n. 7, p. 1342–1345, 1 jul. 2009. <<http://doi.org/10.1016/j.elecom.2009.04.017>>

FRANKLIN, M. Determination of m-Chlorophenyl-Piperazine in Plasma by High-Performance Liquid Chromatography with Coulometric Detection. **Journal of Liquid Chromatography**, v. 15, n. 9, p. 1553–1563, jul. 1992. <<http://doi.org/10.1080/10826079208018308>>

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, 2019. <<http://doi.org/10.3389/fchem.2019.00190>>

FRISOLI, A.; CHAVES, P. H. M.; PINHEIRO, M. M.; SZEJNFELD, V. L. The effect of nandrolone decanoate on bone mineral density, muscle mass, and hemoglobin levels in elderly women with osteoporosis: A double-blind, randomized, placebo-controlled clinical trial. **Journals of Gerontology - Series A Biological Sciences and Medical Sciences**, v. 60, n. 5, p. 648–653, 2005. <<http://doi.org/10.1093/gerona/60.5.648>>

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. n. 9, p. 37–41, 1993.

GOSSER, D. K. Cyclic Voltammetry; Simulation and Analysis of Reaction Mechanisms. **Synthesis and Reactivity in Inorganic and Metal-Organic Chemistry**, v. 24, n. 7, p. 1237–1238, ago. 1994. <<http://doi.org/10.1080/00945719408001398>>

GOYAL, R. N.; GUPTA, V. K.; CHATTERJEE, S. Electrochemical investigations of corticosteroid isomers-testosterone and epitestosterone and their simultaneous determination in human urine. **Analytica Chimica Acta**, v. 657, n. 2, p. 147–153, 2010. <<http://doi.org/10.1016/j.aca.2009.10.035>>

GRANGER, M. C. 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, 1999. <<http://doi.org/10.1149/1.1392673>>

HAYASHI, T.; SAKURADA, I.; HONDA, K.; MOTOHASHI, S.; UCHIKURA, K. Electrochemical Detection of Sugar-related Compounds Using Boron-doped Diamond Electrodes. **Analytical Sciences**, v. 28, n. 2, p. 127–127, 10 fev. 2012.

<<http://doi.org/10.2116/analsci.28.127>>

HOFFMANN, R.; KRIELE, A.; OBLOH, H.; HEES, J.; WOLFER, M.; SMIRNOV, W.; YANG, N.; NEBEL, C. E. Electrochemical hydrogen termination of boron-doped diamond. **Applied Physics Letters**, v. 97, n. 5, p. 052103, 2 ago. 2010. <<http://doi.org/10.1063/1.3476346>>

HOFFMANN, R.; OBLOH, H.; TOKUDA, N.; YANG, N.; NEBEL, C. E. Fractional surface termination of diamond by electrochemical oxidation. **Langmuir**, v. 28, n. 1, p. 47–50, 10 jan. 2012. <<http://doi.org/10.1021/la2039366>>

HOLLAND, M. L.; HEEBNER, E. T. High-performance liquid chromatographic assay with ultraviolet detection for the determination of etoperidone and two active metabolites, 5-(1-hydroxyethyl)etoperidone and 1-(3-chlorophenyl)piperazine, in plasma. **Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications**, v. 567, n. 2, p. 433–440, 1991. <[http://doi.org/10.1016/0378-4347\(91\)80149-7](http://doi.org/10.1016/0378-4347(91)80149-7)>

HUDARI, F. F.; ZANONI, M. V. B. A glassy carbon electrode modified with reduced graphene oxide for sensitive determination of bumetanide in urine at levels required for doping analysis. **Microchimica Acta**, v. 184, n. 10, p. 4117–4124, 14 out. 2017. <<http://doi.org/10.1007/s00604-017-2443-5>>

HUMPHREY, S. P.; WILLIAMSON, R. T. A review of saliva: Normal composition, flow, and function. **Journal of Prosthetic Dentistry**, v. 85, n. 2, p. 162–169, 2001. <<http://doi.org/10.1067/mpr.2001.113778>>

HUYNH, M. H. V.; MEYER, T. J. Proton-Coupled Electron Transfer. **Chemical Reviews**, v. 107, n. 11, p. 5004–5064, 1 nov. 2007. <<http://doi.org/10.1021/cr0500030>>

KENNEDY, M. C.; O’SULLIVAN, A. J. Do anabolic—androgenic steroids enhance sporting performance? **Medical Journal of Australia**, v. 166, n. 2, p. 60–61, jan. 1997. <<http://doi.org/10.5694/j.1326-5377.1997.tb138719.x>>

KINTZ, P.; CIRIMELE, V.; DUMESTRE-TOULET, V.; LUDES, B. Doping control for nandrolone using hair analysis. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 24, n. 5–6, p. 1125–1130, 2001. <[http://doi.org/10.1016/S0731-7085\(00\)00570-7](http://doi.org/10.1016/S0731-7085(00)00570-7)>

KIRLA, K. T.; GROH, K. J.; POETZSCH, M.; BANOTE, R. K.; STADNICKA-MICHALAK, J.; EGGEN, R. I. L.; SCHIRMER, K.; KRAEMER, T. Importance of

toxicokinetics to assess the utility of zebrafish larvae as model for psychoactive drug screening using meta-chlorophenylpiperazine (mCPP) as example. **Frontiers in Pharmacology**, v. 9, n. APR, p. 1–12, 2018. <<http://doi.org/10.3389/fphar.2018.00414>>

KLOUDA, J.; BAREK, J.; NESMĚRÁK, K.; SCHWARZOVÁ-PECKOVÁ, K. Non-Enzymatic Electrochemistry in Characterization and Analysis of Steroid Compounds. **Critical Reviews in Analytical Chemistry**, v. 47, n. 5, p. 384–404, 2017. <<http://doi.org/10.1080/10408347.2017.1318694>>

KLOUDA, J.; BAREK, J.; KOČOVSKÝ, P.; HERL, T.; MATYSIK, F. M.; NESMĚRÁK, K.; SCHWARZOVÁ-PECKOVÁ, K. Bile acids: Electrochemical oxidation on bare electrodes after acid-induced dehydration. **Electrochemistry Communications**, v. 86, p. 99–103, 2018. <<http://doi.org/10.1016/j.elecom.2017.11.024>>

KOVALEVA, J.; IR, E. D.; PAEPE, P. DE; VERSTRAETE, A. Acute chlorophenylpiperazine overdose: A case report and review of the literature. **Therapeutic Drug Monitoring**, v. 30, n. 3, p. 394–398, 2008. <<http://doi.org/10.1097/FTD.0b013e318170a879>>

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

LANARO, R.; COSTA, J. L.; ZANOLLI FILHO, L. A.; CAZENAVE, S. O. S. Identificação química da clorofenilpiperazina (CPP) em comprimidos apreendidos. **Química Nova**, v. 33, n. 3, p. 725–729, 2010. <<http://doi.org/10.1590/s0100-40422010000300042>>

LEIS, D. DAS. **Portal de Legislação**, 2009. . Acesso em: 19 mar. 2021

LEITE, F.; SANTOS, R. **País faz apreensão de nova droga**. . Acesso em: 18 mar. 2021.

LEVENT, A.; ALTUN, A.; TAŞ, S.; YARDIM, Y.; ŞENTÜRK, Z. Voltammetric Behavior of Testosterone on Bismuth Film Electrode: Highly Sensitive Determination in Pharmaceuticals and Human Urine by Square-Wave Adsorptive Stripping Voltammetry. **Electroanalysis**, v. 27, n. 5, p. 1219–1228, 2015. <<http://doi.org/10.1002/elan.201400627>>

LINO, F. M. A. .; CORDEIRO, D. D. .; BATISTA, R. C. .; GIL, E. S. .; SILVA, I. S. .; ANGNES, L. Electrochemical Remediation of 17 α -Ethinylestradiol. **Journal of Chemistry and Chemical Engineering**, v. 7, n. April, p. 344–350, 2013.

LOURENCAO, B. C.; PINHEIRO, R. A.; SILVA, T. A.; CORAT, E. J.; FATIBELLO-

FILHO, O. Porous boron-doped diamond/CNT electrode as electrochemical sensor for flow-injection analysis applications. **Diamond and Related Materials**, v. 74, p. 182–190, 1 abr. 2017. <<http://doi.org/10.1016/j.diamond.2017.03.006>>

LOURENCAO, B. C.; BROSCENSKI, R. F.; MEDEIROS, R. A.; FATIBELLO-FILHO, O.; ROCHA-FILHO, R. C. Analytical Applications of Electrochemically Pretreated Boron-Doped Diamond Electrodes. **ChemElectroChem**, v. 7, n. 6, p. 1291–1311, 2020. <<http://doi.org/10.1002/celec.202000050>>

LOVRIC, M.; KOMORSKY-LOVRIC, Š. Square-wave voltammetry of an adsorbed reactant. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 248, n. 2, p. 239–253, 1988. <[http://doi.org/10.1016/0022-0728\(88\)85089-7](http://doi.org/10.1016/0022-0728(88)85089-7)>

LUO, D.; WU, L.; ZHI, J. Fabrication of boron-doped diamond nanorod forest electrodes and their application in nonenzymatic amperometric glucose biosensing. **ACS Nano**, v. 3, n. 8, p. 2121–2128, 25 ago. 2009. <<http://doi.org/10.1021/nn9003154>>

LUO, Y. R. Comprehensive handbook of chemical bond energies. **Comprehensive Handbook of Chemical Bond Energies**, p. 1–1656, 2007. <<http://doi.org/10.1201/9781420007282>>

MAIER, F.; RIEDEL, M.; MANTEL, B.; RISTEIN, J.; LEY, L. Origin of surface conductivity in diamond. **Physical Review Letters**, v. 85, n. 16, p. 3472–3475, 16 out. 2000. <<http://doi.org/10.1103/PhysRevLett.85.3472>>

MARTINS, D.; GARRIDO, E. M. P. J.; BORGES, F.; GARRIDO, J. M. P. J. Voltammetric profiling of new psychoactive substances: Piperazine derivatives. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 883, n. February, p. 115054, 2021. <<http://doi.org/10.1016/j.jelechem.2021.115054>>

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

MODELSKA, K.; CUMMINGS, S. Tibolone for Postmenopausal Women: Systematic Review of Randomized Trials. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 87, n. 1, p. 16–23, jan. 2002. <<http://doi.org/10.1210/jcem.87.1.8141>>

MORENO, I. E. D.; DA FONSECA, B. M.; MAGALHÃES, A. R.; GERALDES, V. S.; QUEIROZ, J. A.; BARROSO, M.; COSTA, S.; GALLARDO, E. Rapid determination of piperazine-type stimulants in human urine by microextraction in packed sorbent after method optimization using a multivariate approach. **Journal of Chromatography A**, v. 1222, p. 116–120, jan. 2012. <<http://doi.org/10.1016/j.chroma.2011.12.016>>

NGAMCHUEA, K.; BATCHELOR-MCAULEY, C.; COMPTON, R. G. Understanding electroanalytical measurements in authentic human saliva leading to the detection of salivary uric acid. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 262, p. 404–410, jun. 2018. <<http://doi.org/10.1016/j.snb.2018.02.014>>

NOTSU, H.; YAGI, I.; TATSUMA, T.; TRYK, D. A.; FUJISHIMA, A. Surface carbonyl groups on oxidized diamond electrodes. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 492, n. 1, p. 31–37, set. 2000. <[http://doi.org/10.1016/S0022-0728\(00\)00254-0](http://doi.org/10.1016/S0022-0728(00)00254-0)>

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

OLIVEIRA, T. DA 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>>

PAVIA, D. L.; LAMPMAN, G. M.; KRIZ, G. S.; VYVYAN, J. R. **Introdução à espectroscopia**. Cengage Learning, 2010.

PEDROTTI, J. J.; ANGNES, L. 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>>

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

PENNING, T. M.; LEE, S. H.; JIN, Y.; GUTIERREZ, A.; BLAIR, I. A. Liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS) of steroid hormone metabolites and its

applications. **Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 121, n. 3–5, p. 546–555, 2010. <<http://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2010.01.005>>

PEREIRA, G. F.; DEROCO, P. B.; SILVA, T. A.; FERREIRA, H. S.; FATIBELLO-FILHO, O.; EGUILUZ, K. I. B.; SALAZAR-BANDA, G. R. Study of electrooxidation and enhanced voltammetric determination of β -blocker pindolol using a boron-doped diamond electrode. **Diamond and Related Materials**, v. 82, n. November 2017, p. 109–114, 2018. <<http://doi.org/10.1016/j.diamond.2018.01.010>>

PEREIRA, P. F.; DA SILVA, W. P.; MUÑOZ, R. A. A.; RICHTER, E. M. A simple and fast batch injection analysis method for simultaneous determination of phenazopyridine, sulfamethoxazole, and trimethoprim on boron-doped diamond electrode. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 766, p. 87–93, abr. 2016. <<http://doi.org/10.1016/j.jelechem.2016.01.034>>

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

PLETCHER, D.; GREFF, R.; PEAT, R.; PETER, L. M.; ROBINSON, J. **Instrumental Methods in Electrochemistry**. Philadelphia: Woodhead Publishing Limited, 2001.

RAMESHAM, R. Effect of annealing and hydrogen plasma treatment on the voltammetric and impedance behavior of the diamond electrode. **Thin Solid Films**, v. 315, n. 1–2, p. 222–228, mar. 1998. <[http://doi.org/10.1016/S0040-6090\(97\)00592-0](http://doi.org/10.1016/S0040-6090(97)00592-0)>

REN, Y.; DU, J.; DU, X.; XIN, G.; CHANG, J.; ZHOU, H.; HAO, H. A novel analytical method of TFMPP and mCPP in fluids of drug addicts using LLE-GC/NPD. **Technology and Health Care**, v. 27, n. S1, p. S67–S84, 2019. <<http://doi.org/10.3233/THC-199008>>

RIBEIRO, F. W. P.; SOUSA, C. P.; MORAIS, S.; DE LIMA-NETO, P.; CORREIA, A. N. Sensing of formetanate pesticide in fruits with a boron-doped diamond electrode. **Microchemical Journal**, v. 142, p. 24–29, 1 nov. 2018. <<http://doi.org/10.1016/j.microc.2018.06.012>>

ROCHA, L. R.; DE CÁSSICA MENDONÇA, J.; BOARETO CAPELARI, T.; ANTIGO MEDEIROS, R.; TEIXEIRA TARLEY, C. R. Development of a reliable and selective voltammetric method for determination of designer drug 1-(3-chlorophenyl)piperazine (mCPP) using boron-doped diamond electrode and exploiting surfactant-mediated

measurements. **Sensors and Actuators, B: Chemical**, v. 310, n. February, p. 127812, 2020a. <<http://doi.org/10.1016/j.snb.2020.127812>>

ROCHA, R. G.; SILVA, W. P.; SOUSA, R. M. F.; JUNIOR, M. C.; SANTANA, M. H. P.; MUNOZ, R. A. A.; RICHTER, E. M. Investigation of midazolam electro-oxidation on boron doped diamond electrode by voltammetric techniques and density functional theory calculations: Application in beverage samples. **Talanta**, v. 207, n. August 2019, p. 120319, 2020b. <<http://doi.org/10.1016/j.talanta.2019.120319>>

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, J. R.; RANGEL, A. O. S. S. Development of a chromatographic low pressure flow injection system using amperometric detection: Application to the analysis of niacin in coffee. **Food Chemistry**, v. 187, p. 152–158, 15 nov. 2015. <<http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.04.093>>

SCHOLZ, F. **Electroanalytical Methods**. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2010. v. 1s

SELVA, T. M. G.; REIS DE ARAUJO, W.; CESAR DA PAIXÃO, T. R. L. Non-Invasive Salivary Electrochemical Quantification of Paraquat Poisoning Using Boron Doped Diamond Electrode. **Electroanalysis**, v. 27, n. 7, p. 1642–1648, 1 jul. 2015. <<http://doi.org/10.1002/elan.201400745>>

SILVA, P. R. P. DA; DANIELSKI, R.; CZEPIELEWSKI, M. A. Esteróides anabolizantes no esporte. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, v. 8, n. 6, p. 235–243, 2002. <<http://doi.org/10.1590/s1517-86922002000600005>>

SILVA, R. A. G.; SILVA, L. A. J.; MUNOZ, R. A. A.; RICHTER, E. M.; OLIVEIRA, A. C. Fast and direct determination of mancozeb through batch injection analysis with amperometric detection on boron-doped diamond electrodes. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 733, p. 85–90, nov. 2014. <<http://doi.org/10.1016/j.jelechem.2014.09.025>>

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, ago. 2017. <<http://doi.org/10.1002/elan.201700160>>

SMIRNOV, W.; YANG, N.; HOFFMANN, R.; HEES, J.; OBLOH, H.; MÜLLER-SEBERT, W.; NEBEL, C. E. Integrated All-Diamond Ultramicroelectrode Arrays: Optimization of Faradaic and Capacitive Currents. **Analytical Chemistry**, v. 83, n. 19, p. 7438–7443, out. 2011. <<http://doi.org/10.1021/ac201595k>>

SOUSA, C. P.; RIBEIRO, F. W. P.; OLIVEIRA, T. M. B. F.; SALAZAR-BANDA, G. R.; DE LIMA-NETO, P.; MORAIS, S.; CORREIA, A. N. Electroanalysis of Pharmaceuticals on Boron-Doped Diamond Electrodes: A Review. **ChemElectroChem**, v. 6, n. 9, p. 2350–2378, 2 maio 2019. <<http://doi.org/10.1002/celec.201801742>>

STAACK, R. F.; PAUL, L. D.; SCHMID, D.; ROIDER, G.; ROLF, B. Proof of a 1-(3-chlorophenyl)piperazine (mCPP) intake-Use as adulterant of cocaine resulting in drug-drug interactions? **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 855, n. 2 SPEC. ISS., p. 127–133, 2007. <<http://doi.org/10.1016/j.jchromb.2007.05.017>>

STAACK, R. F.; MAURER, H. H. Piperazine-Derived Designer Drug 1-(3-Chlorophenyl)piperazine (mCPP): GC-MS Studies on its Metabolism and its Toxicological Detection in Rat Urine Including Analytical Differentiation from its Precursor Drugs Trazodone and Nefazodone. **Journal of Analytical Toxicology**, v. 27, n. 8, p. 560–568, 2003. <<http://doi.org/10.1093/jat/27.8.560>>

STRADIOTTO, N. R.; YAMANAKA, H.; ZANONI, M. V. B. **Electrochemical sensors: A powerful tool in analytical chemistry** *Journal of the Brazilian Chemical Society*, abr. 2003.

SU, W. Y.; CHENG, S. H. Electrocatalysis and sensitive determination of cysteine at poly(3,4-ethylenedioxythiophene)-modified screen-printed electrodes. **Electrochemistry Communications**, v. 10, n. 6, p. 899–902, 2008. <<http://doi.org/10.1016/j.elecom.2008.04.013>>

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 SPEC. ISS., p. 4021–4026, 2004.

<<http://doi.org/10.1016/j.electacta.2004.01.082>>

ŠVORC, L.; VOJS, M.; MICHNIAK, P.; MARTON, M.; RIEVAJ, M.; BUSTIN, D. Electrochemical behavior of methamphetamine and its voltammetric determination in biological samples using self-assembled boron-doped diamond electrode. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 717–718, p. 34–40, 15 mar. 2014. <<http://doi.org/10.1016/j.jelechem.2014.01.008>>

ŠVORC, L.; KALCHER, K. Modification-free electrochemical approach for sensitive monitoring of purine DNA bases: Simultaneous determination of guanine and adenine in biological samples using boron-doped diamond electrode. **Sensors and Actuators, B: Chemical**, v. 194, p. 332–342, 1 abr. 2014. <<http://doi.org/10.1016/j.snb.2013.12.104>>

SWAIN, G. M. Solid Electrode Materials. In: **Handbook of Electrochemistry**. Elsevier, 2007. p. 111–153.

TANCER, M. E.; JOHANSON, C. E. The subjective effects of MDMA and mCPP in moderate MDMA users. **Drug and Alcohol Dependence**, v. 65, n. 1, p. 97–101, 2001. <[http://doi.org/10.1016/S0376-8716\(01\)00146-6](http://doi.org/10.1016/S0376-8716(01)00146-6)>

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, 2003. <<http://doi.org/10.1021/ac020583q>>

THE WORLD ANTI-DOPING AGENCY. **Prohibited List - January 2020 - WADA**. . Acesso em: 6 out. 2020.

TIMMER, C. J.; HOUWING, N. S. Dose proportionality of three different doses of tibolone. **Pharmacotherapy**, v. 22, n. 1 I, p. 6–13, 2002. <<http://doi.org/10.1592/phco.22.1.6.33495>>

TIMMER, C. J.; VERHEUL, H. A. M.; DOORSTAM, D. P. Pharmacokinetics of tibolone in early and late postmenopausal women. **British Journal of Clinical Pharmacology**, v. 54, n. 2, p. 101–106, 2002. <<http://doi.org/10.1046/j.1365-2125.2002.01619.x>>

TORMIN, T. F.; CUNHA, R. R.; RICHTER, E. M.; MUNOZ, R. A. A. Fast simultaneous determination of BHA and TBHQ antioxidants in biodiesel by batch injection analysis using pulsed-amperometric detection. **Talanta**, v. 99, p. 527–531, set. 2012. <<http://doi.org/10.1016/j.talanta.2012.06.024>>

TSITSILONIS, S.; PERREA, D. Anabolic steroids: A review of the literature. **Archives of Hellenic Medicine**, v. 26, n. 5, p. 601–610, 2009.

VENUGOPAL, N.; VIJAYA BHASKAR REDDY, A.; MADHAVI, G.; JAAFAR, J.; MADHAVI, V.; GANGADHARA REDDY, K. Trace level quantification of 1-(3-chloropropyl)-4-(3-chlorophenyl)piperazine HCl genotoxic impurity in trazodone using LC–MS/MS. **Arabian Journal of Chemistry**, v. 12, n. 7, p. 1615–1622, 2019. <<http://doi.org/10.1016/j.arabjc.2014.10.006>>

VERHEUL, H. A. M.; TIMMER, C. J.; VAN IERSEL, M. L. P. S.; DELBRESSINE, L. P. C.; KLOOSTERBOER, H. J. Pharmacokinetic parameters of tibolone and metabolites in plasma, urine, feces, and bile from ovariectomized cynomolgus monkeys after a single dose or multiple doses of tibolone. **Drug Metabolism and Disposition**, v. 35, n. 7, p. 1112–1118, 2007. <<http://doi.org/10.1124/dmd.106.014159>>

VERHOEVEN, C. H. J.; VOS, R. M. E.; DELBRESSINE, L. P. C. The in vivo metabolism of tibolone in animal species. **European Journal of Drug Metabolism and Pharmacokinetics**, v. 27, n. 1, p. 1–10, mar. 2002. <<http://doi.org/10.1007/BF03190399>>

VOS, R. M. E.; KREBBERS, S. F. M.; VERHOEVEN, C. H. J.; DELBRESSINE, L. P. C. The in vivo human metabolism of tibolone. **Drug Metabolism and Disposition**, v. 30, n. 2, p. 106–112, 2002. <<http://doi.org/10.1124/dmd.30.2.106>>

WADDELL, S. A.; FERNANDEZ, C.; INVERARITY, C. C.; PRABHU, R. Extending the capability of forensic electrochemistry to the novel psychoactive substance benzylpiperazine. **Sensing and Bio-Sensing Research**, v. 13, p. 28–39, 2017. <<http://doi.org/10.1016/j.sbsr.2016.12.001>>

WANG, J. **Analytical electrochemistry**. 2. ed. New York: John Wiley & Sons, 2006.

WOHLFARTH, A.; WEINMANN, W. Bioanalysis of new designer drugs. **Bioanalysis**, v. 2, n. 5, p. 965–979, 2010. <<http://doi.org/10.4155/bio.10.32>>

WOLTERS, B. G.; KRAAN, G. P. B. Clinical applications of gas chromatography and gas chromatography-mass spectrometry of steroids. **Journal of Chromatography A**, v. 843, n. 1–2, p. 247–274, 1999. <[http://doi.org/10.1016/S0021-9673\(99\)00153-3](http://doi.org/10.1016/S0021-9673(99)00153-3)>

WONG, A.; SANTOS, A. M.; FATIBELLO-FILHO, O. Simultaneous determination of dopamine and cysteamine by flow injection with multiple pulse amperometric detection using

a boron-doped diamond electrode. **Diamond and Related Materials**, v. 85, p. 68–73, 1 maio 2018. <<http://doi.org/10.1016/j.diamond.2018.03.034>>

WONG, S. H. Y.; MARZOUK, N. Determination of a Trazadone Metabolite, 1-m-Chlorophenyl- Piperazine in Plasma by Liquid Chromatography. **Journal of Liquid Chromatography**, v. 8, n. 8, p. 1379–1395, jun. 1985. <<http://doi.org/10.1080/01483918508067151>>

YADAV, S. K.; CHANDRA, P.; GOYAL, R. N.; SHIM, Y. B. A review on determination of steroids in biological samples exploiting nanobio-electroanalytical methods. **Analytica Chimica Acta**, v. 762, p. 14–24, 2013. <<http://doi.org/10.1016/j.aca.2012.11.037>>

YAMADA, M.; KINOSHITA, K.; KUROSAWA, M.; SAITO, K.; NAKAZAWA, H. Analysis of exogenous nandrolone metabolite in horse urine by gas chromatography/combustion/carbon isotope ratio mass spectrometry. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 45, n. 4, p. 654–658, 2007. <<http://doi.org/10.1016/j.jpba.2007.07.005>>

ZACHOWSKI, E. J.; WOJCIECHOWSKI, M.; OSTERYOUNG, J. The analytical application of square-wave voltammetry. **Analytica Chimica Acta**, v. 183, n. C, p. 47–57, 1986. <[http://doi.org/10.1016/0003-2670\(86\)80073-3](http://doi.org/10.1016/0003-2670(86)80073-3)>

ZAVAZALOVA, J.; GHICA, M. E.; SCHWARZOVA-PECKOVA, K.; BAREK, J.; BRETT, C. M. A. Carbon-Based Electrodes for Sensitive Electroanalytical Determination of Aminonaphthalenes. **Electroanalysis**, v. 27, n. 7, p. 1556–1564, 1 jul. 2015. <<http://doi.org/10.1002/elan.201400719>>

ZOSKI, C. Handbook of electrochemistry. 2006.

ZUO, M.; GAO, M. J.; LIU, Z.; CAI, L.; DUAN, G. L. p-Toluenesulfonyl isocyanate as a novel derivatization reagent to enhance the electrospray ionization and its application in the determination of two stereo isomers of 3-hydroxyl-7-methyl-norethynodrel in plasma. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 814, n. 2, p. 331–337, 2005. <<http://doi.org/10.1016/j.jchromb.2004.10.054>>

ATIVIDADES DESENVOLVIDAS DURANTE O DOUTORADO

Publicação de artigos em revistas científicas relacionados à presente tese de doutorado

- SILVA, W. P.; ROCHA, R. G.; ARANTES, L. C.; LIMA, C. D.; MELO, L. M. A.; MUNOZ, R. A.A.; DOS SANTOS, W. T.P.; RICHTER, E. M.; Development of a simple and rapid screening method for the detection of 1-(3-chlorophenyl)piperazine in forensic samples. **Talanta**, v. 233, p. 122597, 2021.
- SILVA, W. P.; ROCHA, R. G.; FELISBINO, J. K. R. P.; SOUSA, R. M. F.; MUNOZ, R. A. A.; RICHTER, E. M.; Electrochemical Determination of the Steroid Tibolone and Its Metabolites in Saliva Samples. **ChemElectroChem**, v. 7, p. 4469-4476, 2020.

Outras publicações de artigos em revistas científicas durante o doutorado

- ROCHA, R. G.; Da Silva, W. P.; SOUSA, R. M. F.; JUNIOR, M. C.; SANTANA, M. H.P.; MUNOZ, R. A. A.; RICHTER, E. M.; Investigation of midazolam electro-oxidation on boron doped diamond electrode by voltammetric techniques and density functional theory calculations: Application in beverage samples. **Talanta**, v. 207, p. 120319, 2020.
- RODRIGUES, G.; SILVA, W. P.; ROCHA, D. P.; RICHTER, E. M.; MUNOZ, R. A. A.; BATISTA, A.; Electrochemical determination of 2-naphthylamine in perfume samples using borondoped diamond electrode. **Química Nova**, v. 43, p. 286-290, 2020.

- CARDOSO, R. M.; MENDONÇA, D. M. H.; SILVA, W. P.; SILVA, M. N. T.; NOSSOL, E.; DA SILVA, R. A. B.; RICHTER, E. M.; MUÑOZ, R. A. A.; 3D printing for electroanalysis: From multiuse electrochemical cells to sensors. **Analytica Chimica Acta**, v. 1033, p. 49-57, 2018.
- SQUISSATO, A. L.; SILVA, W. P.; DEL CLARO, A. T. S.; ROCHA, D. P.; DORNELLAS, R. M.; RICHTER, E. M.; FOSTER, C. W.; BANKS, C. E.; MUNOZ, R. A. A.; Portable electrochemical system using screen-printed electrodes for monitoring corrosion inhibitors. **Talanta**, v. 174, p. 420-427, 2017.