



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

Instituto de Química

Programa de Pós-Graduação em Química - Doutorado

**DESENVOLVIMENTO DE MÉTODOS ELETROQUÍMICO E POR  
ELETROMIGRAÇÃO PARA DETERMINAÇÃO DE ZINCO, ÁCIDO ASCÓRBICO,  
ESCOPOLAMINA E BROMETO DE BUTILESCOPOLAMINA EM AMOSTRAS  
FARMACÊUTICAS E DE INTERESSE FORENSE.**

MICHELLE MIRANDA ARAÚJO DE CARVALHO RIBEIRO

Tese de Doutorado

UBERLÂNDIA

Janeiro

2022

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

Instituto de Química

Programa de Pós-Graduação em Química

**Desenvolvimento de métodos eletroquímico e por eletromigração para determinação de zinco, ácido ascórbico, escopolamina e brometo de butilescopolamina em amostras farmacêuticas e de interesse forense.**

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

**Aluna:** Me. Michelle Miranda Araújo de Carvalho Ribeiro

**Orientador:** Prof. Dr. Eduardo Mathias Richter

**Área de concentração:** Química Analítica

Janeiro

2022

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

R484  
2022 Ribeiro, Michelle Miranda Araújo de Carvalho, 1991-  
Desenvolvimento de métodos eletroquímico e por  
eletromigração para determinação de zinco, ácido  
ascórbico, escopolamina e brometo de butilescopolamina  
em amostras farmacêuticas e de interesse forense.  
[recurso eletrônico] / Michelle Miranda Araújo de  
Carvalho Ribeiro. - 2022.

Orientador: Eduardo Mathias Richter.

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

Modo de acesso: Internet.

Disponível em: <http://doi.org/10.14393/ufu.te.2022.69>

Inclui bibliografia.

1. Química. I. Richter, Eduardo Mathias ,1965-,  
(Orient.). II. Universidade Federal de Uberlândia. Pós-  
graduação em Química. III. 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

Programa de Pós-Graduação em:	Química				
Defesa de:	Tese de Doutorado Acadêmico, 123, PPGQUI				
Data:	Vinte e seis de janeiro de dois mil e vinte e dois	Hora de início:	13:00 h	Hora de encerramento:	18:30 h
Matrícula do Discente:	11723QMI001				
Nome do Discente:	Michelle Miranda Araújo de Carvalho Ribeiro				
Título do Trabalho:	Desenvolvimento de métodos eletroquímico e por eletromigração para determinação de zinco, ácido ascórbico, escopolamina e brometo de butilescopolamina em amostras farmacêuticas e de interesse forense.				
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/yyp-afwd-qcx>, a Banca Examinadora, designada pelo Colegiado do Programa de Pós-graduação em Química, assim composta: Professores Doutores: Wendell Karlos Tomazelli Coltro, da Universidade Federal de Goiás; Marcone Augusto Leal de Oliveira, da Universidade Federal de Juiz de Fora; Cristiane Luisa Jost, da Universidade Federal de Santa Catarina; Dosil Pereira de Jesus, da Universidade Estadual de Campinas e Eduardo Mathias Richter, orientador da candidata.

Iniciando os trabalhos o presidente da mesa, Dr. Eduardo Mathias Richter, apresentou a Comissão Examinadora e a candidata, agradeceu a presença do público, e concedeu à Discente a palavra para a exposição do seu trabalho. A duração da apresentação da 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):

Aprovada.

Esta defesa faz parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor.

O competente diploma será expedido após cumprimento dos demais requisitos, conforme as normas do Programa, a legislação pertinente e a regulamentação interna da UFU.



Documento assinado eletronicamente por **Eduardo Mathias Richter, Professor(a) do Magistério Superior**, em 26/01/2022, às 18:34, 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 **Dosil Pereira de Jesus, Usuário Externo**, em 26/01/2022, às 18:34, 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 **Cristiane Luisa Jost, Usuário Externo**, em 26/01/2022, às 18:35, 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 **Marcone Augusto Leal de Oliveira, Usuário Externo**, em 26/01/2022, às 18:36, 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 **Wendell Karlos Tomazelli Coltro, Usuário Externo**, em 26/01/2022, às 18:36, 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](https://www.sei.ufu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador **3258837** e o código CRC **350829CF**.

*À minha mãe Nilce, minha avó Maria e a minha tia Candita, pelo incentivo nos estudos e dedicação em minha criação e apoio.*

*Ao meu marido e companheiro Felipe, pelo carinho, amor e compreensão.*

*Ao bem mais precioso, meu filho Theo, que ao mesmo tempo que tornou essa jornada mais desafiadora, à deixou mais leve.*

*Ao meu orientador, Eduardo, pelo conhecimento compartilhado, paciência e compreensão.*

*À todos os amigos que conquistei nesta jornada de laboratório, pela ajuda, apoio e diversão.*

## AGRADECIMENTOS

- A Deus, por estar sempre presente, me fornecendo força e paciência para sempre seguir em frente e iluminando o caminho que percorro em minha vida.
- Às duas pessoas mais importantes de minha vida: meu marido e meu filho, por me completar e me dar forças para sempre seguir em frente em busca do melhor para nós três.
- A toda minha Família, mãe, avós, irmãos, sogra, tios e primos.
- Ao meu orientador prof. Dr. Eduardo Mathias Richter, pelas horas dedicadas a me ensinar, pela paciência e incentivo, pela confiança em mim depositada, pela compreensão, principalmente por eu precisar conciliar o doutorado com a maternidade em meio à uma pandemia e pela amizade oferecida dentro e fora do laboratório.
- A todos os amigos dos laboratórios de pesquisa do IQ-UFU, pela amizade, respeito e por todos os momentos de descontração, que fizeram as duras e longas horas de trabalho mais macias e divertidas, pela ajuda nas discussões e pela troca de experiências. Especialmente aos membros do Nupe: Alice, Raquel, Jéssica, Sílvia, Ana Paula, Thiago Costa, Jhonys, David, Weberson, Afonso, Diego, Melo, Jian, Luiz André, Marina, além da Thaís, Diandra e Weida que são como se fossem do laboratório, com eles compartilhei momentos inesquecíveis tanto no laboratório quanto fora dele.
- Aos amigos da graduação (marmotas) que se mantiveram sempre comigo.
- Aos professores do IQ-UFU que contribuíram para a minha formação.
- Aos membros da banca pela aceitação e contribuições a serem concedidas para o aprimoramento deste trabalho.

- Às agências de fomento, FAPEMIG, CAPES e CNPq, pelas bolsas de iniciação científica, mestrado, e doutorado, também pelos auxílios financeiros nos projetos e nos congressos em que participei.

- Ao Instituto de Química pelo espaço concedido e aos seus funcionários pela paciência, colaboração e amizade.



**“A menos que modifiquemos a nossa maneira de pensar, não seremos capazes de resolver os problemas causados pela forma como nos acostumamos a ver o mundo”**

**(Albert Einstein)**

## Resumo

Ribeiro, M. M. A. de C. **Desenvolvimento de métodos eletroquímico e por eletromigração para determinação de zinco, ácido ascórbico, escopolamina e brometo de butilescopolamina em amostras farmacêuticas e de interesse forense.** 2022. 162f. Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Química, Instituto de Química, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia – MG, 2022.

Neste trabalho foram desenvolvidos dois métodos simples e rápidos para a determinação simultânea de zinco (Zn) e ácido ascórbico (AA) em amostras farmacêuticas e um método para a determinação rápida e simultânea de escopolamina (SCO) e N-butilbrometo de escopolamina (BSCO) em amostras farmacêuticas e bebidas. Um dos métodos de determinação de Zn e AA foi baseado em análise por injeção em batelada com detecção por voltametria de onda quadrada (BIA-SWV) e o outro em eletroforese capilar com detecção condutométrica sem contato (CE-C<sup>4</sup>D). A determinação simultânea de SCO e BSCO também foi realizada por CE-C<sup>4</sup>D. Para a determinação de Zn e AA por BIA-SWV foram obtidas faixas lineares de 0,5 a 20,0  $\mu\text{mol L}^{-1}$  e de 18,5 a 370  $\mu\text{mol L}^{-1}$  com limites de detecção (LDs) de 0,2 e 5,4  $\mu\text{mol L}^{-1}$  para Zn e AA, respectivamente. Na determinação de Zn e AA por CE-C<sup>4</sup>D foram obtidas faixas lineares de 50 a 400  $\mu\text{mol L}^{-1}$  e de 1850 a 14800  $\mu\text{mol L}^{-1}$  com LD de 10 e 20  $\mu\text{mol L}^{-1}$  para Zn e AA, respectivamente. Em ambos os métodos as amostras foram preparadas com diluição simples em água deionizada ou eletrólito suporte. A determinação simultânea de SCO e BSCO por CE-C<sup>4</sup>D foi realizada tanto na bebida diluída em água (10% v/v) quanto em bebida pura (sem diluição). Foram obtidas faixas lineares entre 10 e 1000  $\mu\text{mol L}^{-1}$  para ambas as espécies com LD de 2,4 e 2,8  $\mu\text{mol L}^{-1}$  para SCO e BSCO, respectivamente. Os estudos de recuperação foram realizados com e sem o uso de “flush” entre as amostras injetadas. Os valores de recuperação variaram de 100 a 111% para SCO e de 90 a 114% para BSCO (sem flush entre as amostras) e de 95 a 112 % para SCO e de 90 a 105 % para BSCO (com flush entre as amostras). Finalmente, bebidas sem diluição e com o uso de flush também foram analisadas e recuperações de 91 a 111% para SCO e de 82 a 100% para BSCO foram obtidas. O método CE-C<sup>4</sup>D desenvolvido também mostrou-se útil para a detecção da formação de SCO (alucinógeno) a partir do aquecimento de um comprimido de buscopan<sup>®</sup> que contém BSCO em sua composição.

**Palavras chave:** Adulteração, análise forense, análises rápidas, determinação simultânea.

## Abstract

Ribeiro, M. M. A. de C. **Development of an electrochemical and electromigration methods for determination of zinc, ascorbic acid, scopolamine and butylscopolamine bromide in pharmaceutical and forensic samples.** 2022. 162p. Thesis (Doctorate) – Programa de Pós-Graduação em Química, Instituto de Química, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia – MG, 2022.

In this thesis two simple and fast methods were developed for simultaneous determination of zinc (Zn) and ascorbic acid (AA) in pharmaceuticals samples and one method for fast and simultaneous determination of scopolamine (SCO) and scopolamine N-butylbromide (BSCO) in pharmaceutical and beverage samples. For Zn and AA determination, one method was based on batch injection analysis with square wave voltammetric detection (BIA-SWV) and other based on capillary electrophoresis with contactless conductivity detection (CE-C<sup>4</sup>D). Simultaneous determination of SCO and BSCO was also performed by CE-C<sup>4</sup>D. For the determination of Zn and AA by BIA-SWV, linear ranges from 0.5 to 20.0  $\mu\text{mol L}^{-1}$  and from 18.5 to 370  $\mu\text{mol L}^{-1}$  were obtained with limit of detection (LOD) of 0.2 and 5.4  $\mu\text{mol L}^{-1}$  for Zn and AA, respectively. In the determination of Zn and AA by CE-C<sup>4</sup>D, linear ranges from 50 to 400  $\mu\text{mol L}^{-1}$  and from 1850 to 14800  $\mu\text{mol L}^{-1}$  were obtained with LOD of 10 and 20  $\mu\text{mol L}^{-1}$  for Zn and AA, respectively. In both methods, samples were prepared by simple dilution in deionized water or supporting electrolyte. The simultaneous determination of SCO and BSCO by CE-C<sup>4</sup>D was performed in beverage samples without and with dilution in water (10% v/v). Linear ranges between 10 and 1000  $\mu\text{mol L}^{-1}$  were obtained for both species with LOD of 2.4 and 2.8  $\mu\text{mol L}^{-1}$  for SCO and BSCO, respectively. Recovery studies were performed with and without flush procedure between injected samples. Recovery values ranged from 100 to 111% for SCO and from 90 to 114% for BSCO were obtained for beverage samples without flush procedure, and from 95 to 112% for SCO and 90 to 105% for BSCO for samples with flush procedure between analysis). Finally, recovery values of 91 to 111% for SCO and 82 to 100% for BSCO were obtained for undiluted beverage samples with flush procedure between analysis. The CE-C<sup>4</sup>D method also proved to be useful for detecting the formation of SCO (hallucinogenic compound) from heating a buscopan® tablet that contains BSCO in its composition.

**Keywords:** Adulteration, forensic analysis, fast analysis, simultaneous determination.

## SUMÁRIO DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> – Estrutura molecular do ácido ascórbico e os respectivos valores de pKa. ....	30
<b>Figura 2</b> - Fórmula estrutural da escopolamina (SCO) e os respectivos valores de pKa. ....	33
<b>Figura 3</b> - Fórmula estrutural da N-butil brometo de escopolamina (BSCO). ....	36
<b>Figura 4</b> - Representação da interface do capilar com a solução. ....	47
<b>Figura 5</b> - Esquema do sistema de detecção C <sup>4</sup> D com representação dos dois eletrodos (E1 e E2) e o desenho que representa o eletroferograma com pico positivo e pico negativo. ....	53
<b>Figura 6</b> – Forma de aplicação de potencial na voltametria de onda quadrada. I <sub>d</sub> : corrente direta; α: amplitude do pulso de potencial; ΔE <sub>s</sub> : incremento do pulso de potencial; I <sub>r</sub> : corrente reversa; T: período. ....	56
<b>Figura 7</b> – Etapas envolvidas na voltametria de redissolução (stripping) anódica. ....	58
<b>Figura 8</b> – Etapas de operação do sistema BIA e o tipo de sinal adquirido quando do uso da detecção amperométrica. ....	60
<b>Figura 9</b> – Imagem e esquema de funcionamento do equipamento de CE-C <sup>4</sup> D utilizado no trabalho. ....	69
<b>Figura 10</b> - Esquema do procedimento desenvolvido por CE-C <sup>4</sup> D para determinação simultânea de Zn e AA. ....	70
<b>Figura 11</b> – (A) Esquema da célula BIA utilizada no trabalho; (B) Imagem real da célula BIA; (C) Mecanismo de injeção no sistema BIA para análises de redissolução onde em (A): início da injeção; (B) após 5 s de injeção; (C) após 35 s de injeção; (D) após 40 s do início da injeção. ....	72
<b>Figura 12</b> - (A) Imagem da pipeta eletrônica que foi utilizada para as injeções no sistema BIA; (B) Imagem do sistema de agitação para célula BIA. ....	73
<b>Figura 13</b> - Esquema do procedimento desenvolvido por BIA-SWASV para determinação simultânea de Zn e AA. ....	74
<b>Figura 14</b> – Eletroferogramas obtidos com o estudo de diferentes composições de BGE: (A) 30 mmol L <sup>-1</sup> de HIS + 15 mmol L <sup>-1</sup> de TRIS pH=8,8; (B) 20 mmol L <sup>-1</sup> de MES e HIS pH=6,1; (C) 30 mmol L <sup>-1</sup> de HIS + 10 mmol L <sup>-1</sup> ácido benzóico pH= 8,8; (D) 30 mmol L <sup>-1</sup>	

<sup>1</sup> de HIS + 10 mmol L<sup>-1</sup> de NaOH pH=8,4. Solução padrão: 100 μmol L<sup>-1</sup> de Zn e 3700 μmol L<sup>-1</sup> de AA. Comprimento total e efetivo do capilar: 40 e 10 cm; Potencial aplicado: 25kV; Tempo de injeção: 1,0 s. .... 77

**Figura 15** – Eletroferogramas de soluções padrão (A) e amostra (B) contendo 100 μmol L<sup>-1</sup> de Zn e 3700 μmol L<sup>-1</sup> de AA. BGE: 20 mmol L<sup>-1</sup> de MES e HIS, pH=6,1. Comprimento total e efetivo do capilar: 40 e 10 cm; potencial aplicado: 25kV; tempo de injeção: 1,0 s. .... 78

**Figura 16** – Eletroferogramas obtidos com soluções amostra com 100 μmol L<sup>-1</sup> de Zn e 3700 μmol L<sup>-1</sup> de AA e adição de cobre (100 μmol L<sup>-1</sup>) ou níquel (100 μmol L<sup>-1</sup>). BGE: 20 mmol L<sup>-1</sup> de MES e HIS pH=6,1. Comprimento efetivo do capilar para análise de cobre: 10 cm (primeiro detector); comprimento efetivo do capilar para análise de níquel: 30 cm (segundo detector). Demais condições experimentais vide Figura 15. .... 80

**Figura 17** – Eletroferogramas referentes ao estudo da variação equimolar da concentração de MES/HIS no BGE: (A) 20 mmol L<sup>-1</sup> de MES e HIS; (B) 30 mmol L<sup>-1</sup> de MES e HIS; (C) 40 mmol L<sup>-1</sup> de MES e HIS, todos em pH=6,1. Padrão e amostra com 100 μmol L<sup>-1</sup> de Zn e 3700 μmol L<sup>-1</sup> de AA, sendo: (a) solução padrão, (b) solução amostra com adição de 100 μmol L<sup>-1</sup> de Ni. Comprimento total e efetivo do capilar 50 e 10 cm. Demais condições experimentais vide Figura 15. .... 84

**Figura 18**- Eletroferogramas do estudo da adição de diferentes concentrações de Ni às soluções padrão e amostra com 100 μmol L<sup>-1</sup> de Zn e 3700 μmol L<sup>-1</sup> de AA. Concentrações de Ni: (1) 100 μmol L<sup>-1</sup>; (2) 50 μmol L<sup>-1</sup>; (3) 75 μmol L<sup>-1</sup> e (4) 25 μmol L<sup>-1</sup>. BGE: 30 mmol L<sup>-1</sup> de MES e HIS, pH=6,1. Condições experimentais vide Figura 15. .... 86

**Figura 19** - Variação das áreas de Zn (símbolo azul) e AA (símbolo laranja) em função das diferentes concentrações de Ni adicionado às soluções padrão (■) e amostra (▲). Condições vide Figura 18. .... 87

**Figura 20** - Eletroferogramas obtidos no estudo do tempo de injeção (0,5 - 2,5 segundos). Composição da solução padrão: 100, 3700, 75, e 200 μmol L<sup>-1</sup> de Zn, AA, Ni e excipientes (bicarbonato de sódio, ácido cítrico e o benzoato de sódio), respectivamente. Demais condições vide Figura 17. .... 88

**Figura 21** – Eletroferogramas do estudo de repetibilidade com 10 injeções sucessivas de uma solução padrão com 100, 3700, 75 e 200 μmol L<sup>-1</sup> de Zn, AA, Ni e de cada um dos

excipientes (bicarbonato de sódio, ácido cítrico e o benzoato de sódio), respectivamente. Demais condições vide Tabela 3.....	91
<b>Figura 22</b> - Eletroferogramas obtidos com injeções de soluções contendo concentrações crescentes de Zn (50, 100, 200, 300 e 400 $\mu\text{mol L}^{-1}$ ) e AA (1850, 3700, 7400, 11100 e 14800 $\mu\text{mol L}^{-1}$ ). Demais condições vide Tabela 3. ....	92
<b>Figura 23</b> – Curvas de calibração para o Zn (100 $\mu\text{mol L}^{-1}$ - 400 $\mu\text{mol L}^{-1}$ ) e para o AA (3700 $\mu\text{mol L}^{-1}$ – 14800 $\mu\text{mol L}^{-1}$ ). Demais condições vide Figura 22. ....	95
<b>Figura 24</b> – Efeitos dos pré-tratamentos eletroquímicos anódico (+10 mA por 1000 s; linha preta) e catódico (-10 mA por 1000 s; linha vermelha) no desempenho do eletrodo de BDD. Concentração: 5 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de Zn e 185 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de AA; eletrólito suporte: 0,12 mol $\text{L}^{-1}$ BR (pH = 6,0); potencial de deposição: -1,5 V; tempo de deposição: 10 s; volume de injeção: 150 $\mu\text{L}$ ; velocidade de injeção: 49 $\mu\text{L s}^{-1}$ ; frequência: 30 Hz; amplitude: 60 mV; incremento de varredura: 5 mV. ....	98
<b>Figura 25</b> – (A) Voltamogramas de SW obtidos no estudo do efeito do pH (2,0 – 7,0) com uma solução padrão de 5 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de Zn (■) e 185 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de AA (●). Efeito do pH na corrente de pico de Zn e AA (B) e no potencial de pico do AA (C). Eletrólito suporte: 0,12 mol $\text{L}^{-1}$ de solução BR (pH = 6,0). Demais condições vide Figura 24. ....	100
<b>Figura 26</b> - Voltamogramas de SW obtidos no estudo do efeito da variação da composição do eletrólito suporte: (A) 0,12 mol $\text{L}^{-1}$ de solução BR (pH = 6,0); (B) 0,12 mol $\text{L}^{-1}$ de $\text{H}_3\text{PO}_4$ + 0,12 mol $\text{L}^{-1}$ de $\text{H}_3\text{COOH}$ (pH ajustado em pH = 6,0 com NaOH); (C) 0,12 mol $\text{L}^{-1}$ de $\text{H}_3\text{COOH}$ (pH ajustado em 5,75 com NaOH). Concentração dos analitos: 5 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de Zn e 185 $\mu\text{mol L}^{-1}$ . Demais condições vide Figura 24. ....	103
<b>Figura 27</b> – Voltamogramas de SW obtidos no estudo do efeito da concentração do eletrólito suporte com solução padrão de 5 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de Zn e 185 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de AA: (A) 0,12 mol $\text{L}^{-1}$ de solução BR (pH = 6,0); (B) 0,06 mol $\text{L}^{-1}$ de solução BR (pH = 6,0) e (C) 0,18 mol $\text{L}^{-1}$ de solução BR (pH = 6,0). Eletrodo de trabalho: BDD após ativação anódica (+10 mA por 1000 s) e ativação catódica (-10 mA por 1000 s). Demais condições vide Figura 24.....	104
<b>Figura 28</b> – (A) Voltamogramas SW e gráfico mostrando a variação da corrente de oxidação de Zn no estudo da variação do potencial de deposição (-1,4; -1,5; -1,6 e -1,7 V) com uma solução padrão de 2 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de Zn em 0,12 mol $\text{L}^{-1}$ de solução BR (pH = 6,0). Demais condições vide Figura 24. ....	105

**Figura 29 – (A)** Voltamogramas SW e gráfico mostrando a variação da corrente de oxidação de Zn em função do tempo de deposição (5s - 30s), com uma solução padrão de  $2 \mu\text{mol L}^{-1}$  de Zn em  $0,12 \text{ mol L}^{-1}$  de solução BR (pH = 6,0); potencial de deposição: -1,6 V. **B)** em função do tempo de deposição. Demais condições vide Figura 28..... 106

**Figura 30 – (A)** Voltamogramas de SW e gráfico mostrando a variação da corrente de oxidação de Zn e AA em função da variação da velocidade de injeção ( $17 \mu\text{L s}^{-1}$  a  $164 \mu\text{L s}^{-1}$ ) com padrão de  $5 \mu\text{mol L}^{-1}$  de Zn e  $185 \mu\text{mol L}^{-1}$  de AA em  $0,12 \text{ mol L}^{-1}$  de solução BR (pH = 6,0). Potencial de deposição: -1,6 V; tempo de deposição: 10 s. Demais condições vide Figura 29. .... 107

**Figura 31 – (A)** Voltamogramas de SW e gráfico mostrando a variação da corrente de oxidação de Zn e AA em função da variação do volume de injeção ( $50 \mu\text{L}$  -  $250 \mu\text{L}$ ) com solução padrão de  $5 \mu\text{mol L}^{-1}$  de Zn e  $185 \mu\text{mol L}^{-1}$  de AA em  $0,12 \text{ mol L}^{-1}$  de solução BR (pH = 6,0). Potencial de deposição: -1,6 V e tempo de deposição: 10 s e velocidade de injeção:  $78 \mu\text{L s}^{-1}$ . Demais condições vide Figura 30. .... 108

**Figura 32 - (A)** Voltamogramas de SW e gráfico mostrando a variação da corrente de oxidação de Zn e AA obtidos no estudo do efeito do incremento de potencial (1 – 10 mV) usando uma solução padrão de  $5 \mu\text{mol L}^{-1}$  de Zn e  $185 \mu\text{mol L}^{-1}$  de AA em  $0,12 \text{ mol L}^{-1}$  de solução BR (pH = 6,0); frequência: 30 Hz; amplitude: 60 mV. Demais condições vide Figura 31. .... 109

**Figura 33 -** Voltamogramas de SW e gráfico mostrando a variação da corrente de oxidação de Zn e AA obtidos no estudo do efeito da variação da frequência (10 – 50 Hz) usando uma solução padrão de  $5 \mu\text{mol L}^{-1}$  de Zn e  $185 \mu\text{mol L}^{-1}$  de AA em  $0,12 \text{ mol L}^{-1}$  de solução BR (pH = 6,0); incremento de varredura: 3mV; amplitude: 60 mV. Demais condições vide Figura 32. .... 110

**Figura 34 -** Voltamogramas de SW e gráfico mostrando a variação da corrente de oxidação de Zn e AA obtidos no estudo da variação da amplitude (10 mV – 100 mV) com o padrão de  $5 \mu\text{mol L}^{-1}$  de Zn e  $185 \mu\text{mol L}^{-1}$  de AA em  $0,12 \text{ mol L}^{-1}$  de solução BR (pH = 6,0); incremento de varredura: 3mV e frequência: 40 Hz. Demais condições vide Figura 33. .... 112

**Figura 35 –** Voltamogramas de SW e gráficos mostrando a variação da corrente de oxidação de Zn e AA obtidos no estudo da faixa linear com solução padrão de Zn variando

de 0,5 - 20  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ) e solução padrão de AA variando de 18,5 - 370  $\mu\text{mol L}^{-1}$  em 0,12 mol  $\text{L}^{-1}$  de solução BR (pH = 6,0). Demais condições vide Figura 34. .... 114

**Figura 36** - Voltamogramas de SW e gráficos obtidos no estudo de repetibilidade para 10 injeções sucessivas de soluções padrão contendo (a) 1,0/37,0 (■), (b) 3,0/111,0 (●) e (c) 5,0/185,0 (▲)  $\mu\text{mol L}^{-1}$  de Zn /AA, respectivamente. Eletrólito suporte 0,12 mol  $\text{L}^{-1}$  de solução BR (pH = 6,0). Potencial de deposição: -1,6 V; tempo de deposição: 10 s; velocidade de injeção: 78  $\mu\text{L s}^{-1}$ ; volume de injeção: 150  $\mu\text{L}$ ; incremento de varredura: 3 mV; frequência: 40 Hz e amplitude: 50 mV. .... 116

**Figura 37** - Voltamogramas de SWASV e respectivas curvas de calibração obtidas para solução amostra antes (linha preta) e após adição de concentrações crescentes de solução padrão de Zn (1,0; 2,0; 3,0 e 4,0  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ) e AA (37, 74, 111 e 148  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ) em 0,12 mol  $\text{L}^{-1}$  de solução BR (pH = 6,0). Demais condições vide Figura 36. .... 118

**Figura 38** – Estudo da interferência recíproca entre Zn e AA. **(A)** Zn (1 a 10  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ) e AA = 18,5  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ; **(B)** AA (37 a 350  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ) e Zn = 1  $\mu\text{mol L}^{-1}$ . Demais condições experimentais vide Figura 36. .... 120

**Figura 39** - Estudo de interferência. Voltamogramas de SWASV obtidos para uma solução contendo 2  $\mu\text{mol L}^{-1}$  de Zn e 74  $\mu\text{mol L}^{-1}$  de AA antes (linha preta) e após (linha vermelha) a adição dos possíveis interferentes (2  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ). Voltamogramas obtidos para soluções contendo apenas cada interferente também são apresentados (linha tracejada azul): magnésio (A), cálcio (B), ácido fólico (C), biotina (D), vitamina A (E) e vitamina D (F). Condições experimentais vide Figura 36. .... 121

**Figura 40** – Gráfico da distribuição de carga da SCO e BSCO em função do pH. .... 125

**Figura 41** – Eletroferogramas obtidos com injeção de solução padrão de 100  $\mu\text{mol L}^{-1}$  de SCO e BSCO usando diferentes composições de BGE: (a) 20 mmol  $\text{L}^{-1}$  de ácido butírico + 7 mmol  $\text{L}^{-1}$  de NaOH (pH=4,5); (b) 20 mmol  $\text{L}^{-1}$  de MES + 10 mmol  $\text{L}^{-1}$  de NaOH (pH=6,0) e (c) 20 mmol  $\text{L}^{-1}$  de TAPS + 10 mmol  $\text{L}^{-1}$  de NaOH (pH=8,0); Tempo de injeção: 1,0 s; Comprimento total e efetivo do capilar: 50 e 40 cm; Potencial de separação: +25kV (lado da injeção); \*Pico de sistema. .... 127

**Figura 42** – Eletroferogramas obtidos no estudo do pH utilizando solução padrão de 100  $\mu\text{mol L}^{-1}$  de SCO e BSCO. BGE: 20 mmol  $\text{L}^{-1}$  de ácido butírico + NaOH para uma faixa de pH de 4,0 a 5,5. Tempo de injeção: 1,0 s; comprimento total do capilar: 50 cm;



comprimento efetivo do capilar; (A) 10 cm e (B) 40 cm; Potencial de separação: 25kV.  
..... 129

**Figura 43** – Eletroferogramas obtidos no estudo da concentração de ácido butírico na composição do BGE com solução padrão de 100  $\mu\text{mol L}^{-1}$  de SCO e BSCO. Concentrações de ácido butírico: 10, 20 e 30  $\text{mmol L}^{-1}$  + NaOH (pH=4,5); Tempo de injeção: 1,0 s; Comprimento total e efetivo do capilar: 50 e 40 cm; Potencial de separação: +25kV. .. 130

**Figura 44** – Eletroferogramas obtidos no estudo de tempo de injeção com solução padrão de 100  $\mu\text{mol L}^{-1}$  de SCO e BSCO. BGE: 20  $\text{mmol L}^{-1}$  de ácido butírico + 7  $\text{mmol L}^{-1}$  de NaOH (pH= 4,5). Tempo de injeção: 1,0 s; comprimento total do capilar: 50 cm e comprimento efetivo do capilar: (A) 10 e (B) 40 cm; Potencial de separação: +25kV. . 132

**Figura 45** – Eletroferogramas obtidos no estudo do potencial de separação com solução padrão de 100  $\mu\text{mol L}^{-1}$  de SCO e BSCO. BGE: 20  $\text{mmol L}^{-1}$  de ácido butírico + 7  $\text{mmol L}^{-1}$  de NaOH (pH= 4,5). Tempo de injeção: 1,0 s; comprimento total do capilar: 50 cm e comprimento efetivo do capilar: (A) 10 e (B) 40 cm; potencial de separação variando de 15 a 30kV. .... 134

**Figura 46** – Eletroferogramas obtidos no estudo da repetibilidade com uma amostra de vodka (10% v/v) fortificada com solução padrão de 100  $\mu\text{mol L}^{-1}$  de SCO e BSCO. BGE: 20  $\text{mmol L}^{-1}$  de ácido butírico + 7  $\text{mmol L}^{-1}$  de NaOH (pH= 4,5). Tempo de injeção: 1s; Comprimento total e efetivo do capilar: 50 e 40cm; potencial aplicado variando de: +25kV.  
..... 136

**Figura 47** – Eletroferogramas obtidos no estudo da faixa linear com soluções padrão variando na faixa de concentração de 10 a 1000  $\mu\text{mol L}^{-1}$  de SCO e BSCO e suas respectivas curvas de calibração (n=3). Demais condições vide Figura 46. .... 137

**Figura 48** – Eletroferogramas e as respectivas curvas de calibração obtidos pela injeção de soluções padrões com: (a) 60  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ; (b) 80  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ; (c) 100  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ; (d) 200  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ; (e) 300  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ; (f) 400  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ; (g) 500  $\mu\text{mol L}^{-1}$  de SCO e BSCO. Demais condições vide Figura 46. .... 138

**Figura 49** – Eletroferogramas obtidos após a adição de (A) 1000  $\mu\text{mol L}^{-1}$  de SCO e BSCO em diferentes amostras de bebidas (10% v/v) e (B) dos brancos das amostras de bebidas (10% v/v). Demais condições vide Figura 46. .... 141

**Figura 50** – Eletroferogramas obtidos com uma solução padrão de  $200 \mu\text{mol L}^{-1}$  de SCO e BSCO e uma solução de amostra farmacêutica diluída para uma concentração de  $200 \mu\text{mol L}^{-1}$  de BSCO. Demais condições vide Figura 46..... 147

**Figura 51** – Eletroferogramas obtidos a partir da injeção de: (a) solução padrão contendo SCO e BSCO ( $1000 \mu\text{mol L}^{-1}$  cada); amostra farmacêutica (buscopan®) (b) preparada na hora; (c) exposta 24 h em temperatura ambiente; (d) após o aquecimento na estufa em  $80^\circ\text{C}$ ; (e) após o aquecimento por 10 s na chama de um bico de Bunsen e (f) solução “e” enriquecida com  $400 \mu\text{mol L}^{-1}$  de SCO. Demais condições vide Figura 46..... 149

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

$\mu_{ef}$  – mobilidade efetiva

$\mu_{eo}$  – mobilidade eletrosmótica

$\mu_{ep}$  – Mobilidade eletroforética

$a$  – Amplitude de aplicação dos pulsos de potencial

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

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

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

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

**BR** – Tampão Britton-Robinson

**BSCO** – N-butilbrometo de escopolamina

**C<sup>4</sup>D** – Detecção condutométrica sem contato acoplada capacitivamente, do inglês, “*Capacitive Coupled Contactless Conductivity Detection*”

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

$C_{ef}$  – Comprimento efetivo do capilar

**CHES** – Ácido (2-ciclohexilamino) etanosulfônico

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

**DFSA** – Droga facilitadora de crime e/ou estupro, do inglês, “*drug-facilitated sexual assault*”

**DMX** – Ácido 3,4 dimetoxinâmico

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

**E** – Campo elétrico

**e** – Carga elementar

**EA** – Eletrodo auxiliar

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

**E<sub>p</sub>** – Potencial de pico

**ET** – Eletrodo de trabalho

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

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

**FL** – Faixa linear

**GC -MS** – Cromatografia gasosa com detecção por espectrometria de massas

**HIS** – L-Histidina

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

**I<sub>C</sub>** – Corrente capacitiva

**I<sub>F</sub>** – Corrente faradaica

**I<sub>p</sub>** – Corrente de pico

**LD** – Limite de detecção

**LQ** – Limite de quantificação

**MEKC** – Eletrocromatografia micelar

**Ø** – Diâmetro

**PC** – Plano de cisalhamento

**PI** – Padrão interno

**r** – Raio de Stokes

**SCO** – escopolamina

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

**t<sub>eof</sub>** – Tempo de migração do fluxo eletrosmótico

**t<sub>m</sub>** – Tempo de migração da espécie

**$t_R$**  – Tempo de retenção

**TRIS** – Tris-(hidroximetil)-aminometano

**U.A.** – Unidade arbitrária

**UV-VIS** – Ultravioleta / Visível

**$v$**  – Velocidade de varredura

**$v_{ap}$**  – velocidade aparente

**$W$**  – Largura de base do pico

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

**$z$**  – Número de cargas

**$\alpha$**  – Coeficiente de transferência de elétrons

**$\Delta E_s$**  – Incremento de varredura de potencial

**$\epsilon_0$**  – Permittividade do vácuo

**$\epsilon_s$**  – Permittividade da solução

**$\zeta$**  – Potencial zeta

**$\eta$**  – viscosidade dinâmica

## **DICIONÁRIO DE TERMOS MÉDICOS:**

**NEUROPEPTÍDEOS** - Substâncias químicas produzidas e liberadas pelas células cerebrais.

**IMUNOMODULADORES** - Imunomoduladores são substâncias que atuam no sistema imunológico conferindo aumento da resposta orgânica contra determinados microorganismos, incluindo vírus, bactéria, fungos e protozoários, mediante à produção de interferon e seus indutores.

**OLIGOELEMENTO** - São estruturas fundamentais para que o organismo funcione regularmente. Eles são considerados elementos essenciais e são vitais para o corpo, mesmo que em pequenas quantidades. A maioria deles não é produzida naturalmente pelo organismo.

**FATOR ETIOLÓGICO** – Agente causador da doença.

**SISTEMA LINFÁTICO** - constituído pelo tecido linfóide (ou reticular), é um tipo especial de tecido conjuntivo rico em células reticulares e em células de defesa, como os linfócitos, os plasmócitos e os macrófagos.

**ANTIOXIDANTE INTRACELULAR** - Molécula capaz de inibir a oxidação de outras moléculas dentro da célula.

**NEUROMODULADOR** - Os neuromoduladores são substâncias que possuem a capacidade de prolongar ou reduzir o efeito de um neurotransmissor, ou seja, podem modular a excitabilidade de uma membrana, e normalmente atuam em conjunto com os neurotransmissores porém sem alterar a essência de sua transmissão.

**QUIMIOTAXIA** - reação de orientação de um organismo ou de uma célula na direção - ou na direção oposta - a um determinado estímulo químico. Esta característica é de extrema importância nos fenômenos de inflamação ou de resposta imunitária.

**MOTILIDADE LEUCOCITÁRIA** – capacidade dos leucócitos em realizar movimentos autônomos.

**LINFÓCITOS** - são células responsáveis pela defesa do corpo. Eles pertencem ao grupo dos leucócitos, também chamados de glóbulos brancos.

**CÉLULAS IMUNOCOMPETENTES** – são as células que possuem a capacidade de produzir uma resposta imunitária específica para responder a uma estimulação antigênica, isto é, de diferenciar o "seu" do "não seu" e o "seu modificado".

**ANTICORPO** - são proteínas produzidas pelo sistema imunológico como resposta a um agente invasor do organismo, seja ele um agente infeccioso, célula tumoral ou substância capaz de desencadear uma resposta alérgica.

**ANTICOLINÉRGICOS** - substâncias que podem ser extraídas de plantas ou obtidas por meio de síntese orgânica. Sua característica é inibir a ação da acetilcolina.

**ANTIEMÉTICOS** - correspondem a uma classe farmacológica destinada a promover o alívio dos sintomas relacionados às náuseas (enjoos) e êmese (vômito).

**ANTIESPASMÓDICOS** - (também chamados de espasmolíticos ou antiespásticos) são uma classe de fármacos que inibe a motilidade da musculatura visceral. O efeito produzido é o de prevenir a ocorrência de espasmos no estômago, intestino, útero ou bexiga.

**PARASSIMPATOLÍTICO** - substância que reduz a atividade do sistema nervoso parassimpático. O sistema nervoso parassimpático faz parte do sistema nervoso autônomo.

**RECEPTORES MUSCARÍNICOS DE ACETILCOLINA** - são receptores metabotrópicos acoplados a proteínas G, presentes no corpo humano e animal. São estimulados pela acetilcolina, desencadeando uma cascata intracelular que é responsável pelas respostas ditas "muscarínicas".

**NÚCLEO BASAL DE MEYNERT** - é uma parte do núcleo basilar constituído por redes neuronais de receptores colinérgicos (neurônio colinérgico) que se dispõem desde a região septal-banda diagonal da porção fronto-basal mais rostral até a porção mais caudal do globo pálido. Seu nome é em homenagem a Theodor Meynert.

**BARREIRA HEMATOENCEFÁLICA** - é uma estrutura que impede e/ou dificulta a passagem de substâncias do sangue para o sistema nervoso central, tais como anticorpos, complemento e fatores de coagulação.

## SUMÁRIO DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> - Reagentes utilizados nos trabalhos por CE-C <sup>4</sup> D e BIA-SWASV.....	66
<b>Tabela 2</b> - Relação das áreas correspondentes a 100 µmol L <sup>-1</sup> de Zn em solução padrão (A) e solução amostra (F) com: 75 µmol L <sup>-1</sup> de Ni (G e H) e 200 µmol L <sup>-1</sup> de benzoato de sódio (B); bicarbonato de sódio (C); ácido cítrico (D) e todos os excipientes adicionados ao padrão sem (E) e com Ni (H). .....	81
<b>Tabela 3</b> - Condições otimizadas para o método CE-C <sup>4</sup> D desenvolvido.....	90
<b>Tabela 4</b> - Características analíticas do método CE-C <sup>4</sup> D. ....	94
<b>Tabela 5</b> - Comparação dos resultados obtidos com a análise de 4 amostras por CE-C <sup>4</sup> D e pelos métodos de referência, titulação (AA) e FAAS (Zn). ....	95
<b>Tabela 6</b> - Condições otimizadas para a determinação simultânea de Zn e AA por BIA-SWASV.....	113
<b>Tabela 7</b> - Características analíticas do método BIA-SWASV para determinação simultânea de Zn e AA. ....	117
<b>Tabela 8</b> - Resultados obtidos na análise de quatro amostras usando o método BIA-SWASV e os métodos de referência (titulação para AA e FAAS para Zn. A1 e A2 são amostras que contém Zn e AA; A3 somente Zn e A4 somente AA. ....	119
<b>Tabela 9</b> - Comparação das características analíticas dos dois métodos desenvolvidos, BIA-SWASV e CE-C <sup>4</sup> D, para a determinação simultânea de Zn e AA em amostras farmacêuticas. ....	123
<b>Tabela 10</b> - Condições otimizadas para o método CE-C <sup>4</sup> D desenvolvido. ....	135
<b>Tabela 11</b> - Características analíticas do método CE-C <sup>4</sup> D para determinação simultânea de SCO e BSCO.....	139
<b>Tabela 12</b> - Resultados obtidos nos estudos de adição e recuperação com nove tipos de bebidas dopadas com SCO e BSCO por CE-C <sup>4</sup> D (sem flush entre as análises).....	142
<b>Tabela 13</b> - Resultados obtidos nos estudos de adição e recuperação com nove tipos de bebidas dopadas com SCO e BSCO por CE-C <sup>4</sup> D (com flush entre as análises). ....	143



<b>Tabela 14</b> - Resultados obtidos nos estudos de adição e recuperação com nove tipos de bebidas puras (sem diluição) dopadas com SCO e BSCO por CE-C <sup>4</sup> D (com flush entre as análises).....	144
<b>Tabela 15</b> – Resumo dos resultados obtidos nos experimentos de recuperação com as amostras de bebidas dopadas com SCO e BSCO por CE-C <sup>4</sup> D.....	145
<b>Tabela 16</b> - Resultados obtidos na análise de três amostras de buscopan® por CE-C <sup>4</sup> D. ....	147
<b>Tabela 17</b> – Métodos para a determinação de SCO e/ou BSCO descritos na literatura e o desenvolvido por CE-C <sup>4</sup> D.....	151

# Sumário

1.	INTRODUÇÃO.....	28
<b>1.1.</b>	<b>PARTE 1: Zinco e ácido ascórbico .....</b>	<b>28</b>
1.1.1.	Zinco (presente na amostra na forma de citrato de zinco) .....	28
1.1.2.	Ácido ascórbico .....	29
1.1.3.	Formulação farmacêutica contendo Zn e AA.....	30
1.1.4.	Contextualização .....	31
1.1.5.	Métodos para determinação simultânea de Zn e AA.....	32
<b>1.2.</b>	<b>PARTE 2: Escopolamina e brometo de butilescopolamina.....</b>	<b>33</b>
1.2.1.	Escopolamina (SCO) .....	33
1.2.2.	Brometo de butilescopolamina (BSCO).....	35
1.2.3.	Contextualização .....	37
1.2.4.	“Boa noite, Cinderela!” .....	38
1.2.5.	Métodos de determinação de SCO e BSCO em diversas amostras .....	39
1.3.	Contribuições analíticas .....	40
1.4.	Técnicas empregadas .....	41
1.4.1.	Eletroforese Capilar (CE).....	41
1.4.1.1.	Abordagem teórica.....	43
1.4.1.2.	Mobilidades.....	44
1.4.2.	Sistemas de detecção em CE .....	49
1.4.2.1.	Detecção condutométrica sem contato acoplada capacitivamente (C <sup>4</sup> D).....	52
1.5.1.	Voltametria de redissolução anódica .....	57
1.6.	Análise por injeção em batelada (BIA) .....	59
1.7.	Eletrodo de diamante dopado com boro (BDD) .....	61
2.	OBJETIVOS .....	64
2.1.	Objetivos gerais.....	64

2.2.	Objetivos específicos .....	64
3.	PARTE EXPERIMENTAL .....	65
3.1.	Amostras, soluções e reagentes .....	65
3.1.1.	Determinação de Zn e AA. ....	65
3.1.2.	Determinação de SCO e BSCO.....	67
3.2.	Equipamentos .....	68
3.2.1.	CE-C <sup>4</sup> D:.....	68
3.2.2.	BIA-SWASV .....	71
3.2.3.	Métodos de referência .....	75
4.	RESULTADOS E DISCUSSÕES .....	76
	<b>PRIMEIRA PARTE: DETERMINAÇÃO SIMULTÂNEA DE ZINCO E ÁCIDO ASCÓRBICO UTILIZANDO CE-C<sup>4</sup>D E BIA-SWVASV.....</b>	<b>76</b>
4.1.	Determinação simultânea de Zn e AA por CE-C <sup>4</sup> D .....	76
4.1.1.	Conclusões parciais.....	96
4.2.	Determinação simultânea de Zn e AA por BIA-SWASV .....	97
4.2.1.	Conclusões parciais.....	124
	<b>SEGUNDA PARTE: DETERMINAÇÃO SIMULTÂNEA DE ESCOPOLAMINA E BUTILESCOPOLAMINA EM FÁRMACO E AMOSTRAS DE BEBIDAS.....</b>	<b>125</b>
4.3.	Determinação simultânea de SCO e BSCO por CE-C <sup>4</sup> D. ....	125
4.3.1.	Conclusões parciais.....	152
5.	CONCLUSÕES GERAIS .....	154
6.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	156
7.	ARTIGOS PUBLICADOS DURANTE O PERÍODO DO DOUTORADO .....	179

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. PARTE 1: Zinco e ácido ascórbico

#### 1.1.1. Zinco (presente na amostra na forma de citrato de zinco)

O zinco (Zn) é componente estrutural de muitas proteínas, hormônios, neuropeptídeos e componente catalítico de muitas enzimas. Este micronutriente atua na estimulação do crescimento, na prevenção do diabetes, como antioxidante, estimulante tireoidiano, além de agir como imunomodulador, sendo, portanto, um dos oligoelementos mais importantes do corpo (DARDENNE, 2002). Estudos demonstram que suplementos de Zn em doses nutricionais ajudam a evitar alterações no sistema imunológico de grupos de risco que possuem sua deficiência (BLACK, 1998; HAASE; RINK, 2009; UCIECHOWSKI; RINK, 2016; FABRIS; MOCHEGANI, 1995)

As causas para o crescente aumento de doenças crônicas apontam principalmente para alimentação como fator etiológico principal, sendo que um dos pilares deste processo é a deficiência de micronutrientes (MAFRA; COZZOLINO, 2004). Atualmente, a deficiência de Zn é muito comum, especialmente nos países em desenvolvimento. Nos países industrializados, os idosos são os mais afetados e, assim, doenças como artrite reumatoide, diabetes, aterosclerose, deficiência da função cognitiva, e também a degeneração muscular que é relacionada à idade podem ser devido a deficiência de Zn (WESSELS; MAYWALD; RINK, 2017). Nos idosos que não fazem suplementação vitamínica, a deficiência leve de Zn é um problema clínico significativo (PRASAD *et al.*, 1993). Além disso, estudos demonstram que a deficiência de Zn pode resultar em atrofia do sistema linfóide e em crianças pode causar alterações cerebelares anormais prejudicando respostas comportamentais e emocionais (BLACK, 1998; PATTEN; BRONZERT, 2015).

Assim como a deficiência, o excesso de Zn também é prejudicial e está associado à supressão da resposta imune, diminuição da lipoproteína de alta densidade (HDL) e a redução das concentrações de cobre no plasma sanguíneo (JEN; YAN, 2010).

### **1.1.2. Ácido ascórbico**

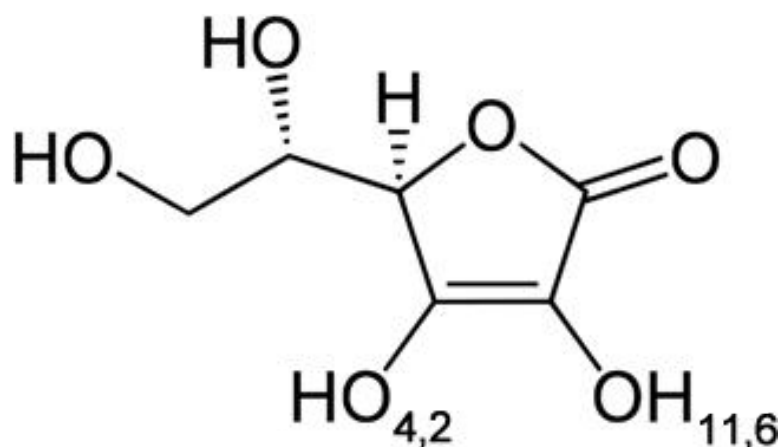
O ácido ascórbico (AA), mais conhecido como vitamina C, é um antioxidante intracelular que também atua como um neuromodulador de neurotransmissão mediada pela dopamina e glutamato. No sistema imunológico está envolvida em várias funções, como quimiotaxia, motilidade leucocitária, atividade bactericida e transformação de linfócitos, além disso, o AA tem a capacidade de proteger o organismo dos danos provocados pelo estresse oxidativo, ou seja, do excesso de radicais livres no organismo (LI *et al.*, 2015). O AA é muito importante no combate às hemorragias e no fortalecimento do sistema imunológico, pois auxilia na absorção do ferro (KLIMCZAK *et al.*, 2007).

Quimicamente, o AA é a mais simples das vitaminas e é a mais produzida industrialmente. A vitamina C é naturalmente encontrada em alimentos cítricos, como por exemplo no limão, laranja, pimentão, espinafre, acerola, entre outros. Apesar desta vitamina estar presente em diversos alimentos, nem todos conseguem ingeri-la pela dieta alimentar comum, uma vez que grande parte da população não consome esses alimentos. Desta forma os suplementos de vitamina C são amplamente consumidos em todo o mundo (DAVIES; AUSTIN; PARTRIDGE, 1991).

Uma das consequências da deficiência de AA é o escorbuto, caracterizado pelo enfraquecimento geral, hemorragia, hálito fétido, sangramento das membranas gengivais e mucosas. Outros sintomas causados pela deficiência de AA são a predisposição à doenças virais, feridas na pele, bronquite e pneumonia (DAVIES; AUSTIN; PARTRIDGE, 1991).

O excesso da ingestão de AA pode causar hipervitaminose, o que pode gerar intoxicação, diarreia, convulsão estomacal e, além disso, pode acarretar em cálculos urinários, já que a vitamina C se liga ao cálcio e forma oxalato de cálcio, provocando o aparecimento de pedras nos rins. O consumo em excesso também pode promover um aumento excessivo da absorção de ferro (DAVIES; AUSTIN; PARTRIDGE, 1991). A estrutura molecular da molécula de AA está apresentada na Figura 1.

**Figura 1** – Estrutura molecular do ácido ascórbico e os respectivos valores de pKa.



**Fonte:** <https://chemicalize.com/app/dashboard>. Acesso em 30/10/21 às 13:00 hs.

### 1.1.3. Formulação farmacêutica contendo Zn e AA

Os comprimidos efervescentes contendo AA e Zn em sua composição são muito populares e facilmente acessíveis em todo o mundo. Em combinação com o AA, o Zn contribui para a proliferação e manutenção adequada das células imunocompetentes, além de auxiliar na promoção de anticorpos (FABRIS; MOCHEGANI, 1995; FABRIS, N., MOCHEGANI, E., 1998; FRAKER *et al.*, 2000).

Quando se trata de crianças, a alimentação deve ser a principal fonte para fornecer esses nutrientes essenciais. Contudo, a suplementação de AA e Zn também é muito utilizada, especialmente nas regiões que ainda estão em desenvolvimento nutricional, onde este tipo de intervenção possui um papel fundamental na saúde e imunidade dessas crianças (MAGGINI; WENZLAFF; HORNIG, 2010). Dados de vários países da Ásia e América Latina indicam que deficiências de AA e Zn em crianças continuam em níveis alarmantes. Um estudo realizado no ano de 2010 mostrou que as evidências são cada vez maiores de que a deficiência de AA e Zn afetam adversamente os aspectos físicos e de crescimento mental das crianças, além de também prejudicar suas defesas imunológicas (MAGGINI; WENZLAFF; HORNIG, 2010).

#### **1.1.4. Contextualização**

As técnicas empregadas na preparação de formulações farmacêuticas, principalmente os procedimentos de mistura de substâncias ativas e adjuvantes (substância que “reforça” a ação da substância ativa) constitui-se numa etapa crítica. As adulterações, falhas operacionais e falsificações de medicamentos geram um problema de saúde preocupante. A baixa qualidade advinda das falhas operacionais são frequentemente associadas a um processo de produção descontrolado (RAJH VIDAL; AUGELLI; LUCIO DO LAGO, 2013). As adulterações e falsificações em produtos farmacêuticos incluem a substituição do medicamento por placebos, que não contém nenhum princípio ativo, adição de alguma substância que não está descrita na bula, com objetivo de potencializar algum efeito do medicamento e até mesmo a adulteração da quantidade do princípio ativo, reduzindo, e às vezes até anulando o efeito do medicamento (CUNHA, 2013).

Diante deste cenário, faz-se necessário o desenvolvimento de metodologias analíticas para a determinação de princípios ativos em formulações farmacêuticas e não apenas em amostras biológicas. Segundo a Farmacopeia Americana (THE UNITED STATES PHARMACOPOEIA, 2002), quando dois ou mais princípios ativos estão combinados em única formulação farmacêutica, o método considerado padrão ou o mais indicado para a quantificação (controle de qualidade) é a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) com detecção no ultravioleta. A priorização e recomendação do uso da cromatografia se deve à sua automatização, possibilidade de análises simultâneas e principalmente, ao seu campo de ação, pois a técnica, além de apresentar alta precisão, permite o controle de qualidade de um número considerável de formulações disponibilizadas no mercado.

Entretanto, algumas características da eletroforese capilar (CE – do inglês, “*Capillary electrophoresis*”) e da análise por injeção em batelada (BIA - do inglês, “*Batch injection analysis*”) as tornam técnicas bastante atrativas para análise desses tipos de formulações. Ambas são de simples operação, baixo custo (por exemplo, em CE o custo dos capilares é significativamente menor que o das colunas cromatográficas), geralmente rápidas e utilizam um pequeno volume de amostras e reagentes. Além disso, diferente da técnica de HPLC (uso comum de solventes orgânicos) a água é o solvente mais utilizado em CE e em BIA. Portanto, o volume e a toxidez dos resíduos gerados são menores quando comparada à técnica de HPLC. Por estas razões, ambas as técnicas utilizadas neste trabalho apresentam baixo impacto ambiental.

#### **1.1.5. Métodos para determinação simultânea de Zn e AA**

Uma análise simples e rápida para uma formulação contendo Zn e AA não é algo tão simples, pois os analitos possuem características físico-químicas muito diferentes; o Zn é



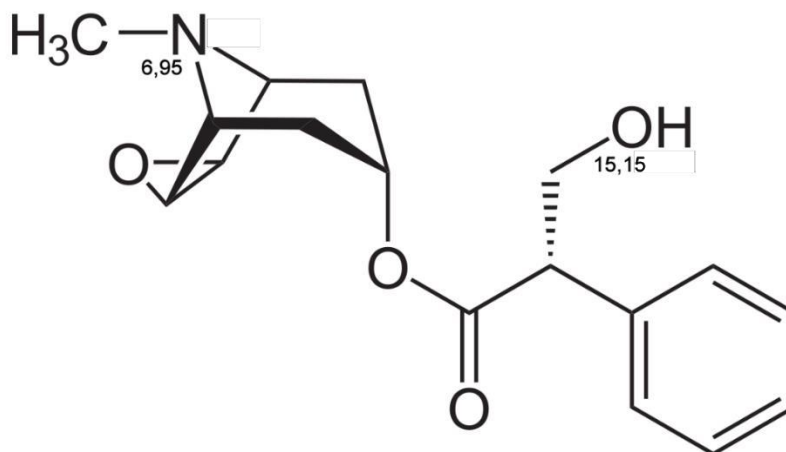
um metal de transição e o AA é uma molécula orgânica. Várias metodologias analíticas já foram exploradas para a determinação de Zn ou de AA. A maioria dos procedimentos para a determinação de Zn são baseados em análises espectrofotométricas (AMIN, 1994; CHEN, JIANRONG; TEO, 2001; ISKANDER; KLEIN; BAUER, 1986; KRYSSTEK; KOBYLECKA; PTASZYNSKI, 1993; ÖZCAN; AL JUHAIMI, 2012; TEIXEIRA, 2000; UDOH, 1995). Além dos métodos espectrofotométricos, métodos voltamétricos de redissolução (BARTON *et al.*, 2016; LEWIN; PEDRERO; VILARIÑO, 1986) e a eletroforese capilar (DE CARVALHO *et al.*, 2009; KUBÁŇ, PAVEL *et al.*, 2011; LOPES; COELHO; GUTZ, 2011; RIBEIRO *et al.*, 2016) também foram usados para a determinação de Zn. Na determinação de AA, muitos métodos analíticos já foram desenvolvidos conforme pode ser observado em artigos de revisão publicados sobre o assunto (PISOSCHI *et al.*, 2014; WANG, XU *et al.*, 2018; YEBRA-BIURRUN, 2000). No entanto, até hoje, nenhum método foi desenvolvido para a determinação simultânea de AA e Zn.

## 1.2. PARTE 2: Escopolamina e brometo de butilescopolamina

### 1.2.1. Escopolamina (SCO)

Dentre os vários alcalóides tropanicos naturais, o bromidrato de hioscina ou escopolamina ( $C_{17}H_{21}NO_4$ , SCO; Figura 2), é encontrado em diversas plantas da família *Solanaceae*, cujas representantes mais conhecidas são a *Datura stramonium* e a *Atropa belladonna* (STEENKAMP *et al.*, 2004). Essas plantas são utilizadas para fins medicinais devido às suas ações anticolinérgicas, antieméticas, antiespasmódicas e parassimpatolíticas (GAMAL, 2020).

**Figura 2** - Fórmula estrutural da escopolamina (SCO) e os respectivos valores de pKa.



**Fonte:** <https://chemicalize.com/app/dashboard>. Acesso em 30/10/21 às 13:00 hs.

A SCO é uma amina terciária que possui alto grau de penetração no sistema nervoso central (LAUWERS *et al.*, 1983) e pode causar um efeito inibitório sobre receptores muscarínicos de acetilcolina, que influencia as vias de neurotransmissão da memória. Por afetar o núcleo basal de Meynert, o consumo de SCO pode ter efeitos sobre a memória (amnésia) e a cognição de usuários (URIBE *et al.*, 2005). Portanto, dependendo da dosagem, a SCO é capaz de causar efeitos analgésicos, sedativos, fadiga, transtorno mental, amnésia e alucinações (CUNHA *et al.*, 2017; GAMAL, 2020).

Os alcalóides tropânicos possuem efeitos que são extremamente dependentes da dose e podem levar à morte por paralisia respiratória. A SCO é insípida, inodora e facilmente absorvida no trato gastrointestinal e pode ser administrada por via oral, dérmica ou por inalação (URIBE *et al.*, 2005). Por esse motivo, a SCO atua como um potente sedativo que facilita roubos e crimes sexuais quando adicionada às bebidas (VAN SASSENBROECK *et al.*, 2005). A literatura aborda diversos exemplos de estudos de caso e relatos de crimes praticados onde a presença da SCO foi constatada (DURÁN, 2012; SÁIZ *et al.*, 2013a; URIBE *et al.*, 2005).

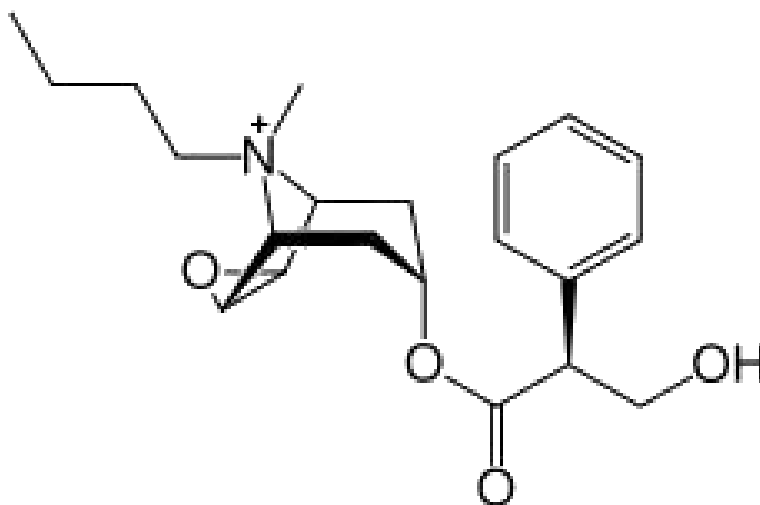
O uso abusivo de SCO é muito arriscado, uma vez que a dose que provoca as alucinações é muito próxima da dose letal. Algumas reportagens abordam alguns casos de morte e internações pelo uso abusivo da SCO (20 MINUTOS, 2011; EUROPAPRESS, 2011).

No contexto clínico, devido ao alto grau de penetração no sistema nervoso central, a SCO é utilizada para combater enjoos e como adjuvante da anestesia. A alta potência, o rápido início de ação e os efeitos amnésicos da SCO levaram a sua inclusão nos testes para casos de doenças degenerativas, como a demência, por exemplo (MINTZER; KLEYKAMP; GRIFFITHS, 2010). O início dos sintomas clínicos é rápido, levando cerca de 15 a 30 minutos e a duração dos efeitos pode durar até 2 a 3 dias, dependendo da dose administrada (BECHTEL; HOLSTEGE, 2007).

### **1.2.2. Brometo de butilescopolamina (BSCO)**

O BSCO possui fórmula estrutural  $C_{21}H_{30}BrNO_4$ , Figura 3, e é um sal orgânico alcalino que faz parte dos alcalóides tricíclicos quaternários de amônio. Estas espécies são compostas de duas partes principais, sendo uma parte, que é relativamente volumosa, constituída por compostos orgânicos tricíclicos ligados entre si através de um átomo central de nitrogênio. A outra parte é um ânion ligado (GAMAL, 2020).

**Figura 3** - Fórmula estrutural da N-butil brometo de escopolamina (BSCO).



**Fonte:** <https://chemicalize.com/app/dashboard>. Acesso em 30/10/21 às 14:00 hs.

A BSCO é um exemplo de composto desenvolvido a fim de minimizar os efeitos tóxicos e indesejados da SCO. Dentre vários compostos de aminas quaternárias semelhantes a SCO, a BSCO foi sintetizada de tal forma que sua alta polaridade impede a absorção da droga no trato gastrointestinal e não cruza a barreira hematoencefálica. Essas modificações permitem que a BSCO possa estar presente em várias formulações farmacêuticas que raramente ocasionam efeitos no sistema nervoso central (GAMAL, 2020).

A BSCO é um medicamento antiespasmódico utilizado mundialmente sob o nome comercial de buscopan®. Além da função antiespasmódica, a BSCO pode ser usada como analgésico, medicamento antiespasmódico cervical local durante o trabalho de parto, cólica biliar, cálculo distal na uretra, além de ser a pré-medicação utilizada em colonoscopias (GAMAL, 2020).

### 1.2.3. Contextualização

As drogas facilitadoras de crime e/ou estupro são geralmente conhecidas no mundo por termos em inglês, como “*drug-facilitated sexual assault*” (DFSA), “*drink spiking*” e/ou “*date rape*”, ou simplesmente como “boa noite, Cinderela”, no Brasil. Essas substâncias incapacitantes são comumente adicionadas à bebidas a fim de fazer com que a vítima perca a capacidade de resistir à roubos ou práticas sexuais não consentidas (DEVORE; SACHS, 2011).

Comumente, a droga de estupro é adicionada à bebida de um indivíduo, que pode ser alcoólica ou não, com intuito de o incapacitar conscientemente para em sequência praticar algum tipo de roubo ou abuso sexual. Dependendo da dose administrada, a amnésia acontece logo após a ingestão da substância e esta é a principal característica das drogas selecionadas para esta finalidade. Além de amnésia, as vítimas deste tipo de crime relatam alguns sintomas como, queda de pressão, náusea, bradicardia, confusão, tontura, julgamento prejudicado, sonolência, descontrole muscular e perda de consciência (BERTOL *et al.*, 2018).

Existem uma grande variedade de fármacos e drogas ilícitas que podem ser utilizados com essa finalidade. Os efeitos adversos dessas substâncias podem ser aumentados mediante ingestão concomitante de bebidas alcoólicas. Em alguns casos, o efeito da droga pode ser confundido com embriaguez excessiva. Existem diversos relatos de DFSA reportados na literatura (ANDERSON; FLYNN; PILGRIM, 2017; BERTOL *et al.*, 2018; BOSMAN; VERSCHRAAGEN; LUSTHOF, 2011; CABALLERO; JORGE; LANDEIRA, 2017; HURLEY; PARKER; WELLS, 2006; MCBRIERTY; WILKINSON; TORMEY, 2013) e os diversos casos relatados indicam uma preocupação mundial no papel significativo dessas drogas, nos casos de estupro.

#### 1.2.4. “Boa noite, Cinderela!”

A SCO é um tipo de DFSA muito utilizada com a finalidade de sedação e amnésia (prática popularmente conhecida como “Boa noite, Cinderela”). Além da SCO diversas outras substâncias também são utilizadas com essa mesma finalidade, como, por exemplo, o GHB (gama-hidroxibutirato), flunitrazepam, midazolam e cetamina. Além desses, outros benzodiazepínicos e sedativos-hipnóticos, como barbitúricos, opioides, anti-histamínicos e anticolinérgicos também são utilizados (BECHTEL; HOLSTEGE, 2007).

Por causa das propriedades sedativas e amnésicas dessas drogas, as vítimas na maioria das vezes não mantêm memória de um acometimento, apenas uma consciência ou sensação de que foram violadas, por isso, não conseguem relatar de forma clara os ataques sofridos do agressor (GRELA; GAUTAM; COLE, 2018). Desta forma, os vestígios da presença da droga utilizada no crime ou dos seus metabólitos presentes nos fluidos corporais são a única evidência contra quem praticou o crime de abuso (ADAMOWICZ; KAŁA, 2010).

Além da finalidade criminosa, a SCO também é utilizada como droga de abuso com finalidades alucinógenas. Existem muitos casos de intoxicação, em que os pacientes são admitidos em unidades hospitalares com instabilidade, distúrbios visuais e confusão após sua ingestão (LAUWERS *et al.*, 1983; VALLERSNES *et al.*, 2009).

A BSCO, que é derivada da SCO, não é uma substância capaz de causar efeitos alucinógenos, já que sua alta polaridade, impede o cruzamento da barreira hematoencefálica, e, por isso, não é considerada uma amostra de interesse forense. Entretanto, conforme relatado em diversos trabalhos encontrados na literatura, a BSCO pode ser facilmente convertida em SCO. Alguns estudos relatam casos de overdose de presidiários causados pela inalação de fumaça de cigarros contendo comprimidos triturados de BSCO – “buscopan®” (JALALI; AFSHARI; BABAEI, 2014; LAUWERS *et al.*, 1983). Casos de consumo de SCO

por usuários que à sintetizaram em casa a partir da BSCO também são relatados na literatura (KUMMER *et al.*, 2016).

Em todos os estudos de caso citados anteriormente, análises realizadas pela perícia nos conteúdos ingeridos pelos pacientes mostrou a presença de SCO. Este fato pode ser explicado pela conversão da BSCO em SCO pela ação de altas temperaturas. Outro fator que deve ser considerado é a contaminação acidental com SCO na preparação do medicamento que deveria conter apenas BSCO.

#### **1.2.5. Métodos de determinação de SCO e BSCO em diversas amostras**

Diferentes técnicas têm sido utilizadas na determinação individual da BSCO ou SCO em diferentes tipos de matrizes. A literatura apresenta trabalhos para determinação de SCO em fluidos biológicos e amostras farmacêuticas por HPLC (PAPADOYANNIS *et al.*, 1994b; WHELPTON *et al.*, 1992), em soro sanguíneo, extrato vegetal e urina por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC-MS) (CHERKAOUI *et al.*, 1998b; NAMERA *et al.*, 2002; OERTEL *et al.*, 1996), em amostras farmacêuticas, biológicas e bebida utilizando técnicas voltamétricas (FARHADI; KARIMPOUR, 2007; OLIVEIRA, THIAGO DA COSTA *et al.*, 2016; SANTOS *et al.*, 2014) e potenciométricas (AFKHAMI; SHIRZADMEHR; MADRAKIAN, 2014; EL-HAFEEZ MOSTAFA, 2002).

A determinação de SCO utilizando um sistema CE-C<sup>4</sup>D foi feita em formulações farmacêuticas (BADAWY; ISSA; MUTAIR, 2005), em amostras de bebidas e em produtos de beleza (SÁIZ *et al.*, 2013b). O tempo de análise para determinação da SCO em bebidas foi de 3,5 minutos com um acondicionamento do capilar num período de 4 minutos entre cada análise.

Os procedimentos desenvolvidos para a determinação da BSCO compreendem métodos titulométricos, espectrofotométricos, cromatográficos, eletroforéticos e eletroquímicos que estão relatados em uma recente revisão (GAMAL, 2020).

Em outro trabalho encontrado na literatura, a eletroforese capilar em meio não aquoso (NACE) foi utilizada para a determinação de diversos alcaloides tropânicos e, dentre estes, a SCO e BSCO (CHERKAOUI *et al.*, 1999). Neste trabalho, solventes orgânicos foram utilizados na composição do BGE para a separação dos isômeros litorina e hiosciamina em extratos vegetais com um tempo de análise de aproximadamente 6 minutos. O método desenvolvido de determinação da SCO e BSCO não foi avaliado com a análise de amostras reais.

Em geral, a maioria das técnicas analíticas não são capazes de distinguir a SCO de seus derivados devido à similaridade dos compostos. Além disso, o desenvolvimento de técnicas para a determinação dessas espécies não é uma tarefa fácil, levando em consideração a sua alcalinidade, polaridade relativamente alta e a baixa volatilidade. Nesse cenário, métodos analíticos que possibilitem a determinação da SCO e seus derivados é de grande importância, principalmente se for um método simples, rápido, eficaz e que utiliza quantidades mínimas de amostras e reagentes.

### **1.3. Contribuições analíticas**

Considerando todo o contexto abordado, as indústrias farmacêuticas e os órgãos de controle qualidade buscam constantemente novos métodos analíticos rápidos, econômicos e confiáveis para determinação simultânea de diversos princípios ativos presentes em formulações farmacêuticas. Da mesma forma, o desenvolvimento de métodos analíticos que podem contribuir com o trabalho da polícia em investigações criminais é de grande



relevância. A determinação simultânea da SCO e seu derivado BSCO, pode ser aplicado tanto em análises de amostras de interesse forense, quanto para garantir a não contaminação de uma formulação farmacêutica por SCO, ou até mesmo identificar uma possível conversão de BSCO em SCO em alguma parte do processo de produção do fármaco.

De maneira geral, as pesquisas para o desenvolvimento de novos métodos analíticos, seja para análise de amostras farmacêuticas ou forenses, buscam eficiência, confiabilidade, baixo custo e também menor geração de resíduos, uma vez que a questão ambiental vem tendo cada vez mais relevância (BASÁEZ *et al.*, 2008). Existem trabalhos na literatura que abordam em que nível um método analítico é considerado ambientalmente verde através de métricas (GALUSZKA *et al.*, 2012; HICKS *et al.*, 2019; PENA-PEREIRA; WOJNOWSKI; TOBISZEWSKI, 2020). Segundo os autores deste trabalho, alguns parâmetros podem ser considerados na avaliação de um método de análise: (i) tipo e necessidade de tratamento de amostras; (ii) quantidade de amostra utilizada; (iii) possibilidade de análise *in-situ*; (iv) possibilidade de integração dos processos analíticos; (v) automatização e miniaturização do sistema; (vi) uso ou não de derivatização; (vii) geração de resíduos e seu tratamento; (viii) possibilidade de determinar mais de uma espécie em uma única corrida; (ix) quantidade de energia utilizada; (x) origem dos reagentes (se é obtido de fontes renováveis); (xi) utilização de reagentes tóxicos e (xii) o nível de segurança de quem opera o equipamento (PENA-PEREIRA; WOJNOWSKI; TOBISZEWSKI, 2020).

## **1.4. Técnicas empregadas**

### **1.4.1. Eletroforese Capilar (CE)**

Em 1930, o sueco Arne Wilhelm Kaurin Tiselius, em um trabalho pioneiro, descreveu a utilização da técnica de eletroforese na separação de proteínas do soro sanguíneo (SVEDBERG; TISELIUS, 1926). Este trabalho, desenvolvido no período de doutorado de

Tiselius, rendeu a ele o Prêmio Nobel de Química de 1948. Basicamente, a amostra era colocada em um tubo (na forma de U) preenchido com solução tampão e um potencial elétrico era aplicado nas extremidades do tubo, por conseguinte, os analitos migravam por atração coulômbica de acordo com suas cargas.

Na época, Tiselius não conseguiu zonas distintas de separação, pois os tipos de suportes utilizados (papel, géis, dentre outros), não dissipavam satisfatoriamente o calor produzido quando o potencial elétrico era aplicado. Além disso, era comum ocorrer distorções das bandas do soluto, uma vez que esses suportes apresentavam elevadas áreas superficiais, o que gera maior adsorção dos analitos.

Muitos anos mais tarde, em 1967, Hjerten, que integrava o grupo de pesquisa de Tiselius, propôs a aplicação de campos elétricos mais elevados em tubos com diâmetro interno de 300  $\mu\text{m}$  e comprimento total de 36 cm, os quais eram submetidos a voltagens de 2,5 a 3,0 kV sob rotação contínua e, desta forma, zonas mais distintas de separação foram observadas (S. HJERTEN, 1967). O fluxo eletrosmótico (EOF) só foi melhor compreendido no ano de 1974 por Pretorius e colaboradores, em um trabalho em que foi demonstrado a vantagem desse tipo de fenômeno quando comparado com o fluxo laminar (PRETORIUS; HOPKINS; SCHIEKE, 1974). No mesmo ano, o pesquisador Virtanen utilizou tubos com diâmetros muito menores para realizar as separações eletroforéticas, esses tubos tinham cerca de 50 a 200  $\mu\text{m}$  de diâmetro interno (VIRTANEN, 1974).

Em 1981, Jorgenson e Lukacs demonstrou a capacidade da CE em realizar diversos tipos de separação, o que tornou a técnica bem mais conhecida. No equipamento desenvolvido foram utilizados capilares de vidro com diâmetro interno muito pequeno (75  $\mu\text{m}$ ). A diminuição do diâmetro interno do capilar aumentou muito a relação entre superfície do capilar e volume, desta forma, o efeito Joule causado pela geração de calor através da passagem de corrente foi minimizado e, portanto, a aplicação de campos elétricos mais

elevados foi possível, aumentando significativamente a eficiência das separações (JORGENSEN; LUKACS, 1981).

#### 1.4.1.1. Abordagem teórica

A eletroforese tem como princípio básico a migração diferenciada de determinadas espécies dentro de uma solução eletrolítica quando submetidas à ação de um campo elétrico. Basicamente, a separação ocorre devido as diferenças de mobilidades existentes entre as espécies presentes no interior do capilar por meio de diferentes modos de separação, mecanismos singulares e seletividade característica (TAVARES; M., 1995). A CE é caracterizada pelo uso de volumes bastante reduzidos de amostra (1 – 10 nL) e pela versatilidade, pois com um mesmo capilar é possível separar desde íons inorgânicos (cloretos, sódio, por exemplo) até macromoléculas, como por exemplo proteínas e aminoácidos, alterando-se o eletrólito de corrida (BGE, do inglês, “*background electrolyte*”) (TAVARES, 1997).

Quando comparada com outras técnicas de separação, como por exemplo a cromatografia líquida, algumas vantagens podem ser associadas a CE. Pode-se destacar a utilização de pequenos volumes de reagentes e amostras (o que gera um menor impacto ambiental e menor custo de operação). Outra vantagem da CE está relacionada à instrumentação relativamente simples, e esta característica permitiu que muitos grupos de pesquisa produzissem seus próprios equipamentos, como é o caso do equipamento utilizado neste trabalho (DE CARVALHO *et al.*, 2009; FRANCISCO; DO LAGO, 2009; FRACASSI DA SILVA; DO LAGO, 1998).

A CE é uma técnica que compreende diferentes mecanismos de separação. Os principais modos de separação que foram desenvolvidos incluem: eletroforese capilar em

gel (CGE); eletroforese capilar de zona (CZE); focalização isoelétrica capilar (CIEF); isotacoforese capilar (CITP); eletroforese capilar por afinidade (CAE); cromatografia eletrocínética micelar capilar (MEKC) e eletrocromatografia capilar (CEC) (LANDERS, 2007). Os diversos modos de separação por CE, aliados às diferentes técnicas de detecção possíveis, possibilitam diversas aplicações desta técnica de separação (JORGENSEN, 1986; TAVARES, 1997; WHATLEY, 2001)

Dentre os modos de separação, a eletroforese capilar de zona (CZE – capillary zone electrophoresis) é a mais difundida. A CZE se baseia na migração de íons solvatados e também de espécies neutras, em meio de eletrólitos, quando um campo elétrico é aplicado. Neste modo de separação, a amostra é inserida na forma de um plug estreito. Quando a diferença de potencial é aplicada, cada zona migra de forma independente e constante, porém de forma diferenciada, característica da sua própria mobilidade. A literatura traz diversos artigos que abordam os aspectos teóricos (equações) relacionadas a CE (TAVARES; M., 1995; TAVARES, 1997). Trabalhos mais recentes usam animações computacionais para explicar os fundamentos básicos de CE de forma mais didática (VAZ; OLIVEIRA; OLIVEIRA, 2015).

#### 1.4.1.2. Mobilidades

A mobilidade dos analitos ou mobilidade eletroforética ( $\mu_{ep}$ ) é um parâmetro fundamental em CE que depende da carga do íon ( $z$ ), da viscosidade da solução ( $\eta$ ) e do raio efetivo do íon ( $r$ ). A  $\mu_{ep}$  pode ser estimada a partir da teoria de Debye–Huckel–Henry (Equação 1): (TAVARES; M., 1995).

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

Onde  $z$  é a carga da espécie;  $e$  a carga unitária;  $\eta$  a viscosidade do BGE;  $r$  o raio de Stokes da espécie.

Observa-se na Equação 1, que quanto menor o raio solvatado do íon, maior será a mobilidade eletroforética. Porém, quando dois íons possuem o mesmo tamanho, aquele com maior carga se moverá mais rapidamente (modo co-EOF). A natureza da carga do íon (se é positiva, negativa ou neutra) influenciará o sentido o qual o íon se move (no caso de espécies neutras, a  $\mu_{ep}$  é igual a zero).

É importante ressaltar que nem sempre as espécies vão estar totalmente ionizadas, como é o caso de bases ou ácidos orgânicos fracos, que podem estar parcialmente ionizados, ou seja, parte das espécies apresentam carga e a outra parte é neutra. Contudo, as espécies ionizáveis estão em constante equilíbrio e por isso migram em única banda (CZE). Neste caso, a migração referente a relação carga/raio irá depender do grau de ionização (dependente do pH) e esta relação é definida pela Equação 2 (TAVARES; M., 1995).

$$\vec{\mu}_{ef} = \sum_{j=1}^n \alpha_j \vec{\mu}_{epj} \quad \text{(Equação 2)}$$

Outro fenômeno importante, que pode estar presente em CE e que poderá influenciar na mobilidade das espécies em solução, sejam elas iônicas ou não, é o fluxo eletrosmótico (EOF, do inglês “electroosmotic flow”). Dependendo das condições (como por exemplo, a composição e pH do BGE, o tipo de capilar), pode ser que o EOF afete o movimento de todos os componentes de uma solução no interior do capilar quando um campo elétrico é aplicado.

O cálculo do  $\mu_{eo}$  envolve fatores como, a permissividade do BGE ( $\epsilon_s$ ), a permissividade no vácuo ( $\epsilon_o$ ), o potencial zeta ( $\zeta$ ) e a viscosidade da solução ( $\eta$ ) conforme definido na Equação 3 (TAVARES; M., 1995).

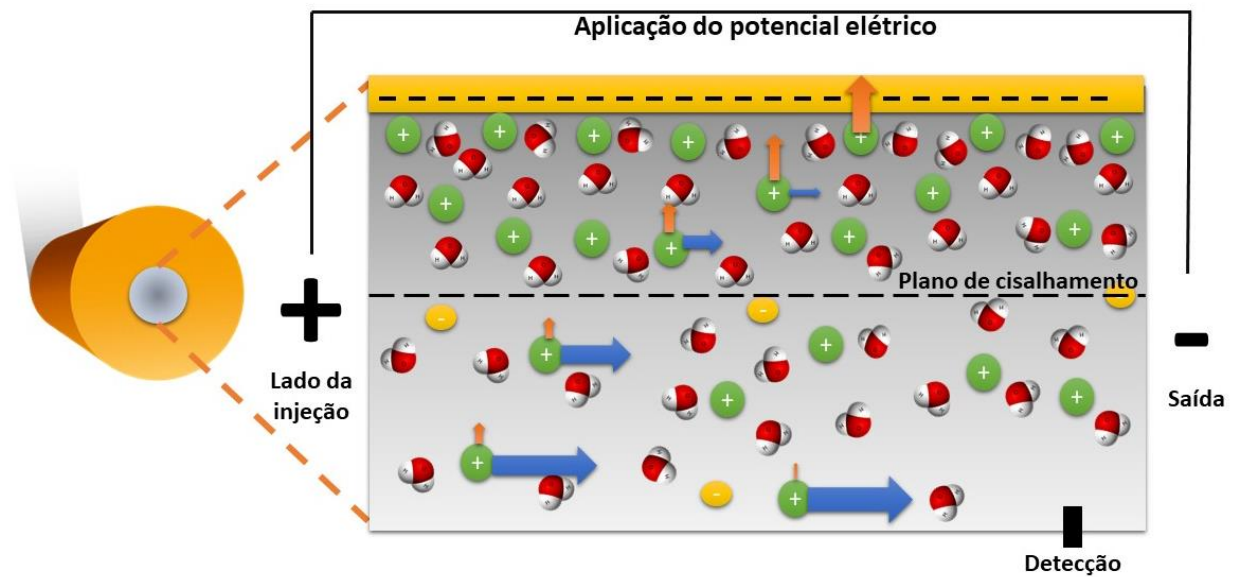
$$\vec{\mu}_{eo} = -\frac{\varepsilon_s \varepsilon_0}{\eta} \zeta \quad (\text{Equação 3})$$

Desse modo, a velocidade com que as espécies chegam até o detector ( $v_{ap}$ ) é a soma vetorial da  $\mu_{ep}$  e da  $\mu_{eo}$  multiplicada pelo campo elétrico aplicado (E), definida pela Equação 4.

$$v_{ap} = (\vec{\mu}_{ef} + \vec{\mu}_{eo})\vec{E} \quad (\text{Equação 4})$$

Dentre os materiais que podem ser utilizados para a fabricação de capilares (pirex, teflon, sílica), os constituídos de sílica fundida são os mais comuns. No capilar de sílica fundida cargas negativas podem ser geradas na parede interior do capilar devido à presença de grupos silanóis ionizáveis (SiOH) na superfície (pKa ~ 6). Esses grupos são significativamente ionizados, em valores de pH superiores a 3, resultando em uma superfície de silanoato (SiO<sup>-</sup>) carregada negativamente (VANORMAN *et al.*, 1990). Em valores de pH mais alcalinos, os grupos silanóis estarão mais desprotonados e, desta forma, a magnitude do EOF também será maior. Já em valores de pH mais ácidos, os grupos silanóis estão menos ionizados e a magnitude EOF é menor (LAMBERT; MIDDLETON, 1990; TAVARES; M., 1995). Uma ilustração do que ocorre na interface do capilar com a solução quando um campo elétrico é aplicado está apresentada na Figura 4.

**Figura 4** - Representação da interface do capilar com a solução.



**Fonte:** A autora.

Inicialmente, os íons positivos do BGE são atraídos pela parede negativa do capilar para formar uma camada fixa fortemente aderida à superfície, de forma a manter a eletroneutralidade do sistema. Esta camada é conhecida como plano interno de Helmholtz (IHP). Em seguida tem-se a formação de uma segunda camada, denominada plano externo de Helmholtz (OHP), pois ainda existe uma alta concentração de íons positivos na solução, mas agora menos atraídos pela parede negativa do capilar. Conforme se distancia da parede do capilar, a concentração desses contra-íons diminui gradativamente até alcançar o equilíbrio (cargas positivas = cargas negativas) com a concentração dos íons no seio da solução. Essa região é conhecida como a camada difusa da dupla camada elétrica (TAVARES; M., 1995).

A interface entre essas duas camadas formadas, onde ocorre o início da movimentação dos íons, é denominado "Plano de Cisalhamento" (PC). No PC existe um limite teórico no qual cada carga elétrica pode ser considerada independente da outra. Além disso, a formação dessa dupla camada elétrica gera uma diferença de potencial muito

próxima à parede do capilar, e este fenômeno é conhecido como potencial zeta ( $\zeta$ ). Esse potencial decai exponencialmente conforme se afasta da superfície do capilar (SCHWER; KENNDLER, 1991).

O  $\zeta$  é dependente da densidade de carga da superfície do capilar, que é dependente do pH da solução. Portanto, valores de pH mais alcalinos geram altos valores de  $\zeta$  e a magnitude do EOF também será alta, uma vez que os grupos silanóis estão mais ionizados. Já em pH menor, é esperado que o valor do  $\zeta$  e da magnitude do EOF sejam menores. Outro fator que também afeta a mobilidade do EOF é a força iônica do eletrólito de corrida. Pois na medida em que a força iônica aumenta, a dupla camada elétrica se torna mais compacta, resultando em uma redução do  $\zeta$  que por sua vez diminui a mobilidade do EOF (SCHWER; KENNDLER, 1991).

A aplicação de um campo elétrico inicia um processo de migração dos íons do BGE envolvidos na formação da dupla camada elétrica para os polos de carga oposta. Durante a migração tem-se uma transferência de momentos dos íons solvatados induzindo um fluxo de solução como um todo, este é o EOF. As cargas mais próximas da parede do capilar de sílica não migram, porém, as cargas positivas da camada difusa, são arrastadas em direção ao cátodo, o que caracteriza o EOF normal, onde ocorre uma migração líquida maior de cátions ( $\mu_{eo} + \mu_{ep}$ ) em direção ao cátodo comparada a migração líquida de ânions ( $\mu_{ep} - \mu_{eo}$ ) em direção ao ânodo (WEINBERGER, 2000). Uma analogia pertinente seria considerar o EOF normal como sendo a correnteza de um rio no qual os cátions nadam a favor da correnteza e os ânions contra a esta mesma correnteza.

Para a análise de ânions com alta mobilidade eletroforética é comum inverter o sentido do EOF para que a análise ocorra em tempos menores (ânions com velocidade maior ou igual ao do EOF) (FUERSTENAU, 1956; KUBÁŇ, PETR *et al.*, 2014). O método mais utilizado emprega a adição de tensoativos catiônicos a composição do BGE, principalmente



os derivados de sais quaternários de amônio de cadeia longa como o brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB, do inglês “cetyltrimethylammonium bromide”), para que a superfície do capilar forme uma pseudo parede com cargas positivas e, conseqüentemente, promova a inversão do sentido do EOF (para o lado anódico). (KANETA; TANAKA; TAGA, 1993; LUCY; UNDERHILL, 1996; TAVARES, 1997). A inversão ocorre pela interação eletrostática da “cabeça” polar do surfactante catiônico com a carga negativa do grupo silanol na superfície da sílica formando uma monocamada do surfactante. Uma segunda camada é formada pela interação das “caudas” hidrofóbicas dessas moléculas do surfactante na parede do capilar com as “caudas” de outras moléculas do mesmo surfactante, desta forma, a cabeça polar (positiva) fica voltada para a solução no interior do capilar. Neste caso, é comum as espécies aniônicas migrarem primeiro, seguida pelas espécies neutras (EOF) e, por fim, tem-se a migração das espécies catiônicas mais lentas que o EOF.

Uma outra característica que contribui para a alta eficiência de separação da técnica de CE está vinculada ao perfil radial da velocidade eletrosmótica. Neste tipo de perfil, um gradiente de velocidade se forma apenas na dupla camada, devido a atração das espécies pela superfície do capilar. Desta forma, no centro do capilar não há diferença de pressão para impulsionar a solução e um perfil planar que possui menor dispersão de bandas é esperado (HEIGER, 1997).

#### **1.4.2. Sistemas de detecção em CE**

O desempenho de uma técnica de separação está diretamente relacionado ao tipo de detector que é utilizado. Por este motivo, nas últimas décadas, diversos tipos de detectores vêm sendo abordados por estudiosos, com intuito de obter-se melhores resultados nas análises de inúmeros tipos de matrizes. Os detectores mais empregados em CE são os

detectores de espectrofotométricos no ultravioleta/visível (UV-Vis). Os detectores de fluorescência, espectrometria de massas e eletroquímicos também são utilizados. A seletividade é uma das características de um detector, que podem ser seletivos ou universais. Os detectores seletivos medem uma determinada propriedade do soluto e os detectores universais respondem a qualquer alteração no monitoramento do sinal quando a espécie cruza a janela de detecção (SPUDEIT; DOLZAN; MICKE, 2012).

O detector por UV-Vis é o mais utilizado em sistemas CE (HAQUE; STEWART, 1999). Neste tipo de detecção, comprimentos de onda na região do espectro onde os analitos de interesse apresentam absorvidade são utilizados, enquanto os eletrólitos empregados são constituídos por espécies com baixo coeficiente de absorção na mesma região. No entanto, a detecção indireta por meio da adição de um cromóforo no BGE também pode ser empregada, desta forma, uma diminuição na absorbância é medida, quando os analitos cruzam a janela de detecção. Para passagem de radiação no capilar de sílica é feita a remoção do revestimento de poliimida presente no capilar ou através do uso de uma célula de quartzo (ZEMANN, 2003).

Este detector tem limitações na determinação de espécies sem absorvidade na região UV-Vis e, no caso de cátions metálicos, como por exemplo o Zn, o uso da detecção indireta apresenta limitações em função do pH (precipitação) (NEHMÉ et al., 2010). Outra limitação do detector UV-Vis está relacionada à baixa detectabilidade devido ao reduzido caminho óptico do capilar, que acaba limitando o uso desse detector, quando limites de detecção muito baixos são requeridos. Para contornar essa questão, alguns artifícios podem ser usados, como a pré-concentração dos analitos dentro (online) do capilar ou antes da injeção (offline), a derivatização de compostos com baixa absorvidade e também a utilização de células (tipo “Z”) de alta sensibilidade (SWINNEY; BORNHOP, 2000).

Os detectores de fluorescência são os mais sensíveis e seletivos aplicados em CE, pois a fluorescência é medida contra uma radiação de fundo (background) bastante baixa, permitindo que pequenas quantidades de luz, emitidas pelos analitos, possam ser medidas, o que possibilita maior detectabilidade. Para as moléculas que não possuem fluorescência nativa, etapas de derivatização podem ser realizadas. Limites de detecção da ordem de  $10^{-13}$  mol L<sup>-1</sup> podem ser alcançados, dependendo da técnica utilizada e da geometria do detector (SWINNEY; BORNHOP, 2000; TAMIZI; JOUYBAN, 2015).

Dentre os detectores eletroquímicos, tem-se os amperométricos, os potenciométricos, e os condutométricos. Os detectores amperométricos baseiam-se na transferência de elétrons entre o analito de interesse e a superfície do eletrodo, no qual é aplicado um potencial. A transferência de elétrons, que ocorre no eletrodo, devido a reações de oxido-redução produz uma corrente que é proporcional a concentração do analito. O posicionamento do eletrodo (adaptação) dentro ou próximo do capilar não é tão simples, uma vez que pode haver interferência do campo elétrico do sistema CE no potencial aplicado na detecção amperométrica (MARK; SCHOLZ; MATYSIK, 2012; FRACASSI DA SILVA, 2003).

Os detectores potenciométricos baseiam-se na seletividade de microeletrodos que podem detectar pequenas quantidades de íons orgânicos e inorgânicos, que geram uma diferença de potencial com relação a solução que preenche o capilar (BGE) e o sensor. Essa diferença de potencial é medida e é diretamente proporcional à concentração do íon detectado (SWINNEY; BORNHOP, 2000).

Na detecção condutométrica, um potencial é aplicado em um par de eletrodos, os quais podem estar com ou sem contato com a solução eletrolítica. Quando os analitos passam entre os eletrodos a mudança de condutividade é medida. Essa variação de condutividade tem relação direta com a concentração dos analitos iônicos (ZEMANN *et al.*, 1998).

A utilização da espectrometria de massas para detecção em CE pode agregar em sensibilidade bem como pode ser usada para gerar informações estruturais adicionais da molécula (seletividade). Este tipo de detecção é muito utilizado quando se deseja realizar análises de produtos de degradação e metabólitos. Uma limitação desse tipo de detecção diz respeito a composição dos BGE utilizados, que por exemplo precisa ser volátil, desta forma tem-se uma limitação na faixa de pH de trabalho (ŠOLÍNOVÁ; KAŠIČKA, 2006).

#### **1.4.2.1. Detecção condutométrica sem contato acoplada capacitivamente (C<sup>4</sup>D)**

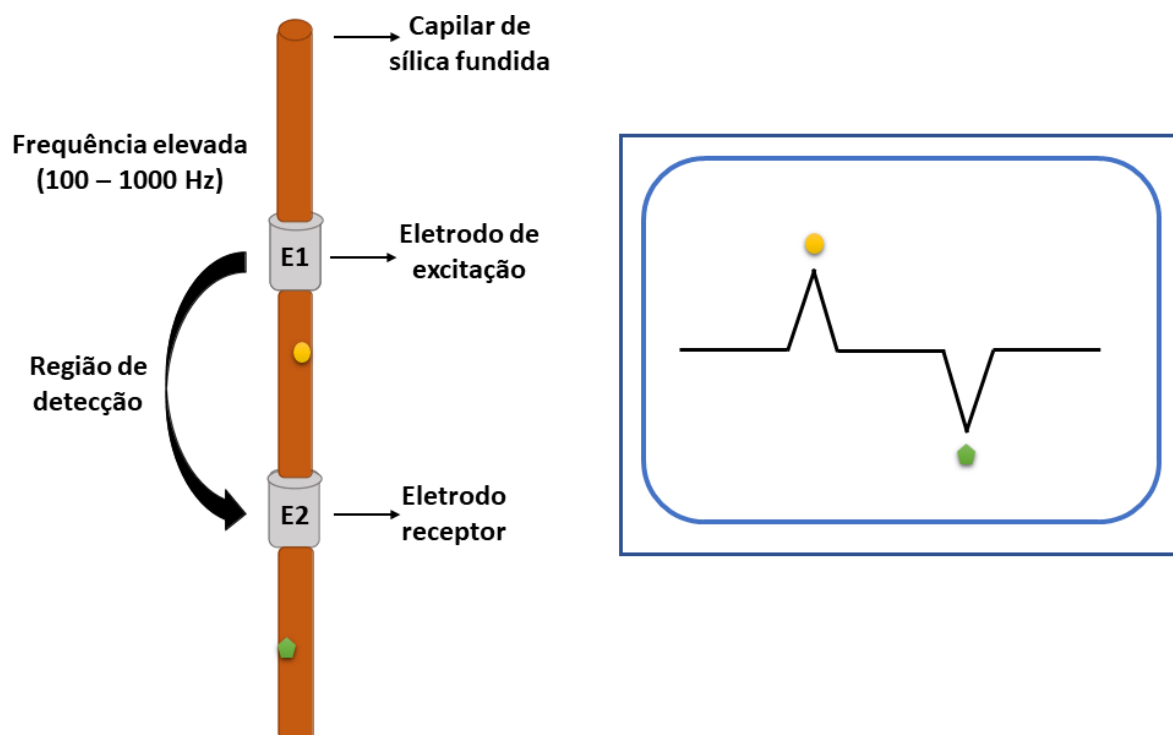
A história da detecção condutométrica teve início no ano de 1928 (ZAHN, 1928). Contudo, o uso da detecção condutométrica em eletroforese foi demonstrada somente no ano de 1972 com aplicação em isotacoforese (VAN DER *et al.*, 1972) e 1985 em CZE (DEML; FORET; BOČEK, 1985). Em 1998, a detecção condutométrica sem contato acoplada capacitivamente (C<sup>4</sup>D, do inglês “capacitively coupled contactless conductivity detection”) aplicada a CZE foi introduzida simultaneamente por Fracassi da Silva e do Lago (FRACASSI DA SILVA; DO LAGO, 1998) e por Zemann e colaboradores (ZEMANN *et al.*, 1998). Algumas revisões que abordam este tipo de detecção são descritas na literatura por Hauser e Kúbán (HAUSER; KUBÁŇ, 2020; KUBÁŇ, PAVEL; HAUSER, 2004a).

Uma característica importante do detector C<sup>4</sup>D, que é um detector universal, é a eliminação do risco de contaminação, uma vez que o detector não entra em contato com as soluções que fluem no interior do capilar. Além disso, por ser eletricamente isolado da solução eletrolítica, é comum apresentar melhor estabilidade e resposta analítica (ALVES BRITO-NETO *et al.*, 2005a).

Na detecção por C<sup>4</sup>D, um sinal senoidal de elevada frequência (de 100 a 1000 kHz) é aplicado a dois eletrodos integrados (geralmente metálicos) que estão posicionados ao

redor do capilar. Esses eletrodos monitoram continuamente a condutividade (que é proporcional a corrente gerada) de uma solução que flui através do capilar. Basicamente, um dos eletrodos atua como transmissor que emite um sinal senoidal de alta frequência de corrente alternada. O outro eletrodo atua como receptor, sendo fixado a uma distância pré-estabelecida para monitorar o sinal de corrente alternada que é atenuado pela impedância da região de detecção (ZEMANN *et al.*, 1998). Na medida em que a migração dos íons acontece, ocorre uma variação na condutividade e correspondente variação na corrente elétrica entre os eletrodos de detecção. O monitoramento contínuo desse sinal resulta em picos relacionados aos analitos separados, cujas intensidades dependem da concentração das espécies. Um esquema do funcionamento do detector está representado na Figura 5.

**Figura 5** - Esquema do sistema de detecção  $C^{4}D$  com representação dos dois eletrodos (E1 e E2) e o desenho que representa o eletroferograma com pico positivo e pico negativo.



**Fonte:** A autora.

O mecanismo de detecção se baseia no deslocamento do co-íon presente no BGE pelo íon a ser analisado. Por exemplo, quando a mobilidade ( $\mu$ ) do analito for maior/menor que a do co-íon do BGE ocorre um aumento/diminuição da condutividade na região do capilar e o detector é sensibilizado, obtendo o registro de um pico positivo/negativo no eletroferograma. Quanto maior for a diferença de mobilidade do BGE em relação ao analito, maior será a sensibilidade do detector, por isso o BGE possui papel fundamental na sensibilidade de cada analito. Alguns artigos de revisão abordam mais detalhes sobre os aspectos fundamentais da CE-C<sup>4</sup>D (ALVES BRITO-NETO *et al.*, 2005a, b; JOHNSTON *et al.*, 2005; KUBÁŇ, PAVEL; HAUSER, 2018, 2004b, c; WANG, CHUNLING *et al.*, 2020).

### **1.5. Voltametria de onda quadrada.**

A voltametria de onda quadrada (SWV, inglês square-wave voltammetry) é uma técnica voltamétrica diferencial rápida e sensível que possui limites de detecção comparáveis aos das técnicas espectroscópicas quando se trata, por exemplo, da determinação de alguns metais por redissolução e de moléculas orgânicas com comportamento reversível. Além disso, a técnica permite avaliação cinética e mecanística do processo eletródico que está sendo estudado, principalmente quando se trata de reações de cinética rápida (BARD *et al.*, 2003). Na SWV, a aplicação do potencial no eletrodo de trabalho se dá na forma de uma onda quadrada simétrica sobreposta em uma escada de potencial.

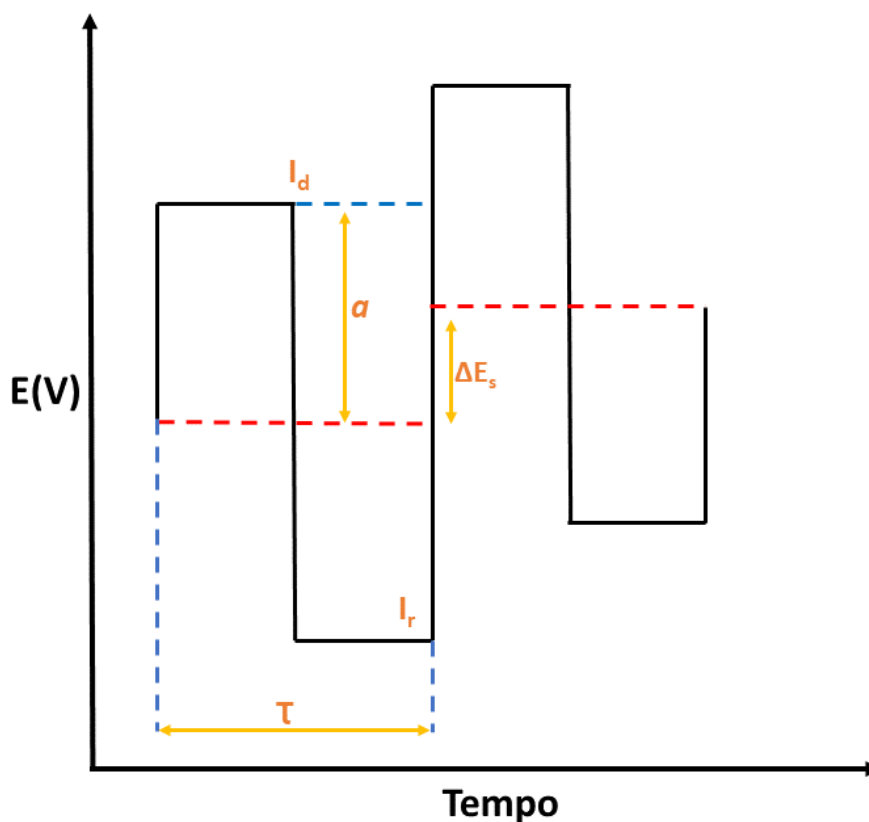
A aquisição do sinal na SWV é realizada no final da aplicação de cada degrau de potencial, de forma que a corrente faradaica seja obtida após a minimização da contribuição da corrente capacitiva, uma vez que o decaimento da corrente capacitiva com o tempo é mais rápido do que o decaimento da corrente faradaica (SOUZA; MACHADO; AVACA, 2003).

A corrente resultante é obtida através da subtração da corrente medida no final do pulso anódico ou catódico (direta) e a corrente medida no final do pulso catódico ou anódico (reversa), respectivamente. Como essas correntes possuem sinais opostos, elas se somam proporcionando um aumento da sensibilidade (principalmente quando os processos eletródicos são reversíveis) (HEINZE, 1981; SOUZA; MACHADO; AVACA, 2003; WANG, JOSEPH, 2006).

O formato da curva de corrente-potencial se dá pela aplicação de potenciais que possuem amplitude  $a$  (amplitude do pulso de potencial) e que variam de acordo com uma escada de potencial de altura  $\Delta E_s$  (incremento do pulso de potencial) por um período de tempo  $\tau$ . Uma representação deste esquema está apresentada na Figura 6.

Quando se trata da curva de potencial-tempo, a largura do pulso ( $\tau/2$ ) é chamada  $t$  e a frequência de aplicação dos pulsos é chamada de  $f$  e é dada por  $(1/t)$ . Ao final dos pulsos diretos e reversos, a corrente é medida e o sinal é obtido como uma intensidade da corrente resultante ( $\Delta I$ ) de forma diferencial. A forma de aquisição da corrente diminui consideravelmente a detecção da corrente capacitiva e, portanto, melhora o limite de detecção da técnica (SOUZA; MACHADO; AVACA, 2003).

**Figura 6** – Forma de aplicação de potencial na voltametria de onda quadrada.  $I_d$ : corrente direta;  $a$ : amplitude do pulso de potencial;  $\Delta E_s$ : incremento do pulso de potencial;  $I_r$ : corrente reversa;  $\tau$ : período.



**Fonte:** A autora (adaptado de WANG, 2006).

O modelo atual da SWV foi desenvolvido no final da década de 1970 (CHRISTIE; TURNER; OSTERYOUNG, 1977; TURNER *et al.*, 1977). Nesta versão, velocidades de varredura maiores que  $100 \text{ mVs}^{-1}$  eram utilizadas e as medidas de corrente eram realizadas apenas ao final do tempo de aplicação do pulso de potencial. Este fato melhorou a sensibilidade da técnica, ampliando consideravelmente seu campo de aplicação (SOUZA; MACHADO; AVACA, 2003).

Uma das vantagens da SWV em aplicações eletroanalíticas é a economia em tempo de análise pelo fato de, em muitos casos, a remoção do oxigênio dissolvido antes das análises não ser necessário. A eliminação desta etapa só é possível pelo fato de que na região de corrente limitante para a redução do oxigênio, a contribuição dos pulsos

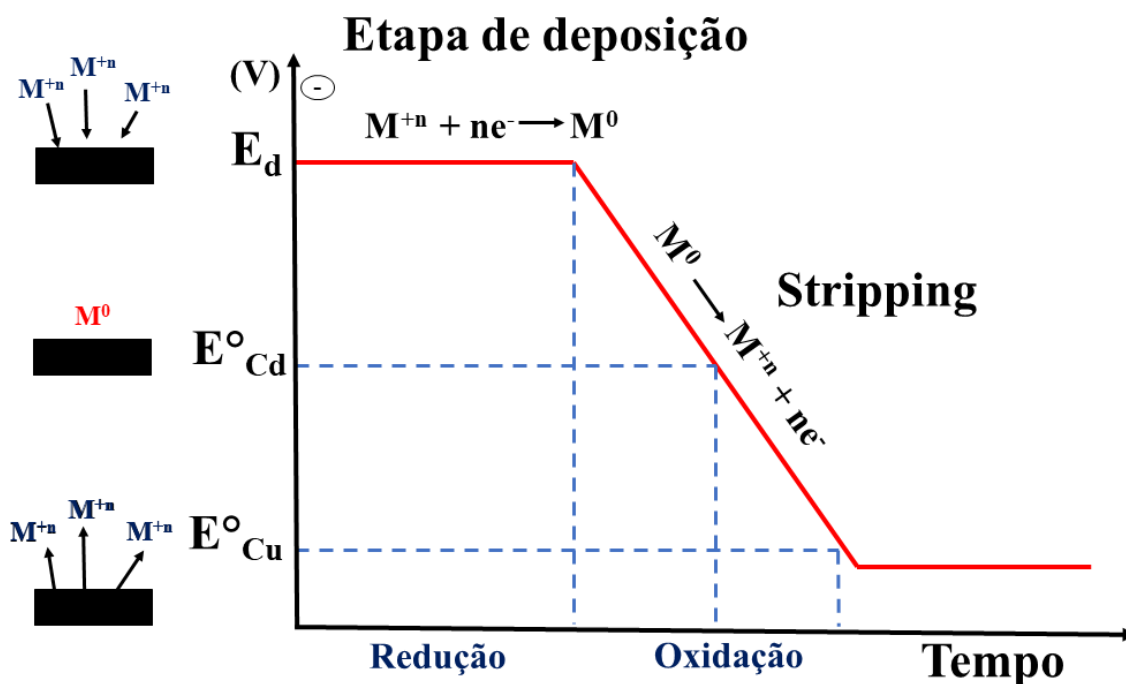


direto e reverso são iguais, o que leva a uma corrente líquida igual a zero (BARD et al., 2003). Além disso, na varredura que vai no sentido de potenciais negativos para potenciais positivos, a elevada velocidade de varredura limita o tempo para que espécies eletroativas de oxigênio difundam para a superfície do eletrodo. Esse procedimento é utilizado com bons resultados em voltametria de redissolução anódica, principalmente quando combinada com técnicas em fluxo (BRETT, CHRISTOPHER M.A; BRETT; TUGULEA, 1996; BRETT, CHRISTOPHER M A; OLIVEIRA BRETT; MITOSERIU, 1994; BRETT, CHRISTOPHER MARIA A.; BRETT; TUGULEA, 1996).

#### **1.5.1. Voltametria de redissolução anódica**

A voltametria por redissolução anódica (ASV, do inglês “*anodic stripping voltammetry*”) é uma técnica aplicável à cátions metálicos que podem ser depositados (por redução eletroquímica) sobre a superfície do eletrodo de trabalho. A deposição dos metais é feita sob potencial constante, com a solução mantida sob agitação, por um período de tempo controlado (BARD et al., 2003). As etapas envolvidas na análise por ASV são demonstradas na Figura 7.

**Figura 7** – Etapas envolvidas na voltametria de redissolução (stripping) anódica.



**Fonte:** A autora (adaptado de BARD et al, 2003).

Para a etapa de redução do metal ou metais de interesse, um potencial de aproximadamente 0,4 V mais negativo deve ser aplicado na etapa anterior que é a etapa de deposição (pré-concentração). O tempo em que a deposição do metal é feita, deve levar em consideração a faixa de concentração dos analitos, já que este tempo está diretamente relacionado à sensibilidade da técnica. Esta etapa de deposição é geralmente favorecida pela convecção (agitação) das espécies de interesse até a superfície do eletrodo de trabalho (BARD et al., 2003).

De forma resumida, uma pequena e reprodutível fração do metal presente na solução é depositada na superfície do eletrodo por um período de tempo pré-definido, após esse período de tempo, a eletrólise é interrompida e a convecção forçada é desativada. Na próxima etapa, o analito é redissolvido (oxidado) ou retirado do eletrodo mediante a varredura de potencial para valores mais positivos. O processo de varredura de potencial que ocorre

durante a etapa de redissolução é geralmente uma rampa linear de potencial ou um sinal voltamétrico pulsado que minimiza a interferência da corrente capacitiva (pulso diferencial ou onda quadrada) (FOGG; WANG, 1999).

Além da ASV existem outros dois tipos de voltametria de redissolução: a catódica e a adsortiva. A voltametria de redissolução catódica (CSV) consiste na polarização anódica do eletrodo a qual o composto é depositado (como óxido, por exemplo), seguida da eletroredução do óxido formado através da varredura de potencial no sentido catódico. A voltametria de redissolução adsortiva consiste na pré-concentração por adsorção da espécie eletroativa na superfície do eletrodo (com ou sem o uso de potencial). No caso de metais, um complexante adequado é adicionado à solução para a formação de um complexo (metal-ligante) e é esse complexo que será acumulado na superfície do eletrodo (DA SILVA, 2007).

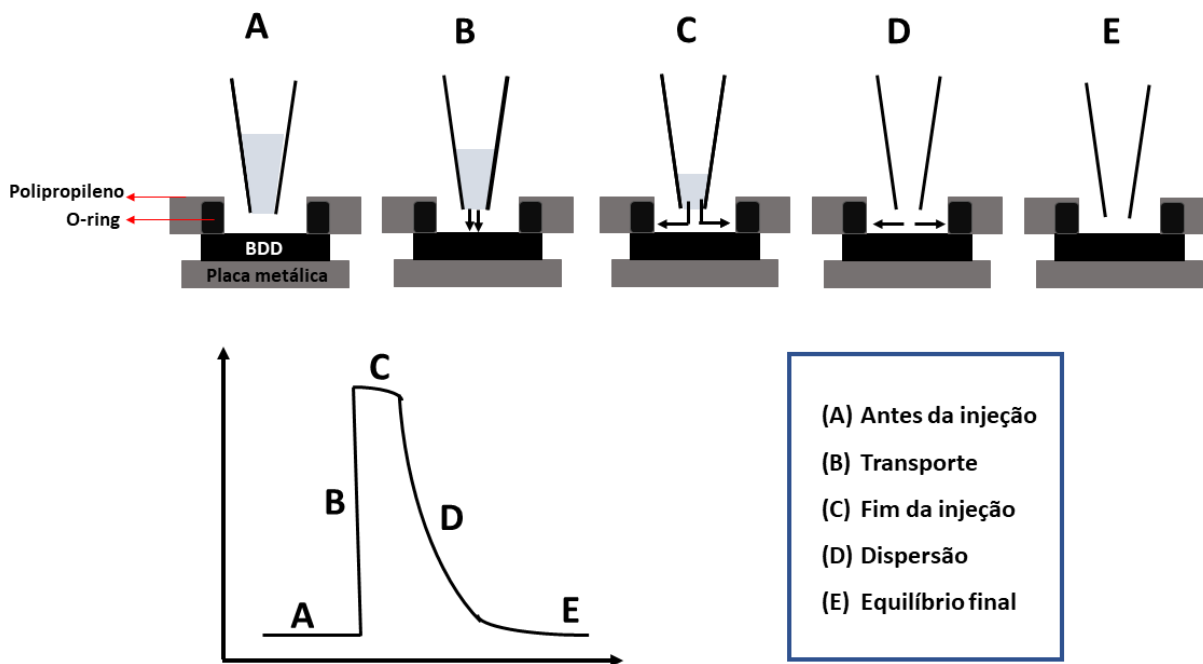
### **1.6. Análise por injeção em batelada (BIA)**

A BIA é uma técnica analítica inicialmente descrita na literatura no início da década de 90 (WANG, JOSEPH; TAHA, 1991). Nesta técnica, pequenos volumes, na ordem de 20 a 150  $\mu\text{L}$  de solução amostra ou padrão, são injetados com o auxílio de uma micropipeta eletrônica diretamente sobre um detector imerso em um grande volume de solução inerte.

Com a intenção de aumentar a frequência analítica, o sistema de BIA pode ser considerado uma alternativa em relação aos métodos baseados em análise por injeção em fluxo (FIA, do inglês “flow injection analysis”) (RAMSING; RŮŽIČKA; HANSEN, 1981). No sistema BIA, a posição do eletrodo de trabalho é oposta à ponteira do sistema de injeção, que é feita na configuração “wall-jet”, ou seja, diretamente sobre a superfície do eletrodo de trabalho (detecção eletroquímica). O sistema pode ser operado com ou sem agitação da solução no interior da célula (PEREIRA *et al.*, 2012). Quando a espécie a ser analisada entra

em contato com a superfície do eletrodo, tem-se como resultado um sinal transiente (pico), muito similar ao obtido no sistema FIA. Uma representação da forma de obtenção dos picos em sistemas BIA com detecção amperométrica está ilustrada na Figura 8.

**Figura 8** – Etapas de operação do sistema BIA e o tipo de sinal adquirido quando do uso da detecção amperométrica.



**Fonte:** A autora, adaptado de (QUINTINO; ANGNES, 2004).

Conforme apresentado na Figura 8, em A, antes de acontecer a injeção, observa-se uma corrente constante que é atribuída a corrente residual gerada a partir da aplicação de um potencial na presença de um eletrólito inerte, o que indica que não existe reação de transferência eletrônica na superfície do eletrodo. A partir do momento que a solução presente na pipeta é injetada (B), observa-se um abrupto aumento da corrente, pois neste momento acontece o processo redox que está relacionado ao analito de interesse transportado até a superfície do eletrodo de trabalho por convecção. O valor máximo de corrente (C) é atingido durante o procedimento de injeção, e até que esta injeção seja finalizada, esse valor de corrente se mantém constante. Em (D) é observado uma queda acentuada da corrente,

pois após o final do procedimento de injeção, o transporte deixa de ser convectivo e passa a ser difusional. Por fim, em (E), o equilíbrio existente antes da injeção do analito (corrente residual) é estabelecido (elevada diluição no interior da célula). A agitação mecânica no interior da célula é uma opção para acelerar o retorno da corrente ao patamar de antes da injeção. Os procedimentos de limpeza dos eletrodos usados em análises também são facilitados com a agitação mecânica da solução no interior da célula.

Como em toda técnica de análise, o sistema BIA apresenta vantagens e desvantagens. Os sistemas BIA apresentam restrições em procedimentos de derivatização e pré-tratamentos ou diluições online de amostras, além de certa limitação quando se trata da sua automação (DA SILVA, 2017; WANG, JOSEPH; TAHA, 1991). Além disso, para se obter uma boa reprodutibilidade no sistema de injeção, o uso de pipetas eletrônicas é necessário, já que com o uso de pipetas manuais, o bom desempenho das injeções depende diretamente da habilidade do operador (WANG, JOSEPH *et al.*, 1992). Este problema da necessidade da pipeta eletrônica, que nem sempre está disponível nos laboratórios de pesquisa, pode ser contornado pelo uso de um padrão interno (GIMENES *et al.*, 2012). Quando comparado ao sistema FIA, que é um sistema muito parecido, o sistema BIA apresenta menor lixiviação do material utilizado em eletrodos modificados (QUINTINO; ANGNES, 2004), menor diluição quando volumes pequenos são injetados e, portanto, melhor sensibilidade, menor geração de resíduos e eliminação de problemas como formação de bolhas de ar e vazamentos (WANG, JOSEPH *et al.*, 1992).

### **1.7. Eletrodo de diamante dopado com boro (BDD)**

O diamante dopado com boro (BDD, do inglês “boron doped diamond”) é um material a base de carbono, porém, com propriedades superiores a outras formas de carbono (carbono

vítreo, grafite, pasta de carbono, etc). O BDD gera uma pequena e estável corrente de fundo ao longo de um amplo intervalo de potencial de trabalho, possui cinética relativamente rápida de transferência de elétrons para vários sistemas redox sem pré-tratamento convencional (polimento), baixa adsorção molecular, estabilidade dimensional, resistência à corrosão (robustez), e transparência óptica (RAO; FUJISHIMA, 2000).

Existem diferentes métodos para se obter o BDD, sendo que o mais comum se baseia na deposição química em fase de vapor. Diferentes substratos condutores, como silício, molibdênio, tungstênio ou titânio, podem ser utilizados como suporte para a película fina de BDD (MACPHERSON, 2015). Cada método de obtenção do BDD possui um mecanismo de formação do filme um pouco diferente, porém, todos servem para ativar uma fonte de gás rico em carbono, produzindo um precursor de crescimento em estreita proximidade com a superfície do substrato (FUJISHIMA *et al.*, 2005). Existem dois tipos de filmes finos de diamante sintetizados rotineiramente, que são baseados no seu tamanho e morfologia. Que são os filmes micro e o nanocristalino (ALEHASHIM *et al.*, 1995).

O diamante, que é um material isolante, quando tratado em plasma de hidrogênio têm sua resistividade de aproximadamente  $10^{16} \Omega \text{ cm}$  reduzida para algo em torno de  $10^6 \Omega \text{ cm}$ , que ainda é um valor de resistividade muito alto. No entanto, quando um filme de diamante é apropriadamente dopado, ele adquire boa condutividade e pode se tornar um material promissor para ser empregado como eletrodo (KONDO *et al.*, 2007). Por possuir baixa energia de ativação como transportador de carga (0,37 eV), o boro é o dopante mais utilizado para produzir eletrodos de diamante dopados. Sua introdução no filme de diamante é feita utilizando um reagente contendo boro adicionado à mistura dos gases de deposição (KRAFT, 2007).

Os dopantes mais empregados são: (i) diborano ( $\text{B}_2\text{H}_6$ ), que por não ter carbono e oxigênio na molécula evita a inclusão de elementos extras no reator, porém, é altamente

tóxico, explosivo e reativo; (ii) trimetilborato ( $C_3H_9BO_3$ ), que não é tóxico mas deve ser diluído em acetona e metanol, o que implica numa fonte adicional de carbono e oxigênio; e o (iii) óxido de boro ( $B_2O_3$ ) que é o mais comum deles por possuir grande disponibilidade, porém, também deve ser solubilizado em acetona ou metanol (BARROS *et al.*, 2005). O nitrogênio ( $NH_3$  e  $N_2$ ), fósforo ( $PH_3$ ) e enxofre ( $H_2S$ ) também podem ser utilizados como dopantes (KRAFT, 2007).

Existe um estudo na literatura que demonstra que os filmes de diamante não são tão eletroquimicamente inertes e que suas propriedades superficiais podem ser sensivelmente alteradas via pré-tratamento superficial (PELSKOV *et al.*, 1987). Desde então, diversos trabalhos têm sido direcionados para a caracterização do comportamento eletroquímico da superfície do eletrodo de BDD, de forma à alterar a sua superfície via tratamentos anódicos e catódicos (BALDAN *et al.*, 2013; CHEN, LI-CHIA; CHANG; CHANG, 2008; GIRARD *et al.*, 2007; OLIVEIRA, SEVERINO CARLOS B; OLIVEIRA-BRETT, 2010; SALAZAR-BANDA *et al.*, 2006; SUFFREDINI *et al.*, 2004).

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. Objetivos gerais**

O objetivo geral neste trabalho foi desenvolver métodos eletroanalíticos simples, rápidos, de baixo custo, com o mínimo preparo de amostra e mínimo impacto ambiental utilizando a CE-C<sup>4</sup>D e BIA-SWASV, para análise de zinco (Zn), ácido ascórbico (AA), escopolamina (SCO) e N-butilbrometo de escopolamina (BSCO) em amostras farmacêuticas e de interesse forense.

### **2.2. Objetivos específicos**

- Determinação simultânea de Zn e AA em amostra de suplemento vitamínico utilizando a CE-C<sup>4</sup>D;
- Determinação simultânea Zn e AA em amostra de suplemento vitamínico utilizando a BIA-SWASV;
- Determinação simultânea de SCO e BSCO em amostras farmacêuticas e em bebidas recreativas utilizando a CE-C<sup>4</sup>D.



### **3. PARTE EXPERIMENTAL**

#### **3.1. Amostras, soluções e reagentes**

Todas as soluções foram preparadas com água deionizada (resistividade superior a 18 M $\Omega$  cm) obtida em sistema de purificação modelo Direct-Q (Millipore - Bedford, MA, EUA). Todos os reagentes utilizados nos trabalhos eram de pureza analítica e foram usados sem purificação prévia. Na Tabela 1 estão listados todos os reagentes usados no trabalho, a sua origem e pureza.

**Tabela 1** - Reagentes utilizados nos trabalhos por CE-C<sup>4</sup>D e BIA-SWASV.

<b>Reagente</b>	<b>Origem (aquisição)</b>	<b>Grau de pureza (%)</b>
Ácido bórico	Panreac	99,8
Ácido cítrico	Impex	99,5
Ácido ascórbico	Vetec	99,0
Cloreto de cálcio dihidratado	Synth	78,0
Cloreto de sódio	Synth	99,0
Cloreto de zinco	Quimlab	99,0
Hidróxido de sódio	Panreac	98,0
MES	Vetec	99,9
Histidina	Vetec	98,5
Zinco metálico	Syth	99,0
Solução padrão de Níquel	Syth	99,0
Benzoato de sódio	Carlo Erba	99,5
Carbonato de sódio	Carlo Erba	99,5
Hidrogenocarbonato de sódio	Carlo Erba	99,7
Ácido fólico	Sigma-aldrich	99,0
Cloreto de magnésio	Aroma bem estar	99,0
Vitamina A	Via farma	99,0
Vitamina D	Infinity farma	97,0
Biotina	Infinity farma	97,0
Ácido fosfórico	AppliedChem Panreac	88,5
Ácido acético	AppliedChem Panreac	98,0
Ácido butírico	Fluka Analytical	99,5
Escopolamina	Sigma-Aldrich	98,0
N-butil brometo de escopolamina	Fagron	99,5

**Fonte:** A autora.

### 3.1.1. Determinação de Zn e AA.

Para as análises em CE a solução padrão de Zn ( $1000 \text{ mg L}^{-1}$ ) foi preparada dissolvendo-se 100 mg de Zn metálico em 3 mL de HCl 65% (v/v) e essa solução foi diluída para um volume final de 100 mL com água deionizada. Para as análises por BIA-SWVASV foi utilizado um padrão de cloreto de zinco ( $1000 \text{ mg L}^{-1}$ ) da Quimlab (Jacareí, Brazil). A solução padrão de AA sempre era preparada um pouco antes das análises por dissolução de 0,0176g em 10 mL água deionizada. As amostras farmacêuticas (pastilhas efervescentes) foram adquiridas em farmácias locais. Todas as amostras foram adequadamente dissolvidas em água deionizada, submetidas à sonicação até que todo o gás  $\text{CO}_2$  fosse eliminado e filtradas usando filtro de membrana de nitrocelulose com tamanho de poro de 0,45  $\mu\text{m}$ .

### 3.1.2. Determinação de SCO e BSCO.

As soluções padrão e amostras farmacêuticas de SCO e BSCO foram preparadas imediatamente antes dos experimentos, por dissolução do pó em água deionizada. Refrigerantes e bebidas alcoólicas foram comprados em um supermercado local. As bebidas foram diluídas 10 vezes em água deionizada. Antes da diluição, as amostras carbonatadas (coca-cola®, energético, skol beats® e cerveja) foram abertas e submetidas a sonicação de 5 minutos para remoção do gás dissolvido.

As amostras farmacêuticas contendo 10 mg de BSCO foram adquiridas em farmácias locais. Dez comprimidos foram pesados (massa total: 1,422 g), finamente macerados e cuidadosamente homogeneizados. Em seguida, 0,0313 g do pó resultante foi dissolvido em 5 mL de água deionizada. A partir desta solução, alíquotas de 200 e 400  $\mu\text{mol L}^{-1}$  foram preparadas para a realização dos experimentos. Antes da injeção no sistema CE, todas as

soluções de amostra foram filtradas através de um filtro de membrana (tamanho de poro de 0,45  $\mu\text{m}$ ) adquirido da Merck (Darmstadt Alemanha).

No estudo de conversão de BSCO em SCO, cinco comprimidos de buscopan® (10 mg de BSCO por comprimido) foram pulverizados e homogeneizados (massa total = 0,75 g). Em seguida, massas equivalentes a um comprimido (0,15g) foram pesadas e colocadas em três diferentes béqueres de vidro que foram submetidos a diferentes condições (béquer aberto) com intuito de verificar a conversão de BSCO em SCO: (i) 24h em temperatura ambiente; (ii) 8 h aquecido na estufa a 80 °C e, (iii) 10 segundos aquecido na chama do bico de Bunsen. Em seguida, o conteúdo de cada béquer foi dissolvido em 5 mL de água deionizada, diluído 4,5 vezes, filtrado e injetado no sistema CE. Na Tabela 1 estão listados os reagentes, origem e pureza.

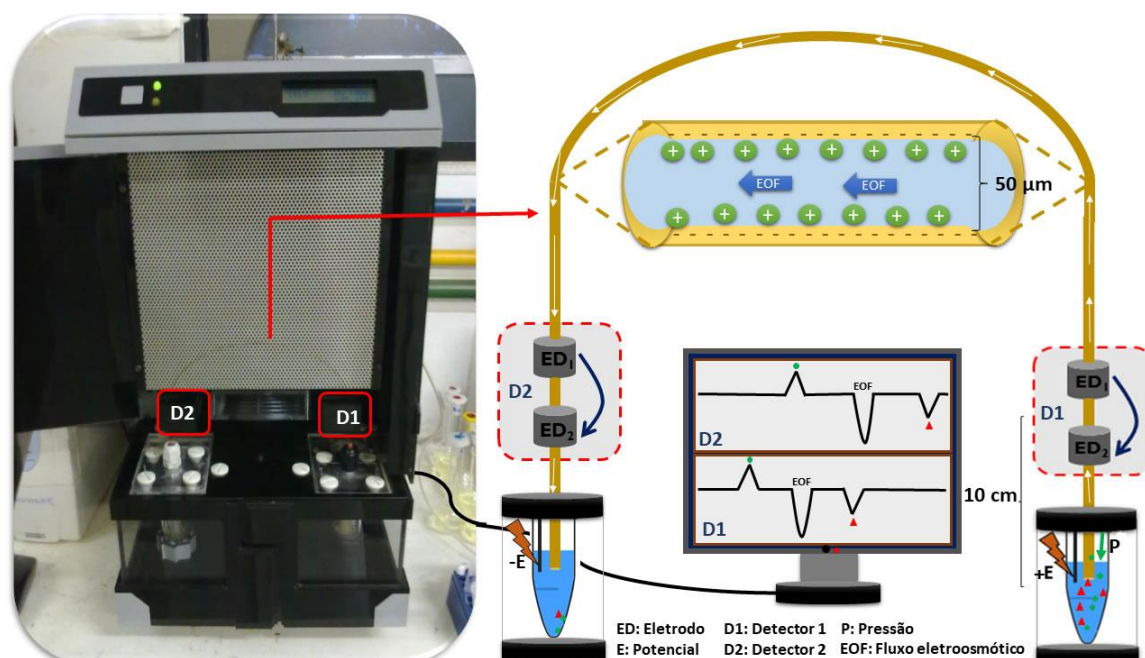
## **3.2. Equipamentos**

### **3.2.1. CE-C<sup>4</sup>D:**

Todos os eletroferogramas foram obtidos usando um equipamento eletroforese capilar construído em laboratório do IQUSP/SP e que possui dois detectores condutométricos sem contato acoplados capacitivamente (CE-C<sup>4</sup>D). Uma imagem e um esquema de funcionamento do equipamento são apresentados na Figura 9 (FRACASSI DA SILVA; DO LAGO, 1998; FRANCISCO; DO LAGO, 2009). Estes detectores possuem um oscilador, operando na frequência de 1,1 MHz, otimizado para uso de capilares com diâmetro interno no intervalo de 20 até 100  $\mu\text{m}$ . O sinal do oscilador é do tipo senoidal e sua amplitude é fixada no valor de 4 Vp-p. Os detectores estão posicionados em torno do capilar a 10 cm de cada extremidade. O capilar de sílica fundida usado, em todos os experimentos,

foi de 40 ou 50 cm de comprimento e 50  $\mu\text{m}$  de diâmetro interno  $\times$  375  $\mu\text{m}$  de diâmetro externo (Agilent, Folsom, CA, EUA).

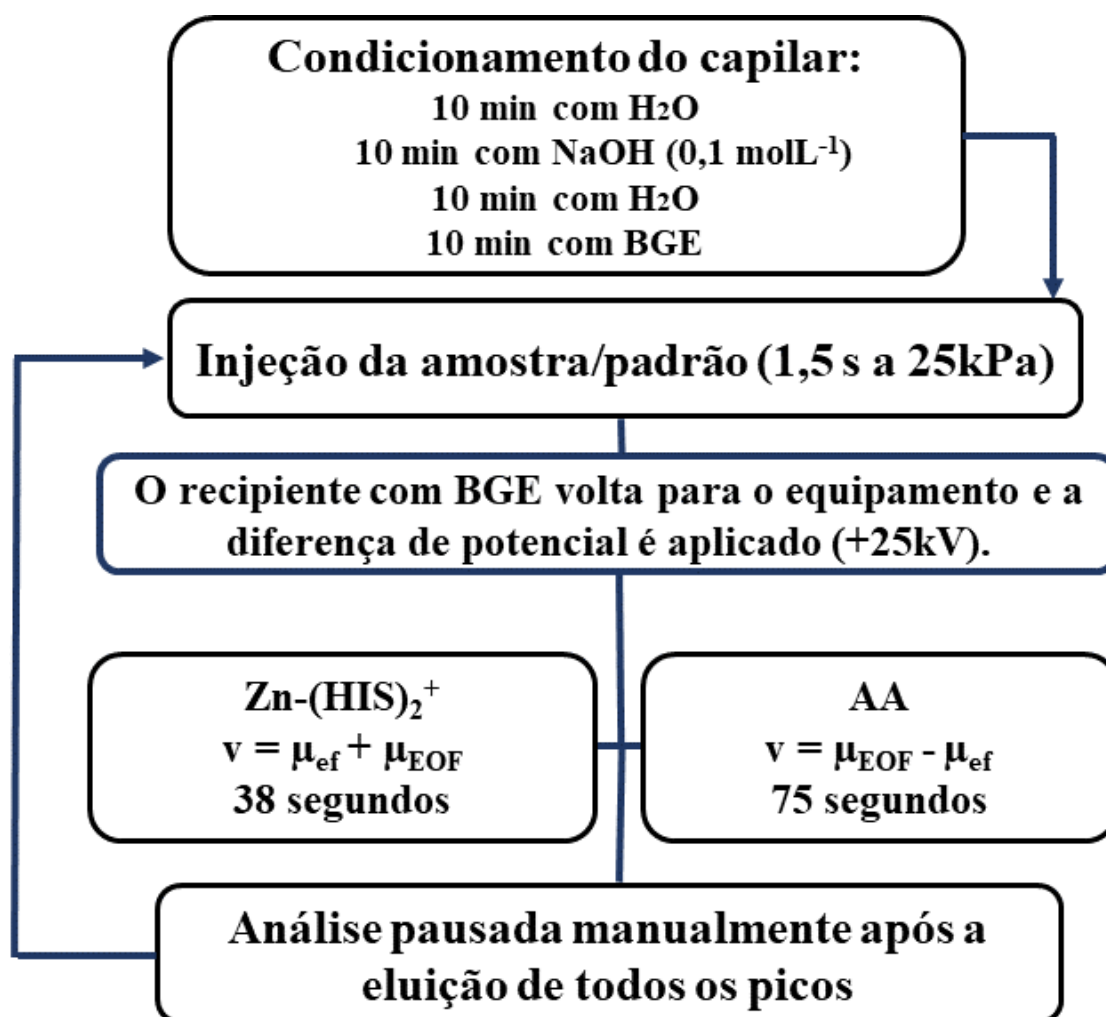
**Figura 9** – Imagem e esquema de funcionamento do equipamento de CE- $\text{C}^4\text{D}$  utilizado no trabalho.



**Fonte:** A autora.

Antes do uso, o interior do capilar era condicionado com água deionizada por 10 minutos, em seguida com 0,1 mol  $\text{L}^{-1}$  de NaOH (10 minutos), novamente com água deionizada (10 minutos) e finalmente com eletrólito de corrida (BGE) por 10 minutos. As soluções eram injetadas hidrodinamicamente por 1,5 s (AA e Zn) ou 1,0 s (SCO e BSCO) com uma pressão de 25 kPa. Todos os experimentos (exceto para otimização de potencial) foram realizados com tensão de separação de +25 kV (lado da injeção) e na condição de EOF normal. A Figura 10 apresenta um esquema que resume o procedimento usado na determinação de AA e Zn. Na determinação de SCO e BSCO, o procedimento foi similar, mas ambas as espécies eram catiônicas ( $v = \mu_{\text{ef}} + \mu_{\text{EOF}}$ ).

**Figura 10** - Esquema do procedimento desenvolvido por CE-C<sup>4</sup>D para determinação simultânea de Zn e AA.



**Fonte:** A autora.

Nos estudos de adição e recuperação, os valores de recuperação foram calculados utilizando a equação abaixo:

$$\text{Recuperação (\%)} = \left( \frac{C1 - C2}{C3} \right) \times 100 \quad (\text{Equação 5})$$

Onde:

C1 = concentração do analito na amostra fortificada,

C2 = concentração do analito na amostra não fortificada,

C3 = concentração do analito adicionada à amostra fortificada.

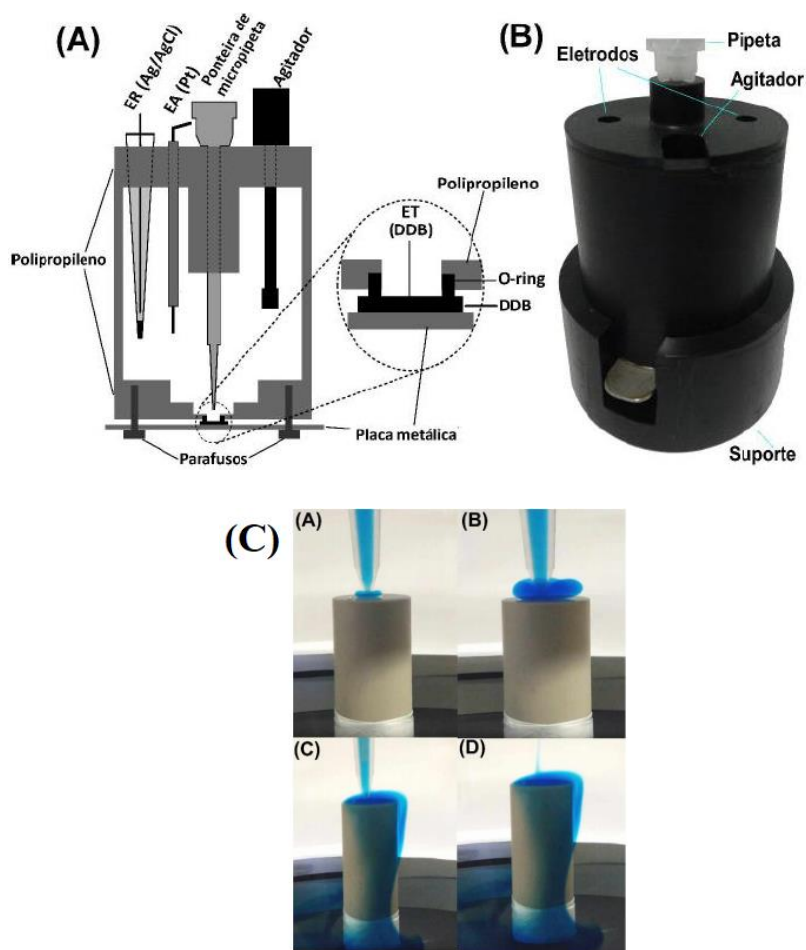
### 3.2.2. BIA-SWASV

Os experimentos eletroquímicos foram realizados usando um potenciostato/galvanostato PGSTAT 128N controlado pelo software NOVA 1.11.1 (Metrohm Autolab BV, Utrecht, Netherlands). Todos os voltamogramas apresentados tiveram correção da linha de base utilizando o algoritmo de “moving average” disponível no software NOVA 1.11.1. Como eletrodo auxiliar foi utilizado um fio de platina e como referência um eletrodo de  $\text{Ag}|\text{AgCl}|\text{KCl}_{(\text{sat.})}$  (PEDROTTI; ANGNES; GUTZ, 1996). O eletrodo de referência foi produzido no próprio laboratório pela eletrodeposição de AgCl sobre um fio de Ag através da aplicação de +0,3 V em meio de uma solução de HCl 0,10 mol L<sup>-1</sup> durante aproximadamente duas horas.

O eletrodo de trabalho de diamante dopado com boro (BDD) usado na determinação simultânea de AA e Zn consiste em um filme fino de BDD (1,2 μm de espessura; nível de dopagem de cerca de 8000 ppm de boro) depositado sobre uma placa de silício policristalino (0,7 x 0,7 cm) com 1 mm de espessura (NeoCoat SA, La Chaux-de-Fonts, Suíça). Diariamente, antes de usar o eletrodo de BDD, a sua superfície era submetida a um pré-tratamento anódico aplicando-se +10 mA por 1000 s em solução tampão Britton-Robinson (BR) 0,12 mol L<sup>-1</sup>. Posteriormente, era realizado um pré-tratamento catódico aplicando-se -10 mA por um período de 1000 s em uma solução de 0,1 mol L<sup>-1</sup> de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (SALAZAR-BANDA *et al.*, 2010). Todos os resultados voltamétricos apresentados no trabalho foram realizados sem remoção do oxigênio dissolvido em solução e à temperatura ambiente.

Todos os experimentos voltamétricos foram realizados utilizando uma célula de análise por injeção em batelada (BIA) que está ilustrada na Figura 11. O suporte mostrado na Figura 11B permite a colocação da célula BIA sobre a bancada sem a necessidade de uso de garras.

**Figura 11** – (A) Esquema da célula BIA utilizada no trabalho; (B) Imagem real da célula BIA; (C) Mecanismo de injeção no sistema BIA para análises de redissolução onde em (A): início da injeção; (B) após 5 s de injeção; (C) após 35 s de injeção; (D) após 40 s do início da injeção.



**Fonte:** (OLIVEIRA, T. C, 2015; TORMIN, T. F, 2016).

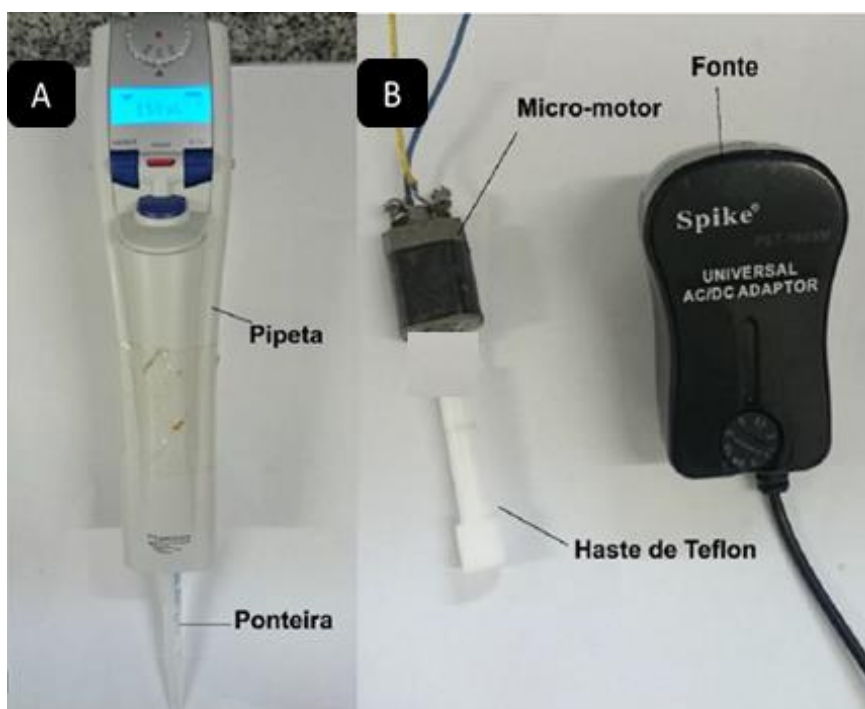
Na Figura 11C, observa-se em A e B o mecanismo inicial e após 5 s da injeção começar, onde nota-se claramente a formação de uma zona de solução (“azulada”) na superfície do eletrodo. A solução/amostra é forçada para o eletrodo de trabalho apenas durante a etapa de injeção por ação da micropipeta, com tempo aproximado de 35 s (C). Após a injeção



terminar, a solução/amostra ainda cerca a superfície do eletrodo e o analito ainda pode ser transferido por difusão para o eletrodo durante a etapa de deposição (D).

A célula foi desenvolvida em nosso laboratório, conforme descrito anteriormente (TORMIN *et al.*, 2011). Todas as injeções foram realizadas usando uma micropipeta eletrônica (Eppendorf® Multipette stream) com um volume de injeção constante (Figura 12A). A distância entre a ponta da micropipeta (Combitip®) e o eletrodo de trabalho também era constante ( $\approx 2$  mm), conforme recomendado na literatura (QUINTINO; ANGNES, 2004).

**Figura 12** - (A) Imagem da pipeta eletrônica que foi utilizada para as injeções no sistema BIA; (B) Imagem do sistema de agitação para célula BIA.

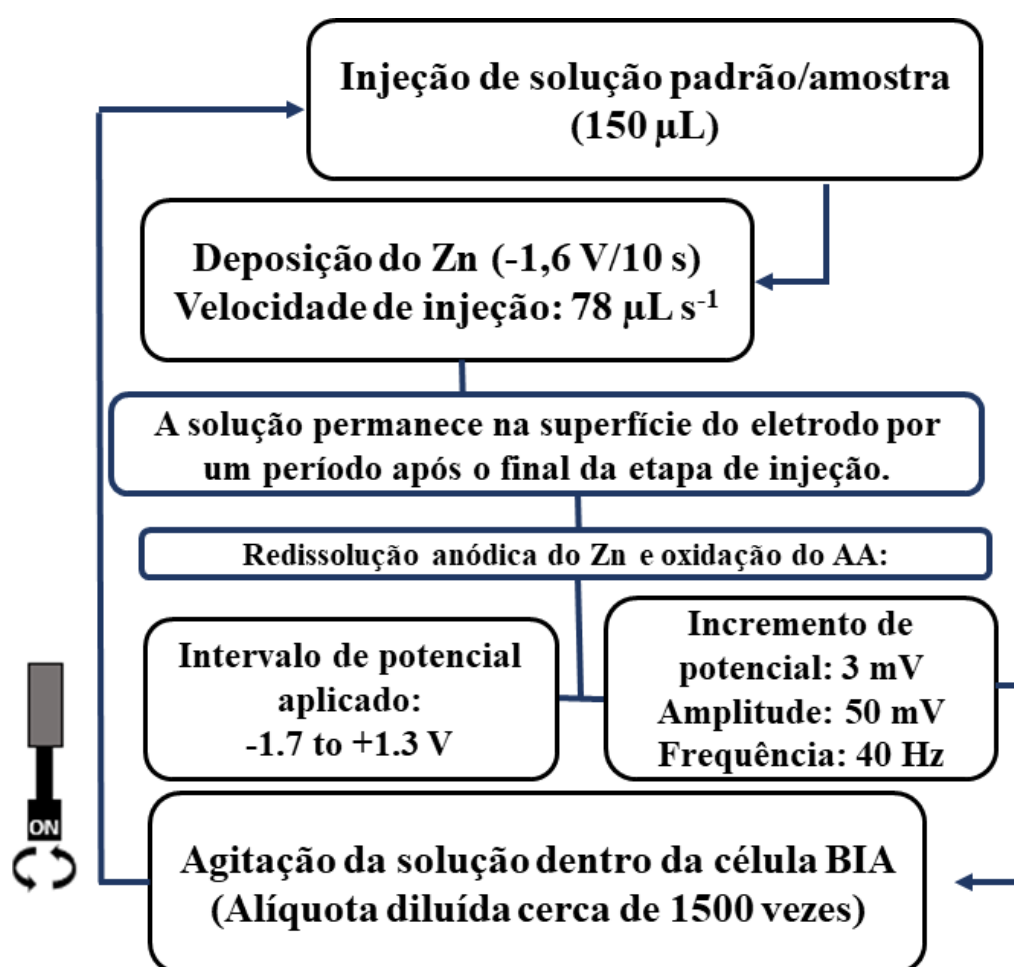


**Fonte:** (OLIVEIRA, T. C, 2015)

Para fixar a peça de BDD e manter o contato elétrico, uma placa metálica foi pressionada sobre a placa de BDD através de dois parafusos posicionados nas extremidades da parte inferior da célula. O eletrodo de BDD foi colocado na parte inferior da célula sobre um anel

de borracha (O-ring) e a área de eletrodo ( $0,18 \text{ cm}^2$ ) foi definida pelo diâmetro interno do anel de vedação ( $0,48 \text{ cm}$ ). Entre as injeções de diferentes soluções, um micro-motor DC de  $12 \text{ V}$  (Figura 12B), adaptado com uma haste de teflon (GIMENES *et al.*, 2012), foi empregado para agitar a solução. Um esquema do procedimento utilizado na determinação simultânea de Zn e AA é mostrado na Figura 13.

**Figura 13** - Esquema do procedimento desenvolvido por BIA-SWASV para determinação simultânea de Zn e AA.



Fonte: A autora.

### 3.2.3. Métodos de referência

Os resultados obtidos na determinação de Zn por CE foram comparados aos obtidos por absorção atômica por chama (FAAS). Neste procedimento foi usado um equipamento modelo Varian® SpectrAA 220 (Victoria, Australia), cujas condições operacionais utilizadas foram: Comprimento de onda de 213,9 nm; largura da fenda de 0,7 nm; corrente da lâmpada de catodo oco (HCL) L1788-30NE de 10 mA; largura do queimador de 10 cm; vazão do fluxo de acetileno de 1,25 L min<sup>-1</sup> e vazão do fluxo de ar de 5,25 L min<sup>-1</sup>, temperatura da chama cerca de 2700 K (MANOURI *et al.*, 1998).

Os resultados obtidos na determinação de AA por CE foram comparados aos obtidos pelo método iodométrico (NWEZE; ABDULGANIYU; ERHABOR, 2015). Em um erlenmeyer foram adicionados 5 mL de amostra, 0,15 g de iodeto de potássio, 1 mL de ácido sulfúrico 1 mol L<sup>-1</sup> e 1 mL de solução de amido (indicador). Em seguida, essa solução foi titulada com uma solução padrão de iodato de potássio (0,0100 mol L<sup>-1</sup>) até que a mudança de cor fosse observada.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

### PRIMEIRA PARTE: DETERMINAÇÃO SIMULTÂNEA DE ZINCO E ÁCIDO ASCÓRBICO UTILIZANDO CE-C<sup>4</sup>D E BIA-SWVASV.

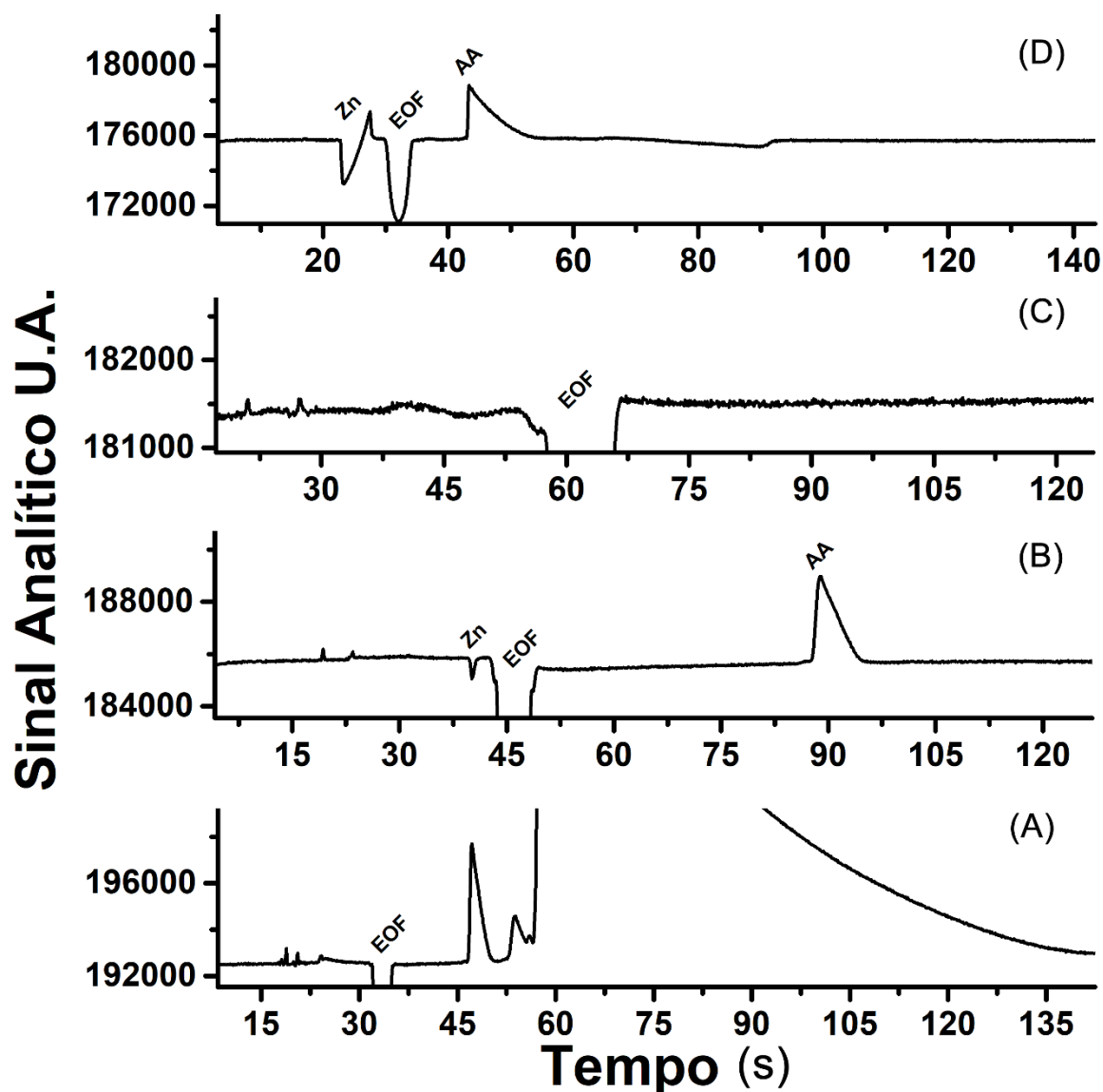
#### 4.1. Determinação simultânea de Zn e AA por CE-C<sup>4</sup>D

Em um artigo publicado recentemente (RIBEIRO *et al.*, 2016), a determinação rápida e simultânea de Zn e nafazolina (40 s) foi demonstrada por CE-C<sup>4</sup>D utilizando 20 mmol L<sup>-1</sup> de MES e de HIS (pH = 6,0) como BGE. Nas condições usadas no trabalho, o Zn interage com a HIS presente na composição do BGE através dos anéis de imidazol formando um complexo quelato catiônico de fórmula Zn-(HIS)<sub>2</sub><sup>+</sup> (JI *et al.*, 2000; KHO *et al.*, 2000). A formação do complexo reduz a mobilidade do Zn e, por isso, é possível obter uma boa resolução com relação ao pico do sódio (encontrado em muitas amostras farmacêuticas). Em pH = 6,0, o AA (pK<sub>A1</sub>= 4,2 e pK<sub>A2</sub>= 11,6) possui baixa mobilidade eletroforética (MORABIA *et al.*, 2004), pois 100% das moléculas de AA estão na forma aniônica com apenas uma carga negativa, além disso, a molécula possui alto peso molecular (176 g mol<sup>-1</sup>). Desta forma, estudos foram realizados para determinação simultânea do complexo catiônico de HIS com Zn e AA usando o modo contra EOF (mobilidade EOF >> mobilidade eletroforética de AA).

Como o principal objetivo do trabalho é a determinação rápida e simultânea de Zn e AA, compostos como TRIS e ácido benzóico (além do MES) foram avaliados para compor o BGE com valores de pH mais elevados (mantendo a HIS na composição do BGE). O aumento no pH da solução, eleva o número de grupos silanóis ionizados na parede interna do capilar de sílica, aumentando assim a mobilidade do EOF, o que conseqüentemente pode

levar a menores tempos de análise. Os eletroferogramas deste estudo estão apresentados na Figura 14. As concentrações de Zn e AA usadas neste estudo são similares as concentrações destes compostos em amostras farmacêuticas comerciais.

**Figura 14** – Eletroferogramas obtidos com o estudo de diferentes composições de BGE: (A) 30 mmol L<sup>-1</sup> de HIS + 15 mmol L<sup>-1</sup> de TRIS pH=8,8; (B) 20 mmol L<sup>-1</sup> de MES e HIS pH=6,1; (C) 30 mmol L<sup>-1</sup> de HIS + 10 mmol L<sup>-1</sup> ácido benzóico pH= 8,8; (D) 30 mmol L<sup>-1</sup> de HIS + 10 mmol L<sup>-1</sup> de NaOH pH=8,4. Solução padrão: 100 μmol L<sup>-1</sup> de Zn e 3700 μmol L<sup>-1</sup> de AA. Comprimento total e efetivo do capilar: 40 e 10 cm; Potencial aplicado: 25kV; Tempo de injeção: 1,0 s.

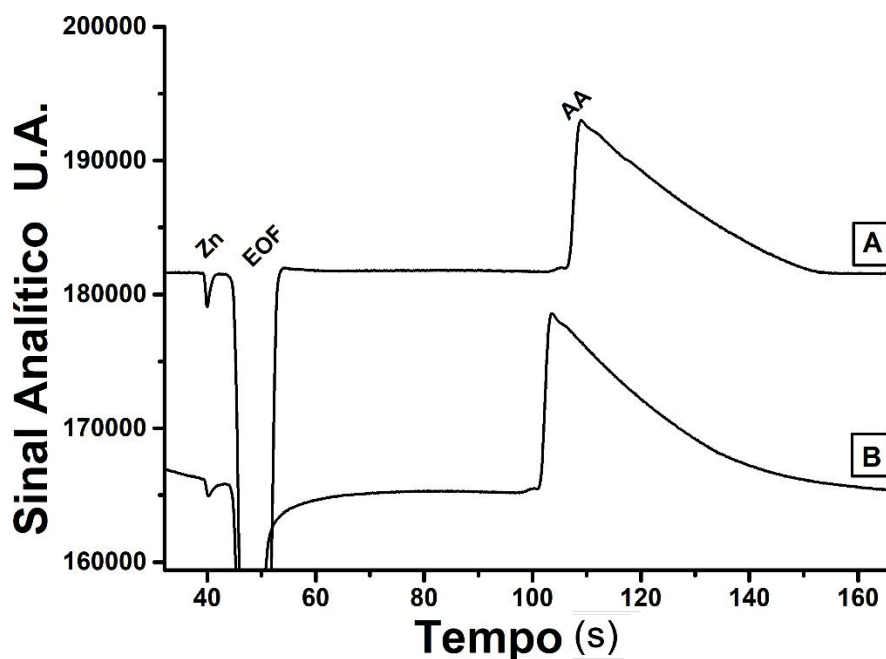


Fonte: A autora.

Não foram observados picos para o Zn em BGE's com pH maior que 7,0. A concentração do cátion bivalente diminui com o aumento do pH devido a provável formação das seguintes espécies:  $\text{Zn(OH)}^+$ ,  $\text{Zn(OH)}_{2(s)}$ ,  $\text{Zn(OH)}_3^-$  e  $\text{Zn(OH)}_4^{2-}$ , ou seja, em valores de pH mais elevados ( $\text{pH} > 7,0$ ), a formação de uma espécie que precipita ( $\text{Zn(OH)}_{2(s)}$  -  $K_{ps}=3 \times 10^{-17}$ ) inviabiliza a análise por CE. Portanto, na separação de Zn e AA por CE, um BGE com pH abaixo de 7,0 faz-se necessário. Desta forma, o BGE composto pela concentração equimolar de MES e HIS ( $\text{pH}=6,1$ ) (Figura 14B) foi selecionado para os estudos subsequentes.

Antes de prosseguir com os demais estudos de otimização do método foi realizado a injeção de uma solução padrão e uma solução amostra, para verificar se ambos apresentavam comportamento similar no BGE selecionado. A solução padrão foi preparada com proporção semelhante a proporção apresentada na amostra (37 vezes mais AA que Zn). Os eletroferogramas referentes a este estudo estão apresentados na Figura 15.

**Figura 15** – Eletroferogramas de soluções padrão (A) e amostra (B) contendo  $100 \mu\text{mol L}^{-1}$  de Zn e  $3700 \mu\text{mol L}^{-1}$  de AA. BGE:  $20 \text{mmol L}^{-1}$  de MES e HIS,  $\text{pH}=6,1$ . Comprimento total e efetivo do capilar: 40 e 10 cm; potencial aplicado: 25kV; tempo de injeção: 1,0 s.

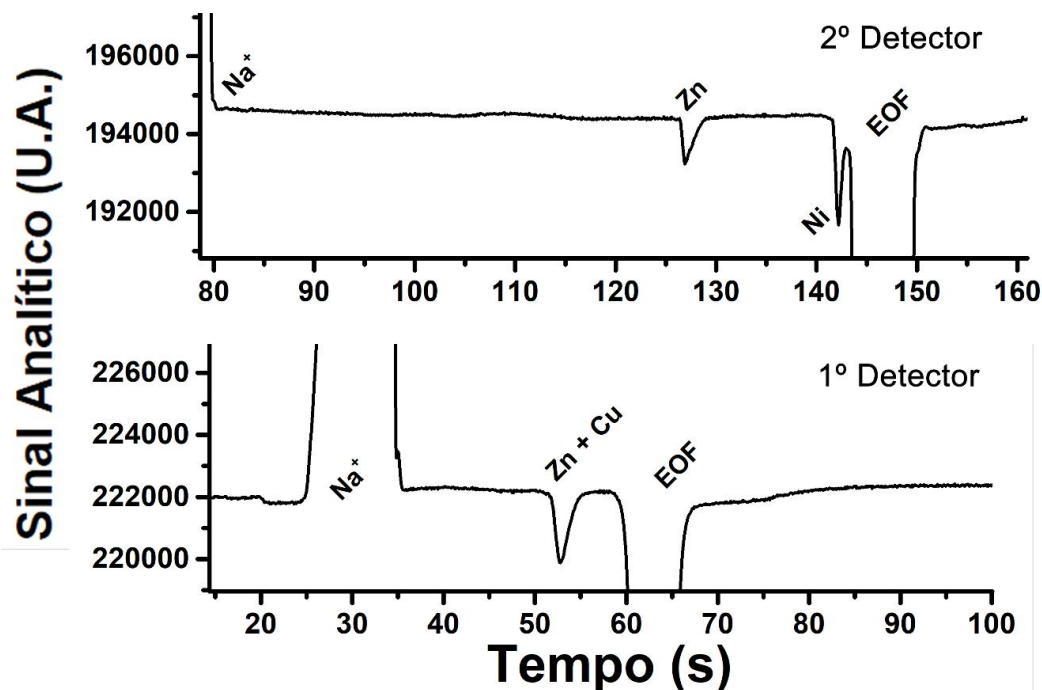


Fonte: A autora.

Observa-se na Figura 15 um efeito de cauda no pico do AA, característico da eletrodispersão que é causada quando a condutividade do contra-íon do BGE é maior que a condutividade do analito. Para o Zn observa-se um formato de pico bem definido na solução padrão (A) e um pico de menor intensidade e mais alargado na solução da amostra (B). Diante desses resultados, estudos de recuperação foram realizados e valores em torno de 50% e 100% foram obtidos para Zn e AA, respectivamente.

Diante da baixa recuperação observada para o Zn na amostra foram avaliadas algumas alternativas para minimizar este problema. Desta forma, seria possível dar continuidade nos estudos de otimização do método. Uma possibilidade foi adicionar à solução amostra, o níquel (Ni) e cobre (Cu), que são metais que apresentam um comportamento eletroforético parecido com o do Zn e que, poderiam de alguma forma, minimizar essa interferência provavelmente causada por algum interferente na matriz do fármaco. Os eletroferogramas referente a este estudo estão apresentados na Figura 16. Neste estudo, resultados obtidos com os dois detectores C<sup>4</sup>D do equipamento são mostrados.

**Figura 16** – Eletroferogramas obtidos com soluções amostra com  $100 \mu\text{mol L}^{-1}$  de Zn e  $3700 \mu\text{mol L}^{-1}$  de AA e adição de cobre ( $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) ou níquel ( $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ ). BGE:  $20 \text{ mmol L}^{-1}$  de MES e HIS  $\text{pH}=6,1$ . Comprimento efetivo do capilar para análise de cobre:  $10 \text{ cm}$  (primeiro detector); comprimento efetivo do capilar para análise de níquel:  $30 \text{ cm}$  (segundo detector). Demais condições experimentais vide Figura 15.



Fonte: A autora.

Os resultados mostraram que o Cu e o Zn, nas condições em estudo, possuem mesmo tempo de migração e, por isso, o uso do Cu foi descartado.

No primeiro detector ( $10 \text{ cm}$  de coluna), o pico referente ao Ni não foi observado. Já no segundo detector, o pico do Ni saiu próximo ao EOF, porém, com baixa resolução ( $r < 1,5$ ), ou seja, no primeiro detector não foi observado nenhum um pico adicional, pois o Ni provavelmente co-migrou com o EOF. Contudo, foi observado também que com a adição do Ni na amostra, o pico do Zn apresentou maior intensidade. Ou seja, na presença de Ni, o pico do Zn na amostra apresentou formato similar ao pico do Zn na solução padrão.



Diante destes resultados, pressupõe-se que algum componente da matriz presente na amostra está causando, de alguma forma, um efeito de diminuição da intensidade do pico do Zn. Além disso, os resultados obtidos também mostraram que a adição de Ni poderia contornar este problema. A fim de identificar a origem deste fenômeno, soluções padrão de Zn com e sem a presença de um ou de todos os excipientes (bicarbonato de sódio, ácido cítrico e o benzoato de sódio) presentes na amostra foram analisados por CE-C<sup>4</sup>D com e sem a presença de Ni. Os resultados destes estudos são apresentados na Tabela 2.

**Tabela 2** - Relação das áreas correspondentes a 100  $\mu\text{mol L}^{-1}$  de Zn em solução padrão (A) e solução amostra (F) com: 75  $\mu\text{mol L}^{-1}$  de Ni (G e H) e 200  $\mu\text{mol L}^{-1}$  de benzoato de sódio (B); bicarbonato de sódio (C); ácido cítrico (D) e todos os excipientes adicionados ao padrão sem (E) e com Ni (H).

	<b>Composição da solução</b>	<b>Área do Zn (U.A.)</b>
<b>A</b>	Padrão	6,31 $\pm$ 0,19
<b>B</b>	Padrão + BZS	6,18 $\pm$ 0,18
<b>C</b>	Padrão + BS	6,25 $\pm$ 0,19
<b>D</b>	Padrão + AC	5,28 $\pm$ 0,16
<b>E</b>	Padrão + BS + BZS + AC	5,32 $\pm$ 0,18
<b>F</b>	Amostra	3,16 $\pm$ 0,09
<b>G</b>	Amostra + Ni	6,30 $\pm$ 0,18
<b>H</b>	Padrão + BS+ BZS + AC + Ni	6,35 $\pm$ 0,20

\*Bicarbonato de sódio (BS); ácido cítrico (AC) e benzoato de sódio (BZS).

**Fonte:** A autora.

Como pode ser observado nos resultados da Tabela 2, a área do pico de Zn na solução padrão (A) foi de 6,31 $\pm$ 0,19. Após a adição de benzoato de sódio (B) ou bicarbonato de sódio (C) na solução padrão, as áreas do pico de Zn permaneceram relativamente constantes (6,18 $\pm$  0,18 e 6,25 $\pm$  0,19, respectivamente). No entanto, após a adição de ácido cítrico (D),

a área do pico de Zn diminuiu para  $5,28 \pm 0,16$  (-16%). Um valor de área semelhante ( $5,32 \pm 0,18$ ) também foi obtido após a adição de todos os excipientes avaliados na solução padrão (E). Estes resultados sugerem que apenas o ácido cítrico está interferindo no sinal do Zn.

Na análise de uma solução de amostra (F) contendo a mesma concentração de Zn (determinada por FAAS), a área do pico de Zn foi de  $3,16 \pm 0,09$  (-50%). Vale ressaltar que não conhecemos a quantidade exata de cada excipiente na amostra, uma vez que esta informação não é fornecida na bula. Diante desses resultados é bem provável que a quantidade de ácido cítrico adicionada na solução padrão ( $200 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) seja inferior à quantidade presente na amostra e, por isso, a redução do sinal de Zn na amostra após a adição Ni foi menor que a redução do sinal de Zn na amostra.

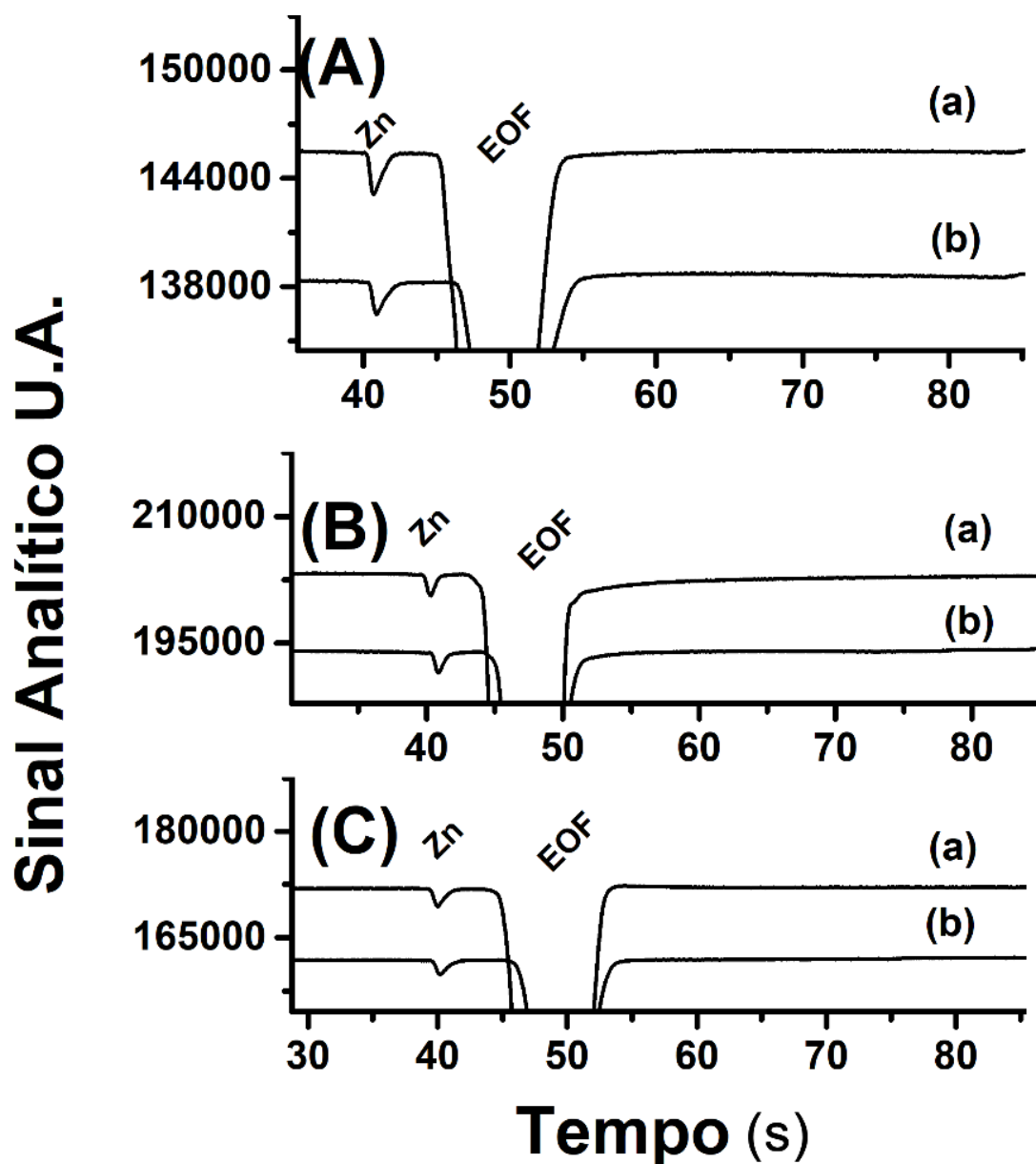
De acordo com a literatura (WYRZYKOWSKI; CHMURZYŃSKI, 2010), o citrato forma complexos estáveis com Zn ( $K = 4,0 \times 10^4$ ) e isso pode explicar a diminuição da área do pico de Zn nas soluções das amostras (a presença de citrato desestabiliza ou compete com a formação do complexo entre Zn e HIS). O Ni ( $K_f = 14,5 \times 10^4$ ) é um metal que forma um complexo mais estável (3,6 vezes maior) com o citrato do que o Zn ( $K_f = 4,0 \times 10^4$ ) (WYRZYKOWSKI; CHMURZYŃSKI, 2010). Assim, a adição de Ni mostrou ter potencial para contornar o problema da magnitude do sinal do Zn na solução amostra (analisado como  $\text{Zn}-(\text{HIS})_2^+$ ). Uma outra hipótese, diz respeito às questões cinéticas, o Ni, nessas condições, pode apresentar maior habilidade na participação da reação de substituição do ligante na formação do complexo com o citrato (a reação acontece de forma mais rápida), ou seja, pode apresentar maior labilidade que o Zn nessas condições.

Em suma, a adição de Ni nas amostras fez com que o Zn ficasse “livre” para formar o complexo com a HIS, de forma similar ao que acontece na solução padrão. Portanto, analisando todos os resultados obtidos com este estudo, chegou-se à conclusão que, a adição

de Ni na solução amostra faz com que o Zn presente na amostra (Tabela 2G) apresentasse área de pico similar ao Zn presente na solução padrão (Tabela 2A).

Retomando aos estudos de otimização do método, o próximo passo foi avaliar a concentração equimolar de MES e HIS no BGE. Para este estudo foram avaliadas três concentrações diferentes de MES/HIS (20, 30 e 40 mmol L<sup>-1</sup>) empregando duas soluções diferentes: solução padrão (a) e solução amostra com a adição de 100 μmol L<sup>-1</sup> de Ni (b). Os eletroferogramas obtidos neste estudo são apresentados na Figura 17.

**Figura 17** – Eletroferogramas referentes ao estudo da variação equimolar da concentração de MES/HIS no BGE: (A) 20 mmol L<sup>-1</sup> de MES e HIS; (B) 30 mmol L<sup>-1</sup> de MES e HIS; (C) 40 mmol L<sup>-1</sup> de MES e HIS, todos em pH=6,1. Padrão e amostra com 100 μmol L<sup>-1</sup> de Zn e 3700 μmol L<sup>-1</sup> de AA, sendo: (a) solução padrão, (b) solução amostra com adição de 100 μmol L<sup>-1</sup> de Ni. Comprimento total e efetivo do capilar 50 e 10 cm. Demais condições experimentais vide Figura 15.

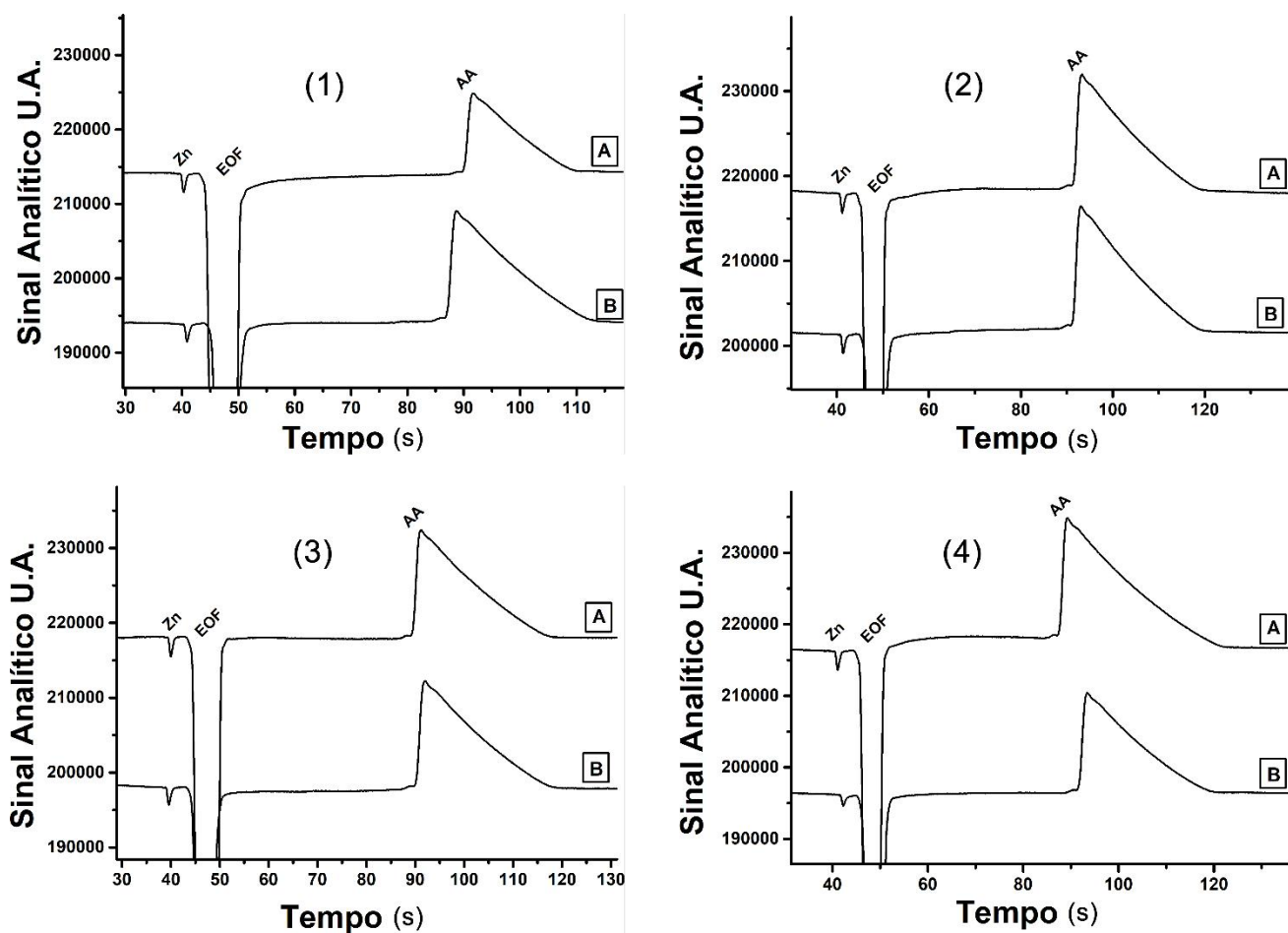


Fonte: A autora.

É possível observar que tanto em (A), (B) e (C), o sinal do Zn para o padrão e para a amostra com adição de Ni apresentaram perfis e intensidades semelhantes. Os eletroferogramas (A) e (B) foram os que apresentaram os menores tempo de análise, porém, no BGE (B) foi observada uma maior semelhança entre os picos do Zn do padrão e amostra. Portanto, o BGE composto por 30 mmol L<sup>-1</sup> de MES e HIS foi selecionado para os estudos posteriores.

Posteriormente, os estudos foram direcionados para a investigação da concentração ideal de Ni a ser utilizada na amostra. Para isso, diferentes concentrações de Ni (25, 50, 75 e 100 μmol L<sup>-1</sup>) foram adicionadas às soluções de amostras com concentração conhecida de Zn (100 μmol L<sup>-1</sup>) e as áreas de pico obtidas foram comparadas àquelas obtidas com uma solução padrão contendo Zn e AA. Os eletroferogramas obtidos neste estudo são apresentados na Figura 18.

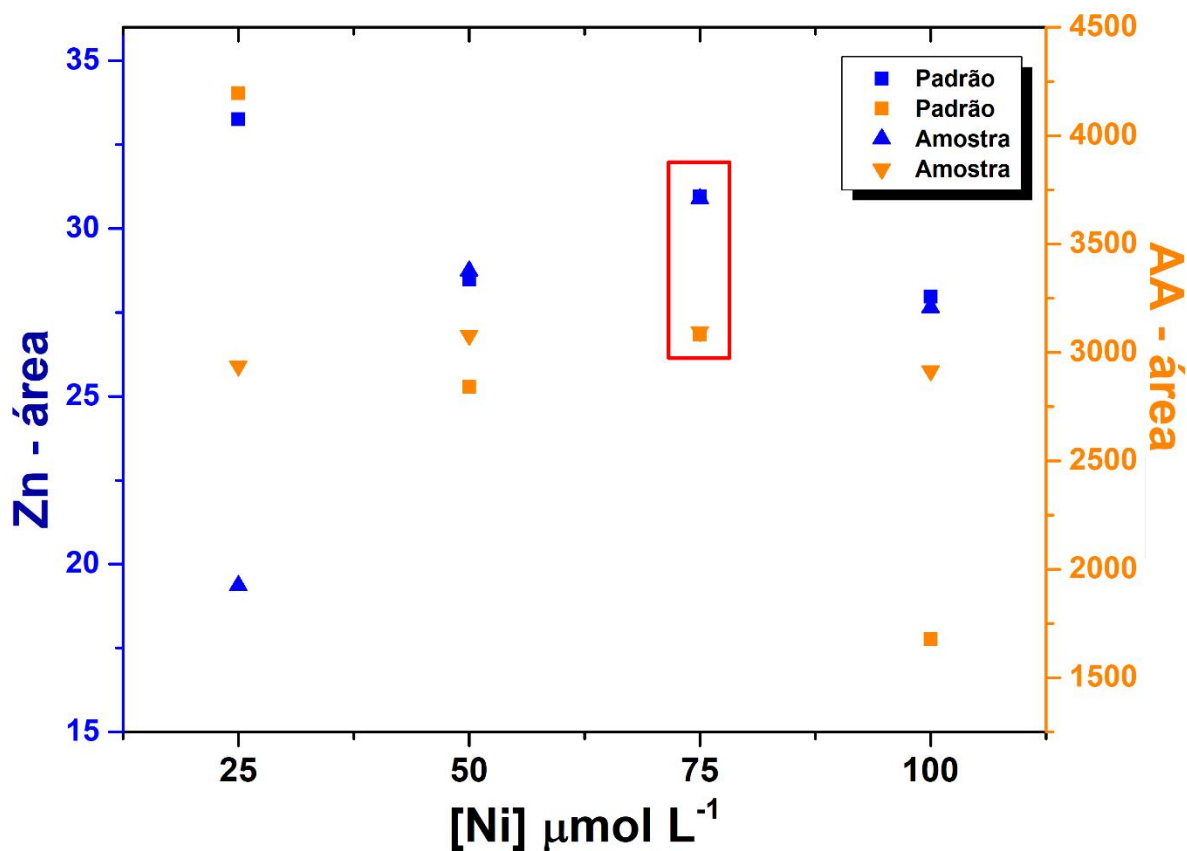
**Figura 18-** Eletroferogramas do estudo da adição de diferentes concentrações de Ni às soluções padrão e amostra com  $100 \mu\text{mol L}^{-1}$  de Zn e  $3700 \mu\text{mol L}^{-1}$  de AA. Concentrações de Ni: (1)  $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ ; (2)  $50 \mu\text{mol L}^{-1}$ ; (3)  $75 \mu\text{mol L}^{-1}$  e (4)  $25 \mu\text{mol L}^{-1}$ . BGE:  $30 \text{ mmol L}^{-1}$  de MES e HIS,  $\text{pH}=6,1$ . Condições experimentais vide Figura 15.



**Fonte:** A autora.

A fim de facilitar a visualização e discussão dos resultados obtidos na Figura 18, as áreas dos picos detectados para Zn (símbolo azul) e AA (símbolo laranja) foram plotados em função da concentração de Ni adicionado nas soluções analisadas (Figura 19).

**Figura 19** - Variação das áreas de Zn (símbolo azul) e AA (símbolo laranja) em função das diferentes concentrações de Ni adicionado às soluções padrão (■) e amostra (▲). Condições vide Figura 18.



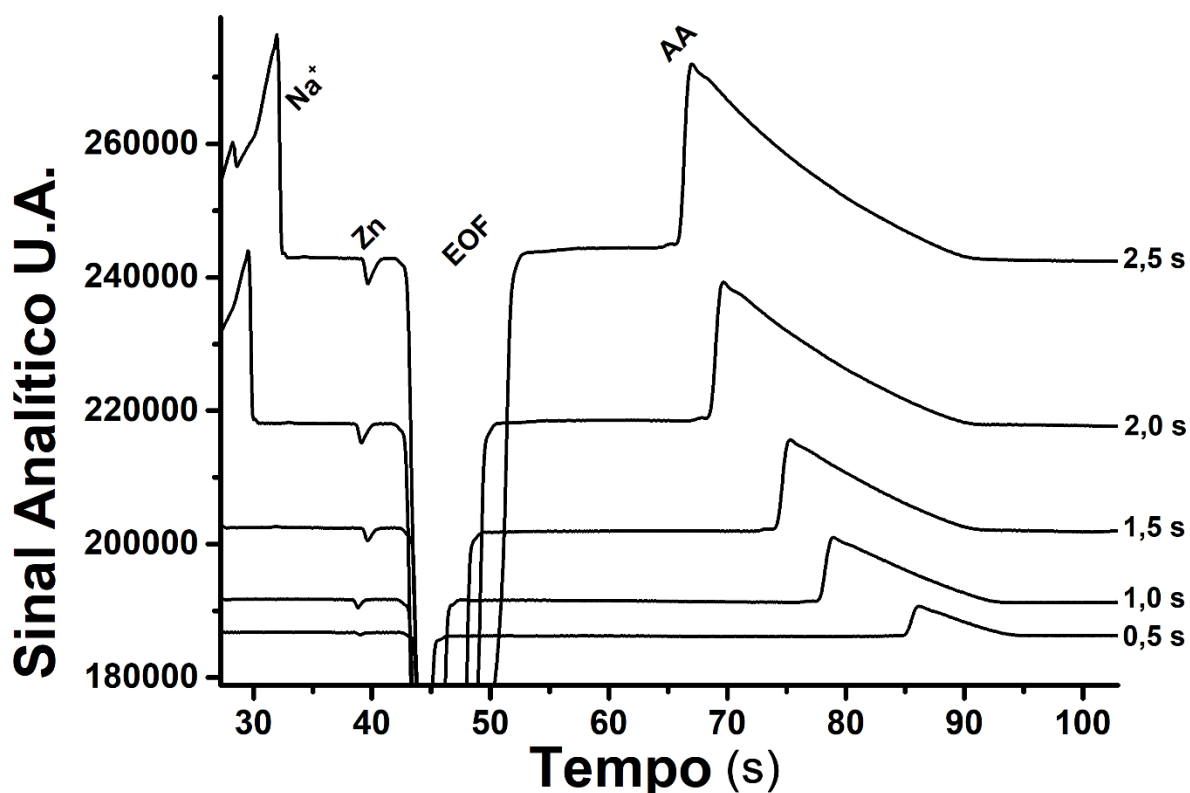
Fonte: A autora.

É possível observar na Figura 19 que a adição de Ni na amostra faz com que a área do Zn da amostra se aproxime da área do Zn presente na solução padrão. Este fato só não é observado quando apenas  $25 \mu\text{mol L}^{-1}$  de Ni é adicionado. Nesta condição, a área do Zn se manteve menor na amostra que no padrão, ou seja, possivelmente a concentração de Ni adicionada à amostra não foi suficiente para evitar a desestabilização do complexo Zn-(HIS)<sub>2</sub>. Além disso, é possível observar uma grande diferença nos valores de área para o AA, no padrão e amostra, quando  $100 \mu\text{mol L}^{-1}$  de Ni foi adicionado, o que provavelmente pode ter ocorrido por algum tipo de interação entre o Ni e o AA (FORNARO; COICHEV, 1998). A adição de  $75 \mu\text{mol L}^{-1}$  de Ni à amostra foi a concentração que gerou uma maior

proximidade entre os valores de áreas das soluções padrão e amostra, tanto para o Zn como para AA, e por isso, essa foi a condição selecionada para os estudos posteriores.

O próximo parâmetro avaliado foi o tempo de injeção. Este estudo foi realizado usando uma solução padrão contendo 100, 3700 e 75  $\mu\text{mol L}^{-1}$  de Zn, AA e Ni, respectivamente. Para simular as condições da amostra, 200  $\mu\text{mol L}^{-1}$  de cada excipiente (bicarbonato de sódio, ácido cítrico e o benzoato de sódio) também foram adicionados (o que justifica a adição do Ni). Os resultados obtidos neste estudo são mostrados na Figura 20.

**Figura 20** - Eletroferogramas obtidos no estudo do tempo de injeção (0,5 - 2,5 segundos). Composição da solução padrão: 100, 3700, 75, e 200  $\mu\text{mol L}^{-1}$  de Zn, AA, Ni e excipientes (bicarbonato de sódio, ácido cítrico e o benzoato de sódio), respectivamente. Demais condições vide Figura 17.



Fonte: A autora.



Após este estudo, o tempo de injeção que confere maior sensibilidade sem afetar resolução e a largura da base do pico foi selecionado. Como pode observado na Figura 20, o aumento do tempo de injeção não gera interferências significativas na resolução do pico de Zn com relação ao EOF, porém, além de aumentar a intensidade dos picos, o aumento do tempo de injeção também aumenta consideravelmente a largura da base do pico de AA e acentua o “efeito de cauda”, causado pelas diferenças de condutividade com o BGE. Desta forma, o tempo de injeção intermediário de 1,5 s foi selecionado para as análises posteriores.

Parâmetros como potencial de separação e variação da temperatura também foram avaliados. Elevados potenciais de separação levam a tempos de análises menores, já que o potencial está diretamente relacionado ao tempo de migração. A utilização de um potencial de separação menor (15 ou 20 kV) não é justificável já que não foi identificado problema de efeito Joule em potencial de separação de 25 kV. A utilização de potencial maior (30 kV) não foi possível, uma vez que nessas condições, os eletroferogramas apresentaram uma linha base mais ruidosa (efeito Joule), além de fugas de alta tensão que eventualmente ocorrem com o equipamento em uso (situação observada em diversos trabalhos realizados com o equipamento). Desta forma, o potencial de +25 kV (lado da injeção) foi utilizado em todas as análises.

Outro estudo realizado teve como finalidade verificar se a flutuação de temperatura no capilar tinha algum efeito na robustez do método, uma vez que a temperatura está diretamente relacionada à viscosidade das soluções e, conseqüentemente, nos tempos de migração. Os valores de temperatura foram variados entre 20 e 30 °C e não foi observado variação significativa (< 2,0 %) na área dos picos de Zn e AA.

O capilar utilizado em todos os estudos possuía 40 cm de comprimento total, 10 e 30 cm de comprimentos efetivos, primeiro e segundo detector, respectivamente. Nas análises

foi utilizado o primeiro detector, pois nessas condições se obtêm menores tempos de análises.

Todos os parâmetros experimentais otimizados no desenvolvimento do método proposto são apresentados na Tabela 3.

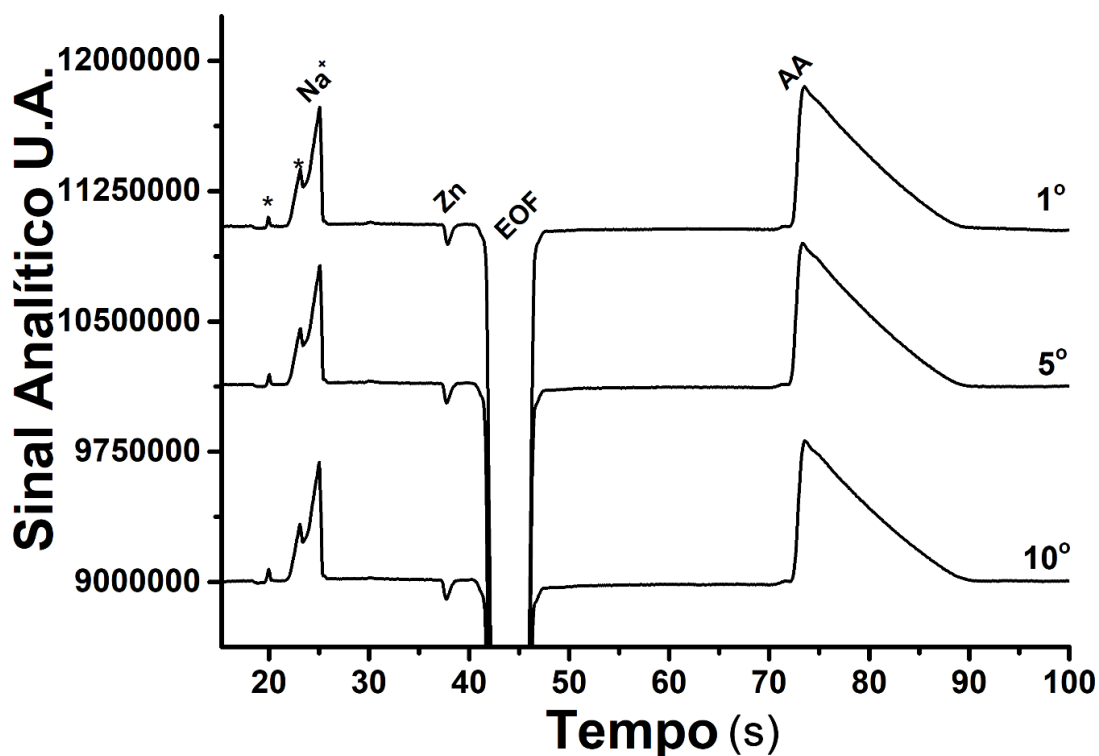
**Tabela 3** - Condições otimizadas para o método CE-C<sup>4</sup>D desenvolvido.

<b>Parâmetros</b>	<b>Faixa estudada</b>	<b>Valores otimizados</b>
<b>Concentração do BGE (mmol L<sup>-1</sup>)</b>	20 – 40	30
<b>Potencial de separação (kV)</b>	15 – 25	25
<b>Tempo de injeção (s) a 25 kPa</b>	0,5 – 2,5	1,5
<b>Temperatura (°C)</b>	20 – 30	25
<b>Comprimento efetivo do capilar (cm)</b>	10 e 30	10

**Fonte:** A autora.

O estudo de repetibilidade expressa a precisão do método analítico e representa o grau de concordância entre os resultados de medições sucessivas de um analito que é avaliado sob as mesmas condições de medição, onde as repetições são realizadas em curto espaço de tempo. Para o teste de repetibilidade foram feitas injeções sucessivas (n = 10) de solução padrão contendo 100 µmol L<sup>-1</sup> de Zn, 3700 µmol L<sup>-1</sup> de AA, 75 µmol L<sup>-1</sup> de Ni e 200 µmol L<sup>-1</sup> cada um dos excipientes (bicarbonato de sódio, ácido cítrico e o benzoato de sódio) para simular as condições da amostra. Para melhor visualização dos eletroferogramas, a primeira, quinta e décima análise são apresentadas na Figura 21.

**Figura 21** – Eletroferogramas do estudo de repetibilidade com 10 injeções sucessivas de uma solução padrão com 100, 3700, 75 e 200  $\mu\text{mol L}^{-1}$  de Zn, AA, Ni e de cada um dos excipientes (bicarbonato de sódio, ácido cítrico e o benzoato de sódio), respectivamente. Demais condições vide Tabela 3.



**Fonte:** A autora.

Os dados obtidos no estudo de repetibilidade revelaram que o método é estável, pois os DPRs foram menores que 3,5% e de 2% ( $n = 10$ ) para as áreas dos picos e tempos de migração do Zn e AA, respectivamente. Este estudo foi realizado sem limpeza do capilar entre as medidas consecutivas, ou seja, não há necessidade da renovação do BGE (“*flush*”) no capilar ao longo de dez análises sucessivas. Após as dez injeções sucessivas foi observado que o desvio aumentava de forma significativa, ou seja, após as dez análises existe a necessidade de fazer um “*flush*” de 1 minuto no capilar. O estudo de repetibilidade inter-dias também foi realizado mediante análise de solução padrão em três dias diferentes. Este estudo apresentou DPRs de 8,2% para a área e 8% para tempo de migração do Zn e de 6,1% para a área e 2% para o tempo de migração do AA. Estes resultados indicam que uma calibração

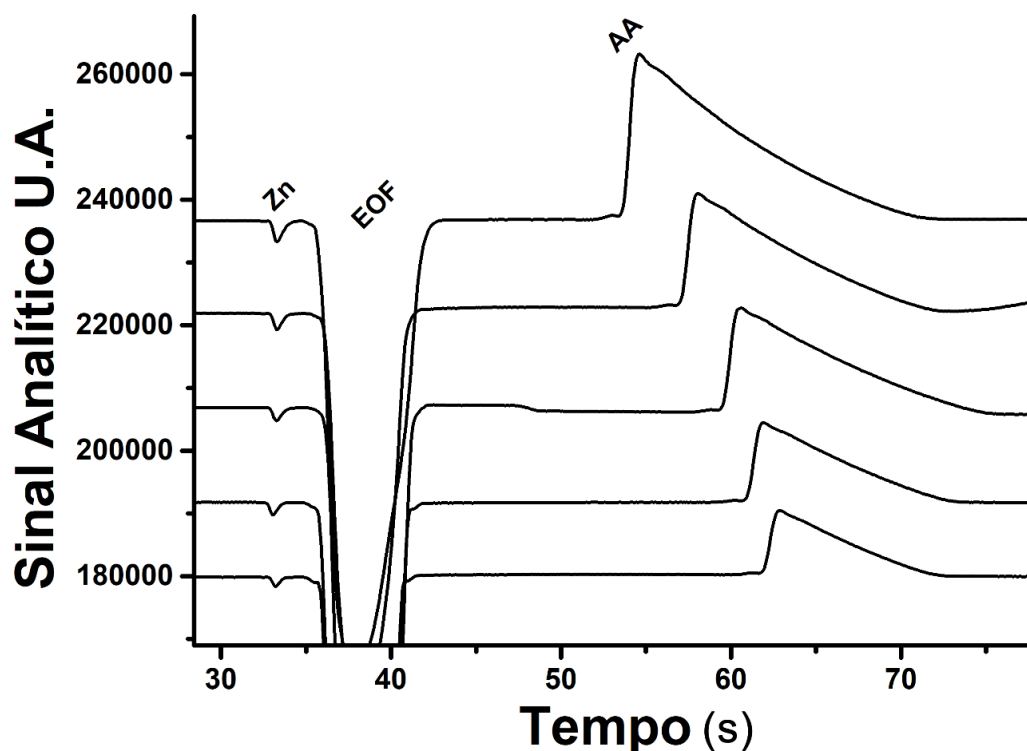
diária permite a obtenção de resultados mais precisos. Os desvios foram calculados com base na equação abaixo:

$$DPR (\%) = DPx/\bar{x} \times 100 \quad (\text{Equação 6})$$

Sendo:  $DPx$  = Desvio padrão da área;  $\bar{x}$  = área média encontrada para a série de medidas.

Posteriormente foi feito um estudo para verificar a faixa de concentração onde existe uma relação linear entre concentração de Zn e AA e a área dos respectivos picos registrados no detector. Soluções padrão contendo concentrações crescentes de Zn e AA foram injetadas e as médias das áreas registradas foram plotadas em função da concentração. Os eletroferogramas obtidos nestes estudos são apresentados na Figura 22. Este estudo foi feito levando em consideração a proporção de Zn e AA encontrada em amostras comerciais (AA 37 vezes mais concentrado que Zn).

**Figura 22** - Eletroferogramas obtidos com injeções de soluções contendo concentrações crescentes de Zn (50, 100, 200, 300 e 400  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ) e AA (1850, 3700, 7400, 11100 e 14800  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ). Demais condições vide Tabela 3.



Fonte: A autora.

As áreas dos picos para Zn e AA apresentam relação linear para uma ampla faixa de concentração (de  $50 \mu\text{mol L}^{-1}$  a  $400 \mu\text{mol L}^{-1}$  para o Zn e  $1850 \mu\text{mol L}^{-1}$  a  $14800 \mu\text{mol L}^{-1}$  para AA,  $r > 0,998$ ). Observa-se que até mesmo em elevadas concentrações tem-se resolução e relação linear entre as concentrações e área dos picos para os analitos em estudo. A possibilidade de obtenção de uma ampla faixa linear de resposta é uma das características do detector  $C^4D$ , e isso torna viável a análise de amostras que contém espécies com concentrações muito diferentes.

A Tabela 4 apresenta um resumo das características analíticas do método proposto avaliadas neste estudo. Dentre estas características estão o limite de detecção (LD), que é a menor concentração da espécie que pode ser detectada e que normalmente é calculado pela triplicata do quociente entre o desvio padrão do branco pela inclinação da curva analítica ( $3SB/b$ ) onde, SB é o desvio padrão das 10 medidas do branco, e o b é a inclinação (sensibilidade) da curva analítica. O limite de quantificação (LQ), é a menor concentração da espécie que pode ser determinada com um nível aceitável de precisão e exatidão é calculado como sendo ( $10SB/b$ ). Neste trabalho, o LD foi obtido mediante injeções de soluções contendo concentrações cada vez menores (diluição progressiva) de Zn e AA até que não fosse possível distinguir o sinal dos analitos do ruído (ARMBRUSTER; TILLMAN; HUBBS, 1994; LAWSON, 1994). É importante ressaltar que o valor de LQ para o AA ficou muito abaixo ao primeiro ponto da faixa linear, pois para construção da faixa linear, como para todas as análises, foi considerado a proporção das espécies no fármaco (1:37 para Zn e AA, respectivamente).

**Tabela 4** - Características analíticas do método CE-C<sup>4</sup>D.

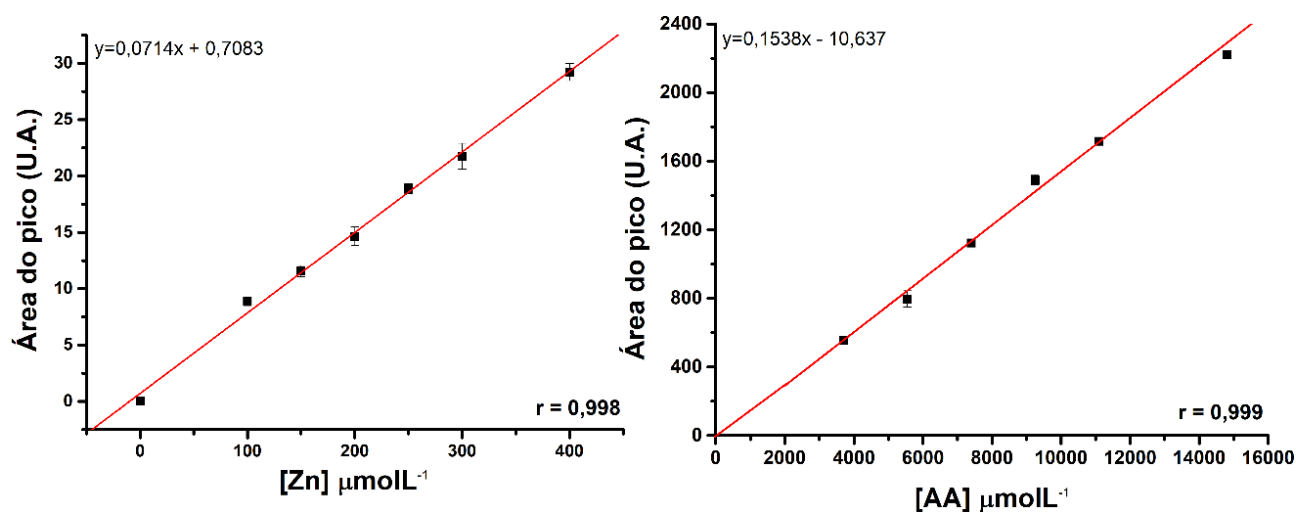
<b>Características Analíticas</b>	<b>Zn</b>	<b>AA</b>
<b>Tempo de migração (s)</b>	38,0 ± 0,3	75,0 ± 1,6
<b>Resolução**</b>	5,4 ± 0,2	2,6 ± 0,1
<b>Coefficiente de correlação</b>	0,998	0,999
<b>Faixa Linear (µmol L<sup>-1</sup>)</b>	50 – 400	1850 – 14800
<b>LD (µmol L<sup>-1</sup>)</b>	10	20
<b>LQ (µmol L<sup>-1</sup>)</b>	33	66
<b>RSD intra-dias (n = 10)</b>	2,7 %	3,5 %
<b>RSD inter-dias (n = 3)</b>	8,2 %	6,1 %
<b>Frequência analítica (h<sup>-1</sup>)</b>	40	40

\*\*Resolução entre o pico de Zn e o EOF e entre o EOF e o pico do AA.

**Fonte:** A autora.

A partir destes resultados, as curvas de calibração (Figura 23) foram obtidas para análise de quatro amostras farmacêuticas (A1, A2, A3 e A4). Os resultados obtidos na análise dessas quatro amostras por CE-C<sup>4</sup>D e com os métodos comparativos (titulação para AA e FAAS para Zn) são apresentados na Tabela 5.

**Figura 23** – Curvas de calibração para o Zn ( $100 \mu\text{mol L}^{-1}$  -  $400 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) e para o AA ( $3700 \mu\text{mol L}^{-1}$  -  $14800 \mu\text{mol L}^{-1}$ ). Demais condições vide Figura 22.



**Fonte:** A autora.

**Tabela 5** - Comparação dos resultados obtidos com a análise de 4 amostras por CE-C<sup>4</sup>D e pelos métodos de referência, titulação (AA) e FAAS (Zn).

Amostr a	Bula (comprimido)	CE	Titulação	FAAS	Diferenças %		
					E <sub>1</sub>	E <sub>2</sub>	
A	Zn	10,0 mg	10,1 ± 0,4	-	9,6 ± 0,2	+ 1%	+ 5,2%
1	AA	1,00 g	0,99 ± 0,04	1,01 ± 0,02	-	- 1,0 %	- 2,0 %
A	Zn	10,0 mg	9,6 ± 0,7	-	9,5 ± 0,2	- 3,4%	+ 1,0%
2	AA	1,00 g	1,03 ± 0,04	1,01 ± 0,02	-	+ 3,0 %	+ 2,0 %
A	Zn	10,0 mg	9,9 ± 0,1	-	10,0 ± 0,1	- 1,0%	- 1,0%
3	AA	1,00 g	1,01 ± 0,05	1,06 ± 0,02	-	+ 1,0 %	- 4,7%
A	Zn	10,0 mg	10,6 ± 0,1	-	10,5 ± 0,1	+ 6,0%	+ 1,0%
4	AA	1,00 g	1,02 ± 0,08	1,06 ± 0,02	-	+ 2,4%	- 3,8%

E1: Diferença entre os resultados obtidos por CE-C<sup>4</sup>D e os valores reportados pela bula; E2: Diferença entre os resultados obtidos por CE-C<sup>4</sup>D e os obtidos pelos métodos de referência (Titulação e FAAS).

**Fonte:** A autora.

De acordo com o teste t-Student pareado todos os resultados obtidos por CE-C<sup>4</sup>D estão de acordo com os obtidos por titulação ou por FAAS. Com um nível de confiança de 95% os valores obtidos foram inferiores ao valor crítico teórico (2,78; n = 3), o que indica que os resultados são estatisticamente semelhantes. A precisão do procedimento também foi avaliada mediante estudos de adição e recuperação, onde quantidades conhecidas de Zn e AA foram adicionadas à amostra. Foram obtidas recuperações de  $100 \pm 3$  e  $101 \pm 2\%$  para o Zn e AA, respectivamente.

#### **4.1.1. Conclusões parciais**

Um método para a determinação de Zn e AA em única corrida foi proposta pela primeira vez. O método proposto é simples, rápido ( $\sim 40$  injeções  $h^{-1}$ ), necessita de etapas simples de preparação de amostras (apenas dissolução e diluição em água), faz uso de quantidades muito pequenas de amostras e reagentes (impacto ambiental mínimo) e a análise é feita usando calibração externa. A interferência de ácido cítrico (presente no fármaco como excipiente) na magnitude do pico de Zn (complexo catiônico entre Zn e HIS) foi eliminada através da adição de Ni em todas as soluções amostras. A constante de formação de complexos entre Ni e citrato é maior do que entre Zn e citrato, desta forma, a formação do complexo entre Zn e HIS no BGE ocorre sem interferência de citrato.



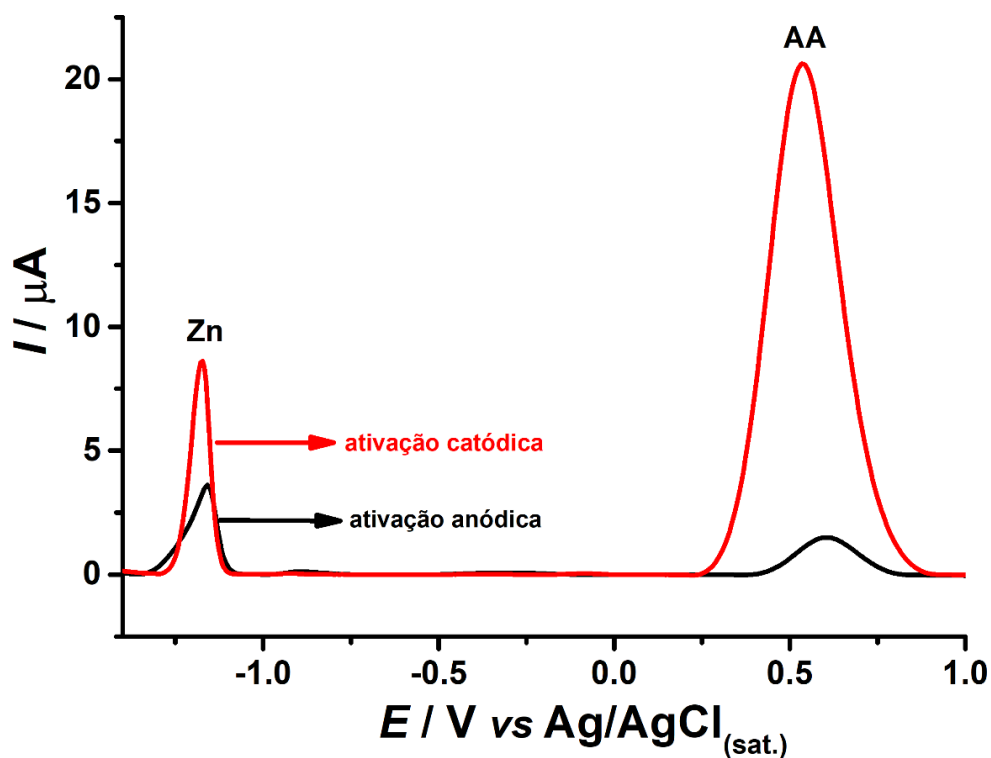
#### 4.2. Determinação simultânea de Zn e AA por BIA-SWASV

A possibilidade da determinação simultânea de Zn e uma espécie orgânica (nafazolina) por BIA-SWASV também já foi demonstrada anteriormente (OLIVEIRA, THIAGO DA COSTA *et al.*, 2016) em nosso grupo de pesquisa. Em função disso, nós optamos em verificar se este método também se aplicaria para a determinação simultânea de Zn e AA. Adquirir experiência com outra técnica de análise muito utilizada no grupo também foi importante nesta decisão. É importante frisar aqui que a técnica SWV, no modo convencional (célula eletroquímica no estado estacionário), não apresentou resultados satisfatórios na determinação simultânea de Zn e nafazolina. Ou seja, o sucesso na determinação simultânea de Zn e nafazolina foi atribuído à algumas características do sistema BIA como contato mínimo entre eletrodo e amostra (menor contaminação) e facilidade de uso de etapas de limpeza entre os procedimentos de análise. Os primeiros estudos deste trabalho foram realizados utilizando o mesmo eletrólito (tampão acetato 0,05 mol L<sup>-1</sup>; pH = 4,7) do trabalho anterior, o qual apresentou resultados satisfatórios nos estudos de otimização empregando soluções padrão contendo Zn e AA. No entanto, na análise do comprimido efervescente, que é uma amostra com matriz diferente da amostra que contém Zn e nafazolina (solução oftalmológica), os testes de recuperação não apresentaram bons resultados (< 50% para o Zn), o que foi atribuído a um provável problema de efeito de matriz. Este problema não foi resolvido mesmo utilizando o método de adição de padrão. Desta forma, os estudos iniciais de otimização foram retomados a fim de buscar novas condições experimentais que pudessem contornar o problema encontrado.

A polaridade da superfície do eletrodo de BDD depende do tipo de ativação eletroquímica previamente aplicada. As respostas eletroquímicas de muitas espécies redox usando BDD como eletrodo de trabalho dependem fortemente do tipo de terminação química

em sua superfície, desta forma, o tipo de ativação da superfície de eletrodo de BDD foi avaliada. A ativação anódica aumenta a quantidade de terminações contendo oxigênio e grupos hidroxila na superfície do eletrodo, aumentando sua hidrofiliabilidade, enquanto a ativação catódica favorece terminações contendo hidrogênio, exibindo características hidrofóbicas. Assim, o comportamento eletroquímico do BDD pode ser alterado em função do tipo de ativação realizada antes das análises (BARROS *et al.*, 2005; PLESKOV, 2000). Na Figura 24 são apresentados os voltamogramas obtidos na injeção de uma solução padrão composta por Zn e AA no sistema BIA-SWASV após a realização de cada um dos modos de ativação (anódico e catódico) do eletrodo de BDD.

**Figura 24** – Efeitos dos pré-tratamentos eletroquímicos anódico (+10 mA por 1000 s; linha preta) e catódico (-10 mA por 1000 s; linha vermelha) no desempenho do eletrodo de BDD. Concentração:  $5 \mu\text{mol L}^{-1}$  de Zn e  $185 \mu\text{mol L}^{-1}$  de AA; eletrólito suporte:  $0,12 \text{ mol L}^{-1}$  BR (pH = 6,0); potencial de deposição: -1,5 V; tempo de deposição: 10 s; volume de injeção:  $150 \mu\text{L}$ ; velocidade de injeção:  $49 \mu\text{L s}^{-1}$ ; frequência: 30 Hz; amplitude: 60 mV; incremento de varredura: 5 mV.



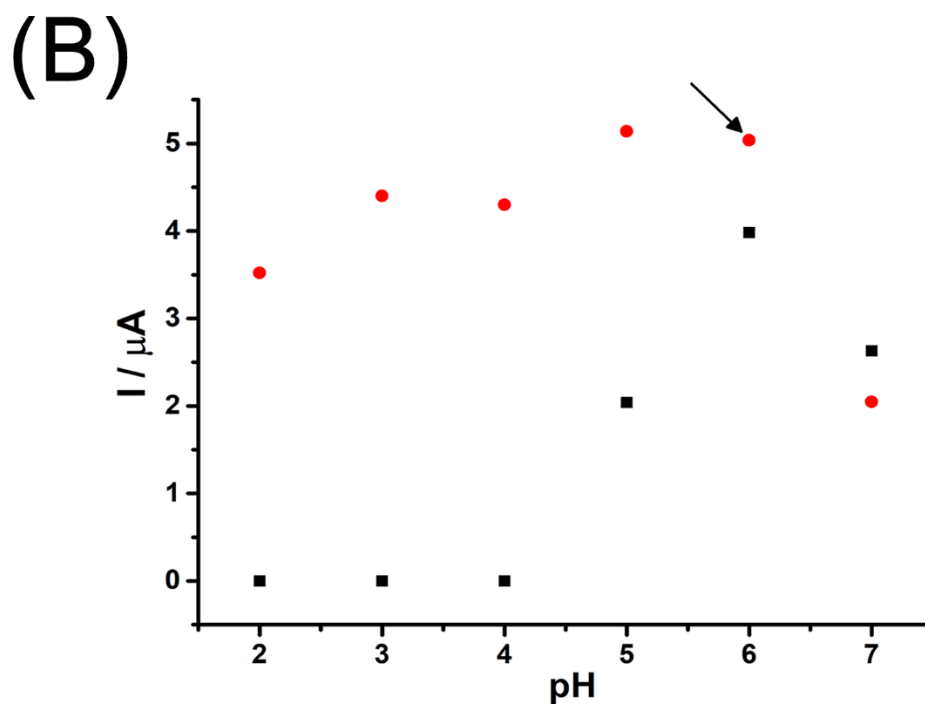
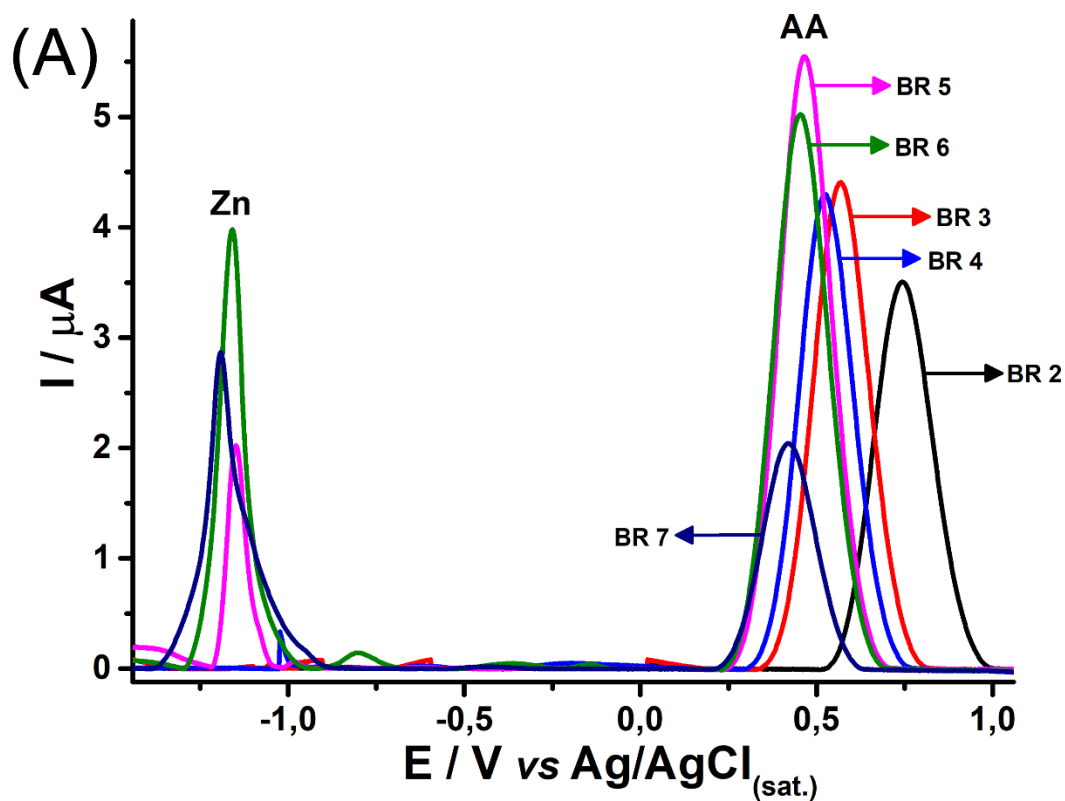
Fonte: A autora.

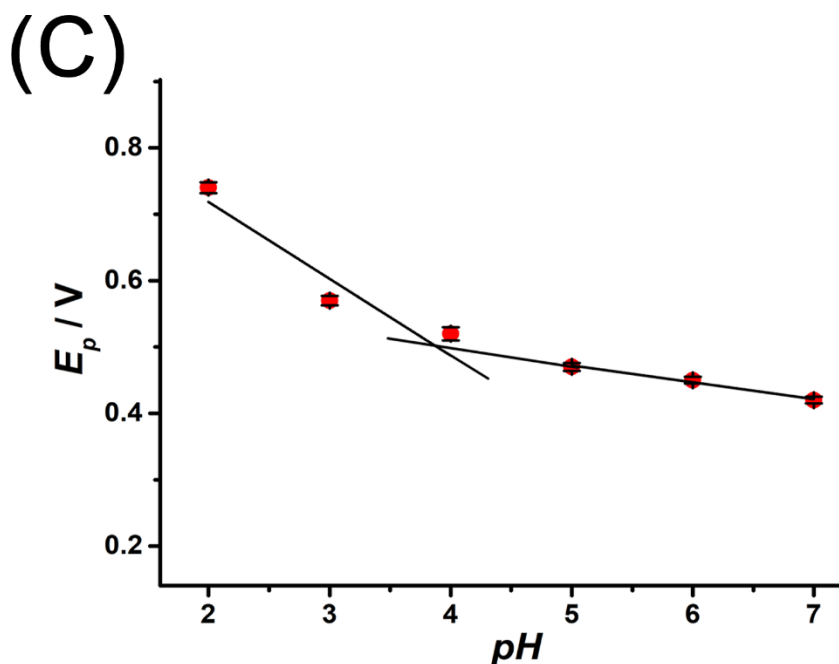
Observa-se que a oxidação do AA é fortemente favorecida com a hidrogenação da superfície do BDD (tratamento catódico), o que está de acordo com trabalho publicado anteriormente (BROCENSCHI *et al.*, 2016). O tratamento anódico também diminuiu de forma acentuada a corrente obtida para o Zn, o que possivelmente também é ocasionado pela mudança de polaridade da superfície do eletrodo de BDD. Portanto, em função do perfil voltamétrico dos picos obtidos tanto para Zn quanto para o AA, o tratamento catódico foi utilizado para a realização dos estudos subsequentes do trabalho.

A investigação dos parâmetros envolvidos no trabalho foram todos realizados utilizando o sistema BIA, uma vez que no sistema estacionário não era obtido um sinal para o Zn. Acredita-se que a ausência do sinal do Zn ocorra pelo fato de que o AA está presente em elevada concentração na amostra (37 vezes maior que a concentração de Zn), uma vez que para a preparação de todos os padrões utilizados no trabalho foi utilizada a mesma proporção existente nas formulações comerciais.

Posteriormente avaliou-se o efeito do pH usando o tampão BR na resposta eletroquímica do Zn (detectado por oxidação após a sua redução eletroquímica na superfície do eletrodo) e do AA (oxidação direta). As soluções com pH acima de 7,0 não foram avaliadas devido a formação de compostos insolúveis de Zn. A Figura 25 apresenta os voltamogramas de SW obtidos no estudo de pH (A) e gráficos mostrando a relação entre pH e corrente de pico (B) e potencial de pico (C).

**Figura 25** – (A) Voltamogramas de SW obtidos no estudo do efeito do pH (2,0 – 7,0) com uma solução padrão de  $5 \mu\text{mol L}^{-1}$  de Zn (■) e  $185 \mu\text{mol L}^{-1}$  de AA (●). Efeito do pH na corrente de pico de Zn e AA (B) e no potencial de pico do AA (C). Eletrólito suporte:  $0,12 \text{ mol L}^{-1}$  de solução BR (pH = 6,0). Demais condições vide Figura 24.





Fonte: A autora.

Como pode ser observado na Figura 25A, em soluções com  $\text{pH} < 4,0$ , apenas o pico de oxidação do AA foi observado. Provavelmente, isso se deve a elevada concentração de  $\text{H}^+$  (redução a  $\text{H}_2$ ) presente nestas soluções que pode competir com a redução dos íons  $\text{Zn}^{2+}$  na superfície do eletrodo de BDD. O pico do Zn foi observado apenas em soluções com  $\text{pH} > 4,0$  (OLIVEIRA, THIAGO DA COSTA *et al.*, 2016)

De acordo com a literatura (LANGELOTH; CHIKU; EINAGA, 2010; TORMIN *et al.*, 2015), a magnitude e o potencial de pico são influenciados pela composição do eletrólito suporte e pelo pH. Geralmente, o mecanismo eletroquímico para a redissolução anódica do Zn envolve apenas a redução de  $\text{Zn}^{2+}$  em Zn metálico na superfície do eletrodo (etapa de pré-concentração) com subsequente oxidação em  $\text{Zn}^{2+}$  (etapa de redissolução).

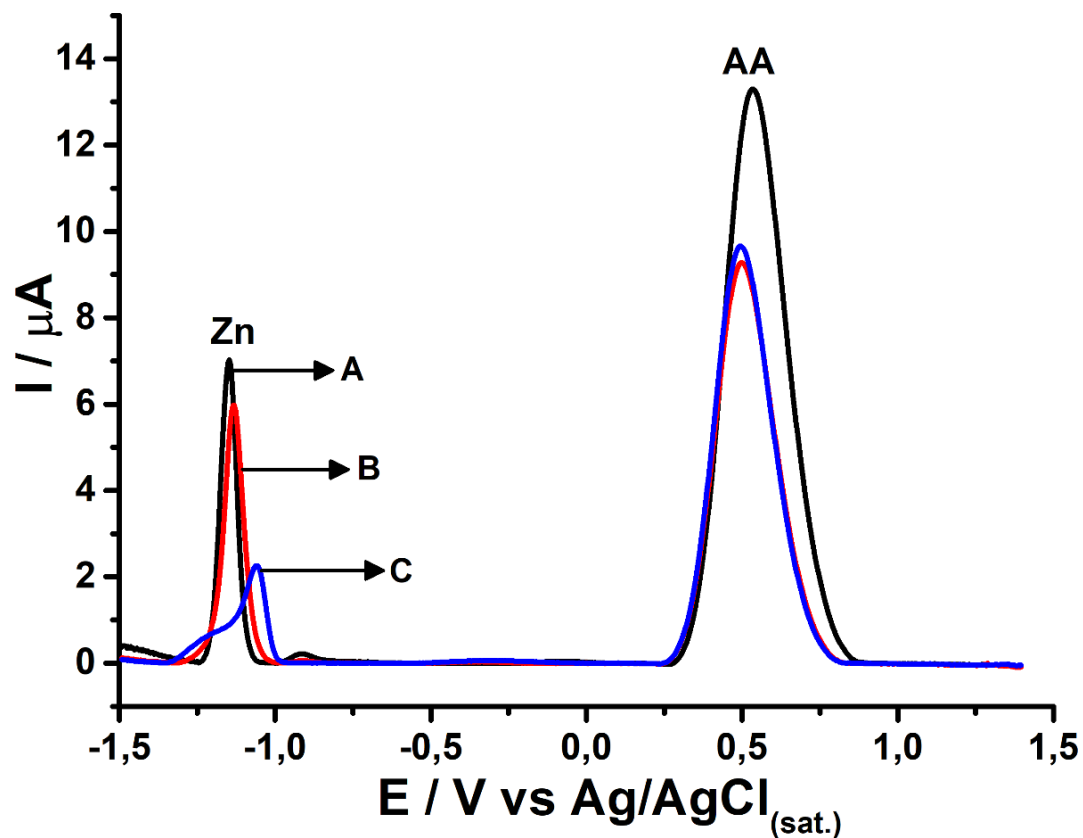
O mecanismo de eletro-oxidação do AA em material de carbono e em soluções neutras é bem conhecido (COMPTON; MATYSIK, 1996; HU; KUWANA, 1986; TADAYON; VAHED; BAGHERI, 2016). Em soluções com valores de pH próximo a 7, a espécie eletroativa é o ascorbato ( $\text{HAA}^-$ ;  $\text{pK}_1 = 4,2$  e  $\text{pK}_2 = 11,6$ ) e a eletro-oxidação do AA

ocorre em duas etapas. Na primeira etapa de oxidação, a transferência de um elétron e de um  $H^+$  ocorre com a formação de um ânion radical, que passa por uma segunda oxidação irreversível de 1 elétron para formar ácido desidroascórbico. O gráfico do potencial de pico em relação ao pH é mostrado na Figura 25C. Como previsto, o potencial de oxidação do AA diminui com o aumento do pH e a interseção de ambas as linhas ( $E_p \times pH$ ) está próxima do valor do primeiro  $pK_a$  (4,2).

É importante mencionar que a oxidação eletroquímica do AA é altamente dependente do tipo de terminações de superfície no eletrodo BDD (BROCENSCHI *et al.*, 2016). Desta forma, o eletrodo de BDD com o mesmo pré-tratamento de superfície precisa ser usado durante todo o estudo de pH. Por fim, com base na Figura 25B, a melhor resposta analítica em termos de corrente para o Zn, que é a espécie em menor concentração na amostra, foi obtida em  $pH = 6,0$  e, por isso, este valor de pH foi selecionado para os próximos estudos.

Como relatado no início desta seção, novos estudos seriam realizados para identificar o eletrólito de suporte a ser usado para a determinação e quantificação simultânea de Zn e AA. Além do tampão acetato, os tampões BR e o tampão composto por ácido fosfórico e ácido acético (que seria o tampão BR sem o ácido bórico) com  $pH = 6$  foram avaliados como eletrólitos de suporte. Este “tampão BR” sem o ácido bórico foi testado, para confirmar que o borato não estaria complexando com algum componente da amostra. A Figura 26 apresenta os voltamogramas de SW obtidos para este estudo e os melhores resultados foram obtidos utilizando o tampão BR, uma vez que apresentou maior resposta eletroquímica (corrente de pico) e picos com formatos gaussianos para ambos os analitos.

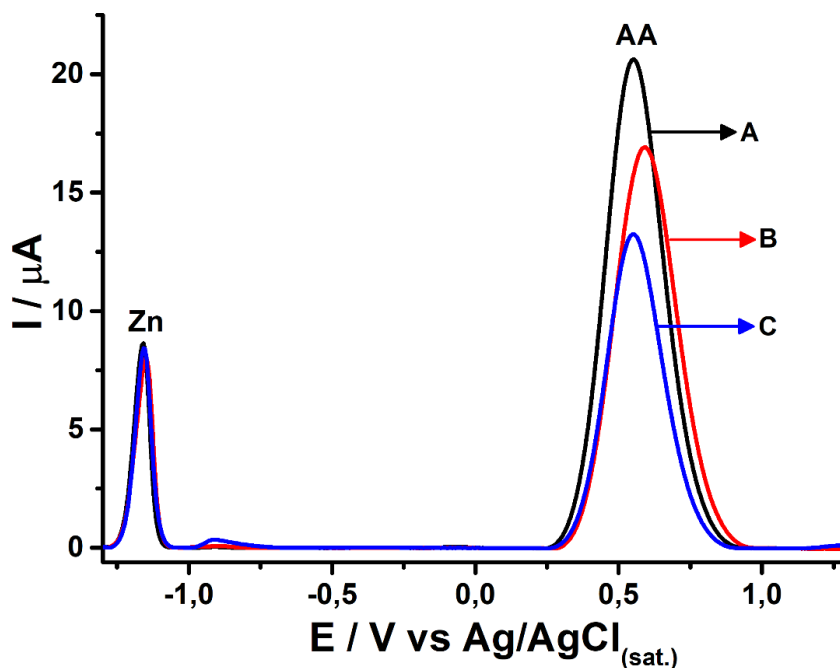
**Figura 26** - Voltamogramas de SW obtidos no estudo do efeito da variação da composição do eletrólito suporte: **(A)** 0,12 mol L<sup>-1</sup> de solução BR (pH = 6,0); **(B)** 0,12 mol L<sup>-1</sup> de H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> + 0,12 mol L<sup>-1</sup> de H<sub>3</sub>COOH (pH ajustado em pH = 6,0 com NaOH); **(C)** 0,12 mol L<sup>-1</sup> de H<sub>3</sub>COOH (pH ajustado em 5,75 com NaOH). Concentração dos analitos: 5 μmol L<sup>-1</sup> de Zn e 185 μmol L<sup>-1</sup>. Demais condições vide Figura 24.



**Fonte:** A autora.

Em outro estudo foi avaliado o comportamento dos picos de Zn e AA com a variação da concentração do tampão BR em 0,06, 0,12 e 0,18 mol L<sup>-1</sup> (pH = 6,0). Os voltamogramas de SW são apresentados na Figura 27.

**Figura 27** – Voltamogramas de SW obtidos no estudo do efeito da concentração do eletrólito suporte com solução padrão de  $5 \mu\text{mol L}^{-1}$  de Zn e  $185 \mu\text{mol L}^{-1}$  de AA: **(A)**  $0,12 \text{ mol L}^{-1}$  de solução BR (pH = 6,0); **(B)**  $0,06 \text{ mol L}^{-1}$  de solução BR (pH = 6,0) e **(C)**  $0,18 \text{ mol L}^{-1}$  de solução BR (pH = 6,0). Eletrodo de trabalho: BDD após ativação anódica (+10 mA por 1000 s) e ativação catódica (-10 mA por 1000 s). Demais condições vide Figura 24.



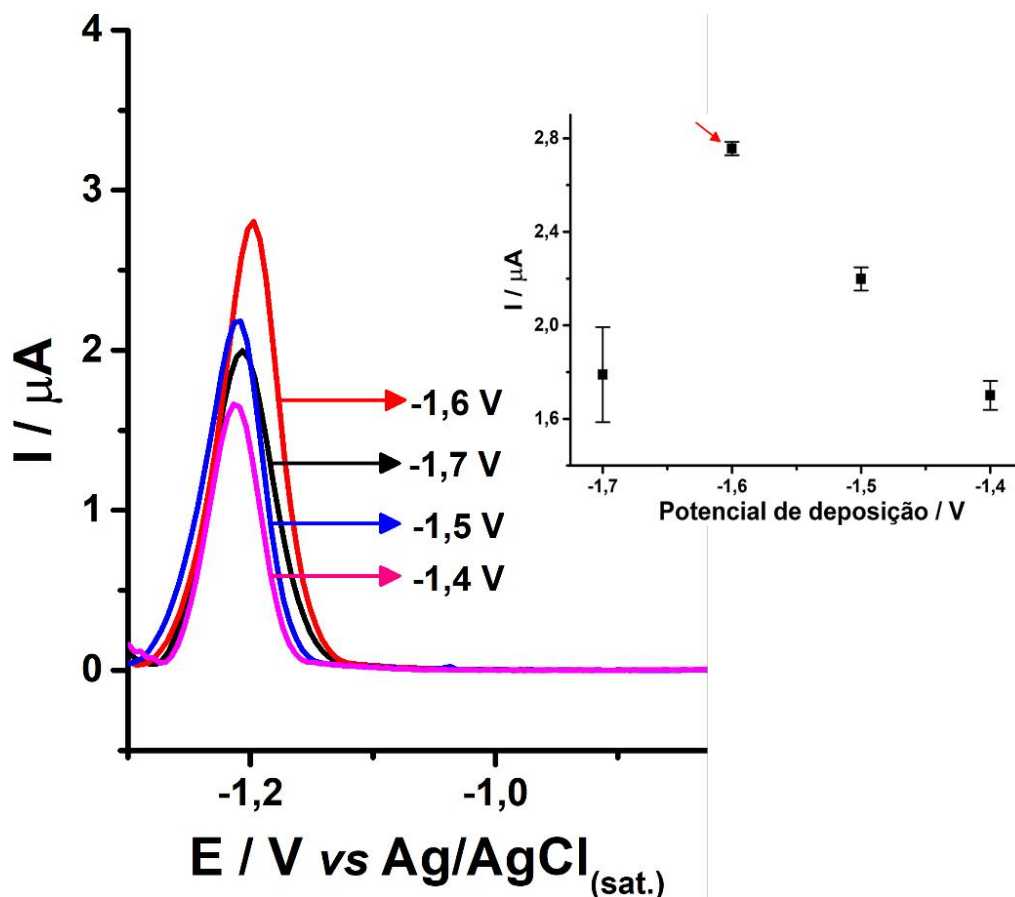
**Fonte:** A autora.

Observa-se que a variação da concentração do tampão BR não afetou o sinal de corrente do Zn, porém, para o AA, a concentração de  $0,12 \text{ mol L}^{-1}$  apresentou a maior corrente de pico. Portanto, o tampão BR  $0,12 \text{ mol L}^{-1}$  (pH = 6,0) foi selecionado como eletrólito de suporte em estudos subsequentes.

Uma vez definido o eletrólito suporte, alguns parâmetros que influenciam o desempenho do sistema BIA-SWASV foram otimizados a fim de obter um melhor desempenho analítico. Os voltamogramas de redissolução por SW obtidos para o estudo do efeito do potencial de deposição com solução padrão de  $2 \mu\text{mol L}^{-1}$  de Zn estão apresentados na Figura 28.



**Figura 28 – (A)** Voltamogramas SW e gráfico mostrando a variação da corrente de oxidação de Zn no estudo da variação do potencial de deposição (-1,4; -1,5; -1,6 e -1,7 V) com uma solução padrão de  $2 \mu\text{mol L}^{-1}$  de Zn em  $0,12 \text{ mol L}^{-1}$  de solução BR (pH = 6,0). Demais condições vide Figura 24.

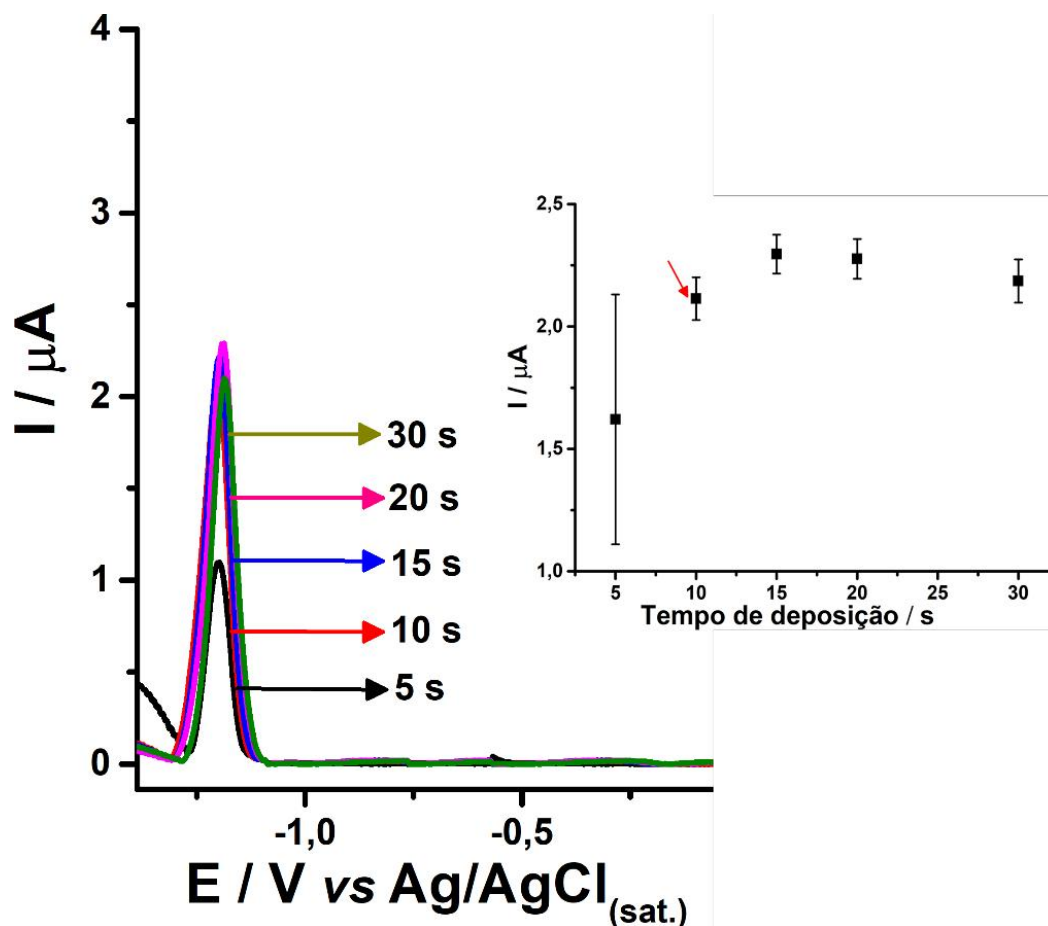


**Fonte:** A autora.

Com base no gráfico obtido é observado que a corrente de pico do Zn aumenta até o potencial de deposição de -1,6 V. No potencial de -1,7 V uma perda de sensibilidade foi observada, provavelmente por ocorrer maior evolução de hidrogênio neste potencial. Portanto, -1,6 V foi o potencial selecionado para a realização da deposição de Zn.

O próximo passo foi avaliar a influência do tempo de deposição no sinal voltamétrico do Zn. A Figura 29 apresenta os voltamogramas de SW referentes a este estudo.

**Figura 29** – (A) Voltamogramas SW e gráfico mostrando a variação da corrente de oxidação de Zn em função do tempo de deposição (5s - 30s), com uma solução padrão de  $2 \mu\text{mol L}^{-1}$  de Zn em  $0,12 \text{ mol L}^{-1}$  de solução BR (pH = 6,0); potencial de deposição:  $-1,6 \text{ V}$ . **B)** em função do tempo de deposição. Demais condições vide Figura 28.

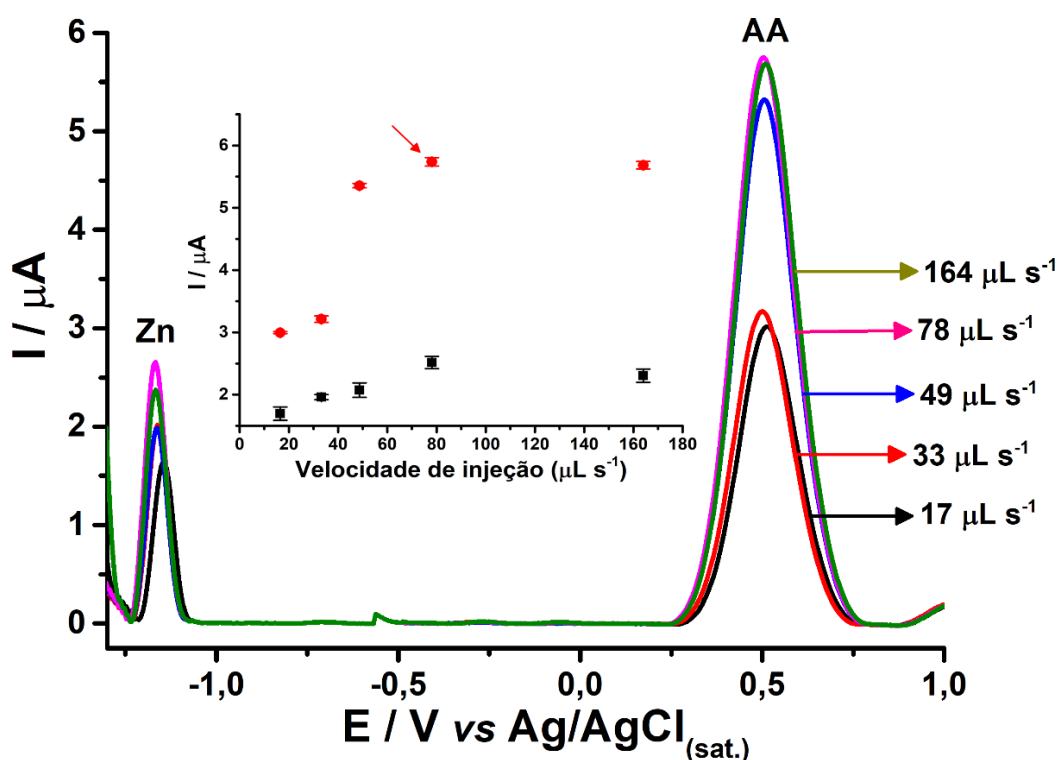


Fonte: A autora.

Observa-se nos voltamogramas de SW da Figura 29 um aumento do sinal voltamétrico para a redissolução de Zn quando o tempo de deposição varia de 5 a 15 s. Em tempos maiores que 15 s, o sinal do Zn se manteve praticamente constante. Uma vez que o trabalho visa uma análise mais rápida e com maior frequência analítica, o tempo de 10 s foi selecionado para a etapa de deposição do Zn, já que este tempo apresentou baixos desvios relativos e valores de corrente muito próximos ao tempo de deposição de 15 s.

No último estudo da etapa de deposição do Zn, os parâmetros relacionados com a pipeta eletrônica foram avaliados: velocidade (Figura 30) e o volume de injeção (Figura 31).

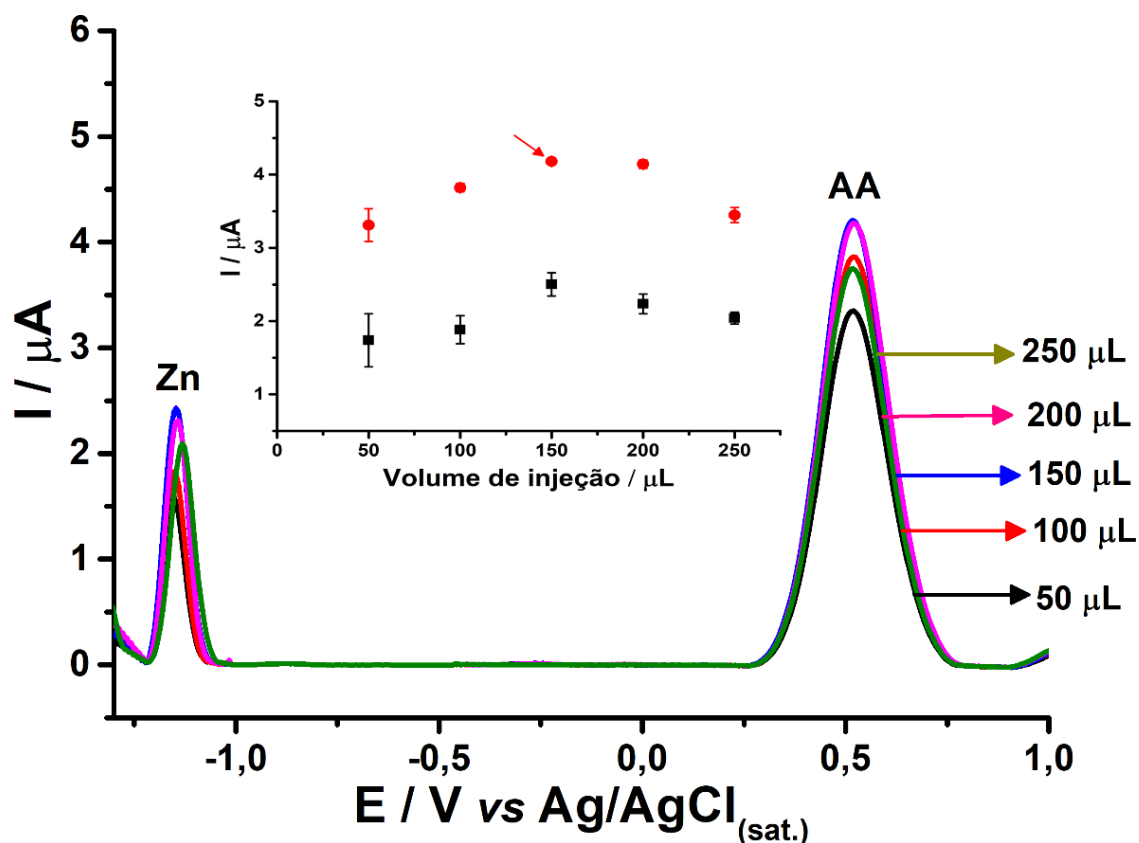
**Figura 30 – (A)** Voltamogramas de SW e gráfico mostrando a variação da corrente de oxidação de Zn e AA em função da variação da velocidade de injeção ( $17\mu\text{L s}^{-1}$  a  $164\mu\text{L s}^{-1}$ ) com padrão de  $5\mu\text{mol L}^{-1}$  de Zn e  $185\mu\text{mol L}^{-1}$  de AA em  $0,12\text{mol L}^{-1}$  de solução BR (pH = 6,0). Potencial de deposição:  $-1,6\text{ V}$ ; tempo de deposição: 10 s. Demais condições vide Figura 29.



Fonte: A autora.

Observa-se que o aumento da velocidade de injeção até  $78\mu\text{L s}^{-1}$  levou a um aumento no sinal voltamétrico tanto para o Zn como para o AA. Em velocidades maiores, o sinal de ambos se manteve estável. Portanto, a velocidade de injeção de  $78\mu\text{L s}^{-1}$  foi utilizada nos estudos posteriores.

**Figura 31** – (A) Voltamogramas de SW e gráfico mostrando a variação da corrente de oxidação de Zn e AA em função da variação do volume de injeção (50  $\mu\text{L}$  - 250  $\mu\text{L}$ ) com solução padrão de 5  $\mu\text{mol L}^{-1}$  de Zn e 185  $\mu\text{mol L}^{-1}$  de AA em 0,12  $\text{mol L}^{-1}$  de solução BR (pH = 6,0). Potencial de deposição: -1,6 V e tempo de deposição: 10 s e velocidade de injeção: 78  $\mu\text{L s}^{-1}$ . Demais condições vide Figura 30.



Fonte: A autora.

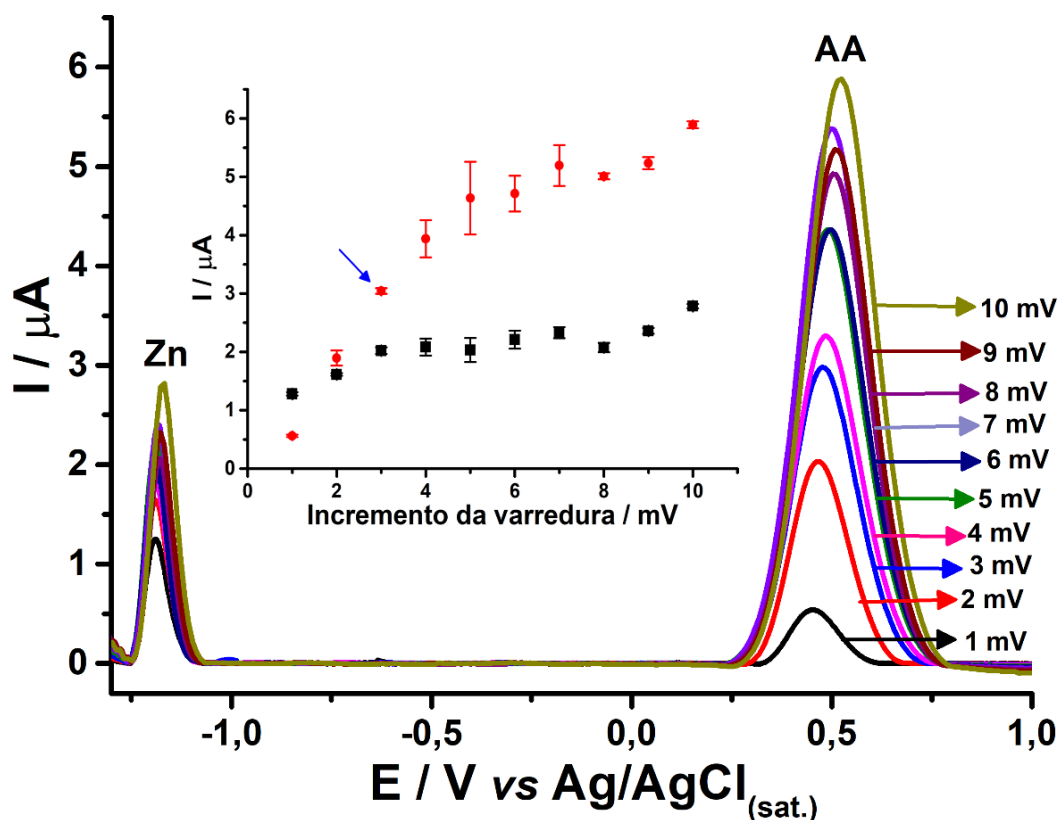
Observa-se na Figura 31 um crescente aumento no sinal voltamétrico tanto para o Zn quanto para o AA com o aumento do volume de injeção até 150  $\mu\text{L}$ . Em volumes superiores, o sinal voltamétrico, tanto para o Zn quanto para o AA, apresentou uma leve queda. Desta forma, o volume de injeção de 150  $\mu\text{L}$  foi selecionado para os estudos posteriores.

Após definição dos parâmetros relacionados ao sistema BIA e ao processo de deposição do Zn, os parâmetros instrumentais relacionados com a técnica de SWV, como incremento de potencial ( $\Delta E$ s), frequência de aplicação de potenciais ( $f$ ) e a amplitude de pulso de potencial ( $a$ ) foram avaliados. Tais parâmetros foram otimizados com o intuito de

obter a melhor resposta, em termos de intensidade de corrente, perfil voltamétrico e estabilidade de sinal.

O incremento de potencial foi avaliado em um intervalo de 1 a 10 mV, onde a frequência e amplitude foram mantidas em 30 Hz e 60 mV, respectivamente. Os voltamogramas de SW obtidos são apresentados na Figura 31.

**Figura 32** - (A) Voltamogramas de SW e gráfico mostrando a variação da corrente de oxidação de Zn e AA obtidos no estudo do efeito do incremento de potencial (1 – 10 mV) usando uma solução padrão de  $5 \mu\text{mol L}^{-1}$  de Zn e  $185 \mu\text{mol L}^{-1}$  de AA em  $0,12 \text{ mol L}^{-1}$  de solução BR (pH = 6,0); frequência: 30 Hz; amplitude: 60 mV. Demais condições vide Figura 31.



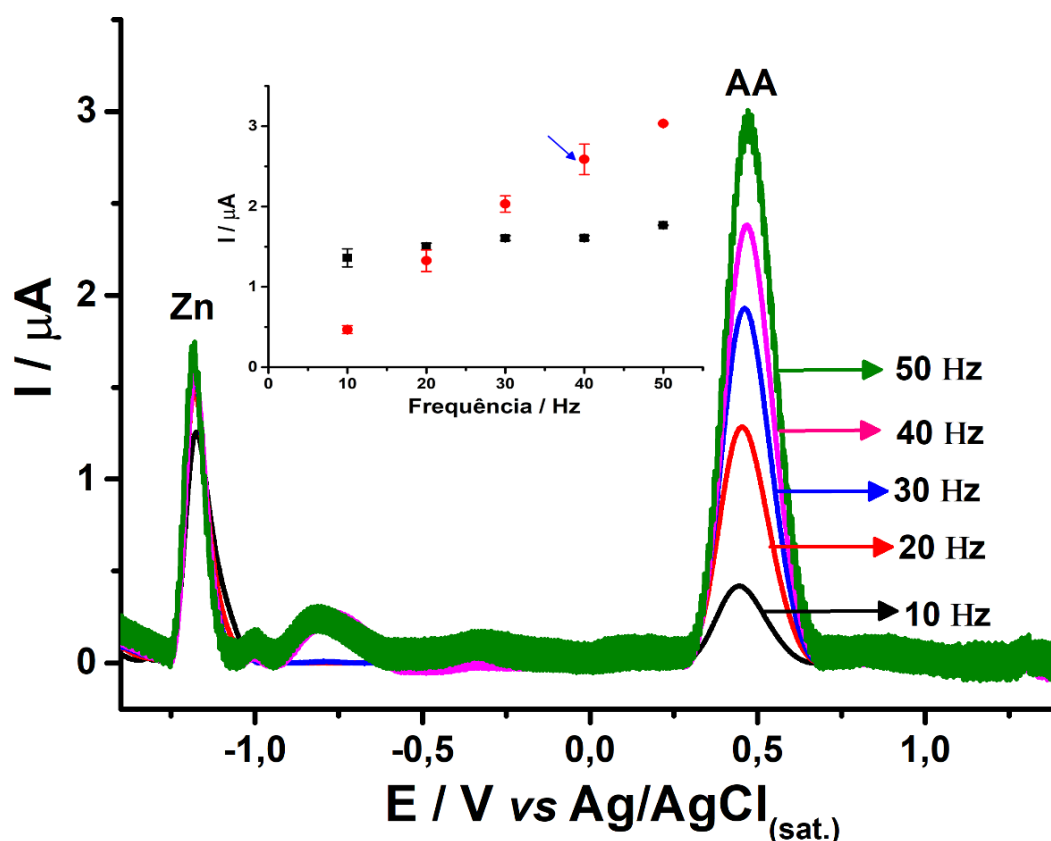
Fonte: A autora.

Observa-se um ganho de corrente significativo até o incremento de potencial de 3 mV. Após esse valor, a corrente do Zn se manteve praticamente constante até 9 mV e um novo aumento no incremento de 10 mV foi observado. Para o AA é observado um aumento

constante de corrente, com desvios mais elevados no intervalo de 4 a 8 mV. Portanto, o incremento de potencial de 3 mV foi selecionado para os estudos posteriores, uma vez que os desvios padrões da corrente de oxidação do AA no intervalo de 4 a 8 mV foi mais elevado.

O próximo passo foi estudar a frequência de aplicação de pulsos de potenciais. O aumento na frequência mostrou um aumento significativo nos valores de corrente para a oxidação do AA e uma variação muito pequena para a oxidação do Zn. A Figura 33 apresenta os voltamogramas de SW obtidos neste estudo.

**Figura 33** - Voltamogramas de SW e gráfico mostrando a variação da corrente de oxidação de Zn e AA obtidos no estudo do efeito da variação da frequência (10 – 50 Hz) usando uma solução padrão de  $5 \mu\text{mol L}^{-1}$  de Zn e  $185 \mu\text{mol L}^{-1}$  de AA em  $0,12 \text{ mol L}^{-1}$  de solução BR (pH = 6,0); incremento de varredura: 3mV; amplitude: 60 mV. Demais condições vide Figura 32.

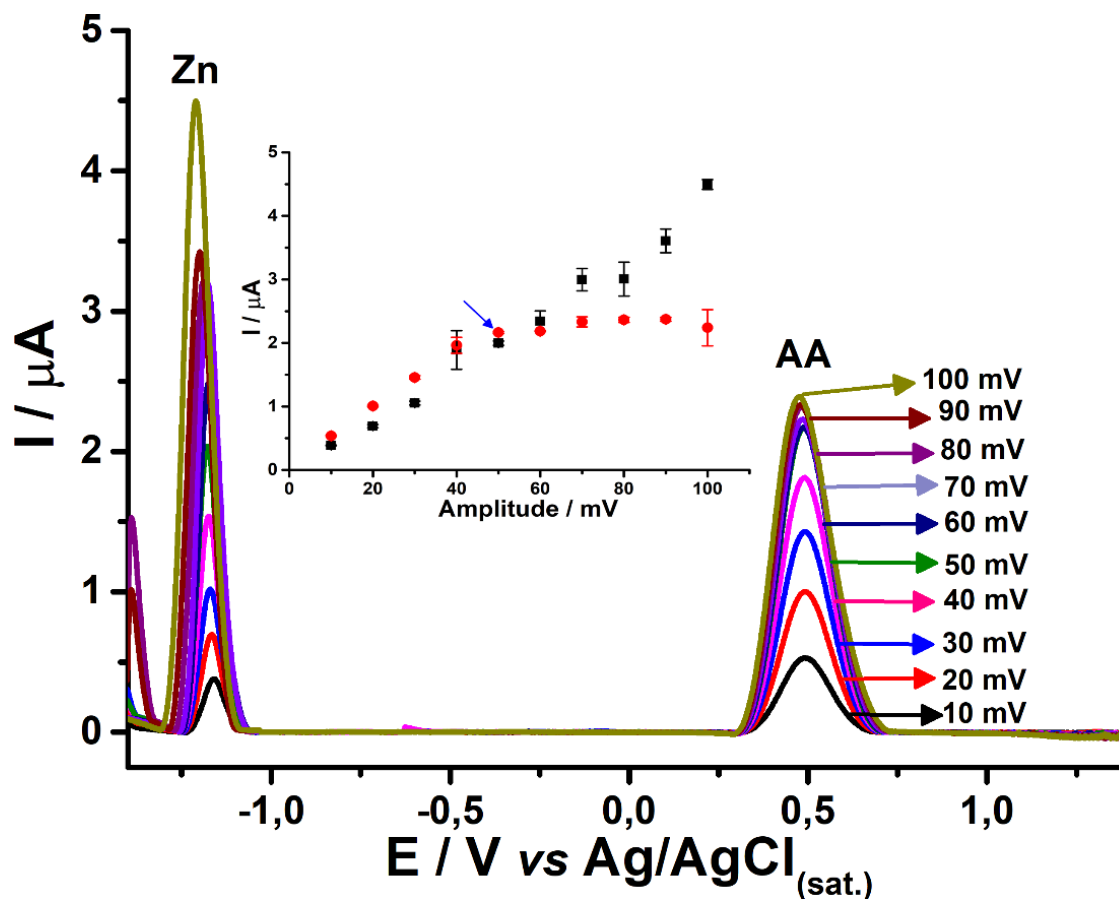


Fonte: A autora.

Observa-se um comportamento linear da frequência com relação à corrente de pico para a molécula de AA. Este perfil é característico de processos adsorptivos de espécies eletroativas na superfície do eletrodo (O'DEA; RIBES; OSTERYOUNG, 1993). Apesar da frequência de 50 Hz ter apresentado uma corrente de pico mais elevada e menor desvio relativo, a frequência de 40 Hz foi selecionada, pois a linha base do voltamograma apresentou um ruído mais elevado com a frequência de 50 Hz, o que poderia diminuir a detectabilidade (diminuição da relação sinal/ruído) e estabilidade do método proposto.

Outro parâmetro estudado foi a influência da amplitude. A Figura 34 apresenta os voltamogramas em função da variação amplitude de aplicação de pulsos de potenciais (10 a 100 mV). A frequência e o incremento de potencial foram mantidos constantes em 40 Hz e 3 mV, respectivamente.

**Figura 34** - Voltamogramas de SW e gráfico mostrando a variação da corrente de oxidação de Zn e AA obtidos no estudo da variação da amplitude (10 mV – 100 mV) com o padrão de 5  $\mu\text{mol L}^{-1}$  de Zn e 185  $\mu\text{mol L}^{-1}$  de AA em 0,12 mol  $\text{L}^{-1}$  de solução BR (pH = 6,0); incremento de varredura: 3mV e frequência: 40 Hz. Demais condições vide Figura 33.



**Fonte:** A autora.

Observa-se que o aumento da amplitude levou a um aumento linear na corrente de pico para o Zn em toda a faixa estudada. Já para o AA, a corrente se mantém praticamente estável acima de 50 mV. Portanto, a amplitude de 50 mV foi selecionada para os próximos estudos.

A Tabela 6 apresenta um resumo de todos os parâmetros otimizados para a determinação simultânea de Zn e AA utilizando o sistema BIA–SWASV.



**Tabela 6** - Condições otimizadas para a determinação simultânea de Zn e AA por BIA–SWASV.

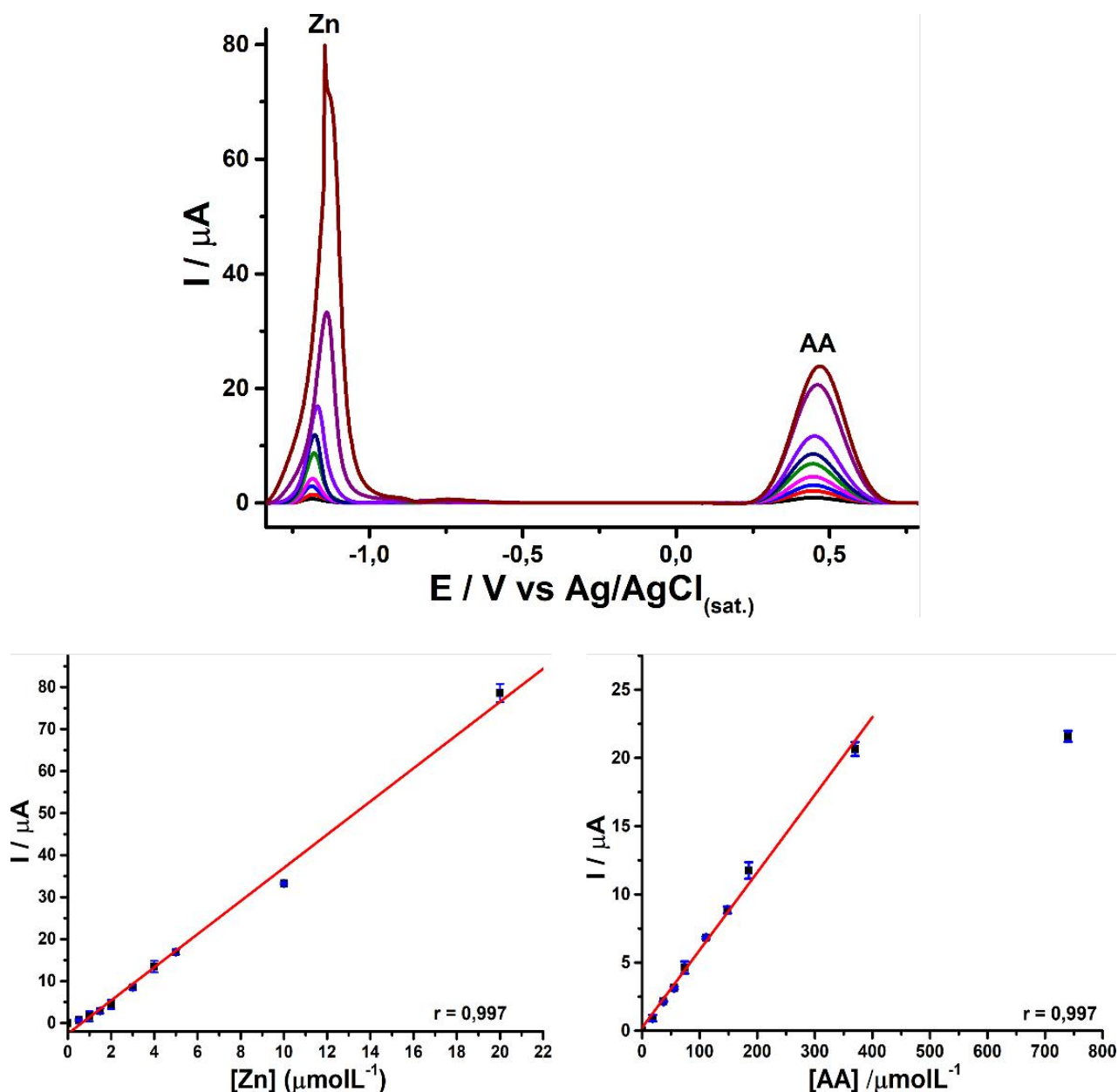
<b>Parâmetros</b>	<b>Faixa estudada</b>	<b>Valores otimizados</b>
<b>Faixa de pH</b>	2 – 7	6
<b>Concentração do BR (mmol L<sup>-1</sup>)</b>	0,06 – 0,18	0,12
<b>Potencial de deposição do Zn (V)</b>	-1,7 – 1,4	-1,6
<b>Tempo de deposição do Zn (s)</b>	5 – 30	10
<b>Frequência (Hz)</b>	10 – 50	40
<b>Amplitude (mV)</b>	10 – 100	50
<b>Incremento de potencial (mV)</b>	1 – 10	3
<b>Velocidade de injeção (µL s<sup>-1</sup>)</b>	17 – 164	78
<b>Volume de injeção (µL)</b>	50 – 250	150

**Fonte:** A autora.

O próximo passo foi avaliar a faixa linear do método para determinação simultânea do Zn e AA. Vale ressaltar que para a faixa linear foi dada maior ênfase à concentração de AA, uma vez que esta espécie está presente em concentração muito elevada na formulação farmacêutica. Ou seja, após a diluição da amostra, a concentração de AA necessita estar na faixa linear de resposta do método para este analito. Neste estudo, soluções contendo a mesma diferença nas concentrações entre o Zn e o AA à existente em amostras comerciais (37 vezes mais AA que Zn) foram empregadas. A Figura 35 apresenta os voltamogramas de SW obtidos para injeção de soluções com concentrações crescentes de Zn e AA no sistema BIA e as respectivas curvas de calibração. As soluções padrão avaliadas apresentaram resposta linear na faixa de concentração de 0,5 – 20,0 µmol L<sup>-1</sup> para o Zn e de 18,5 – 370,0 µmol L<sup>-1</sup> para o AA. A partir destes resultados, os limites de detecção (LD) foram calculados em 0,2 e 5,4 µmol L<sup>-1</sup> para o Zn e AA, respectivamente. O LD foi calculado levando em consideração a regra da IUPAC em que:  $LD = 3s_B/S$  e  $LQ = 10s_B/S$  (onde  $s_B$  é o desvio padrão

do ruído da linha de base e  $S$  é a inclinação das curvas de calibração obtidas com soluções padrão).

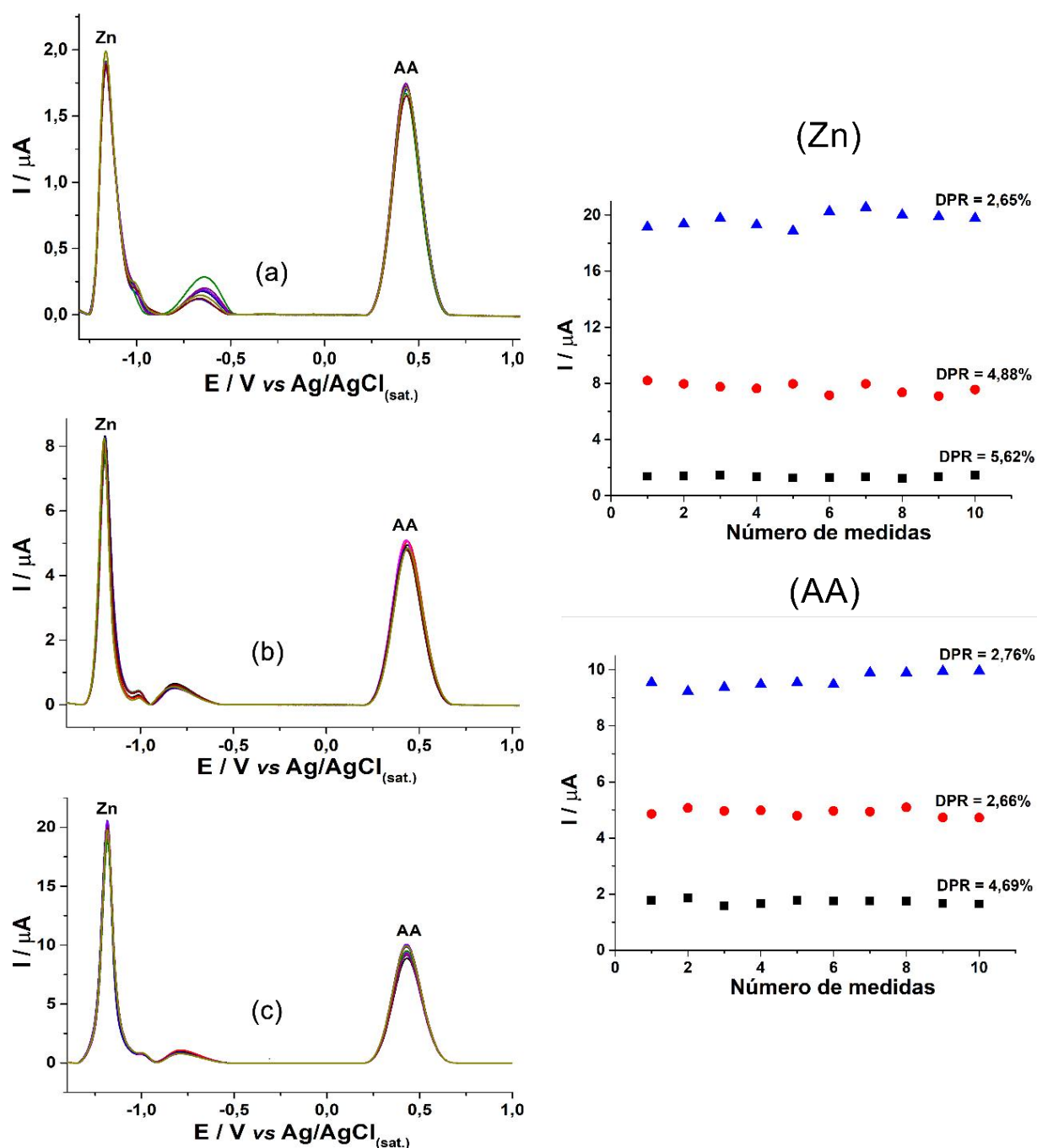
**Figura 35** – Voltamogramas de SW e gráficos mostrando a variação da corrente de oxidação de Zn e AA obtidos no estudo da faixa linear com solução padrão de Zn variando de 0,5 - 20  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ) e solução padrão de AA variando de 18,5 - 370  $\mu\text{mol L}^{-1}$  em 0,12 mol  $\text{L}^{-1}$  de solução BR (pH = 6,0). Demais condições vide Figura 34.



Fonte: A autora.

Após a realização dos estudos de otimização dos parâmetros relacionados com a determinação de Zn e AA por BIA–SWASV, um estudo para avaliar a estabilidade do método foi realizado a partir de injeções sucessivas ( $n = 10$ ) de três soluções padrão contendo diferentes concentrações: (a)  $1 \mu\text{mol L}^{-1}$  e  $37 \mu\text{mol L}^{-1}$ ; (b)  $3 \mu\text{mol L}^{-1}$  e  $111 \mu\text{mol L}^{-1}$  e (c)  $5 \mu\text{mol L}^{-1}$  e  $185 \mu\text{mol L}^{-1}$  de Zn e AA, respectivamente. Os valores de DPR obtidos nestes estudos foram menores do que 5,6% para o Zn, e menores que 4,8% para o AA. Portanto, podemos concluir que o método proposto é estável nas condições otimizadas. A repetibilidade entre dias diferentes (inter-dias) foi avaliada através de medidas realizadas em três dias diferentes. Neste estudo, os valores de DPR foram de 12,2% e 6,9% para o Zn e AA, respectivamente. Este resultado confirma a importância de se fazer a curva de calibração diariamente, para que uma maior precisão na análise das amostras seja obtida. A Figura 36 apresenta os voltamogramas e os gráficos que foram obtidos neste estudo.

**Figura 36** - Voltamogramas de SW e gráficos obtidos no estudo de repetibilidade para 10 injeções sucessivas de soluções padrão contendo (a) 1,0/37,0 (■), (b) 3,0/111,0 (●) e (c) 5,0/185,0 (▲)  $\mu\text{mol L}^{-1}$  de Zn /AA, respectivamente. Eletrólito suporte 0,12 mol  $\text{L}^{-1}$  de solução BR (pH = 6,0). Potencial de deposição: -1,6 V; tempo de deposição: 10 s; velocidade de injeção: 78  $\mu\text{L s}^{-1}$ ; volume de injeção: 150  $\mu\text{L}$ ; incremento de varredura: 3 mV; frequência: 40 Hz e amplitude: 50 mV.



Fonte: A autora.

As características analíticas obtidas a partir de todos os estudos realizados até então estão resumidas na Tabela 7.

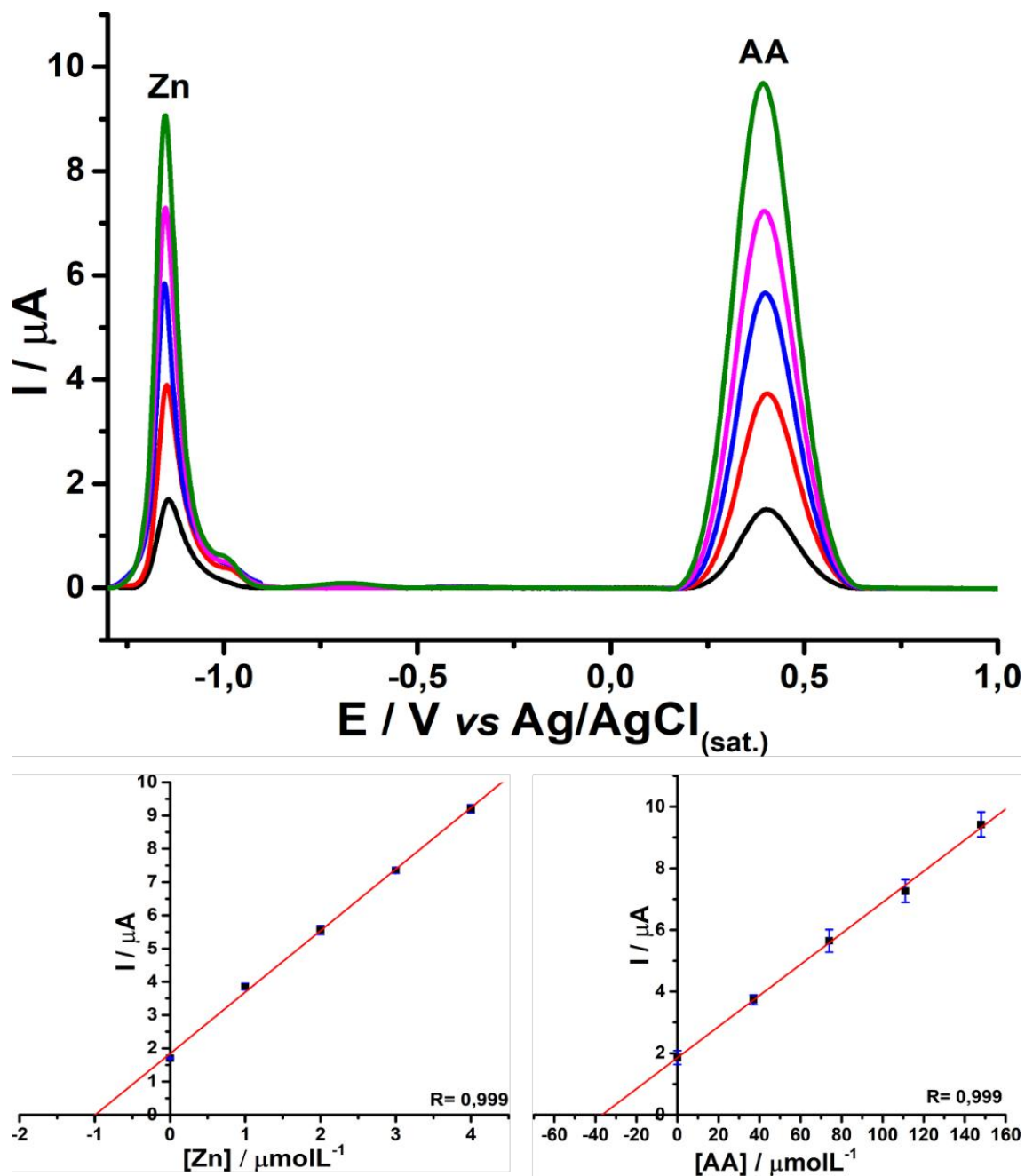
**Tabela 7** - Características analíticas do método BIA-SWASV para determinação simultânea de Zn e AA.

<b>Características analíticas</b>	<b>Zn</b>	<b>AA</b>
<b>Coefficiente de correlação (r)</b>	0,997	0,997
<b>Sensibilidade (<math>\mu\text{A V L } \mu\text{mol}^{-1}</math>)</b>	$3,95 \pm 0,1$	$0,0504 \pm 0,0011$
<b>Intercepto (<math>\mu\text{A V}</math>)</b>	$1,83 \pm 0,09$	$1,85 \pm 0,10$
<b>Faixa Linear (<math>\mu\text{mol L}^{-1}</math>)</b>	0,5 – 20,0	18,5 – 370
<b>LD (<math>\mu\text{mol L}^{-1}</math>)</b>	0,2	5,4
<b>LQ (<math>\mu\text{mol L}^{-1}</math>)</b>	0,5	17,8
<b>Frequência analítica (<math>\text{h}^{-1}</math>)</b>	67	67
<b>RSD intra-dias (n = 10)<sup>a</sup></b>	2,7	2,7
<b>RSD intra-dias (n = 10)<sup>b</sup></b>	4,9	2,8
<b>RSD intra-dias (n = 10)<sup>c</sup></b>	5,6	4,8
<b>RSD inter dias (n = 3)</b>	12,2	6,9
<b>Recuperação (%)</b>	$99 \pm 3$	$99 \pm 2$

[Zn] e [AA]:<sup>a</sup>1 e 37  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ; <sup>b</sup>3 e 111  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ; <sup>c</sup>5 e 185  $\mu\text{mol L}^{-1}$

O desempenho do método BIA-SWASV foi avaliado através da análise de quatro amostras farmacêuticas usando o método de adição de padrão. Duas das amostras continham em sua composição Zn e AA, uma apenas AA e outra apenas Zn. Os voltamogramas de SWASV e as correspondentes curvas de calibração obtidas para uma amostra contendo Zn e AA estão apresentadas na Figura 37. Para comparação, as amostras também foram analisadas por FAAS (Zn) e titulação (AA). A Tabela 8 resume os resultados obtidos na análise das quatro amostras.

**Figura 37** - Voltamogramas de SWASV e respectivas curvas de calibração obtidas para solução amostra antes (linha preta) e após adição de concentrações crescentes de solução padrão de Zn ( $1,0$ ;  $2,0$ ;  $3,0$  e  $4,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) e AA ( $37$ ,  $74$ ,  $111$  e  $148 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) em  $0,12 \text{ mol L}^{-1}$  de solução BR ( $\text{pH} = 6,0$ ). Demais condições vide Figura 36.



Fonte: A autora.

**Tabela 8** - Resultados obtidos na análise de quatro amostras usando o método BIA-SWASV e os métodos de referência (titulação para AA e FAAS para Zn. A1 e A2 são amostras que contêm Zn e AA; A3 somente Zn e A4 somente AA).

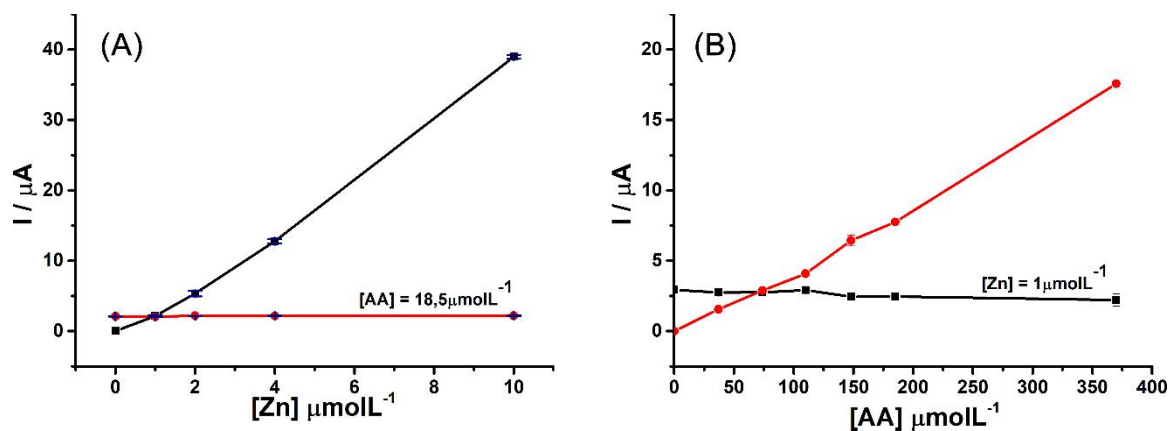
Amostra	Bula	BIA-SWASV	Titulação	FAAS	Diferença %		
					E <sub>1</sub>	E <sub>2</sub>	
A1	Zn	10,0 mg	9,9 ± 0,3	-	9,6 ± 0,2	- 1,0	+1,0
	AA	1,00 g	0,99 ± 0,02	1,01 ± 0,02	-	-1,0	-1,0
A2	Zn	10,0 mg	10,0 ± 0,3	-	9,5 ± 0,2	0	+5,0
	AA	1,00 g	0,95 ± 0,05	1,01 ± 0,02	-	-5,0	-6,0
A3	Zn	10,0 mg	9,34 ± 0,10	-	9,57 ± 0,24	-6,6	-2,3
A4	AA	1,00 g	0,98 ± 0,05	1,06 ± 0,04	-	-2,0	+8,0

E<sub>1</sub>: diferença entre os resultados obtidos por BIA-SWASV e os valores contidos na bula; E<sub>2</sub>: diferença entre os resultados obtidos por BIA-SWASV e pelos métodos de referência (Titulação e FAAS).

De acordo com o teste t-Student pareado, os valores da Tabela 8 foram inferiores ao valor crítico teórico (2,78; n=3) com um nível de confiança de 95%, o que indica que os resultados obtidos são estatisticamente equivalentes. Estudos de recuperação também foram realizados pela análise das amostras antes e após a adição de Zn e AA e os valores médios de recuperação foram de 99 ± 3% e 99 ± 2%, respectivamente. Esses resultados indicam a ausência de efeitos da matriz e evidenciam a precisão do método.

Por fim, foi feito um estudo para avaliar a possibilidade de interferência recíproca entre a redissolução anódica de Zn e a oxidação do AA. Na Figura 38A são apresentados os voltamogramas de SWASV obtidos para soluções contendo concentrações crescentes de Zn (1 a 10 µmol L<sup>-1</sup>) e constante de AA (18,5 µmol L<sup>-1</sup>). Na Figura 38B são apresentados os voltamogramas de SWASV obtidos para soluções contendo concentrações crescentes de AA (37 a 350 µmol L<sup>-1</sup>) e constante de Zn (1 µmol L<sup>-1</sup>).

**Figura 38** – Estudo da interferência recíproca entre Zn e AA. **(A)** Zn (1 a 10  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ) e AA = 18,5  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ; **(B)** AA (37 a 350  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ) e Zn = 1  $\mu\text{mol L}^{-1}$ . Demais condições experimentais vide Figura 36.



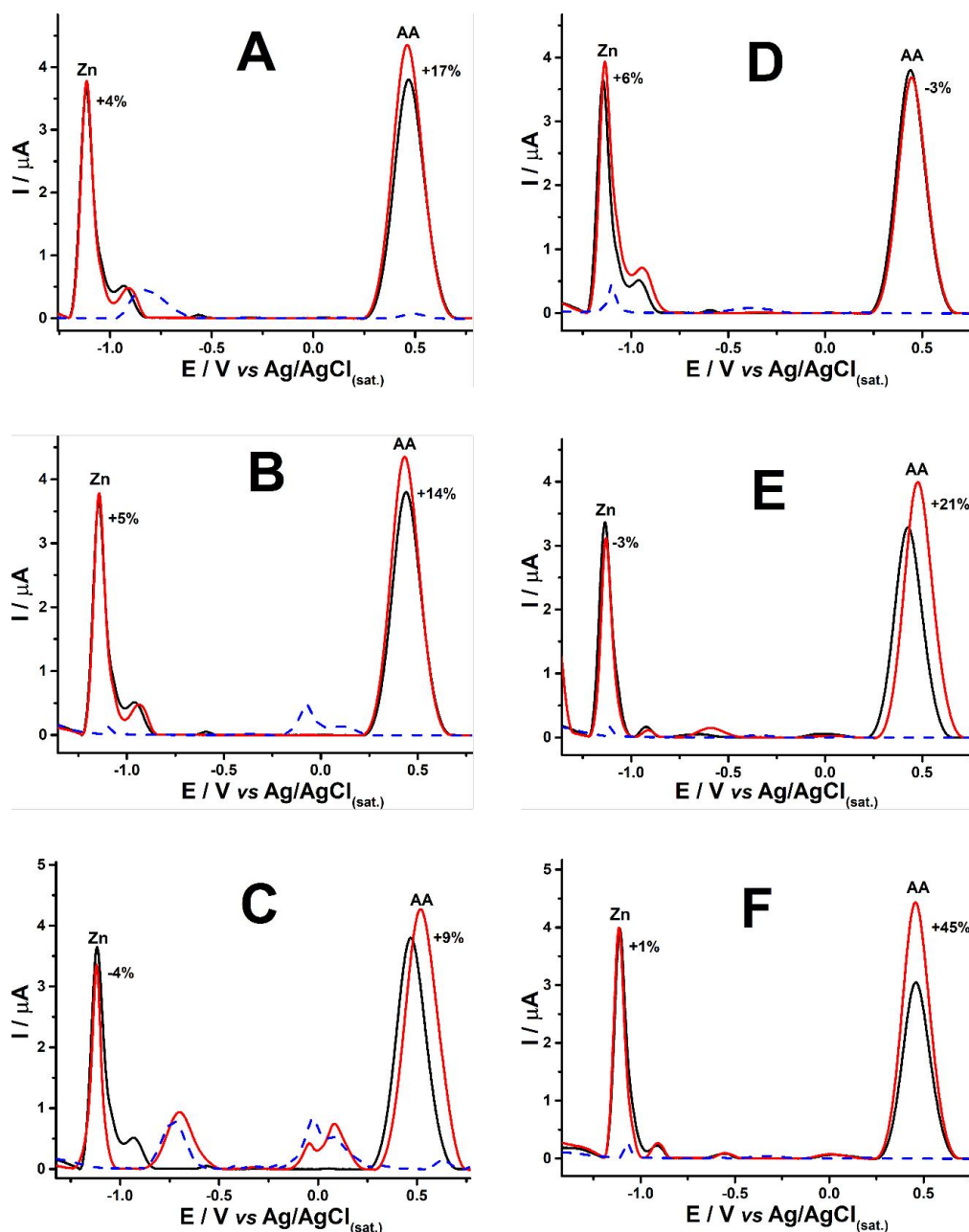
**Fonte:** A autora.

Como pode ser observado neste estudo, o aumento linear de concentração de uma das espécies não interferiu significativamente na resposta eletroquímica da outra espécie. Desta forma, pode-se dizer que não há interferência entre as etapas de redissolução anódica do Zn e a oxidação do AA, na faixa de concentração estudada.

Adicionalmente, um estudo de interferência foi realizado na presença de alguns compostos que podem ser encontrados na presença do Zn e AA em comprimidos multivitamínicos disponíveis comercialmente, como o magnésio, cálcio, ácido fólico, biotina, vitamina A e vitamina D. As concentrações utilizadas nesses estudos foram semelhantes às encontradas em amostras comerciais, ou seja, próximas à concentração do Zn. Na Figura 39 são mostrados os voltamogramas de SWASV para as soluções com cada potencial interferente (linha tracejada azul) e soluções contendo 2  $\mu\text{mol L}^{-1}$  de Zn e 74  $\mu\text{mol L}^{-1}$  de AA antes (linha preta) e depois (linha vermelha) da adição dos possíveis interferentes (2  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ).



**Figura 39** - Estudo de interferência. Voltamogramas de SWASV obtidos para uma solução contendo  $2 \mu\text{mol L}^{-1}$  de Zn e  $74 \mu\text{mol L}^{-1}$  de AA antes (linha preta) e após (linha vermelha) a adição dos possíveis interferentes ( $2 \mu\text{mol L}^{-1}$ ). Voltamogramas obtidos para soluções contendo apenas cada interferente também são apresentados (linha tracejada azul): magnésio (A), cálcio (B), ácido fólico (C), biotina (D), vitamina A (E) e vitamina D (F). Condições experimentais vide Figura 36.



Fonte: A autora.

Como demonstrado neste estudo, nenhum pico foi observado para os interferentes na região do potencial que o Zn (-1,16 V) ou AA (+0,45 V) são oxidados. Quando as soluções padrão contendo Zn e AA sem e com a presença dos potenciais interferentes foram avaliadas, alterações muito pequenas ( $\leq 6\%$ ) na corrente de pico do Zn foram observadas. Contudo, para o AA, variações importantes foram observadas na presença de vitamina A (21%) e vitamina D (45%). Apesar dessas espécies fornecerem uma variação elevada na corrente do AA, não foram observadas alterações no perfil voltamétrico do AA. Portanto, o uso do método de adição padrão pode evitar os efeitos de interferência causados por esses compostos nas amostras. É pertinente também ressaltar, que em algumas formulações de Zn e AA tem-se a presença da vitamina A e D, e que essas vitaminas não interferem na quantificação do AA, uma vez que a concentração dessas espécies é muito menor ( $\mu\text{g/comprimido}$ ) que a concentração utilizada neste experimento.

A Tabela 9 mostra uma comparação entre as características analíticas do método desenvolvido por BIA-SWASV e o método usando eletroforese capilar (CE-C<sup>4</sup>D) descrito anteriormente nesta tese.

**Tabela 9** – Comparação das características analíticas dos dois métodos desenvolvidos, BIA-SWASV e CE-C<sup>4</sup>D, para a determinação simultânea de Zn e AA em amostras farmacêuticas.

<b>Parâmetros</b>		<b>CE-C<sup>4</sup>D</b>	<b>BIA-SWASV</b>
Faixa linear ( $\mu\text{mol L}^{-1}$ )	Zn	150 – 400	0,5 – 20,0
	AA	5550 – 14800	18,5 – 370
LD ( $\mu\text{mol L}^{-1}$ )	Zn	10	0,2
	AA	20	5,4
Injeções ( $\text{h}^{-1}$ )		48	67
RSD intra-dias		< 8,2%	< 5,6%
Portabilidade		Não	Sim
Preparo de amostra		Diluição em água e adição de níquel	Diluição no eletrólito suporte

**Fonte:** A autora.

Com base nos resultados pode-se dizer que o método BIA-SWASV apresenta limites de detecção mais baixos e não requer o uso de um reagente adicional (Ni) para evitar a interferência do citrato (excipiente presente na amostra) na determinação de Zn. Além disso, o método BIA possui maior potencial de portabilidade. Contudo, no método CE-C<sup>4</sup>D, a quantificação é mais rápida, pelo fato de se utilizar a calibração externa, além de ser mais econômica, pois um menor volume de amostras e reagentes é utilizado. O fato de apresentar maiores limites de detecção não é um problema, levando em conta que as concentrações dos analitos no tipo de amostra analisada é elevada. É interessante notar que cada método possui faixas lineares em regiões distintas, ou seja, dependendo do tipo de amostra que contenha essas espécies, o método mais adequado pode ser selecionado.

#### 4.2.1. Conclusões parciais

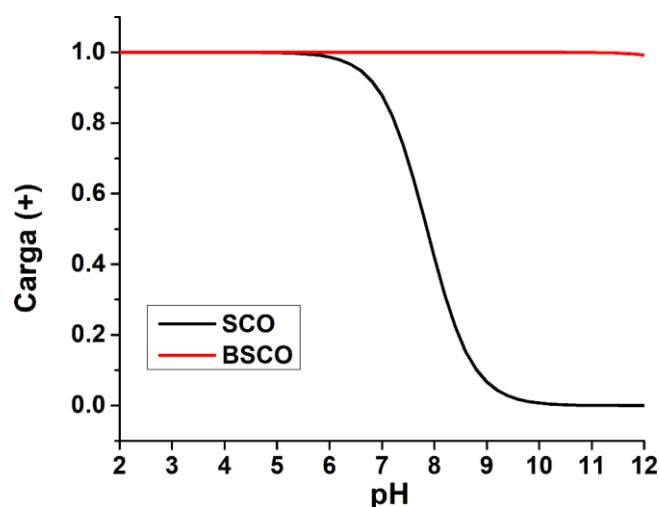
Nesta parte do trabalho foi desenvolvido pela primeira vez um método simples e portátil utilizando a técnica BIA-SWASV para a determinação simultânea de Zn (composto inorgânico) e AA (composto orgânico). O método proposto apresentou seletividade, boa precisão (recuperações em torno de 100%), frequência analítica de 67 injeções  $\text{h}^{-1}$ , preparo de amostra simples (apenas dissolução no eletrólito suporte), e são utilizados pequenos volumes de amostras e reagentes por análise. É um método apropriado para ser utilizado em laboratórios com infraestrutura limitada.

## SEGUNDA PARTE: DETERMINAÇÃO SIMULTÂNEA DE ESCOPOLAMINA E BUTILESCOPOLAMINA EM FÁRMACO E AMOSTRAS DE BEBIDAS.

### 4.3. Determinação simultânea de SCO e BSCO por CE-C<sup>4</sup>D.

Conforme já relatado na literatura (BREWER *et al.*, 2014), a SCO apresenta em sua molécula um grupo nitrogênio de baixa basicidade com um valor de  $pK_a = 7,75$ . Desta forma, a SCO está presente predominantemente em sua forma catiônica em soluções aquosas com pH menores que 7,75. Em valores de pH mais altos, as moléculas de SCO perdem gradualmente sua carga, e sua forma neutra é que predomina, portanto, em valores de pH maiores que 9,7, a CZE não pode mais ser usada. Além disso, outro fator muito importante, é a solubilidade da SCO, que é muito baixa em soluções aquosas com pH superior a 7,0 (SWAIN, 2012). Por outro lado, a BSCO é um sal de amônio quaternário, que está carregada positivamente em toda faixa de pH dos eletrólitos aquosos comumente utilizados em CZE (2-12) (CHERKAOUI *et al.*, 1998a). Os gráficos de carga versus pH da SCO e BSCO são mostrados na Figura 40.

**Figura 40** – Gráfico da distribuição de carga da SCO e BSCO em função do pH.



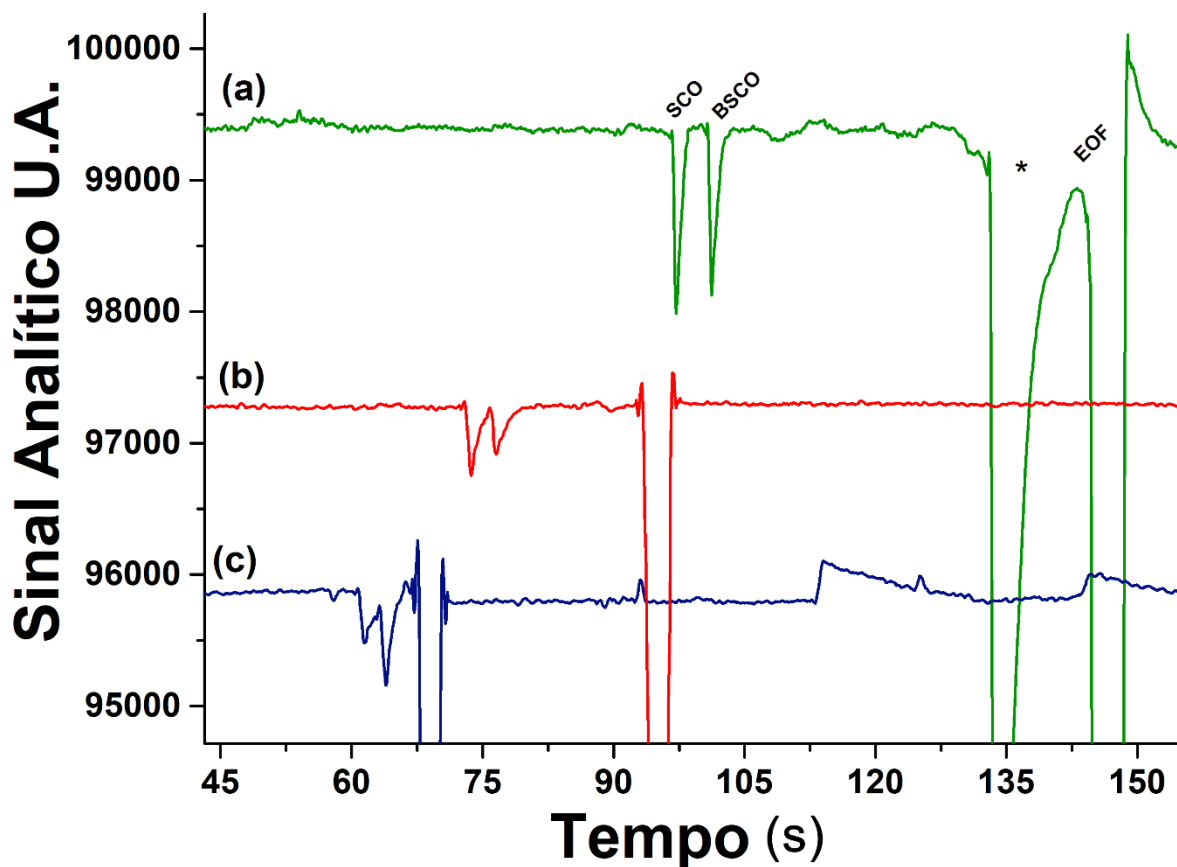
Fonte: CurtiPot, GUTZ, 1992.

Apesar da SCO e BSCO apresentarem massas molares e estruturas muito parecidas, o comportamento dessas espécies ao longo da faixa de pH é muito diferente, o que pode viabilizar a separação por CZE. Portanto, a separação das duas espécies será dependente do pH do BGE, uma vez que este fator irá influenciar na magnitude da protonação da SCO. Além da distribuição de cargas ao longo da faixa de pH, o grupo butil da BSCO também deve contribuir para a diferença da mobilidade eletroforética entre os dois compostos.

Quando a CE com detecção do tipo C<sup>4</sup>D é utilizada na separação e detecção de cátions orgânicos em diferentes tipos de amostras, os cátions inorgânicos comumente presentes, como sódio, cálcio, magnésio e outros, podem ser espécies potencialmente interferentes (FRACASSI DA SILVA, 2003). Desta forma, a utilização de BGE's com maior condutividade, como por exemplo, compostos por ácidos orgânicos fracos com pH ajustado com NaOH foram selecionados para os estudos iniciais.

Neste estudo, três ácidos orgânicos foram inicialmente avaliados: (i) ácido butírico (pKa=4,9), (ii) MES (pKa=6,2) e (iii) TAPS (pKa=8,3). Para este estudo foi utilizada uma solução padrão contendo 100 µmol L<sup>-1</sup> de ambos os compostos (SCO e BSCO). Cada BGE era composto por: (a) 20 mmol L<sup>-1</sup> de ácido butírico + 7 mmol L<sup>-1</sup> NaOH (pH 4,5); (b) 20 mmol L<sup>-1</sup> de MES + 10 mmol L<sup>-1</sup> de NaOH (pH 6,0); (c) TAPS 20 mmol L<sup>-1</sup> + NaOH 10 mmol L<sup>-1</sup> (pH 8,0). Os eletroferogramas obtidos neste estudo são mostrados na Figura 41.

**Figura 41** – Eletroferogramas obtidos com injeção de solução padrão de 100  $\mu\text{mol L}^{-1}$  de SCO e BSCO usando diferentes composições de BGE: (a) 20  $\text{mmol L}^{-1}$  de ácido butírico + 7  $\text{mmol L}^{-1}$  de NaOH (pH=4,5); (b) 20  $\text{mmol L}^{-1}$  de MES + 10  $\text{mmol L}^{-1}$  de NaOH (pH=6,0) e (c) 20  $\text{mmol L}^{-1}$  de TAPS + 10  $\text{mmol L}^{-1}$  de NaOH (pH=8,0); Tempo de injeção: 1,0 s; Comprimento total e efetivo do capilar: 50 e 40 cm; Potencial de separação: +25kV (lado da injeção); \*Pico de sistema.



Fonte: A autora.

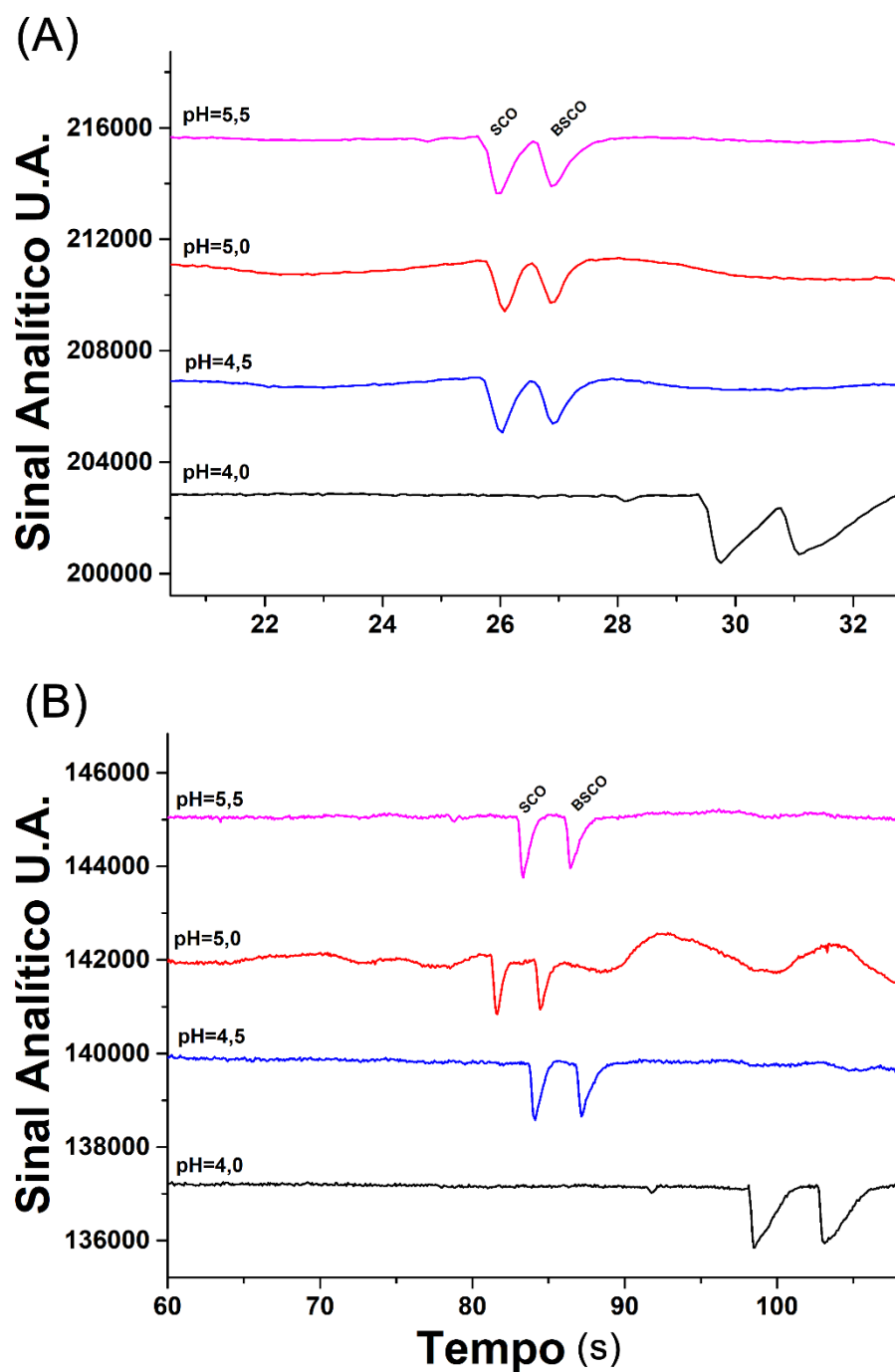
Como pode ser observado na Figura 41, a determinação de ambos os compostos foi possível quando os BGE's compostos por ácido butírico (pH=4,5) e MES (pH=6,0) foram utilizados. Em pH 8,0, não foi possível obter a separação completa entre as duas espécies, provavelmente pelos problemas associados à baixa solubilidade da SCO em solução aquosa e/ou porque nesse pH os compostos em estudo (SCO e BSCO) apresentarem mobilidades semelhantes.

Considerando que a SCO possui um tempo de migração inferior ao da BSCO, pode-se concluir que o efeito do grupo butil (massa molar maior) na mobilidade eletroforética foi o fator mais importante para possibilitar a separação das duas moléculas. Levando-se em consideração o desempenho, o formato dos picos, a sensibilidade e a resolução ( $> 1,5$ ), o BGE composto por  $20 \text{ mmol L}^{-1}$  de ácido butírico +  $7 \text{ mmol L}^{-1}$  de NaOH foi selecionado para os experimentos subsequentes.

Em seguida, a faixa de pH próxima ao valor de pKa do ácido butírico (ou seja, 4,9) foi avaliada em ambos os detectores, que possuem comprimentos efetivos de (A) 10 cm e (B) 40 cm. Os resultados obtidos na faixa de pH entre 4,0 e 5,5 são mostrados na Figura 42.



**Figura 42** – Eletroferogramas obtidos no estudo do pH utilizando solução padrão de 100  $\mu\text{mol L}^{-1}$  de SCO e BSCO. BGE: 20  $\text{mmol L}^{-1}$  de ácido butírico + NaOH para uma faixa de pH de 4,0 a 5,5. Tempo de injeção: 1,0 s; comprimento total do capilar: 50 cm; comprimento efetivo do capilar; (A) 10 cm e (B) 40 cm; Potencial de separação: 25kV.

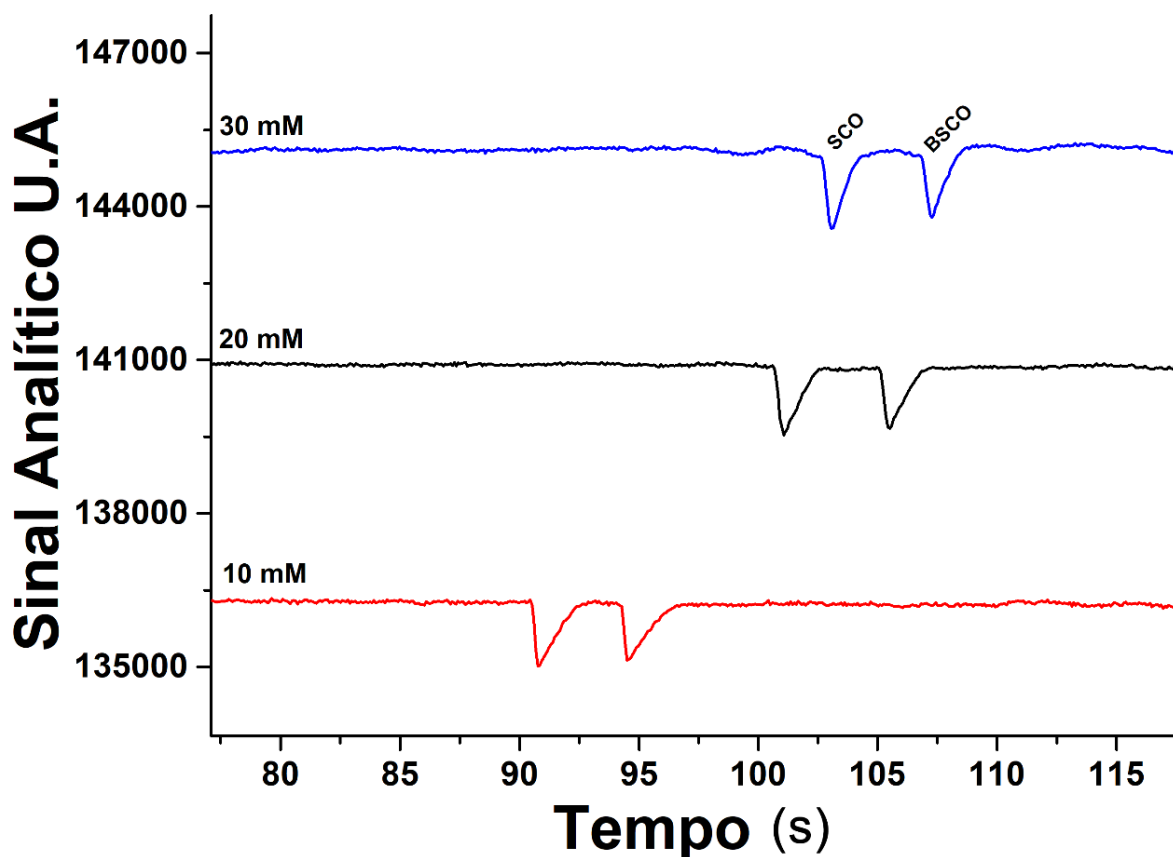


Fonte: A autora.

Conforme apresentado na Figura 42, um melhor compromisso entre os parâmetros de separação, como resolução, simetria de pico (picos mais estreitos) e maior estabilidade da linha base foram observados em ambos os detectores com o BGE de pH 4,5. Desta forma, esse valor de pH foi selecionado para os estudos subsequentes.

Por fim, o último parâmetro referente à composição do BGE foi avaliado. A concentração do ácido butírico foi avaliada em 10, 20 e 30 mmol L<sup>-1</sup> com pH ajustado para 4,5 com NaOH. Os eletroferogramas obtidos neste estudo estão apresentados na Figura 43.

**Figura 43** – Eletroferogramas obtidos no estudo da concentração de ácido butírico na composição do BGE com solução padrão de 100 μmol L<sup>-1</sup> de SCO e BSCO. Concentrações de ácido butírico: 10, 20 e 30 mmol L<sup>-1</sup> + NaOH (pH=4,5); Tempo de injeção: 1,0 s; Comprimento total e efetivo do capilar: 50 e 40 cm; Potencial de separação: +25kV.

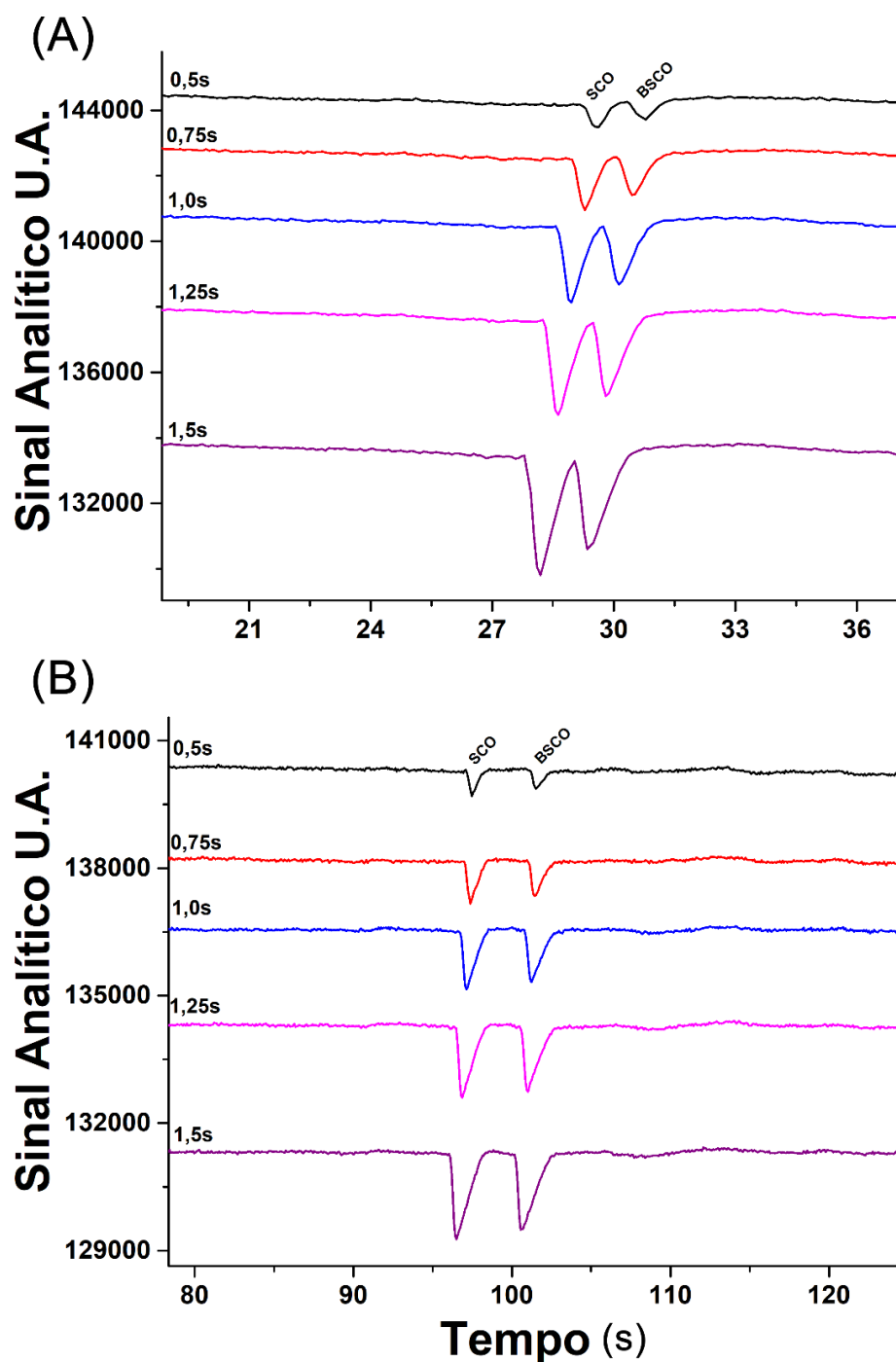


Fonte: A autora.

De acordo com os resultados obtidos, valores de resolução maiores que 1,5 foram encontrados em todas as concentrações estudadas. Apesar do BGE composto por 10 mmol L<sup>-1</sup> de ácido butírico ter apresentado um menor tempo de análise, o BGE com 20 mmol L<sup>-1</sup> de ácido butírico foi selecionado, pois apresentou melhor resolução (2,7 para 20 mmol L<sup>-1</sup> e 1,4 para 10 mmol L<sup>-1</sup>) entre os picos e uma ligeira melhora na estabilidade de linha base. Além disso, sua maior capacidade tamponante, quando comparado com o BGE de 10 mmol L<sup>-1</sup>, deve ser levado em consideração, uma vez que o objetivo é a análise de diferentes tipos de amostras com matrizes relativamente complexas.

Além do estudo da composição do BGE, os outros parâmetros instrumentais também foram avaliados em ambos os detectores. Como é o caso do estudo do tempo de injeção. Neste estudo, a injeção foi feita de forma hidrodinâmica com tempos que variaram entre 0,5 e 1,5 s a uma pressão constante de 25 kPa. Os eletroferogramas obtidos estão apresentados na Figura 44.

**Figura 44** – Eletroferogramas obtidos no estudo de tempo de injeção com solução padrão de  $100 \mu\text{mol L}^{-1}$  de SCO e BSCO. BGE:  $20 \text{ mmol L}^{-1}$  de ácido butírico +  $7 \text{ mmol L}^{-1}$  de NaOH (pH= 4,5). Tempo de injeção: 1,0 s; comprimento total do capilar: 50 cm e comprimento efetivo do capilar: (A) 10 e (B) 40 cm; Potencial de separação: +25kV.

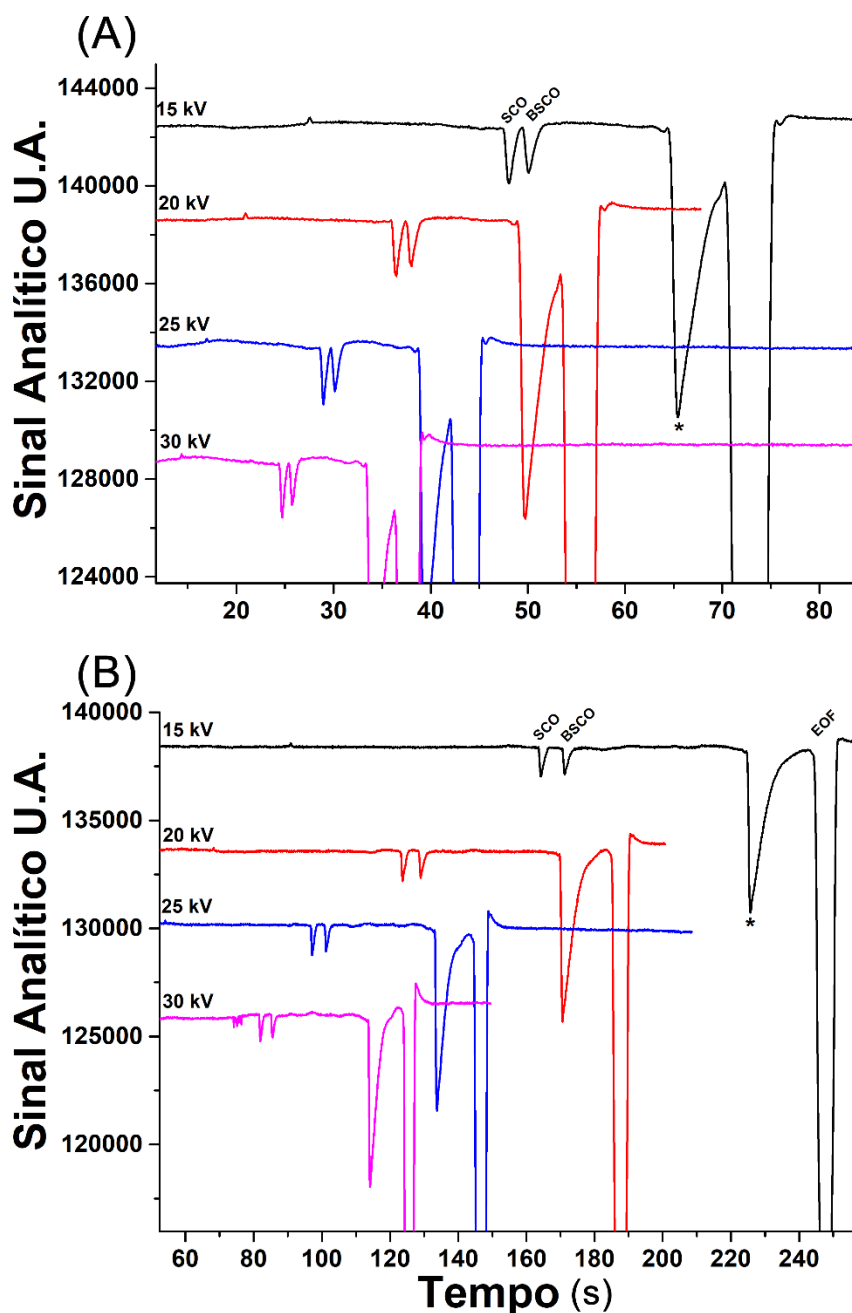


Fonte: A autora.

O aumento do tempo de injeção acarreta um aumento na área dos picos, pois um maior volume de solução é injetado. Consequentemente, a largura do pico também aumenta e a resolução diminui. Desta forma, o tempo de injeção intermediário de 1,0 s e o segundo detector foram selecionados para os próximos estudos.

O potencial de separação também foi avaliado nos dois detectores entre +15 a +30 kV utilizando uma solução padrão de  $100 \mu\text{mol L}^{-1}$  de SCO e BSCO. Os eletroferogramas referente a este estudo estão apresentados na Figura 45.

**Figura 45** – Eletroferogramas obtidos no estudo do potencial de separação com solução padrão de  $100 \mu\text{mol L}^{-1}$  de SCO e BSCO. BGE:  $20 \text{ mmol L}^{-1}$  de ácido butírico +  $7 \text{ mmol L}^{-1}$  de NaOH (pH= 4,5). Tempo de injeção: 1,0 s; comprimento total do capilar: 50 cm e comprimento efetivo do capilar: (A) 10 e (B) 40 cm; potencial de separação variando de 15 a 30kV.



Fonte: A autora.

Conforme pode ser observado na Figura 45, quanto maior o potencial aplicado, menor é o tempo de análise, consequentemente, um maior número de injeções por hora podem ser

realizadas. Desta forma, o potencial de +25 kV foi selecionado para as análises posteriores, uma vez que, já foi observado em outros trabalhos, que o potencial de 30 kV (potencial máximo da fonte utilizada) gera uma instabilidade na linha base ao longo das injeções. Avaliou-se também a estabilidade do método frente a uma variação de temperatura entre 20 a 30°C e nenhuma alteração significativa na separação e intensidade dos picos foi observada (DPR < 3%).

Portanto, as melhores condições foram obtidas com BGE composto por 20 mmol L<sup>-1</sup> de ácido butírico com 7 mmol L<sup>-1</sup> de NaOH (pH 4,5), potencial de separação de +25 kV e tempo de injeção de 1,0 s (25 kPa). O segundo detector (40 cm de comprimento efetivo de capilar) apresentou melhor resolução entre os picos da SCO e BSCO, com tempo total de análise inferior a 110 segundos (30 injeções h<sup>-1</sup>). É importante salientar que, se a determinação individual de SCO ou BSCO for necessária, o primeiro detector (10 cm de comprimento efetivo de capilar) pode ser utilizado e, neste caso, a determinação pode ser realizada em até 30 s (120 injeções h<sup>-1</sup>). Um resumo dos parâmetros otimizados é mostrado na Tabela 10.

**Tabela 10** – Condições otimizadas para o método CE-C<sup>4</sup>D desenvolvido.

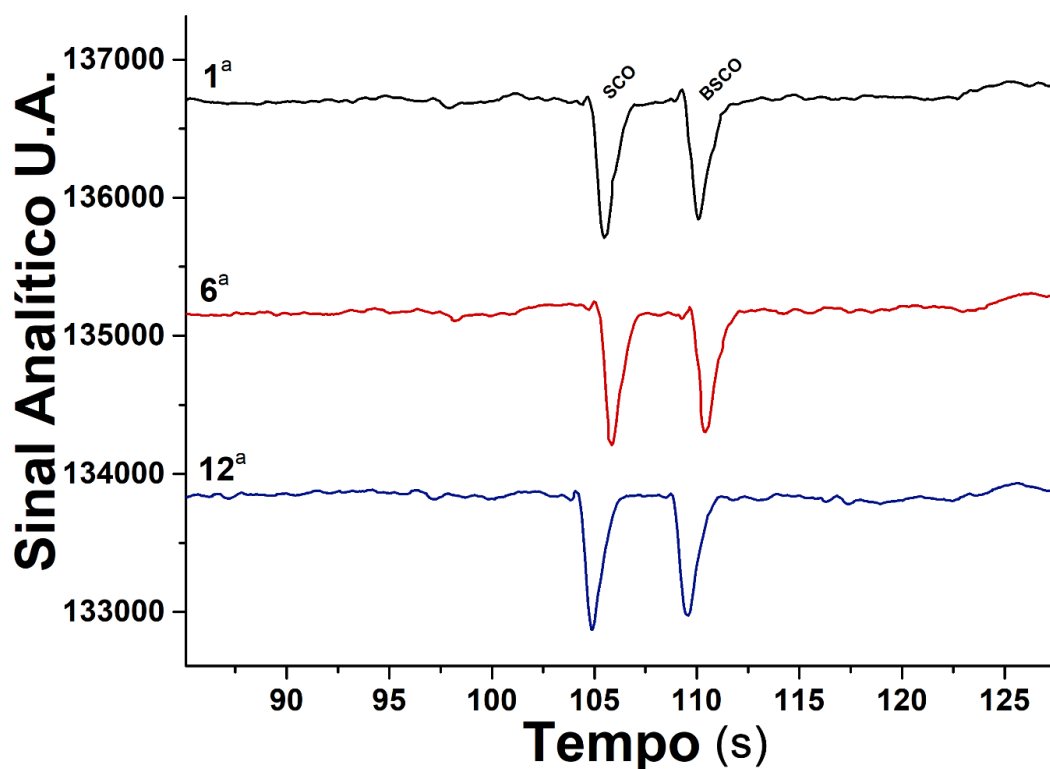
<b>Parâmetros</b>	<b>Faixa avaliada</b>	<b>Valores otimizados</b>
<b>Concentração do BGE (mmol L<sup>-1</sup>)</b>	10 – 30	20
<b>Potencial de separação (kV)</b>	15 – 25	25
<b>Tempo de injeção (s) a 25 kPa</b>	0,5 – 1,5	1,0
<b>pH do BGE</b>	4,0 – 5,5	4,5
<b>Temperatura (°C)</b>	20-30	25

**Fonte:** A autora.

Para a validação do método, o estudo da repetibilidade foi realizado com uma das amostras de bebidas alcoólicas que seriam avaliadas neste trabalho. Foram realizadas injeções sucessivas de uma solução amostra de vodka diluída em água (10% v/v) e

enriquecida com  $200 \mu\text{mol L}^{-1}$  de SCO e BSCO. Os DPRs ( $n = 12$ ) para as áreas dos picos foram de 4,0 e 5,0% para SCO e BSCO, respectivamente. Os valores de DPRs para os tempos de migração foram de 4,0% para ambas as espécies. É importante ressaltar que este estudo foi realizado sem nenhum procedimento de limpeza do capilar entre as análises. Após as doze injeções sucessivas, observou-se uma alteração significativa na área do pico, e, portanto, um “flush” de aproximadamente 200 s é necessário. O 1º, 6º e 12º eletroferogramas deste estudo são mostrados na Figura 46.

**Figura 46** – Eletroferogramas obtidos no estudo da repetibilidade com uma amostra de vodka (10% v/v) fortificada com solução padrão de  $100 \mu\text{mol L}^{-1}$  de SCO e BSCO. BGE:  $20 \text{ mmol L}^{-1}$  de ácido butírico +  $7 \text{ mmol L}^{-1}$  de NaOH (pH= 4,5). Tempo de injeção: 1s; Comprimento total e efetivo do capilar: 50 e 40cm; potencial aplicado variando de: +25kV.



Fonte: A autora.

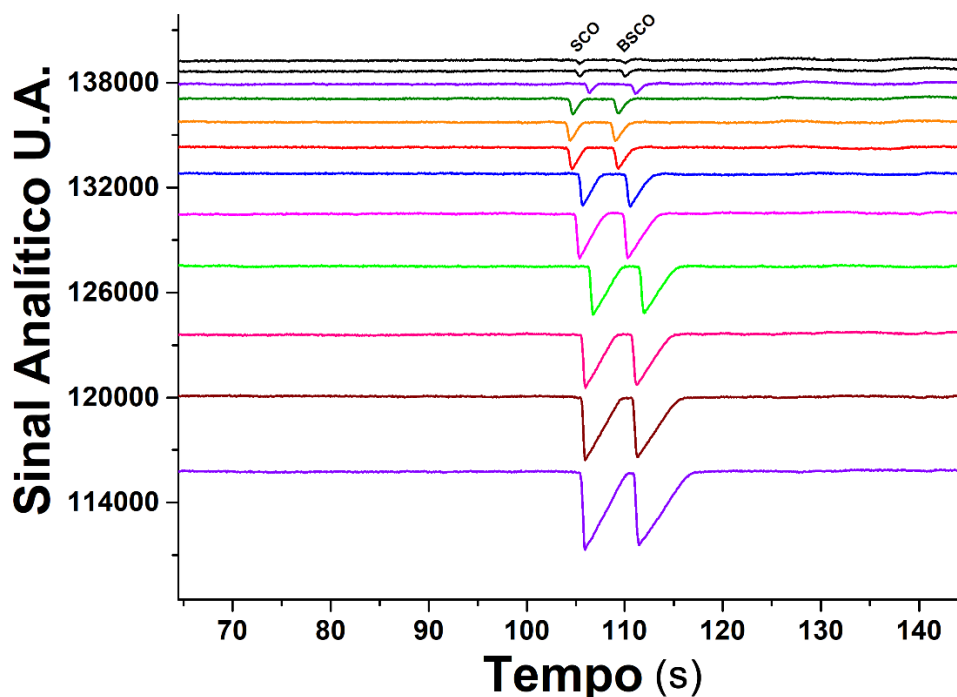
O estudo de repetibilidade também foi realizado com uma solução padrão e resultados semelhantes foram obtidos (DPR de 3,8% para SCO e de 4,7% para a BSCO). A

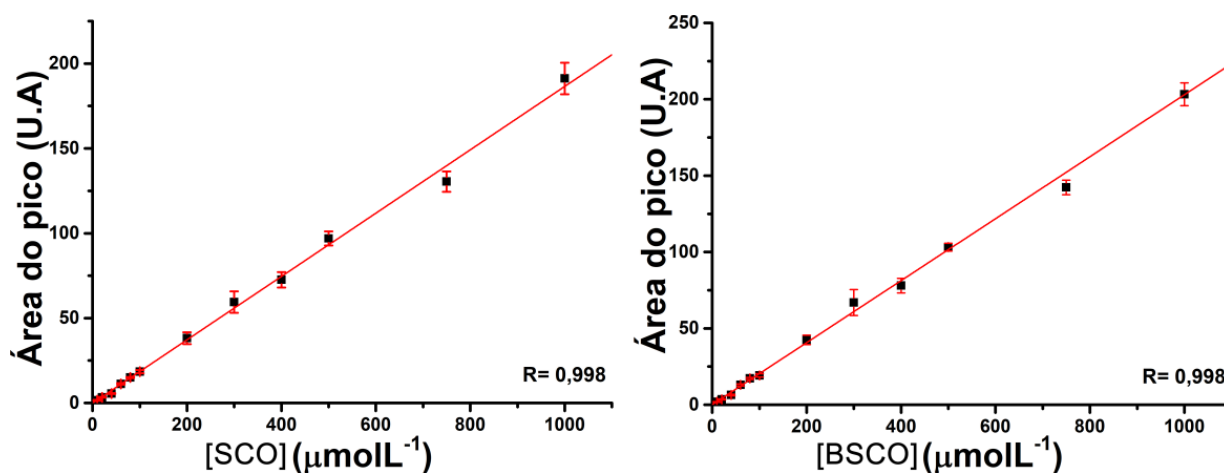


repetibilidade inter-dias ( $n = 3$ ) também foi estudada para os tempos de migração e as áreas dos picos de SCO e BSCO utilizando uma solução padrão. Neste estudo foram obtidos DPRs de 8,8 e 10,0% para áreas de pico e de 8,0 e 11,0% para os tempos de migração da SCO e BSCO, respectivamente. Estes resultados demonstram o excelente desempenho do método proposto. Apesar dos desvios inter-dias serem relativamente baixos, a construção diária da curva de calibração para a quantificação em amostras é necessária para obtenção de resultados mais precisos e confiáveis.

A faixa linear do método proposto foi avaliada por meio de injeções sucessivas de soluções padrão contendo concentrações crescentes de SCO e BSCO ( $n = 3$ ). A faixa de concentração variou entre 10 e 1000  $\mu\text{mol L}^{-1}$  para ambos os compostos. Os eletroferogramas e as curvas de calibração obtidas para este estudo são mostradas na Figura 47.

**Figura 47** – Eletroferogramas obtidos no estudo da faixa linear com soluções padrão variando na faixa de concentração de 10 a 1000  $\mu\text{mol L}^{-1}$  de SCO e BSCO e suas respectivas curvas de calibração ( $n=3$ ). Demais condições vide Figura 46.

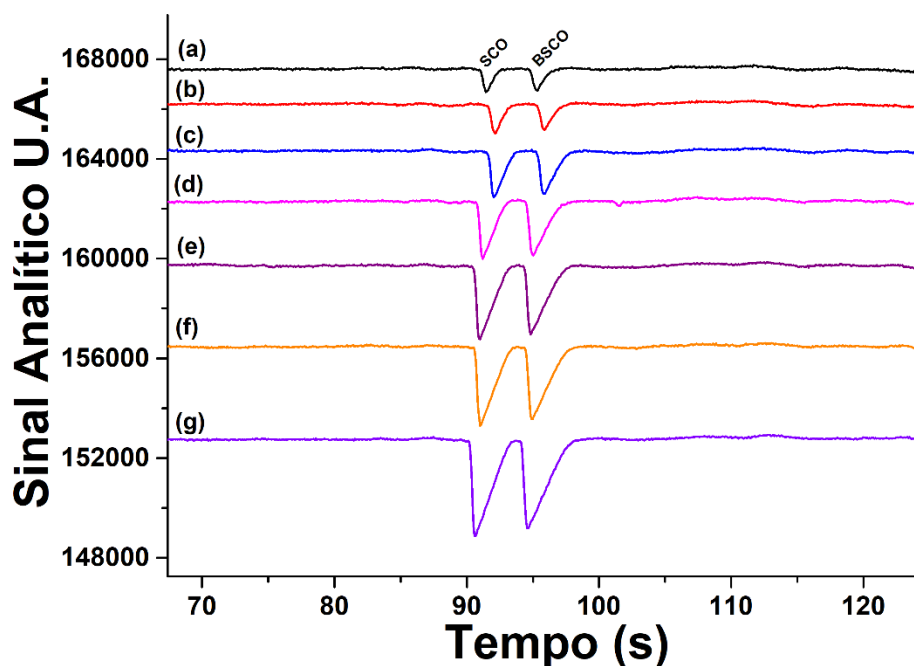


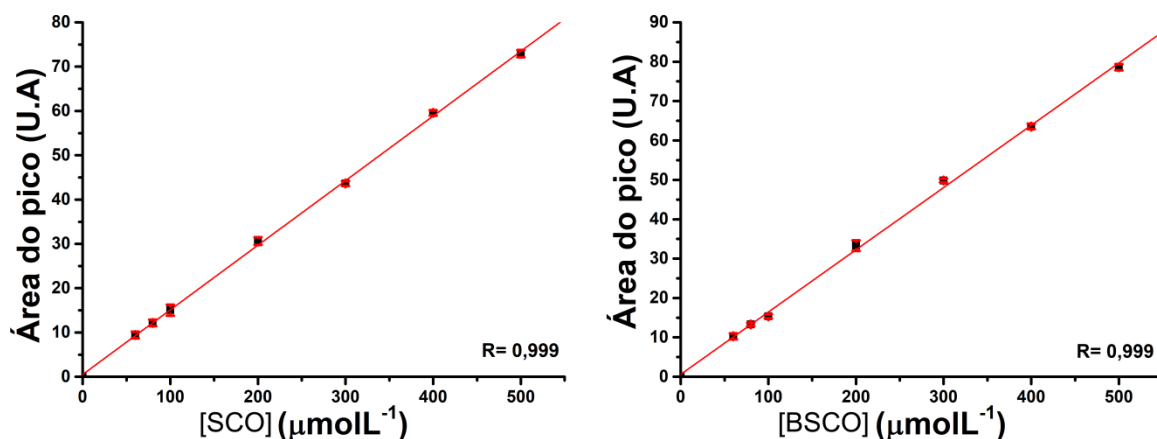


Fonte: A autora.

Conforme pode ser observado, o método apresentou amplas faixas lineares e coeficientes de correlação de 0,998 para ambos os compostos (SCO e BSCO). Uma faixa de concentração menor ( $50$  a  $500 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) foi selecionada para a construção da curva de calibração (Figura 48) a ser utilizada na análise de amostras.

**Figura 48** – Eletroferogramas e as respectivas curvas de calibração obtidos pela injeção de soluções padrões com: (a)  $60 \mu\text{mol L}^{-1}$ ; (b)  $80 \mu\text{mol L}^{-1}$ ; (c)  $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ ; (d)  $200 \mu\text{mol L}^{-1}$ ; (e)  $300 \mu\text{mol L}^{-1}$ ; (f)  $400 \mu\text{mol L}^{-1}$ ; (g)  $500 \mu\text{mol L}^{-1}$  de SCO e BSCO. Demais condições vide Figura 46.





Fonte: A autora.

Os limites de detecção (LD) foram calculados com base na curva de calibração da Figura 48. O método apresentou valores de LD de 2,4 e 2,8  $\mu\text{mol L}^{-1}$  para SCO e BSCO, respectivamente. Todos os parâmetros analíticos do método proposto estão resumidos na Tabela 11.

**Tabela 11** - Características analíticas do método CE-C<sup>4</sup>D para determinação simultânea de SCO e BSCO.

Parâmetros analíticos	SCO	BSCO
Tempo de migração (s)	97,0 ± 8,4	100,0 ± 11,0
Resolução**	2,37 ± 0,06	15,27 ± 0,25
Coefficiente de correlação	0,999	0,999
Faixa linear ( $\mu\text{mol L}^{-1}$ )	10 – 1000	10 - 1000
LOD ( $\mu\text{mol L}^{-1}$ )	2,4	2,8
LOQ ( $\mu\text{mol L}^{-1}$ )	8,0	9,3
RSD Intra-dias (n = 12)	4,0 %	5,0 %
Frequência analítica (h <sup>-1</sup> )	34	34

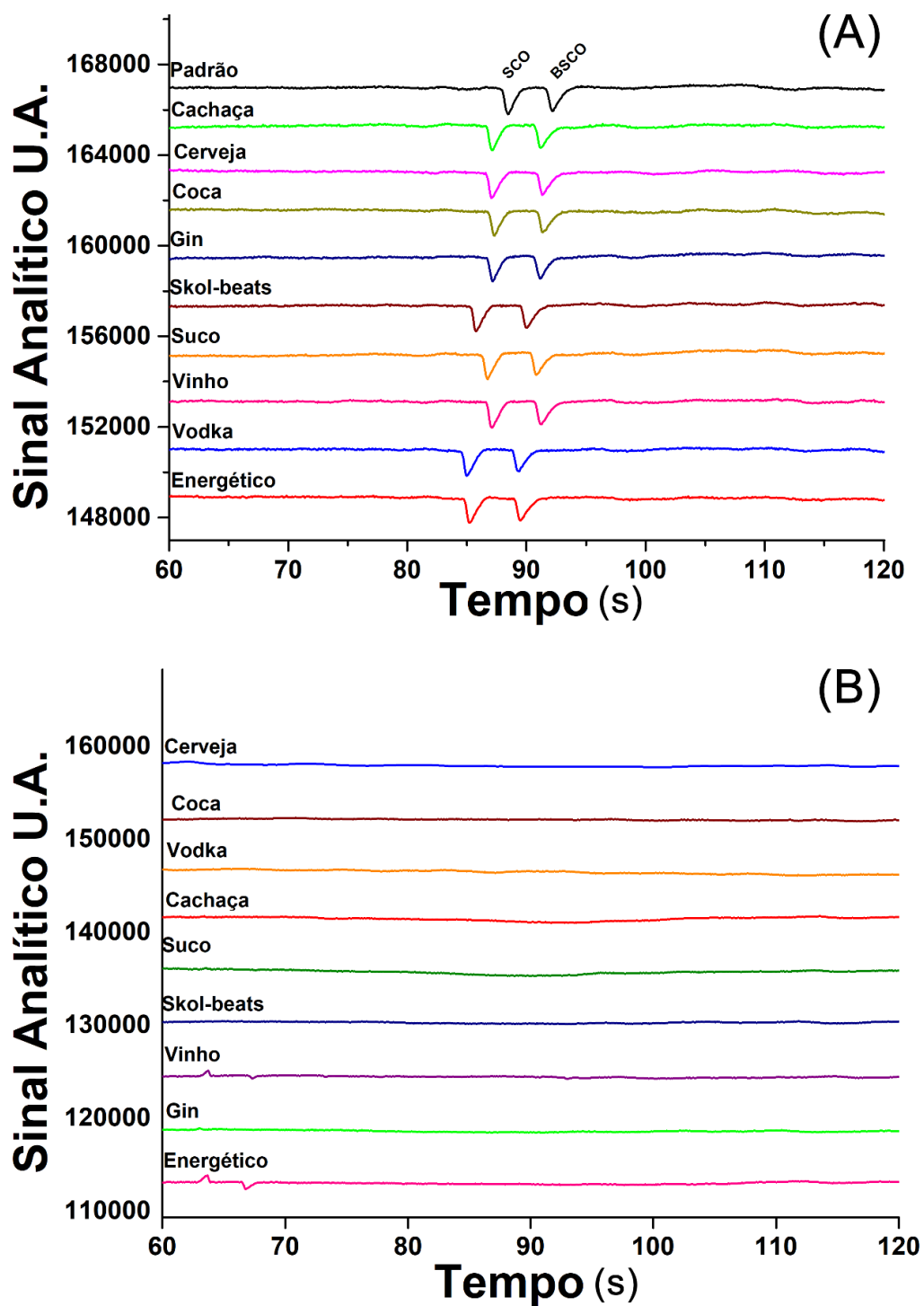
\*\*Resolução entre os picos de SCO e BSCO e entre o pico da BSCO e o EOF.

Fonte: A autora.

Numa etapa seguinte, o método desenvolvido foi avaliado como um método de triagem rápida para a detecção de SCO e BSCO em amostras de bebidas para fins forenses e para a

determinação e controle de qualidade de amostras farmacêuticas (buscopan®) contendo BSCO como ingrediente ativo. A detecção de eventual contaminação de formulações farmacêuticas com SCO também pode ser possível. A Figura 49 (A) apresenta os eletroferogramas obtidos para uma solução padrão contendo  $100 \mu\text{mol L}^{-1}$  de SCO e BSCO e nove amostras de diferentes bebidas que foram dopadas com  $1 \text{ mmol L}^{-1}$  de ambos os analitos e que em seguida diluídas 10 vezes em água deionizada. Os eletroferogramas para as amostras sem adição de SCO e BSCO são apresentados na Figura 49 (B), onde pode ser observado uma linha de base estável e sem picos de interferentes nos tempos de migração de ambos os analitos.

**Figura 49** – Eletroferogramas obtidos após a adição de (A) 1000  $\mu\text{mol L}^{-1}$  de SCO e BSCO em diferentes amostras de bebidas (10% v/v) e (B) dos brancos das amostras de bebidas (10% v/v). Demais condições vide Figura 46.



Fonte: A autora.

Para a definição da quantidade de SCO que seria adicionada às amostras de bebidas foi levado em consideração os dados disponíveis na literatura, a qual aborda a dosagem ativa e letal da mesma ( $\pm 1 \text{ mmol L}^{-1}$ ) (LAUWERS *et al.*, 1983). O estudo de recuperação foi feito em amostras da bebida enriquecidas com quantidades conhecidas de SCO e BSCO em diferentes condições: (i) amostras das bebidas diluídas (10% v/v) sem o procedimento de flush entre as análises (Tabela 12); (ii) amostras das bebidas diluídas (10% v/v) com o procedimento de flush (100 s) entre as análises (Tabela 13) e (iii) amostras das bebidas puras (sem diluição) com o procedimento de flush (100 s) entre as análises (Tabela 14). Por se tratar de amostras muito diferentes e complexas, a opção de fazer o flush entre cada tipo de amostra foi realizada para descartar qualquer tipo de interferência.

**Tabela 12** - Resultados obtidos nos estudos de adição e recuperação com nove tipos de bebidas dopadas com SCO e BSCO por CE-C<sup>4</sup>D (sem flush entre as análises).

<b>Amostra</b>	<b>Conc. adicionada SCO e BSCO (mmol L<sup>-1</sup>)</b>	<b>Conc. <math>\pm</math> SD SCO (mmol L<sup>-1</sup>)</b>	<b>Conc. <math>\pm</math> SD BSCO (mmol L<sup>-1</sup>)</b>	<b>Rec. SCO (%)</b>	<b>Rec. BSCO (%)</b>
GIN	1,00	1,01 $\pm$ 0,02	0,90 $\pm$ 0,01	101 $\pm$ 2	90 $\pm$ 1
Vinho	1,00	1,04 $\pm$ 0,01	0,97 $\pm$ 0,01	104 $\pm$ 1	97 $\pm$ 1
Suco	1,00	1,00 $\pm$ 0,01	0,90 $\pm$ 0,01	100 $\pm$ 1	90 $\pm$ 1
Coca-cola®	1,00	1,00 $\pm$ 0,01	0,97 $\pm$ 0,01	100 $\pm$ 1	97 $\pm$ 1
Cachaça	1,00	1,09 $\pm$ 0,02	0,94 $\pm$ 0,01	110 $\pm$	94 $\pm$ 1
Skol Beats®	1,00	1,09 $\pm$ 0,01	0,96 $\pm$ 0,01	109 $\pm$ 2	96 $\pm$ 1
Vodka	1,00	1,09 $\pm$ 0,01	0,90 $\pm$ 0,01	109 $\pm$ 1	90 $\pm$ 1
Cerveja	1,00	1,11 $\pm$ 0,01	0,92 $\pm$ 0,01	111 $\pm$ 1	92 $\pm$ 1
Energético	1,00	1,07 $\pm$ 0,01	0,90 $\pm$ 0,01	107 $\pm$ 1	90 $\pm$ 1

**Fonte:** A autora.

**Tabela 13** - Resultados obtidos nos estudos de adição e recuperação com nove tipos de bebidas dopadas com SCO e BSCO por CE-C<sup>4</sup>D (com flush entre as análises).

<b>Sample</b>	<b>Conc. adicionada SCO/BSCO (mmol L<sup>-1</sup>)</b>	<b>Conc. ± SD SCO (mmol L<sup>-1</sup>)</b>	<b>Conc. ± SD BSCO (mmol L<sup>-1</sup>)</b>	<b>Recuperação SCO (%)</b>	<b>Recuperação BSCO (%)</b>
GIN	1,00	1,04 ± 0,03	0,91 ± 0,01	104±3	91±1
Vinho	1,00	1,00 ± 0,04	1,03± 0,02	100±4	103±2
Suco	1,00	1,00 ± 0,01	0,90 ± 0,01	100±1	90±1
Coca-cola®	1,00	1,12 ± 0,02	1,05 ± 0,03	112±2	105±3
Cachaça	1,00	1,03 ± 0,02	0,98 ± 0,02	103±3	98±2
Skol Beats®	1,00	1,07 ± 0,02	1,01 ± 0,02	107±2	101±2
Vodka	1,00	1,08 ± 0,01	1,03 ± 0,03	108±1	103±3
Cerveja	1,00	1,11 ± 0,02	1,05 ± 0,01	111±2	105±1
Energético	1,00	0,95 ± 0,01	0,98 ± 0,01	95±1	98±1

**Fonte:** A autora.

**Tabela 14** - Resultados obtidos nos estudos de adição e recuperação com nove tipos de bebidas puras (sem diluição) dopadas com SCO e BSCO por CE-C<sup>4</sup>D (com flush entre as análises).

Sample	Conc.	Conc. $\pm$ SD	Conc. $\pm$ SD	Recuperação	Recuperação
	adicionada SCO/BSCO (mmol L <sup>-1</sup> )	SCO (mmol L <sup>-1</sup> )	BSCO (mmol L <sup>-1</sup> )	SCO (%)	BSCO (%)
GIN	0,100	0,096 $\pm$ 0,001	0,086 $\pm$ 0,002	96 $\pm$ 1	86 $\pm$ 2
Vinho*	0,100	-	-	-	-
Suco	0,100	0,101 $\pm$ 0,001	0,098 $\pm$ 0,002	101 $\pm$ 1	98 $\pm$ 2
Coca-cola®	0,100	0,095 $\pm$ 0,001	0,089 $\pm$ 0,002	95 $\pm$ 1	89 $\pm$ 2
Cachaça	0,100	0,111 $\pm$ 0,001	0,100 $\pm$ 0,001	111 $\pm$ 1	100 $\pm$ 1
Skol Beats®	0,100	0,093 $\pm$ 0,001	0,082 $\pm$ 0,001	93 $\pm$ 1	82 $\pm$ 1
Vodka	0,100	0,091 $\pm$ 0,002	0,089 $\pm$ 0,001	91 $\pm$ 2	89 $\pm$ 1
Cerveja*	0,100	-	-	-	-
Energético*	0,100	-	-	-	-

**Fonte:** A autora.

Para facilitar a visualização dos valores de recuperação obtidos nas três diferentes condições em que o experimento foi realizado, a Tabela 15 apresenta um resumo dessas informações.



**Tabela 15** – Resumo dos resultados obtidos nos experimentos de recuperação com as amostras de bebidas dopadas com SCO e BSCO por CE-C<sup>4</sup>D.

Amostras	Recuperação (%)					
	Sem flush		Com flush*		Sem diluição**	
	SCO	BSCO	SCO	BSCO	SCO	BSCO
GIN	101	90	104	91	96	86
Vinho	104	97	100	103	-	-
Suco	100	90	100	90	101	98
Coca-cola®	100	97	112	105	95	89
Cachaça	110	94	103	98	111	100
Skol Beats®	109	96	107	101	93	82
Vodka	109	90	108	103	91	89
Cerveja	111	92	111	105	-	-
Energético	107	90	95	98	-	-
<b>Média</b>	<b>106 ± 5</b>	<b>93 ± 3</b>	<b>104 ± 6</b>	<b>99 ± 6</b>	<b>99 ± 8</b>	<b>93 ± 7</b>

\*flush de 100s entre cada tipo de amostra; \*\*bebida injetada diretamente no equipamento com flush entre cada tipo de amostra.

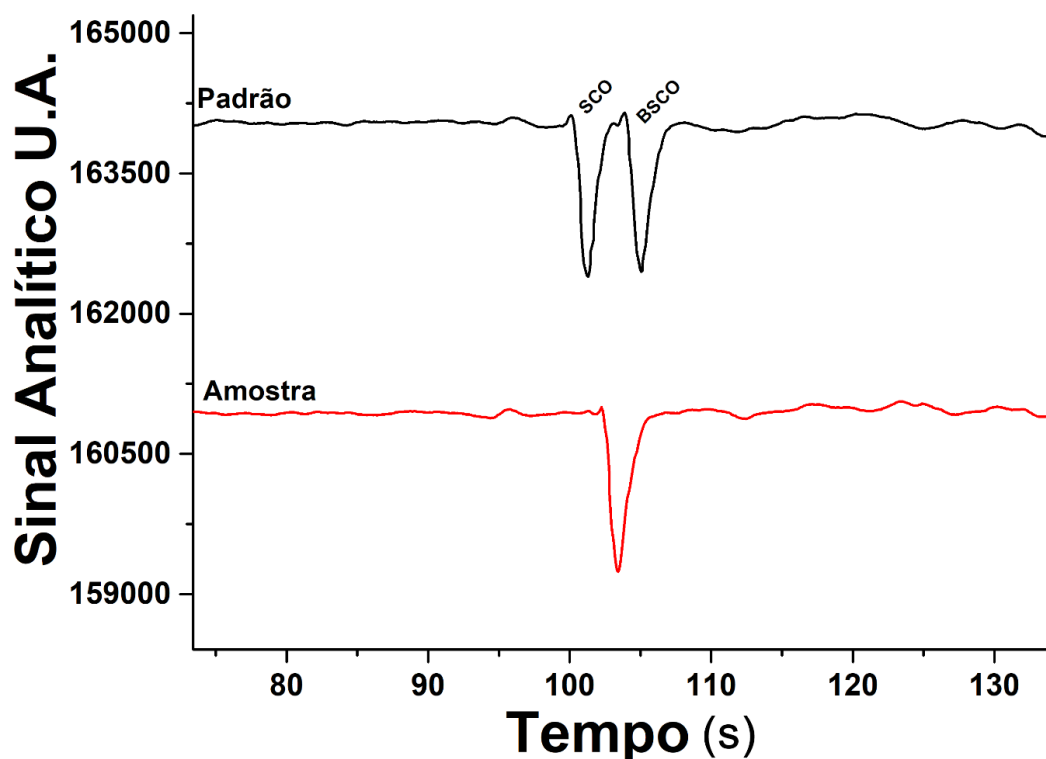
Como pode ser observado na Tabela 15, foram obtidos valores de recuperação semelhantes para SCO com e sem o procedimento de flush entre as injeções (média de  $106 \pm 5\%$  e  $104 \pm 6\%$ , respectivamente). No entanto, os valores de recuperação obtidos para BSCO foram melhores com o uso do flush ( $99 \pm 6\%$ ) do que sem o uso do flush ( $93 \pm 3\%$ ) entre as injeções das amostras. Adicionalmente, o desempenho do método desenvolvido também foi avaliado por estudos de recuperação realizados com amostras das bebidas puras, ou seja, sem diluição, dopadas com  $0,1 \text{ mmol L}^{-1}$  de SCO e BSCO (com flush entre as injeções). Nesses estudos, valores médios de recuperação de  $99 \pm 8\%$  e  $93 \pm 7\%$  foram

obtidos, respectivamente, para SCO e BSCO em seis amostras de bebidas não diluídas (GIN, suco, Coca-cola®, cachaça, skolBeats® e vodka). Os valores de recuperação não foram satisfatórios (< 50%) para as amostras não diluídas de vinho, cerveja e energético.

Os resultados obtidos indicam a ausência do efeito de matriz em todas as amostras avaliadas após a diluição (10% v/v) e utilização do procedimento de flush entre as injeções. Se o procedimento de flush não for utilizado, apenas a recuperação do BSCO cai para cerca de 90%, que ainda é um valor aceitável neste tipo de análise. A possibilidade da análise de amostras não diluídas pode ser muito prática na triagem rápida dessas bebidas no dia a dia das investigações policiais. É válido ressaltar que a determinação foi realizada com simples etapa de pré-tratamento da amostra (apenas diluição em água).

A curva de calibração da Figura 48 também foi utilizada na análise de três diferentes soluções de amostras farmacêuticas que continham a BSCO como princípio ativo. A amostra A3 também apresentava dipirona em sua composição. O eletroferograma referente à análise de uma amostra está apresentado na Figura 50 e todos os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 16.

**Figura 50** – Eletroferogramas obtidos com uma solução padrão de 200  $\mu\text{mol L}^{-1}$  de SCO e BSCO e uma solução de amostra farmacêutica diluída para uma concentração de 200  $\mu\text{mol L}^{-1}$  de BSCO. Demais condições vide Figura 46.



Fonte: A autora.

**Tabela 16** - Resultados obtidos na análise de três amostras de buscopan® por CE-C<sup>4</sup>D.

Amostras	Valor da bula (mg/comprimido)	CE-C <sup>4</sup> D (mg/comprimido)
A1	10	10,20 ± 0,80
A2	10	9,97 ± 0,20
A3 (com dipirona)	10	9,32 ± 0,80

Fonte: A autora.

Conforme observado na Tabela 16, os valores obtidos foram próximos aos valores apresentados na bula dos medicamentos. Comparando com a amostra A1 e A2, a amostra A3 apresentou uma maior diferença, com relação a massa apresentada na bula. É provável

que essa variação nos valores das áreas seja devido a elevada concentração de dipirona presente no medicamento (25 vezes mais dipirona do que BSCO). Estudos de recuperação com adição de  $200 \mu\text{mol L}^{-1}$  de BSCO às amostras farmacêuticas também foram realizados. O valor médio de recuperação para as três amostras foi de  $105\% \pm 3$ , o que indica a ausência de efeitos matriz.

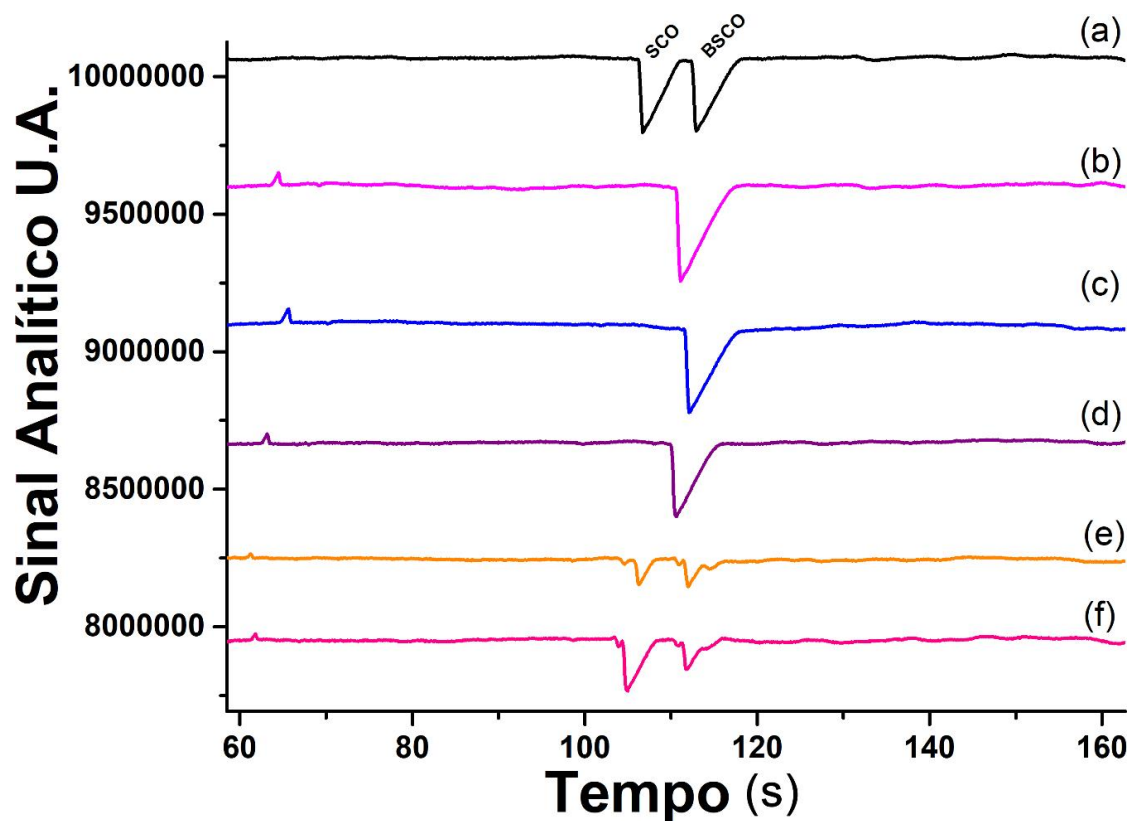
Portanto, o método desenvolvido nesse trabalho tem grande potencial para ser uma ferramenta a ser utilizada em triagens rápidas de amostras de bebidas para detecção de adição ilegal de SCO. Além disso, o método também é útil para o controle de qualidade de amostras farmacêuticas que contém BSCO. Podemos concluir também que o uso de um BGE com a presença de sódio (alta mobilidade) impediu a detecção de cátions alcalinos normalmente presentes em bebidas e amostras farmacêuticas, diferentemente do observado em um artigo publicado na literatura, onde o mesmo detector foi utilizado na detecção de SCO em bebidas (SÁIZ *et al.*, 2013a). No trabalho citado, o BGE composto por  $10 \text{ mmol L}^{-1}$  de HEPES e TRIS com pH 7,6 foi utilizado, na mesma corrida foram observados mais seis picos de cátions que eluíram mais rápido que a SCO, porém esses picos não foram identificados no artigo.

De acordo com o que já foi relatado anteriormente na literatura (KUMMER *et al.*, 2016), a SCO pode ser produzida a partir de fármacos sem prescrição (buscopan®) por um processo de conversão térmica do BSCO em altas temperaturas (aquecimento). Conforme descrito na introdução deste trabalho, a SCO foi produzida em casa a partir da BSCO por aquecimento em óleo comestível no micro-ondas (VAN SASSENBROECK *et al.*, 2005) e também pela queima ou uso de cigarros após a adição do pó de medicamento buscopan® ao cigarro (FRASCHT *et al.*, 2007).

A fim de confirmar se a conversão da BSCO presente em fármacos em SCO psicoativa é possível e se o método desenvolvido é adequado para detectar o composto formado (SCO),

um teste rápido com este objetivo foi realizado. Neste estudo, comprimidos de buscopan® foram macerados e analisados por CE-C<sup>4</sup>D após exposição à diferentes condições: (i) 24 h em temperatura ambiente; (ii) 8 h de aquecimento na estufa a 80°C e, (iii) aquecido por 10 segundos na chama do bico de Bunsen. Após o período de exposição às diferentes condições, todas as amostras foram adequadamente dissolvidas, diluídas e analisadas pelo método CE proposto. A Figura 51 apresenta os eletroferogramas obtidos neste estudo.

**Figura 51** – Eletroferogramas obtidos a partir da injeção de: (a) solução padrão contendo SCO e BSCO (1000  $\mu\text{mol L}^{-1}$  cada); amostra farmacêutica (buscopan®) (b) preparada na hora; (c) exposta 24 h em temperatura ambiente; (d) após o aquecimento na estufa em 80°C; (e) após o aquecimento por 10 s na chama de um bico de Bunsen e (f) solução “e” enriquecida com 400  $\mu\text{mol L}^{-1}$  de SCO. Demais condições vide Figura 46.



Fonte: A autora.

De acordo com os resultados apresentados na Figura 51, a BSCO presente na amostra macerada apresentou boa estabilidade química quando foi exposta 24 horas em temperatura ambiente (Figura 51c) e quando foi exposta por 8 horas a 80 °C dentro da estufa (Figura 51d). Os resultados mostraram que a área do pico da BSCO para essas soluções (51c e 51d) foram semelhantes a área obtida para a solução de amostra recém-preparada (Figura 51b). Além disso, nenhum pico adicional foi detectado para SCO (< LD).

No entanto, quando a amostra macerada foi aquecida por 10 segundos em um bico de Bunsen (dentro de um béquer de vidro) (Figura 51e), observou-se a diminuição na área do pico da BSCO e o aparecimento de um pico no tempo de migração da SCO. A fim de confirmar que este pico seria referente a formação da SCO, 400  $\mu\text{mol L}^{-1}$  da solução padrão de SCO foi adicionada à amostra aquecida no bico de Bunsen e um aumento na intensidade do pico foi observado (Figura 51f).

Os resultados obtidos nesse estudo introdutório sugerem que o antiespasmódico mais popular no mundo (buscopan®) pode ser facilmente convertido em SCO (composto psicoativo). Esta questão precisa ser estudada com mais detalhes no futuro, para avaliação da taxa de conversão, faixa de temperatura, entre outros aspectos. No entanto, nós podemos inferir que o método proposto neste trabalho é uma ferramenta simples, rápida e de baixo custo para a realização desses estudos.

A fim de apresentar as vantagens do método desenvolvido, uma comparação com os métodos já existentes na literatura para determinação de SCO e/ou BSCO estão listados na Tabela 17.

**Tabela 17** – Métodos para a determinação de SCO e/ou BSCO descritos na literatura e o desenvolvido por CE-C<sup>4</sup>D.

<b>Técnica</b>	<b>Analito</b>	<b>LOD (<math>\mu\text{mol L}^{-1}</math>)</b>	<b>Tempo por corrida (min)</b>	<b>Observação</b>	<b>Ref</b>
<b>CZE-DAD<sup>a</sup></b>	Ipratropium	1,8	12	Utilização de solvente orgânico	(CHERKA OUI <i>et al.</i> , 1998b)
	Oxitropium	IS			
	BSCO	1,8			
	Flutropium	1,8			
<b>CE-C<sup>4</sup>D</b>	SCO	5,9	3,4	Utilização de solvente orgânico	(SÁIZ <i>et al.</i> , 2013b)
	atropina	N/A			
<b>Potenciometria</b>	SCO	4,0	0,25	Horas na preparação da membrana de PVC e condicionamento do eletrodo por 1 hora antes da análise	(EL- HAFEEZ MOSTAFA , 2002)
<b>CE – DAD<sup>a</sup></b>	Metilscopolamina	N/A	18	Use of organic solvents; only qualitative.	(CHERKA OUI <i>et al.</i> , 1999)
	BSCO				
	SCO				
	Apoatropina				
	Atropina				
	Littorine				
<b>HPLC – UV</b>	BSCO atropina	N/A	N/A	Etapa de limpeza previa por SPE	(PAPADO YANNIS <i>et al.</i> , 1994a)
<b>CE-C<sup>4</sup>D</b>	BSCO	2,8	1,8	Preparação simples da amostra; baixo custo instrumental	Este trabalho
	SCO	2,4			

**Fonte:** A autora.

Conforme observado na Tabela 17, os métodos já descritos na literatura apresentam maiores tempos de análise do que o método CE-C<sup>4</sup>D desenvolvido neste trabalho, com exceção para o método potenciométricos, que é mais rápido (0,25 min) (RIBEIRO *et al.*, 2016). Apesar de ser mais rápido, o método potenciométrico necessita de etapa de preparo da membrana de PVC utilizada como eletrodo e também necessita de um tempo longo ( $\pm 1$  hora) de condicionamento do eletrodo. Além disso, a determinação simultânea da SCO e da BSCO não é possível usando o método potenciométrico.

Além de ser um método rápido, a determinação simultânea de ambas as espécies sem o uso de solventes orgânicos também pode ser considerado uma vantagem (método verde). A possibilidade de determinação simultânea da SCO e da BSCO foi mostrada apenas uma vez (CHERKAOUI, 1999), porém, o método é mais lento (18 min) e não foi avaliado na análise de amostras reais. Portanto, o método CE-C<sup>4</sup>D aqui proposto é mais simples, barato, rápido e pode ser aplicado na análise de uma grande variedade de amostras sem efeitos de matriz.

#### **4.3.1. Conclusões parciais**

Neste trabalho foi demonstrado, pela primeira vez, que a determinação simultânea da SCO e da BSCO é possível por CE-C<sup>4</sup>D em menos de 110 segundos. O método desenvolvido neste trabalho foi empregado para a determinação da SCO e BSCO em diferentes tipos de bebidas e amostras farmacêuticas com pré-tratamento mínimo da amostra (apenas dissolução e/ou diluição em água). O método proposto apresentou diversas vantagens como, baixo custo, simplicidade, fácil preparo da amostra, análise rápida e consumo de pequena quantidade de reagentes/amostras. Como a SCO é uma droga controlada, pois pode ser utilizada para fins criminosos, o método proposto tem grande potencial como ferramenta de



triagem rápida para auxiliar as investigações policiais e também para obtenção de informações preliminares sobre amostras suspeitas. O método também se mostrou útil para identificar a formação de SCO a partir do medicamento buscopan®.

## 5. CONCLUSÕES GERAIS

Nesta tese, três métodos analíticos foram apresentados utilizando duas diferentes técnicas de baixo custo (CE-C<sup>4</sup>D e a BIA-SWASV) onde os equipamentos utilizados foram construídos/idealizados no Brasil.

Na primeira parte do trabalho foram desenvolvidos métodos utilizando a CE-C<sup>4</sup>D e BIA-SWASV para a determinação e quantificação simultânea de Zn e AA pela primeira vez. Ambas metodologias propostas apresentaram altas velocidades de análise (>40 injeções h<sup>-1</sup>), preparo de amostras simples, apenas diluição em água ou diluição no eletrólito suporte, além de possuírem um baixo consumo de amostras e reagentes, o que reduz muito o impacto ambiental. Devido à presença de ácido cítrico na amostra do polivitamínico que contém o Zn e AA, foi necessário adicionar Ni na amostra quando a análise foi feita por CE-C<sup>4</sup>D, pois o ácido cítrico interagia com o Zn impedindo a sua complexação com a HIS para formação da espécie determinada no método. Para contornar problemas com a matriz do fármaco, a quantificação pelo método da adição de padrão foi utilizada na análise por BIA-SWASV.

Na segunda parte deste trabalho a CE-C<sup>4</sup>D foi aplicada para a determinação de SCO e BSCO em amostras de onze diferentes bebidas e também no fármaco que contém a BSCO (buscopan®). Este foi o primeiro trabalho desenvolvido para a determinação de SCO e BSCO com algum tipo de aplicação. A determinação simultânea dessas duas espécies não é fácil devido a diferença de polaridade que elas possuem. O método desenvolvido utiliza uma quantidade mínima de reagentes, é barato, simples e rápido (cerca de 110 segundos por análise) e as amostras são analisadas sem nenhum pré-tratamento (apenas diluição em água). Além disso, não foi observado nenhum tipo de interferência. O método tem potencial para ser utilizado como ferramenta de triagem no auxílio de investigações policiais, uma vez que a SCO é uma droga controlada, muitas vezes utilizada para fins criminosos. Outro ponto em

que o método se mostrou útil, foi na identificação da formação de SCO a partir de BSCO, o que pode auxiliar na investigação da origem da SCO utilizada no crime.

Os métodos desenvolvidos neste trabalho podem ser considerados mais verdes que o método analítico padrão (HPLC), pois necessitam de uma quantidade menor de reagentes, o que leva a uma menor geração de resíduos. Além disso, os reagentes utilizados não são tóxicos, a análise simultânea é possível, os métodos podem ser portáteis, todas as amostras são preparadas apenas com diluição simples e são mais rápidos, o que gera consequentemente, um menor gasto de energia.

## 6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMOWICZ, Piotr; KAŁA, Maria. Simultaneous screening for and determination of 128 date-rape drugs in urine by gas chromatography–electron ionization-mass spectrometry. **Forensic Science International**, v. 198, n. 1–3, p. 39–45, maio 2010 <DOI: 10.1016/j.forsciint.2010.02.012>.

AFKHAMI, Abbas; SHIRZADMEHR, Ali; MADRAKIAN, Tayyebeh. Improvement in performance of a hyoscine butylbromide potentiometric sensor using a new nanocomposite carbon paste: a comparison study with polymeric membrane sensor. **Ionics**, v. 20, n. 8, p. 1145–1154, ago. 2014 <DOI:10.1007/s11581-014-1078-3>.

ALEHASHEM, Shokoofeh *et al.* Cyclic Voltammetric Studies of Charge Transfer Reactions at Highly Boron-Doped Polycrystalline Diamond Thin-Film Electrodes. **Analytical Chemistry**, v. 67, n. 17, p. 2812–2821, 1 set. 1995. <<https://doi.org/10.1021/ac00113a014>>.

ALVES BRITO-NETO, José Geraldo *et al.* Understanding capacitively coupled contactless conductivity detection in capillary and microchip electrophoresis. Part 1. Fundamentals. **Electroanalysis**, v. 17, n. 13, p. 1198–1206, 2005a <DOI:10.1002/elan.200503237>.

ALVES BRITO-NETO, José Geraldo *et al.* Understanding capacitively coupled contactless conductivity detection in capillary and microchip electrophoresis. Part 2. Peak shape, stray capacitance, noise, and actual electronics. **Electroanalysis**, v. 17, n. 13, p. 1207–1214, 2005b <<https://doi.org/10.1002/elan.200503238>>.

AMIN, Alaa S. Spectrophotometric Determination of Zinc in Pharmaceutical Samples with Some Salicylic Azo Compounds. **Analytical Letters**, v. 27, n. 1, p. 95–102, jan. 1994. <<https://doi.org/10.1080/00032719408006348>>.

ANDERSON, Laura Jane; FLYNN, Asher; PILGRIM, Jennifer Lucinda. A global epidemiological perspective on the toxicology of drug-facilitated sexual assault: A systematic review. **Journal of Forensic and Legal Medicine**, v. 47, p. 46–54, abr. 2017 <DOI: 10.1016/j.jflm.2017.02.005>.

ARMBRUSTER, David A; TILLMAN, Margaret D; HUBBS, Linda M. Limit of detection (LQD)/limit of quantitation (LOQ): comparison of the empirical and the statistical methods exemplified with GC-MS assays of abused drugs. **Clinical Chemistry**, v. 40, n. 7, p. 1233–1238, 1 jul. 1994 <<https://doi.org/10.1093/clinchem/40.7.1233>>.

BADAWY, Sayed S.; ISSA, Yousry M.; MUTAIR, Ali A. PVC membrane ion-selective electrodes for the determination of Hyoscyamine in pure solution and in pharmaceutical preparations under batch and flow modes. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 39, n. 1–2, p. 117–124, 2005 <DOI: 10.1016/j.jpba.2005.03.025>.

BALDAN, M.R. *et al.* Cathodic and anodic pre-treated boron doped diamond with different sp<sup>2</sup> content: Morphological, structural, and impedance spectroscopy characterizations. **Journal of Physics and Chemistry of Solids**, v. 74, n. 12, p. 1830–1835, dez. 2013 <<https://doi.org/10.1016/j.jpics.2013.07.015>>.

BARROS, Rita de Cássia Mendes De *et al.* Filmes de diamante CVD dopado com boro. Parte I . Histórico, produção e caracterização. **Química Nova**, v. 28, n. 2, p. 317–325, mar. 2005 <<https://doi.org/10.1590/S0100-40422005000200024>>.

BARTON, John *et al.* Screen-printed electrodes for environmental monitoring of heavy metal ions: a review. **Microchimica Acta**, v. 183, n. 2, p. 503–517, 2016 <<https://doi.org/10.1007/s00604-015-1651-0>>.

BARD, A. J. *et al.* **Encyclopedia of Electrochemistry, Volume 3, Instrumentation and Electroanalytical Chemistry**. [s.l.] Wiley New York, 2003.

BASÁEZ, LUISA *et al.* ELECTROCHEMICAL AND ELECTROPHORETIC STUDY OF SODIUM METAMIZOLE. **Journal of the Chilean Chemical Society**, v. 53, n. 3, p. 1572–1575, set. 2008. <<http://dx.doi.org/10.4067/S0717-97072008000300004>>.

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

BERTOL, Elisabetta *et al.* Proactive drugs in DFSA cases: Toxicological findings in an eight-years study. **Forensic Science International**, v. 291, p. 207–215, out. 2018 <doi: 10.1016/j.emc.2007.02.008>.

BLACK, Maureen M. Zinc deficiency and child development. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 68, n. 2 SUPPL., p. 464–469, 1998 <DOI: 10.1093/ajcn/68.2.464S>.

BOSMAN, Ingrid J.; VERSCHRAAGEN, Miranda; LUSTHOF, Klaas J. Toxicological Findings in Cases of Sexual Assault in the Netherlands\*. **Journal of Forensic Sciences**, v. 56, n. 6, p. 1562–1568, nov. 2011 <DOI: 10.1111/j.1556-4029.2011.01888.x>.

BRETT, Christopher M.A; BRETT, Ana Maria Oliveira; TUGULEA, Laura. Anodic stripping voltammetry of trace metals by batch injection analysis. **Analytica Chimica Acta**, v. 322, n. 3, p. 151–157, abr. 1996 < [https://doi.org/10.1016/S0022-0728\(99\)00061-3](https://doi.org/10.1016/S0022-0728(99)00061-3)>.

BRETT, Christopher M A; OLIVEIRA BRETT, Ana Maria; MITOSERIU, Lucian Costel. Amperometric and Voltammetric Detection in Batch Injection Analysis. **Analytical Chemistry**, v. 66, n. 19, p. 3145–3150, 1 out. 1994 <<https://doi.org/10.1021/ac00091a024>>.

BRETT, Christopher Maria A.; BRETT, Ana Maria Oliveira; TUGULEA, Laura. Batch injection analysis with adsorptive stripping voltammetry for the determination of traces of nickel and cobalt. **Electroanalysis**, v. 8, n. 7, p. 639–642, jul. 1996 <<http://doi.wiley.com/10.1002/elan.1140080707>>.

BREWER, Kimberly *et al.* Scopolamine in racing horses: Trace identifications associated with dietary or environmental exposure. **Veterinary Journal**, v. 199, n. 3, p. 324–331, 2014 < <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2013.12.013>>.

BROCENSCHI, Ricardo F *et al.* Assessments of the Effect of Increasingly Severe Cathodic Pretreatments on the Electrochemical Activity of Polycrystalline Boron-Doped Diamond Electrodes. **Analytical Chemistry**, v. 88, n. 10, p. 5363–5368, 17 maio 2016 <<https://doi.org/10.1021/acs.analchem.6b00676>>.

CABALLERO, Carlos García; JORGE, Óscar Quintela; LANDEIRA, Angelines Cruz. Alleged drug-facilitated sexual assault in a Spanish population sample. **Forensic Chemistry**, v. 4, p. 61–66, jun. 2017 <DOI:10.1016/J.FORC.2017.02.009>.

CHEN, Jianrong; TEO, Khay Chuan. Determination of cadmium, copper, lead and zinc in water samples by flame atomic absorption spectrometry after cloud point extraction. **Analytica Chimica Acta**, v. 450, n. 1–2, p. 215–222, dez. 2001 <[https://doi.org/10.1016/S0003-2670\(01\)01367-8](https://doi.org/10.1016/S0003-2670(01)01367-8)>.

CHEN, Li-Chia; CHANG, Chia-Chin; CHANG, Hsien-Chang. Electrochemical oxidation of histidine at an anodic oxidized boron-doped diamond electrode in neutral solution. **Electrochimica Acta**, v. 53, n. 6, p. 2883–2889, fev. 2008. <<https://doi.org/10.1016/j.electacta.2007.10.071>>.

c, Samir *et al.* Nonaqueous versus aqueous capillary electrophoresis for the dosage of N-butylscopolamine in various pharmaceutical formulations. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 21, n. 1, p. 165–174, 1999 <DOI: 10.1016/s0731-7085(99)00141-7>.

CHERKAOUI, Samir *et al.* Validated capillary electrophoresis method for the determination of atropine and scopolamine derivatives in pharmaceutical formulations. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 17, n. 6–7, p. 1167–1176, 1998a <DOI: 10.1016/s0731-7085(98)00083-1>.

CHERKAOUI, Samir *et al.* Validated capillary electrophoresis method for the determination of atropine and scopolamine derivatives in pharmaceutical formulations. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 17, n. 6–7, p. 1167–1176, set. 1998b <[https://doi.org/10.1016/S0731-7085\(98\)00083-1](https://doi.org/10.1016/S0731-7085(98)00083-1)>.

CHERKAOUI, Samir *et al.*, Nonaqueous Capillary Electrophoresis for the Analysis of Selected Tropane Alkaloids in a Plant Extract. **Chromatographia**, v. 49, n. 1, p. 54–60, 1999 <DOI:10.1007/BF02467187>.

CHRISTIE, J H\_; TURNER, John A; OSTERYOUNG, R A. Square wave voltammetry at the dropping mercury electrode: theory. **Analytical Chemistry**, v. 49, n. 13, p. 1899–1903, 1 nov. 1977 <<https://doi.org/10.1021/ac50021a008>>.

COMPTON, Richard G; MATYSIK, Frank-Michael. Sonovoltammetric behavior of ascorbic acid and dehydroascorbic acid at glassy carbon electrodes: Analysis using pulsed sonovoltammetry. **Electroanalysis**, v. 8, n. 3, p. 218–222, mar. 1996 <<https://doi.org/10.1002/elan.1140080304>>.

CUNHA, Rafael R. *et al.* Fast determination of codeine, orphenadrine, promethazine, scopolamine, tramadol, and paracetamol in pharmaceutical formulations by capillary electrophoresis. **Journal of Separation Science**, v. 40, n. 8, p. 1815–1823, abr. 2017 <<https://doi.org/10.1002/jssc.201601275>>.

CUNHA, Rafael Rodrigues. Desenvolvimento de métodos rápidos para determinação de Codeína, Diclofenaco e seus contra-íons por eletroforese capilar com detecçãocondutométrica sem contato (CE-C<sup>4</sup>D). 2013. 81p. **Dissertação** (Mestrado em Química) - Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2013.

DA SILVA, L. O. C., especificação química de cobre nas águas da região costeira da ilha de santa catarina utilizando voltametria de redissolução catódica e métodos espectrométricos de emissão e absorção atômica. **Dissertação** (Mestrado em Agroquímica), Universidade Federal de Viçosa, 2007.

DARDENNE, M. Zinc and immune function. **European Journal of Clinical Nutrition**, v. 56, p. S20–S23, 2002 <DOI: 10.1038/sj.ejcn.1601479>.

DAVIES, Michael B; AUSTIN, John; PARTRIDGE, David A. Vitamin C: its chemistry and biochemistry. [S.l.]: **Royal society of chemistry**, 1991 <DOI:<https://doi.org/10.1039/9781847552303>>.



DE CARVALHO, Leandro M. *et al.* Simultaneous determination of cations by capillary electrophoresis with contactless conductivity detection performed in a home-made equipment. **Quimica Nova**, v. 32, n. 8, p. 2203–2208, 2009 <<https://doi.org/10.1590/S0100-40422009000800036>>.

DEML, M; FORET, F; BOČEK, P. Electric sample splitter for capillary zone electrophoresis. **Journal of Chromatography A**, v. 320, n. 1, p. 159–165, fev. 1985 <[https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(01\)90491-1](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(01)90491-1)>.

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

DURÁN, L F. Detenido por abusar de numerosas mujeres tras sedarlas con una potente droga. **Diario El Mundo [edición on-line]**, 2012.

EL-HAFEEZ MOSTAFA, Gamal Abdel. Potentiometric PVC membrane sensor for the determination of scopolamine in some pharmaceutical formulations. **Analytical Sciences**, v. 18, n. 12, p. 1335–1338, 2002 <DOI: 10.2116/analsci.18.1335>.

EUROPAPRESS (ed.). **Los detenidos de la rave de Getafe hicieron el brebaje de estramonio en casa y lo daban gratis "para abrir mercado**. 2011. Disponível em: <https://www.europapress.es/madrid/noticia-detenidos-rave-getafe-hicieron-brebaje-estramonio-casa-daban-gratis-abrir-mercado-20110825135011.html>. Acesso em: 27 dez. 2021.

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

FABRIS, N., Mocchegiani, E., Revisão: Zinco, doenças humanas e envelhecimento, **Envelhecimento** 7. 1995, 72 -93.

FOGG, Arnold G; WANG, Joseph. Terminology and Convention for Electrochemical Stripping Analysis. **Pure and Applied Chemistry**, v. 71, n. 5, p. 891–897, 30 maio 1999 <<https://doi.org/10.1351/pac199971050891>>.

FORNARO, Adalgiza; COICHEV, Nina. Ácido L-ascórbico: reações de complexação e de óxido-redução com alguns íons metálicos de transição. **Química Nova**, v. 21, n. 5, p. 642–650, out. 1998 <<https://doi.org/10.1590/S0100-40421998000500017>>.

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

FRACASSI DA SILVA, José Alberto. Detecção eletroquímica em eletroforese capilar. **Química Nova**, v. 26, n. 1, p. 56–64, 2003 <<https://doi.org/10.1590/S0100-40422003000100012>>.

FRAKER, Pamela J *et al.* The Dynamic Link between the Integrity of the Immune System and Zinc Status. **The Journal of Nutrition**, v. 130, n. 5, p. 1399S–1406S, 1 maio 2000 <<https://doi.org/10.1093/jn/130.5.1399S>>.

FRANCISCO, Kelliton José Mendonça; DO LAGO, Claudimir Lucio. A compact and high-resolution version of a capacitively coupled contactless conductivity detector. **ELECTROPHORESIS**, v. 30, n. 19, p. 3458–3464, out. 2009 <<https://doi.org/10.1002/elps.200900080>>.

FRASCHT, Martine *et al.* Formation of scopolamine from N-butyl-scopolammonium bromide in cigarettes. **Journal of Analytical Toxicology**, v. 31, n. 4, p. 220–223, 2007 <[DOI:10.1093/JAT/31.4.220](https://doi.org/10.1093/JAT/31.4.220)>.

FUERSTENAU, D W. Streaming Potential Studies on Quartz in Solutions of Aminium Acetates in Relation to the Formation of Hemi- micelles at the Quartz-Solution Interface. **The Journal of Physical Chemistry**, v. 60, n. 7, p. 981–985, 1 jul. 1956 <<https://doi.org/10.1021/j150541a039>>.

FUJISHIMA, Akira *et al.* *Diamond electrochemistry*. [S.l.]: Elsevier, 2005 <eBook ISBN: 9780080931050>.

GALUSZKA, Agnieszka *et al.* Analytical Eco-Scale for assessing the greenness of analytical procedures. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, v. 37, p. 61–72, 2012 <<https://doi.org/10.1016/j.trac.2012.03.013>>.

GAMAL, Mohammed. Analytical review: Analytical techniques for hyoscine: N butyl bromide. *Analyst*, v. 145, n. 6, p. 2025–2037, 2020 <DOI: 10.1039/d0an00076k>.

GIMENES, Denise Tofanello *et al.* A Simple Strategy to Improve the Accuracy of the Injection Step in Batch Injection Analysis Systems with Amperometric Detection. *Electroanalysis*, v. 24, n. 9, p. 1805–1810, set. 2012. <<https://doi.org/10.1002/elan.201200254>>.

GIRARD, H. *et al.* Effect of anodic and cathodic treatments on the charge transfer of boron doped diamond electrodes. *Diamond and Related Materials*, v. 16, n. 2, p. 316–325, 2007 <DOI:10.1016/j.diamond.2006.06.009>.

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

GUTZ, I. G. R., **programa CurTiPot - pH e Curvas de Titulação Potenciométrica: Análise e Simulação**, versão 4.3.1, Disponível em: <http://www.iq.usp.br/gutz/Curtipot.html>.

HAASE, Hajo; RINK, Lothar. The immune system and the impact of zinc during aging. *Immunity & Ageing*, v. 6, n. 1, p. 9, 2009 <<https://doi.org/10.1186/1742-4933-6-9>>.

HAUSER, Peter C; KUBÁŇ, Pavel. Capacitively coupled contactless conductivity detection for analytical techniques – Developments from 2018 to 2020. **Journal of Chromatography A**, v. 1632, p. 461616, 2020 <<https://doi.org/10.1016/j.chroma.2020.461616>>.

HEINZE, J. Allen J. Bard and Larry F. Faulkner: Electrochemical Methods - Fundamentals and Applications. Wiley, New York 1980, 718 + XVIII S., Preis: £ 14.70. **Berichte der Bunsengesellschaft für physikalische Chemie**, v. 85, n. 11, p. 1085–1086, nov. 1981 <<https://doi.org/10.1002/bbpc.19810851142>>.

HJERTÉN, S., Free zone electrophoresis. **Chromatographic Reviews**, v. 9, p. 122–143, 1967. <DOI: 10.1016/0009-5907(67)80003-6>.

HICKS, Michael B *et al.* Making the move towards modernized greener separations: introduction of the analytical method greenness score (AMGS) calculator. **Green Chemistry**, v. 21, n. 7, p. 1816–1826, 2019 <DOI:<https://doi.org/10.1039/C8GC03875A>>.

HU, Ing Feng; KUWANA, Theodore. Oxidative mechanism of ascorbic acid at glassy carbon electrodes. **Analytical Chemistry**, v. 58, n. 14, p. 3235–3239, 1 dez. 1986 <<https://doi.org/10.1021/ac00127a069>>.

HURLEY, Michael; PARKER, Helen; WELLS, David L. The epidemiology of drug facilitated sexual assault. **Journal of Clinical Forensic Medicine**, v. 13, n. 4, p. 181–185, maio 2006 <DOI: 10.1016/j.jcfm.2006.02.005>.

ISKANDER, F. Y.; KLEIN, D. E.; BAUER, T. L. Determination of trace element impurities in aspirin tablets by neutron activation analysis. **Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry Articles**, v. 97, n. 2, p. 353–357, fev. 1986 <<https://doi.org/10.1007/BF02035681>>.

JALALI, Farzad; AFSHARI, Reza; BABAEI, Ali. Smoking crushed hyoscine/scopolamine tablets as drug abuse. **Substance Use and Misuse**, v. 49, n. 7, p. 793–797, 2014 <DOI: 10.3109/10826084.2014.880178>.

JEN, Melinda; YAN, Albert C. Syndromes associated with nutritional deficiency and excess. **Clinics in Dermatology**, v. 28, n. 6, p. 669–685, nov. 2010. <<https://doi.org/10.1016/j.clindermatol.2010.03.029>>.

Jl, Mian *et al.* Thermokinetics of the formation reaction of zinc histidine complex. **Chemical Journal on Internet**, v. 2, n. 10, p. 16–19, 2000 <DOI:10.1002/cjoc.20020200104>.

JOHNSTON, Stephen E *et al.* Expanded electrical model of a contactless conductivity detector: Development and verification. **Journal of Chromatography A**, v. 1094, n. 1–2, p. 148–157, nov 2005 <DOI: 10.1016/j.chroma.2005.07.098>.

JORGENSON, James W.; LUKACS, Kryn De Arman. Zone Electrophoresis in Open-Tubular Glass Capillaries. **Analytical Chemistry**, v. 53, n. 8, p. 1298–1302, 1981 <<https://doi.org/10.1021/ac00231a037>>.

JORGENSON, James W. Electrophoresis. **Analytical Chemistry**, v. 58, n. 7, p. .743A–760A, 1 jun. 1986 <<https://doi.org/10.1021/ac00298a001>>.

JORGENSON, J. W., LUKÁCS, K. D. Zone Electrophoresis in Open-Tubular Glass Capillaries. **American Chemical Society**, v. 53, p. 1298–1302, 1981. <DOI: 10.1021/ac00231a037>.

KANETA, Takashi; TANAKA, Shunitz; TAGA, Mitsuhiko. Effect of cetyltrimethylammonium chloride on electroosmotic and electrophoretic mobilities in capillary zone electrophoresis. **Journal of Chromatography A**, v. 653, n. 2, p. 313–319, nov. 1993 <[https://doi.org/10.1016/0021-9673\(93\)83189-Y](https://doi.org/10.1016/0021-9673(93)83189-Y)>.

KHO, Richard *et al.* Zinc-histidine as nucleation centers for growth of ZnS nanocrystals. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 272, n. 1, p. 29–35, 2000 <DOI: 10.1006/bbrc.2000.2712>.

KLIMCZAK, Inga *et al.* Effect of storage on the content of polyphenols, vitamin C and the antioxidant activity of orange juices. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 20, n. 3, p. 313–322, 2007 <<https://doi.org/10.1016/j.jfca.2006.02.012>>.

KONDO, Takeshi *et al.* Plasma etching treatment for surface modification of boron-doped diamond electrodes. **Electrochimica Acta**, v. 52, n. 11, p. 3841–3848, mar. 2007 <<https://doi.org/10.1016/j.electacta.2006.11.001>>.

KRAFT, Alexander. Doped diamond: a compact review on a new, versatile electrode material. **Int. J. Electrochem. Sci**, v. 2, n. 5, p. 355–385, 2007 <<https://doi.org/10.1016/j.seppur.2018.11.056>>.

KRYSTEK, J; KOBYLECKA, J; PTASZYNSKI, B. Spectrophotometric determination of zinc with 1-(2-Pyridylazo)-2-naphthol and cetyltrimethylammonium bromide in insulin. **Chemia Analityczna**, v. 38, p. 607, 1993 < Corpus ID: 41997194 >.

KUBÁŇ, Pavel *et al.* Electromembrane extraction of heavy metal cations followed by capillary electrophoresis with capacitively coupled contactless conductivity detection. **ELECTROPHORESIS**, v. 32, n. 9, p. 1025–1032, abr. 2011 <<https://doi.org/10.1002/elps.201000462>>.

KUBÁŇ, Pavel; HAUSER, Peter C. Contactless Conductivity Detection in Capillary Electrophoresis: A Review. **Electroanalysis**, v. 16, n. 24, p. 2009–2021, 1 dez. 2004a <<https://doi.org/10.1002/elan.200403125>>.

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

KUBÁŇ, Pavel; HAUSER, Peter C. Fundamental aspects of contactless conductivity detection for capillary electrophoresis. Part I: Frequency behavior and cell geometry. **ELECTROPHORESIS**, v. 25, n. 20, p. 3387–3397, out. 2004b <<https://doi.org/10.1002/elps.200406059>>.

KUBÁŇ, Pavel; HAUSER, Peter C. Fundamental aspects of contactless conductivity detection for capillary electrophoresis. Part II: Signal-to-noise ratio and stray capacitance. **ELECTROPHORESIS**, v. 25, n. 20, p. 3398–3405, out. 2004c <<https://doi.org/10.1002/elps.200406060>>.

KUBÁŇ, Petr *et al.* Separation of oxalate, formate and glycolate in human body fluid samples by capillary electrophoresis with contactless conductometric detection. **Journal of Chromatography A**, v. 1325, p. 241–246, jan. 2014 <<https://doi.org/10.1016/j.chroma.2013.12.039>>.

KUMMER, Sebastian *et al.* Abuse of the over-the-counter antispasmodic butylscopolamine for the home synthesis of psychoactive scopolamine. **European Journal of Pediatrics**, v. 175, n. 7, p. 1019–1021, 2016 <<https://doi.org/10.1007/s00431-015-2683-5>>.

LAMBERT, William J; MIDDLETON, David L. pH hysteresis effect with silica capillaries in capillary zone electrophoresis. **Analytical Chemistry**, v. 62, n. 15, p. 1585–1587, 1 ago. 1990 <<https://doi.org/10.1021/ac00214a009>>.

LANGELOTH, Michael; CHIKU, Masanobu; EINAGA, Yasuaki. Anodic stripping voltammetry of zinc at boron-doped diamond electrodes in ammonia buffer solution. **Electrochimica Acta**, v. 55, n. 8, p. 2824–2828, mar. 2010 <<https://doi.org/10.1016/j.electacta.2009.12.097>>.

LAUWERS, L. F. *et al.* Scopolamine intoxications. **Intensive Care Medicine**, v. 9, n. 5, p. 283–285, 1983 <DOI: 10.1007/BF01691256>.

LAWSON, G. M. Defining limit of detection and limit of quantitation as applied to drug of abuse testing: striving for a consensus. **Clinical chemistry**, v. 40, n. 7 Pt 1, p. 1218–1219, 1994.

LEWIN, L.L.; PEDRERO, P.Sanz; VILARIÑO, M.R. Direct determination of zinc in insulin preparations by differential pulse polarography. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 4, n. 1, p. 23–29, jan. 1986 <[https://doi.org/10.1016/0731-7085\(86\)80019-X](https://doi.org/10.1016/0731-7085(86)80019-X)>.

LI, Linbo *et al.* Hexagonal Cobalt Oxyhydroxide–Carbon Dots Hybridized Surface: High Sensitive Fluorescence Turn-on Probe for Monitoring of Ascorbic Acid in Rat Brain Following Brain Ischemia. **Analytical Chemistry**, v. 87, n. 6, p. 3404–3411, 17 mar. 2015 <<https://doi.org/10.1021/ac5046609>>.

LOPES, Fernando Silva; COELHO, Lúcia Helena Gomes; GUTZ, Ivano Gebhardt Rolf. Automated two-dimensional separation flow system with electrochemical preconcentration, stripping, capillary electrophoresis and contactless conductivity detection for trace metal ion analysis. **Electrophoresis**, v. 32, n. 8, p. 939–946, 2011 <DOI: 10.1002/elps.201000479>.

LUCY, Charles A; UNDERHILL, Royale S. Characterization of the Cationic Surfactant Induced Reversal of Electroosmotic Flow in Capillary Electrophoresis. **Analytical Chemistry**, v. 68, n. 2, p. 300–305, 1 jan. 1996 <<https://doi.org/10.1021/ac950632h>>.

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

MAFRA, Denise; COZZOLINO, Sílvia Maria Franciscato. Importância do zinco na nutrição humana. **Revista de Nutrição**, v. 17, n. 1, p. 79–87, 2004 <<https://doi.org/10.1590/S1415-52732004000100009>>.



MAGGINI, S.; WENZLAFF, S.; HORNIG, D. Essential role of vitamin c and zinc in child immunity and health. **Journal of International Medical Research**, v. 38, n. 2, p. 386–414, 2010 <DOI: 10.1177/147323001003800203>.

MANOURI, Olga Ch *et al.* Three approaches to the analysis of zinc(II) in pharmaceutical formulations by means of different spectrometric methods. **II Farmaco**, v. 53, n. 8–9, p. 563–569, ago. 1998 <[https://doi.org/10.1016/S0014-827X\(98\)00066-4](https://doi.org/10.1016/S0014-827X(98)00066-4)>.

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

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

MINUTOS, 20 (ed.). **Dos muertos y un herido en una 'rave' en Getafe**. 2011. Disponível em: <https://www.20minutos.es/noticia/1139338/0/muertos/getafe/rave/>. Acesso em: 27 dez. 2021.

MORABIA, Alfredo *et al.* Population-based study of SR-BI genetic variation and lipid profile. **Atherosclerosis**, v. 175, n. 1, p. 159–168, jul. 2004 <<https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2004.03.014>>.

NAMERA, Akira *et al.* Quantitative analysis of tropane alkaloids in biological materials by gas chromatography-mass spectrometry. **Forensic science international**, v. 130, n. 1, p. 34–43, nov. 2002 <DOI: 10.1016/s0379-0738(02)00302-x>.

NWEZE, C C; ABDULGANIYU, M G; ERHABOR, O G. Comparative analysis of vitamin C in fresh fruits juice of *Malus domestica*, *Citrus sinensi*, *Ananas comosus* and *Citrullus lanatus* by iodometric titration. **Int. J. Sci. Environ. Technol**, v. 4, n. 1, p. 17–22, 2015.

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

OERTEL, R *et al.* Determination of scopolamine in human serum by gas chromatography-ion trap tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications**, v. 682, n. 2, p. 259–264, 1996 <DOI: 10.1016/0378-4347(96)00095-3>.

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

OLIVEIRA, Thiago da Costa. Desenvolvimento de métodos eletroanalíticos empregando análise por injeção em batelada para a determinação de nafazolina, zinco, feniramina e clorfeniramina em formulações farmacêuticas. **Dissertação** (mestrado em química), 110 p. Universidade Federal de Uberlândia, 2015.

OLIVEIRA, Thiago da Costa *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, maio 2016 <<https://doi.org/10.1016/j.talanta.2016.02.031>>.

ÖZCAN, Mehmet Musa; AL JUHAIMI, Fahad Y. Determination of heavy metals in bee honey with connected and not connected metal wires using inductively coupled plasma atomic emission spectrometry (ICP–AES). **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 184, n. 4, p. 2373–2375, 15 abr. 2012 <<https://doi.org/10.1007/s10661-011-2123-6>>.

PAPADOYANNIS, I. *et al.* Solid-phase extraction and rp-hplc analysis of atropine sulphate and scopolamine-n-butylbromide in pharmaceutical preparations and biological fluids. **Instrumentation Science & Technology**, v. 22, n. 1, p. 83–103, 1994a <<https://doi.org/10.1080/10739149408003023>>.

PAPADOYANNIS, I. *et al.* Solid-Phase Extraction and RP-HPLC Analysis of Atropine Sulphate and Scopolamine-N-Butylbromide in Pharmaceutical Preparations and Biological Fluids. **Instrumentation Science & Technology**, v. 22, n. 1, p. 83–103, fev. 1994b <<https://doi.org/10.1080/10739149408003023>>.

PATTEN, Bernard M; BRONZERT, Diane A. Syndrome of Acute Zinc Loss. **Arch. Neurol.** v. 20007, 2015 <DOI: 10.1001/archneur.1975.00490530067006>.

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

PELSKOV, Yu V. *et al.* Photoelectrochemical properties of semiconductor diamond. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 228, n. 1–2, p. 19–27, 1987 <[https://doi.org/10.1016/0022-0728\(87\)80093-1](https://doi.org/10.1016/0022-0728(87)80093-1)>.

PENA-PEREIRA, Francisco; WOJNOWSKI, Wojciech; TOBISZEWSKI, Marek. AGREE—Analytical GREENess Metric Approach and Software. **Analytical Chemistry**, v. 92, n. 14, p. 10076–10082, 21 jul. 2020 <<https://doi.org/10.1021/acs.analchem.0c01887>>.

PEREIRA, Polyana F *et al.* Fast batch injection analysis system for on-site determination of ethanol in gasohol and fuel ethanol. **Talanta**, v. 90, p. 99–102, fev. 2012 <<https://doi.org/10.1016/j.talanta.2012.01.004>>.

PISOSCHI, Aurelia Magdalena *et al.* Electrochemical methods for ascorbic acid determination. **Electrochimica Acta**, v. 121, p. 443–460, mar. 2014 <<https://doi.org/10.1016/j.electacta.2013.12.127>>.

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

PRASAD, A S *et al.* Zinc deficiency in elderly patients. **Nutrition** (Burbank, Los Angeles County, Calif.), v. 9, n. 3, p. 218–224, 1993.

PRETORIUS, Victor; HOPKINS, B. J.; SCHIEKE, J. D. Electro-osmosis. A new concept for high-speed liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 99, n. C, p. 23–30, 1974.

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

RAJH VIDAL, Denis Tadeu; AUGELLI, Marcio Antonio; LUCIO DO LAGO, Claudimir. Determination of sildenafil and vardenafil by capillary zone electrophoresis using capacitively coupled contactless conductivity detection. **Analytical Methods**, v. 5, n. 8, p. 2041–2045, 2013 <<http://dx.doi.org/10.1039/c3ay26470j>>.

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

RAO, T.N.; FUJISHIMA, A. Recent advances in electrochemistry of diamond. **Diamond and Related Materials**, v. 9, n. 3–6, p. 384–389, abr. 2000 <[https://doi.org/10.1016/S0925-9635\(99\)00234-4](https://doi.org/10.1016/S0925-9635(99)00234-4)>.

REYES, Darwin R *et al.* Micro Total Analysis Systems. 1. Introduction, Theory, and Technology. **Analytical Chemistry**, v. 74, n. 12, p. 2623–2636, 1 jun. 2002 <<https://doi.org/10.1021/ac0202435>>.

RIBEIRO, Michelle M.A.C. *et al.* A sub-minute electrophoretic method for simultaneous determination of naphazoline and zinc. **Journal of Chromatography A**, v. 1472, p. 134–137, nov. 2016 <<https://doi.org/10.1016/j.chroma.2016.10.031>>.

SÁIZ, Jorge *et al.* In situ determination of scopolamine in evidence of recreational and predatory use. **Journal of the Forensic Science Society**, v. 165, p. 165, 2013a <DOI:10.1016/j.scijus.2013.08.001>.

SÁIZ, Jorge *et al.* Rapid determination of scopolamine in evidence of recreational and predatory use. **Science and Justice**, v. 53, n. 4, p. 409–414, 2013b <DOI:10.1016/j.scijus.2013.08.001>.

SALAZAR-BANDA, Giancarlo 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, n. 10, p. 1817–1827, 18 out. 2010 <<https://doi.org/10.1007/s10800-010-0139-1>>.

SALAZAR-BANDA, Giancarlo R *et al.* On the changing electrochemical behaviour of boron-doped diamond surfaces with time after cathodic pre-treatments. **Electrochimica Acta**, v. 51, n. 22, p. 4612–4619, jun. 2006 <<https://doi.org/10.1016/j.electacta.2005.12.039>>.

SANTOS, Simone Birkheur *et al.* A simple square-wave voltammetric method for the determination of scopolamine in pharmaceuticals using a boron-doped diamond electrode. **Química Nova**, v. 37, n. 10, p. 1579–1583, 2014 <<https://doi.org/10.5935/0100-4042.20140278>>.

SCHWER, Christine; KENNDLER, Ernst. Electrophoresis in fused-silica capillaries: the influence of organic solvents on the electroosmotic velocity and the zeta potential. **Analytical Chemistry**, v. 63, n. 17, p. 1801–1807, 1 set. 1991 <<https://doi.org/10.1021/ac00017a026>>.

SHOJI, Shuichi; ESASHI, Masayoshi; MATSUO, Tadayuki. Prototype miniature blood gas analyser fabricated on a silicon wafer. **Sensors and Actuators**, v. 14, n. 2, p. 101–107, jun. 1988 <[https://doi.org/10.1016/0250-6874\(88\)80057-X](https://doi.org/10.1016/0250-6874(88)80057-X)>.

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

SPUDEIT, Daniel Alfonso; DOLZAN, Maressa Danielli; MICKE, Gustavo Amadeu. Eletroforese Capilar: uma breve introdução. **Scientia Chromatographica**, v. 4, n. 4, p. 287–297, 2012 <<http://dx.doi.org/10.4322/sc.2012.017>>.

STEENKAMP, P.A. *et al.* Fatal Datura poisoning: identification of atropine and scopolamine by high performance liquid chromatography/photodiode array/mass spectrometry. **Forensic Science International**, v. 145, n. 1, p. 31–39, out. 2004 <<https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2004.03.011>>.

SUFFREDINI, Hugo B *et al.* Enhanced electrochemical response of boron-doped diamond electrodes brought on by a cathodic surface pre-treatment. **Electrochimica Acta**, v. 49, n. 22–23, p. 4021–4026, set. 2004 <<https://doi.org/10.1016/j.electacta.2004.01.082>>.

SVEDBERG, The; TISELIUS, Arne. A new method for determination of the mobility of proteins. **Journal of the American Chemical Society**, v. 48, n. 9, p. 2272–2278, 1926 <<https://doi.org/10.1021/ja01420a004>>.

SWAIN, Matthew. Chemicalize.Org. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 52, n. 2, p. 613–615, 2012.

SWINNEY, Kelly; BORNHOP, Darryl J. Detection in capillary electrophoresis. **Electrophoresis**, v. 21, n. 7, p. 1239–1250, 1 abr. 2000 <[https://doi.org/10.1002/\(SICI\)15222683\(20000401\)21:7<1239::AIDELPS1239>3.0.CO;2-6](https://doi.org/10.1002/(SICI)15222683(20000401)21:7<1239::AIDELPS1239>3.0.CO;2-6)>.

TADAYON, Fariba; VAHED, Saba; BAGHERI, Hasan. Au-Pd/reduced graphene oxide composite as a new sensing layer for electrochemical determination of ascorbic acid, acetaminophen and tyrosine. **Materials Science and Engineering: C**, v. 68, p. 805–813, nov. 2016 <<https://doi.org/10.1016/j.msec.2016.07.039>>.

TAMIZI, Elnaz; JOUYBAN, Abolghasem. The potential of the capillary electrophoresis techniques for quality control of biopharmaceuticals-A review. **ELECTROPHORESIS**, v. 36, n. 6, p. 831–858, mar. 2015 <<https://doi.org/10.1002/elps.201400343>>.

TAVARES, Marina F. M; M. *Eletroforese capilar: Conceitos básicos*. **Química Nova**. v. 19, n. 2, p. 173-181, 1995.

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

TEIXEIRA, L. Nickel and zinc determination by flow-injection solid-phase spectrophotometry exploiting different sorption rates. **Talanta**, v. 51, n. 5, p. 1027–1033, 28 abr. 2000 <[https://doi.org/10.1016/S0039-9140\(00\)00288-5](https://doi.org/10.1016/S0039-9140(00)00288-5)>.

TISELIUS, A. The Moving Boundary Method of studying the electrophoresis of proteins. *Nova Acta Regional Societatis Scientist Upsaliensis*, v.7, n. 4, p. 107, 1930.

THE UNITED STATES PHARMACOPOEIA, U.S.P. 25 rev., Editor. 2002: Convention: Rockville.

TORMIN, T. F. *et al.* Batch-injection stripping voltammetry of zinc at a gold electrode: application for fuel bioethanol analysis. **Electrochimica Acta**, v. 164, p. 90–96, maio 2015 <<https://doi.org/10.1016/j.electacta.2015.02.172>>.

TORMIN, T. F. *et al.* Fast and direct determination of butylated hydroxyanisole in biodiesel by batch injection analysis with amperometric detection. **Talanta**, v. 85, n. 3, p. 1274–1278, set. 2011 <<https://doi.org/10.1016/j.talanta.2011.06.008>>.

TORMIN, T. F. Desenvolvimento de métodos eletroanalíticos para a determinação de metais em biocombustíveis empregando a análise por injeção em batelada (bia). **Tese (Doutorado em Química)**, 148 p. Universidade Federal de Uberlândia, 2016.

TURNER, John A *et al.* Square wave voltammetry at the dropping mercury electrode: experimental. **Analytical Chemistry**, v. 49, n. 13, p. 1904–1908, 1 nov. 1977 <<https://doi.org/10.1021/ac50021a009>>.

UCIECHOWSKI, Peter; RINK, Lothar. Chapter 39 - Zinc: An Essential Trace Element for the Elderly. **Molecular basis of nutrition and aging (org.)**. San Diego: Academic Press, 2016. p. 551–566 <<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801816-3.00039-X>>.

UDOH, A.P. Determination of calcium, magnesium and zinc in unused lubricating oils by atomic absorption spectroscopy. **Talanta**, v. 42, n. 12, p. 1827–1831, dez. 1995 <[https://doi.org/10.1016/0039-9140\(95\)01634-1](https://doi.org/10.1016/0039-9140(95)01634-1)>.

URIBE, Manuel *et al.* Perfil epidemiológico de la intoxicación con burundanga en la clínica Uribe Cualla SA de Bogotá, DC. **Acta Neurol Colomb**, v. 21, n. 3, p. 197–201, 2005.

VALLERSNES, Odd Martin *et al.* Epidemic of poisoning caused by scopolamine disguised as Rohypnol™ tablets Scopolamine disguised as Rohypnol™ tablets. **Clinical Toxicology**, v. 47, n. 9, p. 889–893, 2009 <DOI: 10.3109/15563650903333804>.

VAN DER, C. *et al.* A.c. conductivity measurements in isotachopheresis. **Analytica Chimica Acta**, v. 59, n. 2, p. 298–301, 1972 <[https://doi.org/10.1016/S0003-2670\(01\)95095-0](https://doi.org/10.1016/S0003-2670(01)95095-0)>.

VAN LINTEL, H.T.G.; VAN DE POL, F.C.M.; BOUWSTRA, S. A piezoelectric micropump based on micromachining of silicon. **Sensors and Actuators**, v. 15, n. 2, p. 153–167, out. 1988 <[https://doi.org/10.1016/0250-6874\(88\)87005-7](https://doi.org/10.1016/0250-6874(88)87005-7)>.

VAN SASSENBROECK, Diederik *et al.* Three cases of substitution errors leading to hyoscine hydrobromide overdose. **Clinical Toxicology**, v. 43, n. 7, p. 861–865, 2005 <DOI: 10.1080/15563650500357560>.



VANORMAN, Barbara B *et al.* Effects of buffer composition on electroosmotic flow in capillary electrophoresis. **Journal of Microcolumn Separations**, v. 2, n. 4, p. 176–180, jul. 1990 <<https://doi.org/10.1002/mcs.1220020404>>.

VAZ, Fernando Antonio Simas; OLIVEIRA, Cledson Lopes Marta De; OLIVEIRA, Marcene Augusto Leal De. Fundamentals of capillary electrophoresis: an animation approach. **Química Nova**, v. 38, n. 5, p. 732–737, 2015 <<http://dx.doi.org/10.5935/0100-4042.20150065>>.

VIRTANEN, R. Zone electrophoresis in a narrow-bore tube employing potentiometric detection - theoretical and experimental study. **Acta Polytechnica Scandinavica-Chemical Technology Series**, n. 123, p. 1-67, 1974 <ISBN: 9516660495 9789516660496>.

WANG, Chunling *et al.* Simulation and Experimental Study on Doubled-Input Capacitively Coupled Contactless Conductivity Detection of Capillary Electrophoresis. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 7944, 2020 <<https://doi.org/10.1038/s41598-020-64896-3>>.

WANG, Joseph. **Analytical Electrochemistry**. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc., 2006 <DOI:10.1002/0471790303>.

WANG, Joseph *et al.* Computerized pipettes with programmable dispensation. **Analytica Chimica Acta**, v. 267, n. 1, p. 171–177, set. 1992 <[https://doi.org/10.1016/0003-2670\(92\)85020-7](https://doi.org/10.1016/0003-2670(92)85020-7)>.

WANG, Joseph; TAHA, Ziad. Batch injection analysis. **Analytical Chemistry**, v. 63, n. 10, p. 1053–1056, 15 maio 1991 <<https://doi.org/10.1021/ac00010a025>>.

WANG, Xu *et al.* Recent advances in vitamins analysis by capillary electrophoresis. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 147, p. 278–287, jan. 2018 <<https://doi.org/10.1016/j.jpba.2017.07.030>>.

WESSELS, Inga; MAYWALD, Martina; RINK, Lothar. Zinc as a gatekeeper of immune function. **Nutrients**, v. 9, n. 12, p. 9–12, 2017 <DOI: 10.3390/nu9121286>.

WHATLEY, Harry. Basic Principles and Modes of Capillary Electrophoresis. **Clinical and Forensic Applications of Capillary Electrophoresis**. Totowa, NJ: Humana Press, 2001. v. 58. p. 21–58 <[https://doi.org/10.1007/978-1-59259-120-6\\_2](https://doi.org/10.1007/978-1-59259-120-6_2)>.

WHELPTON, Robin *et al.* Liquid chromatographic determination of hyoscyne (scopolamine) in urine using solid phase extraction. **Biomedical Chromatography**, v. 6, n. 4, p. 198–204, jul. 1992 <<https://doi.org/10.1002/bmc.1130060410>>.

WYRZYKOWSKI, Dariusz; CHMURZYŃSKI, Lech. Thermodynamics of citrate complexation with Mn<sup>2+</sup>, Co<sup>2+</sup>, Ni<sup>2+</sup> and Zn<sup>2+</sup> ions. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 102, n. 1, p. 61–64, 3 out. 2010 <<https://doi.org/10.1007/s10973-009-0523-4>>.

YEBRA-BIURRUN, M. Flow injection determination methods of ascorbic acid. **Talanta**, v. 52, n. 3, p. 367–383, 30 jun. 2000 <[https://doi.org/10.1016/S0039-9140\(00\)00402-1](https://doi.org/10.1016/S0039-9140(00)00402-1)>.

ZAHN, H. Über das Leitvermögen von starken Elektrolyten für Hochfrequenzströme. **Zeitschrift für Physik**, v. 51, n. 5–6, p. 350–354, maio 1928 <<https://doi.org/10.1007/BF01338317>>.

ZEMANN, Andreas J *et al.* Contactless Conductivity Detection for Capillary Electrophoresis. **Analytical Chemistry**, v. 70, n. 3, p. 563–567, fev. 1998 <<https://doi.org/10.1021/ac9707592>>.

## 7. ARTIGOS PUBLICADOS DURANTE O PERÍODO DO DOUTORADO

**RIBEIRO, MICHELLE MIRANDA A. C.**; PRADO, ALICEANA A.; DOMINGUES BATISTA, ALEX; ALEJANDRO ABARZA MUNOZ, RODRIGO; MATHIAS RICHTER, EDUARDO. Rapid method for simultaneous determination of ascorbic acid and zinc in effervescent tablets by capillary zone electrophoresis with contactless conductivity detection. JOURNAL OF SEPARATION SCIENCE, v. 00, p. 1-6, 2018.

**RIBEIRO, MICHELLE**; ROCHA, RAQUEL; MUNOZ, RODRIGO; RICHTER, EDUADRO. A batch injection analysis system with square-wave voltammetric detection for fast and simultaneous determination of zinc and ascorbic acid. ELECTROANALYSIS, v. 32, p. 1-8, 2020.

**RIBEIRO, MICHELLE**; MARRA, MARIANA; COSTA, BRENDA; OLIVEIRA, THIAGO; BATISTA, ALEX; MUÑOZ, RODRIGO; RICHTER, EDUARDO. Sub-Minute Method for Determination of Naphazoline in the Presence of Diphenhydramine, Pheniramine or Chlorpheniramine by Capillary Electrophoresis. JOURNAL OF THE BRAZILIAN CHEMICAL SOCIETY, v. 00, p. 1, 2018.

**RIBEIRO, MICHELLE**; BARRETO, DIANDRA; PETRUCI, JOAO FLÁVIO; RICHTER, EDUARDO. Simultaneous determination of scopolamine and butylscopolamine in pharmaceutical and beverage samples by capillary zone electrophoresis. MICROCHEMICAL JOURNAL, v. 172, p. 1, 2022.

ROCHA, RAQUEL G.; STEFANO, JÉSSICA S.; ARANTES, IANA V. S.; **RIBEIRO, MICHELLE M. A. C.**; SANTANA, MARIO H. P.; RICHTER, EDUARDO M.; MUNOZ, RODRIGO A. A. Simple Strategy for Selective Determination of Levamisole in Seized Cocaine and Pharmaceutical Samples Using Disposable Screen-printed Electrodes. ELECTROANALYSIS, v. 31, p. 153-159, 2019.

JOÃO, AFONSO F.; SQUISSATO, ANDRÉ L.; RIBEIRO, **MICHELLE M. A. C.**; RICHTER, EDUARDO M.; FARIA, ANÍZIO M.; MUÑOZ, RODRIGO A. A. Potential of Mafura seed oil as a feedstock for biodiesel production. *BIOFUELS*, v. 00, p. 1-7, 2020.

BARRETO, DIANDRA N.; RIBEIRO, **MICHELLE M.A.C.**; SUDO, JOÃO T.C.; RICHTER, EDUARDO M.; MUÑOZ, RODRIGO A.A.; SILVA, SIDNEI G. High-throughput screening of cocaine, adulterants, and diluents in seized samples using capillary electrophoresis with capacitively coupled contactless conductivity detection. *TALANTA*, v. 217, p. 120987-6, 2020.

DO PRADO, A.A, **RIBEIRO, M.M.A.C**, RICHTER, E.M. Ultra-rapid capillary zone electrophoresis method for simultaneous determination of arginine and ibuprofen. *J SEP SCI*. 2021; 1– 6. <https://doi.org/10.1002/jssc.202100169>.

DAVID L. O. RAMOS; **MICHELLE M. A. C. RIBEIRO**; RODRIGO A. A. MUNOZ; EDUARDO MATHIAS RICHTER. Portable amperometric method for selective determination of caffeine in samples with the presence of interfering electroactive chemical species. *JOURNAL OF ELECTROANALYTICAL CHEMISTRY*, 2022.