

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

Instituto de Química

Programa de Pós-Graduação em Química

**Uma estratégia simples para melhorar a seletividade de métodos
amperométricos de análise: determinação de cafeína e cocaína em
amostras complexas.**

DAVID LUIZ OLIVEIRA RAMOS

Dissertação de Mestrado

UBERLÂNDIA

Janeiro de 2022

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

Instituto de Química

Programa de Pós-Graduação em Química

Uma estratégia simples para melhorar a seletividade de métodos amperométricos de análise: determinação de cafeína e cocaína em amostras complexas.

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química do Instituto de Química da Universidade Federal de Uberlândia, como requisito à obtenção do título de Mestre em Química.

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

Aluno: David Luiz Oliveira Ramos

Orientador: Prof. Dr. Eduardo Mathias Richter

Área de concentração: Eletroquímica Aplicada

Janeiro de 2022

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

R175
2022

Ramos, David Luiz Oliveira, 1995-
Uma estratégia simples para melhorar a seletividade de métodos amperométricos de análise: determinação de cafeína e cocaína em amostras complexas. [recurso eletrônico] / David Luiz Oliveira Ramos. - 2022.

Orientador: Eduardo Mathias Richter.
Coorientador: Rodrigo Alejandro Abarza Muñoz.
Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia, Pós-graduação em Química.
Modo de acesso: Internet.
Disponível em: <http://doi.org/10.14393/ufu.di.2022.67>
Inclui bibliografia.
Inclui ilustrações.

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.

CDU: 54

Bibliotecários responsáveis pela estrutura de acordo com o AACR2:

Gizele Cristine Nunes do Couto - CRB6/2091



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Química
Av. João Naves de Ávila, 2121, Bloco 5I - Bairro Santa Mônica, Uberlândia-MG, CEP
38400-902
Telefone: (34) 3239-4385 - www.cpgquimica.iq.ufu.br - cpgquimica@ufu.br



ATA DE DEFESA - PÓS-GRADUAÇÃO

Programa de Pós-Graduação em:	Química				
Defesa de:	Dissertação de Mestrado Acadêmico, 335, PPGQUI				
Data:	Vinte e cinco de janeiro de dois mil e vinte e dois	Hora de início:	14:05	Hora de encerramento:	17:20
Matrícula do Discente:	11922QMI003				
Nome do Discente:	David Luiz Oliveira Ramos				
Título do Trabalho:	Uma estratégia simples para melhorar a seletividade de métodos amperométricos de análise: determinação de cafeína e cocaína em amostras complexas.				
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 <https://meet.google.com/sbd-smesz-oe>, a Banca Examinadora, designada pelo Colegiado do Programa de Pós-graduação em Química, assim composta: Professores Doutores: Wallans Torres Pio dos Santos, da Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri; André Luiz dos Santos, da Universidade Federal de Uberlândia 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 Mestre.

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 28/01/2022, às 09:17, 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 **Wallans Torres Pio dos Santos, Usuário Externo**, em 28/01/2022, às 09:24, 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 **Andre Luiz dos Santos, Professor(a) do Magistério Superior**, em 28/01/2022, às 10:05, 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 **3335018** e o código CRC **A544B1D8**.

Referência: Processo nº 23117.086799/2021-44

SEI nº 3335018

AGRADECIMENTOS

- *A toda a minha família, em especial à minha mãe e meu pai, Luciana e Luiz Ramos, pelo apoio, carinho, motivação em todos os momentos que precisei.*
- *Ao meu orientador Prof. Dr. Eduardo Richter e coorientador Prof. Dr. Rodrigo Muñoz, por todos os ensinamentos, orientações, confiança, paciência e incentivos.*
- *Aos meus amigos, Jéssica Stefano, Raquel Rocha, William Soté, Diego Godina, Diego Alves, Jhonys Machado e Thiago Oliveira (minha Tia Gorda), pelo carinho, amizade, paciência, conversas, apoio, incentivo e momentos de descontração ao longo destes anos difíceis e conturbados que vivemos durante a pandemia do Coronavírus (COVID-19), sem vocês tudo seria mais difícil.*
- *Aos companheiros de trabalho do Núcleo de Pesquisa em Eletroanalítica (NuPE), pela ajuda, paciência e ensinamentos.*
- *À Universidade Federal de Uberlândia e ao Instituto de Química pela disponibilidade do laboratório para a realização deste trabalho.*
- *Aos órgãos de fomento científico, Capes, FAPEMIG e CNPq, pelo apoio financeiro durante a realização deste trabalho, mesmo durante este tempo tão difícil de ataque à pesquisa científica e a educação pública.*
- *Aos examinadores da banca, por dedicarem seu tempo à leitura e estudo do meu trabalho e contribuição para seu aprimoramento.*

“A educação não transforma o mundo. Educação muda as pessoas. Pessoas transformam o mundo.”

Paulo Freire

RESUMO

Neste trabalho foi proposto um procedimento simples para melhorar a seletividade de métodos amperométricos de análise. Basicamente, a proposta consiste na aplicação de dois pulsos de potenciais sequenciais (P_1 e P_2) e o uso da diferença de corrente detectada entre os dois potenciais ($I_{P_1} - I_{P_2}$). A potencialidade da estratégia proposta foi avaliada mediante a determinação de cafeína em diferentes amostras (fármacos, suplementos, refrigerantes, energéticos e urina sintética) e cocaína em saliva humana usando Análise por Injeção em Batelada (BIA) com detecção amperométrica e diamante dopado com boro como eletrodo de trabalho. Apesar dos dois compostos estudados (cafeína e cocaína) serem eletroativos em potenciais acima de +1 V, a determinação seletiva dos dois compostos foi possível em amostras complexas (presença de interferentes eletroativos) após simples diluição das amostras em eletrólito de suporte. Na determinação de cafeína e cocaína, os pulsos de potenciais otimizados foram +1,40 V e +1,55 V ($I_{\text{cafeína}} = I_{+1,55 \text{ V}} - I_{+1,40 \text{ V}}$) e +1,80 V e +1,90 V ($I_{\text{cocaína}} = I_{+1,90 \text{ V}} - I_{+1,80 \text{ V}}$), respectivamente. Na determinação de cafeína em amostras de alimentos e de formulações farmacêuticas, resultados estatisticamente similares aos obtidos por eletroforese capilar foram adquiridos. Adicionalmente, recuperações satisfatórias foram obtidas nos estudos de adição e recuperação de cafeína em urina sintética (entre 108 e 109 %) e de cocaína em saliva humana (entre 90 e 120 %). As análises foram possíveis usando a técnica de amperometria de múltiplos pulsos e injeção de uma alíquota da amostra ou amperometria convencional com a aplicação de dois pulsos de potenciais sequenciais e a injeção de duas alíquotas da amostra. O método desenvolvido neste trabalho se mostrou uma ferramenta promissora para aplicações portáteis de determinação de um único composto em investigações forenses, exames antidoping esportivos e análises laboratoriais farmacêuticas.

Palavras-chave: Amostras biológicas; Análise por injeção em batelada; Cafeína; Cocaína; Cronoamperometria; Química Forense;

ABSTRACT

In this work, a simple procedure was proposed to improve the selectivity of amperometric methods of analysis. Basically, the proposal consists in the application of two sequential potential pulses (P_1 and P_2) and the use of the current difference detected between both potentials ($I_{P_1} - I_{P_2}$). The potential of the proposed strategy was evaluated by determining caffeine in different samples (drugs, supplements, soft drinks, energy drinks and synthetic urine) and cocaine in human saliva using Batch Injection Analysis (BIA) with amperometric detection and boron-doped diamond (BDD) as the working electrode. Although the two studied compounds (caffeine and cocaine) are electroactive at potentials above +1 V, the selective determination of the two compounds was possible in complex samples (presence of electroactive interferences) after simple sample dilution in supporting electrolyte. In the determination of caffeine and cocaine, the optimized potential pulses were +1.40 V and +1.55 V ($I_{\text{caffeine}} = I_{+1.55 \text{ V}} - I_{+1.40 \text{ V}}$) and +1.80 V and +1.90 V ($I_{\text{cocaine}} = I_{+1.90 \text{ V}} - I_{+1.80 \text{ V}}$), respectively. In the determination of caffeine in food samples and pharmaceutical formulations, results statistically similar to those obtained by capillary electrophoresis were achieved. Additionally, satisfactory recovery values were obtained with synthetic urine (between 108 and 109%) and human saliva (between 90 and 120 %) samples spiked caffeine and cocaine, respectively. The analyzes were possible using multiple pulse amperometry and the injection of a single aliquot of sample or using conventional amperometry with the application of two sequential potential pulses and the injection of two sample aliquots. The developed method in this work proved to be a promising tool for portable applications (determination of a single compound) in different areas such as forensic investigations, sports anti-doping tests and pharmaceutical laboratory analyses.

Keywords: Biological samples; Batch injection analysis; Caffeine; Cocaine; Chronoamperometry; Forensic chemistry.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Evolução das correntes, faradaica e capacitiva, com o tempo ao aplicar um potencial a um eletrodo estacionário. Fonte: Adaptado de [8]	16
Figura 2. Esquema de uma célula BIA com detecção eletroquímica, adaptada para o uso com BDD. Fonte: Autor.	21
Figura 3. Etapas de operação de um sistema BIA e resultado obtido. Fonte: Adaptado de [56].	22
Figura 4. Estrutura molecular da CAF. Fonte: [85].....	23
Figura 5. Mecanismo simplificado da oxidação da CAF. Fonte:[64].	24
Figura 6. Estrutura molecular da COC. Fonte: [85]	25
Figura 7. Mecanismo representando a oxidação da COC. Fonte:[74]	26
Figura 8. (A) Dispositivo agitador desenvolvido por impressão 3D (FDM): suporte para o motor e pá; (B) Fonte universal de tensão variável; (C) Micro Motor DC Akiyama. Fonte: Autor.....	33
Figura 9. Efeito do pH e do pré-tratamento catódico (●) e anódico (■) do eletrodo de BDD na corrente de oxidação da CAF. Concentração de CAF: 50 mg L ⁻¹ ; técnica: voltametria cíclica; v: 100 mV s ⁻¹ ; incremento de potencial: 5 mV.	35
Figura 10. Voltamogramas cíclicos obtidos para CAF (50 mg L ⁻¹) em solução tampão BR pH 2 (linha vermelha) e solução 0,1 mol L ⁻¹ de H ₂ SO ₄ (linha preta). Outras condições: velocidade de varredura: 100 mV s ⁻¹ ; incremento de potencial: 5 mV; eletrodo de trabalho: BDD após pré-tratamento anódico.	36
Figura 11. Amperogramas obtidos pela injeção de uma solução contendo 25 mg L ⁻¹ de CAF no sistema BIA-MPA. Pulso de potenciais aplicados: +0,9; +1,0; +1,1; +1,2; +1,3; +1,4; +1,5; +1,6; +1,7 e +1,8 V, 100 ms cada; eletrólito de suporte: H ₂ SO ₄ 0,1 mol L ⁻¹ , volume injetado: 150 μL; velocidade de injeção: 75 μL s ⁻¹	37
Figura 12. Voltamograma hidrodinâmico obtido a partir correntes detectadas nos amperogramas da Fig. 11. Pulso de potenciais aplicados: +0,9; +1,0; +1,1; +1,2; +1,3; +1,4; +1,5; +1,6; +1,7 e +1,8 V, 100 ms cada; eletrólito de suporte: H ₂ SO ₄ 0,1 mol L ⁻¹ , volume injetado: 150 uL; velocidade de injeção: 75 uL s ⁻¹	37
Figura 13. A) Amperogramas obtidos com a injeção de uma solução contendo 25 mg L ⁻¹ de CAF em função da velocidade de agitação I (0 rpm), II (200 rpm), III (389 rpm), IV (578 rpm), V (767 rpm) e VI (956 rpm). (B) Relação entre a corrente de pico e a	

velocidade de agitação (n = 3). Volume de injeção: 150 µL; velocidade de injeção: 83 µL s ⁻¹ ; pulsos de potenciais aplicados: +1,40 V/150 ms e 1,55 V/150 ms.	39
Figura 14. (A) Amperogramas obtidos com a injeção de 25 mg L ⁻¹ de CAF em função do volume de injeção I (50 µL), II (100 µL), III (150 µL), IV (200 µL) e V (250 µL). (B) Relação entre a corrente de pico e volume de injeção (n = 3). Condições amperométricas: velocidade de agitação = 578 rpm; velocidade de injeção = 83µL s ⁻¹ ; pulsos de potenciais aplicados: +1,40 V/150 ms e 1,55 V/150 ms.....	40
Figura 15. (A) Amperogramas obtidos com a injeção de 25 mg L ⁻¹ de CAF em função da velocidade de injeção I (34 µL s ⁻¹), II (50 µL s ⁻¹), III (83,3 µL s ⁻¹), IV (166 µL s ⁻¹), V (200 µL s ⁻¹) e VI (227 µL s ⁻¹). (B) Relação entre a corrente de pico e velocidade de injeção (n = 3). Condições amperométricas: velocidade de agitação = 578 rpm; volume de injeção = 200 µL; pulsos de potenciais aplicados: +1,40 V/150 ms e 1,55 V/150 ms.	41
Figura 16. Corrente detectada para a oxidação do PAR (10 mg L ⁻¹) a +1,40 V (■) e +1,55 V (●) em função do tempo de aplicação de cada pulso de potencial (50 a 250 ms).	42
Figura 17. Amperogramas adquiridos de cada pulso de potencial aplicado (+1,40 e +1,55 V) para injeções de soluções com concentrações crescentes de CAF (2, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 100, 200, 300 e 400 mg L ⁻¹). Demais condições de acordo com a Tabela 3	44
Figura 18. Curva adquirida para a diferença de corrente (ΔI) de cada potencial aplicado (+1,40 e 1,55 V) para injeções de soluções com concentrações crescentes de CAF (2, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 100, 200, 300 e 400 mg L ⁻¹). Demais condições de acordo com a Tabela 3	45
Figura 19. (A) Amperogramas obtidos por BIA-MPA para injeção de soluções com concentração fixa de CAF (10 mg L ⁻¹) e concentrações crescentes de PAR (0,0; 20,0; 40,0; 60,0; 80,0 e 100,0 mg L ⁻¹); (B) Gráfico de barras de porcentagem da corrente para oxidação CAF sem e com a presença de PAR; (C) Valores de corrente para oxidação de CAF (I _{CAF} = I _{+1,55V} - I _{+1,40V}). Eletrólito de suporte: 0,1 mol L ⁻¹ H ₂ SO ₄ ; outras condições de acordo com a Tabela 3	47
Figura 20. Voltamogramas hidrodinâmicos obtidos por BIA-MPA para injeção de CAF (círculos vermelhos) e PAR (quadrados pretos - espécie interferente modelo). Pulsos potenciais aplicados: +0,7, +0,8, +0,9; +1,0, +1,1, +1,2, +1,3, +1,4, +1,5 e +1,6 V; concentração: 25 mg L ⁻¹ de ambos os compostos; eletrólito de suporte: 0,1 mol L ⁻¹ H ₂ SO ₄ ; outras condições de acordo com a Tabela 3	48
Figura 21. Amperograma obtido por amperometria de pulso diferencial para injeção de soluções contendo concentrações crescentes de CAF (10 a 50 mg L ⁻¹). Pulsos potenciais	

aplicados: +1,55 V / 200 ms e 1,40 V / 200 ms. Demais condições de acordo com a Tabela 3	49
Figura 22. Amperogramas BIA-MPA e respectiva curva de calibração ($r = 0,998$) obtidos após injeções de soluções contendo CAF 10 a 50 mg L ⁻¹ (a - e ; $r = 0,998$) e cinco amostras diluídas adequadamente em eletrólito suporte: Tylenol DC (f), Melhoral (g), suplemento Thermodrol (h), refrigerante Coca-Cola (i) e energético Red Bull (j). Demais condições de acordo com a Tabela 3	50
Figura 23. Voltamogramas hidrodinâmicos obtidos para a injeção de uma solução contendo 10 mg L ⁻¹ de CAF (■) e soluções de amostra de urina sintética diluídas (10% v / v) (●) em eletrólito suporte no sistema BIA-MPA. Pulso de potenciais aplicados: +1,0; +1,1; +1,2; +1,3; +1,4; +1,5; +1,6; +1,7 e +1,8 V. Eletrólito de suporte: 0,1 mol L ⁻¹ H ₂ SO ₄ (A) e 0,1 mol L ⁻¹ tampão acetato pH 4,7 (B). Condições amperométricas de acordo com a Tabela 3	53
Figura 24. Amperogramas e a curva de calibração ($r = 0,999$) para soluções de amostras de urina sintética diluídas (10% v / v) em eletrólito de suporte enriquecido com CAF (10 mg L ⁻¹) usando BIA-MPA. Eletrólito de suporte: tampão de acetato 0,1 mol L ⁻¹ pH 4,7. Condições amperométricas de acordo com a Tabela 3	54
Figura 25. Amperogramas e a curva de calibração ($r = 0,998$) para soluções de amostra de urina sintética diluídas (10% v / v) em eletrólito de suporte enriquecido com CAF (10 mg L ⁻¹) usando BIA-CA. Eletrólito de suporte: tampão de acetato 0,1 mol L ⁻¹ pH 4,7. Condições amperométricas de acordo com a Tabela 3 . Eu acho melhor deletar o tempo junto dos potenciais. Isso só é útil para confundir (+1,40 V).....	55
Figura 26. Amperogramas obtidos por BIA com detecção amperométrica para injeção de COC 5 mg L ⁻¹ (A) e seu respectivo voltamograma hidrodinâmico (B). Pulsos de potenciais aplicados: +1,7, +1,8, +1,9 e +2,0 V. Eletrólito de suporte: H ₂ SO ₄ 0,1 mol L ⁻¹ . Demais condições: volume de injeção = 80 μL; velocidade de agitação = 1050 rpm; velocidade de injeção = 200 μL s ⁻¹	57
Figura 27. (A) Amperogramas obtidos para a variação da corrente de oxidação de 5 mg L ⁻¹ de COCem função do volume de injeção (20 a 100 μL). (B) Relação entre a corrente de pico e a volume de injeção (n = 3). Condições amperométricas: velocidade de agitação = 1050 rpm; velocidade de injeção = 200 μL s ⁻¹	58
Figura 28. (A) Amperogramas obtidos para injeções de solução contendo 5 mg L ⁻¹ de COCem função da velocidade de injeção (83 a 299 μL s ⁻¹). (B) Relação entre a corrente	

de pico e a velocidade de injeção (n = 3). Demais condições: velocidade de agitação = 1050 rpm; volume de injeção = 60 µL.	59
Figura 29. (A) Amperogramas obtidos para oxidação de 5 mg L ⁻¹ de COC em função da velocidade de agitação (700 a 1750 rpm). (B) Relação entre a corrente de pico e a velocidade de agitação (n = 3). Condições amperométricas: volume de injeção = 60 µL e velocidade de injeção = 200 µL s ⁻¹	60
Figura 30. (A) Amperogramas adquiridos nos pulsos de potenciais de +1,80 e 1,95 V para injeções de soluções com concentrações crescentes de COC (0,2; 0,4; 0,6; 0,8; 1,0; 2,0; 4,0; 6,0; 8,0; 10; 20; 30; 40 e 50 mg L ⁻¹). Condições amperométricas de acordo com a Tabela 7. (B) Curva adquirida para $\Delta I (I_{+1,95V} - I_{+1,80V})$	61
Figura 31. Voltamogramas hidrodinâmicos obtidos por BIA com detecção amperométrica para injeção de COC 15 µmol L ⁻¹ (▲), AU 30 µmol L ⁻¹ (■) e URE 80 µmol L ⁻¹ (●). Pulsos de potenciais aplicados: +1,7, +1,8, +1,9 e +2,0. Eletrólito de suporte: H ₂ SO ₄ 0,1 mol L ⁻¹ ; outras condições de acordo com a Tabela 7.....	63

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Lista de reagentes utilizados e suas respectivas especificações.	29
Tabela 2. Lista de amostras utilizadas e suas respectivas especificações.....	31
Tabela 3. Faixas estudadas e parâmetros otimizados para detecção amperométrica de CAF por BIA-MPA.	42
Tabela 4. Características analíticas do método BIA-MPA proposto para determinação amperométrica de CAF.....	45
Tabela 5. Comparação dos resultados obtidos para a determinação de CAF usando BIA-MPA obtidas no mesmo dia (intra-dia) e em dias diferentes (inter-dia; n = 3) versus resultados obtidos por CE (n = 3) nas amostras de Tylenol DC (F), Melhoral (G), suplemento Thermodrol (H), refrigerante Coca-Cola (I) e energético Red Bull (J). $E_1 = 100 \times (\text{intra-dia} - \text{valor do rótulo}) / \text{rótulo}$; $E_2 = 100 \times (\text{intra-dia} - \text{CE}) / \text{CE}$; % de precisão: Desvio padrão relativo (RSD); $P_1 = \text{precisão intra-dia}$, $P_2 = \text{precisão inter-dia}$; $\Delta I = I_{+1,55V} - I_{+1,40V}$	51
Tabela 6. Resultados obtidos em estudos de recuperação em amostras de urina sintética enriquecidas com CAF por BIA-MPA e BIA com detecção por cronoamperometria (n = 3). $\Delta I = I_{+1,55V} - I_{+1,40V}$	55
Tabela 7. Faixas estudadas e parâmetros otimizados para detecção amperométrica de COC por BIA-CA.....	60
Tabela 8. Características analíticas do método BIA-MPA proposto para determinação amperométrica de CAF.....	62
Tabela 9. Resultados obtidos em estudos de adição e recuperação em amostras de saliva humana enriquecidas com COC por BIA-CA (n = 3). $\Delta I = I_{+1,90V} - I_{+1,80V}$	67

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

Δx – Variação da concentração do analito

Δy – Variação do sinal analítico

ΔE – Variação de potencial

ΔI – Diferença entre correntes de pico obtidas pela aplicação dos potenciais escolhidos

A – Área superficial do eletrodo

ABS – Acrilonitrila butadieno estireno, do inglês “*Acrylonitrile Butadiene Styrene*”

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

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

BR – Tampão Britton-Robbinson

C – Capacidade da dupla camada elétrica

CA – Cronoamperometria, do inglês, “*Chronoamperometry*”

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

C_1 – Concentração do analito medida na amostra fortificada

C_2 – Concentração do analito medida na amostra não fortificada

C_3 – Concentração do analito adicionada

CAF – Cafeína

COC – Cocaína

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

D – Coeficiente de difusão

DPa – Desvio padrão amostral

DPA – Amperometria de pulso diferencial, do inglês “*Differential pulse amperometry*”

DMX – 3,4-Dimetoxicinamato

ER – Erro relativo

eV – Elétron-volt, unidade de medida de energia

F – Constante de Faraday

FDM – Modelagem de deposição fundida, do inglês “*Fused Deposition Modeling*”

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

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

I_f – Corrente faradaica

I_c – Corrente capacitiva

LD – Limite de detecção

LIF – Fluorescência induzida por laser, do inglês “*Laser-induced fluorescence*”

LQ – Limite de quantificação

Mdb – Média aritmética simples dos coeficientes angulares

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

MS – Espectrometria de massas, do inglês “*Mass spectrometry*”

ms – milissegundo, unidade de medida de tempo

PAR – Paracetamol

PIB – Produto interno bruto

Rpm – Rotação por minuto

RSD – Desvio padrão relativo

R_s – Resistência da solução

Rec – Recuperação

S – Sensibilidade

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

t – Tempo

TRIS – 2-amino-2-hidroximetil-propano-1,3 diol

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

SUMÁRIO

1. Introdução	14
1.1. Considerações gerais	14
1.2. Amperometria	14
1.3. Eletrodo de diamante dopado com boro (BDD)	19
1.4. Análise por injeção em batelada (BIA)	20
1.5. Cafeína (CAF)	23
1.6. Cocaína (COC)	24
1.7. Amostras biológicas.....	27
2. Objetivo	28
3. Parte Experimental.....	28
3.1. Reagentes e soluções	28
3.2. Amostras	30
3.3. Instrumentação.....	32
4. Resultados e Discussão	34
4.1. Considerações iniciais.....	34
4.2. Parte 1: Desenvolvimento de um método amperométrico para determinação de cafeína em amostras complexas.....	34
4.2.1. Comportamento eletroquímico da cafeína (CAF).....	34
4.2.2. Estudos de otimização dos parâmetros do sistema BIA-MPA	38
4.2.3. Faixa linear.....	43
4.2.4. Avaliação da seletividade.....	46
4.2.5. Aplicação do método proposto em amostras reais.....	49
4.2.6. Aplicação do método em amostra de urina sintética.....	52
4.3. Parte 2: Determinação de COC em amostras de salivas humanas.....	56
4.3.1. Comportamento eletroquímico da COC	56

4.3.2. Estudos de otimização dos parâmetros do sistema BIA-CA.....	57
4.3.3. Faixa Linear.....	61
4.3.4. Avaliação da Seletividade	62
4.3.5. Aplicação em saliva humana.....	65
5. Conclusão.....	68
6. Perspectivas	69
7. Referências.....	69

1. Introdução

1.1.Considerações gerais

No início do século XX os cientistas começaram a utilizar propriedades físicas do analito para análises quantitativas, como condutividade, potencial de eletrodo, absorção ou emissão de luz, razão massa-carga e fluorescência. Técnicas cromatográficas e eletroforéticas altamente eficientes começaram a substituir a destilação, extração e precipitação para a separação de componentes de misturas complexas antes de sua determinação qualitativa ou quantitativa. Neste contexto, os métodos instrumentais possibilitavam agora a determinação de pequenas quantidades de analitos em amostras cada vez mais complexas [1]. As técnicas mais utilizadas são as espectroscópicas e cromatográficas, no entanto, alguns equipamentos e reagentes utilizados com estas técnicas podem ter custo financeiro alto, além de necessitar de um tratamento amostral longo dificultando análises de rotina [2 – 4].

O desenvolvimento de metodologias que possibilitem análises que necessitem de um menor processamento amostral, geração de volume menor de resíduos e com um custo viável é de grande interesse científico e industrial. Outra característica que pode ser de grande interesse em diferentes áreas é a possibilidade da análise no local onde a amostra é coletada, o que pode facilitar a análise, economizar tempo e recursos financeiros [2 - 6].

1.2. Amperometria

As técnicas eletroquímicas quando empregadas em determinações analíticas são conhecidas como técnicas eletroanalíticas. Estas técnicas geralmente necessitam de equipamentos de baixo custo, são mais simples, rápidas e normalmente não necessitam de um preparo de amostra muito complexo tal como nas técnicas cromatográficas e espectroscópicas [4,6-7].

Uma técnica eletroanalítica importante é a cronoamperometria, também conhecida como amperometria. Na cronoamperometria, a corrente (“ampe-”, de ampere unidade de medida da corrente elétrica), gerada ao se aplicar um potencial no eletrodo de trabalho, é mensurada em função do tempo (por isso “crono-”, do grego Krónos) [6-9].

Ao se aplicar um certo potencial ao eletrodo de trabalho podem ocorrer reações de oxidação ou redução de espécies eletroativas presentes na interface eletrodo/solução. A corrente correspondente à transferência de elétrons entre o eletrodo e a espécie eletroativa é chamada de corrente faradaica (I_f). No entanto, na aplicação de um potencial, outra corrente também é gerada, conhecida como corrente capacitiva (I_C), a qual tem sua origem no carregamento da dupla camada elétrica [6-10].

Em uma análise, o ideal é que a corrente medida seja majoritariamente a I_f , porque essa é a corrente correspondente às transferências de elétrons na superfície do eletrodo. Para um eletrodo plano, I_f pode ser representada pela **equação de Cottrel (1)** [7].

$$I_f(t) = \frac{nFAD^{\frac{1}{2}}c_{\infty}}{(\pi t)^{\frac{1}{2}}} \quad (1)$$

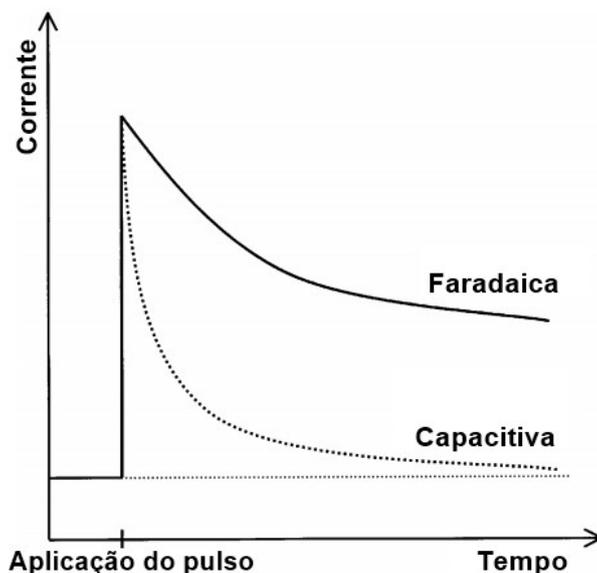
Onde n corresponde ao número de elétrons envolvidos na reação, F a constante de Faraday ($C \text{ mol}^{-1}$), A a área superficial do eletrodo (m^2), D é o coeficiente de difusão ($\text{m}^2 \text{ s}^{-1}$), c_{∞} a concentração das espécies químicas no interior da solução (mol m^{-3}) e t corresponde ao tempo (s) [7].

Porém, quando se varia o potencial aplicado, uma dupla camada elétrica acaba sendo gerada na interface eletrodo/solução dando origem a I_C , representada pela **equação (2)** onde ΔE é o potencial aplicado, R a resistência da solução, C a capacitância da dupla camada e t o tempo. Portanto, I_C não só depende do potencial aplicado como também da capacitância da dupla camada elétrica e da resistência da solução.

$$I_C = \frac{\Delta E}{R} \exp\left(-\frac{t}{RC}\right) \quad (2)$$

Na **Figura 1** é possível observar uma ilustração dos comportamentos simultâneos da I_f e I_C a partir da aplicação de um pulso de potencial em um eletrodo estacionário. O tempo menor de decaimento da corrente capacitiva é devido ao acúmulo de carga na dupla camada elétrica com a aplicação constante do potencial, enquanto a faradaica tem um tempo maior de decaimento devido as reações e o efeito de difusão que estão ocorrendo na superfície do eletrodo [7, 8].

Figura 1. Evolução das correntes, faradaica e capacitiva, com o tempo ao aplicar um potencial a um eletrodo estacionário. Fonte: Adaptado de [8]



Em um procedimento no qual o tempo de análise necessita ser muito pequeno, o indicado é que se utilize eletrodos com a menor área superficial possível para reduzir a contribuição de I_C o máximo possível. Como pode ser observado na **equação (2)**, I_C é exponencialmente proporcional a área uma vez que C depende diretamente da área do eletrodo e, como I_f é diretamente proporcional à A (**equação 1**) é possível deduzir que a razão $\frac{I_f}{I_C}$ é inversamente proporcional a área [7].

As técnicas amperométricas convencionais, baseadas na aplicação de um potencial constante, podem apresentar problemas de seletividade, uma vez que amostras de matrizes complexas podem conter vários tipos de espécies químicas que serão oxidadas ou reduzidas simultaneamente em determinado potencial. Portanto, compostos que oxidam ou reduzem em potenciais mais positivos ou mais negativos podem ter problemas com interferências de compostos eletroativos em potenciais menos positivos ou menos negativos, respectivamente.

Devido a isso, muitas estratégias para melhorar a seletividade da técnica amperométrica têm sido propostas na literatura. Sem dúvida, a abordagem mais utilizada é a modificação de superfícies de eletrodos com diferentes tipos de materiais. Dentre estes, podemos destacar a utilização de enzimas [11-13], membranas [14, 15] e materiais com atividade eletrocatalítica [16-18]. Além disso, a seletividade também pode ser melhorada por meio do acoplamento da detecção amperométrica a técnicas de separação,

como cromatografia líquida [19, 20] e eletroforese capilar [21, 22] ou mesmo através de diferentes formas de aplicação de pulsos de potenciais [23-29].

Na literatura podemos encontrar várias técnicas amperométricas que se diferenciam pela forma de aplicação dos pulsos de potenciais. Dentre estas técnicas, a amperometria de múltiplos pulsos (MPA, do inglês “*Multiple pulse amperometry*”) e a amperometria de pulso diferencial (DPA, do inglês “*Differential pulse amperometry*”) se destacam porque podem ser utilizadas para melhorar a sensibilidade e seletividade da amperometria [29-49].

Na MPA é possível aplicar de dois até dez pulsos de potenciais sequencialmente no mesmo eletrodo e monitorar a corrente separadamente em cada pulso de potencial. Portanto, até 10 amperogramas distintos podem ser gerados de forma simultânea. Essa técnica possibilita a determinação simultânea de duas ou três espécies químicas presentes em uma amostra usando apenas um eletrodo de trabalho (melhora na seletividade) [29 – 51].

A MPA já foi usada para determinações simultâneas de vários analitos em formulações farmacêuticas, como o paracetamol e ácido ascórbico [30], paracetamol e cafeína [31] codeína e diclofenaco [32], nimesulida e paracetamol [33], paracetamol e naproxeno [34], dimenidrinato, difenidramina e 8-clorotofilina [35], propranolol e hidroclorotiazida [36], cafeína, ibuprofeno e paracetamol [37], captopril e hidroclorotiazida [38], sulfametoxazol, trimetoprim e fenazopiridina [39], difenidramina, 8-cloroteofilina e piridoxina [40], nafazolina e zinco [41], propifenazona, paracetamol e cafeína [42]. Em outras amostras consideradas mais complexas, como alimentícias ou combustíveis e biológicas, a MPA foi utilizada para determinar, respectivamente, hidroxianisol butilado e hidroxitolueno butilado [43], hidroxianisol butilado e terc-butilhidroquinona [44] e ácido α -lipólico [45].

Em alguns trabalhos foram utilizadas estratégias usando a MPA para obter uma melhor seletividade na detecção de alguns analitos, como: verapamil em formulações farmacêuticas e urina humana [46], controle de qualidade dos medicamentos aminofilina, carbamazepina, clindamicina, colchicina, minoxidil, prazosina, procainamida, teofilina, varfarina e verapamil [47], determinação de oxcarbazepina em urina e amostras farmacêuticas [48], quantificação de cotinina em amostras de saliva [49], determinação

de prazosina em amostras farmacêuticas [50] e determinação indireta de dopamina na presença de um grande excesso de ácido ascórbico [51].

A técnica DPA foi descrita pela primeira vez em 1985, por Marcenac e Gonon [52]. Neste procedimento, três pulsos de potenciais foram aplicados sequencialmente ao eletrodo de trabalho: um de limpeza e dois para detecção de espécies eletroativas, interferente(s) e analito, presentes na amostra. A diferença entre as correntes (ΔI) correspondentes aos dois últimos pulsos de potenciais corresponde ao amperograma de pulso diferencial [52-55]. No primeiro pulso de potencial, os interferentes foram detectados e, no segundo, os interferentes e o analito de interesse. A diferença entre as correntes detectadas entre os dois pulsos deu acesso a corrente do processo eletroquímico proveniente somente do analito de interesse. É possível encontrar na literatura alguns trabalhos utilizando DPA como técnica para monitoramento *in vivo* de dopamina [52], determinação de diazepam em amostras de bebidas [53], frutose em presença de glicose [54] e levodopa em soro humano [55].

No monitoramento *in vivo* de dopamina, a cada 0,4 segundos foram aplicados pulsos de potenciais que induziram a liberação de dopamina no organismo das cobaias e assim foi monitorada a cinética de liberação em condições fisiológicas. Os valores dos parâmetros foram escolhidos com base em trabalhos usando voltametria de pulso normal e diferencial, o potencial final foi definido como um valor ligeiramente abaixo do potencial de oxidação de dopamina [52].

Na determinação de diazepam em bebidas, utilizando a técnica DPA, os autores aplicaram três potenciais diferentes, um potencial de limpeza e em seguida dois potenciais para realizar a determinação, todos por 50 ms. O sinal analítico foi calculado como a diferença entre o sinal médio nos últimos 25 ms entre o terceiro e o segundo pulso, os valores de pulsos a serem utilizados foram investigados através de um estudo do comportamento eletroquímico do diazepam por voltametria cíclica [53].

A detecção amperométrica pulsada de quadrupolo junto a DPA foram utilizadas para a determinação simultânea de glicose e frutose em um sistema FIA. Foram aplicados quatro pulsos, um para limpeza, outro para reativação do eletrodo primeiro pulso foi usado para a oxidação de glicose, o segundo para ambos os analitos e a subtração das correntes obtidas foram utilizadas para quantificação da frutose, os potenciais e tempos de pulsos escolhidos foram estudados anteriormente [54].

O monitoramento de levodopa em soro humano foi realizado empregando a técnica DPA implementada em um smartphone. Dois pulsos de potenciais, previamente otimizados através de estudos por voltametria de pulso diferencial foram aplicados ao eletrodo de trabalho. A diferença entre as correntes detectadas entre os dois potenciais permitiu a detecção seletiva de levodopa. [55].

1.3.Eletrodo de diamante dopado com boro (BDD)

O diamante é um material extremamente inerte. Em sua estrutura, cada átomo de carbono está ligado tetraedricamente a 4 outros átomos de carbono, cada um a uma distância de 1,54 Å, por ligações covalentes fortes se estendendo em todas as direções formando uma molécula gigante tridimensional composta por carbonos hibridizados sp^3 . A consequente ausência de ligações π torna o diamante um material isolante, “bandgap” de 5,45 eV e resistividade da ordem de $10^{16} \Omega \text{ cm}$. Processos de dopagem são comumente utilizados para diminuir essa resistividade e tornar possível a utilização do diamante na produção de materiais condutores como eletrodos, aproveitando seu alto ponto de fusão e dureza [56-57].

O boro possui uma pequena energia de ativação como transportador de carga (0,37 eV) e, por isso, é o dopante mais utilizado na fabricação de eletrodos de diamante. A dopagem por deposição a vapor onde um composto contendo boro é adicionado a uma mistura de gases que é depositada no filme de diamante em crescimento é o processo de produção de diamante mais utilizado. O composto mais empregado como fonte de boro é o óxido de boro devido a sua menor toxicidade, maior estabilidade e disponibilidade [58-59].

Em 1987, Pleskov *et al.* [60] introduziram os eletrodos de diamante dopado com boro (BDD, do inglês, “*boron-doped diamond*”) na eletroquímica e, desde então, são conhecidos por possuírem propriedades eletródicas atrativas tais como: amplo intervalo de potencial onde a corrente de fundo é baixa e estável permitindo uma ampla faixa de potencial de trabalho em meio aquoso, cinética relativamente rápida de transferência de elétrons, baixa adsorção molecular, além de estabilidade mecânica e química [58-61]. Conseqüentemente, o BDD é bastante utilizado na eletroquímica, principalmente na eletroanalítica como eletrodo de trabalho no desenvolvimento e aplicação de métodos analíticos [38-44, 62-73].

As características físicas, químicas e eletrônicas das superfícies BDD, e consequentemente sua resposta eletroquímica, são fortemente influenciadas pela terminação da superfície BDD [69]. Superfícies terminadas em hidrogênio apresentam afinidade eletrônica negativa e alta condutividade, enquanto superfícies terminadas em oxigênio são hidrofílicas com afinidade eletrônica positiva e baixa condutividade [69].

Quando eletrodos BDD são acoplados a células eletroquímicas a terminação da superfície geralmente é gerada por métodos eletroquímicos catódicos ou anódicos. No tratamento catódico a evolução de hidrogênio produz terminações de hidrogênio na superfície enquanto no tratamento anódico a evolução de oxigênio produz terminações de oxigênio [69]. No entanto, é importante enfatizar que o pré-tratamento eletroquímico deve ser constantemente refeito (geralmente uma vez por dia), pois condições, como tempo de exposição ao ar, potencial aplicado, tempo de aplicação do potencial e tipo de analito em estudo ou análise podem gerar diferentes modificações na superfície BDD [69].

1.4. Análise por injeção em batelada (BIA)

A análise por injeção em batelada (BIA, do inglês, “*batch injection analysis*”) é uma técnica desenvolvida e apresentada por WANG e TAHA em 1991 como uma alternativa aos métodos baseados em análise por injeção em fluxo (FIA, do inglês “*flow injection analysis*”) [74]. Quando a detecção eletroquímica é acoplada a sistemas BIA, o princípio de funcionamento é baseado na injeção de pequenos volumes de solução diretamente sobre a superfície do detector submerso em um grande volume de eletrólito de suporte [74 - 76].

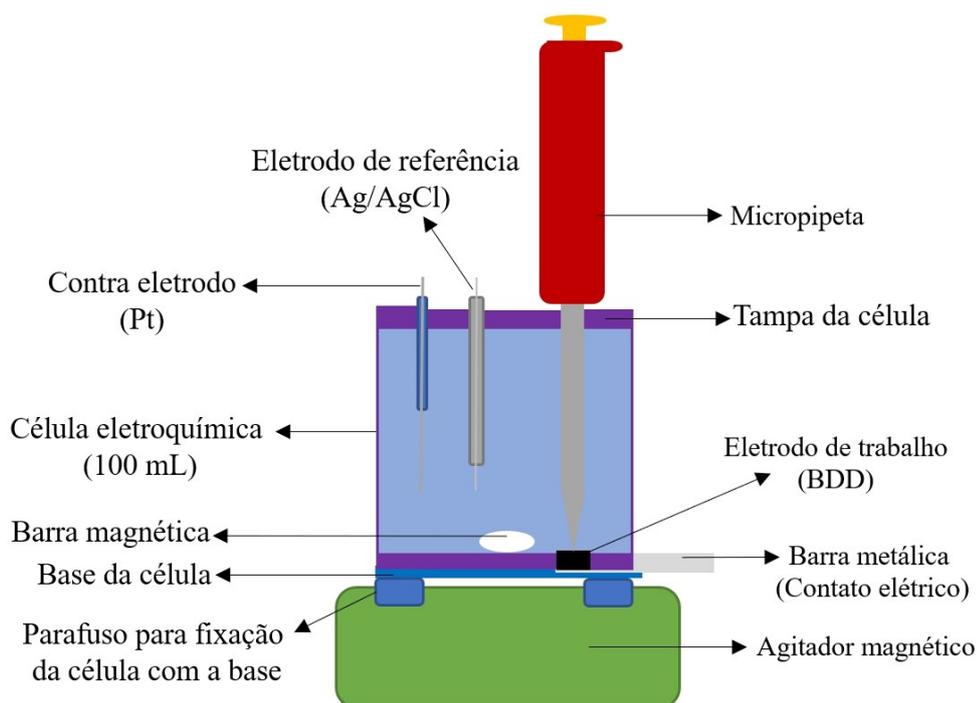
Uma grande vantagem de sistemas BIA em relação a FIA é que não há a necessidade de uso de tubulações e sistemas de bombeamento e, consequentemente, menor incidência de vazamentos e formação de bolhas no interior das tubulações. No entanto, diversas características vantajosas são mantidas, incluindo análises rápidas, simplicidade de utilização, alta sensibilidade, boa repetibilidade e utilização de baixos volumes amostrais e de reagentes. Outra vantagem seria a possibilidade de injeção da amostra sem prévia diluição no eletrólito suporte, pois um pequeno volume é injetado em uma quantidade muito grande de eletrólito de suporte, mantendo a força iônica praticamente inalterada [45, 75 – 82]. Outra vantagem a ser considerada é o potencial de

portabilidade, uma vez que todos os equipamentos usados estão disponíveis no mercado alimentados por baterias (pipeta eletrônica, mini-potenciostato e notebook).

A técnica BIA também apresenta limitações em atividades relacionadas com automações e procedimentos de derivatização e manipulação de amostras. Isso se deve basicamente devido a pequena distância existente entre a ponteira da micropipeta e a superfície do eletrodo de trabalho [83].

A **Figura 2** representa uma célula BIA adaptada para o uso do diamante dopado com boro como eletrodo de trabalho juntamente com um sistema de agitação composto por uma barra magnética e um agitador magnético. A posição do eletrodo de trabalho é oposta a ponteira da micropipeta de forma que a injeção da solução (volume constante) é feita diretamente na superfície do mesmo (configuração “*wall-jet*”) [77].

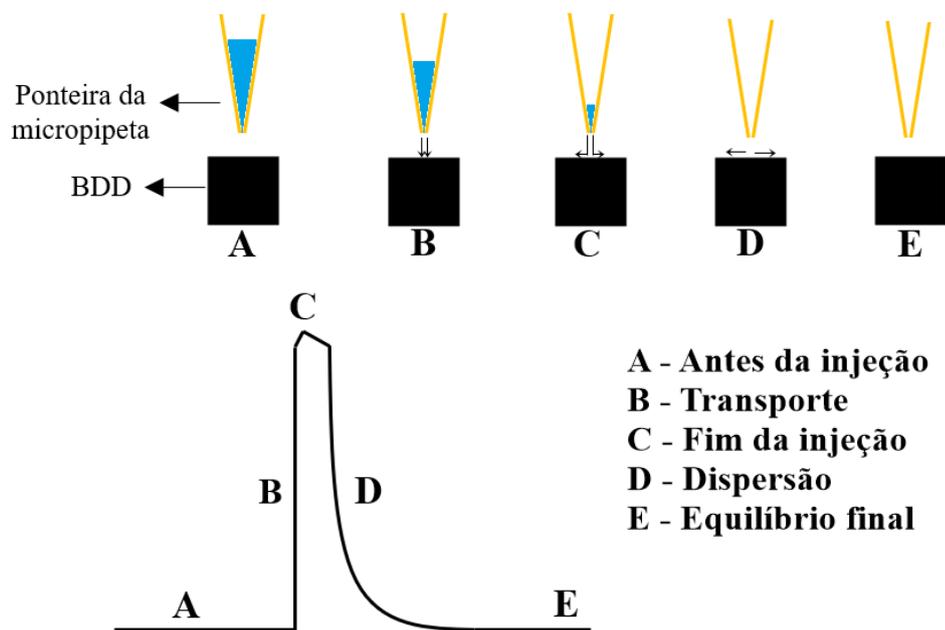
Figura 2. Esquema de uma célula BIA com detecção eletroquímica, adaptada para o uso com BDD. Fonte: Autor.



A **Figura 3** ilustra as etapas (A até E) envolvidas na formação de sinais transientes (picos) formados pela passagem da espécie em análise sobre a superfície do eletrodo após a injeção de uma alíquota de solução contendo uma espécie eletroativa. Antes da injeção

da espécie eletroativa é observada uma corrente constante (corrente residual) que corresponde somente ao eletrólito de suporte (**Fig. 3A**), indicando que ainda não ocorreu transferência eletrônica na superfície do eletrodo. Quando a solução contendo o analito é injetada usando uma pipeta (convecção), uma corrente (**Fig. 3B**) relacionada ao transporte da espécie eletroativa (redução ou oxidação) até a superfície do eletrodo é detectada. Em seguida, a corrente alcança um valor máximo que permanece até o fim da injeção (**Fig. 3C**). Ao final da injeção ocorre uma queda da corrente devido a mudança no fenômeno de transporte de massa, de convecção para difusional (**Fig. 3D**), atingindo novamente o equilíbrio anterior a injeção (**Fig. 3E**) [81]. A agitação mecânica, além de minimizar possíveis contaminações, também ajuda a aumentar a frequência analítica, pois a alíquota injetada é removida com maior rapidez da proximidade da superfície do eletrodo de trabalho (diluição elevada dentro da célula BIA) [33].

Figura 3. Etapas de operação de um sistema BIA e resultado obtido. Fonte: Adaptado de [56].



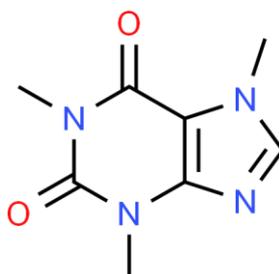
Na literatura [76], o acoplamento do sistema BIA com a detecção amperométrica (amperometria de múltiplos pulsos) e voltamétrica (voltametria de onda quadrada) vem sendo descritas com o intuito de melhorar a seletividade, estabilidade e sensibilidade. Além disso, sistemas BIA com detecção amperométrica e/ou voltamétrica

podem ser considerados como sugestão para o desenvolvimento de métodos eletroquímicos de baixo custo, de grande potencial de portabilidade e possibilidade de determinação de mais de uma espécie até mesmo em amostras com matrizes consideradas complexas. Como eletrodo, uma boa opção vem sendo a utilização do BDD devido à sua robustez e facilidade no pré-tratamento. Com essa junção pode-se obter um sistema de detecção simples, de relativo baixo custo e com pré-tratamento amostral minimizado [32-45, 73].

1.5.Cafeína (CAF)

A CAF, cujo nome IUPAC é 1,3,7-Trimetilpurina-2,6-diona, é um alcaloide com a estrutura molecular ilustrada na **Figura 4**. A molécula pode ser encontrada naturalmente nas sementes de café (*Coffea sp.*), nas folhas de chá verde (*Camilla sinensis*), no cacau (*Theobroma cocoa*), guaraná (*Paullinia cupana*) e na erva mate (*Ilex paraguayensis*). É muito utilizada em fármacos, principalmente antigripais, em bebidas (refrigerantes e energéticos) e suplementos alimentares. A CAF é considerada um dos alcaloides mais consumidos no mundo e apresenta atividade importante no sistema nervoso central descrita como aumento da capacidade de alerta e redução da fadiga, porém é famosa por afetar de forma negativa o sistema motor, causar insônia e intensificar a ansiedade [84].

Figura 4. Estrutura molecular da CAF. Fonte: [85]



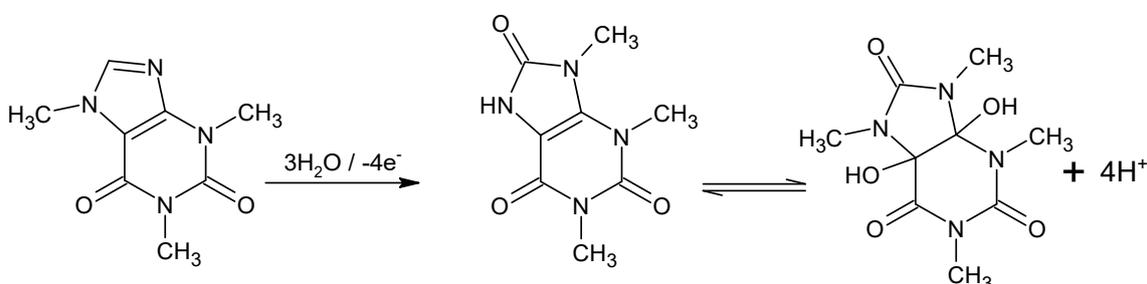
Devido ao seu grande consumo por parte da população, o seu largo espectro de ação fisiológica e por ser uma droga estimulante, existe interesse pelas indústrias e cientistas em desenvolver métodos qualitativos e quantitativos de análises químicas cada vez mais práticos, para sua identificação em alimentos, fluidos biológicos e até em amostras de drogas apreendidas [84, 86].

Em algumas drogas ilícitas, como a cocaína, a CAF vem sendo utilizada por traficantes como adulterante, devido a sua ação estimulante e suas características físicas similares (pó branco), com a finalidade de aumentar o volume final do produto vendido

de forma ilegal. A detecção da CAF e demais adulterantes, em amostras apreendidas pode auxiliar na localização e identificação de grupos específicos de criminosos, pois o tipo de adulteração e a porcentagem característica de adulterante utilizado varia entres estes grupos [4, 84-86].

Nas técnicas eletroquímicas, a partir de estudos utilizando voltametria cíclica (CV, do inglês “*cyclic voltammetry*”) e o BDD como eletrodo de trabalho, a reação de oxidação eletroquímica da CAF já foi estudada. O processo geral envolve quatro elétrons e quatro prótons e pode ser representado pelo mecanismo global ilustrado pela **Figura 5** [87-91].

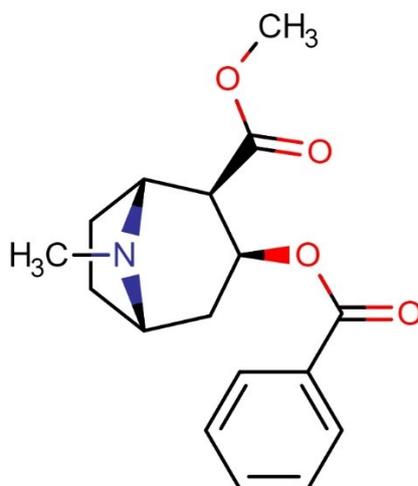
Figura 5. Mecanismo simplificado da oxidação da CAF. Fonte: Adaptado [90].



1.6.Cocaína (COC)

A COC é um dos principais alcaloides extraídos das folhas de plantas do gênero *Erythroxylum*. Seu nome IUPAC é metil (1R, 2R, 3S, 5S) -3-benzoiloxi-8metil-8-azabicyclo [3.2.1] octano-2-carboxilato e sua estrutura molecular é representada pela **Figura 6** [85-86].

Figura 6. Estrutura molecular da COC. Fonte: [85]



A COC pode ser consumida de forma intravenosa, intranasal, fumável ou ingerida combinada a bebidas alcoólicas [92 – 96]. A sua dependência é resultado da sensação de euforia causada pela sua estimulação cerebral, no pior dos casos seu uso em grandes quantidades pode levar a parada cardíaca, respiratória e convulsões [89 – 90]. O Brasil é o país que apresenta os maiores índices de atendimento médico após o uso da COC, vale ressaltar que grande parte dos efeitos relatados pelos usuários se devem também à ação das principais substâncias utilizadas como adulterantes, como benzocaína, levamisol e CAF, entre outros [4, 94 – 99].

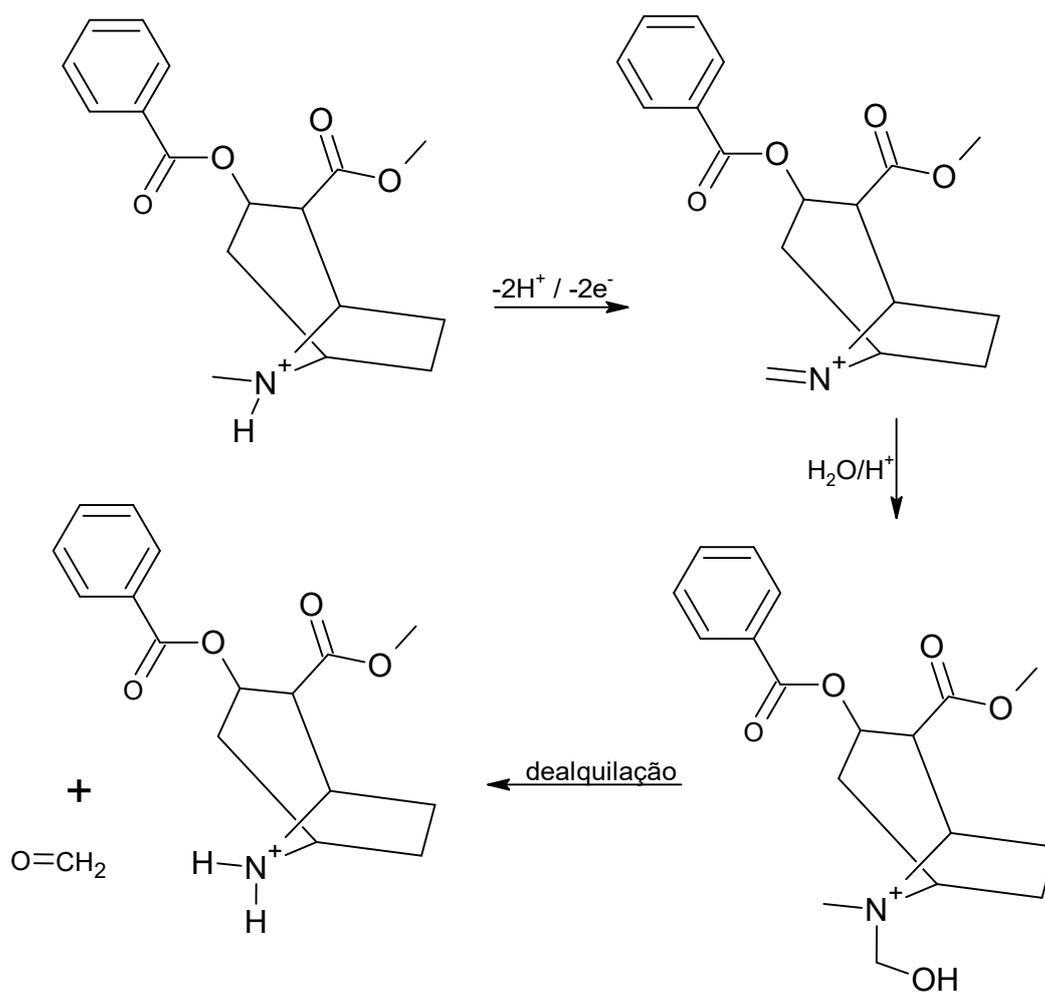
Devido a seu efeito estimulante, a COC está presente na lista de substâncias proibidas da World Anti-Doping Agency (WADA), agência responsável pelo código mundial antidoping [100]. Atualmente, os atletas participantes de uma competição olímpica são submetidos a uma coleta de urina, que pode ser acompanhada de uma coleta de sangue e, em seguida, após o preenchimento de formulários pelo atleta, as amostras são encaminhadas para um laboratório credenciado à WADA onde serão realizadas as análises [101 – 102].

A cromatografia líquida e gasosa, eletroforese capilar, ressonância magnética nuclear e espectroscopia de infravermelho constituem os métodos de análises de amostras suspeitas de conterem drogas de abusos [96 – 111]. São procedimentos precisos e sensíveis, entretanto, são relativamente caros e necessitam de equipamentos volumosos. Porém, mesmo assim, estes equipamentos são preferencialmente utilizados por laboratórios da WADA, da Polícia Civil e Polícia Federal. Neste contexto, pesquisas

acerca de métodos mais simples, de baixo custo e em com características portáteis são de grande interesse [4, 91, 92, 104, 105].

Os métodos eletroanalíticos são uma opção como métodos portáteis, mais simples e de baixo custo para aplicações forenses [4, 98, 99, 111, 112]. Recentemente, a partir de estudos utilizando CV, voltametria de onda quadrada (SWV, do inglês “*Square Wave Voltammetry*”) empregando BIA e BDD como eletrodo de trabalho, a reação de oxidação da COC em meio ácido foi estudada [4, 99]. O processo de oxidação, **Figura 7**, acontece pela transferência de dois elétrons e dois prótons, resultando em um íon intermediário imínio, após isso, ocorre uma hidratação e um rearranjo intramolecular para a obtenção de produtos de N-dealquilação, que corresponde a uma amina secundária protonada e um formaldeído [4, 99].

Figura 7. Mecanismo representando a oxidação da COC. Fonte: Adaptado de [74]



1.7. Amostras biológicas

Existe uma forte demanda para o desenvolvimento de métodos de análise para a determinação/identificação de drogas de abuso. Geralmente estas análises auxiliam no controle de uso de drogas no trânsito, no trabalho, em competições esportivas, em clínicas de recuperação e investigações forenses [113-114].

Outros tipos de amostras também podem ser utilizadas para a realização de análises de drogas, por exemplo, no caso de investigações forenses podem ser utilizados objetos, como cédulas de dinheiro [115 – 116]. Porém, de maneira geral, as mais utilizadas são as amostras biológicas, dentre elas sangue, urina e saliva [114, 117].

O sangue é considerado uma amostra de matriz complexa, pois é constituído de 80% de água e o restante de proteínas, gorduras e sais. É amplamente utilizado em análises toxicológicas forenses por fornecer uma análise mais detalhada, correlacionando o estado clínico do indivíduo com a concentração de droga no sangue. Porém, o método de obtenção da amostra é considerado invasivo e possui maiores chances de contaminação. Além disso, a janela de detecção do analito pode ser bastante restrita devido ao metabolismo e o procedimento analítico envolve alguns tratamentos de amostra, como a adição de anticoagulantes e centrifugação para a obtenção do plasma e do soro, respectivamente [114, 117].

A urina é constituída por 98% de água e o restante por substâncias químicas orgânicas (como ureia e ácido úrico) e inorgânicas (como íons cloreto e sódio). É a amostra mais utilizada para a detecção dos metabólitos referentes ao composto de interesse, pois consiste em um produto do sangue metabolizado pelos rins. Pode ser coletada em grandes volumes (um adulto saudável elimina em média 1,2 L de urina por dia), porém, é uma amostra de fácil adulteração caso a coleta não seja acompanhada, o que torna muitas vezes o método invasivo e/ou constrangedor [114, 117].

A saliva vem sendo utilizada como uma alternativa às demais amostras biológicas, pois é o fluido biológico mais aquoso sendo constituído por 99% de água e o restante de proteínas (majoritariamente enzimas), glicose, ureia, lipídeos e eletrólitos como sódio, potássio, fosfato e bicarbonato. Além disso, sua coleta não é

invasiva e pode ser realizada de forma fácil e rápida utilizando alguns dispositivos encontrados à venda, como Salivette®, OraSure® e Omni-Sal® [114, 117].

A maior parte das drogas estão presentes na saliva do usuário por um processo simples de difusão passiva, que é caracterizado pela transferência das moléculas da droga através de um gradiente de concentração sem gasto de energia [118]. Os grupos de drogas que podem ser identificadas na saliva são as anfetaminas, os barbitúricos, as benzodiazepinas, os alcaloides e os opioides [118]. A COC pode ser encontrada de forma inalterada em maiores concentrações na saliva do que no plasma sanguíneo e na urina [119].

2. Objetivo

O objetivo do trabalho é demonstrar a potencialidade da amperometria na determinação seletiva de analitos em amostras de medicamentos, bebidas, suplementos e amostras biológicas (urina sintética e saliva). A estratégia foi direcionada na aplicação de dois pulsos de potenciais sequenciais e usar a diferença entre as correntes detectadas para eliminar o sinal das espécies interferentes que oxidam em potenciais menos positivos que o analito (CAF e COC).

3. Parte Experimental

3.1. Reagentes e soluções

Todas as soluções aquosas foram preparadas utilizando água deionizada de alta pureza ($R \geq 18 \text{ M}\Omega \text{ cm}$) obtida com um sistema de purificação de água Mili Q (Millipore Bedford, MA, USA). Informações (pureza, fornecedor e origem) sobre os reagentes utilizados no desenvolvimento deste trabalho estão descritos na **Tabela 1**. Todos os reagentes usados possuíam grau de pureza analítica, logo, não foram realizados procedimentos de purificação.

Tabela 1. Lista de reagentes utilizados e suas respectivas especificações.

Substância	Teor (%)	Fornecedor	Origem
Ácido acético	99	Synth	Diadema, Brasil
Ácido ascórbico	99	Vetec	Duque de Caxias, Brasil
Ácido bórico	99	Pareac Química	Barcelona, Espanha
Ácido cítrico	99	Vetec	Duque de Caxias, Brasil
Ácido fosfórico	85	Synth	Diadema, Brasil
Ácido sulfúrico	98	Vetec	Duque de Caxias, Brasil
Ácido úrico	99	Sigma-Aldrich	Saint Louis, EUA
Bicarbonato de sódio	99	Synth	Diadema, Brasil
Caféina	99	Synth	Diadema, Brasil
Cocaína	98	Polícia Federal	Uberlândia, Brasil
Cloreto de amônio	99	Synth	Diadema, Brasil
Cloreto de cálcio dihidratado	78	Synth	Diadema, Brasil
Cloreto de sódio	99	Synth	Diadema, Brasil
Dihidrogenofosfato de potássio	99	Merck	Darmestádio, Alemanha
Hidrogenofosfato de potássio	99	Merck	Darmestádio, Alemanha
Hidróxido de sódio	99	Pareac Química	Barcelona, Espanha
Sulfato de magnésio heptahidratado	99	Neon	São Paulo, Brasil
Sulfato de sódio	99	Vetec	Duque de Caxias, Brasil
Ureia	99	Dinâmica	São Paulo, Brasil
2-mino-hidroximetil-propano-1,3 diol (TRIS)	99	Sigma-Aldrich	Saint Louis, EUA
3,4-Dimetoxicinamato (DMX)	99	Sigma-Aldrich	Saint Louis, EUA

A solução tampão acetato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 4,7 foi preparada utilizando a concentração adequada do ácido acético e o pH ajustado com NaOH 1 mol L^{-1} , enquanto a solução de ácido sulfúrico $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ foi preparada a partir de uma simples diluição do ácido sulfúrico 98% em água deionizada.

A solução tampão Britton-Robbinson (BR) utilizada no estudo do comportamento eletroquímico da CAF em função do pH foi preparada em meio aquoso a partir de uma mistura dos ácidos fosfórico, acético e bórico nas concentrações de $0,04 \text{ mol L}^{-1}$ cada. O ajuste do pH para obter as soluções de pH 2 a 10 foi realizado com NaOH 1 mol L^{-1} . Para a realização dos estudos, as soluções padrões de CAF e COC foram preparadas na concentração de 1000 mg L^{-1} diretamente nos eletrólitos utilizados e, em seguida, foram realizadas as diluições necessárias.

3.2. Amostras

As cinco amostras comerciais utilizadas junto a suas formas físicas e composição declarada pelos fabricantes são listadas na **Tabela 2**. Todas as amostras foram analisadas sem etapas de filtração prévia, no entanto, as amostras gaseificadas foram submetidas a banho ultrassônico por 5 minutos para a remoção de todos os gases dissolvidos (para evitar erros experimentais na pipetagem) e em seguida diluídas no eletrólito suporte de cada tipo de análise.

Para as análises das amostras de Tylenol DC, Melhoral e Thermodrol, dez comprimidos foram pesados, macerados e cuidadosamente homogeneizados. Em seguida, algumas porções foram retiradas, pesadas e dissolvidas diretamente em volume conhecido de eletrólito suporte (H_2SO_4 $0,1 \text{ mol L}^{-1}$). Finalmente, esta solução foi novamente diluída em eletrólito suporte até uma concentração adequada de acordo com informações no rótulo do produto específico.

Nas análises comparativas utilizando a eletroforese capilar (CE), a solução contendo 10 mmol L^{-1} de DMX e 20 mmol L^{-1} de TRIS, em pH 8,4, foi usada como tampão de corrida [100]. Na análise por CE das formulações farmacêuticas (Tylenol, Melhoral e Thermodrol), as soluções foram preparadas em água deionizada. A amostra de Coca-Cola foi injetada sem diluição (após remoção do gás carbônico usando ultrassom – 10 min) e a amostra de Red Bull foi diluída duas vezes em água deionizada.

Tabela 2. Lista de amostras utilizadas e suas respectivas especificações

Amostra	Forma física	Composição declarada
Coca-Cola	Líquido	água carbonatada, açúcar, extrato de noz de cola, ácido fosfórico, cafeína (100 mg L ⁻¹) e corante de caramelo IV
Melhoral	Cápsula	ácido acetilsalicílico (500 mg), cafeína (30 mg), amido, hipromelose e triacetina
Red Bull	Líquido	água carbonatada, sacarose, glicose, taurina (4000 mg L ⁻¹), cafeína (320 mg L ⁻¹), vitaminas (B3, B5, B6, B2, B12), ácido cítrico, bicarbonato de sódio, bicarbonato de magnésio, aromatizantes, corante caramelo I
Tylenol DC	Cápsula	Paracetamol (500 mg), cafeína (65 mg), amido, glicolato de amido sódico, celulose microfina, corante amarelo FD&C N° 6 laca de alumínio, laca de alumínio corante vermelho 40, dióxido de titânio, estearato de magnésio, hipromelose e macrogol.
Thermodrol	Cápsula	420 mg de cafeína

A amostra de urina sintética foi preparada conforme descrito na literatura [120]. Em 250 mL de água deionizada, os seguintes reagentes foram adicionados: 0,1 g de ácido cítrico, 0,093 g de ácido ascórbico, 0,525 g de bicarbonato de sódio, 2,5 g de uréia, 0,0175 g de ácido úrico, 0,01 g de cloreto de cálcio dihidratado, 1,3 g de cloreto de sódio, 0,353 g de sulfato de sódio, 0,123 g de sulfato de magnésio heptahidratado, 0,325 g de cloreto de amônio, 0,238 g de hidrogenofosfato de potássio e 0,305 g de dihidrogenofosfato de potássio.

As amostras de salivas foram coletadas após consentimento de 4 pessoas saudáveis pela manhã (após a escovação dos dentes) usando um dispositivo (“tubo”) Salivette (Sarstedt AG & Co; Nümbrecht - Alemanha). Este dispositivo consiste em um

tubo com o diâmetro de 16,8 mm com uma tampa de pressão e um rolo de fibra sintética interno para ser inserido na boca e após cerca de 2 minutos retirado e devolvido ao tubo [121]. Em seguida, o tubo Salivette foi levado para centrifugação a 5000 rpm por 5 minutos. Cada amostra de saliva após a centrifugação foi, primeiramente, diluída 2 vezes no eletrólito de suporte $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ e depois 250 vezes no mesmo eletrólito com concentração de $0,1 \text{ mol L}^{-1}$.

3.3. Instrumentação

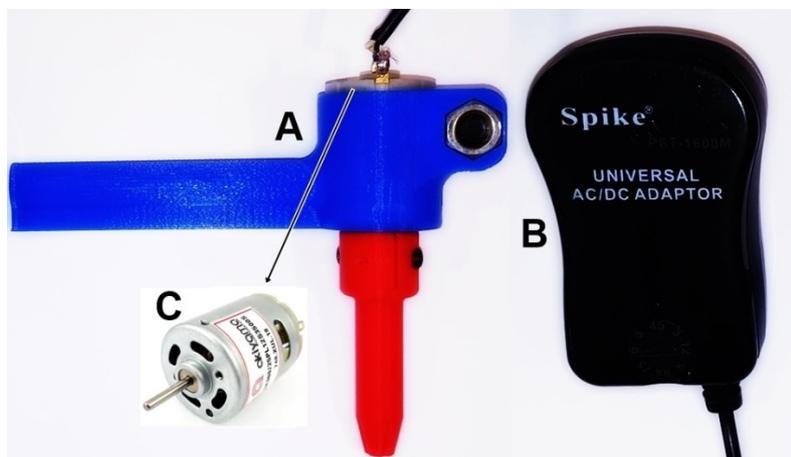
As medidas eletroquímicas foram todas realizadas usando um potenciostato μ -Autolab Tipo III (Metrohm Autolab, Utrecht, Holanda). A técnica MPA foi controlada pelo software GPES 4.8, a cronoamperometria e a voltametria cíclica pelo software NOVA 2.1.2, os quais também foram utilizados para aquisição e tratamento dos dados.

Uma célula BIA com volume interno de 100 mL usada nos experimentos amperométricos foi construída usando a tecnologia de impressão 3D (modelagem de deposição fundida - FDM, do inglês “*Fused Deposition Modeling*”) e filamento ABS (do inglês, “*Acrylonitrile Butadiene Styrene*”) conforme descrito na literatura [122]. O agitador magnético 728 Stirrer com 10 opções de velocidade de agitação (200 a 1900 rpm - Metrohm AG), juntamente com uma barra magnética, foi usado para realizar a agitação da solução no interior da célula BIA nos estudos de determinação de CAF.

Posteriormente, nos estudos para determinação amperométrica de COC em amostras de saliva, um agitador desenvolvido em parceria com a Faculdade de Engenharia Mecânica da Universidade Federal de Uberlândia foi utilizado. Este agitador foi projetado com o intuito de diminuir o ruído causado na corrente de fundo do sistema BIA com detecção amperométrica devido a agitação da solução presente na célula durante as análises (aumento na frequência analítica e diminuição da contaminação da superfície do eletrodo de trabalho).

O dispositivo agitador, **Figura 8**, foi desenhado utilizando o software SolidWorks e produzido a partir da impressão 3D (FDM) usando o software de fatiamento Simplify 3D, um filamento de ABS e uma impressora do modelo Core A1 Dual, ambos da empresa GTMax 3D. A velocidade de rotação (agitação) foi controlada através de uma fonte universal de tensão variável Spike de 3 a 12 V (700 a 4000 rpm), **Figura 8B**, conectada a um Micro Motor DC Akiyama com tensão nominal de 12V e rotação de 3500 rpm, **Fig. 8C**.

Figura 8. (A) Dispositivo agitador desenvolvido por impressão 3D (FDM): suporte para o motor e pá; (B) Fonte universal de tensão variável; (C) Micro Motor DC Akiyama. Fonte: Autor.



Um mini Ag / AgCl (KCl saturado) [123] e um fio de platina foram usados como eletrodos de referência e auxiliar, respectivamente. Uma camada fina ($\sim 1,2 \mu\text{m}$) de um filme de diamante dopado com boro (BDD; $\sim 8000 \text{ ppm}$) depositado sobre um substrato de silício ($0,7 \times 0,7 \text{ cm}$) com uma espessura de $1,0 \text{ mm}$ (Neocast SA, La Chaux-de-Fonts, Suíça) foi utilizado como o eletrodo de trabalho.

Foram avaliados dois tipos de pré-tratamentos eletroquímicos da superfície do BDD: (i) pré-tratamento anódico realizado em corrente constante ($+ 0,01 \text{ A}$; 1000 s) em $0,1 \text{ mol L}^{-1} \text{ H}_2\text{SO}_4$ [124] e, (ii) pré-tratamento catódico realizado em corrente constante ($- 0,01 \text{ A}$; 1000 s) em $0,1 \text{ mol L}^{-1} \text{ H}_2\text{SO}_4$ [125]. Na determinação de CAF, melhores resultados foram obtidos após o pré-tratamento anódico, enquanto na COC o melhor pré-tratamento foi o catódico [126]. O pré-tratamento foi realizado uma vez ao dia antes do início dos experimentos.

As separações por CE foram realizadas em um equipamento com detecção condutométrica sem contato (C^4D) [127-128]. O capilar de sílica fundida (sem modificação – fluxo eletrosmótico normal) usado em todos os experimentos tinha 50 cm de comprimento total, 10 cm de comprimento efetivo e 50 mm de diâmetro interno (Agilent, Folsom, CA, EUA). Antes das análises, o capilar foi pré-tratado por lavagem com água deionizada por 10 min , alternando-se a lavagem com $\text{NaOH } 0,1 \text{ M}$, água novamente e finalmente com o tampão de corrida a ser usado utilizado na análise. Em seguida, as

amostras foram injetadas hidrodinamicamente por 1 s a 25 kPa e a separação realizada com uso de voltagem +25 kV (lado da injeção).

4. Resultados e Discussão

4.1. Considerações iniciais

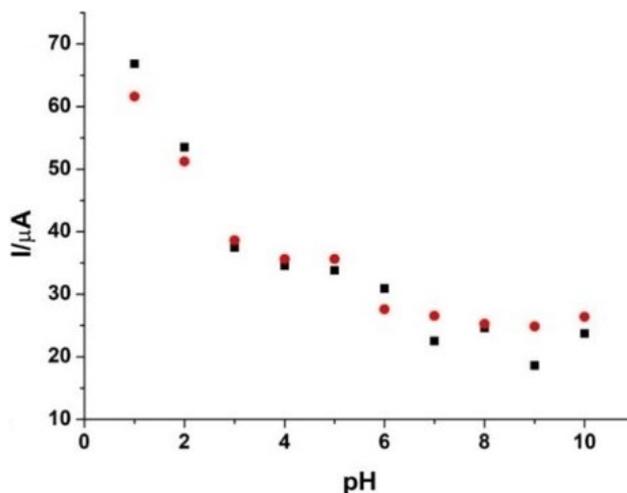
Os resultados e discussões deste trabalho foram divididos em duas partes. Na primeira parte serão apresentados os estudos realizados para o desenvolvimento de um método amperométrico para determinação de CAF em produtos comerciais e urina sintética. Na segunda parte, serão apresentados os estudos relacionados com o desenvolvimento de um método amperométrico para determinação de COC em amostras de saliva.

4.2. Parte 1: Desenvolvimento de um método amperométrico para determinação de cafeína em amostras complexas

4.2.1. Comportamento eletroquímico da cafeína (CAF)

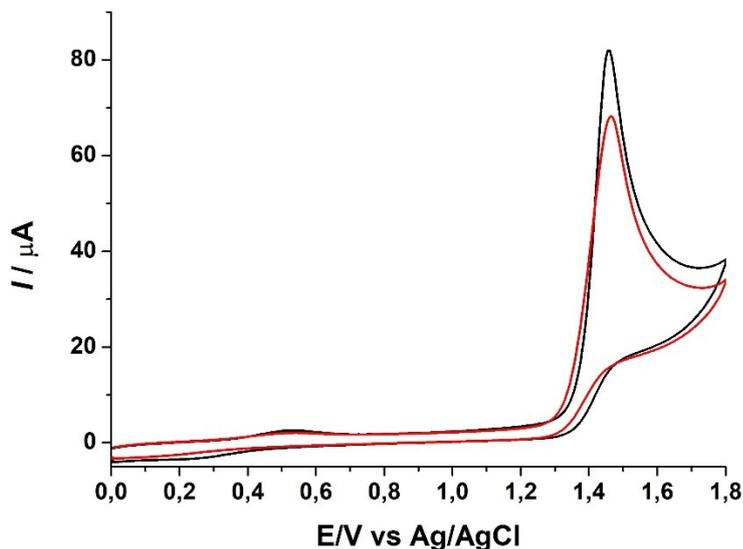
O comportamento eletroquímico da CAF foi inicialmente investigado variando-se o pH de 1 a 10 usando voltametria cíclica e BDD como eletrodo de trabalho. Uma solução de H₂SO₄ 0,1 mol L⁻¹ foi usada para representar o pH 1 e soluções de tampão BR para os demais pHs (2 a 10). A **Figura 9** mostra a variação da corrente de oxidação da CAF em função do pH após o pré-tratamento catódico (- 0,01 A/1000 s em H₂SO₄; e anódico (+ 0,01 A/1000 s em H₂SO₄) do eletrodo de BDD.

Figura 9. Efeito do pH e do pré-tratamento catódico (●) e anódico (■) do eletrodo de BDD na corrente de oxidação da CAF. Concentração de CAF: 50 mg L⁻¹; técnica: voltametria cíclica; v : 100 mV s⁻¹; incremento de potencial: 5 mV.



Como pode ser observado na **Figura 9** a maior corrente de oxidação para CAF (~70 μ A) foi obtida em pH = 1 (0,1 mol L⁻¹ H₂SO₄) no pré-tratamento anódico do eletrodo BDD. Além disso, o modo de preparo da solução de H₂SO₄ é mais simples do que do tampão BR pH = 2, portanto, essa foi a condição selecionada para estudos posteriores. Na **Figura 10** são mostrados os voltamogramas cíclicos obtidos nas condições de pH = 2 e pH = 1 descritas anteriormente.

Figura 10. Voltamogramas cíclicos obtidos para CAF (50 mg L^{-1}) em solução tampão BR pH 2 (linha vermelha) e solução $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de H_2SO_4 (linha preta). Outras condições: velocidade de varredura: 100 mV s^{-1} ; incremento de potencial: 5 mV ; eletrodo de trabalho: BDD após pré-tratamento anódico.



O comportamento eletroquímico da CAF também foi estudado usando a técnica BIA-MPA. Neste caso, uma sequência de 10 pulsos de potenciais (+0,9; +1,0; +1,1; +1,2; +1,3; +1,4; +1,5; +1,6; +1,7 e +1,8 V; 100 ms cada) foi aplicada repetidamente ao eletrodo de BDD com o registro de 10 amperogramas separados em função do tempo, **Figura 11**. Uma solução contendo 25 mg L^{-1} de CAF foi injetada em triplicata e a partir dos valores de corrente detectados em cada pulso de potencial, um voltamograma hidrodinâmico mostrado na **Figura 12** foi construído.

Figura 11. Amperogramas obtidos pela injeção de uma solução contendo 25 mg L^{-1} de CAF no sistema BIA-MPA. Pulso de potenciais aplicados: +0,9; +1,0; +1,1; +1,2; +1,3; +1,4; +1,5; +1,6; +1,7 e +1,8 V, 100 ms cada; eletrólito de suporte: H_2SO_4 $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, volume injetado: $150 \text{ }\mu\text{L}$; velocidade de injeção: $75 \text{ }\mu\text{L s}^{-1}$.

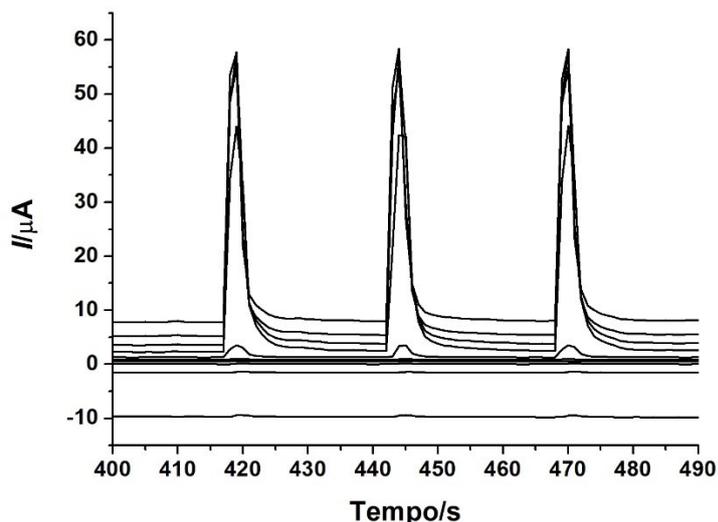
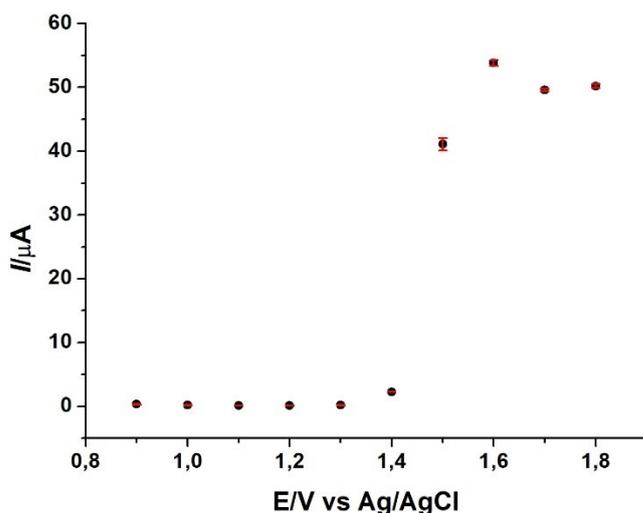


Figura 12. Voltamograma hidrodinâmico obtido a partir correntes detectadas nos amperogramas da Fig. 11. Pulso de potenciais aplicados: +0,9; +1,0; +1,1; +1,2; +1,3; +1,4; +1,5; +1,6; +1,7 e +1,8 V, 100 ms cada; eletrólito de suporte: H_2SO_4 $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, volume injetado: $150 \text{ }\mu\text{L}$; velocidade de injeção: $75 \text{ }\mu\text{L s}^{-1}$.



Pelo voltamograma hidrodinâmico apresentado na **Figura 12**, pode-se observar que a oxidação da CAF ocorre a partir do potencial de +1,40 V. Esta reação eletroquímica ocorre a partir da transferência de 4 prótons e 4 elétrons conforme descrito na literatura

[80 - 84]. Com base nessas informações, dois valores de potenciais foram escolhidos para avaliar a estratégia aqui proposta para aumentar a seletividade na detecção de CAF em amostras complexas mediante o uso da amperometria diferencial pulsada (DPA). Um potencial foi selecionado no início da oxidação do CAF (+1,40 V) e o outro na região de potencial onde a corrente é máxima (+1,55 V). Os dois pulsos de potenciais serão aplicados sequencialmente e a corrente proveniente da oxidação da CAF (I_{CAF}) pode ser calculada usando a seguinte equação 8:

$$I_{CAF} = I_{+1,55V} - I_{+1,40V} = \Delta I \quad (8)$$

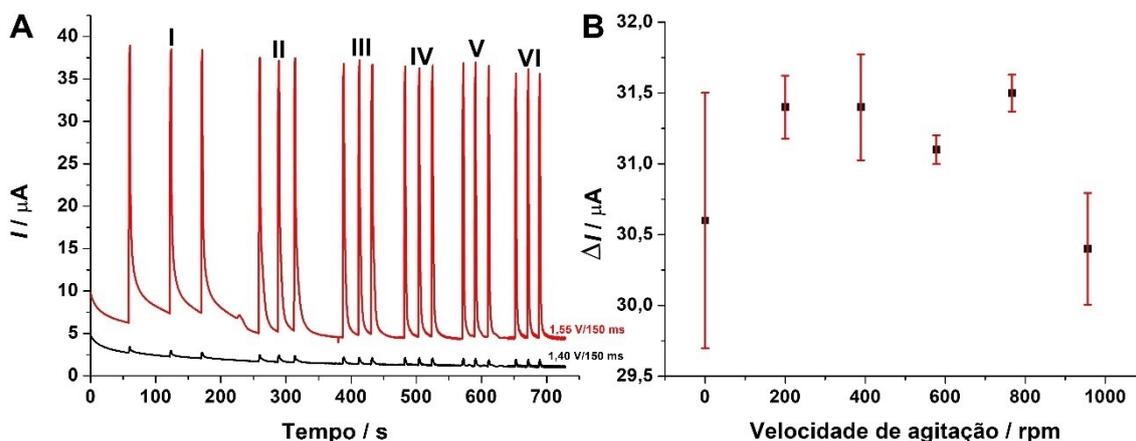
4.2.2. Estudos de otimização dos parâmetros do sistema BIA-MPA

Os parâmetros experimentais que influenciam o desempenho da técnica BIA-MPA (velocidade de agitação, velocidade de injeção e volume de injeção) foram otimizados para identificar as melhores condições (intensidade de corrente e repetibilidade) de detecção de CAF. Nestes estudos, uma solução de 25 mg L⁻¹ de CAF preparada no eletrólito de suporte (0,1 mol L⁻¹ H₂SO₄) foi utilizada.

4.2.2.1. Velocidade de agitação

A otimização da velocidade de agitação utilizando o agitador magnético foi realizada variando-se a velocidade de 200 a 956 rpm. A escolha da velocidade ideal foi feita avaliando-se o ganho de corrente na oxidação da CAF, o menor desvio padrão resultante das triplicatas e a minimização do ruído no sinal de fundo causado pela vibração do sistema que ocorre devido a movimentação da barra magnética. A **Figura 13** apresenta os amperogramas nos dois potenciais selecionados (+1,40 V e +1,55 V) com injeção de alíquotas de uma solução contendo 25 mg L⁻¹ de CAF.

Figura 13. A) Amperogramas obtidos com a injeção de uma solução contendo 25 mg L^{-1} de CAF em função da velocidade de agitação **I** (0 rpm), **II** (200 rpm), **III** (389 rpm), **IV** (578 rpm), **V** (767 rpm) e **VI** (956 rpm). **(B)** Relação entre a corrente de pico e a velocidade de agitação ($n = 3$). Volume de injeção: $150 \text{ }\mu\text{L}$; velocidade de injeção: $83 \text{ }\mu\text{L s}^{-1}$; pulsos de potenciais aplicados: $+1,40 \text{ V}/150 \text{ ms}$ e $1,55 \text{ V}/150 \text{ ms}$.

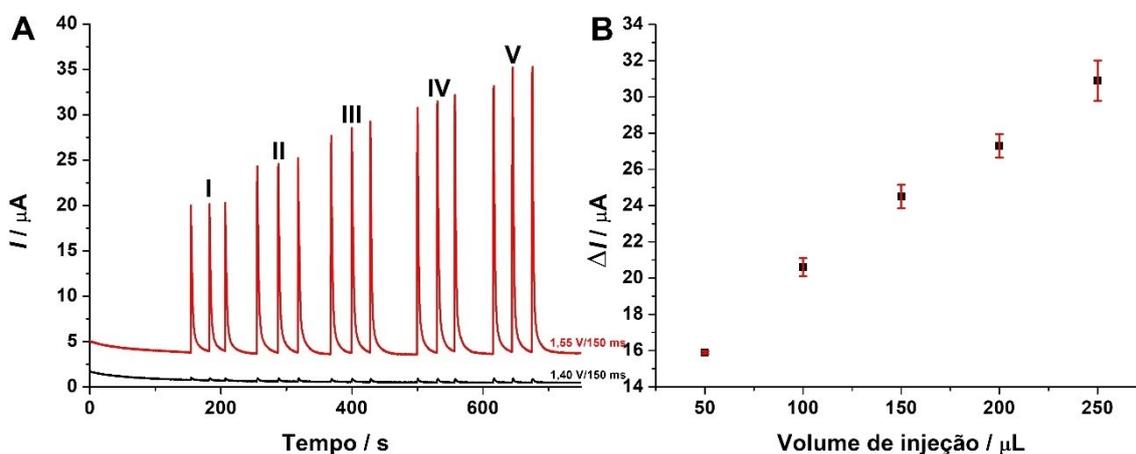


Através da **Figura 13** foi observado que a intensidade de corrente variou pouco ($< 4 \%$) em função da velocidade de agitação. No entanto, um aumento considerável pode ser observado na frequência analítica entre a ausência (≈ 70 injeções h^{-1}) e presença (≈ 200 injeções h^{-1} , 956 rpm) de agitação no interior da célula BIA. A presença da agitação também é útil para amenizar a provável contaminação da superfície do eletrodo (menor tempo de contato com o eletrodo). A velocidade de agitação escolhida para os estudos subsequentes foi a de aproximadamente 578 rpm (≈ 150 injeções h^{-1}). Esta condição não é a de melhor frequência analítica, mas apresentou um desvio padrão um pouco menor ($\pm 0,3 \text{ }\mu\text{A}$) para a injeção em triplicata da solução de CAF.

4.2.2.2. Volume de injeção

A otimização do volume de injeção foi realizada fixando uma velocidade de injeção de $83 \text{ }\mu\text{L s}^{-1}$ e utilizando a velocidade de agitação otimizada de 578 rpm. A escolha do volume de injeção foi realizada avaliando-se o ganho de corrente do sinal de oxidação da CAF, visando uma melhor sensibilidade e precisão na detecção. Os resultados obtidos são mostrados na **Figura 14**, em triplicata, para a injeção de uma alíquota contendo 25 mg L^{-1} de CAF.

Figura 14. (A) Amperogramas obtidos com a injeção de 25 mg L^{-1} de CAF em função do volume de injeção **I** ($50 \mu\text{L}$), **II** ($100 \mu\text{L}$), **III** ($150 \mu\text{L}$), **IV** ($200 \mu\text{L}$) e **V** ($250 \mu\text{L}$). (B) Relação entre a corrente de pico e volume de injeção ($n = 3$). Condições amperométricas: velocidade de agitação = 578 rpm ; velocidade de injeção = $83 \mu\text{L s}^{-1}$; pulsos de potenciais aplicados: $+1,40 \text{ V}/150 \text{ ms}$ e $1,55 \text{ V}/150 \text{ ms}$.

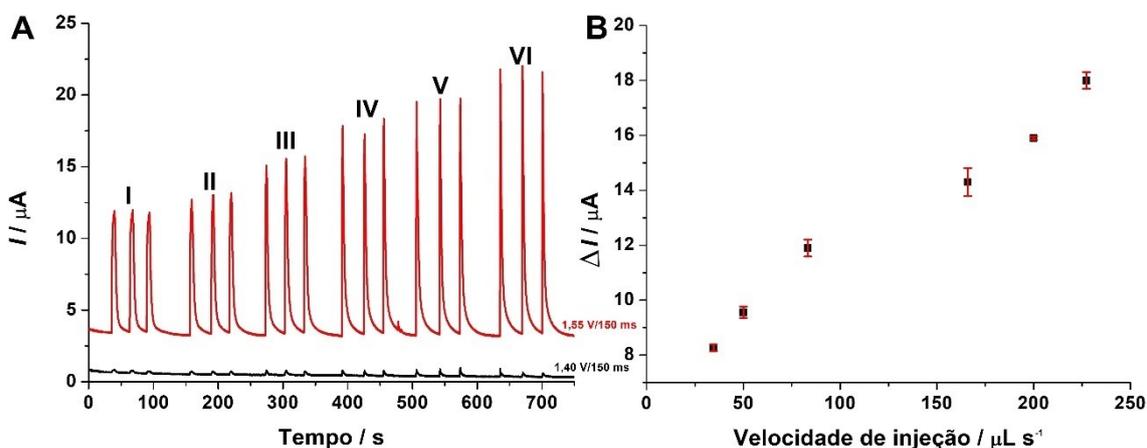


A partir dos resultados mostrados na **Figura 14** pode-se concluir que a maior corrente de oxidação da CAF ($31 \mu\text{A}$) foi obtido com o volume de $250 \mu\text{L}$. Porém, o desvio padrão das injeções em triplicata nesse volume foi maior em relação aos demais volumes avaliados. Nos estudos seguintes, apesar da aquisição de corrente um pouco menor ($28 \mu\text{A}$), o volume de $200 \mu\text{L}$ foi selecionado (menor desvio padrão $\pm 0,6 \mu\text{A}$).

4.2.2.3. Velocidade de injeção

Com a velocidade de agitação e o volume de injeção definidos, outro parâmetro a ser otimizado é a velocidade de injeção. A **Figura 15** apresenta os resultados obtidos para injeções em triplicata de $200 \mu\text{L}$ de uma solução contendo 25 mg L^{-1} de CAF em função da velocidade de injeção.

Figura 15. (A) Amperogramas obtidos com a injeção de 25 mg L^{-1} de CAF em função da velocidade de injeção **I** ($34 \text{ } \mu\text{L s}^{-1}$), **II** ($50 \text{ } \mu\text{L s}^{-1}$), **III** ($83,3 \text{ } \mu\text{L s}^{-1}$), **IV** ($166 \text{ } \mu\text{L s}^{-1}$), **V** ($200 \text{ } \mu\text{L s}^{-1}$) e **VI** ($227 \text{ } \mu\text{L s}^{-1}$). (B) Relação entre a corrente de pico e velocidade de injeção ($n = 3$). Condições amperométricas: velocidade de agitação = 578 rpm ; volume de injeção = $200 \text{ } \mu\text{L}$; pulsos de potenciais aplicados: $+1,40 \text{ V}/150 \text{ ms}$ e $1,55 \text{ V}/150 \text{ ms}$.



Como pode ser observado na **Figura 15**, a velocidade de injeção de $200 \text{ } \mu\text{L s}^{-1}$ forneceu uma corrente de oxidação um pouco menor do que $227 \text{ } \mu\text{L s}^{-1}$, no entanto, um menor desvio padrão ($\pm 0,06 \text{ } \mu\text{A}$) pode ser observado para $200 \text{ } \mu\text{L s}^{-1}$. Portanto, esta velocidade de injeção foi usada nos estudos seguintes.

4.2.2.4. Estudo de otimização do tempo de aplicação dos pulsos de potenciais

Os tempos de aplicação (50 a 250 ms) dos pulsos de potenciais ($1,40$ e $1,55 \text{ V}$) foram avaliados utilizando uma solução de 10 mg L^{-1} ($66,1 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$) de paracetamol (PAR). Neste estudo, o PAR foi usado como interferente modelo para a determinação de CAF (**Fig. 16**).

Na proposta em estudo, os tempos de aplicação ideais são aqueles em que os sinais de corrente de oxidação de PAR detectados nos dois potenciais sejam iguais ou mais próximos possível. Nesta condição, a corrente de oxidação de PAR seria eliminada por subtração empregando a equação 8. Esta condição foi observada nos tempos de 50 e 200 ms (**Fig. 16**). Apesar do tempo de 50 ms apresentar correntes iguais em ambos os potenciais, a intensidade de corrente era menor nesta condição. Por isso, o tempo de aplicação de 200 ms foi adotado nos experimentos subsequentes. Vale a pena ressaltar que as diferenças entre o menor e o maior valor de corrente é de aproximadamente $1 \text{ } \mu\text{A}$, um valor de corrente baixo que não é suficiente para causar algum erro significativo,

então provavelmente em qualquer uma das condições de tempo de pulso seria possível a realização do método. Os parâmetros otimizados para a detecção amperométrica de CAF por BIA-MPA são mostrados na **Tabela 3**.

Figura 16. Corrente detectada para a oxidação do PAR (10 mg L^{-1}) a $+1,40 \text{ V}$ (■) e $+1,55 \text{ V}$ (●) em função do tempo de aplicação de cada pulso de potencial (50 a 250 ms).

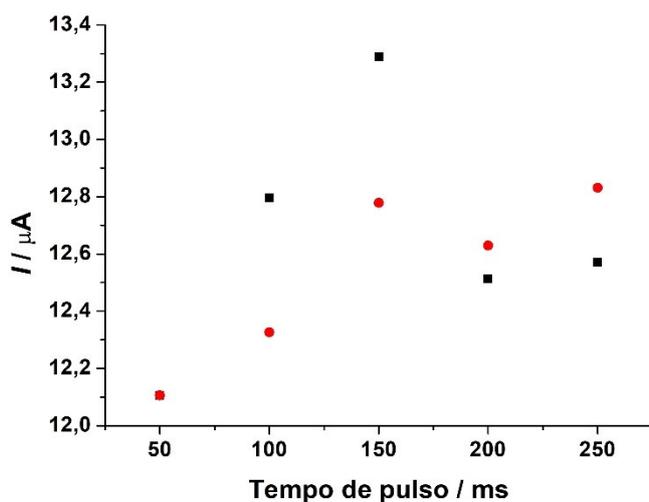


Tabela 3. Faixas estudadas e parâmetros otimizados para detecção amperométrica de CAF por BIA-MPA.

Parâmetros	Faixa de estudo	Valor otimizado
Velocidade de agitação (rpm)	200 – 956	578
Velocidade de injeção ($\mu\text{L s}^{-1}$)	34 – 227	200
Volume de injeção (μL)	50 – 250	150
*Tempo de pulso (ms)	50 - 300	200

*Potenciais avaliados: $+1,40 \text{ V}$ e $+1,55 \text{ V}$

4.2.3. Faixa linear

Após a otimização dos parâmetros para a detecção amperométrica de CAF por BIA-MPA (**Tabela 3**), estudos foram realizados para identificar a faixa linear de resposta para CAF. A faixa linear corresponde a faixa de trabalho onde a correlação entre o sinal medido é diretamente proporcional à massa ou concentração da espécie a ser quantificada [129-132]. Neste trabalho a faixa linear foi determinada empiricamente, a partir de sinais medidos para concentrações conhecidas de CAF, em seguida, uma curva analítica foi construída e uma equação de reta determinada a partir do método matemático da regressão linear estimando-se o coeficiente linear e angular da curva, juntamente com o coeficiente de correlação r [129-132].

A **Figura 17** mostra os amperogramas registrados em +1,40 V e +1,55 V para injeções em triplicata de soluções contendo concentrações crescentes de CAF (2, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 100, 200, 300 e 400 mg L⁻¹). Uma faixa linear foi identificada entre 2 e 300 mg L⁻¹ (10 a 1546 μmol L⁻¹) de CAF com um coeficiente de correlação igual a 0,998 (**Fig. 18**). Correntes de oxidação para CAF também foram detectadas em +1,40 V, mas foram cerca de 15 vezes menores que em +1,55V e, portanto, não impedem o uso da estratégia aqui proposta.

Figura 17. Amperogramas adquiridos de cada pulso de potencial aplicado (+1,40 e +1,55 V) para injeções de soluções com concentrações crescentes de CAF (2, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 100, 200, 300 e 400 mg L⁻¹). Demais condições de acordo com a **Tabela 3**.

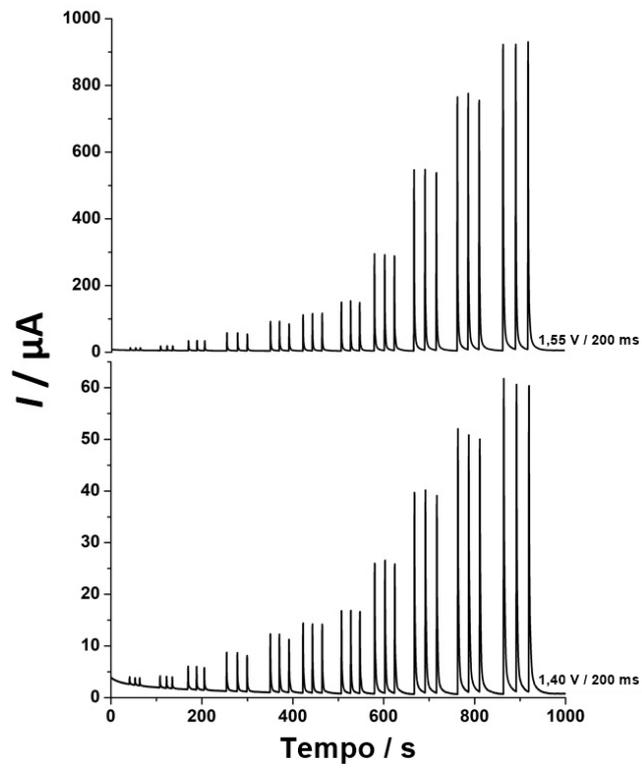
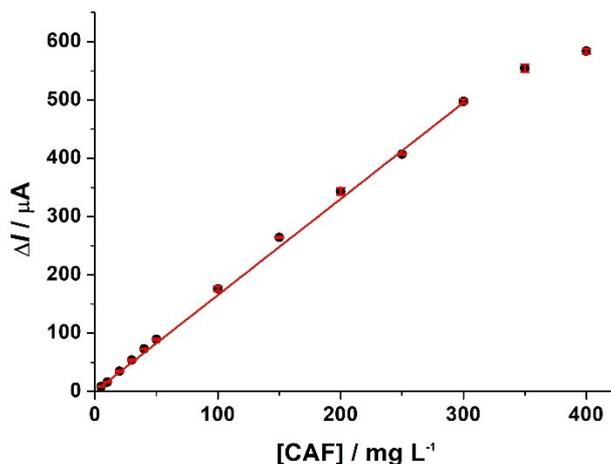


Figura 18. Curva adquirida para a diferença de corrente (ΔI) de cada potencial aplicado (+1,40 e 1,55 V) para injeções de soluções com concentrações crescentes de CAF (2, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 100, 200, 300 e 400 mg L⁻¹). Demais condições de acordo com a **Tabela 3**.



A **Tabela 4** mostra as características analíticas do método BIA-MPA para determinação amperométrica de CAF. O limite de detecção (LD) e quantificação (LQ) foram calculados usando as equações $3\sigma/s$ e $10\sigma/s$, respectivamente, em que σ corresponde ao desvio padrão do coeficiente linear e s ao coeficiente angular [129-132].

Tabela 4. Características analíticas do método BIA-MPA proposto para determinação amperométrica de CAF.

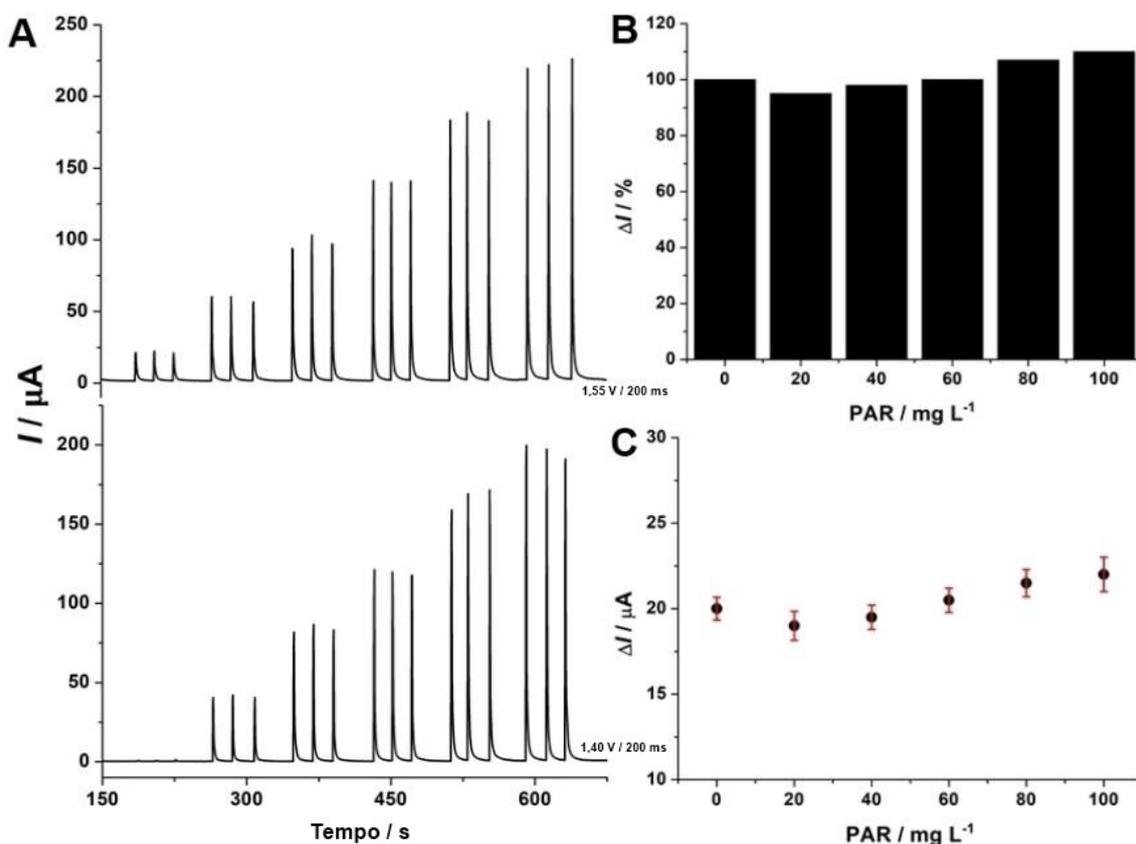
Parâmetros	Valores
Coefficiente angular ($\mu\text{A L mg}^{-1}$)	$2,40 \pm 0,03$
Coefficiente linear (μA)	$4,20 \pm 0,04$
r	0,998
Faixa Linear (mg L^{-1})	2,0 - 300,0
Nº de pontos (n)	11
LD (mg L^{-1})	0,05
LQ (mg L^{-1})	0,17

4.2.4. Avaliação da seletividade

A **Figura 19A** mostra os amperogramas adquiridos para os pulsos +1,40 V e +1,55 V para a injeção em triplicata de soluções com concentração fixa de CAF (10 mg L⁻¹) sem e com a presença de concentrações crescentes de PAR (20,0; 40,0; 60,0; 80,0 e 100,0 mg L⁻¹). Como pode ser observado, CAF só foi detectada em +1,55 V (primeiras injeções; n = 3) e PAR em ambos os pulsos de potenciais.

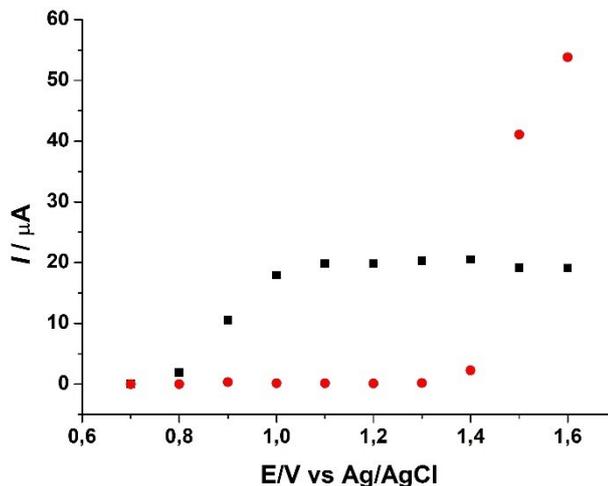
Na **Fig. 19B**, a corrente detectada para 10 mg L⁻¹ CAF ($19,8 \pm 1,2 \mu\text{A}$) foi considerada 100% e comparada com o ΔI ($I_{\text{CAF}} = I_{+1,55\text{V}} - I_{+1,40\text{V}}$) obtido para soluções contendo concentrações crescentes de PAR (modelo de espécie interferente). Como pode ser observado, a corrente detectada para CAF foi relativamente constante em todas as soluções avaliadas (RSD = 6,1%), o que também pode ser visto na **Fig. 19C** (valores de corrente). Esses resultados são evidências de que a detecção seletiva de CAF é possível nessas condições. O valor RSD (6,1%; n = 6) também pode ser considerado um estudo de repetibilidade (precisão intra-dia) [129-132].

Figura 19. (A) Amperogramas obtidos por BIA-MPA para injeção de soluções com concentração fixa de CAF (10 mg L^{-1}) e concentrações crescentes de PAR (0,0; 20,0; 40,0; 60,0; 80,0 e $100,0 \text{ mg L}^{-1}$); (B) Gráfico de barras de porcentagem da corrente para oxidação CAF sem e com a presença de PAR; (C) Valores de corrente para oxidação de CAF ($I_{\text{CAF}} = I_{+1,55\text{V}} - I_{+1,40\text{V}}$). Eletrólito de suporte: $0,1 \text{ mol L}^{-1} \text{ H}_2\text{SO}_4$; outras condições de acordo com a **Tabela 3**.



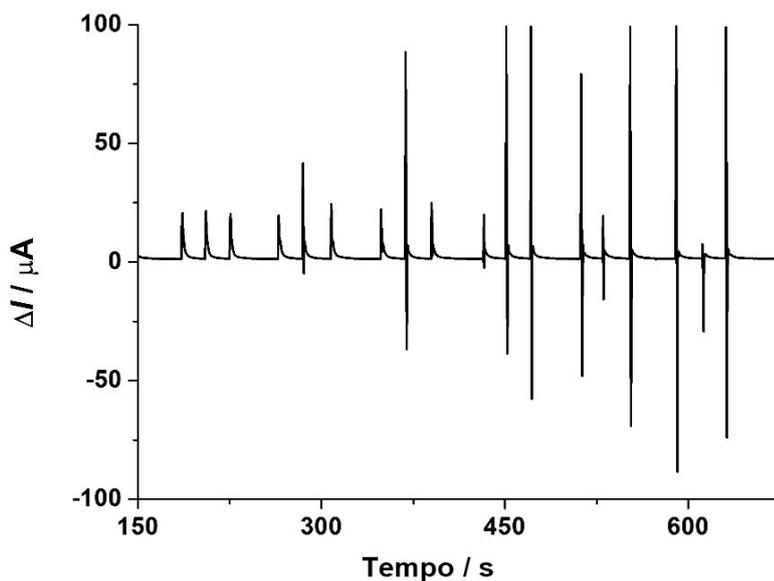
Os resultados observados na **Figura 19** corroboram com os resultados apresentados na **Figura 20**, que mostra os comportamentos eletroquímicos do PAR e CAF em um voltamograma hidrodinâmico. Como pode ser visto claramente, nos potenciais escolhidos ($+1,40 \text{ V}$ e $+1,55\text{V}$), a corrente correspondente a oxidação do PAR é relativamente constante enquanto a da CAF é muito maior em $+1,55 \text{ V}$, o que torna o método viável.

Figura 20. Voltamogramas hidrodinâmicos obtidos por BIA-MPA para injeção de CAF (círculos vermelhos) e PAR (quadrados pretos - espécie interferente modelo). Pulsos potenciais aplicados: +0,7, +0,8, +0,9; +1,0, +1,1, +1,2, +1,3, +1,4, +1,5 e +1,6 V; concentração: 25 mg L⁻¹ de ambos os compostos; eletrólito de suporte: 0,1 mol L⁻¹ H₂SO₄; outras condições de acordo com a **Tabela 3**.



Em seguida, a técnica de amperometria de pulso diferencial que exibe apenas um amperograma (apenas a diferença entre as correntes registradas em cada pulso de potencial é mostrada) foi selecionada para tornar a análise mais simples e rápida. Como pode ser observado na **Figura 21**, picos amperométricos típicos ($n = 3$) foram obtidos para a solução de CAF 10 mg L⁻¹, entretanto, para soluções com concentrações mais altas, picos deformados e / ou ruídos de fundo elevados foram detectados. Diante disso, foi utilizada a técnica MPA e a diferença de corrente foi obtida com auxílio de outro software (Excel, por exemplo).

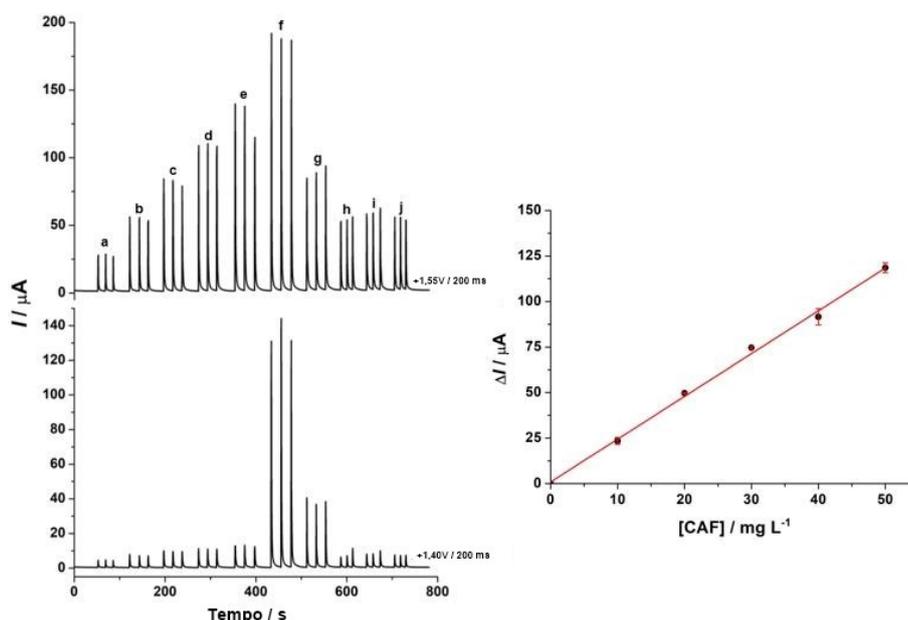
Figura 21. Amperograma obtido por amperometria de pulso diferencial para injeção de soluções contendo concentrações crescentes de CAF (10 a 50 mg L⁻¹). Pulsos de potenciais aplicados: +1,55 V / 200 ms e 1,40 V / 200 ms. Demais condições de acordo com a **Tabela 3**.



4.2.5. Aplicação do método proposto em amostras reais

A **Figura 22** ilustra os amperogramas registrados em +1,40 V e + 1,55 V para a injeção de soluções contendo concentrações crescentes de CAF (10, 20, 30, 40 e 50 mg L⁻¹) e cinco (**f**, **g**, **h**, **i** e **j**) soluções de amostras adequadamente diluídas em eletrólito de suporte (H₂SO₄ mol L⁻¹). Como pode ser visto na **Fig. 21**, espécies interferentes foram detectadas no potencial de +1,40 V, com correntes maiores detectadas para as amostras farmacêuticas (**f** e **g**) e menores para as outras três amostras (**h**: suplemento alimentar; **i**: refrigerante e **j**: energético).

Figura 22. Amperogramas BIA-MPA e respectiva curva de calibração ($r = 0,998$) obtidos após injeções de soluções contendo CAF 10 a 50 mg L⁻¹ (a - e; $r = 0,998$) e cinco amostras diluídas adequadamente em eletrólito suporte: Tylenol DC (f), Melhoral (g), suplemento Thermodrol (h), refrigerante Coca-Cola (i) e energético Red Bull (j). Demais condições de acordo com a **Tabela 3**.



A partir da **Tabela 5** podemos observar os resultados obtidos para a determinação de CAF em cinco amostras diferentes utilizando o método BIA proposto. Para efeito de comparação, as amostras também foram analisadas por eletroforese capilar [133] e a análise estatística (teste t de Student pareado) foi usada para comparar os valores obtidos [1]. Com um nível de confiança de 95%, os valores t resultantes (0,754) foram menores que o valor crítico (2,78; $\alpha = 0,01$), demonstrando que não há diferenças significativas entre os resultados obtidos por ambos os métodos.

A precisão foi estimada com base no valor de RSD das concentrações de CAF obtidas pela análise das amostras pelo método proposto no mesmo dia para $n = 3$ (precisão intra-dia) e em três dias consecutivos (precisão inter-dia). Os valores variaram de 1 - 3% para a precisão intra-dia e inter-dia, sendo que estes resultados ($RSD \leq 5\%$) mostram alta precisão do método. Quando comparado a uma técnica como a cromatografia líquida

comumente utilizada para esse fim [90, 134], o método proposto apresenta vantagens como mais rapidez, custo inferior, etapas simples de preparação da amostra (dissolução e / ou diluição) e características portáteis, mas também apresenta algumas desvantagens como a detecção de apenas um analito por ensaio.

Na **Tabela 5** também são mostrados os resultados obtidos utilizando somente o potencial maior (+1,55 V). Nestas condições, os valores de CAF encontrados nas amostras F, G, I e J são maiores em relação aos obtidos a partir da diferença, $I_{+1,55V} - I_{+1,40V}$, demonstrando o efeito dos interferentes eletroativos presentes na amostra. Porém, para as amostras H e J, os valores encontrados se aproximaram dos resultados obtidos por CE, evidenciando que nestas amostras não existem ou as espécies eletroativas interferentes estão presentes em baixas concentrações.

Tabela 5. Comparação dos resultados obtidos para a determinação de CAF usando BIA-MPA obtidas no mesmo dia (intra-dia) e em dias diferentes (inter-dia; $n = 3$) versus resultados obtidos por CE ($n = 3$) nas amostras de Tylenol DC (F), Melhoral (G), suplemento Thermodrol (H), refrigerante Coca-Cola (I) e energético Red Bull (J). $E_1 = 100 \times (\text{intra-dia} - \text{valor do rótulo}) / \text{rótulo}$; $E_2 = 100 \times (\text{intra-dia} - \text{CE}) / \text{CE}$; % de precisão: Desvio padrão relativo (RSD); $P_1 = \text{precisão intra-dia}$, $P_2 = \text{precisão inter-dia}$; $\Delta I = I_{+1,55V} - I_{+1,40V}$.

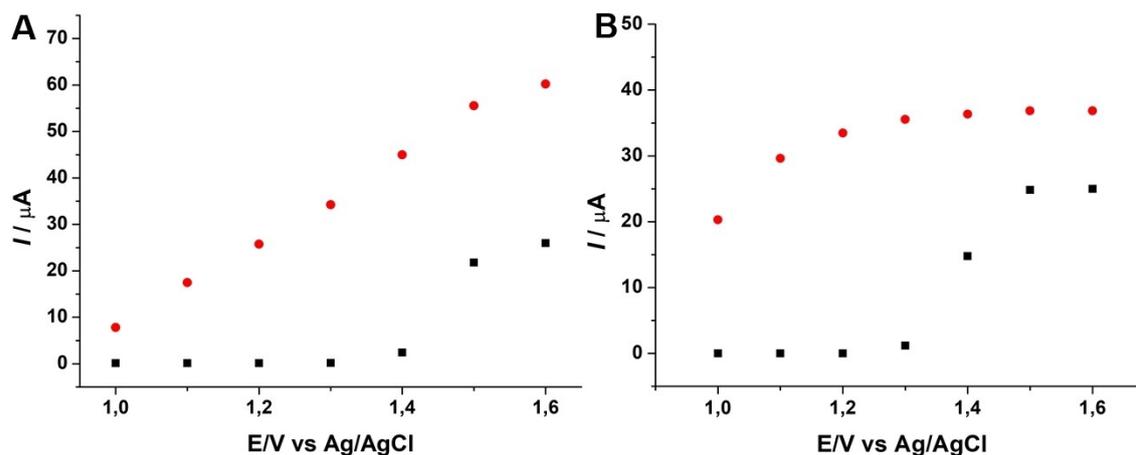
Método BIA							
Amostra	Valor da bula (mg)	CE (mg)	A partir do ΔI		A partir do $I_{+1,55V}$		
			Intra-dia (mg)	Inter-dia (mg)	Intra-dia (mg)	E_1 (%)	E_2 (%)
F	130	122±1	135±3	133±2	487±3	4	11
G	30	31±1	29±1	30±1	51±2	-3	-6
H	420	450±2	399±1	391±1	410±1	-5	-12
I	100	99±1	95±2	99±1	110±2	-5	-4
J	320	323±2	325±2	314±1	336±2	2	1

4.2.6. Aplicação do método em amostra de urina sintética

O desempenho do método proposto também foi avaliado pela determinação de CAF em amostras de urina sintética. Esta amostra possui uma composição complexa com a presença de altos níveis de compostos eletroativos como os ácidos ascórbico e úrico que atuam como espécies interferentes na determinação amperométrica de CAF. Primeiramente, foi realizada a construção de voltamogramas hidrodinâmicos (sistema BIA) para soluções de CAF e de urina sintética, **Figura 23**, em dois eletrólitos diferentes com o intuito de se adquirir a melhor condição para a realização da determinação de CAF em urina sintética.

Como pode ser observado na **Figura 23A**, os compostos eletroativos comumente encontrados em amostras de urina (como os ácidos ascórbico e úrico) apresentaram atividade eletroquímica em potenciais superiores a +1,0 V. Porém, diferentemente do comportamento eletroquímico do PAR, esses compostos apresentaram valores de pico de corrente crescentes em potenciais mais elevados (sem platô na região de potencial onde a CAF é eletroativa) quando H_2SO_4 $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ foi usado como eletrólito de suporte. Este resultado mostrou claramente que, nesta condição, a determinação seletiva de CAF não é possível utilizando o protocolo proposto, pois as correntes detectadas para as espécies interferentes na amostra de urina sintética não são as mesmas de +1,40 V e a +1,55 V.

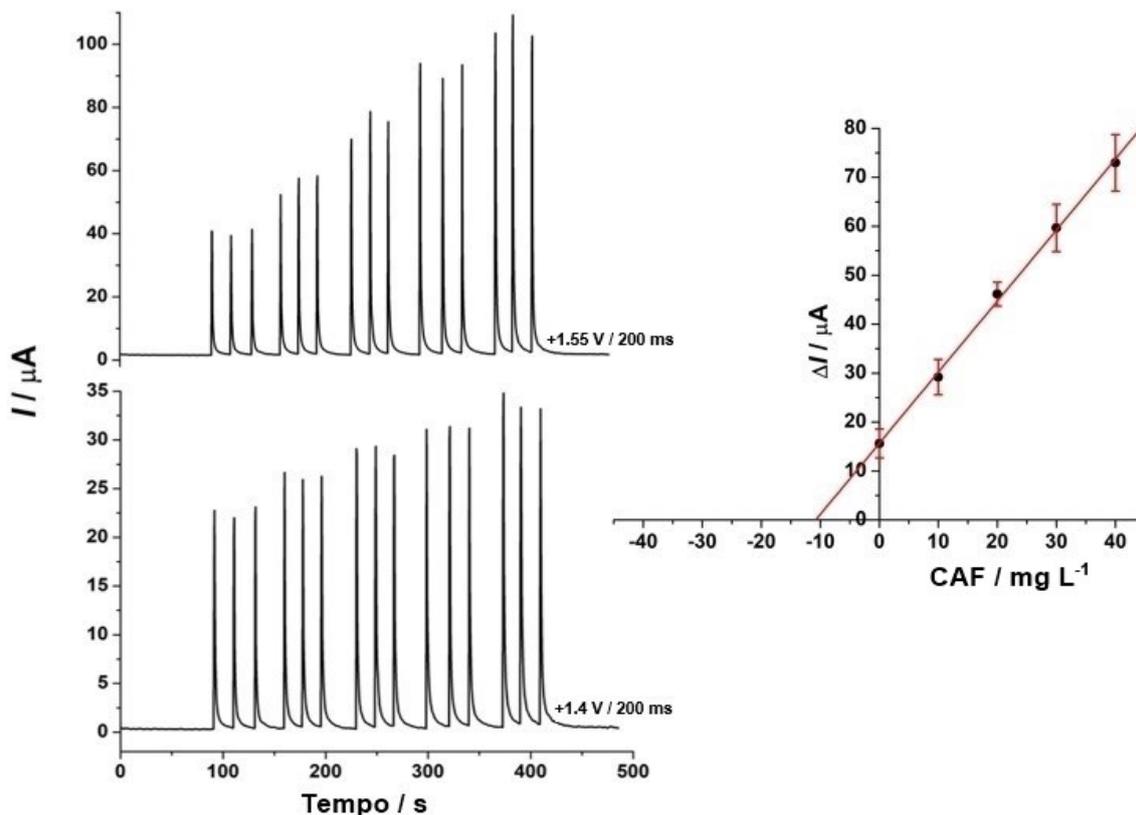
Figura 23. Voltamogramas hidrodinâmicos obtidos para a injeção de uma solução contendo 10 mg L^{-1} de CAF (■) e soluções de amostra de urina sintética diluídas (10% v / v) (●) em eletrólito suporte no sistema BIA-MPA. Pulso de potenciais aplicados: +1,0; +1,1; +1,2; +1,3; +1,4; +1,5; +1,6; +1,7 e +1,8 V. Eletrólito de suporte: $0,1 \text{ mol L}^{-1} \text{ H}_2\text{SO}_4$ (A) e $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ tampão acetato pH 4,7 (B). Condições amperométricas de acordo com a Tabela 3.



Para contornar a limitação descrita, estudos foram realizados para encontrar outro eletrólito de suporte onde o comportamento eletroquímico dos interferentes fosse similar ao PAR em meio de H_2SO_4 $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ e a análise fosse possível. A Figura 23B mostra o voltamograma hidrodinâmico obtido no sistema BIA com a injeção de amostras de urina diluídas (10% v / v) em tampão acetato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ com pH 4,7 (eletrólito de suporte). Como pode ser visto, Fig. 23B, a corrente detectada para a urina sintética aumenta em potenciais entre +1,0 e +1,2 V e permanece relativamente constante em potenciais maiores que +1,2 V. Além disso, resultados semelhantes foram obtidos para CAF em ambos os eletrólitos de suporte.

A Figura 24 mostra os amperogramas obtidos por BIA-MPA para a injeção de uma amostra de urina sintética diluída 10 vezes ($37,2$ e $7,0 \text{ mg L}^{-1}$ de ácidos ascórbico e úrico, respectivamente) em tampão de acetato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ com pH 4,7 e enriquecido com CAF (10 mg L^{-1}). A concentração de CAF foi selecionada considerando que 5% da dose de CAF ingerida é excretada inalterada na urina e que a concentração presente nas principais fontes alimentares varia de 80 a 1200 mg L^{-1} , sem considerar a presença dos metabólitos da CAF no organismo humano [135].

Figura 24. Amperogramas e a curva de calibração ($r = 0,999$) para soluções de amostras de urina sintética diluídas (10% v / v) em eletrólito de suporte enriquecido com CAF (10 mg L⁻¹) usando BIA-MPA. Eletrólito de suporte: tampão de acetato 0,1 mol L⁻¹ pH 4,7. Condições amperométricas de acordo com a **Tabela 3**.



A respectiva curva de calibração usando o método de adição padrão também é mostrada na **Fig. 24**. Como a técnica MPA não está comumente disponível em softwares de potenciostatos comerciais, esta análise também foi realizada usando BIA com detecção aplicando os dois potenciais seguidos usando cronoamperometria (CA), no entanto, neste caso, todas as soluções foram injetadas duas vezes, **Figura 25**. Os valores de recuperação obtidos por ambos os procedimentos são exibidos na **Tabela 6**.

Figura 25. Amperogramas e a curva de calibração ($r = 0,998$) para soluções de amostra de urina sintética diluídas (10% v / v) em eletrólito de suporte enriquecido com CAF (10 mg L⁻¹) usando BIA-CA. Eletrólito de suporte: tampão de acetato 0,1 mol L⁻¹ pH 4,7. Condições amperométricas de acordo com a **Tabela 3**. Eu acho melhor deletar o tempo junto dos potenciais. Isso só é útil para confundir (+1,40 V)

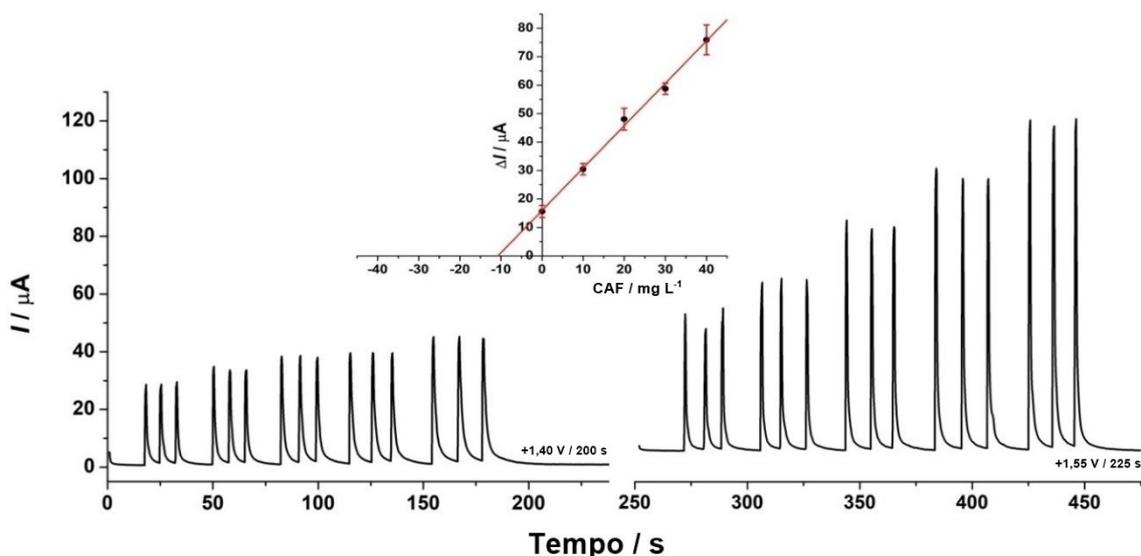


Tabela 6. Resultados obtidos em estudos de recuperação em amostras de urina sintética enriquecidas com CAF por BIA-MPA e BIA com detecção por cronoamperometria (n = 3). $\Delta I = I_{+1,55V} - I_{+1,40V}$.

Técnica	A partir do ΔI			A partir do $I_{+1,55V}$	
	[CAF] adicionada (mg L ⁻¹)	[CAF] encontrada (mg L ⁻¹)	Recuperação (%) ΔI	[CAF] encontrada (mg L ⁻¹)	Recuperação (%)
BIA - MPA	10	10,8 ± 1,0	108	24,0 ± 2,0	240
BIA - CA	10	10,9 ± 1,0	109	24,6 ± 1,5	246

MPA: Amperometria de Múltiplos Pulsos; CA: Cronoamperometria

Os resultados apresentados na **Tabela 6** indicam que a troca do eletrólito de suporte (H₂SO₄ para tampão acetato) melhorou consideravelmente os valores de recuperação para CAF perto de 100%, em amostras de urina sintética com a presença de altos níveis de espécies interferentes eletroativas (ácidos ascórbico e úrico), indicando boa exatidão para o método [129-132]. Os estudos de adição e recuperação também foram realizados usando H₂SO₄ 0,1 mol L⁻¹ como eletrólito de suporte e valores de recuperação

elevados foram obtidos (> 120 %). A partir dos resultados obtidos é possível concluir que os estudos de otimização são importantes para a detecção do analito alvo, mas otimizações em relação às espécies interferentes também podem ser necessárias. Não foram encontradas diferenças significativas entre as duas técnicas amperométricas utilizadas (MPA e CA). No entanto, a determinação de CAF em urina sintética utilizando amperometria convencional ($E = +1,55V$) é inviável, pois as recuperações obtidas foram maiores do que 200% (**Tabela 6**).

4.3. Parte2: Determinação de COC em amostras de salivas humanas

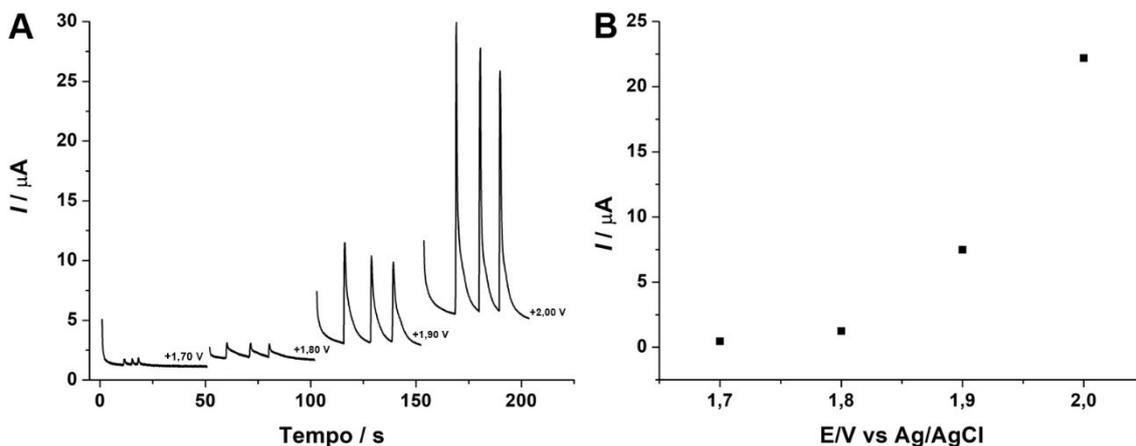
Nesta parte do trabalho a amperometria de múltiplos pulsos não foi utilizada, a partir daqui somente foi utilizada a amperometria constante (CA), disponível no Nova 2.1 como cronoamperometria.

4.3.1. Comportamento eletroquímico da COC

De acordo com a literatura, a solubilidade da COC diminui drasticamente com o aumento do pH, portanto, para se trabalhar com a COC usando técnicas eletroquímicas sem o uso de solventes orgânicos, o indicado é que se utilize eletrólitos em meio ácido [74]. Nestas condições, a COC é eletroquimicamente oxidada em potenciais maiores do que +1,8 V, logo, o uso do BDD como eletrodo de trabalho devido à sua ampla janela de potencial [4,74] é indicado. Deste modo, nos estudos iniciais, H_2SO_4 0,1 mol L⁻¹, BDD e BIA-CA foram selecionados como eletrólito suporte, eletrodo de trabalho e procedimento de análise, respectivamente, para a detecção de COC.

O comportamento eletroquímico da COC foi estudado usando a técnica BIA-CA com a aplicação de 4 potenciais seguidos (+1,7; +1,8; +1,9; +2,0 V) e com o registro de 4 amperogramas sequenciais no mesmo experimento, **Figura 26A**. Soluções contendo 5 mg L⁻¹ (16,5 μmol L⁻¹) de COC foram injetadas sequencialmente em triplicata e a partir dos valores de corrente detectados em cada pulso de potencial foi construído o voltamograma hidrodinâmico mostrado na **Figura 26B**.

Figura 26. Amperogramas obtidos por BIA com detecção amperométrica para injeção de COC 5 mg L⁻¹ (A) e seu respectivo voltamograma hidrodinâmico (B). Pulsos de potenciais aplicados: +1,7, +1,8, +1,9 e +2,0 V. Eletrólito de suporte: H₂SO₄ 0,1 mol L⁻¹. Demais condições: volume de injeção = 80 μL; velocidade de agitação = 1050 rpm; velocidade de injeção = 200 μL s⁻¹.



Pelo voltamograma hidrodinâmico apresentado na **Figura 26**, pode-se observar que a oxidação da COC ocorre a partir do potencial de +1,80 V e com correntes muito maiores em +1,90 V e +2,00 V. Com base nessas informações, os pulsos de potenciais de +1,80 V e 1,95 V foram selecionados para os estudos iniciais. Nesta condição, a proposta é que a corrente proveniente da oxidação seletiva de COC (I_{COC}) possa ser calculada usando a **equação 9**:

$$I_{COC} = I_{+1,95V} - I_{+1,80V} = \Delta I \quad (9)$$

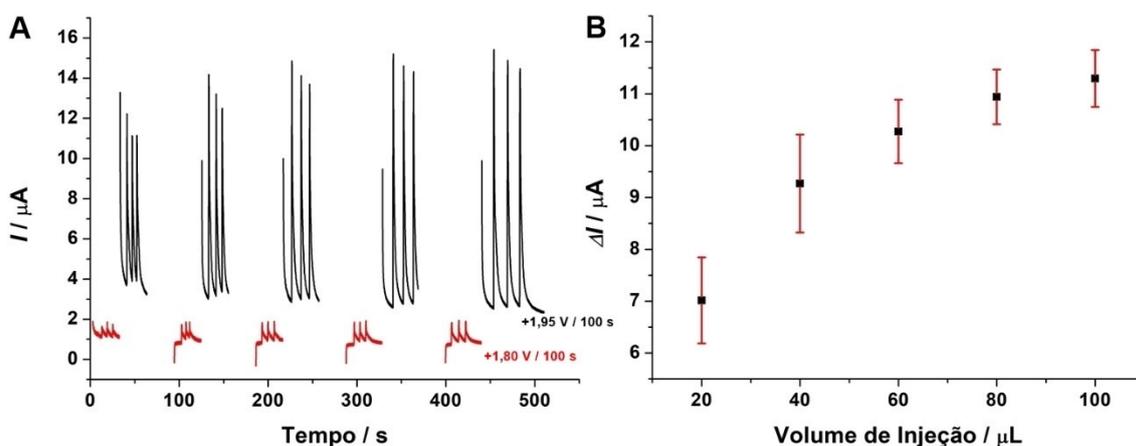
4.3.2. Estudos de otimização dos parâmetros do sistema BIA-CA

Os parâmetros experimentais que influenciam o desempenho da técnica BIA-CA (volume de injeção, velocidade de injeção, tempo de aplicação de cada pulso de potencial e velocidade de agitação) foram otimizados para melhorar a sensibilidade/estabilidade na detecção amperométrica de COC.

4.3.2.1. Volume de injeção

A otimização do volume de injeção foi realizada fixando uma velocidade de injeção de $200 \mu\text{L s}^{-1}$, tempo de aplicação de cada potencial em 100 s e velocidade de agitação de 1050 rpm. A escolha do volume de injeção foi realizada avaliando-se a intensidade de corrente de oxidação da COC e a repetibilidade em medidas sucessivas com um menor volume injetado possível. Os resultados obtidos são mostrados na **Figura 27**, em triplicata, para injeções de alíquotas contendo 5 mg L^{-1} de COC.

Figura 27. (A) Amperogramas obtidos para a variação da corrente de oxidação de 5 mg L^{-1} de COC em função do volume de injeção (20 a $100 \mu\text{L}$). (B) Relação entre a corrente de pico e a volume de injeção ($n = 3$). Condições amperométricas: velocidade de agitação = 1050 rpm; velocidade de injeção = $200 \mu\text{L s}^{-1}$.

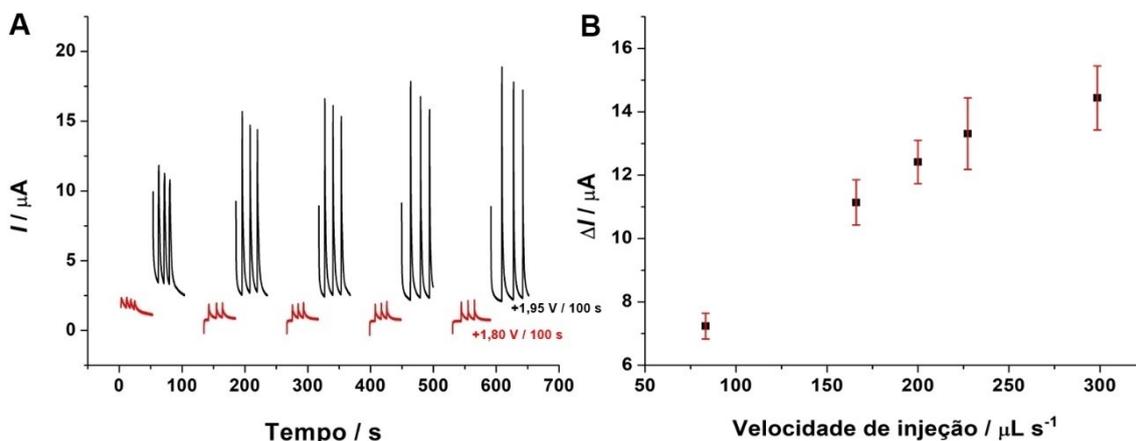


A partir dos resultados mostrados na **Figura 27** pode-se concluir que o maior sinal de corrente de oxidação da COC ($10 \mu\text{A}$), com menor valor de desvio padrão, aliado ao menor volume possível de solução injetada, corresponde ao volume de $60 \mu\text{L}$. Este volume foi utilizado nos estudos seguintes.

4.3.2.2. Velocidade de injeção

A **Figura 28** apresenta os amperogramas obtidos para injeções em triplicata de alíquotas de $60 \mu\text{L}$ de uma solução contendo 5 mg L^{-1} de COC em função da velocidade de injeção.

Figura 28. (A) Amperogramas obtidos para injeções de solução contendo 5 mg L^{-1} de COC em função da velocidade de injeção (83 a $299 \text{ } \mu\text{L s}^{-1}$). (B) Relação entre a corrente de pico e a velocidade de injeção ($n = 3$). Demais condições: velocidade de agitação = 1050 rpm ; volume de injeção = $60 \text{ } \mu\text{L}$.

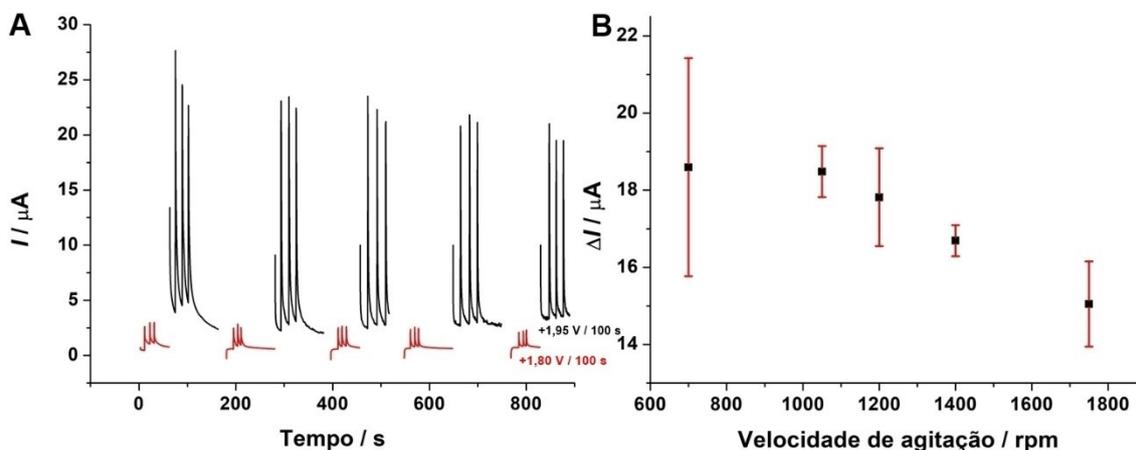


Como pode ser observado na **Figura 28**, o maior sinal de corrente de pico ($12,5 \mu\text{A}$) com o menor valor de desvio padrão ($n = 3$) foi obtida com a velocidade de injeção de $200 \text{ } \mu\text{L s}^{-1}$, portanto, essa foi a velocidade de injeção selecionada para os estudos subsequentes.

4.3.2.3. Velocidade de agitação

A otimização da velocidade de agitação utilizando o dispositivo produzido via tecnologia de impressão 3D foi realizada variando-se a velocidade de 200 a 1900 rpm . A escolha da velocidade ideal foi feita avaliando-se o ganho de corrente na oxidação da COC, o menor desvio padrão resultante das injeções em triplicatas e a minimização do ruído na linha base causado pela agitação da solução. A **Figura 29** apresenta os amperogramas (A) e a variação da corrente de pico de oxidação (B; $n = 3$) para injeções de solução contendo 5 mg L^{-1} de COC.

Figura 29. (A) Amperogramas obtidos para oxidação de 5 mg L^{-1} de COCem função da velocidade de agitação (700 a 1750 rpm). (B) Relação entre a corrente de pico e a velocidade de agitação ($n = 3$). Condições amperométricas: volume de injeção = $60 \mu\text{L}$ e velocidade de injeção = $200 \mu\text{L s}^{-1}$.



Através da **Figura 29** pode-se observar que a velocidade de agitação de 1050 rpm apresentou um resultado ligeiramente melhor. A corrente de pico é similar ao obtido em 700 rpm, mas o desvio padrão é menor para as injeções em triplicata. Os parâmetros otimizados para a detecção amperométrica de COC por BIA-CA são mostrados na **Tabela 7**.

Tabela 7. Faixas estudadas e parâmetros otimizados para detecção amperométrica de COC por BIA-CA.

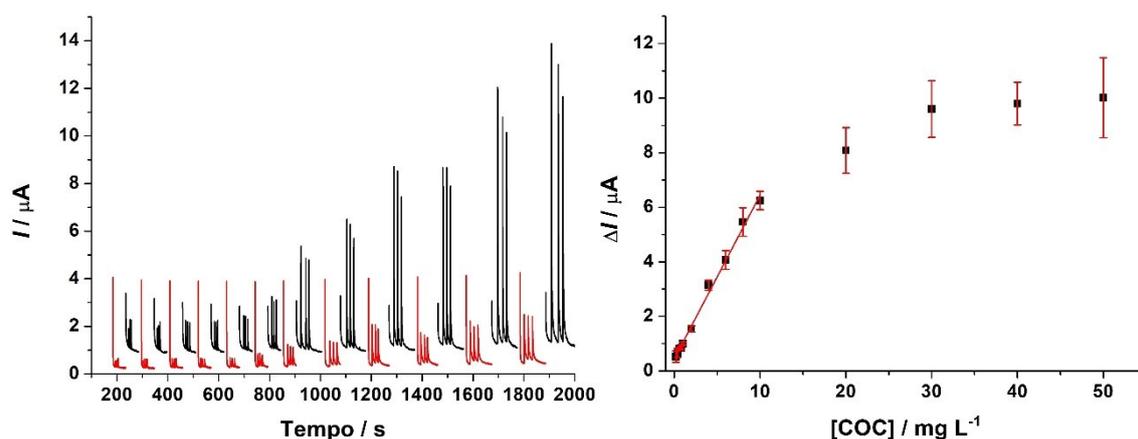
Parâmetros	Faixa de estudo	Valor otimizado
Velocidade de agitação (rpm)	700 – 1750	1050
Velocidade de injeção ($\mu\text{L s}^{-1}$)	83 – 299	200
Volume de injeção (μL)	20 – 100	60

*Potenciais avaliados: $+1,80 \text{ V}$ e $+1,95 \text{ V}$

4.3.3. Faixa Linear

A partir dos parâmetros otimizados para a detecção amperométrica de COC por BIA-CA mostrados na **Tabela 7** e das diferenças de correntes registradas entre os dois pulsos de potenciais selecionados (**equação 9**), a faixa linear foi identificada entre 0,2 e 10 mg L⁻¹ (0,6 a 33 μmol L⁻¹) de COC com um coeficiente de correlação igual a 0,996. Na **Figura 30** é possível observar os amperogramas (**A**) e a curva de calibração obtidos (**B**), respectivamente.

Figura 30. (A) Amperogramas adquiridos nos pulsos de potenciais de +1,80 e 1,95 V para injeções de soluções com concentrações crescentes de COC (0,2; 0,4; 0,6; 0,8; 1,0; 2,0; 4,0; 6,0; 8,0; 10; 20; 30; 40 e 50 mg L⁻¹). Condições amperométricas de acordo com a **Tabela 7**. (B) Curva adquirida para ΔI ($I_{+1,95V} - I_{+1,80V}$).



A **Tabela 8** mostra as características analíticas do método BIA-CA para determinação amperométrica de COC. Limites de detecção e quantificação foram calculados usando a definição da literatura ($3\sigma/s$ e $10\sigma/s$, respectivamente, em que σ corresponde ao desvio padrão do coeficiente linear e s ao coeficiente angular) [112-113].

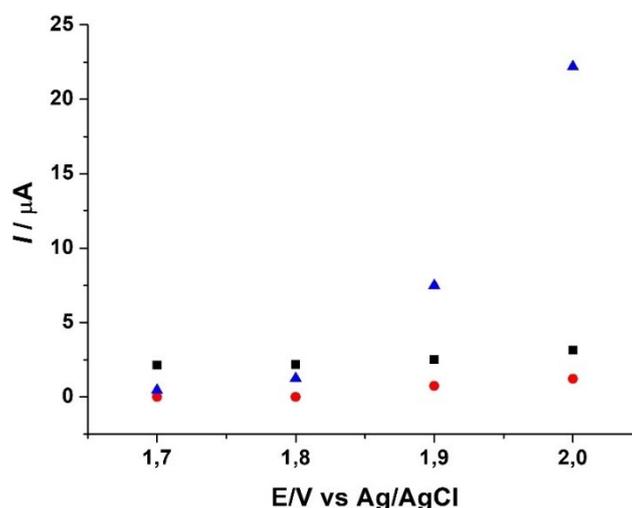
Tabela 8. Características analíticas do método BIA-MPA proposto para determinação amperométrica de CAF.

Parâmetros	Valores
Coefficiente angular ($\mu\text{A L mg}^{-1}$)	$0,8 \pm 0,02$
Coefficiente linear (μA)	$0,4 \pm 0,02$
r	0,996
Faixa Linear (mg L^{-1})	0,2 - 10,0
Nº de pontos (n)	10
LD (mg L^{-1})	0,08
LQ (mg L^{-1})	0,2

4.3.4. Avaliação da Seletividade

A **Figura 31** mostra os amperogramas adquiridos para os pulsos de potenciais +1,70, +1,80, +1,90 e + 2,00 V para a injeção de soluções de COC $15 \mu\text{mol L}^{-1}$ e soluções contendo os principais compostos orgânicos potenciais interferentes presentes na saliva humana: ácido úrico (AU) $30 \mu\text{mol L}^{-1}$ e ureia (URE) $80 \mu\text{mol L}^{-1}$ [88, 92]. A partir dos resultados observados na **Fig. 31** pode-se concluir que o ácido úrico e a ureia não são interferentes, pois possuem correntes de oxidação relativamente constantes nos potenciais entre +1,7 e +1,9 V.

Figura 31. Voltamogramas hidrodinâmicos obtidos por BIA com detecção amperométrica para injeção de COC 15 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (\blacktriangle), AU 30 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (\blacksquare) e URE 80 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (\bullet). Pulsos de potenciais aplicados: +1,7, +1,8, +1,9 e +2,0. Eletrólito de suporte: H_2SO_4 0,1 mol L^{-1} ; outras condições de acordo com a Tabela 7.



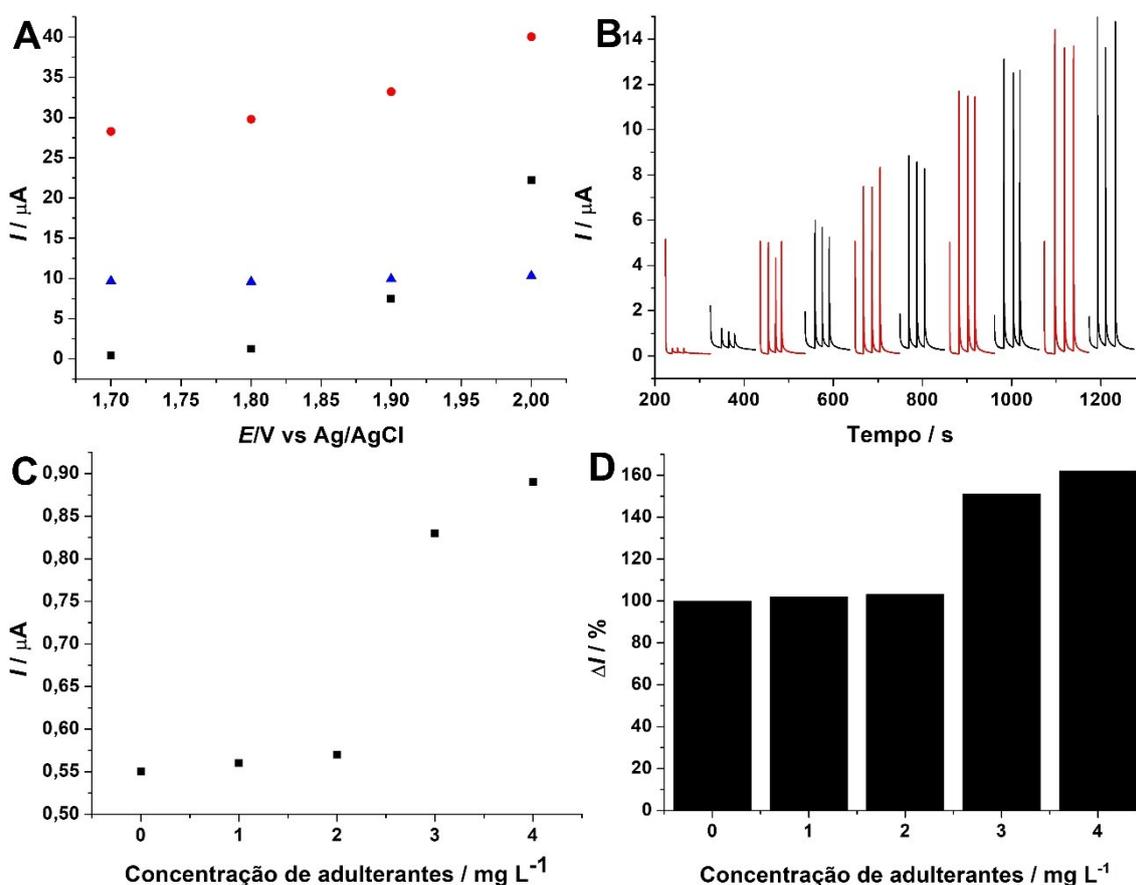
Também foi analisado a possível interferência de dois dos adulterantes de COC mais utilizados por criminosos, a fenacetina (FEN) e a CAF [136]. A **Figura 32A** mostra amperogramas hidrodinâmicos adquiridos para os pulsos de potenciais +1,70, +1,80, +1,90 e +2,00 V para a injeção de soluções de COC, CAF e FEN na concentração de 5 mg L^{-1} . A partir destes resultados podemos concluir que a CAF e FEN não são interferentes nestas condições, pois possuem correntes de oxidação relativamente constantes nos potenciais entre +1,7 e +1,9 V.

A **Figura 32B e 32C** mostram amperogramas e voltamogramas hidrodinâmicos adquiridos para os pulsos +1,95 V e +1,80 V para a injeção em triplicata de soluções com concentração fixa de COC (1 mg L^{-1}) sem e com a presença de concentrações crescentes de CAF e FEN (1,0; 2,0; 3,0 e 4,0 mg L^{-1}). Como pode ser observado, a corrente da oxidação de COC em 1,80 V é muito pequena em relação à detectada em +1,95 V, porém ao se adicionar CAF e FEN é possível observar um grande aumento da corrente em ambos os pulsos de potenciais.

Na **Fig. 32D**, a corrente detectada para 1 mg L^{-1} de COC ($0,55 \pm 0,1 \mu\text{A}$) foi considerada com sendo 100% e comparada com o ΔI ($I_{\text{COC}} = I_{+1,90\text{V}} - I_{+1,80\text{V}}$) obtido para soluções contendo concentrações crescentes de CAF e FEN. Como pode ser observado, a corrente detectada para COC foi relativamente constante ($\sim 0,55 \mu\text{A}$) nas concentrações

dos adulterantes iguais e duas vezes maiores (1 e 2 mg L⁻¹) do que a concentração de COC (RSD = 3,0%, n=3), o que também pode ser visto na **Fig. 32C** (valores de corrente). Porém, nas concentrações dos adulterantes de 3 e 4 mg L⁻¹, as correntes resultantes não foram constantes (0,85 e 0,90 μA), provavelmente porque as concentrações de FEN e CAF são muito altas a ponto de interferir na detecção de COC. Esses resultados são evidências de que a detecção seletiva de COC é possível em amostras reais, levando em consideração que a concentração desses adulterantes em amostras apreendidas geralmente são menores do que a concentração de COC [4, 99, 136].

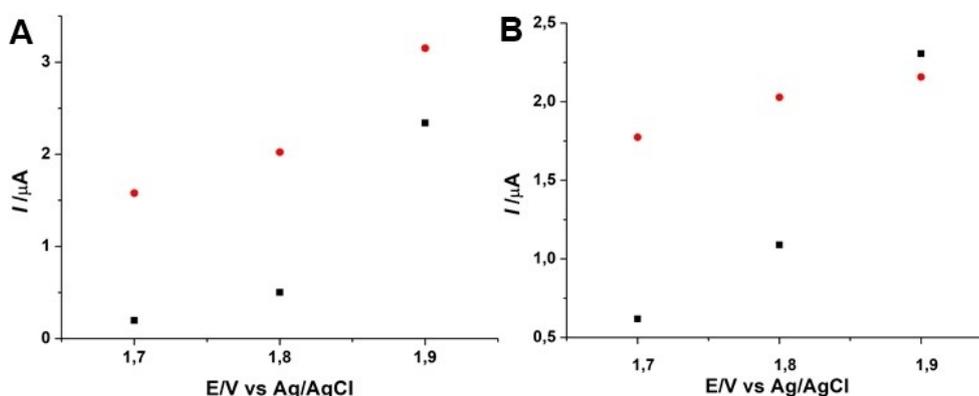
Figura 32. (A) Voltamogramas hidrodinâmicos obtidos por BIA com detecção amperométrica para injeção de COC (■) FEN (▲) e CAF (●), nas concentrações de 5 mg L⁻¹. Pulsos de potenciais aplicados: +1,7, +1,8, +1,9 e +2,0 V; (B) Amperogramas obtidos por BIA-MPA para injeção de soluções com concentração fixa de COC (1 mg L⁻¹) e concentrações crescentes de FEN e CAF (0,0; 1,0; 2,0; 3,0; e 4,0 mg L⁻¹); (C) Valores de corrente para oxidação de COC ($I_{COC} = I_{+1,90V} - I_{+1,80V}$); (D) Gráfico de barras de porcentagem da corrente para oxidação COC sem e com a presença de FEN e CAF; Eletrólito de suporte: H₂SO₄ 0,1 mol L⁻¹; outras condições de acordo com a Tabela 7.



4.3.5. Aplicação em saliva humana

Inicialmente, o comportamento eletroquímico de uma amostra de saliva humana foi estudado aplicando pulsos de +1,70, +1,80 e +1,90 V em uma solução de COC 3 mg L⁻¹ e em uma amostra de saliva diluída 500x, ambas preparadas em eletrólito H₂SO₄ 0,1 mol L⁻¹, **Fig. 33A**, e em tampão acetato com pH de 4,7, **Fig. 33B**.

Figura 33. Voltamogramas hidrodinâmicos obtidos por BIA-CA com detecção amperométrica para injeções de COC 3 mg L⁻¹ (■) e uma amostra de saliva diluída 500x (●) em eletrólito H₂SO₄ 0,1 mol L⁻¹ (A) e em tampão acetato com pH de 4,7 (B). Pulsos de potenciais aplicados: +1,7, +1,8 e +1,9 V; outras condições de acordo com a **Tabela 7**.



A partir dos voltamogramas hidrodinâmicos obtidos, **Figura 32**, é possível observar que em eletrólito H₂SO₄ 0,1 mol L⁻¹, a determinação seletiva de COC em saliva não será possível, pois a corrente de pico assume valores crescentes para uma solução de saliva com o aumento dos valores de potencial. No entanto, em meio de tampão acetato, a corrente de oxidação dos componentes eletroativos presentes na saliva é relativamente constante a partir de 1,8V, o que pode tornar a detecção seletiva de COC possível. Em função da mudança no eletrólito suporte, os pulsos de potenciais escolhidos na utilização da **equação 9** foram alterados para +1,80 e +1,90V.

Em seguida, o método BIA-CA proposto para a determinação de COC foi aplicado em 4 amostras de saliva humana fortificadas com 1,0 mg L⁻¹ de COC usando método de adição de padrão. Os amperogramas e curvas de calibração obtidos podem ser observados na **Figura 34** e os respectivos resultados obtidos no estudo de recuperação na **Tabela 9**. Para evitar/amenizar a contaminação da superfície do eletrodo de BDD, um pulso de potencial adicional (0,0 V por 5 segundos) foi aplicado entre os dois pulsos de potenciais,

ou seja, a seguinte ordem de pulsos de potenciais foi aplicada: 0,0 V/5 s; +1,80 V/80 s e +1,90 V/80 s.

Figura 34. Amperogramas e curvas de calibração obtidas para as 04 amostras de saliva fortificadas com $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ de COC: 1 (A), 2 (B), 3 (C) e 4 (D). Condições experimentais: conforme Tabela 7.

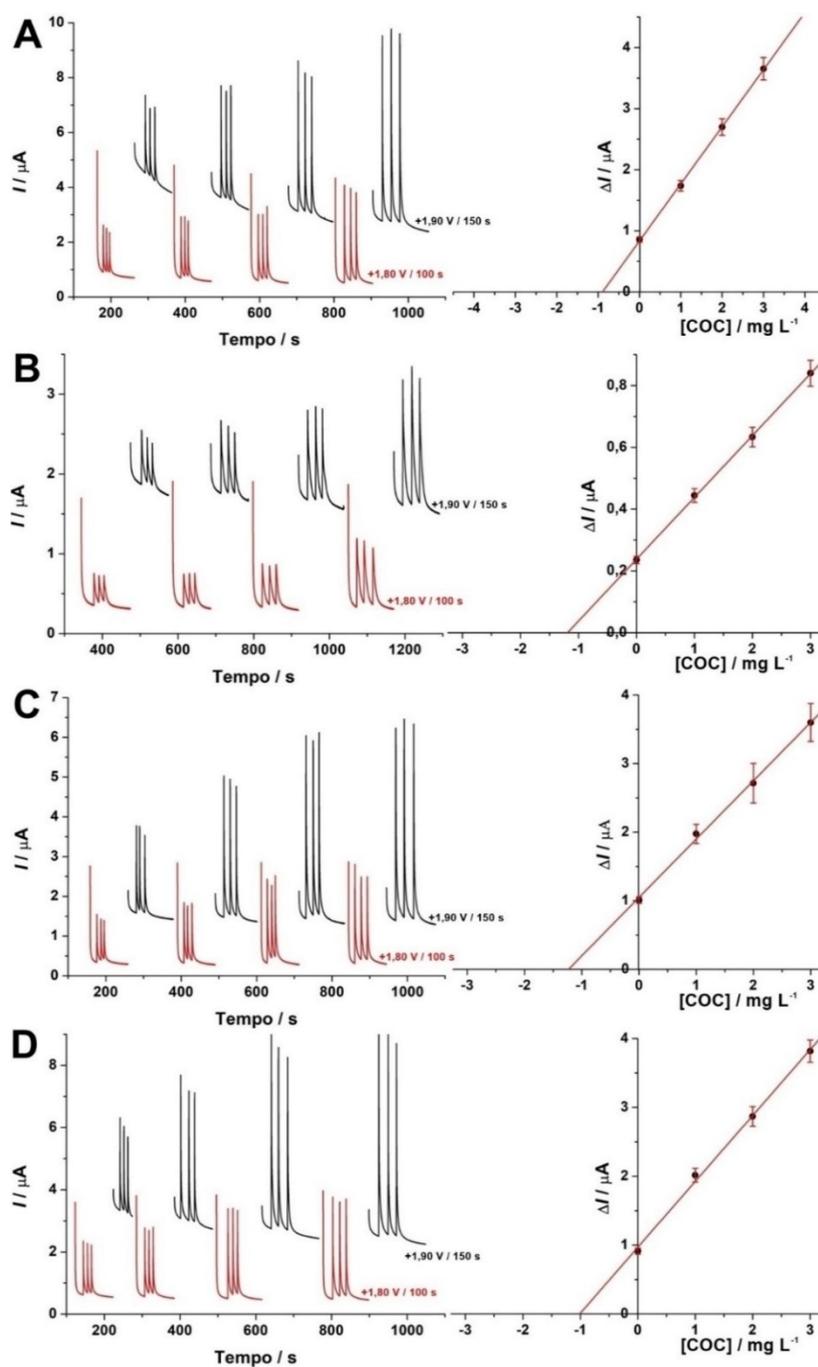


Tabela 9. Resultados obtidos em estudos de adição e recuperação em amostras de saliva humana enriquecidas com COC por BIA-CA (n = 3). $\Delta I = I_{+1,90V} - I_{+1,80V}$.

Amostras	A partir do ΔI			A partir do $I_{+1,90V}$	
	[COC] adicionada (mg L ⁻¹)	[COC] encontrada (mg L ⁻¹)	Recuperação (%)	[COC] encontrada (mg L ⁻¹)	Recuperação (%)
1	1,0	0,9 ± 0,1	90	1,3 ± 0,2	130
2	1,0	1,2 ± 0,1	120	2,0 ± 0,1	200
3	1,0	1,2 ± 0,1	120	2,1 ± 0,2	210
4	1,0	1,1 ± 0,2	110	1,6 ± 0,2	125

Os resultados de recuperação, **Tabela 9**, variaram de 90 a 120%. Portanto, a determinação de COC em amostras de saliva é possível pelo método proposto ($I_{+1,90V} - I_{+1,80V}$) sem preparo de amostras que visam a separação das proteínas naturalmente presentes em saliva humana (apenas diluição). Entretanto, a necessidade de diluição das amostras de saliva em 500 vezes para a obtenção de bons resultados não é animadora. Estudos com o intuito de uso de diluições menores são necessários (tratamento de amostra mais trabalhoso). Quando somente a corrente detectada no potencial maior ($I_{+1,90V}$) foi utilizada nos cálculos, as recuperações ultrapassaram 120%, portanto, utilizando somente um potencial (amperometria convencional) não é possível realizar a determinação de COC em saliva nestas condições.

Na literatura [119] é reportado que um usuário após usar aproximadamente 40 mg de COC elimina na saliva, em menos de 30 minutos, cerca de 0,1 a 1 mg L⁻¹ de COC não metabolizada, sendo que estes valores variam de acordo com o metabolismo do indivíduo e a forma de consumo da droga (intravenosa, fumável ou intranasal). Levando em consideração estas informações e os valores de LQ e LD (0,4 e 0,1 mg L⁻¹) obtidos através do método proposto (BIA-CA), a determinação de COC em saliva somente seria possível após menor diluição das amostras. Portanto, o uso de algum tipo de pré-tratamento de amostra para reduzir ou eliminar os interferentes presentes é necessário.

5. Conclusão

Neste trabalho, um método amperométrico simples, de baixo custo e com potencial para uso em métodos portáteis foi descrito para a determinação seletiva de CAF em diferentes amostras (fármacos, suplementos, refrigerantes, energéticos e urina sintética) e de COC em saliva humana.

Nos estudos referentes à determinação de CAF em diferentes amostras o protocolo proposto demonstrou um LD de $0,05 \text{ mg L}^{-1}$ ($0,26 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$) e os resultados obtidos foram estatisticamente semelhantes (nível de confiança de 95%) aos obtidos por eletroforese capilar. Valores de recuperação próximos a 100% foram obtidos em amostras de urina sintética (108 e 109%).

Na determinação de COC em saliva humana o LD obtido foi de $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ ($0,33 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$) e a recuperação obtida variou de 90 a 120%. Foi demonstrado que o método permite a detecção de cocaína mesmo com grande quantidade de dois de seus principais adulterantes eletroativos, CAF e FEN. Porém, a determinação de COC em saliva por este método somente é possível a partir de um fator de diluição muito grande da amostra, impedindo que o método seja aplicado na realidade, uma vez que a quantidade de COC presente na saliva de um usuário é muito pequena.

Durante o desenvolvimento do método proposto foi demonstrada a importância da realização de estudos prévios com o intuito de se encontrar a condição ideal para a determinação dos analitos. O estudo do comportamento eletroquímico da amostra e do analito, durante a aplicação de diversos valores de potencial e em diferentes eletrólitos, demonstraram ser de extrema importância.

O método apresentou boa frequência analítica ao permitir de 70 a 200 injeções h^{-1} , boa reprodutibilidade e repetibilidade, além de possuir etapas de preparação de amostra simples (dissolução e / ou diluição) que demandam baixo consumo de produtos químicos e reagentes. Portanto, a estratégia aqui proposta tem grande potencial para ser usada para um grande número de analitos em amostras diferentes e auxiliar nas análises de laboratórios farmacêuticos, investigações forenses e exames antidoping de competições esportivas.

6. Perspectivas

Destaca-se como perspectivas deste trabalho:

- Estudos para preparo de amostra com intuito de retirar, em parte ou por completo, possíveis interferentes, visando a quantificação de drogas ilícitas em amostras biológicas para aplicação de teste simples, de baixo custo e portáteis de análise;
- Aprofundar estudos utilizando a amperometria, junto ao sistema BIA para a determinação de cocaína na presença de mais adulterantes;
- Estudos para aplicação do método utilizando eletrodos impressos por impressão 3D FDM como eletrodo de trabalho, permitindo a utilização de eletrodos com custo menor e descartáveis;
- Adaptação do método para análises utilizando volumes pequenos da amostra (análises em gota) visando a redução da quantidade utilizada de amostras e reagentes químicos, diminuindo também o tempo de análise.

7. Referências

- [1] SKOOG, D. A.; HOLLER, F. J.; CROUCH, S. R. Principles of instrumental analysis. 7^a ed. Boston: Cengage Learning, 2017.
- [2] ALI, M. A. *et. al.* Perspective – Electrochemical sensors for soil quality assessment. Journal of The Electrochemical Society, v. 167 037550, 2020. DOI: <https://dx.doi.org/10.1149/1945-7111/ab69fe>
- [3] HURI, M. A. M. *et. al.* A review of explosive residue detection from forensic chemistry perspective. Malaysian Journal of Analytical Sciences, v. 12, n. 2, p. 267-282, 2017. DOI: <https://doi.org/10.17576/mjas-2017-2102-01>
- [4] FREITAS, J. M. *et. al.* A portable electrochemical method for cocaine quantification and rapid screening of common adulterants in seized samples. Sensors and Actuators B: Chemical, v. 243, p. 557-565, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.snb.2016.12.024>

- [5] HU, W. *et al.* Metals Analysis of Agricultural Soils via Portable X-ray Fluorescence Spectrometry. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, v. 92, p. 420-426, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00128-014-1236-3>
- [6] MONK, P. M. S. *Analytical Techniques in the Sciences (AnTS) - Fundamental of electroanalytical chemistry*. Chichester, 1^a ed. West Sussex: John Wiley & Sons, 2001.
- [7] BRETT, M. O; BRETT, C. M. A.; *Electroquímica: princípios, métodos e aplicações*. 1^a ed. Coimbra: Almedina Coimbra, 1996.
- [8] SCHOLZ, F. *Electroanalytical Methods - Guide to Experiments and Applications*. 2^a ed. London: Springer, 2010.
- [9] WANG, J. *Analytical electrochemistry*. 2^a ed. New Jersey: John Wiley & Sons, 2006.
- [10] BARD, A. J.; INZELT, G.; SCHOLZ, F.; *Electrochemical Dictionary*. Leipzig, Springer Berlin Heidelberg, 2012.
- [11] WELTIN, A.; KIENINGER, J.; URBAN, G. A. Microfabricated, amperometric, enzyme-based biosensors for in vivo applications. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, v. 408, p. 4503-4521, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00216-016-9420-4>
- [12] TANG, Z.; MA, Z.; Multiple functional strategies for amplifying sensitivity of amperometric immunoassay for tumor markers: A review. *Biosensors and Bioelectronics*, v. 98, p. 100-112, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bios.2017.06.041>
- [13] MATTHEWS, C. J.; ANDREWS, E. S. V.; PATRICK, W. M.; Enzyme-based amperometric biosensors for malic acid – A review. *Analytica Chimica Acta*, v. 1156, 338218, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.aca.2021.338218>
- [14] WANG, J. Y. *et al.* Using poly (3-aminophenylboronic acid) thin film with binding-induced ion flux blocking for amperometric detection of hemoglobin A1c. *Biosensors and Bioelectronics*, v. 63 p. 317-324, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bios.2014.07.058>
- [15] PHILLIPS, K. S.; HAN, J. H.; CHENG, Q. Development of a “Membrane Cloaking” Method for Amperometric Enzyme Immunoassay and Surface Plasmon Resonance Analysis of Proteins in Serum Samples. *Analytical Chemistry*, v. 79, p. 899-907, 2007. DOI: <https://doi.org/10.1021/ac0612426>

- [16] MATOS-PERALTA, Y.; ANTUCH, M. Review – Prussian Blue and Its Analogs as Appealing Materials for Electrochemical Sensing and Biosensing. *Journal of the Electrochemical Society*, v. 167, 037510, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1149/2.0102003JES>
- [17] CHEN, X. et al. Advances in enzyme-free electrochemical sensors for hydrogen peroxide, glucose, and uric acid. *Microchimica Acta*, v. 181, p. 689-705, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00604-013-1098-0>
- [18] WALCARIUS, A.; MINTEER, S. D.; WANG, J.; et al. Nanomaterials for bio-functionalized electrodes: recent trends. *Journal of Materials Chemistry B*, v. 1, p. 4878-4908, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1039/C3TB20881H>
- [19] WANG, J. Selectivity coefficients for amperometric sensors. *Talanta*, v. 41 p. 857-863, 1994. DOI: [https://doi.org/10.1016/0039-9140\(94\)E0079-7](https://doi.org/10.1016/0039-9140(94)E0079-7)
- [20] TROJANOWICZ, M. Recent developments in electrochemical flow detections – a review part II. Liquid chromatography. *Analytica Chimica Acta*, v. 688, p. 8-35, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.aca.2009.08.040>
- [21] TROJANOWICZ, M. Recent developments in electrochemical flow detections – a review part I. Liquid chromatography. *Analytica Chimica Acta*, v. 653, p. 36-58, 2009. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.aca.2009.08.040>
- [22] FEDOROWSKI, J.; LACOURSE, W. R. A review of pulsed electrochemical detection following liquid chromatography and capillary electrophoresis. *Analytica Chimica Acta*, v. 851, p. 1-11, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.aca.2014.08.035>
- [23] FELIX, F. S.; ANGNES, L. Fast and Accurate Analysis of Drugs Using Amperometry Associated With Flow Injection Analysis. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 99, n. 12, p. 4784 - 4804, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1002/jps.22192>

- [24] ISLAM, M. A. *et al.* Prospects of pulsed amperometric detection in flow-based analytical systems – A review. *Analytica Chimica Acta*, 1052, p. 10-26, 2019. DOI: <http://doi.org/10.1016/j.aca.2018.10.066>
- [25] MACCÀ, C. *et al.* Experimental procedures for the determination of amperometric selectivity coefficients. *Analytica Chimica Acta*, v. 303, p. 265-274, 1995. DOI: [http://doi.org/10.1016/0003-2670\(94\)00511-J](http://doi.org/10.1016/0003-2670(94)00511-J)
- [26] JENSEN, G. C.; WANG, J. Amperometric nitric oxide sensors with enhanced selectivity over carbon monoxide via platinum oxide formation under alkaline conditions. *Analytical Chemistry*, v. 85, p. 10057-10061, 2013. DOI: <http://dx.doi.org/10.1021/ac402633t>
- [27] BINDRA, D. S. Pulsed amperometric detection of glucose in biological fluids at a surface-modified gold electrode. *Analytical Chemistry*, v. 61, p. 2566-2570, 1989. DOI: <https://doi.org/10.1021/ac00197a022>
- [28] LU, W.; WALLACE, G. G. Conducting Polymer sensors for the amperometric detection of proteins in a flow system – The use of sulfonated dye counterions to induce selectivity. *Electroanalysis*, v. 9, n. 6, p. 454 – 460, 1997. DOI: <http://doi.org/10.1002/elan.1140090605>
- [29] SANTOS, W. T. P. DOS *et al.* Análise por injeção em fluxo com detecção amperométrica de múltiplos pulsos: potencialidades e aplicações. *Química Nova*, v. 34, n. 10, p. 1753–1761, 2011. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422011001000008>
- [30] SANTOS, W. T. P. *et al.* Simultaneous flow injection analysis of paracetamol and ascorbic acid with multiple pulse amperometric detection. *Electroanalysis*, v. 20, n. 17, p. 1878 – 1883, 2008. DOI: <https://doi.org/10.1002/elan.200804262>
- [31] SILVA, W. C. *et al.* A Simple Strategy for Simultaneous Determination of Paracetamol and Caffeine Using Flow Injection Analysis with Multiple Pulse Amperometric Detection. *Electroanalysis*, v. 23, n. 12, p. 2764-2770, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1002/elan.201100512>
- [32] GIMENES, D. T. *et al.* Two new electrochemical methods for fast and simultaneous determination of codeine and diclofenac. *Talanta*, v. 116, p. 1026 – 1032, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2013.08.020>

- [33] PEREIRA, P. F. *et al.* Fast and simultaneous determination of nimesulide and paracetamol by batch injection analysis with amperometric detection on bare boron-doped diamond electrode. *Diamond and Related Materials*, v. 39, p. 41–46, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.diamond.2013.07.010>
- [34] STEFANO, J. S. *et al.* Flow-Injection Analysis with Multiple-Pulse Amperometry for Simultaneous Determination of Paracetamol nad Naproxen Using a Homemade Flow Cell for Screen-Printed Electrodes. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, v. 25, n. 3, p. 484-491, 2014. DOI: <http://dx.doi.org/10.5935/0103-5053.20140006>
- [35] FREITAS, J. M. *et al.* Development of a simple and fast electrochemical method for screening and stoichiometric determination of dimenhydrinate. *Electroanalysis*, v. 26, p. 1905 - 1911, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1002/elan.201400300>
- [36] GIMENES, D. T. *et al.* Determination of propranolol and hydrochlorothiazide by batch injection analysis with amperometric detection and capillary electrophoresis with capacitively coupled contactless conductivity detection. *Analytical methods*, v. 6, p. 3261-3267, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1039/c4ay00272e>
- [37] CHAVES, S. C. *et al.* Simultaneous determination of caffeine, ibuprofen, and paracetamol by flow-injection analysis with multiple-pulse amperometric detection on boron-doped Diamond electrode. *Electroanalysis*, v. 27, n.12, p. 2785 – 2791, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1002/elan.201500306>
- [38] GIMENES, D. T. *et al.* Simultaneous determination of captopril and hydrochlorothiazide on boron-doped diamond electrode by batch injection analysis with multiple pulse amperometric detection. *Sensors and Actuators B: Chemical*, v. 212, p. 411 - 418, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.snb.2015.01.132>
- [39] PEREIRA, P. F. *et al.* A simple and fast batch injection analysis method for simultaneous determination of phenazopyridine, sulfamethoxazole, and trimethoprim on boron-doped Diamond electrode. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, v. 766, p. 87-93, 2016. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jelechem.2016.01.034>

- [40] FREITAS, J. M. *et al.* Simultaneous determination of three species with a single injection step using batch injection analysis with multiple pulse amperometric detection. *Talanta*, v. 146, p. 670-675, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2015.06.048>
- [41] OLIVEIRA, T. D. C. *et al.* A batch injection analysis system with square-wave voltammetric detection for fast and simultaneous determination of naphazoline and zinc. *Talanta*, v. 152, p. 308–313, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2016.02.031>
- [42] SILVA, W. P. *et al.* Determinação rápida e simultânea de propifenazona, paracetamol e cafeína utilizando análise por injeção em batelada com detecção amperométrica. *Química Nova*, v. 40, n. 10, p. 1180–1185, 2017. DOI: <https://doi.org/10.21577/0100-4042.20170131>
- [43] MEDEIROS, R. A. *et al.* Simple flow injection analysis system for simultaneous determination of phenolic antioxidants with multiple pulse amperometric detection at a boron-doped Diamond electrode. *Analytical Chemistry*, v. 82, n. 20, p. 8658-8663, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1021/ac101921f>
- [44] TORMIN, T. F. *et al.* Fast simultaneous determination of BHA and TBHQ antioxidants in biodiesel by batch injection analysis using pulsed-amperometric detection. *Talanta*, v. 99, p. 527-531, 2012. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.talanta.2012.06.024>
- [45] PEREIRA, L. N. S. *et al.* Fast quantification of α -lipoic acid in biological samples and dietary supplements using batch injection analysis with amperometric detection. *Talanta*, v. 154, p. 249 - 254, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2016.03.046>
- [46] LIMA, A. B. *et al.* Selective Determination of Verapamil in Pharmaceuticals and Urine Using a Boron-Doped Diamond Electrode Coupled to Flow Injection Analysis with Multiple-Pulse Amperometric Detection. *Electroanalysis*, v. 30, p. 1-7, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1002/elan.201800206>
- [47] GUEDES, T. J.; SANTOS, W. T. P. Fast and Simple Electrochemical Analysis Kit for Quality Control of Narrow Therapeutic Index Drugs. *Electroanalysis*, v. 30, p. 1-11, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1002/elan.201800108>

- [48] LIMA, A. B. *et al.* Altered electrochemistry of oxcarbazepine on cathodically treated boron-doped diamond electrode: Selective detection by pulsed amperometric detection coupled to flow-injection analysis. *Electrochimica Acta*, v. 260, p. 564-570, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.electacta.2017.12.089>
- [49] ALECRIM, M. F. *et al.* Electrochemical behavior of the cotinine at a boron-doped Diamond electrode and its determination in saliva by multiple-pulse amperometry in an FIA system. *Electrochimica Acta*, v. 222, p. 331-337, 2016. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.electacta.2016.10.177>
- [50] GUEDES, T. J. *et al.* Determination of prazosin in pharmaceutical samples by flow injection analysis with multiple-pulse amperometric detection using boron-doped diamond electrode. *Journal of Solid State Electrochemistry*, v. 20, p. 2445-2451, 2015. DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s10008-015-3105-3>
- [51] GIMENES, D. T. *et al.* Flow-Injection Amperometric Method for Indirect Determination of Dopamine in the Presence of a Large Excess of Ascorbic Acid. *Electroanalysis*, v. 22, n. 1, p. 74-78, 2010. DOI: <http://dx.doi.org/10.1002/elan.200900331>
- [52] MARCENAC, F.; GONON, F. Fast in vivo monitoring of dopamine release in the rat brain with differential pulse amperometry. *Analytical Chemistry*, v. 57, n. 8, p. 1778-1779, 1985. DOI: <https://doi.org/10.1021/ac00285a066>
- [53] ANTUNOVIC, V. *et al.* Development of a flow injection system for differential pulse amperometry and its application for Diazepam determination. *Journal of Analytical Methods in Chemistry*, p. 1-6, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1155/2018/6121489>
- [54] SURAREUNGCHAI, W.; DEEPUNYA, W.; TASAKORN, P. Quadruple-pulsed amperometric detection for simultaneous flow injection determination of glucose and fructose. *Analytica Chimica Acta*, v. 448, n. 1-2, p. 125-220, 2001. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0003-2670\(01\)01310-1](https://doi.org/10.1016/S0003-2670(01)01310-1)
- [55] JI, D. *et al.* Smartphone-based differential pulse amperometry system for real-time monitoring of levodopa with carbon nanotubes and gold nanoparticles modified screen-printing electrodes. *Biosens. Bioelectron.* 129 (2019) 216-223. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bios.2018.09.082>

- [56] LEE, J. D. Química Inorgânica não tão concisa, Tradução da 5ª ed. Inglesa; Henrique E. Toma, Koiti Araki, Reginaldo C. Rocha. São Paulo: Blucher, 1999.
- [57] ZOSKI, Cynthia G. (Ed.). Handbook of electrochemistry. Amsterdam: Elsevier, 2006.
- [58] COMPTON, R. G. *et al.* Electroanalysis at Diamond-Like and Doped-Diamond Electrodes. *Electroanalysis*, v. 15, n. 17, p. 1349-1363, 2003. DOI: <http://doi.org/10.1002/elan.200302830>
- [59] BARROS, R. D. C. M. DE *et al.* Filmes de diamante CVD dopado com boro. Parte I. Histórico, produção e caracterização. *Quimica Nova*, v. 28, n. 2, p. 317-325, 2005. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422005000200024>
- [60] PELSKOV, Y. V. *et al.* Photoelectrochemical properties of semiconductor diamond. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, v. 228, n. 1-2, p. 19-27, 1987. DOI: [https://doi.org/10.1016/0022-0728\(87\)80093-1](https://doi.org/10.1016/0022-0728(87)80093-1)
- [61] FUJISHIMA, A. *et al.* Diamond Electrochemistry. Tokyo: Elsevier, 2005. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11175-005-0211-z>
- [62] PYSAREVSKA, S. *et al.* A state-of-the-art approach for facile and reliable determination of benzocaine in pharmaceuticals and biological samples based on the use of miniaturized boron-doped diamond electrochemical sensor. *Sensors and Actuators B: Chemical*, v. 270, p. 9-17, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.snb.2018.05.012>
- [63] OLIVEIRA, T. DA C. *et al.* Development of a Novel Versatile Method for Determination of two Antihistamines in Association with Naphazoline Using Cathodically Pretreated Borondoped Diamond Electrode. *Electroanalysis*, v. 30, n. 5, p. 868-876, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1002/elan.201700658>
- [64] BALL, A. T.; PATEL, A. Electrochimica Acta Rapid voltammetric monitoring of melatonin in the presence of tablet excipients. *Electrochimica Acta*, v. 83, p. 196-201, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.electacta.2012.07.100>
- [65] ALPAR, N. *et al.* Voltammetric Method for the Simultaneous Determination of Melatonin and Pyridoxine in Dietary Supplements Using a Cathodically Pretreated Borondoped Diamond Electrode. *Electroanalysis*, v. 29, n. 7, p. 1691-1699, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1002/elan.201700077>

- [66] YIĞIT, A. I. *et al.* Electrochemical determination of pterostilbene at a cathodically pretreated boron-doped diamond electrode using square-wave adsorptive anodic stripping voltammetry in cationic surfactant media. *Sensors and Actuators, B: Chemical*, v. 231, p. 688–695, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.snb.2016.03.113>
- [67] ŠVORC, L.; KALCHER, K. Flow-injection amperometric determination of yohimbine alkaloid in dietary supplements using a boron-doped diamond electrode. *Sensors and Actuators B: Chemical*, v. 205, p. 215–218, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.snb.2014.08.071>
- [68] WONG, A.; SANTOS, A. M.; FATIBELLO-FILHO, O. Simultaneous determination of dopamine and cysteamine by flow injection with multiple pulse amperometric detection using a boron-doped diamond electrode. *Diamond and Related Materials*, v. 85, p. 68–73, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.diamond.2018.03.034>
- [69] FREITAS, J. M. *et al.* Boron Doped Diamond Electrodes in Flow-Based Systems. *Analytical Chemistry*, v. 7, p. 1-21, 2019. DOI: <https://doi.org/10.3389/fchem.2019.00190>
- [70] ASAI, K.; IVANDINI, T. A.; EINAGA, Y. Continuous and selective measurement of oxytocin and vasopressin using boron-doped diamond electrodes. *Scientific Reports*, v. 6, n. 1, p. 32429, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1038/srep32429>
- [71] MALDONADO, V. Y. *et al.* Analysis of Ag(I) Biocide in Water Samples Using Anodic Stripping Voltammetry with a Boron-Doped Diamond Disk Electrode. *Analytical Chemistry*, v. 90, n. 11, p. 6477–6485, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.7b04983>
- [72] DORNELLAS, R. M.; MUNOZ, R. A. A.; AUCELIO, R. Q. Electrochemical determination of picoxystrobin on boron-doped diamond electrode: Square-wave voltammetry versus BIA-multiple pulse amperometry. *Microchemical Journal*, v. 123, p. 1–8, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.microc.2015.05.010>
- [73] SILVA, R. A. B. DA *et al.* Batch injection analysis with amperometric detection: Application for simultaneous analysis using a single working electrode. *Analytical Methods*, v. 3, n. 12, p. 2804–2808, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1039/C1AY05395G>

- [74] WANG, J.; TAHA, Z. Batch injection analysis. *Analytical Chemistry*, v. 63, n. 10, p. 1053–1056, maio 1991. DOI: <http://doi.org/10.1021/ac00010a025>
- [75] BRETT, C. M. A.; BRETT, A. M. O.; MITOSERIU, L. C. Amperometric and Voltammetric Detection in Batch Injection Analysis. *Analytical Chemistry*, v. 66, n. 19, p. 3145–3150, out. 1994. DOI: <http://doi.org/10.1021/ac00091a024>
- [76] ROCHA, D. P. *et al.* Batch-Injection Analysis Better Than Ever: New Materials for Improved Electrochemical Detection and On Site Applications. *Electroanalysis*, v. 30, p. 1- 15, 2018. DOI: <http://doi.org/10.1002/elan.201800042>
- [77] BRETT, C. M. A.; BRETT, A. M. O.; MITOSERIU, L. C. Amperometric batch injection analysis: Theoretical aspects of current transients and comparison with wall-jet electrodes in continuous flow. *Electroanalysis*, v. 7, n. 3, p. 225–229, 1995. DOI: <https://doi.org/10.1002/elan.1140070305>
- [78] BRETT, C. M. A.; BRETT, A. M. O.; TUGULEA, L. Batch injection analysis with adsorptive stripping voltammetry for the determination of traces of nickel and cobalt. *Electroanalysis*, v. 8, n. 7, p. 639–642, 1996. DOI: <http://doi.org/10.1002/elan.1140080707>
- [79] BRETT, C. M. *et al.* Novel polymermodified electrodes for batch injection sensors and application to environmental analysis. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, v. 468, n. 1, p. 26–33, 1999. DOI: [http://doi.org/10.1016/S0022-0728\(99\)00061-3](http://doi.org/10.1016/S0022-0728(99)00061-3)
- [80] WANG, J. *et al.* Computerized pipettes with programmable dispensation. *Analytica Chimica Acta*, v. 267, n. 1, p. 171–177, 1992. DOI: [http://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/0003-2670\(92\)85020-7](http://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/0003-2670(92)85020-7)
- [81] QUINTINO, M. S. M.; ANGNES, L. Batch Injection Analysis: An Almost Unexplored Powerful Tool. *Electroanalysis*, v. 16, n. 7, p. 513–523, 2004. DOI: <http://doi.org/10.1002/elan.200302878>
- [82] VELOSO, W. B. *et al.* Flow-through amperometric determination of ampicillin using a copper electrode in a batch injection analysis system, *Measurement*, v. 155, 107516, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.measurement.2020.107516>

- [83] DA SILVA, R. A. B. Caracterizações e aplicações analíticas de eletrodos compósitos modificados com Azul da Prússia e determinações simultâneas em sistemas de análise por injeção em batelada empregando somente um eletrodo de trabalho. 2012. 142 p. Tese (Doutorado em Química). Instituto de Química, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, MG. Disponível em: <https://repositorio.ufu.br/handle/123456789/17508>
- [84] MARIA, C. A. B.; MOREIRA, R. F. A. Cafeína: Revisão sobre métodos de análise. Química Nova, v. 30, p. 99-105, 2007. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0100-40422007000100021>
- [85] SOUTHAN, C.; STRACZ, A. Extracting and connecting Chemical structures from text sources using chemicalize.org. Journal of Cheminformatics, v. 5, n. 20, p. 1-10, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1186/1758-2946-5-20>
- [86] ZACCA, J. J. *et al.* Brazilian Federal Police drug chemical profiling - the PeQui project. Science & justice: Journal of the Forensic Science Society, v. 54, n. 4, p. 300–6, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.scijus.2014.02.008>
- [87] LOURENÇÃO, B. C. *et al.* Simultaneous voltammetric determination of paracetamol and caffeine in pharmaceutical formulations using a boron-doped diamond electrode. Talanta, v. 78, n. 3, p. 748–752, 2009. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2008.12.040>
- [88] SPĂȚARU, N. *et al.* Anodic voltammetry of xanthine, theophylline, theobromine and caffeine at conductive diamond electrodes and its analytical application. Electroanalysis, v. 14, n. 11, p. 721–728, 2002. DOI: [https://doi.org/10.1002/15214109\(200206\)14:11<721::AIDELAN721>3.0.CO;2-1](https://doi.org/10.1002/15214109(200206)14:11<721::AIDELAN721>3.0.CO;2-1)
- [89] ŠVORC, L. *et al.* Voltammetric determination of caffeine in beverage samples on bare boron doped diamond electrode. Food Chemistry, v. 135, n. 3, p. 1198–1204, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.05.052>
- [90] ŠVORC, L. Determination of Caffeine: A Comprehensive review on electrochemical methods. International Journal of Electrochemical Science, v. 8, p. 5755 – 5773, 2013. Disponível em: <http://www.electrochemsci.org/papers/vol8/80405755.pdf>

- [91] DA SILVA, W. P. Determinação simultânea de propifenazona, paracetamol e cafeína. 2017. 98 p. Dissertação (Mestrado em Química). Instituto de Química, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2017. Disponível em: <https://repositorio.ufu.br/handle/123456789/18156>
- [92] AMEKU, W. A. Combined Colorimetric and Electrochemical Measurement Paper-Based Device for Chemometric Proof-of-Concept Analysis of Cocaine Sample. ACS Omega, v. 6, n. 1, p. 594-605, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1021/acsomega.0c05077>
- [93] UNODC. UNITED NATIONS OFFICE ON DRUGS AND CRIME. Coca Cultivation in the Andean Region: A Survey of Bolívia, Colombia and Peru, 2008. Disponível em: https://www.unodc.org/documents/crop-monitoring/Andean_report_2008.pdf
- [94] Universidade Federal de São Paulo, UNIFESP. Drogas: Um Debate científico. Revista EntreTeses. p. 36-40, 2016. Disponível em: https://www.unifesp.br/reitoria/dci/images/DCI/revistas/Entreteses/Entreteses_06_2016.pdf
- [95] TAPERT, S. F. *et al.* Adolescent substance use and sexual risk-taking behavior. Journal of Adolescent Health, v. 28, n. 3, p. 181-189, 2001. DOI: [https://doi.org/10.1016/S1054-139X\(00\)00169-5](https://doi.org/10.1016/S1054-139X(00)00169-5)
- [96] SUDO, J. T. C. Determinação de cocaína e seus adulterantes empregando Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas (GC-MS). 2020. 99 p. Dissertação (Mestrado em Química) - Instituto de Química, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, MG. Disponível em: <https://repositorio.ufu.br/handle/123456789/30760>
- [97] PASSAGLI, M. *et al.* Toxicologia Forense. 2ª ed. Belo Horizonte: Editora Millennium, 2009.
- [98] ASTURIAS-ARRIBAS, L. *et al.* Sensitive and selective cocaine electrochemical detection using disposable sensors. Analytica Chimica Acta, v. 834, p. 30-36, 2014. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.aca.2014.05.012>
- [99] FREITAS, J. M. Desenvolvimento de métodos eletroanalíticos simples, portáteis e de baixo custo para aplicações em análises forenses. 2019. 120 p. Tese (Doutorado em Química) - Instituto de Química, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, MG. Disponível em: <https://repositorio.ufu.br/handle/123456789/24571>

- [100] World Anti-Doping Agency, WADA. Código Mundial Antidoping Padrão Internacional, Lista Proibida, Comitê Olímpico do Brasil, 2020. Disponível em: https://www.wadaama.org/sites/default/files/resources/files/wada_2020_portuguese_prohibited_list.pdf
- [101] PRUDENCIANO, G. Entenda como serão feitos os testes antidoping na Olimpíada de Tóquio. CNN Brasil Esporte, 29 de jun. de 2021. Disponível em: <https://www.cnnbrasil.com.br/esporte/entenda-como-serao-feitos-os-testes-antidoping-na-olimpiada-de-toquio/>
- [102] KOLLIARI-TURNER, A. *et al.* Doping practices in international weightlifting: analysis of sanctioned athletes/support personnel from 2008 to 2019 and retesting of samples from the 2008 and 2012 Olympic Games. *Sports Medicine*, v. 7 n. 4, p. 1-10, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1186/s40798-020-00293-4>
- [103] CONE, E. J. *et al.* Simultaneous Measurement of Cocaine, Cocaethylene, Their Metabolites, and “Crack” Pyrolysis Products by Gas Chromatography – Mass Spectrometry. *Clinical Chemistry*, v. 40, n. 7, p. 1299-1305, 1994. DOI: <https://doi.org/10.1093/clinchem/40.7.1299>
- [104] SELAVKA, C. M. *et al.* The Forensic Determination of Drugs of Abuse Using Liquid Chromatography with Electrochemical Detection: A Review. *Journal of Liquid Chromatography*, v. 10, p. 345-375, 1987. DOI: <https://doi.org/10.1080/01483918708066723>
- [105] BOTELHO, É. D. *et al.* Chemical Profiling of Cocaine Seized by Brazilian Federal Police in 2009-2012: Major Components, v. 25, n. 4, p. 611-618, 2014. DOI: <https://doi.org/10.5935/2F0103-5053.20140008>
- [106] FIORENTIN, T. R. *et al.* Determination of cutting agents in seized cocaine samples using GC-MS, GC-TMS and LC-MS/MS, v. 295, p. 199-206, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2018.12.016>
- [107] MARRA, M. C. *et al.* Fast determination of cocaine and some common adulterants in seized cocaine samples by capillary electrophoresis with capacitively coupled contactless conductivity detection, v. 10, p. 2875-2880, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1039/C8AY00795K>
- [108] GROBÉRIO, T. S. *et al.* Discrimination and quantification of cocaine and adulterants in seized drug samples by infrared spectroscopy and PLSR. *Forensic Science International*, v. 257, p. 297-306, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2015.09.012>

- [109] BARRETO, D. N. *et al.* High-throughput screening of cocaine, adulterants, and diluents in seized samples using capilar electrophoresis with capacitively coupled contactless conductivity detection. *Talanta*, v. 217, 120987, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2020.120987>
- [110] ROCHA, W. W. F. *et al.* Quantification of cocaine and its adulterants by nuclear magnetic resonance spectroscopy without deuterated solvents (No-D qNMR). *Analytical Methods*, v. 10, p. 1685-1694, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1039/C7AY03000B>
- [111] ZANFROGNINI, B. *et al.* Recent advances in the direct electrochemical detection of drugs of abuse. *Journal of Solid-State Electrochemistry*, v. 24, n. 4, p. 1-14, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10008-020-04686-z>
- [112] ROCHA, R. G. *et al.* 3D-printing for forensic chemistry: voltammetric determination of cocaine on additively manufactured graphene-polylactic acid electrodes. *Analytical Methods*, v. 13, p. 1788-1794, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1039/D1AY00181g>
- [113] MOREIRA, J. S. Determinação de cocaína e lidocaína em saliva empregando preparo de amostra assistido por campo elétrico associado à cromatografia líquida-espectrometria de massa sequencial. 2018. 101 p. Dissertação (Mestrado em Química) - Departamento de Química, Instituto de Ciências Exatas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG. Disponível em: <https://repositorio.ufmg.br/handle/1843/SFSA-AY6SSF>
- [114] VINDENES, V. *et al.* Detection of drugs of abuse in simultaneously collected oral fluid, urine and blood from Norwegian drug drivers. *Forensic Science International*, v. 219, p. 165-171, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2012.01.001>
- [115] RODRIGUES, N. M. *et al.* Contaminação de Cocaína em Cédulas de Dinheiro em Belo Horizonte - MG. *Revista Virtual de Química*, v. 5, n. 2, p. 125-136, 2013. DOI: <https://10.5935/1984-6835.20130016>
- [116] CASTRO, S. V. F. *et al.* Graphite sheet as a novel material for the collection and electrochemical sensing of explosive residues. *Talanta*, v. 203, p. 106-111, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2019.05.048>
- [117] Bordin, D. C. M. *et al.* Técnicas de preparo de amostras biológicas com interesse forense. *Scientia Chromatographica*, n. 7, v. 2, p. 125–143, 2015. DOI: <https://dx.doi.org/10.4322/sc.2015.022>

- [118] PEREIRA, C. P. A importância médico-legal e criminalística da saliva: sistematização da sua aplicação nas ciências forenses. *Revista Portuguesa de Estomatologia, Medicina Dentária e Cirurgia Maxilofacial*, v. 55, n. 1, p. 3-6, 2014. DOI: <https://dx.doi.org/10.1016/j.rpemd.2014.01.002>
- [119] CONE, E. J. *et al.* Simultaneous Measurement of Cocaine, Cocaethylene, Their Metabolites, and “Crack” Pyrolysis Products by Gas Chromatography-Mass Spectrometry. *Drug Monitoring and Toxicology*, v. 40, n. 7, p. 1299-1305, 1994. DOI: <https://10.1093/clinchem/40.7.1299>
- [120] BROOKS, T. *et al.* A simple artificial urine for the growth of urinary pathogens. *Lettera in Aookied Microbiology*, v. 24, p. 203-206, 1997. DOI: <https://doi.org/10.1046/j.1472-765X.1997.00378.x>
- [121] SILVA, W. P. *et al.* Electrochemical Determination of the Steroid Tibolone and Its Metabolites in Saliva Samples. *ChemElectroChem*, v. 7, p. 4469-4476, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1002/celec.202001248>
- [122] CARDOSO, R. M. *et al.* 3D printing for electroanalysis: from multiuse electrochemical cells to sensors. *Analytica Chimica Acta*, v. 1033, p. 49-57, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.aca.2018.06.021>
- [123] PEDROTTI, J. J. *et al.* Miniaturized reference electrodes with microporous Polymer junctions. *Electroanalysis*, v. 8, p. 673-675, 1996. DOI: <https://doi.org/10.1002/elan.1140080713>
- [124] TERASHIMA, T. N. *et al.* Direct electrochemical oxidation of disulfides at anodically pretreated boron-doped diamond electrodes. *Analytical Chemistry*, v. 75, p. 1564-1572, 2003. DOI: <https://doi.org/10.1021/ac020583q>
- [125] SALAZAR-BANDA, G. R. *et al.* On the changing electrochemical behaviour of boron-doped Diamond surfaces with time after cathodic pre-treatments. *Electrochemica Acta*, v. 51, p. 4612-4619, 2006 DOI: <https://doi.org/10.1016/j.electacta.2005.12.039>
- [126] SALAZAR-BANDA, G. R. *et al.* On the activation and physical degradation of boron-doped Diamond surfaces brought on by cathodic pretreatments. *Journal of Applied Electrochemistry*, v. 40, p. 1817-1827, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10800-010-0139-1>
- [127] DA SILVA, J. A. F. *et al.* An oscillometric detector for capillary electrophoresis. *Analytical Chemistry*, v. 70, p. 4339-4343, 1998. DOI: <https://doi.org/10.1021/ac980185g>

- [128] SAITO, R. M. *et al.* Ionic mobility of the solvated proton and acid-base titration in a four-compartment capillary electrophoresis system. *Analytical Methods*, v. 2, p. 164-170, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1039/B9AY00192A>
- [129] RIBANI, M. *et al.* Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. *Quim. Nova* 27 (2003) 771-780. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0100-40422004000500017>
- [130] SKOOG, D. A. *et al.* Fundamentos de química analítica. 9ª ed. São Paulo: Cengage Learning, 2017.
- [131] RAO, T. N. Validation of Analytical Methods. IntechOpen, Chapter 7, p. 130 – 141. DOI: <https://dx.doi.org/10.5772/intechopen.72087>
- [132] SOUZA, G. B.; SOBRINHO, M. R.; BOZA Y. Validação de métodos para análise de alimentos: enfoque em análise centesimal. 1ª ed. São Paulo: Comitê Técnico de Química de Alimentos da REMESP, 2016.
- [133] MARRA, M. C. *et al.* Ultra-fast determination of caffeine, dypirone, and acetylsalicylic acid by capillary electrophoresis with capacitively coupled contactless conductivity detection and identification of degradation products. *Journal of Chromatography A*, v. 1327, p. 149-154, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2013.12.048>
- [134] TEIXEIRA, L. S. *et al.* Microextraction by packed molecularly imprinted polymer to selectively determine caffeine in soft and energy drinks. *Microchemical Journal*, v. 158, 105252, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.microc.2020.105252>
- [135] MAGKOS, F. *et al.* Caffeine use in sports, pharmacokinetics in man and cellular mechanisms of action. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, v. 45, p. 535-562, 2005. DOI: <https://doi.org/10.1080/1040-830491379245>
- [136] BOTELHO, E. D. *et al.* Chemical Profiling of Cocaine Seized by Brazilian Federal Police in 2009-2012: Major Components. *J. Braz. Chem. Soc.*, v. 25, n. 4, p. 611-618, 2014. DOI: <http://dx.doi.org/10.5935/0103-5053.20140008>