UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

INSTITUTO DE QUÍMICA

Programa de Pós-Graduação em Química

William Reis de Araujo

**Desenvolvimento de sensores eletroquímicos e
colorimétricos para aplicações em amostras
de interesse forense**

Versão corrigida da Tese conforme Resolução CoPGr 5890

O original se encontra disponível na Secretaria de Pós-Graduação do IQ-USP

São Paulo

Data do Depósito na SPG:

11 de maio de 2016

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

INSTITUTO DE QUÍMICA

Programa de Pós-Graduação em Química

William Reis de Araujo

**Desenvolvimento de sensores eletroquímicos e
colorimétricos para aplicações em amostras
de interesse forense**

*Tese apresentada ao Instituto de Química da
Universidade de São Paulo para obtenção do
Título de Doutor em Ciências (Química)*

Orientador: Prof. Dr. Thiago Regis Longo Cesar da Paixão

São Paulo

2016

Ficha Catalográfica

Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

Araujo, William Reis de
A663d Desenvolvimento de sensores eletroquímicos e colorimétricos
para aplicações em amostras de interesse forense / William Reis
de Araujo. -- São Paulo, 2016.
209p.

Tese (doutorado) – Instituto de Química da Universidade de
São Paulo. Departamento de Química Fundamental.
Orientador: Paixão, Thiago Regis Longo Cesar da

1. Química eletroanalítica 2. Sensores químicos 3. Colorimetria
4. Eletroquímica 5. Drogas de abuso I. T. II. Paixão, Thiago Regis
Longo Cesar da, orientador.

543.0871 CDD

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA

“Desenvolvimento de sensores eletroquímicos e colorimétricos para aplicações em amostras de interesse forense”

WILLIAM REIS DE ARAUJO

Tese de Doutorado submetida ao Instituto de Química da Universidade de São Paulo como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Doutor em Ciências no Programa de Química.

Aprovado(a) por:

**Prof. Dr. Thiago Regis Longo Cesar da Paixão
(Orientador e Presidente)**

**Prof. Dr. Ivano Gebhardt Rolf Gutz
IQ - USP**

**Prof. Dr. Lucio Angnes
IQ - USP**

**Prof. Dr. Hugo Barbosa Suffredini
UFABC**

**Prof. Dr. Wendell Karlos Tomazelli Coltro
UFG**

**SÃO PAULO
07 de junho de 2016**

Aos meus avós Assis e Maria (In Memoriam) que
contribuíram muito para o meu desenvolvimento
e que infelizmente não puderam contemplar o
final dessa conquista,

Dedico!

Ao Prof. Dr. Thiago Paixão pela oportunidade,
ensinamentos, confiança e amizade proporcionada

durante todos esses anos,

Dedico.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente aos meus pais, Antonio e Cleina, pelo amor, educação, carinho e cuidados durante toda a vida.

Aos meus avós, Assis e Maria, pela educação, amor e preocupações.

Ao professor Thiago Paixão, pela paciência, ensinamentos e convívio.

À Angela Rodrigues, pelo companheirismo e amor dos últimos anos.

Ao professor Joseph Wang pela oportunidade de estágio e aprendizados obtidos, bem como ao seu grupo pela calorosa acolhida.

Aos meus amigos desde a época de graduação (UFABC) e que prezo pela amizade, especialmente, Marcelo, Naomi (Japa), Nilton (Taiwan), Edgar (Ed) e Aleksander (Areks).

Aos amigos de laboratório que acompanharam o desenvolvimento deste projeto, Lígia, Thalita, Luiza, João, Maiara, Cecília, José Ricardo (Zé), Thiago Selva, Gabriela, Mariana, Marina, e aos integrantes mais recentes do L₂ESQ.

À técnica do laboratório, Cristina, pela companhia e aos diversos auxílios durante o desenvolvimento deste trabalho.

Às funcionárias Lúcia e Nívea que sempre foram muito prestativas.

Aos professores que atuaram decisivamente durante minha sólida formação profissional.

Aos colegas do laboratório LSEME, especialmente, Alex, Carla e Gabriel.

Aos colegas do laboratório LAIA, especialmente, Fernando (Fernandinho) e Eric (Pop) pelos auxílios durante o projeto.

Aos demais colegas de pós-graduação pelo convívio e conversas.

Ao IQ-USP e às agências de fomento (CAPES, CNPq e FAPESP), pela infraestrutura oferecida e auxílios financeiros, respectivamente. Agradecimento especial à FAPESP pela bolsa de doutorado (Processo: 2011/19903-5) e bolsa de estágio de pesquisa no exterior (Processo: 2014/00788-0).

RESUMO

Araujo, W.R. Desenvolvimento de sensores eletroquímicos e colorimétricos para aplicações em amostras de interesse forense. 2016. 209p. Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Química. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Esta tese apresenta os estudos e esforços visando ao desenvolvimento de sensores químicos para aplicações diversas na área forense. Foram desenvolvidos métodos eletroanalíticos para detecção e quantificação de alguns compostos comumente encontrados na adulteração de amostras de drogas de abuso (procaína, fenacetina, aminopirina, paracetamol, levamisol), além da cocaína e estudos fundamentais sobre o comportamento eletroquímico desses compostos. Empregaram-se também métodos eletroquímicos para quantificação de compostos tóxicos e perigosos como explosivos (ácido pícrico) e melamina por exemplo. Os trabalhos utilizando sensores eletroquímicos contemplam modificações eletroquímicas das superfícies eletródicas, utilização de sensores com polímeros molecularmente impressos (MIP) e eletrodos descartáveis em papel utilizando diferentes técnicas voltamétricas e amperométricas, eletrodo disco rotatório (EDR) e microbalança de cristal de quartzo.

Além da fabricação de dispositivos analíticos descartáveis em papel empregando detecção eletroquímica utilizou-se também a detecção colorimétrica para quantificação de alguns dos principais adulterantes de amostras de apreensão de cocaína, como procaína e fenacetina, bem como análises e discriminações de compostos explosivos (peroxi e nitro compostos) nessas plataformas portáteis e de baixo custo.

Os métodos foram sempre desenvolvidos visando características como: facilidade, praticidade, baixo custo e portabilidade para análises diretamente no local de medida com mínima infraestrutura laboratorial. Por fim, são apresentados alguns estudos realizados durante estágio de pesquisa no exterior (Universidade da Califórnia - San Diego (UCSD)) na área de *Wearable Sensors*, em que foram desenvolvidos métodos para análises de micronutrientes no suor (zinco) e um metabólito (ácido úrico) na saliva usando sensores aplicados diretamente no corpo humano.

Palavras-chave: Sensores eletroquímicos, sensores colorimétricos, drogas de abuso, dispositivos analíticos em papel, wearable sensors, amostras forenses.

Abstract

Araujo, W.R. Development of electrochemical and colorimetric sensors for application in forensic interest samples. 2016. 209p. PhD Thesis - Graduate Program in Chemistry, Universidade de São Paulo, São Paulo.

This thesis shows studies and efforts to the development of chemical sensors for different applications in the forensic field. Electroanalytical methods were developed for detection and quantification of some compounds (procaine, phenacetin, aminopyrine, acetaminophen, levamisole) commonly found in the drug of abuse adulteration process and cocaine, as well as, fundamental studies about the electrochemical behavior of these compounds. It was also employed electrochemical methods for quantification of hazardous compounds such as explosives (picric acid) and melamine. Analytical methods with electrochemical sensors included electrochemical modification of electrodic surfaces, molecularly imprinted polymers (MIP), and paper disposable electrochemical devices using different voltammetric and amperometric techniques, rotating disc electrode (RDE) and quartz crystal microbalance.

In addition to the fabrication of paper disposable analytical devices with electrochemical detection, it was also used the colorimetric detection to quantify some of the major adulterants in cocaine seizure samples, such as procaine and phenacetin, as well as analysis and discrimination of explosive compounds (peroxy and nitro explosives) in these low cost portable platforms.

All proposed methods were always developed aiming at these characteristics: ease, convenience, low cost and portability for analysis directly at the measurement site with minimal laboratory infrastructure. Finally, we presented some studies conducted during research internship abroad (University of California - San Diego (UCSD)) in the area of Wearable Sensors, which have been developed methods for micronutrient analysis in sweat (Zn) and a metabolite (Uric Acid) in saliva using sensors applied directly to the human body.

Keywords: Electrochemical sensors, colorimetric sensors, drugs of abuse, paper-based analytical devices, wearable sensors, forensic samples.

Sumário

❖	Lista de Figuras.....	38
❖	Lista de Tabelas	49
❖	Introdução geral	26
➤	Drogas ilícitas na sociedade	26
➤	Análises químicas tradicionais de drogas de abuso	26
➤	Análises de adulterantes de drogas de abuso para processo de triagem.....	28
➤	Desenvolvimento de sensores com características portáteis e de baixo custo baseado em plataformas de papel	29
➤	<i>Wearable sensors</i>	36
❖	Objetivos	39
❖	Análise de Cocaína e seus adulterantes por métodos eletroquímicos	40
➤	Detecção e quantificação de creatinina	41
	1. Preâmbulo	41
	2. Materiais e Métodos.....	41
	2.1. Reagentes	42
	2.2. Instrumentação.....	42
	2.3. Análise espectrofotométrica e verificação da exatidão	42
	3. Resultados e discussão	43
➤	Análise de cocaína em amostras de Urina.....	50
	1. Preâmbulo	50
	2. Materiais e métodos	52
	2.1. Reagentes e amostras	52
	2.2. Instrumentação.....	52
	2.3. Análise quimiométrica visando à discriminação das amostras	53
	3. Resultados e discussão	53
➤	Testes de Screening de Cocaína em amostras de urina sintética.....	53
➤	Testes de Screening de drogas de abuso em amostras de urina	55
❖	Detecção eletroquímica dos principais adulterantes de amostras de cocaína	61

➤	Quantificação de Aminopirina em amostras apreendidas	61
1.	Preâmbulo	61
2.	Materiais e métodos	62
2.1.	Reagentes	62
2.2.	Amostras	63
2.3.	Procedimentos eletroquímicos para quantificação de aminopirina.....	63
2.4.	Avaliação da composição das amostras apreendidas e teste de interferência	64
3.	Resultados e Discussão	64
➤	Desenvolvimento de sensor eletroquímico para análise seletiva de fenacetina e paracetamol	70
1.	Preâmbulo	70
2.	Materiais e Métodos.....	71
2.1.	Reagentes	71
2.2.	Formação do NIP (“non-imprinted polymer”).....	72
2.3.	Formação do MIP	72
2.4.	Medidas eletroquímicas	72
3.	Resultados e Discussão	73
➤	Quantificação de Levamisol em amostras de urina sintética	89
1.	Preâmbulo	89
2.	Materiais e Métodos.....	90
2.1.	Reagentes	90
2.2.	Estudos mecanísticos da oxidação do Levamisol	90
2.3.	Quantificação e parâmetros analíticos do método	90
3.	Resultados e Discussão	91
❖	Desenvolvimentos de sensores portáteis e de baixo custo utilizando plataformas de papel	99
❖	Métodos Colorimétricos em substratos de papel para detecção de adulterantes de drogas de abuso.....	100
➤	Desenvolvimento de sensor colorimétrico em papel para detecção de procaína em amostras de cocaína	100
1.	Preâmbulo	100

2. Materiais e Métodos.....	101
2.1. Reagentes	101
2.2. Fabricação dos sensores em papel	101
2.3. Análise colorimétrica	102
2.4. Estudo de interferência	102
2.5. Tratamento eletroquímico das amostras	103
2.6. Fabricação do dispositivo em papel integrando o pré-tratamento eletroquímico	103
➤ Desenvolvimento de sensor colorimétrico em papel para detecção de fenacetina.....	115
1. Preâmbulo	115
2. Materiais e Métodos.....	116
2.1. Reagentes	116
2.2. Avaliação da metodologia espectrofotométrica.....	116
2.3. Fabricação dos sensores em papel (spot test).....	117
2.4. Obtenção das imagens e padrões de cores como resposta analítica.....	118
3. Resultados e Discussão	119
➤ Fabricação de sensores eletroquímicos em papel para aplicações analíticas.	126
1. Preâmbulo	126
2. Materiais e Métodos.....	127
2.1. Reagentes	127
2.2. Fabricação e design do dispositivo eletroquímico em papel.....	128
2.3 Análises eletroquímicas	128
3. Resultados e Discussão	128
❖ Análise de compostos perigosos e/ou intoxicantes	136
➤ Detecção de explosivos.....	137
1. Preâmbulo	137
➤ Detecção eletroquímica de ácido pícrico	138
2. Materiais e Métodos.....	138
2.1. Reagentes	138
2.2. Instrumentação.....	138

3. Resultados e Discussão	139
➤ Análise colorimétrica para detecção de ácido pícrico	146
➤ Discriminação colorimétrica de explosivos	150
1. Preâmbulo	150
2. Materiais e Métodos.....	151
2.1. Reagentes	151
2.2. Sensor Colorimétrico	152
2.3. Suporte para o smartphone.....	153
3. Resultados e discussão	153
➤ Detecção de composto intoxicante (melamina)	155
1. Preâmbulo	155
2. Materiais e Métodos.....	156
2.1. Reagentes	156
2. 2. Análises eletroquímicas	156
3. Resultados e discussão	157
❖ <i>Wearable Sensors</i>	165
1. Preâmbulo	166
➤ Detecção de Zn^{2+} em suor com sensor eletroquímico tipo tatuagem	166
2. Materiais e Métodos.....	167
2.1. Reagentes e Instrumentação.....	167
2.2. Fabricação dos sensores tipo tatuagem temporária.....	167
2.3. Avaliação <i>in-vitro</i> do sensor tipo tatuagem	168
2.4. Testes do sensor sobre o corpo	168
3. Resultados e discussão	169
➤ Detecção de ácido úrico em saliva	174
1. Preâmbulo	174
2. Materiais e Métodos.....	175
2.1. Reagentes e instrumentação	175
2.2. Fabricação e modificação química do biossensor no protetor bucal.....	175

2.3. Avaliação eletroquímica em saliva artificial.....	177
2.4. Avaliação eletroquímica em saliva humana não diluída.....	177
2.5. Monitoramento do ácido urico salivar em paciente hiperuricêmico sobre tratamento ...	178
3. Resultados e Discussão	178
❖ Conclusões Finais	185
❖ Perspectivas Futuras.....	186
❖ Referências bibliográficas.....	187
❖ Súmula Curricular	203
❖ Anexos	210

Lista de Figuras

Figura 1 - Esquema das etapas de produção de dispositivos em papel utilizando a técnica fotolitográfica. Retirado com autorização do trabalho de Martinez e colaboradores [25].	33
Figura 2 - Esquema de produção de dispositivos em papel via técnica de wax printing. Retirado com autorização do trabalho de Lu e colaboradores [58].	34
Figura 3 - Ilustração de um sistema de monitoramento remoto com base em <i>wearable sensors</i> . Informações relacionadas à saúde são obtidas por meio de sensores sem fios junto ao corpo e transmitido para o cuidador/responsável através de um portal de informação, como um telefone móvel. O médico pode usar esta informação para implementar intervenções, conforme necessário. Imagem obtida do trabalho de Patel e colaboradores [63].	37
Figura 4 – Imagens típicas para 3 sensores eletroanalíticos do tipo <i>wearable sensors</i> (tatuagens temporárias) para monitoramento de metabólitos excretados pela pele (suor), ou para análises ambientais. Imagens retirada com autorização dos trabalhos do grupo do Prof. J. Wang [61, 64, 65].	38
Figura 5- Esquema da reação de Jaffé	43
Figura 6 - Voltamogramas cíclicos obtidos/registrados com um eletrodo de carbono vítreo, na ausência (linhas tracejadas) e na presença (linhas cheias) de 1 mmol L ⁻¹ de ácido pícrico. Os eletrólitos utilizados foram: 0,1 mol L ⁻¹ de tampão Britton-Robinson (pH 3,1) (A), 0,1 mol L ⁻¹ de tampão de acetato (pH 4,6) (B), 0,1 mol L ⁻¹ de tampão fosfato (pH 7,2) (C), 0,1 mol L ⁻¹ de tampão de borato (pH 9,1) (D), 0,1 mol L ⁻¹ de NaOH (pH 13) (E). Velocidade de varredura: 50 mV s ⁻¹ .	44
Figura 7- Os voltamogramas cíclicos registrados com eletrodo de carbono vítreo, na presença de 0,1 mol L ⁻¹ de NaOH (linha cheia), 1 mmol L ⁻¹ picrato (pH 13) (linha a tracejado ponto), 1 mmol de creatinina L ⁻¹ (pH 13) (linha a tracejado) 1 mmol L ⁻¹ de picrato e 1 mmol de creatinina L ⁻¹ (pH 13) (linha pontilhada). V= 50 mV s ⁻¹ . Tempo de reação: 10 minutos a 27°C.	45
Figura 8 – Dependência dos parâmetros de amplitude e passo do potencial da técnica de voltametria de pulso diferencial para quantificação de creatinina. (A) dependência da corrente com a amplitude, passo de potencial mantido em 0,02 V. (B) dependência da corrente com o passo de potencial, amplitude mantida em 0,05 V. Os experimentos foram realizados em uma solução contendo 2 mmol L ⁻¹ de picrato (pH 13).	46
Figura 9 - Otimização das condições de reação entre o picrato e creatinina. Voltamogramas de pulso diferenciais registrados com um eletrodo de carbono vítreo, na presença de 1 mmol L ⁻¹ de picrato e 1 mmol L ⁻¹ de creatinina (pH 13). Tempo de reação a 27°C: (a) 0, (b) 3, (c) 12, (d) 32, (e) 50, (f) 63, (g) 103, (h) 121 min. Parâmetros: passo: 0,01 V, amplitude: 0,05 V. Ao lado, gráfico de otimização do tempo. Os valores de corrente de pico foram obtidos a partir de voltamogramas de pulso diferencial com um eletrodo de carbono vítreo, na presença	

de 1 mmol L⁻¹ de picrato e 1 mmol L⁻¹ de creatinina (pH 13). Temperaturas utilizadas na reação: (■) 27, (▲) 3 e (●) 51 ° C.47

Figura 10 - Voltamogramas de pulso diferencial registrados com um eletrodo de carbono vítreo, na presença de 100 µmol L⁻¹ de picrato (pH 13) e 0 µmol L⁻¹ (A) 1 µmol L⁻¹ (B) 5 µmol L⁻¹ (C) 10 µmol L⁻¹ (D) 15 µmol L⁻¹ (E) 30 µmol L⁻¹ (F) 40 µmol L⁻¹ (G) 60 µmol L⁻¹ (H) 80 µmol L⁻¹ de creatinina (I). Parâmetros: passo de 0,02V, amplitude de 0,1V. Curva analítica obtida a partir dos valores de pico de corrente dos voltamogramas de pulso diferencial a 27°C e 100 min.48

Figura 11 – Voltamogramas cíclicos registrados em eletrodo de carbono vítreo em quatro urinas sintéticas na presença (linha cheia) e ausência (linha tracejada) de cocaína 15 g L⁻¹. Velocidade de varredura de 50 mV s⁻¹.54

Figura 12 - Gráfico de escores reportando a discriminação de amostras de urina sintética com e sem a presença de cocaína. Dados de corrente obtidos com eletrodo de Carbono vítreo.55

Figura 13 - Voltamogramas cíclicos registrados com eletrodo de carbono vítreo em meio de tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ (pH = 7,0) contendo urinas de: A e B usuários de drogas com teste positivo para THC nas concentrações de 10,5 µg L⁻¹ e 86 µg L⁻¹ do metabólito, respectivamente, C e D usuários de drogas com teste positivo para benzoilecgonina com concentrações de 4,29 mg L⁻¹ e 0,88 mg L⁻¹ do metabólito, respectivamente; X indivíduo não usuário de droga de abuso. Velocidade de varredura de 50 mV s⁻¹.56

Figura 14 - Gráfico de escores reportando a discriminação de amostras de urina contendo metabólitos de drogas de abuso. Dados entrada do algoritmo: valores de corrente obtidos com eletrodo de carbono vítreo da Figura 13.57

Figura 15- Voltamogramas cíclicos registrados com eletrodo de carbono vítreo em meio de tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ (pH = 7,0) contendo amostra de urina do indivíduo não usuário (X) sem (linha tracejada) e com (linha cheia) a adição de ácido ascórbico 3 g L⁻¹.58

Figura 16 - Gráfico de escores reportando a discriminação de amostras de urinas de usuários de drogas (amostras CONTRAPROVA) (círculos pretos) e de indivíduos não usuários (círculos vermelhos). Dados de entrada do algoritmo: valores de corrente obtidos com eletrodo de carbono vítreo.59

Figura 17- Gráfico de escores reportando a discriminação de amostras de urinas de usuários de drogas (amostras CONTRAPROVA) e de indivíduos não usuários, bem como a adulteração de duas amostras de urinas de não usuárias com a amostra de um indivíduo usuário (C). Legendas dos caracteres encontram-se inseridos ao lado da Figura. Dados de corrente obtidos com eletrodo de carbono vítreo foram utilizados como dados de entrada do algoritmo.60

Figura 18 – Voltamogramas cíclicos registrados em 0,1 mol L⁻¹ de tampão fosfato (pH = 7,4) na ausência (--) e presença (-) de 2 mmol L⁻¹ de aminopirina. Eletrodos utilizados: (A) platina, (B) ouro e (C) carbono vítreo (GC). Velocidade de varredura de 50 mV s⁻¹.65

Figura 19 - Voltamogramas cíclicos registrados utilizando eletrodo de platina na ausência (--) e presença (-) de 2 mmol L⁻¹ de aminopirina. Eletrólitos utilizados: (A) solução 0,2 mol L⁻¹

de ácido sulfurico (pH = 0,8), (B) 0,1 mol L⁻¹ de tampão acetato (pH = 4,6), (C) 0,1 mol L⁻¹ de tampão fosfato (pH = 7,4) e (D) solução 0,1 mol L⁻¹ de NaOH (pH = 13). Velocidade de varredura de 50 mV s⁻¹.66

Figura 20 - Voltamogramas cíclicos registrados em solução de 0,1 mol L⁻¹ de tampão fosfato contendo 2 mmol L⁻¹ de aminopirina usando eletrodo de platina rotativo em diferentes velocidades de rotação: (a) 100 rpm, (b) 400 rpm, (c) 900 rpm, (d) 1600 rpm, (e) 2500 rpm, (f) 3600 rpm, (g) 4900 rpm, and (h) 6400 rpm. Velocidade de varredura de 20 mV s⁻¹. Em destaque encontra-se o gráfico de Levich (corrente limite em função da raiz quadrada da velocidade de rotação) para ambos os processos da aminopirina. Destaca-se que os valores de corrente do processo A2 foram descontados pelo valor de corrente referente ao processo A1 para construção do gráfico.67

Figura 21 - Esquema do mecanismo proposto para o processo de oxidação eletroquímica da aminopirina.68

Figura 22 - (A) Voltamogramas de onda quadrada registrados para adições sucessivas de aminopirina em meio de tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ (pH 7,4) utilizando eletrodo de platina. Concentrações estudadas: 100 a 1000 µmol L⁻¹. Parâmetros da técnica: step de 4 mV, amplitude de 50 mV e frequência de 120 Hz. (B) Curva de calibração para oxidação da aminopirina.69

Figura 23 - Esquema do processo de fabricação de sensor molecularmente impresso.71

Figura 24 – Voltamogramas cíclicos registrados com eletrodo de carbono vítreo na presença (-) e ausência (--) de 25 mmol L⁻¹ de fenacetina (A), 25 mmol L⁻¹ de paracetamol (B), 25 mmol L⁻¹ de benzocaína (C) e 25 mmol L⁻¹ de procaína (D). Eletrólito suporte: etanol/água 1:1 (v/v) com ácido perclórico 0,1 mol L⁻¹. Velocidade de varredura de 50 mV s⁻¹.74

Figura 25 - Esquema das reações envolvidas na oxidação da fenacetina (A) etanol (C) e N-acetil-p-benzoquinonaimina ou NAPQI (D), passando por um intermediário (B). Redução de NAPQI (D) a paracetamol (E) e transformação química desse a p-benzoquinona (H) passando por dois intermediários (F e G). Adaptado de *Bussy* e colaboradores [106].75

Figura 26 - Voltamogramas cíclicos registrados com eletrodo de carbono vítreo durante a polimerização em solução de 25 mmol L⁻¹ de pirrol e 12,5 mmol L⁻¹ de fenacetina. Eletrólito suporte: etanol/água 1:1 (v/v) com ácido perclórico 0,1 mol L⁻¹. Velocidade de varredura de 50 mV s⁻¹.76

Figura 27 - Voltamogramas cíclicos registrados com eletrodo de carbono vítreo modificado com MIP + fenacetina nas cavidades poliméricas em eletrólito suporte contendo 1 mol L⁻¹ de NaNO₃. Eletrólito suporte: etanol/água 1:1 (v/v) com ácido perclórico 0,1 mol L⁻¹. Velocidade de varredura de 50 mV s⁻¹.77

Figura 28 – Esquema ilustrativo em 2D da formação do MIP em (A) e a estrutura após a remoção da fenacetina.78

Figura 29 – Voltamogramas cíclicos registrados consecutivamente (n = 15 ciclos) com MIP na presença de 25 mmol L⁻¹ de fenacetina em meio de etanol/água 1:1 (v/v) + ácido

perclórico 0,1 mol L ⁻¹ após a remoção das moléculas de fenacetina do interior da matriz polimérica. Velocidade de varredura de 50 mV s ⁻¹	78
Figura 30 - Voltamogramas cíclicos registrados com MIP na presença de 25 mmol L ⁻¹ de fenacetina (primeiro ciclo (--) e 15º ciclo (-)) em meio de etanol/água 1:1 (v/v) com ácido perclórico 0,1 mol L ⁻¹ . Velocidade de varredura de 50 mVs ⁻¹	79
Figura 31- Reação redox da p-benzoquinona (H) e hidroxiquinona (I).....	80
Figura 32 - Voltamogramas cíclicos registrados com eletrodo de carbono vítreo modificado com MIP de pirrol em solução de (A) água:etanol (1:1) contendo HClO ₄ 0,1 mol L ⁻¹ , (B) água:etanol (1:1) contendo NaClO ₄ 0,1 mol L ⁻¹ , (C) água:acetonitrila (1:1) contendo perclorato tetrabutylamônio 0,05 mol L ⁻¹ e (D) água:acetona (1:1) contendo HClO ₄ 0,1 mol L ⁻¹ , na ausência (linhas tracejadas) e presença de fenacetina 25 mmol L ⁻¹ (linhas cheias). Janela de potencial: de -1,0 a 1,8 V. Velocidade de varredura: 50 mV s ⁻¹	81
Figura 33- Voltamogramas cíclicos registrados com eletrodo de carbono vítreo modificado com NIP de pirrol em solução de água:etanol (1:1) contendo HClO ₄ 0,1 mol L ⁻¹ na ausência (linhas tracejadas) e presença de fenacetina 25 mmol L ⁻¹ (linhas cheias). Janela de potencial: de -1,0 a 1,8 V. Velocidade de varredura: 50 mV s ⁻¹	83
Figura 34 - Voltamogramas cíclicos registrados com eletrodo de carbono vítreo modificado com MIP de pirrol em solução de água:etanol (1:1) contendo HClO ₄ 0,1 mol L ⁻¹ na ausência (linhas pretas) e presença de fenacetina 25 mmol L ⁻¹ (linhas vermelhas). Soluções modificantes: (A) pirrol 12,5 mmol L ⁻¹ e fenacetina 25 mmol L ⁻¹ ; (B) pirrol 12,5 mmol L ⁻¹ e fenacetina 12,5 mmol L ⁻¹ ; (C) (A) pirrol 12,5 mmol L ⁻¹ e fenacetina 6,25 mmol L ⁻¹ . Janela de potencial: de -1,0 a 1,8 V. Velocidade de varredura: 50 mV s ⁻¹	84
Figura 35- (A) Voltamogramas cíclicos registrados com MIP contendo cavidades de fenacetina na presença de 25 mmol L ⁻¹ de benzocaína, (B) voltamogramas comparando o sinal de 25 mmol L ⁻¹ de benzocaína para eletrodo limpo e o utilizando o eletrodo modificado com MIP contendo cavidades de fenacetina. Eletrólito de suporte: etanol/água 1:1 (v/v) com ácido perclórico 0,1 mol L ⁻¹ . Velocidade de varredura de 50 mV s ⁻¹	85
Figura 36- Esquema mostrando a especificidade do MIP pela fenacetina em (A) e a possível entrada de benzocaína pelo filme (B).	86
Figura 37- Voltamogramas cíclicos obtidos com eletrodo de carbono vítreo modificado com MIP de pirrol em solução de água:etanol (1:1) contendo HClO ₄ 0,1 mol L ⁻¹ na ausência (linhas tracejadas) e presença de (A) procaína 25 mmol L ⁻¹ ou (B) paracetamol 25 mmol L ⁻¹ (linhas cheias). Velocidade de varredura: 50 mV s ⁻¹	87
Figura 38 - 15º Voltamogramas cíclicos obtidos com eletrodo de carbono vítreo modificado com MIP de pirrol em solução de água:etanol (1:1) contendo HClO ₄ 0,1 mol L ⁻¹ na presença de fenacetina 25 mmol L ⁻¹ (Linhas tracejadas) ou com a mistura de (A) fenacetina 25 mmol L ⁻¹ e procaína 25 mmol L ⁻¹ ou (B) fenacetina 25 mmol L ⁻¹ e paracetamol 25 mmol L ⁻¹ (linhas cheias). Velocidade de varredura: 50 mV s ⁻¹	88
Figura 39 - Voltamogramas cíclicos registrados em solução 0,1 mol L ⁻¹ de NaOH na ausência (-) e presença (-) de 1 mmol L ⁻¹ de levamisol. Eletrodos utilizados: (A) cobre, (B)	

carbono vítreo, (C) platina, (D) ouro e (E) DDB pré-tratado catodicamente. Velocidade de varredura de 100 mV s ⁻¹ .	91
Figura 40- Voltamogramas de onda quadrada registrados utilizando eletrodo de DDB pré-tratado catodicamente para solução de 100 µmol L ⁻¹ de levamisol em diferentes pHs: ácido sulfúrico 0,5 mol L ⁻¹ (pH = 0,35), tampão fosfato 0,1 mol L ⁻¹ (pH = 3,0), tampão acetato 0,1 mol L ⁻¹ (pH = 5,0), tampão fosfato 0,1 mol L ⁻¹ (pH = 7,0), tampão borato 0,1 mol L ⁻¹ (pH = 9,0) e solução NaOH 0,1 mol L ⁻¹ (pH = 12,5). Parâmetros: passo de potencial de 10 mV, amplitude de 50 mV e frequência de 100 Hz.	92
Figura 41 – Gráfico da dependência do potencial de pico (E _P) em função do pH para o processo de oxidação do levamisol.	93
Figura 42 – Espectros de massas obtidos da solução padrão de 50 µmol L ⁻¹ de levamisol em diferentes tempos de eletrólise da solução (0 a 5 horas submetidos a potencial de 1,5 V).	94
Figura 43 - Espectro de massas obtido após 5 horas de eletrólise de uma solução padrão de levamisol 50 µmol L ⁻¹ (potencial aplicado de 1,5 V).	95
Figura 44 - Esquema proposto para o mecanismo de oxidação do levamisol.	96
Figura 45- Voltamogramas de onda quadrada registrados utilizando eletrodo de DDB em solução de NaOH 0,1 mol L ⁻¹ para concentrações de levamisol na faixa de 0,5 - 151 µmol L ⁻¹ sob as melhores condições analíticas. Parâmetros: passo de potencial de 10 mV, amplitude de 50 mV e frequência de 100 Hz. Em destaque encontra-se inserida a respectiva curva analítica.	98
Figura 46 - Representação esquemática da diazotização da procaína e acoplamento com o ácido cromotrópico para formar o composto colorido.	104
Figura 47- A) Foto do teste colorimétrico para diferentes concentrações de procaína: 0,01 mmol L ⁻¹ (A), 0,05 mmol L ⁻¹ (B), 0,1 mmol L ⁻¹ (C) e 0,2 mmol L ⁻¹ (D). B) Espectros de absorção das soluções em (A).	105
Figura 48- A) Fotografia das respostas colorimétricas da procaína, em triplicata, em diferentes concentrações de nitrito de sódio na faixa de 0 a 1 mmol L ⁻¹ . Concentrações dos reagentes: procaína 0,05 mmol L ⁻¹ , HCl 0,1 mol L ⁻¹ , NaOH 0,1 mol L ⁻¹ e CTA 2 mg L ⁻¹ . B) Gráfico reportando a intensidade relativa para as diferentes concentrações de nitrito de sódio.	106
Figura 49- A) Fotografia da resposta colorimétrica da procaína, em triplicata, em diferentes concentrações de HCl na faixa de 0,025 a 0,4 mol L ⁻¹ . Concentrações dos reagentes: procaína 0,05 mmol L ⁻¹ , NaNO ₂ 0,8 mmol L ⁻¹ , NaOH 0,1 mol L ⁻¹ e CTA 2 mg L ⁻¹ . B) Gráfico reportando a intensidade relativa para as diferentes concentrações de HCl.	106
Figura 50 - A) Fotografia das respostas colorimétricas da procaína, em triplicata, em diferentes concentrações de CTA na faixa de 0,1 a 2 mg L ⁻¹ . Concentrações dos reagentes: procaína 0,05 mmol L ⁻¹ , NaNO ₂ 0,8 mmol L ⁻¹ , NaOH 0,1 mol L ⁻¹ e HCl 0,1	

mol L ⁻¹ . B) Gráfico reportando a intensidade relativa para as diferentes concentrações de CTA.	107
Figura 51- A) Fotografia das respostas colorimétricas da procaína, em triplicata, em diferentes concentrações de NaOH na faixa de 0,025 and 0,4 mol L ⁻¹ . Concentrações dos reagentes: procaína 0,05 mmol L ⁻¹ , NaNO ₂ 0,8 mmol L ⁻¹ , CTA 2 mg L ⁻¹ e HCl 0,1 mol L ⁻¹ . B) Gráfico reportando a intensidade relativa para as diferentes concentrações de NaOH.....	108
Figura 52- A) Fotografia da resposta colorimétrica da procaína, em triplicata, em diferentes diâmetros de spot (1-6 mm). Concentrações dos reagentes: procaína 0,05 mmol L ⁻¹ , NaNO ₂ 0,8 mmol L ⁻¹ , CTA 2 mg L ⁻¹ , NaOH 0,2 mol L ⁻¹ e HCl 0,1 mol L ⁻¹ . B) Gráfico reportando a intensidade relativa para os diferentes diâmetros de spot test.	109
Figura 53 - Fotografia das respostas colorimétricas da procaína, em triplicata, em diferentes concentrações da mesma (0 a 0,4 mmol L ⁻¹). B) Curva analítica obtida das intensidades relativas para as diferentes concentrações de procaína.	109
Figura 54- A) Fotografia das respostas colorimétricas em triplicata para procaína (Pro), benzocaína (Ben), lidocaína (Lid), cafeína (Caf), aminopirina (Amp), fenacetina (Fen), levamisol (Lev), e paracetamol (Par) na concentração de 0,05 mmol L ⁻¹ B) Teste de interferência de cada adulterante na presença de procaína. C) Gráfico da intensidade relativa de cor para interferência de cada adulterante individualmente e as correspondentes misturas binárias.	110
Figura 55- A) Fotografia das respostas colorimétricas em triplicata para procaína e benzocaína, não tratadas e tratadas eletroquimicamente na concentração de 0,05 mmol L ⁻¹ sob as melhores condições analíticas. B) Gráfico da intensidade relativa de cor para as amostras não tratadas e tratadas eletroquimicamente.....	111
Figura 56 - Esquema da fabricação do dispositivo de análise proposto para integração eletroquímica e colorimetria.	112
Figura 57- Representação esquemática do procedimento para análise de procaína usando o dispositivo em papel integrando pré-tratamento eletroquímico.....	113
Figura 58 - Código de barras bidimensional (QR code) para os vídeos registrados de experimentos reais com (A) procaína e (B) benzocaína 0,1 mmol L ⁻¹ utilizando o dispositivo em papel integrando todas as etapas para análise.....	113
Figura 59- Representação esquemática da construção e uso do dispositivo no papel.	117
Figura 60- Imagem real do suporte para iPhone 4S e sua câmara para obtenção de imagens em condições constantes de iluminação. A) Vista da câmara em perspectiva, B) imagem inferior da câmara com iluminação por leds, C) imagem lateral da mesma. Maiores informações sob a confecção e uso podem ser obtidas no trabalho prévio do grupo de pesquisa [34].	118
Figura 61 - Esquema reacional adaptado de [110].....	119

Figura 62 - A) Espectros de absorção para o composto formado durante a reação entre fenacetina hidrolisada em diferentes concentrações (12, 24, 36 e 48 mg L ⁻¹) e solução aquosa 0,02% de NQS.	120
Figura 63 - Fotografia das respostas colorimétricas da fenacetina, em triplicata, em diferentes concentrações de NQS na faixa de 0,005 a 0,1% m/m. Concentrações dos reagentes: fenacetina 0,29 mmol L ⁻¹ , CTAB 2,5 mmol L ⁻¹ , NaOH 0,68 mol L ⁻¹ . B) Gráfico reportando a porcentagem de magenta para as diferentes concentrações de NaOH.	121
Figura 64 - A) Fotografia das respostas colorimétricas da fenacetina, em triplicata, em diferentes concentrações de NaOH na faixa de 0,19 a 0,85 mol L ⁻¹ . Concentrações dos reagentes: NQS 0,1% m/m, fenacetina 0,5 mmol L ⁻¹ , CTAB 2,5 mmol L ⁻¹ . B) Gráfico reportando a porcentagem de magenta para as diferentes concentrações de NaOH.	122
Figura 65 - A) Fotografia das respostas colorimétricas da fenacetina, em triplicata, em diferentes concentrações de CTAB na faixa de 0,62 a 2,5 mmol L ⁻¹ . Concentrações dos reagentes: NQS 0,1% m/m, fenacetina 0,5 mmol L ⁻¹ e NaOH 0,68 mol L ⁻¹ . B) Gráfico reportando a porcentagem de magenta para as diferentes concentrações de CTAB.	123
Figura 66-A) Fotografia da resposta colorimétrica da fenacetina, em triplicata, em diferentes diâmetros de spot (0,45 - 0,9 cm). Concentrações dos reagentes: NQS 0,1% m/m, fenacetina 0,5 mmol L ⁻¹ , CTAB 1,87 mmol L ⁻¹ , NaOH 0,68 mol L ⁻¹ . B) Gráfico reportando a porcentagem de magenta para os diferentes diâmetros de spot test.	124
Figura 67 - A) Fotografia das respostas colorimétricas da fenacetina, em triplicata, em diferentes concentrações da mesma (0,07 a 0,73 mmol L ⁻¹) sob os melhores parâmetros analíticos obtidos para o método. B) Curva analítica obtida utilizando porcentagem de magenta para as diferentes concentrações de fenacetina.	124
Figura 68- A) Fotografia das respostas colorimétricas em triplicata para fenacetina (Fen), benzocaína (Ben), lidocaína (Lid), cafeína (Caf), aminopirina (Amp), procaína (Pro), e paracetamol (Par) na concentração de 0,2 mmol L ⁻¹ e para misturas binárias destes com a fenacetina B) Gráfico de % de magenta para interferência de cada adulterante individualmente e as correspondentes misturas.	125
Figura 69 – Etapas envolvidas na fabricação do sistema eletroquímico em papel utilizando a tecnologia “silk-screen” (A), layout do sistema desenvolvido (B) e uma imagem real do dispositivo final (C), onde RE= eletrodo de referência, WE = eletrodo de trabalho e CE = contra eletrodo.	129
Figura 70 – (A) Voltamogramas cíclicos registrados em solução de 5 mmol L ⁻¹ de cloreto de hexaminrutênio em tampão acetato pH 4,7 utilizando um único sistema eletroquímico em papel para diferentes velocidades de varredura: 10, 30, 50, 100, 200, 300, and 500 mV s ⁻¹ . Volume de solução: 200µL. Em (B) gráfico relacionando os valores de corrente de pico com a raiz quadrada da velocidade de varredura.	130
Figura 71 - (A) Voltamogramas cíclicos registrados em um único sensor em papel na presença (linha vermelha) e ausência (linha preta) de 5 mmol L ⁻¹ de ácido pícrico.	

Velocidade de varredura de 100 mV s^{-1} . Em (B) Voltamogramas de pulso diferencial registrados para diferentes concentrações de ácido pícrico: 0,2 a $1,1 \text{ mmol L}^{-1}$. Volume de solução: $200 \mu\text{L}$. Parâmetros: passo de potencial de $0,03 \text{ V}$ e amplitude de $0,05 \text{ V}$. Eletrólito suporte: tampão acetato $\text{pH} = 4,7$ 131

Figura 72 - Voltamogramas cíclicos registrados utilizando um único sensor em papel para diferentes concentrações de cloreto: 38 a $500 \mu\text{mol L}^{-1}$. Volume de solução: $200 \mu\text{L}$. Eletrólito suporte: solução de ácido sulfúrico $0,5 \text{ mol L}^{-1}$. Velocidade de varredura de 50 mV s^{-1} 132

Figura 73 - Voltamogramas de onda quadrada registrados com 2 sistemas eletroquímicos em papel (as 4 primeiras análises registradas utilizando 1 dispositivo e as 3 últimas com um segundo dispositivo eletroquímico) em solução de tampão acetato $\text{pH} 4,7$ para adições sucessivas de $10 \mu\text{L}$ de solução estoque de nitrato de chumbo. Concentração final: $9 - 48 \mu\text{mol L}^{-1}$. Parâmetros: frequência de 20 Hz , amplitude de 10 mV e passo de potencial de 10 mV . Deposição por 20 s a -1 V 133

Figura 74- Voltamogramas cíclicos registrados em uma solução tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ ($\text{pH} = 7,4$), na ausência (linha a tracejado) e na presença (linha cheia), de 5 mmol L^{-1} de ácido pícrico. Eletrodos de trabalho utilizados: (A) ouro ($r = 0,78 \text{ milímetros}$), (B) bismuto ($r = 0,33 \text{ milímetros}$), (C) carbono vítreo ($r = 0,71 \text{ milímetros}$), (D) cobre ($r = 1,02 \text{ milímetros}$) e (E) platina ($r = 0,76 \text{ milímetros}$). Velocidade de varredura de 50 mV s^{-1} 139

Figura 75 - Voltamogramas cíclicos registrados com eletrodo de cobre, na ausência (linha tracejada) e na presença (linha cheia), de 5 mmol L^{-1} de ácido pícrico. Os eletrólitos utilizados: (A) sulfato de sódio (pH ajustado para $2,2$ com H_2SO_4), (B) tampão acetato ($\text{pH} = 4,7$), (C) tampão fosfato ($\text{pH} = 7,4$), (D) tampão borato ($\text{pH} = 9,1$) e (E) solução de NaOH ($\text{pH} = 13$), todas as soluções a $0,1 \text{ mol L}^{-1}$. Velocidade de varredura de 50 mVs^{-1} 141

Figura 76- Voltamograma hidrodinâmico em FIA utilizando eletrodo de cobre obtido após injeções de solução 1 mmol L^{-1} de ácido pícrico. Vazão: 2 mL min^{-1} , volume de amostra: $75 \mu\text{L}$ e solução transportadora: $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de tampão fosfato ($\text{pH} = 7,4$). 143

Figura 77- (A) Valores de corrente de pico registradas em função da vazão para injeções de solução de $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de tampão fosfato ($\text{pH} = 7,4$) com 1 mmol L^{-1} de ácido pícrico. Potencial: $-0,9 \text{ V}$, volume da amostra de $75 \mu\text{L}$. (B) Valores de corrente de pico registradas em função do volume de amostra injetado ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de solução tampão fosfato ($\text{pH} = 7,4$) com 1 mmol L^{-1} de ácido pícrico). Potencial: $-0,9 \text{ V}$, vazão: 4 mL min^{-1} . Solução transportadora $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de solução tampão fosfato ($\text{pH} = 7,4$). 144

Figura 78- Fiagrama obtido para injeções de soluções com diferentes concentrações de ácido pícrico: 20 (a), 40 (b), 60 (c), 100 (d), 300 (e) e $500 \mu\text{mol L}^{-1}$. Detalhe: curva de calibração analítica. Potencial: $-0,9 \text{ V}$, vazão: 4 mL min^{-1} , volume de amostra: $75 \mu\text{L}$ e solução transportadora: $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de solução tampão fosfato ($\text{pH} = 7,4$). 145

Figura 79- Voltamogramas cíclicos registrados em solução $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de tampão fosfato ($\text{pH} = 7,4$), na ausência (linha tracejada) e na presença (linha cheia), de 5 mmol L^{-1} de ácido pícrico. Velocidade de varredura de 50 mV s^{-1} . Volume da amostra: $300 \mu\text{L}$ 146

Figura 80– Análise colorimétrica em papel de ácido pícrico com base na reação de Jaffé. A primeira linha de spots corresponde ao branco analítico, ou seja, só solução de creatinina $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ e na segunda linha é mostrado o efeito do aumento do volume das soluções de ácido pícrico e creatinina em meio alcalino ($\text{NaOH } 0,1 \text{ mol L}^{-1}$), ambos em concentração de $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (de 1 a $10 \mu\text{L}$ da direita para a esquerda). Tamanho do *Spot* de reação: $d = 1 \text{ cm}$ 147

Figura 81 - Análise colorimétrica em papel de ácido pícrico com base na reação de Jaffé. A primeira linha de spots corresponde ao branco analítico, ou seja, só solução de creatinina em meio básico pH 13 ($16 \mu\text{L}$ de cada concentração avaliada: 5, 10, 20, 30, 50, 80 e 100 mmol L^{-1}) e na segunda linha ilustra o efeito da adição de $8 \mu\text{L}$ de ácido pícrico $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ e $8 \mu\text{L}$ de cada uma das concentrações de creatinina (da direita para a esquerda, respectivamente). Tamanho do *Spot* de reação: $d = 1 \text{ cm}$ 148

Figura 82– Análise de ácido pícrico em duplicata por teste colorimétrico em papel. Soluções de creatinina $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ em pH 13 e concentrações de ácido pícrico avaliadas foram: 0,3, 0,5, 0,8, 1, 2 e 3 mmol L^{-1} (da direita para a esquerda, respectivamente). Os spots das três primeiras colunas representam o branco (creatinina $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ em pH 13). Volume adicionado de cada solução: $8 \mu\text{L}$ e diâmetro do spot de 1 cm 148

Figura 83– Curva de calibração para análise de ácido pícrico por teste colorimétrico em papel. Soluções de creatinina $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ em pH 13 e concentrações de ácido pícrico avaliadas foram: 0,3, 0,5, 0,8, 1, 2 e 3 mmol L^{-1} . Ao lado encontra-se o gráfico linearizado. 149

Figura 84- Representação esquemática das etapas de construção, processo de medida para extração e análise dos valores do padrão RGB para a discriminação dos explosivos. 153

Figura 85– A) Sinais colorimétricos para as cinco amostras de explosivos utilizando três reagentes diferentes: 1 - Creatinina, 2 - KI / H^+ , 3 - anilina. Gráfico de escores (PCA) mostrando a separação dos 5 diferentes grupos (amostras de explosivos). 154

Figura 86- curva de calibração obtida para os explosivos usando a distância euclidiana (ED) dos valores RGB contra a massa. 155

Figura 87– Voltamogramas cíclicos registrados com eletrodo de cobre com (-) e sem (--) a adição de melamina ($0,5 \text{ mmol L}^{-1}$) para diferentes meios: (1) ácido sulfúrico $0,25 \text{ mol L}^{-1}$, (2) tampão acetato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 4,6, (3) tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ em pH 7,4, (4) tampão borato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ e pH 9,1 e (5) solução de $\text{NaOH } 1 \text{ mol L}^{-1}$. A coluna A apresenta meio sem adição de cloreto e na coluna B foi adicionado $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de cloreto no eletrólito suporte. Velocidade de varredura: 100 mV s^{-1} 158

Figura 88– Voltamogramas cíclicos utilizando eletrodo de cobre para meios sem (--) e com 1 mmol L^{-1} de melamina (-) em solução de ácido sulfúrico $0,25 \text{ mol L}^{-1}$ com adição de 10 mmol L^{-1} de cloreto (A), $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de cloreto (B) e 1 mol L^{-1} de cloreto (C). Velocidade de varredura: 100 mV s^{-1} 159

Figura 89 – A) Voltamogramas cíclicos registrados utilizando cristal piezoelétrico de quartzo com cobre eletrodepositado em a superfície de ouro em uma solução sem (--) e com a adição de melamina (concentração final: 1 mmol L^{-1}) (-). Eletrólito de suporte: ácido sulfúrico $0,25$

mol L ⁻¹ + cloreto de potássio 0,1 mol L ⁻¹ . Velocidade de varredura: 50 mVs ⁻¹ . Em (B), variação de frequência com a varredura de potencial.	160
Figura 90- Esquema do mecanismo de formação e redução do par iônico entre melamina e o cloreto de cobre.	162
Figura 91– Voltamogramas de pulso diferencial registrados com eletrodo de cobre em meio contendo ácido sulfúrico 0,25 mol L ⁻¹ + cloreto de potássio 0,1 mol L ⁻¹ (--) e com adições de 5, 15, 25, 45, 60 e 90 µmol L ⁻¹ de melamina (-). Parâmetros: Passo de potencial de 0,01V e amplitude de 0,2V. Ao lado a curva analítica obtida.	163
Figura 92- (A) Ilustração esquemática do sensor tipo tatuagem temporária e da composição do eletrodo modificado ex-situ através da eletrodeposição de bismuto e adição de Nafion. (B) Procedimento eletroquímico para detecção de Zn ²⁺ (C) Monitoramento de zinco em tempo real durante atividade física com o sensor transferido sobre o braço do indivíduo.	169
Figura 93- Caracterização in-vitro dos sensores tipo tatuagem para análise de Zn ²⁺ . (A) Voltamogramas de redissolução anódica para o aumento da concentração de Zn ²⁺ na faixa de 0 a 2,0 ppm. Ao lado, encontra-se inserida a curva de calibração correspondente. (B) Teste de estabilidade para resposta de 1ppm de zinco para 6 repetitivas varreduras, bem como o gráfico de resposta relativa da intensidade de pico de corrente para esses voltamogramas. Parâmetros: tampão acetato (pH 4,6) contendo 0,1 mol L ⁻¹ de NaCl; potencial de deposição de -1,4V por 120 s; frequência de 25 Hz, amplitude de 25 mV e passo de potencial de 4 mV.	170
Figura 94- Fotografias do sensor de tatuagem "NE" transferido para um pulso humano para testes de tensão mecânica, que envolvem (A) dobraduras e (B) estiramentos. (a) flexão e alongamento do pulso com o sensor; (b) o sensor de tatuagem durante os testes de dobragem e alongamento e (c) o sensor após 100 testes de dobradura e estiramento. (C) Resposta relativa para o pico de redissolução anódica para a concentração de 1 ppm de Zn durante uma série de 30 dessas deformações, sendo registrado voltamogramas após uma série de cada 5 dos testes de alongamento (direita) e flexão (esquerda).	172
Figura 95- (A-C) Voltamogramas de redissolução anódica registrados sobre o corpo para monitoramento de Zn ²⁺ no suor durante atividade física de três diferentes indivíduos. (D) Voltamogramas para adição sucessiva de solução padrão de Zn ²⁺ sobre amostra de suor coletado e utilizando o sensor tatuagem. Parâmetros idênticos aos valores ótimos reportados acima.	173
Figura 96- (A) Fotografia do biossensor em protetor bucal integrando a placa de circuito amperométrico sem fio. (B) Esquema da composição do eletrodo de trabalho de carbono com azul da Prússia (AP) contendo uricase para análise de UA salivar. (C) Fotografia da placa de circuito amperométrico sem fio: lado da frente (esquerda) e no verso (direita).	176
Figura 97- Desempenho eletroquímico em saliva artificial (A) Cronoamperogramas obtidos em diferentes concentrações de UA (incrementos de 50 µmol L ⁻¹ até concentração final de 1 mmol L ⁻¹). A curva de calibração resultante encontra-se inserida ao lado. (B) Estabilidade da resposta eletroquímica para a concentração de 350 µmol L ⁻¹ de UA durante uma operação de 2 h, com medições efetuadas em intervalos de 10 min. Ao lado encontra-se inserido o gráfico	

de corrente relativa versus o tempo estudado. Todos os testes foram realizados com potencial aplicado de -0,3 V (*vs* Ag/AgCl) e um tempo de amostragem de corrente de 60 s..... 180

Figura 98- Seletividade do biossensor em protetor bucal. Cronoamperograma registrado em saliva artificial para a adição de UA na concentração de 350 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e na presença de potenciais interferentes fisiológicos (200 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de ácido ascórbico, 800 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de glicose, 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de acetaminofen, 1 mmol L^{-1} de lactato). Condições como na Figura 97. 181

Figura 99- Desempenho eletroquímico na saliva humana não diluída. (A) Resposta cronoamperométrica de saliva humana não diluída e enriquecida com concentrações crescentes de UA em incrementos de 0,2 mmol L^{-1} . A curva de calibração resultante é mostrada inserida ao lado. (B) Estabilidade da resposta na amostra de saliva humana enriquecida com 350 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de UA. Medidas repetidas foram realizadas a intervalos de 20 minutos ao longo de um período de 2 h. O gráfico inserido reporta a corrente relativa com base na resposta da corrente inicial ($t = 0$ s). O sensor foi mantido na saliva entre tais medições sucessivas. Potencial aplicado de -0,3 V e $t = 60$ s..... 182

Figura 100- Monitoramento dos níveis de UA salivar para voluntário saudável (•) e um paciente hiperuricêmico (▪) obtidos com o biossensor em protetor bucal ao longo de um período de 5 h..... 183

Figura 101- Monitoramento do nível de UA salivar sem tratamento (dia 0) e ao longo de 4 dias de tratamento de hiperuricemia com Alopurinol®. O resultado é obtido pela média de triplicatas com o biossensor desenvolvido..... 184

Lista de Tabelas

Tabela 1 - Comparação das técnicas de produção dos dispositivos em papel mais comuns. Adaptado de [26].....	35
Tabela 2 - Teste de interferência de compostos presentes na urina. Experimentos realizados com uma solução contendo 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de picrato (pH 13) e possíveis interferentes em uma concentração igual a 40 $\mu\text{mol L}^{-1}$	49
Tabela 3 - Resultados obtidos pelo método proposto e o método espectrofotométrico para a análise de creatinina em três amostras de urina.	49
Tabela 4- Composição química de 7 amostras de cocaínas de apreensão identificadas por cromatografia gasosa com detector por ionização de chama e os valores de recuperação de procaína pela metodologia colorimétrica proposta.	114
Tabela 5 - Comparação entre os substratos, eletrodos, materiais e instrumentação necessária para a fabricação de sistemas eletroquímicos à base de papel relatados na literatura	135
Tabela 6 – Avaliação de algumas possíveis substâncias interferentes para quantificação de melamina pelo método proposto.	164
Tabela 7 - Teores médios de adulterantes encontrados nas apreensões analisadas.	210

❖ **Introdução geral**

➤ **Drogas ilícitas na sociedade**

A presença de drogas na humanidade vem desde os primórdios, inseridas em diversos contextos: social, econômico, medicinal, religioso, cultural, psicológico, estético e ritualista. Sendo seu consumo considerado cultural, pois tem finalidades diferentes nas atividades inseridas nestes contextos mencionados [1].

O abuso e a dependência das drogas são problemas de saúde pública que afetam muitas pessoas e tem uma grande variedade de consequências sociais e na saúde dos indivíduos. As drogas estão presentes em todas as classes sociais e se configuram como um dos grandes problemas da atualidade, ameaçando os valores políticos, econômicos e sociais. Além disso, contribuem também para o crescimento dos gastos com tratamento médico e internação hospitalar, elevando os índices de acidente de trânsito, violência urbana e mortes prematuras e trazendo enorme repercussão social e econômica para a sociedade contemporânea [1].

Cabe mencionar ainda que os índices mundiais do consumo de substâncias psicoativas estão aumentando. Segundo dados do Relatório Mundial sobre Drogas da ONU (UNODC, 2012), o problema da droga atinge cerca de 27 milhões de pessoas, o que representa 0,6% da população mundial adulta, e vem despertando uma forte preocupação social [1, 2]. Neste sentido, é crescente a preocupação da população diante de tal situação, principalmente devido à falta de políticas públicas de longo prazo para solucioná-la aliado ao aumento da demanda por serviços de tratamento [1].

➤ **Análises químicas tradicionais de drogas de abuso**

Segundo os dados mostrados anteriormente, o uso de drogas de abuso é desenfreado na sociedade acarretando em um efeito prejudicial para a saúde pessoal, além da segurança pública. Portanto, o teste de drogas de abuso é fundamental, e esses procedimentos analíticos empregados estão evoluindo em sofisticação, especificidade e sensibilidade [3].

A detecção de drogas apreendidas, na maioria dos laboratórios forenses, envolve um processo de duas etapas em que um teste preliminar rápido é utilizado para o *screening* seguido por um processo mais preciso, utilizando técnicas instrumentais [4]. Tipicamente, testes preliminares são muito mais baratos, e permitem medições no local por profissionais não qualificados. As respostas destes testes devem ser rápidas e de fácil interpretação do resultado final [4]. Na literatura há diversos tipos de métodos presuntivos para essa finalidade, incluindo os ensaios do tipo *spot test*, microscopias e imunoensaios.

De todos reportados anteriormente, os imunoensaios (imunoensaio multiplicado por enzima, do inglês *enzyme multiplied immunoassay technique* (EMIT)), são um dos mais utilizados devido ao seu tempo de resposta relativamente rápido e seu baixo custo [3]. Existem, no entanto, desvantagens significativas para o ensaio do tipo EMIT. Certos produtos alimentares e medicamentos podem interferir com o ensaio que conduz à obtenção de falsos negativos e/ou falsos positivos. Além disso, outros fármacos que se assemelham estruturalmente o analito de interesse poderiam gerar um resultado errôneo através de resposta cruzada.

Existem diversos tipos de análises do tipo *spot tests*, como por exemplo, teste de Marquis e Simons para detecção de alcalóides, principalmente compostos anfetamínicos [5]. Teste de Scott que é usualmente realizado para triagem de cocaína e outros anestésicos locais, em que é utilizada uma solução de tiocianato de cobalto em meio ácido que produz um complexo azulado na presença de cocaína [6]. Existem inúmeros testes e modificações desses métodos, e outros, visando obter maior seletividade, muitos desses testes são comercializados na forma de kits para utilização em campo.

Os ensaios do tipo *spot tests* colorimétricos, embora realizados rapidamente, são reconhecidos como de grande valia para restringir o número de classes de drogas às quais pertence uma amostra desconhecida no processo de triagem pericial [7]. Além disso, sabe-se que estes testes apresentam baixa especificidade e podem resultar em conclusões errôneas [7], devido principalmente à interferência de adulterantes e diluentes comumente encontrados em amostras de drogas ilícitas [7].

Dessa forma, após uma primeira triagem, devem-se utilizar as técnicas instrumentais para obtenção de respostas mais precisas e exatas que servirão para compor o laudo pericial.

Dentre as técnicas usuais, destacam-se os métodos cromatográficos com diversos tipos de detectores (eletroquímicos, espectrofotométricos, espectrometria de massas, entre outros), além das técnicas eletroanalíticas e espectrometria de massas aplicadas nas mais diversas matrizes de interesse forense (amostras de apreensão, fluidos ou espécies de origem biológica) [8-15].

➤ **Análises de adulterantes de drogas de abuso para processo de triagem**

As amostras de drogas, comumente antes de chegar ao usuário, recebem adições de substâncias que lhe dão um aumento no volume, conhecidas como diluentes e de outras substâncias com efeitos farmacológicos, conhecidas como adulterantes. As impurezas originadas do refino, armazenamento e síntese, também estão presentes nas drogas comercializadas e contribuem para os efeitos tóxicos, que aliado aos efeitos conjuntos dos diluentes, adulterantes e de altas doses dessas podem ser fatais [2, 16-21].

Os adulterantes visam mascarar os efeitos através da ação anestésica e estimulante no sistema nervoso central (SNC), similares a da cocaína ou que altere as atividades normais do SNC. Com isso, diminui-se a concentração da cocaína na amostra, resultando em uma diminuição do custo de produção e mascarando a percepção da qualidade da droga entre os traficantes e usuários [2, 22].

Raramente as amostras de drogas, principalmente de cocaína, apresentam alta pureza, sendo que os principais adulterantes encontrados são: fenacetina, levamisol, cafeína, procaína, lidocaína, benzocaína, paracetamol, dipirona, entre outros [13-15, 23].

De forma geral, as amostras apreendidas de lugares diferentes, possuem padrões distintos de adulterações, o que pode relacionar essa “impressão digital química” à origem da droga e/ou local de fabricação. Assim, esses estudos podem auxiliar na compreensão das rotas de tráfico de drogas regionais e/ou internacionais resultando em uma política de combate ao uso e estratégias anti-tráfico mais eficazes.

➤ **Desenvolvimento de sensores com características portáteis e de baixo custo baseado em plataformas de papel**

O papel é um material amplamente utilizado para escrita, impressão, desenho e embalagem. A utilidade potencial de papel para além destas aplicações tradicionais advém das suas propriedades físicas. É um material interessante, pois ele pode ser fabricado com pequena espessura, além de ser um material leve e flexível de acordo com o seu processamento. O principal constituinte do papel é a fibra de celulose, e isso pode ser altamente atrativo para certas aplicações, uma vez que permite que o líquido penetre dentro da sua matriz hidrofílica, sem a necessidade de uma bomba ativa ou fonte externa para transporte de soluções [24]. Além disso, as fibras de celulose podem ser funcionalizadas, alterando assim, as propriedades físico-químicas, tais como a hidrofiliabilidade, se desejado, bem como a sua permeabilidade e reatividade [24].

Recentemente, o papel tem atraído muito interesse como material potencial para sensores e dispositivos em Química Analítica e clínica por causa de sua versatilidade, alta abundância e baixo custo [24-26]. Estes dispositivos analíticos podem ser integrados de forma a garantir propriedades flexíveis, portáteis, fácil operação, além de fácil descarte ao produto final.

Há relatos de que Caius Plinius Secundus (23-79 d.C.) detectava a contaminação de FeSO_4 em $\text{Cu}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ através de ensaio que utilizava uma tira de papiro embebida em extrato de noz de galha (ácido tânico). Se a tira de papel adquirisse a cor preta, indicava presença de FeSO_4 [27]. Por volta do século XIX, o papel foi explorado com fins de separação, em que suas propriedades microfluídicas permitiam realizar uma cromatografia para separação de corantes e (bio)moléculas. Já por volta de 1950 substratos de papel foram também utilizados para análises químicas por *Comer* [28] em um teste semi-quantitativo para detecção de glicose em urina. Contudo, somente em 2007 o grupo do professor G. Whitesides [25] impulsionou as aplicações desse material na literatura científica para o desenvolvimento de sensores químicos. Essa retomada da utilização do papel deve-se essencialmente as características mencionadas anteriormente.

O papel é predominantemente composto por fibras de celulose que o torna poroso, permitindo uma microfluidez de líquidos por entre as fibras devido ao processo de capilaridade [29]. Assim, ele tem sido amplamente utilizado como plataforma para ensaios analíticos em micro-escala, transporte de soluções, promoção de misturas e separações de fases [24, 30].

Além das vantagens destacadas anteriormente para a retomada da utilização do papel na construção de sensores químicos, esse substrato apresenta inúmeras vantagens para aplicações como plataformas analíticas para análises qualitativas e quantitativas e obtenção de diagnósticos rápidos. Dentre as vantagens, podemos listar: grande abundância, baixo custo comparado com outras plataformas para sensoramento, fácil obtenção e manuseio, compatibilidade com produções em larga escala de dispositivos microfluídicos, possibilidade de armazenamento a longo prazo, fácil modificação física e química de sua superfície para bio-ensaios, fácil descarte através de incineração tornando-o mais ambientalmente correto, possibilidade de utilização de volumes reduzidos de amostras (micro a nanolitros dependendo da resolução das barreiras criadas no papel), coloração branca (adequada para testes colorimétricos), dentre outras [29, 31]. Porém, como dificuldade/desafio a utilização do papel como plataforma de análise, pode-se listar a questão de homogeneidade em sua estrutura, resistência física e química dependendo da aplicação, sensibilidade à umidade, entre outros.

A portabilidade, acessibilidade e simplicidade dos dispositivos analíticos colorimétricos os tornam atraentes para uso em áreas remotas, ou de baixa infraestrutura laboratorial, porém, a interpretação dos resultados pode requerer profissionais experientes e que muitas vezes não estarão disponíveis no local do exame ou extração do resultado analítico [32]. Uma solução simples a esse problema é o uso de uma câmera de telefone celular para obtenção de uma fotografia do resultado da análise, i.e., teste colorimétrico, e então envio da imagem para uma central, onde há pessoal treinado. Com o auxílio de um computador esse profissional pode fazer as análises do ensaio colorimétrico e os resultados seriam enviados de volta para o usuário por uma mensagem de texto, alertando sobre a presença, ou não, de determinado composto analisado ou até mesmo a quantidade deste em uma amostra [32].

Porém, devemos ter em mente os desafios encontrados para aplicabilidade desses sensores colorimétricos, tais como: interferências da cor da amostra, inconsistências em iluminação, falta de uniformidade, ou a presença de contaminantes particulados que podem

confundir a interpretação do resultado colorimétrico [32]. Contudo, esses obstáculos podem ser vencidos facilmente com certa engenhosidade e conhecimentos físico-químicos. As amostras podem ser tratadas previamente, sendo que é possível acoplar esses processos de pré-tratamento em um único dispositivo descartável em papel. Usando-se as propriedades microfluídicas, é possível separar fases, filtrar e através de imobilizações de reagentes fazer um tratamento mais específico (etapas de derivatizações) [33].

Quanto à problemática de obtenção de imagem reproduzível usando aparelho celular, esta dificuldade está relacionada com a diferença de luminosidade, focalização, ângulo em que é obtida a imagem, dentre outros fatores. Na literatura encontram-se algumas abordagens interessantes para contornar esses problemas, nosso grupo, por exemplo, desenvolveu uma plataforma ajustável para iPhone 4S que possui uma câmara composta por alguns LEDs em seu interior para controle de luminosidade e posição fixa para obtenção das imagens [34, 35]. *Jia* e colaboradores [36] reportaram um método simples para realizar essas correções sem usar aparatos extras. O método consiste em imprimir *spots* com padrões conhecidos de cor (preto e branco) e, a partir de tratamento matemático, corrigir os valores dos testes obtidos através da equação que usa a variação desses padrões em cada imagem.

Uma abordagem alternativa de detector que vem sendo amplamente empregado nos últimos 6 anos nesses dispositivos analíticos é a detecção eletroquímica [37], uma vez que, esta técnica possui diversas características favoráveis ao seu acoplamento nessa plataforma (portabilidade, custo reduzido, possibilidade de miniaturização, rápida resposta e boa sensibilidade).

O acoplamento de eletrodos ao substrato de papel, ocorre principalmente via técnicas de *screen printed*, *silk screen* ou *ink jet printing* [32, 38-41], onde os eletrodos são pintados dado um layout pré-estabelecido com tintas condutivas como carbono, prata e cobre, principalmente. Podem ainda ser confeccionados os eletrodos usando métodos mais sofisticados como a deposição metálica por *sputtering* [42, 43]. Para uso de eletrodos carbonáceos, além do uso de tinta condutiva, há trabalhos que fazem o uso do grafite [44, 45] e da pintura direta no papel com minas de grafite [46-48]. Uma abordagem alternativa é o uso de fios metálicos fixados sobre a superfície do substrato de papel [49, 50].

A fabricação dos sensores em papel envolve a delimitação das zonas de análise, *spot* hidrofílico, constituído, de forma geral, apenas pelo material celulósico do papel e uma região hidrofóbica ao redor desse *spot*. Em geral, a delimitação da barreira hidrofóbica é feita

através da deposição física de agentes como cera [34, 39, 51, 52], polidimetilsiloxano (PDMS) [51, 53], poliestireno [51, 54], entre outros.

Martinez e colaboradores [25] foram os pioneiros na fabricação dos dispositivos microfluídicos em papel (do inglês, μ PADs), sendo que para tal processo utilizaram a fotolitografia, que consiste na gravação de estruturas micrométricas em um substrato plano com auxílio de radiação ultravioleta (UV) [25, 55]. Inicialmente, o papel é embebido com fotorresiste, um polímero sensível à UV. Em seguida, uma máscara fotolitográfica é colocada sobre o papel e esse conjunto é exposto à radiação para gravação da imagem desejada. Essas máscaras fotolitográficas são obtidas pela impressão direta em transparências usando impressoras de alta resolução. A exposição à radiação promove uma interação entre o feixe incidente e o polímero fotossensível [56].

Consequentemente, a estrutura química do polímero exposto à radiação sofre polimerização. Após aquecimento, o fotorresiste contido nas áreas não polimerizadas (protegidas pela máscara) é removido com o uso de um solvente adequado e, por fim, toda a superfície é exposta a um plasma oxidante para retirar polímeros remanescentes no canal hidrofílico. A Figura 1 apresenta as etapas de produção desses dispositivos via fotolitografia reportado por Martinez e colaboradores [25].

Figura 1 - Esquema das etapas de produção de dispositivos em papel utilizando a técnica fotolitográfica. Retirado com autorização do trabalho de Martinez e colaboradores [25].

Uma das técnicas mais utilizadas atualmente é a deposição de cera pela técnica de *wax printing* [57] utilizando uma impressora com cartuchos de cera com disponibilidade no mercado local a um custo relativamente baixo, comparado com técnicas para fabricação de padrões, e com boa reprodutibilidade de impressão. Após a deposição de uma camada fina de cera sobre o papel basta aquecer o conjunto papel mais cera, seja com a utilização de uma prensa térmica ou uma placa de aquecimento, até alcançar o ponto de fusão da cera para que a mesma penetre na matriz do papel [39, 57]. A Figura 2 apresenta um esquema típico desse processo.

Figura 2 - Esquema de produção de dispositivos em papel via técnica de wax printing. Retirado com autorização do trabalho de Lu e colaboradores [58].

Uma abordagem interessante é o uso de um carimbo para fabricação destes dispositivos. Coltro e colaboradores [59] reportaram um método que consistia na impregnação do papel com parafina. Em seguida, utilizando-se um carimbo metálico aquecido, comprimia-o sobre o papel provocando o derretimento da parafina e deposição desse padrão sobre as fibras de um papel não impregnado com parafina, criando assim um layout pré-definido pelo design do carimbo.

Nota-se que há uma ampla gama de métodos para confecção de dispositivos em papel, de forma geral requerendo equipamentos de fácil obtenção e baixo custo e que permitem a fabricação em massa desses dispositivos.

A Tabela 1 apresenta um comparativo das técnicas mais empregadas para desenvolvimento dos dispositivos em papel, através da delimitação de regiões hidrofílicas para análises químicas.

Tabela 1 - Comparação das técnicas de produção dos dispositivos em papel mais comuns. Adaptado de [26].

Métodos	Canais (μm)	Vantagens	Desvantagens
Fotolitografia	186 ± 13	Pode padronizar uma grande variedade de papeis ate $360 \mu\text{m}$ em espessura	Áreas hidrofílicas expostas a polímeros e solventes
Plotagem	$\sim 1000^a$	Canais hidrofílicos não ficam expostos a polímeros ou solventes; barreiras hidrofóbicas são flexíveis	Requer um <i>plotter</i> customizado
Corte	1000^b	Canais hidrofílicos não ficam expostos a polímeros ou solventes	Dispositivos devem ser envoltos em fita
Impressão de cera	561 ± 45	Rápida, requer apenas uma impressora comercial e uma chapa de aquecimento, canais hidrofílicos não ficam expostos a polímeros ou solventes	O design do dispositivo deve levar em conta o espalhamento da cera sobre o papel

^a A dimensão mínima não foi reportada. ^b O método foi demonstrado usando poliéster na face de baixo da membrana de nitrocelulose

➤ *Wearable sensors*¹

Wearable sensors vêm obtendo notório destaque, recentemente, devido à possibilidade de acompanhar em tempo real a saúde dos usuários [60-62]. O interesse médico para sistemas *wearable* surge da necessidade de monitoramento de pacientes durante longos períodos de tempo. Estes dispositivos têm o potencial para obter continuamente informações de saúde vital do corpo de uma pessoa e fornecer essa informação a ela ou seu médico em tempo hábil. Esse acompanhamento diretamente no corpo pode alertar o usuário de um risco iminente a sua saúde e, portanto, facilitar uma tomada de decisão visando a rápida ação clínica (fora do ambiente hospitalar). Um exemplo comum são os biossensores de glicose minimamente invasivos para com o controle glicêmico[61]. Estes dispositivos são promissores para manter e até mesmo melhorar a qualidade de vida e reduzir os custos médicos.

Esse tipo de monitoramento é crucial para o acompanhamento de idosos ou pacientes com doenças crônicas em ambientes domésticos, e particularmente em locais distantes (com pouco ou nenhum acesso pessoal aos médicos) [63]. Monitoramento de marcadores de desempenho diretamente no corpo (acoplado a plataformas de celulares) também tem recebido atenção considerável em conexão a variedade de esportes, fitness e aplicações militares [60, 62, 64, 65]. Enquanto a maioria dos esforços iniciais sobre a implementação dos *wearable sensors* foram dedicados mais a dispositivos físicos, como a locomoção, ao contínuo monitoramento dos sinais vitais (como frequência cardíaca, frequência respiratória e temperatura da pele) a partir de sinais físicos [63]; os usos dos sensores químicos portáteis receberam atenção limitada [61]. A Figura 3 ilustra a utilização de *wearable sensors* para monitoramento de parâmetros de saúde e reabilitação de um indivíduo.

¹ Nota: Por não apresentar uma tradução livre adequada para o português, a meu ver, ao longo do texto será reportado pela nomenclatura em inglês. Uma vez que uma tradução literal seria como sensores usáveis ou vestíveis, o que é incoerente, uma vez que todos os sensores podem ter aplicação (serem usáveis) e nem todos os *wearable sensors* são do tipo vestíveis.

Figura 3 - Ilustração de um sistema de monitoramento remoto com base em *wearable sensors*. Informações relacionadas à saúde são obtidas por meio de sensores sem fios junto ao corpo e transmitido para o cuidador/responsável através de um portal de informação, como um telefone móvel. O médico pode usar esta informação para implementar intervenções, conforme necessário. Imagem obtida do trabalho de Patel e colaboradores [63].

A crescente introdução de novos sensores químicos não invasivos visa preencher as lacunas atuais na tecnologia de *wearable sensors*, como desejado para monitoramento móvel da saúde e diagnóstico remoto. A Figura 4 apresenta alguns exemplos de *wearable chemical sensors*.

Os maiores desafios do ponto de vista de aplicação destes sensores são de construção, a transferência para o corpo e a aquisição de sinal, isto é, processo de engenharia do sistema, uma vez que do ponto de vista químico, as realizações de modificações químicas para obter especificidade nas análises estão bem estabelecidas. Sendo o principal ponto a ser verificado é a necessidade de utilizar substâncias não tóxicas e biocompatíveis.

Figura 4 – Imagens típicas para 3 sensores eletroanalíticos do tipo wearable sensors (tatuagens temporárias) para monitoramento de metabólitos excretados pela pele (suor), ou para análises ambientais. Imagens retirada com autorização dos trabalhos do grupo do Prof. J. Wang [61, 64, 65].

❖ Objetivos

- ✓ Desenvolvimento de métodos eletroanalíticos para discriminação de abuso de cocaína em amostras de urina, bem como teste para verificação da autenticidade quanto à possível diluição dessas amostras.
- ✓ Estudos voltamétricos de alguns dos principais adulterantes de drogas de apreensão (fenacetina, aminopirina, outros) visando *screening* dessas amostras.
- ✓ Desenvolvimento de sensores colorimétricos portáteis e de baixo custo em plataformas de papel visando análises de dois dos principais adulterantes de drogas de abuso (procaína e fenacetina).
- ✓ Detecção e discriminação de explosivos usando métodos colorimétricos ou eletroquímicos em sistemas convencionais e/ou plataformas de papel.
- ✓ Desenvolvimento de *wearable bio(sensors)* para monitoramento de compostos de interesse diretamente no corpo humano em tempo real.
- ✓ Detecção de composto intoxicante (melamina) adicionado para adulterar amostras de leite.

Análise de Cocaína e seus adulterantes por métodos eletroquímicos

➤ Detecção e quantificação de creatinina

1. Preâmbulo

A análise toxicológica para verificação do consumo de drogas vem sendo utilizada no meio profissional, no esporte, no auxílio e acompanhamento da recuperação de usuários em clínicas de tratamento e em pesquisas científicas que avaliam os efeitos dessas drogas em cobaias. Contudo, a grande maioria dos métodos existentes até o momento requer a necessidade da coleta da amostra e posterior análise em laboratório para quantificação do analito de interesse, o que demanda muito tempo até a tomada de decisão do caso. Além disso, existem diferentes tipos de testes rápidos e colorimétricos (“*spot-test*”) para detecção qualitativa de algumas das drogas, que podem auxiliar com informações do tipo “sim ou não” (presença ou não da espécie de interesse em certo limite de detecção) e semi-quantitativas, informações que podem ser preciosas para tomadas de decisão rápida.

Muitos destes *spot-test* estão sujeitos a grandes interferências, como a ingestão de muito líquido e chás que alteram a coloração da urina causando o mascaramento das drogas ou resultados falso-negativos no teste de drogas por imunoensaios [66]. Outro problema de detecção ocorre quando há a alteração da amostra de urina por diluição visando diminuir a concentração da droga e seus metabólitos, e assim gerar um falso-negativo devido à limitação de sensibilidade do método analítico empregado. Uma maneira de contornar esse falso negativo é monitorar também o pH e a concentração de creatinina. Alterações nos valores de creatinina (menores que 20 mg dL⁻¹) nas amostras de urina são um indicativo de adulteração das amostras [66].

Dessa forma, é interessante o desenvolvimento de método analítico simples e exato para quantificação de creatinina nas amostras de urina como parâmetro de identificação de possível adulteração/diluição das amostras.

2. Materiais e Métodos

Todos os reagentes sólidos utilizados foram de grau analítico sem purificação adicional e as soluções foram preparadas dissolvendo os reagentes em água desionizada

processada através de um sistema de purificação de água (Direct-Q®, Sistema de água ultrapura, Millipore, MA, EUA).

2.1. Reagentes

Para as análises de creatinina foram utilizados os seguintes reagentes: fosfocreatina, glicose, ácido ascórbico, fosfato de sódio, tetraborato de sódio, ácido acético, hidróxido de sódio, ácido fosfórico e ácido bórico foram obtidos da Merck (Darmstadt, Alemanha). Ácido úrico e creatinina foram obtidos da Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemanha) e o ácido pícrico da Reagen (Rio de Janeiro, Brasil). As amostras de urina foram recolhidas a partir de voluntários e foram diluídas antes da análise com uma solução de picrato em meio alcalino.

2.2. Instrumentação

Os testes eletroquímicos foram realizados em um sistema de três eletrodos, sendo utilizado eletrodos de carbono vítreo, eletrodo de Ag/AgCl construído no laboratório [67] e fio de platina como eletrodo de trabalho, eletrodo de referência e eletrodo auxiliar, respectivamente. Foi utilizado um potenciostato μ Autolab da Autolab Eco Chemie B.V. com software de aquisição de dados do próprio fabricante.

As soluções analíticas de referência e amostras de urina foram diluídas com uma solução de picrato em meio alcalino ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de NaOH), e esta mistura foi deixada por 100 minutos a 27°C para a reação de Jaffé ocorrer. Foi utilizada a voltametria de pulso diferencial com a aplicação de uma faixa de potencial de $-0,1$ a $-1,0 \text{ V}$ e os valores ótimos para o passo e amplitude de potencial foram $0,02 \text{ V}$ e $0,1 \text{ V}$, respectivamente. Todas as medições eletroquímicas foram realizadas após a remoção do oxigênio utilizando argônio como gás inerte.

2.3. Análise espectrofotométrica e verificação da exatidão

A concentração de creatinina nas amostras de urina foi comparada com os valores obtidos a partir de uma reação quantitativa de creatinina com íon picrato em meio alcalino.

Os valores de absorbância foram medidos em 500 nm. As medidas de absorbâncias foram realizadas utilizando um espectrofotômetro de UV-Vis (modelo U- 3000, HITACHI, Tokyo, Japan) com uma cubeta de quartzo com 1,00 cm de caminho óptico.

3. Resultados e discussão

Os principais métodos de quantificação de creatinina são os espectrofotométricos sendo que o mais comum e bem estabelecido na literatura é o teste de Jaffé [68, 69] que consiste na reação da creatinina com ácido pícrico em meio alcalino, Figura 5. Porém, encontram-se relatos de diversos compostos potencialmente interferentes nessa análise como: glicose, ácido ascórbico, ácido úrico e fosfocreatina [70, 71].

Figura 5- Esquema da reação de Jaffé

Com isso, trabalhou-se no desenvolvimento de um método eletroquímico baseado nessa reação visando à redução dos potenciais interferentes mencionados para o teste colorimétrico. Dessa forma, o procedimento baseia-se na análise indireta da creatinina através do monitoramento do picrato. Inicialmente, verificaram-se os perfis voltamétricos do ácido pícrico ou picrato em cinco diferentes tampões, conforme a Figura 6.

Figura 6 - Voltamogramas cíclicos obtidos e registrados com um eletrodo de carbono vítreo, na ausência (linhas tracejadas) e na presença (linhas cheias) de 1 mmol L⁻¹ de ácido pícrico. Os eletrólitos utilizados foram: 0,1 mol L⁻¹ de tampão Britton-Robinson (pH 3,1) (A), 0,1 mol L⁻¹ de tampão de acetato (pH 4,6) (B), 0,1 mol L⁻¹ de tampão fosfato (pH 7,2) (C), 0,1 mol L⁻¹ de tampão de borato (pH 9,1) (D), 0,1 mol L⁻¹ de NaOH (pH 13) (E). Velocidade de varredura: 50 mV s⁻¹.

O voltamograma cíclico obtido em pH 3,1 apresenta uma elevada corrente de pico, ou seja, proporcionaria boa detectabilidade para quantificação do ácido pícrico. No entanto, a reação entre o ácido pícrico e creatinina (Figura 7) ocorre prioritariamente em soluções alcalinas [72] levando a formação de um composto laranja-avermelhado (complexo de Janovsky), pois o ácido pícrico precisa estar na sua forma desprotonada, íon picrato.

Figura 7- Os voltamogramas cíclicos registrados com eletrodo de carbono vítreo, na presença de $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de NaOH (linha cheia), 1 mmol L^{-1} picrato (pH 13) (linha a tracejado ponto), $1 \text{ mmol de creatinina L}^{-1}$ (pH 13) (linha a tracejado) 1 mmol L^{-1} de picrato e $1 \text{ mmol de creatinina L}^{-1}$ (pH 13) (linha pontilhada). $V = 50 \text{ mV s}^{-1}$. Tempo de reação: 10 minutos a 27°C .

Observando a Figura 7 acima, nota-se que nas condições experimentais utilizadas, nenhum sinal de corrente é obtido para uma solução contendo somente creatinina e eletrólito suporte, enquanto que na presença de picrato e creatinina (razão 1:1), o pico de corrente só é observado devido à redução eletroquímica do picrato remanescente da reação entre picrato e creatinina, Figura 5. Para valores mais elevados de concentração de creatinina, não foi observada processo faradaico (não mostrado), daí, conclui-se que o complexo de Janovsky não é eletroativo nas condições experimentais reportadas.

Visando à obtenção de maior sensibilidade, foi utilizada a voltametria de pulso diferencial com o objetivo de se obter um menor limite de detecção para a creatinina. Assim, os parâmetros utilizados nesta técnica (amplitude e passo de potencial) foram otimizados; os

resultados são mostrados na Figura 8. O primeiro parâmetro otimizado foi a amplitude do pulso avaliando esse parâmetro em diferentes valores de potencial (de 0,005 a 0,4 V). Subsequentemente, o efeito do passo de potencial também foi estudado (valores avaliados: 0,0006 – 0,08 V). Os valores ótimos obtidos a partir destes testes foram 0,1 V e 0,02 V para a amplitude e passo de potencial, respectivamente.

Figura 8 – Dependência dos parâmetros de amplitude e passo do potencial da técnica de voltametria de pulso diferencial para quantificação de creatinina. (A) dependência da corrente com a amplitude, passo de potencial mantido em 0,02 V. (B) dependência da corrente com o passo de potencial, amplitude mantida em 0,05 V. Os experimentos foram realizados em uma solução contendo 2 mmol L⁻¹ de picrato (pH 13).

Outro aspecto importante para avaliar a cinética reacional para formação do complexo é o tempo e a temperatura. Na Figura 9A é apresentada o efeito do tempo durante a reação entre creatinina e picrato a 27° C. O decaimento da corrente de pico em função da redução do picrato foi observado até 103 minutos. A temperatura da reação (Figura 9B) foi escolhida como a temperatura ambiente (27°C), em que o decréscimo de sinal foi mais significativo (70%), isto é, a condição em que ocorreu a reação mais extensivamente (o que contribui para um aumento da sensibilidade do método). Observa-se que nas temperaturas de 3 °C e 51 °C, o sinal diminuiu em 41 % e 29 %, respectivamente. Uma justificativa para o decaimento reportado a 51 °C pode ser atribuída a creatinina sendo degradada à metilguanidina em

temperaturas mais altas (superiores a 30°C) [73]. Portanto, a análise da creatinina foi conduzida a 27 °C, após um tempo de reação de 100 min.

Figura 9 - Otimização das condições de reação entre o picrato e creatinina. Voltamogramas de pulso diferenciais registrados com um eletrodo de carbono vítreo, na presença de 1 mmol L⁻¹ de picrato e 1 mmol L⁻¹ de creatinina (pH 13). Tempo de reação a 27°C: (a) 0, (b) 3, (c) 12, (d) 32, (e) 50, (f) 63, (g) 103, (h) 121 min. Parâmetros: passo: 0,01 V, amplitude: 0,05 V. Ao lado, gráfico de otimização do tempo. Os valores de corrente de pico foram obtidos a partir de voltamogramas de pulso diferencial com um eletrodo de carbono vítreo, na presença de 1 mmol L⁻¹ de picrato e 1 mmol L⁻¹ de creatinina (pH 13). Temperaturas utilizadas na reação: (■) 27, (▲) 3 e (●) 51 ° C.

Após a otimização de todos esses parâmetros citados acima, construiu-se uma curva analítica (Figura 10) variando a concentração de creatinina de 0 a 80 μmol L⁻¹ na presença de 100 μmol L⁻¹ de picrato em meio alcalino (solução de 0,1 mol L⁻¹ de NaOH) utilizando as condições experimentais otimizadas anteriormente.

Figura 10 - Voltamogramas de pulso diferencial registrados com um eletrodo de carbono vítreo, na presença de $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ de picrato (pH 13) e $0 \mu\text{mol L}^{-1}$ (A) $1 \mu\text{mol L}^{-1}$ (B) $5 \mu\text{mol L}^{-1}$ (C) $10 \mu\text{mol L}^{-1}$ (D) $15 \mu\text{mol L}^{-1}$ (E) $30 \mu\text{mol L}^{-1}$ (F) $40 \mu\text{mol L}^{-1}$ (G) $60 \mu\text{mol L}^{-1}$ (H) $80 \mu\text{mol L}^{-1}$ de creatinina (I). Parâmetros: passo de $0,02\text{V}$, amplitude de $0,1\text{V}$. Curva analítica obtida a partir dos valores de pico de corrente dos voltamogramas de pulso diferencial a 27°C e 100 min .

Observa-se na Figura 10 que houve linearidade para a faixa de concentrações estudadas. A equação da reta obtida foi $(I/\mu\text{A}) = -2,512 + 0,019 (C/\mu\text{mol L}^{-1})$, $R^2 = 0,997$. O limite de detecção foi calculado multiplicando o desvio padrão das medidas do branco (solução de $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ de picrato ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de NaOH)) e dividindo este pelo coeficiente angular da curva analítica ($3\sigma/\text{inclinação}$), sendo o seu valor estimado em 380 nmol L^{-1} .

A repetibilidade do método proposto foi investigada através da realização de 10 medições (registro de voltamogramas de pulso diferencial) em $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ de ácido pícrico em solução alcalina e apresentou um desvio padrão relativo de 5%.

Pensando na aplicação em amostras reais de urina, testaram-se alguns compostos presentes nessa matriz que poderiam ser possíveis interferentes, tais como: glicose, fosfocreatina, ácido ascórbico e ácido úrico. A escolha desses interferentes deve-se ao fato de que há relatos na literatura que esses compostos apresentam interferência no método espectrofotométrico principalmente em temperaturas elevadas [70, 71] ao se utilizar a reação

reportada na Figura 5. Dessa forma, foram avaliados separadamente o efeito da presença destes compostos no sinal de redução eletroquímico do picrato em meio básico. A interferência foi calculada dividindo-se o pico de corrente catódica do picrato em concentração de $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ + $40 \mu\text{mol L}^{-1}$ de creatinina antes da adição da espécie de interferência pela corrente de pico catódica do picrato + $40 \mu\text{mol L}^{-1}$ de creatinina, após a adição das espécies de interferência (Tabela 2).

Tabela 2 - Teste de interferência de compostos presentes na urina. Experimentos realizados com uma solução contendo $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ de picrato (pH 13) e possíveis interferentes em uma concentração igual a $40 \mu\text{mol L}^{-1}$.

Interferentes	$-I/\mu\text{A}$	Razão de sinal (I_p do composto / I_p do picrato com creatinina)
Ácido Pícrico + Creatinina	1,70	1,00
Ácido Pícrico + Creatinina + ácido úrico	1,69	0,99
Ácido Pícrico + Creatinina + ácido ascórbico	1,63	0,96
Ácido Pícrico + Creatinina + glicose	1,69	0,99
Ácido Pícrico + Creatinina + fosfocreatina	1,68	0,99

Como pode ser observado pela Tabela 2 o método desenvolvido não apresenta interferência significativa para os compostos avaliados. Assim, considerando o bom limite de detecção obtido e a ausência de interferências, aplicou-se o respectivo método para análise de creatinina em amostras de urina coletadas de alguns voluntários. Na Tabela 3, estão reportados os resultados da análise de 3 amostras tanto pelo método desenvolvido (eletroquímico) quanto por análise espectrofotométrica (método oficial).

Tabela 3 - Resultados obtidos pelo método proposto e o método espectrofotométrico para a análise de creatinina em três amostras de urina.

Amostras	Método espectrofotométrico / mmol L^{-1}	Método proposto / mmol L^{-1}
1	$11,4 \pm 0,1$	$11,0 \pm 0,4$
2	$13,7 \pm 0,3$	$13,8 \pm 0,1$
3	$18,9 \pm 0,2$	$19,0 \pm 0,8$

Os resultados obtidos a partir do método proposto encontram-se de acordo com os resultados obtidos pelo método padrão UV-Vis para um nível de confiança de 95% de acordo com o teste t de Student, indicando que o método proposto é concordante, e assim, pode-se concluir que o método é confiável e que pode ser utilizado com sucesso para determinar os níveis de creatinina na urina. Com isso, o monitoramento da creatinina poderia indicar processos de adulteração na urina já que em indivíduos saudáveis esses valores devem ficar entre 40 a 300 mg dL⁻¹ (~ 3,6 – 27 mmol L⁻¹) para homens e 37 a 250 mg dL⁻¹ (~ 3,3 – 22,5 mmol L⁻¹) para mulheres, respectivamente. Entretanto, valores abaixo de 20 mg dL⁻¹ (~1,8 mmol L⁻¹) são dificilmente observados, o que pode indicar que as amostras de urina foram adulteradas [66].

➤ **Análise de cocaína em amostras de Urina**

1. Preâmbulo

Teste de drogas como cocaína é empregado em muitas situações como na reabilitação de usuários de drogas, análise de triagem e para fins forenses. A amostra biológica mais utilizada para esse teste é a urina e o tempo de detecção na amostra biológica é dependente da meia-vida da droga, que pode ser de 12 horas (para a cocaína) após o uso da droga [74]. Na literatura, sensores eletroquímicos com a utilização de método de reconhecimento de padrões não supervisionado aparecem como uma ferramenta interessante e rápida para discriminar amostras diferentes.

No sentido de discriminar amostras qualitativas nos últimos anos, arranjo de sensores eletroquímicos associados com ferramentas quimiométricas para resolução de problemas analíticos em líquidos (línguas eletrônicas) vem ganhando grande destaque na literatura [75]. Esses dispositivos contêm sensores que apresentam sobreposição de sinais para diferentes espécies (baixa seletividade), mas alta sensibilidade de extrair informação da composição de uma determinada amostra. O primeiro trabalho reportado na literatura em 1990 com essa finalidade foi descrito por Toko e colaboradores [76]. O arranjo de sensores proposto tinha a função de mimetizar o trabalho dos receptores gustativos dos seres humanos, de onde surgiu o nome de sensores gustativos ou de sabor (anteriormente ao nome língua eletrônica), devido

à possibilidade de percepção do sabor de alimentos de maneira similar à do sistema gustativo dos seres humanos.

Uma vez que não existe a necessidade de identificação seletiva de uma dada substância, para fins de reconhecimento, a seletividade deixa de ser um requisito fundamental, o que não impede o dispositivo de diferenciar sabores abaixo do limite de detecção humano, e diferenciar entre duas amostras, como por exemplo, tipos de vinhos, qualidade da água e refrigerantes [77-82].

Nesse sentido, a Análise de Componente Principal (do inglês PCA – Principal Component Analysis) tem sido utilizada para análise dos dados [83]. A PCA é um algoritmo que visa reduzir a dimensionalidade do conjunto de dados original, preservando a maior quantidade de informação (variância) possível. Essa redução é obtida por meio do estabelecimento de novas variáveis ortogonais entre si, denominadas componentes principais (PCs, do inglês Principal Components). Organizadas em ordem decrescente de importância (informações), as PCs são combinações lineares das variáveis originais. Os gráficos obtidos representam as amostras em um sistema cartesiano onde os eixos são as PCs [84]. Dessa forma, a PCA permite a interpretação multivariada de conjuntos de dados grandes e complexos por meio de gráficos bi ou tridimensionais. Estes gráficos apresentam informações que expressam as inter-relações que podem existir entre as variáveis, facilitando a interpretação multivariada do comportamento das amostras.

A avaliação das PCs pode auxiliar no estabelecimento de uma assinatura química particular para cada grupo de amostras após a PCA. Sendo assim, o principal objetivo dos estudos de reconhecimento de padrões é relacionar a identidade de uma amostra com suas características químicas. Com isso, esse método mostra as relações existentes entre as amostras e também evidencia qual é o atributo que mais caracteriza cada amostra. A PCA indica se determinada amostra é semelhante ou não a outra por meio do gráfico de escores e pesos (do inglês, “*score and loading plots*”). A importância de cada eixo em um gráfico PCA é expressa em termos de sua respectiva variância, indicando quanta informação é extraída dos experimentos realizados por cada componente principal. A primeira PC (PC1) é definida pela direção que descreve máxima variância dos dados originais. A segunda PC (PC2) tem a direção de máxima variância dos dados no subespaço ortogonal à PC1, e as PCs subsequentes são ortogonais às anteriores e orientadas de tal maneira que descrevem sempre a máxima

variância restante. Em geral, 70 % da variância estão contidas nas duas primeiras componentes principais.

Dessa forma, buscou-se desenvolver um novo método de análise capaz de discriminar as amostras de urina, com e sem a cocaína com base nas respostas eletroquímicas voltamétricas extraídas das amostras utilizando o algoritmo de PCA.

2. Materiais e métodos

2.1. Reagentes e amostras

Foram utilizadas amostras de cocaína apreendidas pela polícia científica de São Paulo, que em parceria com o laboratório, nos cedeu para estudos de rastreamento. As amostras de urina sintética foram preparadas pelo protocolo relatado na literatura [85].

Foram obtidas 4 amostras de urina de usuários de drogas de abuso, em colaboração com a empresa CONTRAPROVA Dopping e toxicologia, essas amostras eram oriundas de usuários de maconha e cocaína. Duas amostras, designadas como A e B foram certificadas para presença de tetra-hidrocanabinol (THC) (metabólito da maconha) e duas amostras, designadas como C e D contendo benzoilecgonina (principal metabólito da cocaína). Ambas as amostras foram analisadas por HPLC acoplado ao detector de massas pela empresa de toxicologia. Para a realização das análises eletroquímicas dessas amostras, utilizou-se uma alíquota de 1 mL de cada amostra que foram diluídas para 2 mL utilizando tampão fosfato pH = 7,0. Foram obtidas ainda algumas amostras de urina de voluntários saudáveis e que declararam não serem usuários de drogas de abuso.

2.2. Instrumentação

Para a realização dos testes eletroquímicos foi utilizado um sistema de três eletrodos: carbono vítreo, platina e Ag/AgCl como eletrodos de trabalho, auxiliar e referência, respectivamente.

Foram preparadas soluções de 16 diferentes amostras de cocaína em urina sintética através da dissolução de aproximadamente 60 mg em 4 mL de urina sintética e agitadas para

dissolução completa de todas as espécies solúveis. Vale ressaltar, que por tratar-se de amostras de apreensão, elas não são puras, apresentando diversos adulterantes e muitos deles não são completamente solúveis em água. As análises por voltametria cíclica foram realizadas utilizando uma janela de potencial de -1,5 V a 1,5 V com uma velocidade de varredura de 50 mV s⁻¹.

As análises das amostras reais de urina foram realizadas por voltametria cíclica em uma janela de potencial de -1,0 a 2,0 V utilizando eletrodo de carbono vítreo e uma velocidade de varredura de 50 mV s⁻¹.

2.3. Análise quimiométrica visando à discriminação das amostras

As análises quimiométricas foram realizadas utilizando o software Statistica® 10 e com base na covariância dos dados obtidos. Como dados de entrada, utilizaram-se todos os valores de corrente obtidos nos voltamogramas cíclicos registrados nas soluções de urina sintética na ausência e na presença de cocaína.

3. Resultados e discussão

➤ Testes de Screening de Cocaína em amostras de urina sintética

Foram realizadas as análises eletroquímicas de 16 amostras de cocaína em meio de urina sintética, conforme relatado na seção materiais e métodos, e a Figura 11 apresenta os perfis voltamétricos para quatro tipos de amostras.

Figura 11 – Voltamogramas cíclicos registrados em eletrodo de carbono vítreo em quatro urinas sintéticas na presença (linha cheia) e ausência (linha tracejada) de cocaína 15 g L^{-1} . Velocidade de varredura de 50 mV s^{-1} .

Observa-se pelos perfis voltamétricos que há tipos muito distintos de amostras e diversos adulterantes presentes, que correspondem provavelmente a origem ou distribuidores (traficantes) diferentes e que fornecem uma “impressão digital da amostra”. Para observar se é possível a discriminação de amostras de urina que contenham e não contenham a cocaína, construiu-se a Figura 12, que é o resultado da discriminação de cocaína em amostras de urina sintética através de um método não supervisionado de reconhecimento de padrões (PCA) com os valores de corrente obtidos pelos testes eletroquímicos como valores de entrada.

Figura 12 - Gráfico de escores reportando a discriminação de amostras de urina sintética com e sem a presença de cocaína. Dados de corrente obtidos com eletrodo de Carbono vítreo.

Observa-se que é necessário apenas cerca de 80% da informação original para possibilitar a discriminação das amostras. A discriminação entre amostras de urina sintética com e sem a cocaína apesar de bem sucedida, nota-se que o grupo de amostras com a presença de cocaína é relativamente disperso, o que pode ser explicado pelas grandes diferenças nos perfis de corrente dos voltamogramas obtidos o que pode estar associado as diferenças de composição entre as amostras (presença de adulterantes).

➤ Testes de Screening de drogas de abuso em amostras de urina

Inicialmente, registraram-se voltamogramas cíclicos para avaliação do comportamento eletroquímico das amostras, utilizou-se uma ampla janela de potencial para uma melhor exploração eletroquímica da composição dessas urinas, o que poderia auxiliar no processo de discriminação entre usuários que fizeram abuso ou não dessas drogas. Os

voltamogramas da Figura 13, apresentam os perfis voltamétricos para análise das 4 amostras de urina de usuários (A-D) e de um indivíduo não usuário (X) de droga de abuso.

Figura 13 - Voltamogramas cíclicos registrados com eletrodo de carbono vítreo em meio de tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ ($\text{pH} = 7,0$) contendo urinas de: A e B usuários de drogas com teste positivo para THC nas concentrações de $10,5 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ e $86 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ do metabólito, respectivamente, C e D usuários de drogas com teste positivo para benzoilecgonina com concentrações de $4,29 \text{ mg L}^{-1}$ e $0,88 \text{ mg L}^{-1}$ do metabólito, respectivamente; X indivíduo não usuário de droga de abuso. Velocidade de varredura de 50 mV s^{-1} .

Observa-se na Figura 13, que todas as amostras, exceto a D, apresentam ao menos um processo de oxidação ao redor de $0,3 \text{ V}$, sendo que a amostra do indivíduo não usuário, amostra X, apresenta este pico mais expressivo em relação aos demais voltamogramas. Nota-se ainda que a amostra D, apresenta um pequeno processo de oxidação não muito definido ao redor de $1,85 \text{ V}$.

Utilizando os valores de corrente dessas amostras como entrada no software Statistica®, construiu-se uma PCA apenas das amostras de usuários para visualização do processo de discriminação entre elas, Figura 14.

Figura 14 - Gráfico de escores reportando a discriminação de amostras de urina contendo metabólitos de drogas de abuso. Dados entrada do algoritmo: valores de corrente obtidos com eletrodo de carbono vítreo da Figura 13.

Na Figura 14, observa-se que as amostras A e B ficam próximas no processo discriminatório, o que é condizente por terem o mesmo metabólito, já as amostras C e D, apresentam um maior distanciamento entre elas no processo discriminatório, o que pode estar associado as diferenças nos perfis voltamétricos, como a ausência de pico de oxidação em 0,3 V e um processo de oxidação em 1,85 V.

É importante notar que apesar da baixa concentração dos metabólitos e a limitação da sensibilidade da técnica utilizada, uma vez que a voltametria cíclica é mais utilizada para um estudo mais exploratório na eletroanálise, foi possível discriminar as amostras quando associado a análise quimiométrica por PCA.

Com relação ao processo de oxidação ao redor de 0,3 V apresentado nos voltamogramas da Figura 14 é bem conhecido na literatura que o conteúdo de antioxidantes e vitaminas pode ser detectado eletroquimicamente em potências baixos [86, 87]. A fim de verificar essa possibilidade, foi realizada uma adição de ácido ascórbico em uma dessas amostras (indivíduo X) e comparado a resposta eletroquímica, conforme Figura 15.

Figura 15- Voltamogramas cíclicos registrados com eletrodo de carbono vítreo em meio de tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ (pH = 7,0) contendo amostra de urina do individuo não usuário (X) sem (linha tracejada) e com (linha cheia) a adição de ácido ascórbico 3 g L⁻¹.

É possível observar que o ácido ascórbico, que é um dos principais antioxidantes naturais, apresenta um processo eletroquímico na mesma região dos processos de oxidação observado nas amostras de urina, demonstrando que essa informação sobre os antioxidantes pode ser útil para o processo de discriminação das amostras.

Uma breve busca na literatura [88-90] sobre correlação de níveis de antioxidantes e abuso de drogas nos revela que esses estão diretamente correlacionados, sendo reportado que existe uma diminuição dos níveis de antioxidantes com o uso de algumas drogas, muitas vezes essa relação é devido a mudança de hábitos alimentares desses usuários, fazendo uso de alimentos com poucas vitaminas, por exemplo.

A fim de ampliar as amostras analisadas, e verificar os padrões de discriminação, aumentou-se a gama de amostras utilizando também amostras de indivíduos que declararam

não serem usuários. Foram coletadas amostras de urina de alguns indivíduos saudáveis, que não haviam feito uso de medicamentos recentemente e que declararam não fazer uso de drogas. O gráfico de escores da Figura 16, ilustra essa discriminação.

Figura 16 - Gráfico de escores reportando a discriminação de amostras de urinas de usuários de drogas (amostras CONTRAPROVA) (círculos pretos) e de indivíduos não usuários (círculos vermelhos). Dados de entrada do algoritmo: valores de corrente obtidos com eletrodo de carbono vítreo.

Observa-se uma clara discriminação entre amostras de urina de usuários e não usuários de drogas de abuso entre os valores negativos e positivos do eixo da PC1. As amostras A, B e C de usuários de drogas se localizaram no grupo representado no primeiro quadrante da Figura, já a amostra D encontra-se no quarto quadrante, isolada das demais. Dentre as amostras de indivíduos não usuários, um fato interessante é que houve uma discriminação entre as amostras de indivíduos do sexo masculino e feminino, sendo que as amostras de urina dos homens não usuários ficaram localizadas principalmente no domínio do segundo quadrante da Figura 16, enquanto as amostras de indivíduos femininos estão localizadas no terceiro quadrante. Dado esse fato ocorrido, pensamos se não poderíamos estar discriminando além de amostras de usuários e não usuários de entorpecentes, discriminando também pelo gênero desses indivíduos, sendo que a PC1 seria responsável por discriminar o uso da droga de abuso e a PC2 responsável pela informação do gênero do indivíduo.

Questionamos a sexualidade dos indivíduos das amostras à CONTRAPROVA, porém por questões de confidencialidade, só souberam apontar que as amostras de A e B são de homens e das demais não teriam essa informação. Para melhor compreensão do ocorrido, foi realizada a adição de uma pequena alíquota da amostra de urina do indivíduo C que apresentava maior concentração de benzoilecgonina e que estava dentro do grupo de usuários de drogas discriminado na Figura 16 às amostras de não usuários femininos. Construiu-se um novo gráfico de escores com a inserção dessas novas “amostras” (urina feminina de não usuário com alíquota da amostra C).

Figura 17- Gráfico de escores reportando a discriminação de amostras de urinas de usuários de drogas (amostras CONTRAPROVA) e de indivíduos não usuários, bem como a adulteração de duas amostras de urinas de não usuárias com a amostra de um indivíduo usuário (C). Legendas dos caracteres encontram-se inseridos ao lado da Figura. Dados de corrente obtidos com eletrodo de carbono vítreo foram utilizados como dados de entrada do algoritmo.

A adição da amostra C foi realizada para não tendenciar o processo discriminatório em relação ao uso da amostra D. De acordo com a Figura 17, observa-se um nítido agrupamento entre as amostras de urinas femininas e amostra D, bem como a manutenção

dos grupos anteriores obtidos na Figura 16, com apenas uma rotação em relação ao eixo da PC2.

Esses dados preliminares demonstram a possibilidade e potencialidade das técnicas eletroquímicas associadas à quimiometria para discriminação de amostras de urinas de usuários e não usuários de drogas de abuso, bem como a possível discriminação entre o gênero dessas amostras.

Para maior esclarecimento/elucidação dos fatos observáveis seriam necessárias análises de maior quantidade de amostras bem como, principalmente, dispor dos padrões analíticos de drogas e metabolitos, para então fazer estudos mais avançados. Porém, infelizmente, devido a alta burocracia existente para aquisição de tais padrões para realização de pesquisa à qual esse país impõe, não foi possível a obtenção durante a vigência desse projeto e maiores estudos foram inviabilizados. Os dados preliminares obtidos com poucas amostras analisadas apresentam um caminho interessante a ser estudado futuramente.

❖ Detecção eletroquímica dos principais adulterantes de amostras de cocaína

➤ Quantificação de Aminopirina em amostras apreendidas

1. Preâmbulo

Nas últimas décadas constata-se a crescente adulteração de drogas de abuso apreendidas mundialmente pelos órgãos competentes, principalmente em cocaína [17, 21, 22, 91, 92], as quais são adicionadas diversas substâncias com o objetivo de aumentar o volume e o lucro na venda dos contrafeitores.

Adulterantes são substâncias que apresentam algum efeito farmacológico, podendo potencializar ou assemelhar-se a algum dos efeitos da cocaína. Já os diluentes, são usados apenas para diluir a droga, sendo inativos e sem efeito farmacológico. Para adulteração optam-se, principalmente, por substâncias que tenham aparência semelhante à cocaína, propriedades anestésicas, sabor amargo e coloração esbranquiçada [91, 92]. Os adulterantes

tanto podem simular os efeitos da cocaína quanto reduzir efeitos indesejados provocados pela droga.

A quantificação de cocaína bem como de seus adulterantes são importantes não somente do ponto de vista clínico e toxicológico, mas também para propósitos forenses relacionados à determinação da origem geográfica, uma vez que, análises de diferentes amostras de apreensão podem ser úteis para finalidades de inteligência policial (determinação da rota de tráfico e rota sintética das drogas, haja vista que, de forma geral os laboratórios clandestinos possuem um padrão característico de adulteração das drogas) [21, 91]. Portanto, a detecção desses adulterantes é como uma "impressão digital química" das amostras de apreensão e essa informação pode ajudar em políticas anti-tráfico mais eficazes [15, 21, 23, 93]. Infelizmente, devido à grande quantidade de apreensões e à carência de recursos humanos dos laboratórios forenses regionais, são grandes as quantidades de amostras armazenadas à espera de testes rápidos para identificação/qualificação [91].

Tendo em vista que a maior parte dos adulterantes são de origem farmacêutica, e que caíram no desuso, acredita-se que o desenvolvimento de métodos de análise para detectá-los em fluídos biológicos, pode ser importante além da questão toxicológica, mas também para utilização como possíveis marcadores do processo de abuso das drogas, uma vez que, ao fazer uso da droga, o usuário acaba tendo contato e/ou fazendo ingestão dos adulterantes que constituem a droga. Assim, é interessante o desenvolvimento de métodos analíticos rápidos, confiáveis e suficientemente seletivos para analisar a cocaína, produtos de degradação e adulterantes para o desenvolvimento de testes anti-dopping mais robustos e para auxílio no combate ao tráfico.

2. Materiais e métodos

2.1. Reagentes

Foram utilizados os seguintes reagentes: H_2SO_4 , KH_2PO_4 , K_2HPO_4 e NaOH foram obtidos da Merck (Darmstadt, Germany). Fenacetina, lidocaína, procaína e benzocaína foram obtidos da Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany). A aminopirina foi adquirida da Alfa Aesar (Johnson Matthey Company).

2.2. Amostras

As soluções padrões de aminopirina e da cocaína foram diluídas em tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ (pH = 7,4). As amostras de cocaínas apreendidas foram obtidas em parceria com o Instituto de Criminalística de São Paulo. As amostras foram manualmente pulverizadas e homogeneizadas e em seguida diluídas em eletrólito de suporte apropriado.

2.3. Procedimentos eletroquímicos para quantificação de aminopirina

Os eletrodos de trabalho avaliados (Pt, GC e Au) foram previamente polidos antes de cada análise usando uma suspensão de alumina (1 µm, Alfa Aesar, MA, USA) para remover espécies adsorvidas e então obter melhor reprodutibilidade. A quantificação de aminopirina foi realizada pela técnica de voltametria de onda quadrada na faixa de potencial de 0,2 a 0,6 V. Os valores ótimos de passo de potencial, amplitude e frequência foram: 4 mV, 50 mV e 120 Hz, respectivamente.

Testes de adição e recuperação foram realizados para verificar a exatidão do método. Com esse intuito, a adição de uma quantidade conhecida de aminopirina foi realizada nas amostras de cocaína a fim de obter uma concentração final em solução de 200 µmol L⁻¹.

Foram realizados experimentos eletroquímicos com o eletrodo de disco rotatório (EDR) (AFMSRX, Pine Instrument Company) com o intuito de elucidar o processo eletroquímico da aminopirina na superfície do eletrodo. Foi utilizada uma velocidade de varredura de 20 mV s⁻¹ e uma faixa de potencial de -0,2 a 1,2 V com eletrodo de platina de diâmetro de 0,56 cm.

2.4. Avaliação da composição das amostras apreendidas e teste de interferência

As amostras de cocaína foram caracterizadas qualitativamente e quantitativamente em relação aos adulterantes presentes nessas amostras. Em parceria com o Instituto de Criminalística de São Paulo que forneceram as amostras e com a colaboração do Instituto Nacional de Criminalística foi realizada a análise quantitativa dos constituintes das amostras por cromatografia gasosa acoplada a um detector de ionização por chama, conforme método reportado na literatura [13].

Realizaram-se testes de interferência para o método eletroquímico proposto em relação aos principais adulterantes encontrados nas amostras de cocaína. Foram testadas as interferências dos seguintes adulterantes: lidocaína, benzocaína, fenacetina, procaína e cafeína na concentração de $0,5 \text{ mmol L}^{-1}$ na presença de $0,25 \text{ mmol L}^{-1}$ de aminopirina.

3. Resultados e Discussão

Aminopirina é um analgésico e antipirético, mas que já foi identificado como possível causador de agranulocitose, diminuidor de glóbulos brancos do sangue e formador de nitrosamina que é uma substância carcinogênica [94, 95], sendo esses os motivos de sua retirada do mercado em diversos países. É reportado na literatura que a aminopirina é uma das formulações farmacêuticas comumente encontradas como adulterante de amostras de apreensão de cocaína [96]. Desta forma, buscou-se o desenvolvimento de um método eletroquímico para identificação e quantificação desse composto em amostras de cocaína visando à obtenção de um sensor adicional para obter informação da composição das amostras de apreensão, auxiliando na discriminação e determinação da origem geográfica dessas amostras e na fabricação de língua eletrônica com essa finalidade.

Inicialmente, verificou-se o comportamento eletroquímico da aminopirina para três diferentes materiais eletródicos (Au, Pt e carbono vítreo), Figura 18.

Figura 18 – Voltamogramas cíclicos registrados em $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de tampão fosfato ($\text{pH} = 7,4$) na ausência (--) e presença (-) de 2 mmol L^{-1} de aminopirina. Eletrodos utilizados: (A) platina, (B) ouro e (C) carbono vítreo (GC). Velocidade de varredura de 50 mV s^{-1} .

Observa-se na Figura 18 que a oxidação da aminopirina ocorre em pelo menos duas etapas, uma primeira etapa em potencial ao redor de $0,4 \text{ V}$ e uma segunda etapa em $0,6 \text{ V}$, sendo o eletrodo de platina é o que proporciona a melhor resposta, maior densidade de corrente para detecção desse composto. Com isso, esse material eletródico foi escolhido para o desenvolvimento do método analítico para quantificação da aminopirina. Definido o melhor material eletródico, avaliou-se o efeito do pH na resposta eletroquímica da aminopirina, Figura 19.

Figura 19 - Voltamogramas cíclicos registrados utilizando eletrodo de platina na ausência (--) e presença (-) de 2 mmol L⁻¹ de aminopirina. Eletrólitos utilizados: (A) solução 0,2 mol L⁻¹ de ácido sulfúrico (pH = 0,8), (B) 0,1 mol L⁻¹ de tampão acetato (pH = 4,6), (C) 0,1 mol L⁻¹ de tampão fosfato (pH = 7,4) e (D) solução 0,1 mol L⁻¹ de NaOH (pH = 13). Velocidade de varredura de 50 mV s⁻¹.

Verifica-se pela Figura 19 que em meio ácido o processo de oxidação da aminopirina é dificultado, isto é, ocorre em um potencial mais positivo (Figura 19A). A partir do valor de pH = 7,4, observa-se que não ocorre mais deslocamento de potencial de pico do processo de oxidação da aminopirina com o pH. Em pH 13 ocorre até uma possível sobreposição de processos que antes eram observados separadamente. Foi escolhido o pH de 7,4 como ótimo para o desenvolvimento do método eletroanalítico, pois nesse valor de pH observa-se uma maior detectabilidade em um menor sobrepotencial.

Avaliada as melhores condições experimentais utilizou-se o eletrodo de disco rotatório (EDR) para estudar o mecanismo de oxidação da aminopirina sobre a superfície do eletrodo de platina. Para tanto, registraram-se voltamogramas hidrodinâmicos com diferentes velocidades de rotação (de 100 a 6400 rpm), Figura 20.

Figura 20 - Voltamogramas cíclicos registrados em solução de $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de tampão fosfato contendo 2 mmol L^{-1} de aminopirina usando eletrodo de platina rotativo em diferentes velocidades de rotação: (a) 100 rpm, (b) 400 rpm, (c) 900 rpm, (d) 1600 rpm, (e) 2500 rpm, (f) 3600 rpm, (g) 4900 rpm, and (h) 6400 rpm. Velocidade de varredura de 20 mV s^{-1} . Em destaque encontra-se o gráfico de Levich (corrente limite em função da raiz quadrada da velocidade de rotação) para ambos os processos da aminopirina. Destaca-se que os valores de corrente do processo A2 foram descontados pelo valor de corrente referente ao processo A1 para construção do gráfico.

Nota-se na Figura 20 a presença de dois processos eletroquímicos, o que é condizente com os resultados mostrados na Figura 19, e que ambos os processos eletroquímicos são controlados por difusão da aminopirina até a superfície do eletrodo. Além disso, nota-se no gráfico de Levich que ambos os processos apresentam o mesmo coeficiente angular, após descontar o sinal do processo A1 no processo A2, indicando que a quantidade de elétrons é a mesma para cada um, dado que os coeficientes difusionais para cada espécie não devem diferir muito. Com isso, e pela estrutura molecular da aminopirina, sugerimos que o número de elétrons envolvidos em cada processo é igual a 1. Com base nessas observações e no estudo de pH, postulamos o seguinte mecanismo para a oxidação da aminopirina na superfície do eletrodo de platina, Figura 21.

Figura 21 - Esquema do mecanismo proposto para o processo de oxidação eletroquímica da aminopirina.

Após avaliar o comportamento eletroquímico e inferir sobre o mecanismo do processo de oxidação eletroquímico da aminopirina, foi realizada a otimização dos parâmetros da técnica de voltametria de onda quadrada e construiu uma curva analítica sob as melhores condições experimentais, Figura 22.

Figura 22 - (A) Voltamogramas de onda quadrada registrados para adições sucessivas de aminopirina em meio de tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ (pH 7,4) utilizando eletrodo de platina. Concentrações estudadas: 100 a 1000 μmol L⁻¹. Parâmetros da técnica: step de 4 mV, amplitude de 50 mV e frequência de 120 Hz. (B) Curva de calibração para oxidação da aminopirina.

Sob as melhores condições obteve-se uma faixa linear de 100 a 1000 μmol L⁻¹ com a seguinte equação de reta: $I (\mu A) = -1,223 + 0,028(C_{\text{Aminopirina}} / \mu\text{mol L}^{-1})$ e $R^2 = 0,998$. Foi estimado um limite de detecção de 22 μmol L⁻¹. Avaliou-se a repetibilidade do método proposto para o registro de 15 voltamogramas de onda quadrada sucessivos utilizando uma concentração de 300 μmol L⁻¹ de aminopirina e obteve-se um desvio padrão de 2,4%.

Verificou-se a possível interferência eletroquímica de outros compostos comumente utilizados como adulterantes da cocaína, conforme descrito na seção da parte experimental. Não foram encontradas variações significativas (maior que 5%) de pico de corrente da oxidação da aminopirina na presença desses compostos avaliados. Em seguida, realizou-se teste de adição e recuperação através da adição de aminopirina em amostras de cocaínas apreendidas (Tabela reportando a composição química das amostras encontra-se em anexos ao final da Tese) e de composição definida. Obteve-se recuperações entre 101 e 112%, o que é aceitável, podendo concluir que o método é acurado.

Uma das amostras era conhecida por adulterada por aminopirina e quando aplicado o método proposto nessa amostra, obteve-se um resultado de $(2,9 \pm 0,1) \% (m/m)$ de

aminopirina e pelo método comparativo (cromatografia gasosa acoplada com detector de ionização de chama) obteve-se um valor de $(2 \pm 4)\%$ (m/m) de adulteração da amostra, atestado novamente a exatidão do método proposto. O desvio padrão do método comparativo é alto devido à propagação das incertezas em que foi reportado o valor pelo laboratório de análise da Polícia Criminalística de São Paulo.

➤ **Desenvolvimento de sensor eletroquímico para análise seletiva de fenacetina e paracetamol**

1. Preâmbulo

Impressão molecular é uma técnica para a produção de sítios de ligações químicas altamente seletivas numa matriz polimérica visando ao reconhecimento molecular específico, e pode ser facilmente utilizada para a fabricação de sensores eletroquímicos [97-99]. Polímeros molecularmente impressos (MIP, do inglês molecularly imprinted polymers) com excelente seletividade, podem ser focados como elementos de reconhecimento molecular similares ao reconhecimento de anticorpos [97-100]. A técnica envolve, tipicamente, os três seguintes passos: (1) agregação/organização de um monômero funcional em torno de uma molécula molde numa solução contendo uma elevada porcentagem de agente de reticulação; (2) polimerização da mistura para obtenção de um polímero estável, e (3) remoção do molde para obter o polímero impresso, os locais de reconhecimento, ou as cavidades de reconhecimento molecular [97, 99]. Os MIPs oferecem uma estrutura tridimensional para o reconhecimento de moléculas do molde devido à forma de complementaridade (forma e tamanho) e as interações entre a cavidade do molde e os monômeros funcionais da estrutura polimérica. De forma geral, MIPs utilizados como sensores químicos podem ser armazenados por longo período de tempo e reutilizado muitas vezes sem perda de atividade quando comparados aos biossensores enzimáticos. Esta estabilidade é devido às suas estruturas poliméricas altamente reticuladas, que conferem a robustez física, elevada resistência mecânicas, durabilidade para calor e pressão, e a tolerância de ambientes químicos diversos [97, 99].

MIPs podem ser ferramentas poderosas para o desenvolvimento de sensores seletivos. A formação do sensor do tipo MIP proposto é baseado na polimerização de monômeros na

presença de uma molécula alvo (ou molde). O molde é em seguida removido da matriz polimérica formada, deixando as cavidades específicas para o alvo poder se ligar especificamente, conforme Figura 23.

Figura 23 - Esquema do processo de fabricação de sensor molecularmente impresso.

Polipirrol é um polímero bem estudado devido à sua fácil preparação, elevada estabilidade, e ampla gama de aplicações [101]. Uma das principais vantagens deste tipo de polímero é a possibilidade de fabricar os MIPs usando um processo de eletropolimerização, uma vez que este método de síntese possibilita o rápido e simples controle da espessura da camada de polímero condutor sobre a superfície do transdutor. Outros tipos de polímeros eletrosintetizados para impressão molecular têm sido relatados na literatura [101-103]. Uma vantagem importante de polipirrol em comparação com as outras camadas poliméricas é que ele pode ser eletropolimerizado sob condições neutras, que podem ser úteis para o aprisionamento de biocatalisadores e biomoléculas [104]. Tendo em vista essas características, desenvolveu-se um sensor molecularmente impresso através da eletropolimerização de polipirrol para detecção de fenacetina e paracetamol.

2. Materiais e Métodos

2.1. Reagentes

Foram utilizados os seguintes reagentes: pirrol, paracetamol e fenacetina foram obtidos da Sigma Aldrich (Steinheim, Alemanha); ácido perclórico, etanol e nitrato de sódio foram obtidos da Merck (Darmstadt, Alemanha). 4-(Dimetilamino) antipirina foi obtida da

Alfa Aesar (Johnson Matthey Company (Ward Hill, USA)). As soluções foram obtidas por dissolução dos reagentes em solução 1:1 (v/v) de água/etanol com $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de HClO_4 como eletrólito de suporte.

2.2. Formação do NIP (“non-imprinted polymer”)

Inicialmente, preparou-se uma solução de $12,5 \text{ mmol L}^{-1}$ de pirrol em meio de etanol/água 1:1 (v/v) com ácido perclórico $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ e para realizar a eletropolimerização na superfície eletródica do carbono vítreo. Foram registrados 5 voltamogramas cíclicos na faixa de potencial de -0,6 a 1,8 V com velocidade de varredura de 50 mV s^{-1} nessa solução e para a estabilização do filme foram registrados mais 6 voltamogramas cíclicos na mesma janela de trabalho em meio contendo apenas o eletrólito de suporte.

2.3. Formação do MIP

Para a formação do MIP eletroquimicamente, preparou-se uma solução de $12,5 \text{ mmol L}^{-1}$ de pirrol em meio de etanol/água 1:1 (v/v) com ácido perclórico $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ e adicionou-se 25 mmol L^{-1} de fenacetina. Para realizar a eletropolimerização na superfície eletródica do carbono vítreo, registraram-se 5 voltamogramas cíclicos de -0,6 a 1,8 V com velocidade de varredura de 50 mV s^{-1} nessa solução. Com o intuito de remover a molécula molde foram registrados mais 6 voltamogramas cíclicos na mesma janela de trabalho em meio de 1 mol L^{-1} de NaNO_3 .

2.4. Medidas eletroquímicas

Foram realizadas medidas por voltametria cíclica em solução de 25 mmol L^{-1} de fenacetina em meio de água/etanol na proporção 1:1 (v / v) contendo $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de HClO_4 . Para cada análise, 15 sucessivos voltamogramas cíclicos foram registrados em uma faixa de potencial de -1,0 V a 1,8 V em uma velocidade de varredura de 50 mV s^{-1} . A avaliação das

possíveis interferências no sinal eletroquímico da fenacetina foi realizada usando as mesmas condições experimentais acima para procaína, aminopirina e benzocaína a uma concentração de 25 mmol L⁻¹.

3. Resultados e Discussão

Segundo a Associação Nacional dos Peritos Criminais Federais [105], através do projeto *Perfil Químico* (PEQUI), cerca de 35% das amostras apreendidas de cocaína apresentam fenacetina atualmente. Dessa forma, empenhou-se esforços para o desenvolvimento de um sensor capaz de detectar esse analgésico amplamente utilizado para adulteração de cocaínas.

Inicialmente, realizaram-se os registros voltamétricos da fenacetina, bem como do paracetamol, que é conhecidamente um produto de degradação dessa espécie, além de procaína e benzocaína, que são dois fármacos (anestésicos) detectados usualmente em amostras de drogas apreendidas, Figura 24.

Figura 24 – Voltamogramas cíclicos registrados com eletrodo de carbono vítreo na presença (-) e ausência (--) de 25 mmol L⁻¹ de fenacetina (A), 25 mmol L⁻¹ de paracetamol (B), 25 mmol L⁻¹ de benzocaína (C) e 25 mmol L⁻¹ de procaína (D). Eletrólito suporte: etanol/água 1:1 (v/v) com ácido perclórico 0,1 mol L⁻¹. Velocidade de varredura de 50 mV s⁻¹.

A Figura 24A apresenta os voltamogramas cíclicos registrados na ausência (linha tracejada) e presença (linha cheia) de fenacetina 25 mmol L⁻¹ utilizando um eletrodo de carbono vítreo não modificado, enquanto que a Figura 25 mostra um esquema detalhado das reações envolvidas na oxidação da fenacetina já descrito anteriormente por Bussy et al e Nouri-Nigjeh et al [106, 107]. O primeiro voltamograma registrado na presença de fenacetina apresenta apenas um pico de oxidação (A2) em aproximadamente 1,1 V, que pode ser atribuído à oxidação da fenacetina (A) a N-acetil-p-benzoquinonaimina (D), que será chamado NAPQI ao longo do texto. Essa oxidação ocorre em mais de uma etapa, primeiro um intermediário (B) é formado através de uma reação eletroquímica, que em seguida sofre um ataque nucleofílico e forma o NAPQI (D) e etanol (C). O NAPQI então pode sofrer dois tipos de reação, como mostra a Figura 25, uma reação eletroquímica em que ele é reduzido à paracetamol (E) e uma reação química levando à formação de p-benzoquinona (H). Esses dois produtos formados podem ser observados nos voltamogramas do primeiro e segundo

ciclo (Figura 24A), onde um pico em 0,23 V aparece e que se refere à redução da p-benzoquinona (H) a hidroquinona (I), como mostra a Figura, e outro pico em -0,65 V que se refere à redução do NAPQI (D) a paracetamol (E). O segundo ciclo registrado, apresenta além dos três picos discutidos anteriormente, um quarto pico em 0,75 V e que pode ser atribuído à oxidação do paracetamol (E) previamente formado no primeiro ciclo a NAPQI (D) [106, 108]. Como comparativo, a Figura 24B mostra o comportamento eletroquímico do paracetamol e assim, observa-se os processos concordantes com o descrito.

Figura 25 - Esquema das reações envolvidas na oxidação da fenacetina (A) etanol (C) e N-acetil-p-benzoquinonaimina ou NAPQI (D), passando por um intermediário (B). Redução de NAPQI (D) a paracetamol (E) e transformação química desse a p-benzoquinona (H) passando por dois intermediários (F e G). Adaptado de Bussy e colaboradores [106].

Nota-se pela Figura 24(C e D), que tanto a benzocaína quanto a procaína são interferentes na análise de fenacetina utilizando-se eletrodo limpo. Assim, buscou-se o desenvolvimento de um sensor que apresentasse especificidade para essa molécula, desta forma, resolveu-se utilizar um método simples reportado na literatura para o desenvolvimento

de eletrodos modificados com polímeros molecularmente impressos (MIP) [101-103], através da eletropolimerização de polipirrol, conforme descrito na metodologia.

A Figura 26 mostra os voltamogramas cíclicos registrados durante a modificação da superfície do eletrodo de carbono vítreo com o MIP com cavidade de reconhecimento para a molécula de fenacetina.

Figura 26 - Voltamogramas cíclicos registrados com eletrodo de carbono vítreo durante a polimerização em solução de 25 mmol L⁻¹ de pirrol e 12,5 mmol L⁻¹ de fenacetina. Eletrólito suporte: etanol/água 1:1 (v/v) com ácido perclórico 0,1 mol L⁻¹. Velocidade de varredura de 50 mV s⁻¹.

Observa-se na Figura 26 uma elevada corrente de oxidação a partir de 0,8 V durante o registro do primeiro ciclo que pode estar associada à eletropolimerização do polipirrol e oxidação da fenacetina próxima à superfície eletródica. Já a partir do segundo ciclo, essa corrente diminui devido ao recobrimento da superfície do eletrodo pelo polímero formado.

Após a modificação, realizou-se uma etapa de remoção da molécula molde (fenacetina), através da varredura de potencial (-0,6 V a 1,8 V) por cinco ciclos consecutivos em uma solução de 1 mol L⁻¹ de NaNO₃, Figura 27.

Figura 27 - Voltamogramas cíclicos registrados com eletrodo de carbono vítreo modificado com MIP + fenacetina nas cavidades poliméricas em eletrólito suporte contendo 1 mol L⁻¹ de NaNO₃. Eletrólito suporte: etanol/água 1:1 (v/v) com ácido perclórico 0,1 mol L⁻¹. Velocidade de varredura de 50 mV s⁻¹.

A Figura 27 ilustra os sinais dos 3 primeiros ciclos registrados, após a formação da camada polimérica reportada na Figura 26, em solução de NaNO₃ para a remoção da fenacetina incorporada na matriz polimérica. Nota-se que para o primeiro ciclo dois sinais de oxidação próximos a 0,7 V e em 1,1 V são observados, sendo esses sinais relacionado à oxidação do paracetamol formado e da fenacetina, respectivamente. Nos sucessivos ciclos, foi observada a diminuição destes sinais até o sinal eletroquímico ficar comparável com o sinal do eletrólito suporte, mostrando que a abordagem utilizada foi eficiente para a remoção da fenacetina da matriz polimérica resultando em cavidades moleculares.

A Figura 28 mostra um esquema da fenacetina incorporada na matriz polimérica e a sua remoção para criação da cavidade molde para esse composto.

Figura 28 – Esquema ilustrativo em 2D da formação do MIP em (A) e a estrutura após a remoção da fenacetina.

Após a remoção das moléculas do interior do filme, utilizou-se o eletrodo modificado para avaliar o comportamento eletroquímico da fenacetina. Foram registrados 15 voltamogramas cíclicos sucessivos, Figura 29.

Figura 29 – Voltamogramas cíclicos registrados consecutivamente ($n = 15$ ciclos) com MIP na presença de 25 mmol L^{-1} de fenacetina em meio de etanol/água 1:1 (v/v) + ácido perclórico $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ após a remoção das moléculas de fenacetina do interior da matriz polimérica. Velocidade de varredura de 50 mV s^{-1} .

Observam-se na Figura 29 diversos processos eletroquímicos ocorrendo na superfície do eletrodo modificado com o MIP contendo as cavidades de reconhecimento para a

molécula da fenacetina. Para melhor discussão dos resultados, será dividido em algumas partes, conforme Figura 30 que apresenta o primeiro e o último ciclo (15°) registrados.

Figura 30 - Voltamogramas cíclicos registrados com MIP na presença de 25 mmol L⁻¹ de fenacetina (primeiro ciclo (--) e 15° ciclo (-)) em meio de etanol/água 1:1 (v/v) com ácido perclórico 0,1 mol L⁻¹. Velocidade de varredura de 50 mVs⁻¹.

Nota-se que no primeiro ciclo somente é observado um único pico de oxidação relativo a I_{A4} que é referente a oxidação da fenacetina para N-acetil-p-benzoquinona imina (NAPQI) após uma etapa de conversão química, conforme esquema da Figura 25, e em seguida a redução eletroquímica desta espécie gerada próxima a -0,55 V (I_{C2}), que corresponde a formação do paracetamol. A partir do segundo ciclo, observam-se outros três processos de oxidação, o pico I_{A1}, I_{A2} e I_{A3}, sendo que este último refere-se a oxidação do paracetamol gerado. Os picos I_{A1}, I_{A2} e I_{C1}, correspondem aos processos de oxi-redução do par hidroxiquinona e benzoquinona obtido a partir da hidrólise do paracetamol [107]. Todos esses processos podem ser vistos utilizando eletrodo de carbono vítreo não modificado (Figura 24), porém, quando utilizado o MIP, observa-se um incremento de corrente em todos os processos com o numero de ciclos, principalmente com relação ao pico de oxidação do paracetamol formado in-situ (I_{A3}) que agora é cerca de 1,7 vezes maior que o sinal da fenacetina após os 15 ciclos.

Uma diferença em relação aos processos redox observados com eletrodo limpo e o MIP, é o desdobramento em dois processos para oxidação da hidroxiquinona à p-

benzoquinona (Figura 31) utilizando o MIP, provavelmente sendo transferido um electrón por vez. Segundo a literatura [109], esse mecanismo pode ocorrer em filmes de polipirrol.

Figura 31- Reação redox da p-benzoquinona (H) e hidroxiquinona (I).

Observando a Figura 30, nota-se que para finalidades quantitativas, essa modificação proporcionaria uma maior seletividade e sensibilidade para analisar a fenacetina. Uma vez que, pode-se analisar a fenacetina indiretamente pelo sinal do paracetamol obtido, sendo esse pré-concentrado no interior do MIP. Ao contrário do eletrodo não modificado, em que não foi observado esse comportamento de aumento do sinal do paracetamol formado pela etapa eletroquímica-química, uma vez que, o paracetamol formado sobre a superfície não modificada do eletrodo com o MIP é possivelmente perdido por difusão para o seio da solução.

Após realizar o estudo do comportamento da fenacetina no MIP, o eletrólito foi modificado para determinar qual o melhor meio a ser trabalhado. Para tanto, além do meio estudado até o momento (água:etanol (1:1) contendo HClO_4 $0,1 \text{ mol L}^{-1}$), utilizou-se também água:acetona (1:1) contendo HClO_4 $0,1 \text{ mol L}^{-1}$; água:etanol (1:1) contendo NaClO_4 $0,1 \text{ mol L}^{-1}$; água:acetonitrila (1:1) contendo perclorato tetrabutilamônio $0,05 \text{ mol L}^{-1}$. Esses outros eletrólitos foram escolhidos com o intuito de variar a polaridade da solução e não utilizar o etanol já que este é um subproduto das reações mostradas na Figura 25, mudando de etanol para acetona ou acetonitrila; e não ter H^+ no meio, mudando de HClO_4 para NaClO_4 ou perclorato tetrabutilamônio, o que também afetaria as reações envolvidas, já que na formação do NAPQI há liberação de H^+ (reações 1 e 2), na formação do paracetamol é necessária a presença de H^+ (reação 3), na formação da p-benzoquinona há tanto o consumo quanto a liberação de H^+ (reações 4 e 5 respectivamente e na redução de p-benzoquinona para hidroxiquinona 2H^+ são necessários para que a reação ocorra. Para todos os experimentos realizados com os diferentes meios, o MIP foi obtido eletropolimerizando o pirrol (12,5

mmol L⁻¹) na presença de fenacetina (25 mmol L⁻¹) em cada um dos meios descritos anteriormente, em seguida a fenacetina foi retirada da matriz polimérica ciclando o eletrodo modificado em nitrato de sódio conforme descrito anteriormente e por fim o MIP foi colocado em uma solução contendo fenacetina e o mesmo eletrólito da modificação e quinze ciclos foram registrados. Cada conjunto de voltamogramas para cada modificação são mostrados na Figura 32.

Figura 32 - Voltamogramas cíclicos registrados com eletrodo de carbono vítreo modificado com MIP de pirrol em solução de (A) água:etanol (1:1) contendo HClO₄ 0,1 mol L⁻¹, (B) água:etanol (1:1) contendo NaClO₄ 0,1 mol L⁻¹, (C) água:acetonitrila (1:1) contendo perclorato tetrabutilamônio 0,05 mol L⁻¹ e (D) água:acetona (1:1) contendo HClO₄ 0,1 mol L⁻¹, na ausência (linhas tracejadas) e presença de fenacetina 25 mmol L⁻¹ (linhas cheias). Janela de potencial: de -1,0 a 1,8 V. Velocidade de varredura: 50 mV s⁻¹.

Comparando os quatro conjuntos de voltamogramas mostrados, diferenças no potencial dos picos, altura e proporção deles podem ser observados. Como pode ser visto, o pico da oxidação do paracetamol tem o maior valor de corrente quando a modificação foi realizada na presença de etanol e ácido perclórico (Figura 32A), já nos outros meios, os picos apresentaram aproximadamente a mesma altura. Esse aumento do pico de oxidação do

paracetamol é devido a ocorrência parcial da hidrólise química da fenacetina em meio ácido para formação da p-fenetidina, composto D (Figura 25) [110], gerando mais NAPQI que leva a formação do paracetamol in situ. O que é reforçado pela observação de menor valor de corrente para a oxidação da fenacetina, já que parte foi hidrolisada.

O maior valor de corrente foi obtido no meio contendo acetona e ácido perclórico (Figura 32D). Esse resultado é condizente com o meio trabalhado, já que não há etanol nesse meio, contrariamente a outros dois meios avaliados, que pode desfavorecer a reação de oxidação da fenacetina, já que o etanol é um dos subprodutos dessa reação (Figura 25).

O pico referente à redução da p-benzoquinona a hidroquinona é praticamente o mesmo nos meios contendo HClO_4 (Figura 32A) e perclorato tetrabutilamônio (Figura 32C), enquanto que no meio contendo água:etanol (1:1) contendo NaClO_4 $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (Figura 32B) houve um deslocamento do potencial de pico para potenciais menos positivos e um leve aumento de corrente. Como a reação de redução envolve dois H^+ (Figura 31), a pequena presença deste no meio, favorece a reação, deslocando assim o potencial de pico para valores mais negativos. Já para a reação reversa (oxidação da hidroquinona a p-benzoquinona), nos dois meios que não apresentam H^+ (Figura 32 (B e C)), os potenciais de pico foram deslocados para valores menos positivos e observam-se com maior clareza as duas etapas da oxidação.

Com os resultados obtidos, decidiu-se manter o meio de água:etanol (1:1) contendo HClO_4 $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ utilizado até o momento, já que esse apresentou a maior corrente de pico para o paracetamol. O próximo teste realizado foi com o polímero eletrodepositado na ausência de fenacetina. Esse teste tem o intuito de avaliar a resposta obtida frente à fenacetina apenas do polímero sem a presença das cavidades moldadas pela molécula em questão. Esse polímero, como já dito anteriormente é um polímero não molecularmente impresso, também conhecido como NIP, e pode ser interpretado como o branco do MIP. Dessa forma, a Figura 33 a seguir mostra quinze ciclos registrados com o NIP na presença de fenacetina 25 mmol L^{-1} . É importante destacar que todas as etapas que foram descritas para o MIP (eletrodeposição, limpeza com nitrato e registro na ausência de fenacetina - branco) foram seguidas para o NIP para garantir que as diferenças observadas entre o MIP e o NIP fossem apenas devido à presença ou não de cavidades próprias para a fenacetina.

Figura 33- Voltamogramas cíclicos registrados com eletrodo de carbono vítreo modificado com NIP de pirrol em solução de água:etanol (1:1) contendo HClO_4 $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ na ausência (linhas tracejadas) e presença de fenacetina 25 mmol L^{-1} (linhas cheias). Janela de potencial: de -1,0 a 1,8 V. Velocidade de varredura: 50 mV s^{-1} .

A Figura 33 mostra que com o NIP há também uma pré-concentração das espécies em solução ou formadas através de reações químicas e eletroquímicas. Esse acúmulo é menor do que com a utilização do MIP (vide Figura 29 e Figura 30). Por exemplo, os picos de oxidação da fenacetina, oxidação do paracetamol e redução do NAPQI chegam a ser 60% maiores no MIP do que no NIP. Esse resultado mostra que não é apenas a cavidade da fenacetina que faz com que ocorra uma pré-concentração das moléculas, a estrutura do polipirrol também permite que as moléculas sejam acumuladas em seus interstícios. De qualquer forma, o NIP ainda apresenta uma melhor resposta.

Além do meio a ser trabalhado, foi também avaliada a proporção entre fenacetina e pirrol durante a eletropolimerização do MIP. Até o presente momento, todos os experimentos foram realizados com o pirrol em uma concentração igual a $12,5 \text{ mmol L}^{-1}$ e a fenacetina a uma concentração de 25 mmol L^{-1} , o que daria uma proporção de 1 pirrol : 2 fenacetina. Optou-se por manter a concentração de pirrol constante, e diminuir a concentração da fenacetina durante a eletropolimerização, avaliando também as proporções 1 pirrol : 1

fenacetina e 1 pirrol : 0,5 fenacetina. Esse experimento teve como intuito também avaliar a importância das cavidades geradas pela fenacetina. É importante destacar que a concentração da fenacetina só foi alterada para a deposição do MIP, para os experimentos realizados após a retirada da fenacetina com nitrato, a concentração de 25 mmol L⁻¹ foi mantida.

A Figura 34 mostra os voltamogramas obtidos com o eletrodo modificado com MIP utilizando diferentes proporções de pirrol e fenacetina, na presença de fenacetina. Pode-se observar que conforme a quantidade de fenacetina diminui e consequentemente a proporção pirrol : fenacetina aumenta (voltamogramas de A até C), diminuem os valores de corrente de todos os picos, comprovando assim que são necessárias as cavidades formadas pela fenacetina durante a formação do MIP e que a melhor condição a ser trabalhada é a proporção de 1 pirrol : 2 fenacetina. Um estudo com uma concentração maior de fenacetina não foi realizado, pois soluções com concentração maior do que 25 mmol L⁻¹ não são facilmente solúveis.

Figura 34 - Voltamogramas cíclicos registrados com eletrodo de carbono vítreo modificado com MIP de pirrol em solução de água:etanol (1:1) contendo HClO₄ 0,1 mol L⁻¹ na ausência (linhas pretas) e presença de fenacetina 25 mmol L⁻¹ (linhas vermelhas). Soluções modificantes: (A) pirrol 12,5 mmol L⁻¹ e fenacetina 25 mmol L⁻¹; (B) pirrol 12,5 mmol L⁻¹ e fenacetina 12,5 mmol L⁻¹; (C) (A) pirrol 12,5 mmol L⁻¹ e fenacetina 6,25 mmol L⁻¹. Janela de potencial: de -1,0 a 1,8 V. Velocidade de varredura: 50 mV s⁻¹.

A repetibilidade do filme foi avaliada, para isso um MIP foi eletrodepositado na superfície do eletrodo de carbono vítreo e o sensor então colocado em uma solução contendo nitrato de sódio, em seguida no eletrólito e por fim em uma solução contendo fenacetina, sendo que em todas as soluções voltamogramas cíclicos foram registrados conforme descrito na parte experimental, repetindo-se esse procedimento quatro vezes, obteve-se um desvio padrão de 4%.

Em seguida, realizaram-se testes para avaliar como esse eletrodo se comporta na presença de interferentes como a benzocaína, procaína e paracetamol que são compostos potencialmente interferentes para detecção de fenacetina em eletrodo limpo, conforme mostrado na Figura 24C. Assim, inicialmente registraram-se alguns voltamogramas para verificar a resposta obtida utilizando o eletrodo modificado com MIP para a benzocaína, Figura 35A.

Figura 35- (A) Voltamogramas cíclicos registrados com MIP contendo cavidades de fenacetina na presença de 25 mmol L⁻¹ de benzocaína, (B) voltamogramas comparando o sinal de 25 mmol L⁻¹ de benzocaína para eletrodo limpo e o utilizando o eletrodo modificado com MIP contendo cavidades de fenacetina. Eletrólito de suporte: etanol/água 1:1 (v/v) com ácido perclórico 0,1 mol L⁻¹. Velocidade de varredura de 50 mV s⁻¹.

Observa-se na Figura 35 que o eletrodo modificado com MIP apresenta um pequeno sinal para benzocaína, cerca de 8 vezes menor que para o eletrodo não modificado, Figura

35B, mostrando assim que essa modificação inibe a chega da benzocaína até a superfície do eletrodo, ou seja, não permite que ela se difunda eficientemente pelo filme para a oxidação devido ao efeito estérico. Tal fato pode ser observado pelo esquema ilustrado na Figura 36.

Figura 36- Esquema mostrando a especificidade do MIP pela fenacetina em (A) e a possível entrada de benzocaína pelo filme (B).

Nota-se no esquema acima, que como o MIP foi construído tendo a fenacetina como molécula molde, essa espécie, fenacetina, pode “encaixar” perfeitamente na cavidade e até interagir pelas ligações intermoleculares de hidrogênio, conforme visto na Figura 36A. Já na presença de benzocaína, há um impedimento estérico entre a molécula e as cavidades formadas, não permitindo a interação e difusão pelo filme, o que poderia explicar o sinal obtido na Figura 35A.

Na sequência, avaliou-se a resposta para procaína e paracetamol para utilização do eletrodo modificado com o MIP da fenacetina, Figura 37.

Na ausência de fenacetina, observou-se um pequeno sinal referente à oxidação da procaína (Figura 37A), em potencial maior do que com o eletrodo limpo (cerca de 400 mV mais positivo) e com uma corrente cerca de quatro vezes menor, indicando assim que o MIP bloqueia a chegada da procaína à superfície eletródica e dificulta sua oxidação. Já com o paracetamol (Figura 37 B), como era de se esperar, um sinal bem definido é observado em 0,75 V, além dos sinais da redução do NAPQI, redução da p-benzoquinona e oxidação da hidroxiquinona.

Figura 37- Voltamogramas cíclicos obtidos com eletrodo de carbono vítreo modificado com MIP de pirrol em solução de água:etanol (1:1) contendo HClO_4 $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ na ausência (linhas tracejadas) e presença de (A) procaína 25 mmol L^{-1} ou (B) paracetamol 25 mmol L^{-1} (linhas cheias). Velocidade de varredura: 50 mV s^{-1} .

Quando os experimentos foram realizados com a mistura de fenacetina e um desses compostos, obteve-se o seguinte resultado (Figura 38).

Figura 38 - 15º Voltamogramas cíclicos obtidos com eletrodo de carbono vítreo modificado com MIP de pirrol em solução de água:etanol (1:1) contendo HClO_4 $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ na presença de fenacetina 25 mmol L^{-1} (Linhas tracejadas) ou com a mistura de (A) fenacetina 25 mmol L^{-1} e procaína 25 mmol L^{-1} ou (B) fenacetina 25 mmol L^{-1} e paracetamol 25 mmol L^{-1} (linhas cheias). Velocidade de varredura: 50 mV s^{-1} .

Observa-se na Figura 38 dois resultados distintos, na presença de procaína (Figura 38A) há uma queda na corrente de todos os picos, já com o paracetamol Figura 38 B) há um aumento de corrente. Esse último pode ser explicado pelo fato de que como dito anteriormente, o paracetamol é gerado após a oxidação da fenacetina, sendo assim, além do paracetamol que está sendo formando, mais paracetamol foi adicionado causando assim o aumento na corrente. Já a queda no sinal de corrente na presença de procaína pode ser devido ao bloqueio das cavidades do MIP pela própria procaína, diminuindo assim a concentração de fenacetina presente próxima a superfície eletródica. Esse efeito na corrente de pico poderia ser corrigido com uma calibração realizada na presença dos interferentes.

Quanto a interferência causada pelo paracetamol, isso pode ser identificado pela presença de seu pico de oxidação em $0,75 \text{ V}$ já no primeiro ciclo registrado caso ele esteja

presente na amostra. Nesse caso, a quantificação da fenacetina deve ser realizada pelo processo de oxidação em 1,1V.

Neste trabalho, buscou-se demonstrar a possibilidade e versatilidade dos polímeros molecularmente impressos para detecção de fenacetina em potencial menor (maior seletividade), através da pré-concentração do paracetamol no interior do polímero, ou ainda a possibilidade de detecção de ambos os adulterantes de cocaína na presença de outros interferentes.

Maiores estudos quanto a outros possíveis adulterantes, bem como a avaliação quantitativa do sensor devem ser avaliados futuramente.

➤ **Quantificação de Levamisol em amostras de urina sintética**

1. Preâmbulo

Levamisol é um fármaco anti-helmíntico e imunomodulador pertencente a uma classe de derivados sintéticos do imidazotiazol. Nos seres humanos, além do uso para o tratamento de parasitoses, tem sido estudado em combinação com outras formas de quimioterapia para câncer do cólon, melanoma e outros [111]. A droga foi banida dos EUA e Canadá em 2000 e 2003, respectivamente, devido ao risco de efeitos secundários graves [112]. O principal efeito tóxico da droga é a agranulocitose, uma depleção grave das células brancas do sangue que deixa os pacientes mais vulneráveis à infecção. Atualmente, o levamisol permanece em uso na veterinária como um vermífugo para bovinos.

Diversos trabalhos demonstram a identificação de levamisol como adulterante de amostras de cocaína ao redor do mundo, principalmente nos EUA, e suas graves consequências à saúde dos usuários dessa droga de abuso são reportadas [112, 113].

Tendo em vista os vieses forenses e clínicos para detecção desse composto, buscou-se o desenvolvimento de um método eletroquímico para detecção e quantificação desse composto em colaboração com doutorando Thiago Selva.

2. Materiais e Métodos

2.1. Reagentes

Foram utilizados os seguintes reagentes: H_2SO_4 , KH_2PO_4 , K_2HPO_4 , ácido acético, acetato de sódio e NaOH foram obtidos da Merck (Darmstadt, Germany). Levamisol foi obtido da Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany).

2.2. Estudos mecanísticos da oxidação do Levamisol

Foram realizados estudos voltamétricos do levamisol em diferentes materiais eletródicos (Au, Pt, Cu, Carbono vítreo e diamante dopado com boro (DDB). Para o eletrodo de DDB, avaliou-se os perfis voltamétricos do levamisol em diferentes valores de pH, usando uma concentração de $0,1 \text{ mmol L}^{-1}$ do composto pela técnica de voltametria de onda quadrada.

Com o intuito de avaliar os produtos formados pela oxidação do levamisol na superfície do eletrodo foram realizados experimentos em diferentes tempos de eletrolise utilizando eletrodo de DDB em $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de tampão acetato de amônio/hidróxido de amônio pH 10 à potencial de 1,5V. A cada hora de eletrólise foi retirada uma alíquota da solução e injetada no espectrômetro de massas 6430 triplo-quad (Agilent Technologies, Santa Clara, CA) com ionização por eletrospray e operado no modo positivo.

2.3. Quantificação e parâmetros analíticos do método

Para quantificação, foi construída a curva de calibração empregando a técnica de voltametria de onda quadrada na faixa de potencial de 0,5 a 1,6 V utilizando o eletrodo de DDB pré-tratado catodicamente, com os seguintes parâmetros otimizados: passo de potencial de 10 mV, amplitude de 50 mV e frequência de 100 Hz em meio de NaOH $0,1 \text{ mol L}^{-1}$.

Os testes de estabilidade e reprodutibilidade foram avaliados após o registro de 10 voltamogramas em solução de levamisol $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ em meio de NaOH $0,1 \text{ mol L}^{-1}$.

3. Resultados e Discussão

Primeiramente, registraram-se voltamogramas cíclicos do levamisol em meio de NaOH $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ para avaliar o perfil voltamétrico deste composto em diferentes materiais eletródicos, conforme Figura 39.

Figura 39 - Voltamogramas cíclicos registrados em solução $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de NaOH na ausência (- -) e presença (-) de 1 mmol L^{-1} de levamisol. Eletrodos utilizados: (A) cobre, (B) carbono vítreo, (C) platina, (D) ouro e (E) DDB pré-tratado catódicamente. Velocidade de varredura de 100 mV s^{-1} .

Observa-se na Figura 39 que dentre todos os materiais eletródicos avaliados, somente as superfícies de carbono (carbono vítreo e DDB) propiciam a oxidação de levamisol, por volta de $1,2 \text{ V}$, sendo que o DDB é o que propicia o melhor sinal analítico, menor sinal de fundo e menor potencial de oxidação. Desta forma, iniciaram-se os estudos, do uso de DDB

como sensor para quantificação do levamisol. Após essa etapa avaliou-se o efeito do pH na resposta eletroquímica do levamisol, Figura 40.

Figura 40- Voltamogramas de onda quadrada registrados utilizando eletrodo de DDB pré-tratado catodicamente para solução de $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ de levamisol em diferentes pHs: ácido sulfúrico $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ (pH = 0,35), tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH = 3,0), tampão acetato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH = 5,0), tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH = 7,0), tampão borato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH = 9,0) e solução NaOH $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH = 12,5). Parâmetros: passo de potencial de 10 mV, amplitude de 50 mV e frequência de 100 Hz.

É possível notar que a oxidação do levamisol é dependente do pH do meio, sendo que ocorre um favorecimento do processo de oxidação do composto com o aumento do pH, ou seja, é possível oxidar o composto em potenciais menores com o aumento do pH do meio, conforme Figura 41.

Observa-se na Figura 40 que em meios fortemente ácidos 2 processos de oxidação (P1 e P2) são observados, sendo que é claro a distinção de 2 processos bem definidos em pH = 0,35 e pH = 3, já em pH = 5 nota-se um pico largo com um “ombro”, comprovado a partir da deconvolução dos sinais. A partir deste valor, observa-se apenas um processo que continua dependente do pH até o valor de pH = 9, e constata-se um decréscimo de sinal de corrente

para esse valor de pH, o que pode estar associado com o eletrólito utilizado. A Figura 41 apresenta a dependência do potencial de pico pelo pH.

Figura 41 – Gráfico da dependência do potencial de pico (E_p) em função do pH para o processo de oxidação do levamisol.

A partir do gráfico acima, é possível calcular as duas equações que regem o comportamento do potencial de pico (E_p) em função do pH, equações 1 e 2.

$$E_{P1} \text{ (V)} = 2,069 - 0,100\text{pH, para } 0,35 < \text{pH} < 5,0 \quad (1)$$

$$E_{P2} \text{ (V)} = 2,068 - 0,060\text{pH, para } 3,0 < \text{pH} < 9,0 \quad (2)$$

Verifica-se que para o processo 1, um coeficiente angular de 100 mV/pH, o que indica que o processo ocorre com a dependência de 2 prótons para um elétron transferido. Já o processo 2, que ocorre apenas em condições ácidas, apresenta um coeficiente angular de 60 mV/pH, o que corrobora com o valor esperado de 59,16 mV/pH previsto pela equação de Nernst para um processo envolvendo um elétron e um próton.

Realizaram-se registros voltamétricos do composto variando a velocidade de varredura da técnica para verificação da natureza do transporte de massa e observou-se que os valores de corrente de pico aumentam linearmente com o aumento da raiz quadrada da velocidade de varredura, indicando que o processo é governado por difusão.

Para melhor compreensão do mecanismo de oxidação, resolveu-se realizar o registro dos espectros de massas após diferentes tempos de eletrólise de uma solução $50 \mu\text{mol L}^{-1}$ de levamisol, conforme Figura 42.

Figura 42 – Espectros de massas obtidos da solução padrão de $50 \mu\text{mol L}^{-1}$ de levamisol em diferentes tempos de eletrólise da solução (0 a 5 horas submetidos a potencial de 1,5 V).

Observa-se na Figura acima, que o espectro de massas para a solução padrão sem sofrer eletrólise apresenta apenas um pico de razão massa carga de 205, que é referente ao levamisol na forma protonada e que a partir de 1 hora de eletrólise, esse pico reduz drasticamente e nota-se o surgimento de novos picos relacionados ao processo de oxidação do levamisol. Para melhor visualização desses picos, construiu-se um gráfico, Figura 43 com apenas o espectro de massas resultante após eletrólise de 5 horas.

Figura 43 - Espectro de massas obtido após 5 horas de eletrólise de uma solução padrão de levamisol $50 \mu\text{mol L}^{-1}$ (potencial aplicado de 1,5 V).

Evidencia-se na Figura 43 que o pico do composto molecular já é menor que dos compostos resultantes após a eletrólise. A Figura 43 ilustra os picos majoritários destacados, e dessa forma, nota-se que o processo de oxidação deste composto é complexo, uma vez que possivelmente é via radicalar com a formação de oligômeros, uma vez que ocorre a formação de compostos com massas muito superiores ao do próprio composto.

Na literatura, encontra-se um estudo voltamétrico recente do levamisol realizado pelo grupo do Prof. Dr. Fatibello [114], em que utilizaram o eletrodo de DDB, mas pré-tratado anodicamente. As condições ótimas reportadas são bem diferentes, sendo que a melhor condição foi em meio de ácido sulfúrico $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ e não observaram 2 processos de oxidação como foi obtido nos resultados mostrados nessa tese. O potencial de detecção reportado por eles foi de 1,9 V, o que deve apresentar uma menor seletividade frente ao método aqui proposto, já que a detecção seria feita em 1,2 V.

Nesse trabalho [114], os autores propuseram um mecanismo de oxidação do levamisol, baseado na oxidação do enxofre presente no grupo tiazolidínico da estrutura. Porém, o mecanismo de oxidação proposto apresenta a liberação de 2 prótons para o meio, o que deve ser extremamente desfavorecido em meio de ácido sulfúrico $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ como

eletrólito suporte e os próprios autores descrevem que o meio ácido é a melhor condição analítica, o que dificultaria o processo de oxidação do levamisol, resultando em perda de sensibilidade e seletividade.

Nossos resultados não corroboram com o resultado observado na literatura [114], uma vez que em condições alcalinas os sinais obtidos foram melhores (maior corrente e em menor potencial), conforme discussão acima e Figura 40. A diferença entre os resultados, talvez, pode estar relacionada a diferença do tratamento prévio da superfície do eletrodo, já que grupos terminais do diamante devem ser hidrofílicos no caso deles e hidrofóbicos no nosso.

Segundo Xiao e colaboradores [115], o levamisol pode ser oxidado formando um cátion radical na amina aromática, baseado nessa observação e nos dados obtidos, foi proposto um possível mecanismo para oxidação do levamisol, conforme Figura 44.

Figura 44 - Esquema proposto para o mecanismo de oxidação do levamisol.

O mecanismo proposto é baseado primeiramente na oxidação da amina aromática para formação de um cátion radical no nitrogênio (etapa 1). A ligação C=N faz um efeito de estabilização nesse radical formado. Após uma etapa de desprotonação (etapa 2), ocorre um equilíbrio para delocalização do radical para o carbono, que apresenta uma estabilização devido ao efeito doador de elétron ou conjugação apresentada pelo grupo fenílico. Em

seguida, os radicais formados reagem através de mecanismos radicalares, para formação de oligômeros, conforme espectro de massas. Devido à complexidade dessas reações, propusemos apenas uma estrutura possível, com massa semelhante a um dos picos encontrados na espectrometria de massas, haja visto que, deve refletir de modo geral a massa do composto com o incremento de uma unidade devido a inserção de um próton pela ionização no eletrospray.

Maiores estudos quanto a caracterização dos compostos formados para melhor elucidação do mecanismo será realizado, para tanto, deve-se realizar a eletrólise novamente e fazer a extração e purificação dos compostos formados para então ser viável a obtenção de espectros de infravermelho e massas de cada composto para elucidar as estruturas.

Após uma proposta do mecanismo de oxidação, avaliou-se a resposta analítica para quantificação do levamisol, através da construção de uma curva analítica, Figura 45.

Figura 45- Voltamogramas de onda quadrada registrados utilizando eletrodo de DDB em solução de NaOH 0,1 mol L⁻¹ para concentrações de levamisol na faixa de 0,5 - 151 μmol L⁻¹ sob as melhores condições analíticas. Parâmetros: passo de potencial de 10 mV, amplitude de 50 mV e frequência de 100 Hz. Em destaque encontra-se inserida a respectiva curva analítica.

Na Figura 45 observa-se uma boa linearidade na faixa de trabalho avaliada (0,5 - 151 μmol L⁻¹) e obteve-se uma equação da reta cuja regressão linear pode ser descrita pela equação: $I (\mu A) = -0,30 + 0,56[C_{LEV} (\mu mol L^{-1})]$, $R^2 = 0,998$. A estabilidade da resposta para a concentração de 50 μmol L⁻¹ de levamisol foi avaliada pelo registro de 10 voltamogramas de onda quadrada, onde se obteve um desvio padrão médio das medidas de 3,9%.

Devido à limitação de tempo, deve-se realizar a aplicação do método proposto para análise do levamisol em amostras reais de cocaína apreendidas, assim como avaliar os possíveis interferentes para o método proposto.

**Desenvolvimentos de sensores portáteis e de baixo custo utilizando
plataformas de papel**

❖ Métodos Colorimétricos em substratos de papel para detecção de adulterantes de drogas de abuso

➤ Desenvolvimento de sensor colorimétrico em papel para detecção de procaína em amostras de cocaína

1. Preâmbulo

A procaína é um fármaco anestésico local, sendo que seu nome comercial mais conhecido é a novocaína, ela foi amplamente utilizado em procedimentos odontológicos por apresentar uma rápida ação anestésica, através do bloqueio dos canais de cálcio [116]. Além da ação anestésica, a procaína também tem mostrado um efeito antidepressivo e antiestresse, porém, caiu em desuso devido a apresentar alguns efeitos adversos como convulsões, bradicardia, arritmias prolongadas e hipotensão grave. Sendo assim, dentro do contexto de automedicação, é de suma importância a limitação dos medicamentos dentro dos padrões preestabelecidos [117, 118].

Devido a essas características anestésicas e seu baixo custo, a procaína também vem sendo utilizada como um dos adulterantes de cocaína, com a intenção de mimetizar os efeitos característicos da cocaína, como por exemplo, causar dormência no teste sensorial (língua e lábios) [119].

A análise colorimétrica tem atraído grande atenção por ser uma poderosa ferramenta de análise qualitativa, sendo importantíssima para tomada de decisão em casos que requeiram rápida resposta [120, 121]. A análise de spot-test tem como objetivo rapidez, baixo custo, portabilidade e simplicidade. Além disso, os *spots tests* apresentam a vantagem de possibilitarem a análise em um amplo número de substratos com um baixo consumo de amostra.

Com isso, desenvolveu-se juntamente com a aluna de iniciação científica Thalita G. Silva um método colorimétrico em substratos de papel para análise e identificação de procaína em amostras de cocaína apreendidas.

2. Materiais e Métodos

2.1. Reagentes

Foram utilizados os seguintes reagentes: fenacetina, lidocaína, procaína, levamisol, paracetamol e benzocaína obtidas da Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA). Aminopirina foi obtida da Alfa Aesar (Johnson Matthey Company). Nitrito de sódio, hidróxido de sódio, ácido cromotrópico (CTA) e etanol foram comprados da Merck (Darmstadt, Alemanha). As amostras de cocaína apreendidas foram obtidas do Instituto de Criminalística de São Paulo e foram maceradas e homogeneizadas. Todas as soluções foram preparadas em meio aquoso, exceto benzocaína, lidocaína, fenacetina e amostras de cocaína que foram solubilizadas em meio de etanol/água 1:1 v/v. As amostras de cocaína de apreensão foram qualitativamente e quantitativamente analisadas pelos peritos quanto a composição dos adulterantes presentes, utilizando a técnica de cromatografia gasosa acoplada com detector por ionização de chama, vide Tabela completa em anexo ao final da Tese.

2.2. Fabricação dos sensores em papel

O desenho dos dispositivos para *spot tests* colorimétricos foram realizados utilizando o software CorelDRAW® X6 e impressos em cera sobre o papel de filtro qualitativo através da impressora Xerox ColorQube 8570 (Norwalk, Connecticut, USA). Os padrões consistiam em círculos de 2 mm de diâmetro delimitados por deposição de cera no substrato celulósico. Após a deposição da cera sobre o papel, esse era levado à prensa térmica para aquecimento por 3 min a 120 °C para provocar o derretimento e penetração da cera entre as fibras do papel. Após essa etapa, na face oposta era colocada uma fita adesiva transparente para prevenir a perda de solução através do papel e para adicionar maior integridade física ao dispositivo.

2.3. Análise colorimétrica

Primeiramente, foi realizado um estudo espectrofotométrico para observar a viabilidade do método empregado, que consistia em realizar uma reação de diazotização com a procaína, através da reação com nitrito de sódio em meio ácido e em seguida o composto formado reage com ácido cromotrópico em meio alcalino formando um composto róseo [122, 123]. Os espectros de absorbância foram realizados em espectrofotômetro UV-vis modelo U-3000 (HITACHI, Tóquio, Japão) com cubeta de quartzo de 1,00 cm de caminho ótico.

Nos testes colorimétricos em papel foi previamente adicionada uma alíquota de solução alcalina do cromóforo (CTA) no *spot* e então foi adicionada a solução de procaína previamente diazotizada. Na seção de resultados e discussão serão apresentados os testes para avaliar as melhores condições reacionais. A melhor condição analítica foi obtida com a adição de 0,5 μL de solução de CTA 2 mg mL^{-1} em meio de NaOH 0,2 mol L^{-1} e 0,5 μL de solução contendo procaína em meio de NaNO_2 0,8 mmol L^{-1} + HCl 0,1 mol L^{-1} . Os testes de adição e recuperação foram realizados pela adição de procaína em amostras reais de cocaína apreendidas em uma concentração final em solução de 0,05 mmol L^{-1} com o intuito de avaliar a exatidão do método

As imagens dos testes colorimétricos foram obtidas através de um scanner comum e utilização do software GIMP2® que convertia as imagens para escala de cinza e então obtinham-se as intensidades relativas para cada teste.

2.4. Estudo de interferência

Foi avaliada a seletividade do sensor para os principais adulterantes de amostras de cocaína. Foram testadas as possíveis interferências de lidocaína (Lid), benzocaina (Ben), fenacetina (Fen), levamisol (Lev), paracetamol (Par), aminopirina (Amp) e cafeína (Caf) no teste colorimétrico para as concentrações de 0,05 mmol L^{-1} nas melhores condições analíticas.

2.5. Tratamento eletroquímico das amostras

Com o intuito de mitigar a interferência causada por outro adulterante, uma eletrólise exaustiva foi utilizada antes do teste colorimétrico. Com essa finalidade foi utilizado um potenciostato portátil DropSens (Oviedo, Espanha) com eletrodos impressos e descartáveis de carbono visando à manutenção da portabilidade e facilidade do método. Nesse sistema, os melhores parâmetros obtidos para oxidação preferencial da benzocaína sem comprometimento significativo da procaína, foram: aplicação de potencial de 1,2 V por 30 min em 40 μL de uma solução contendo 0,1 mmol L^{-1} dos compostos em $\text{HCl } 0,1 \text{ mol L}^{-1}$. A solução foi adicionada diretamente sobre os eletrodos e após a eletrólise, uma alíquota de 0,5 μL da solução foi utilizada para os testes colorimétricos. Verificada a viabilidade de remoção da interferência, um sistema integrando a plataforma de papel de filtro e tratamento eletroquímico foi proposto.

2.6. Fabricação do dispositivo em papel integrando o pré-tratamento eletroquímico

Criamos o dispositivo usando a mesma abordagem utilizada para a análise colorimétrica relatada anteriormente apenas modificando o padrão impresso. O padrão específico consistiu de dois círculos brancos com um diâmetro de 8 mm espaçados entre si em 1 cm por uma barreira de cera. A zona não impressa do primeiro círculo foi removida usando um furador e o eletrodo impresso foi anexado com uma fita dupla face. Esta região foi utilizada como zona de amostragem e para realizar o pré-tratamento eletroquímico. O segundo círculo de 8 mm foi impresso com o canal de 2 mm de largura e 2 cm de comprimento contendo uma região circular no meio para o processo de derivatização (reação de diazotização) e um *spot* final para a detecção colorimétrica. O *design* e as dimensões do dispositivo final para detecção colorimétrica são apresentados na Figura 56.

3. Resultados e discussão

Inicialmente, foi avaliado um método de detecção para procaína que é baseado na diazotização da procaína seguida de uma reação de acomplamento com um agente

cromóforo, conforme reportado na literatura [122, 123]. O mecanismo de detecção da procaina envolve duas etapas, conforme o esquema da Figura 46.

Figura 46 - Representação esquemática da diazotização da procaina e acoplamento com o ácido cromotrópico para formar o composto colorido.

A procaina foi adicionada em meio ácido contendo nitrito de sódio para reação de diazotização entre o grupo amino e o ácido nitroso (formado *in situ* como resultado do nitrito de sódio em meio fortemente ácido), formando o composto (I). Em seguida, a reação de acoplamento entre a procaina diazotizada e o ácido cromotrópico em meio alcalino forma um corante rosa intenso e solúvel em meio aquoso (composto (II)) que exibe um máximo de absorbância em 505 nm.

A Figura 47A ilustra a resposta colorimétrica para diferentes concentrações de procaina e a Figura 47B mostra os espectros de absorbância destas soluções. Observa-se uma variação de cor de alaranjado para um vermelho alaranjado com o aumento da

concentração de procaína, bem como uma boa linearidade entre a absorbância e a concentração da procaína.

Figura 47- A) Foto do teste colorimétrico para diferentes concentrações de procaína: 0,01 mmol L⁻¹ (A), 0,05 mmol L⁻¹ (B), 0,1 mmol L⁻¹ (C) e 0,2 mmol L⁻¹ (D). B) Espectros de absorção das soluções em (A).

Após a verificação da potencialidade do método para identificação visual da procaína, foram realizados experimentos em substratos de papel, para o desenvolvimento de método que propicie a análise em campo de forma simples e rápida. Alguns parâmetros químicos que poderiam afetar a eficiência reacional como a concentração de ácido e nitrito de sódio para a reação de diazotização e a concentração do cromóforo (CTA), bem como a alcalinidade do meio foram avaliados para resultar em melhor detectabilidade da procaína.

Inicialmente, investigou-se o efeito da concentração de nitrito para a resposta colorimétrica no sensor em papel. Cinco diferentes concentrações de nitrito de sódio foram avaliadas e a melhor resposta de intensidade de cor para procaína foi obtida ao se utilizar nitrito 0,8 mmol L⁻¹, conforme Figura 48. Dessa forma, essa concentração foi utilizada para os próximos experimentos.

Figura 48- A) Fotografia das respostas colorimétricas da procaína, em triplicata, em diferentes concentrações de nitrito de sódio na faixa de 0 a 1 $mmol\ L^{-1}$. Concentrações dos reagentes: procaína 0,05 $mmol\ L^{-1}$, HCl 0,1 $mol\ L^{-1}$, NaOH 0,1 $mol\ L^{-1}$ e CTA 2 $mg\ L^{-1}$. B) Gráfico reportando a intensidade relativa para as diferentes concentrações de nitrito de sódio.

Outro parâmetro que afeta a taxa de diazotização é a acidez do meio. A concentração de HCl adicionada foi então avaliada na faixa de 0,025 a 0,4 $mol\ L^{-1}$, Figura 49. A melhor resposta analítica foi obtida no teste colorimétrico ao se utilizar HCl 0,1 $mol\ L^{-1}$, sendo esse parâmetro escolhido para os outros testes.

Figura 49- A) Fotografia da resposta colorimétrica da procaína, em triplicata, em diferentes concentrações de HCl na faixa de 0,025 a 0,4 $mol\ L^{-1}$. Concentrações dos reagentes: procaína 0,05 $mmol\ L^{-1}$, $NaNO_2$ 0,8 $mmol\ L^{-1}$, NaOH 0,1 $mol\ L^{-1}$ e CTA 2

mg L⁻¹. B) Gráfico reportando a intensidade relativa para as diferentes concentrações de HCl.

O efeito da concentração de CTA na intensidade de cor do método foi estudado na faixa de concentrações de 0,1 a 2 mg L⁻¹. A melhor resposta analítica foi obtida ao se utilizar uma concentração de 2 mg L⁻¹, Figura 50.

Figura 50 - A) Fotografia das respostas colorimétricas da procaína, em triplicata, em diferentes concentrações de CTA na faixa de 0,1 a 2 mg L⁻¹. Concentrações dos reagentes: procaína 0,05 mmol L⁻¹, NaNO₂ 0,8 mmol L⁻¹, NaOH 0,1 mol L⁻¹ e HCl 0,1 mol L⁻¹. B) Gráfico reportando a intensidade relativa para as diferentes concentrações de CTA.

Finalmente, foi avaliada a concentração ótima de hidróxido de sódio que propiciaria a melhor condição para formação do composto colorido detectado (composto (II)). As concentrações de NaOH foram avaliadas entre 0,025 and 0,4 mol L⁻¹. A intensidade relativa de cor aumenta com a concentração de NaOH até 0,2 mol L⁻¹, Figura 51, assim, esse valor foi escolhido como ótimo para realização dos outros testes.

Figura 51- A) Fotografia das respostas colorimétricas da procaína, em triplicata, em diferentes concentrações de NaOH na faixa de 0,025 and 0,4 mol L⁻¹. Concentrações dos reagentes: procaína 0,05 mmol L⁻¹, NaNO₂ 0,8 mmol L⁻¹, CTA 2 mg L⁻¹ e HCl 0,1 mol L⁻¹. B) Gráfico reportando a intensidade relativa para as diferentes concentrações de NaOH.

Após a escolha de todos os parâmetros que resultariam na melhor detectabilidade do método, avaliou-se a influência do diâmetro do spot no parâmetro da intensidade relativa. Para tanto, foram adicionados 0,5 µL de solução de procaína 0,05 mmol L⁻¹ em cada spot, visando manter o mesmo número de mols do analito para cada diametro (1 a 6 mm), Figura 52. Observou-se que o spot de menor diâmetro gerava a maior intensidade de cor, o que é coerente, haja vista que se obtém a maior densidade de espécies coloridas por unidade de área. Entretanto, há uma maior irreprodutibilidade na fabricação de spots de 1 mm devido à etapa de aquecimento durante a fabricação do sensor, desta forma, escolheu-se o diâmetro de 2 mm o melhor tamanho do spot.

Figura 52- A) Fotografia da resposta colorimétrica da procaína, em triplicata, em diferentes diâmetros de spot (1-6 mm). Concentrações dos reagentes: procaína $0,05 \text{ mmol L}^{-1}$, NaNO_2 $0,8 \text{ mmol L}^{-1}$, CTA 2 mg L^{-1} , NaOH $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ e HCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$. B) Gráfico reportando a intensidade relativa para os diferentes diâmetros de spot test.

Construiu-se uma curva analítica para procaína na faixa de 5 a $400 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ nas melhores condições experimentais dos parâmetros estudados, Figura 53. Observa-se boa linearidade na faixa de 5 a $60 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$, com a seguinte equação da reta: (intensidade relativa) = $5,068 + 942,5 (C/\text{mmol L}^{-1})$, $R^2 = 0,99$. O limite de detecção foi calculado pela multiplicação de três vezes o desvio padrão do branco dividido pela inclinação da reta do gráfico (sensibilidade) ($3\sigma/\text{sensibilidade}$). O limite de detecção e quantificação foram calculados como $0,9$ e $3,0 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$, respectivamente.

Figura 53 - Fotografia das respostas colorimétricas da procaína, em triplicata, em diferentes concentrações da mesma (0 a $0,4 \text{ mmol L}^{-1}$). B) Curva analítica obtida das intensidades relativas para as diferentes concentrações de procaína.

Antes de iniciar os testes com as amostras reais de procaína verificou-se a resposta do dispositivo em papel para os principais adulterantes comumente encontrados nessas amostras. Testou-se a interferência da lidocaína (Lid), benzocaína (Ben), fenacetina (Fen), levamisol (Lev), paracetamol (Par), aminopirina (Amp) e cafeína (Caf) para o método proposto, Figura 54A, e o efeito de cada composto para o sinal colorimétrico da procaína (Pro), Figura 54B. Todos os possíveis interferentes foram avaliados na concentração de $0,05 \text{ mmol L}^{-1}$ sob as melhores condições analíticas e nenhum, exceto a benzocaína, apresentou variação na intensidade de cor da procaína maior que 3,5%.

Figura 54- A) Fotografia das respostas colorimétricas em triplicata para procaína (Pro), benzocaína (Ben), lidocaína (Lid), cafeína (Caf), aminopirina (Amp), fenacetina (Fen), levamisol (Lev), e paracetamol (Par) na concentração de $0,05 \text{ mmol L}^{-1}$. B) Teste de interferência de cada adulterante na presença de procaína. C) Gráfico da intensidade relativa de cor para interferência de cada adulterante individualmente e as correspondentes misturas binárias.

A interferência química da benzocaína para este método pode ser explicada pelo fato da benzocaína possuir uma estrutura química similar à procaína, pois contém uma amina primária aromática que permite a formação do sal de diazônio, e consequentemente, o acomplamento azo com o CTA para formar o composto colorido. Assim, propôs-se o uso de técnicas eletroquímicas para oxidar preferencialmente o grupo amino da benzocaína e assim obter seletividade no método colorimétrico.

Primeiramente, avaliamos os perfis voltamétricos de ambas as espécies usando eletrodo de carbono, e visando manter a portabilidade e praticidade do método, foram usados eletrodos impressos e descartáveis da DropSens®. A benzocaína apresenta um processo de oxidação em potencial menor que a procaína, cerca de 50 mV.

Avaliamos a melhor condição analítica para análise da procaína que resultasse na mínima interferência da benzocaína. Otimizou-se o potencial aplicado e o tempo de eletrólise da solução. O melhor resultado foi obtido através da utilização de um potencial de 1,2 V por 30 min em uma pequena alíquota (40 μL) de solução em meio de HCl 0,1 mol L^{-1} antes da reação colorimétrica. Nesse estudo, foi avaliado a adulteração 1:1 m/m na concentração de 0,05 mmol L^{-1} para a procaína e benzocaína.

A Figura 55B mostra a comparação da resposta colorimétrica com e sem tratamento eletroquímico para essas duas espécies.

Figura 55- A) Fotografia das respostas colorimétricas em triplicata para procaína e benzocaína, não tratadas e tratadas eletroquimicamente na concentração de 0,05 mmol L^{-1} sob as melhores condições analíticas. B) Gráfico da intensidade relativa de cor para as amostras não tratadas e tratadas eletroquimicamente.

Após o pré-tratamento eletroquímico, a intensidade do sinal da procaína caiu cerca de 10% devido a oxidação de uma pequena parcela das moléculas de procaína, porém a benzocaína exibe uma queda pronunciada de aproximadamente 96%, Figura 55B. Assim, quando aplicado esse tratamento eletroquímico prévio, obtivemos uma perda de 10% em sensibilidade, mas um expressivo ganho (96%) em seletividade.

Dada as características microfluídicas do papel, é possível o acoplamento do sistema eletroquímico nesse substrato, seja anexando os eletrodos ao papel [45] ou pelo preparo dos eletrodos diretamente sobre o papel (pintando os eletrodos sobre o substrato de papel) [39, 48]. Com isso, propusemos um dispositivo integrando todo o processo analítico,

desde o pré-tratamento da amostra até as reações etapa por etapa para formar o composto colorido após a reação de diazotização. A Figura 56 ilustra uma representação da construção do dispositivo proposto.

Figura 56 - Esquema da fabricação do dispositivo de análise proposto para integração eletroquímica e colorimetria.

A análise neste dispositivo foi realizada pela aplicação de 40 μL de solução de amostra sobre a região dos eletrodos (zona da amostragem). Após este processo, um pré-tratamento eletroquímico (aplicação de 1,2 V durante 30 minutos) é realizado e em seguida, o dispositivo é dobrado sobrepondo as duas regiões circulares de 8 mm (Etapa 1 - Figura 57). Assim, a solução percola o canal passando por uma zona intermediária, onde ocorre a etapa de diazotização (reação com nitrito em meio ácido previamente pipetado e seco no papel), e finalmente atinge o ponto de detecção no local onde ocorre a reação de acoplamento entre procaína diazotizada com o CTA em meio alcalino (também previamente impregnado no papel), conforme esquema da Figura 57.

Figura 57- Representação esquemática do procedimento para análise de procaína usando o dispositivo em papel integrando pré-tratamento eletroquímico.

O desempenho e uso desses dispositivos podem ser vistos através do escaneamento dos QR code gerados, Figura 58, para os vídeos registrados de experimentos reais com solução de procaína (A) e benzocaína (B) $0,1 \text{ mmol L}^{-1}$.

A)

B)

Figura 58 - Código de barras bidimensional (QR code) para os vídeos registrados de experimentos reais com (A) procaína e (B) benzocaína $0,1 \text{ mmol L}^{-1}$ utilizando o dispositivo em papel integrando todas as etapas para análise.

Após checar a interferência dos principais adulterantes em amostras de cocaína e obter uma boa seletividade para a procaína, verificamos a acurácia do sensor com o protocolo de adição e recuperação em amostras de cocaínas. A Tabela 4 apresenta os resultados dos testes de recuperação para as amostras com composição química definida por cromatografia. Todas as amostras foram adicionadas uma quantidade de procaína para obter uma 0,05 mmol L⁻¹ em solução.

Tabela 4- Composição química de 7 amostras de cocaínas de apreensão identificadas por cromatografia gasosa com detector por ionização de chama e os valores de recuperação de procaína pela metodologia colorimétrica proposta.

Amostras	Compostos encontrados nas amostras de cocaínas apreendidas/ % (m/m)							Recuperação da procaína^b /%
	Fen ^a	Caf ^a	Lid ^a	Par ^a	Amp ^a	Lev ^a	Coc ^a	
A	6,4	--	1,1	--	--	--	60,2	93,3
B	1,4	22,4	1,4	? ^c	--	--	16,8	93,3
C	0,7	30,6	6,7	? ^c	--	--	10,7	89,5
D	0,7	33,3	21,2	--	--	2,7	24,1	100,0
E	--	59,7	2,8	--	--	6,3	16,9	103,8
F	1,1	--	--	--	2,0	--	81,6	88,7
G	--	0,7	--	--	--	--	91,8	97,8

^a resultados obtidos por cromatografia gasosa

^b Metodologia colorimétrica proposta

^c Composto foi identificado mas não quantificado

Como pode ser observado na Tabela 4, este método proporciona altos níveis de recuperação e boa acurácia. Assim, dado os excelentes parâmetros analíticos, esse dispositivo é promissor para a análise em campo.

➤ **Desenvolvimento de sensor colorimétrico em papel para detecção de fenacetina**

1. Preâmbulo

No Brasil, a Polícia Federal implementou desde 2006 um programa de caracterização química de drogas ilícitas [15]. O Projeto PeQui (Perfil Químico de drogas) que fornece informações da polícia científica sobre os resultados químicos forenses, desde a origem da droga até correlações de apreensões com todas as análises químicas detalhadas. O projeto já conta uma rede de 30 laboratórios de química forense, que inclui todos os 27 estados brasileiros e o Instituto Nacional de Criminalística (NIC, em Brasília, DF)[13].

Acerca da adição de adutlerantes, sua presença tem variados motivos, como já dito, para aumentar a massa, diluir, complementar e intensificar o efeito da droga, além disso, existem adulterantes não intencionais, que são subprodutos das técnicas de produção e/ou provenientes do processo de armazenamento.

De acordo com os resultados do projeto PeQui, entre os adulterantes identificados, a fenacetina foi o mais abundante, cerca de 30% do total de amostras de cocaínas apreendidas continham este fármaco no Brasil.

Cafeína e paracetamol têm duplo propósito como adulterantes, são agentes espessantes e imitam o efeito da droga (cafeína tem propriedade estimulante como a cocaína e anfetamina, e paracetamol têm características analgésicas similares à heroína). A procaína e a lidocaína têm propriedades anestésicas semelhantes à cocaína; já a fenacetina, além de analgésica, é fisicamente semelhante à cocaína, ademais, esta é proibida em muitos países devido às associações entre seu uso com doenças de insuficiência renal e suspeita de carcinogenicidade [124]. Essas adulterações são evidentemente muito perigosas visto que a mistura de fármacos pode causar efeitos danosos adicionais aqueles já esperados pelo consumo da droga.

As técnicas atualmente mais utilizadas para esses tipos de análises são cromatográficas com detecção espectrométrica e assim requerem alto custo de aparelhagem, manutenção e pessoal bem treinado para manuseio desses equipamentos. Tendo em vista a

necessidade de métodos fáceis e portáteis que propiciem análises de viéses forenses/criminalísticos diretamente no local do fato ocorrido, torna-se imprescindível o desenvolvimento de metodologias robustas, de baixo custo, acessíveis e de fácil execução pelos operadores e que forneça resposta rápida para tomada de decisão diretamente em campo. Assim, em colaboração com a aluna de iniciação científica Gabriela O. da Silva, buscou-se o desenvolvimento de método analítico colorimétrico portátil e de fácil uso para detecção de fenacetina e paracetamol para futuras aplicações em *screening* de drogas apreendidas.

2. Materiais e Métodos

2.1. Reagentes

Foram utilizados os seguintes reagentes: HCl, 1,2-naphthoquinona-4-sulfonato de sódio (NQS), ácido acético, acetato de sódio e NaOH foram obtidos da Merck (Darmstadt, Germany). Brometo de cetiltrimetil amônio (CTAB), fenacetina (Fen) e Na₂CO₃ foram obtidos da Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany). Foram pesados 50 mg de Fen e transferidos para um balão de fundo chato de 100 mL já contendo 15 mL de HCl 20% v/v, e completado com água. A solução então foi diluída para conter 50 mg L⁻¹ de Fen. Foram preparadas soluções aquosas de NQS 0,02% m/m antes das análises e protegida da luz através de revestimento do recipiente com auxílio de papel alumínio. Foram utilizadas ainda soluções aquosas de CTAB 1% m/m e de NaOH nas concentrações de 4, 7, 10, 15 e 20% no presente estudo.

2.2. Avaliação da metodologia espectrofotométrica

Foi empregada a metodologia proposta por *Nagaraja* e colaboradores [110], onde é realizada a hidrólise da fenacetina em meio ácido e então a forma hidrolisada reage com o NQS em meio alcalino. Inicialmente, com intuito de verificar a viabilidade desse método, realizaram-se alguns registros espectrofotométricos em diferentes concentrações de fenacetina utilizando um espectrofotômetro modelo U-3000 (HITACHI, Tokyo, Japão) e cubetas de vidros de 1,00 cm de caminho ótico.

2.3. Fabricação dos sensores em papel (spot test)

Para a construção do dispositivo de análise colorimétrica, foi utilizado papel sulfite comum, impressora de cera (Xerox® Color Qube 8570), prensa térmica (Hobby Line Metalnox, Santa Catarina, Brasil) e fita adesiva transparente.

A fabricação dos sensores em papel envolve a delimitação das zonas de análise, *spot* hidrofílico, constituído apenas pelo material celulósico do papel e uma região hidrofóbica ao redor desse *spot* através da deposição de uma fina camada de cera sobre o papel com auxílio de uma impressora apropriada, dado um determinado *layout* pré-definido. Após a deposição da cera sobre o papel, basta aquecer o conjunto papel mais cera, com a utilização de uma prensa térmica até cerca de 120 °C por 2 min para alcançar o ponto de fusão da cera e esta derreta e penetre na matriz do papel definindo as regiões de análise.

Finalmente, uma fita adesiva transparente é colocada no papel, no lado oposto ao da impressão do spot com cera para vedação. Após esse procedimento o dispositivo está pronto para ser utilizado. A amostra é preparada e uma alíquota da solução é colocada sobre o spot com auxílio de uma micropipeta, conforme esquema da Figura 59.

Figura 59- Representação esquemática da construção e uso do dispositivo no papel.

2.4. Obtenção das imagens e padrões de cores como resposta analítica

A análise quantitativa das amostras é realizada através da aquisição de uma foto por aparelho celular (iPhone 4S) e em seguida analisado os valores de intensidade de cor dos spots por meio de um software de computador (GIMP®), ele consegue detectar a quantidade de cada cor presente nos spots, dentro de um padrão estabelecido, nesse caso, CMYK (do inglês, *cyan* (ciano), *magenta* (magenta), *yellow* (amarelo) e *black Key* (preto). Com base na cor das soluções, o magenta apresentou maior correlação logo, essa cor foi utilizada como padrão para as análises. Os dados coletados (% de magenta) são utilizados para construção de uma curva de calibração. Dessa forma, obtém-se informações qualitativas (presença de cor) e quantitativas da fenacetina presente ou não nas amostras.

Para maior acurácia nos resultados quantitativos, é necessário que as fotos sejam tiradas com a mesma exposição de luz, para tanto utilizou-se uma câmara simples construída em polimetilmetacrilato para suporte de um aparelho celular (iPhone 4S), a estrutura é fechada e rígida para manutenção da distância focal a ser obtida a fotografia e com pequenas lâmpadas de led em seu interior, tornando a exibição de luz uniforme e constante, a Figura 60 ilustra a câmara utilizada nos estudos colorimétricos.

Figura 60- Imagem real do suporte para iPhone 4S e sua câmara para obtenção de imagens em condições constantes de iluminação. A) Vista da câmara em perspectiva, B) imagem inferior da câmara com iluminação por leds, C) imagem lateral da mesma. Maiores informações sob a confecção e uso podem ser obtidas no trabalho prévio do grupo de pesquisa [34].

3. Resultados e Discussão

Baseado no trabalho prévio de Nagaraja e colaboradores [110], em que reportam um método espectrofotométrico para determinação de fenacetina e paracetamol, verificou-se a viabilidade desse método proposto para o desenvolvimento de um sensor colorimétrico em papel. O método baseia-se primeiramente na hidrólise ácida da fenacetina ou paracetamol para formação da p-fenetidina (composto (I), esquema da Figura 61) e esse composto em meio alcalino reage com o NQS formando um composto amarelado que quando adicionado o surfactante CTAB, ocorre um deslocamento batocrômico para formação de um produto avermelhado para análise de fenacetina e violeta para análise do paracetamol (composto (II)- Figura 61).

Figura 61 - Esquema reacional adaptado de [110].

Foram preparadas algumas soluções de diferentes concentrações de fenacetina e registrados alguns espectros UV-Vis para avaliação da resposta analítica, Figura 62.

Figura 62 - A) Espectros de absorção para o composto formado durante a reação entre fenacetina hidrolisada em diferentes concentrações (12, 24, 36 e 48 mg L⁻¹) e solução aquosa 0,02% de NQS.

Nota-se na Figura 62 que o composto formado pela hidrólise da fenacetina reage com NQS e absorve ao redor de 500 nm (cor verde), o que suporta a observação experimental, que seria a cor violeta-avermelhado (cor refletida), pois são as cores complementares, conforme pode ser verificado observando um disco de Newton.

Verificada a viabilidade dessa reação, testou-se o uso de *spots* fabricados em papel sulfite comum, conforme relatado na seção materiais e métodos.

Assim, iniciaram-se os testes de otimização dos parâmetros reacionais para o desenvolvimento de um sensor colorimétrico em papel sulfite. A escolha desse substrato está relacionada a seu menor custo comparado ao uso de papel cromatográfico, fácil aquisição e por ser menos poroso, apresenta uma maior integridade física quando molhado. Primeiramente, avaliou-se a concentração do cromóforo que possibilitasse melhor detectabilidade, Figura 63.

Figura 63 - Fotografia das respostas colorimétricas da fenacetina, em triplicata, em diferentes concentrações de NQS na faixa de 0,005 a 0,1% m/m. Concentrações dos reagentes: fenacetina $0,29 \text{ mmol L}^{-1}$, CTAB $2,5 \text{ mmol L}^{-1}$, NaOH $0,68 \text{ mol L}^{-1}$. B) Gráfico reportando a porcentagem de magenta para as diferentes concentrações de NaOH.

Observa-se na figura acima que com o aumento da concentração de NQS, ocorre a intensificação da cor vermelho-alaranjada, sendo que a principal variação de cor ocorre até a concentração de 0,02% de NQS, Figura 63B, com uma leve saturação da cor a partir deste ponto. Porém, a concentração de 0,1% de NQS foi escolhida como ótima por apresentar melhor resposta (maior intensidade de sinal e baixo desvio padrão das análises) além de garantir que sua concentração não seja o fator limitante nos estudos futuros. Em seguida, otimizou-se a concentração de base necessária para obtenção de melhor sinal analítico, Figura 64.

Figura 64 - A) Fotografia das respostas colorimétricas da fenacetina, em triplicata, em diferentes concentrações de NaOH na faixa de 0,19 a 0,85 mol L⁻¹. Concentrações dos reagentes: NQS 0,1% m/m, fenacetina 0,5 mmol L⁻¹, CTAB 2,5 mmol L⁻¹. B) Gráfico reportando a porcentagem de magenta para as diferentes concentrações de NaOH.

A maior intensidade de sinal (% de magenta) foi obtida com a utilização de 0,68 mol L⁻¹ de NaOH e esse valor foi escolhido como ótimo para estudos posteriores. Observa-se que esta foto, Figura 64A, apresentou baixa qualidade devido à falta de focalização e possivelmente a variação na luminosidade dos leds apresentado dentro da câmara utilizada, o que refletiu numa maior variação dos sinais, conforme Figura 64B.

Outro fator importante é a presença do surfactante CTAB, uma vez que a presença dele no meio proporciona um deslocamento batocrômico no produto final formado, ou seja, uma variação de cor de amarelo-alaranjado para um laranja-avermelhado, conforme Figura 65.

Observa-se na Figura 65 que na ausência de CTAB, a coloração da solução é amarela intensa, o que é devido principalmente a cor do NQS, porém, com a adição do surfactante ao meio, essa coloração tende ao laranja-avermelhado com o aumento de CTAB até a concentração por volta de 2 mmol L⁻¹. Observa-se na Figura 65B que o primeiro ponto (branco analítico para o CTAB) apresenta um elevado valor na escala de magenta, porém deve ser destacado que a cor amarela apresentada não pode ser bem correlacionada com o padrão magenta escolhido como resposta analítica para esse sensor.

E essa informação não afeta o estudo uma vez que todos os experimentos foram realizados na presença do surfactante e este ponto é apenas para demonstrar a importância deste parâmetro para a formação do composto colorido monitorado. Nota-se na Figura 65 B que o teor de magenta não altera significativamente até a concentração de 1 mmol L^{-1} de CTAB e em seguida observa-se um aumento expressivo, o que deve ser relacionado com a quantidade de micelas em solução, uma vez que a concentração micelar crítica (CMC) para o CTAB em água e a 25°C é por volta de 1 mmol L^{-1} , evidenciando assim a importância da presença de micelas para estabilização do produto formado. Assim, o valor de $1,87 \text{ mmol L}^{-1}$ de CTAB foi escolhido como ótimo para o método.

Figura 65 - A) Fotografia das respostas colorimétricas da fenacetina, em triplicata, em diferentes concentrações de CTAB na faixa de $0,62$ a $2,5 \text{ mmol L}^{-1}$. Concentrações dos reagentes: NQS $0,1\% \text{ m/m}$, fenacetina $0,5 \text{ mmol L}^{-1}$ e NaOH $0,68 \text{ mol L}^{-1}$. B) Gráfico reportando a porcentagem de magenta para as diferentes concentrações de CTAB.

Após todos os parâmetros reacionais otimizados, verificou-se a importância do tamanho do spot para obtenção de maior detectabilidade do sinal. Evidencia-se na Figura 66 que a diminuição do tamanho do spot proporciona o maior confinamento da solução, e assim, a maior densidade de compostos coloridos por unidade de área. Com isso, o diâmetro de $0,45 \text{ cm}$ foi escolhido como ótimo.

Figura 66-A) Fotografia da resposta colorimétrica da fenacetina, em triplicata, em diferentes diâmetros de spot (0,45 - 0,9 cm). Concentrações dos reagentes: NQS 0,1% m/m, fenacetina 0,5 mmol L⁻¹, CTAB 1,87 mmol L⁻¹, NaOH 0,68 mol L⁻¹. B) Gráfico reportando a porcentagem de magenta para os diferentes diâmetros de spot test.

Após todas as otimizações, sob as melhores condições analíticas, construiu-se uma curva analítica para a fenacetina na faixa de 0,07 a 0,73 mmol L⁻¹, com uma faixa linear entre 0 e 360 μmol L⁻¹ e com a seguinte equação da reta: (% de magenta) = 1,19 + 82,08(C/mmol L⁻¹), R² = 0,990, Figura 67. O limite de detecção foi estimado como sendo de 20 μmol L⁻¹, com base em três vezes o desvio-padrão do branco sobre a sensibilidade.

Figura 67 - A) Fotografia das respostas colorimétricas da fenacetina, em triplicata, em diferentes concentrações da mesma (0,07 a 0,73 mmol L⁻¹) sob os melhores parâmetros

analíticos obtidos para o método. B) Curva analítica obtida utilizando porcentagem de magenta para as diferentes concentrações de fenacetina.

Em seguida, verificou-se a seletividade do sensor para a identificação e quantificação de fenacetina em relação a outros possíveis adulterantes comumente encontrados em amostras de drogas apreendidas. Foi verificada a interferência para procaína (Pro), aminopirina (Amp), cafeína (Caf), Lidocaína (Lid), benzocaína (Ben) e paracetamol (Par), individualmente e na mistura com a fenacetina, todos na concentração de $0,2 \text{ mmol L}^{-1}$, conforme Figura 68 .

A

B

Figura 68- A) Fotografia das respostas colorimétricas em triplicata para fenacetina (Fen), benzocaína (Ben), lidocaína (Lid), cafeína (Caf), aminopirina (Amp), procaína (Pro), e paracetamol (Par) na concentração de $0,2 \text{ mmol L}^{-1}$ e para misturas binárias destes com a fenacetina B) Gráfico de % de magenta para interferência de cada adulterante individualmente e as correspondentes misturas.

Nota-se na Figura 68 que apenas o paracetamol responde a esse teste colorimétrico, apresentando uma coloração diferente da fenacetina, com uma cor mais roxa/violeta, ou seja, com um deslocamento hipsocrômico. Observa-se ainda, que apesar dos demais compostos não fornecerem cor no teste para a fenacetina, evidencia-se que a presença de

procaína, aminopirina e benzocaína em mistura com a fenacetina, proporciona uma queda de sinal (cerca de 10%) para testes quantitativos. Porém, a maior importância desses testes muitas vezes é pela informação qualitativa, apresentação de sinal ou não para a identificação dos compostos adulterantes presentes nas apreensões policiais, sendo que a informação quantitativa pode ser então obtida posteriormente com acurácia com técnicas convencionais, ou obter informações semi-quantitativas com o próprio dispositivo desenvolvido.

Quanto a possível presença do paracetamol nas amostras, essa interferência pode ser possivelmente eliminada através de tratamento eletroquímico das amostras de forma similar ao estudo relatado anteriormente para análise de procaína. Ou uma alternativa mais elegante e que será abordada futuramente é a possibilidade de análise multivariada dos dados para detecção e quantificação de ambas as espécies, uma vez que apresentam colorações diferenciadas quando separadas, e assim, com uso de quimiometria pode ser solucionado esse problema.

➤ **Fabricação de sensores eletroquímicos em papel para aplicações analíticas.**

1. Preâmbulo

As técnicas eletroquímicas possuem uma vantagem inerente frente às demais técnicas instrumentais para o desenvolvimento de sensores portáteis e de baixo custo, que estão relacionadas a fácil portabilidade, possibilidade de miniaturização, instrumentação simples e versatilidade para aplicações diversas.

No campo que concerne o desenvolvimento de sensores eletroquímicos descartáveis e portáteis, há diversas pesquisas realizadas na literatura para a fabricação de eletrodos do tipo impressos através de diferentes tecnologias, mas basicamente utilizando tintas condutivas de carbono e outros metais [125-127], utilizando fios metálicos [49, 128], construção de dispositivos em circuitos eletrônicos [78, 129], confecção a partir de CDs (CDtrodos) [130-

132], utilização direta de grafites[45, 101] ou ainda “pintando/desenhando” com grafite sobre um substrato, comumente papel [47, 48], entre outras formas.

O uso de papel como substrato apresenta diversas vantagens, tais como: baixo custo, fácil obtenção, portabilidade, possibilidade de modificação, é um material reciclável e de fácil armazenamento e transporte, entre outras.

Sensor eletroquímico em sistemas microfluídicos de papel foi primeiramente reportado por Dungchai e colaboradores [37], os quais utilizaram a técnica de screen-printed para confeccionar os eletrodos sobre o papel de filtro e então imobilizou enzimas específicas para detectar ácido úrico, glicose e lactato. Após esse primeiro trabalho, houve uma rápida expansão no desenvolvimento de dispositivos eletroanalíticos sobre esse substrato, porém, quase que unanimemente utilizaram o papel cromatográfico como plataforma, mudando basicamente a porosidade ou com algumas modificações químicas para alterar propriedades físico-químicas como a molhabilidade, taxa de fluxo das soluções, etc. Apesar do papel cromatográfico ser de fácil obtenção em ambientes acadêmicos e industriais, ele pode apresentar menor disponibilidade para o público geral, e um custo superior ao papel comum (papel sulfite ou de escritório). Dessa forma, buscamos o desenvolvimento de dispositivos de custo reduzido e de fácil fabricação e uso utilizando papel sulfite comum como plataforma. Utilizando esse substrato, obtém-se uma redução de custo de 97% quando comparado ao papel cromatográfico do tipo Whatman®, que é o papel de filtro amplamente utilizado na literatura.

2. Materiais e Métodos

2.1. Reagentes

Foram utilizados os seguintes reagentes: acetato de sódio, ácido acético, ácido sulfúrico, cloreto de potássio e nitrato de chumbo foram obtidos da Merck (Darmstadt, Alemanha). A tinta condutiva de prata foi obtida da Joint Metal Comercio LTDA (São Paulo, Brasil) e o ácido pícrico da Reagen (Rio de Janeiro, Brasil).

2.2. Fabricação e design do dispositivo eletroquímico em papel

Inicialmente, imprimiu em impressora de cera (Xerox ColorQube 8570 printer da Xerox (Norwalk, Connecticut, USA)) um template de forma a delimitar regiões de análise (diâmetro de 1,6 cm) em papel sulfite e em seguida, esse papel foi levado para uma prensa térmica (Hobby Line Metalnox, Santa Catarina, Brasil) por 3 minutos a 120°C para derreter a cera e essa infiltrar no papel. Com esse procedimento criou-se 72 regiões de análises que resultaram em 72 dispositivos eletroquímicos em uma única folha de papel sulfite.

Em seguida, criou-se um molde em folha de transparência contendo 72 layouts de um sistema de 3 eletrodos e em seguida eram sobrepostas a folha de transparência com os layouts e a folha de papel sulfite com as regiões hidrofílicas (região sem cera). Em seguida, era pintada essa máscara com tinta condutiva de prata utilizando um rolo de pintura. Assim, quando era retirada a máscara, formava-se na folha de sulfite 72 dispositivos eletroquímicos (eletrodos + região de análise (célula eletroquímica)) que deixado sob aquecimento por 70°C durante 1 hora para a secagem da tinta condutiva, sendo esse aquecimento realizado em estufa.

2.3 Análises eletroquímicas

Cada dispositivo desenvolvido era conectado em suas extremidades por jacarés (conectores) diretamente ao potenciostato. Todas as análises foram realizadas a partir de 10µL de solução estoque em 200 µL de eletrólito suporte (tampão acetato ou solução de ácido sulfúrico).

3. Resultados e Discussão

Utilizou-se da impressão de um molde em impressora de cera para criar barreiras hidrofóbicas que delimitariam o volume da célula eletroquímica e, em seguida, fabricaram-se os eletrodos das células eletroquímicas com tinta condutiva de prata e com o auxílio de um rolo para pintura sobre um molde fabricado em uma folha de transparência. A Figura 69 mostra o esquema de fabricação dos eletrodos sobre a folha de papel sulfite.

Figura 69 – Etapas envolvidas na fabricação do sistema eletroquímico em papel utilizando a tecnologia “silk-screen” (A), layout do sistema desenvolvido (B) e uma imagem real do dispositivo final (C), onde RE= eletrodo de referência, WE = eletrodo de trabalho e CE = contra eletrodo.

Inicialmente, realizou-se a caracterização do sistema de 3 eletrodos desenvolvido utilizando $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]\text{Cl}_3$ como sonda eletroquímica, Figura 70.

Figura 70 – (A) Voltamogramas cíclicos registrados em solução de 5 mmol L^{-1} de cloreto de hexaminrutênio em tampão acetato pH 4,7 utilizando um único sistema eletroquímico em papel para diferentes velocidades de varredura: 10, 30, 50, 100, 200, 300, and 500 mV s^{-1} . Volume de solução: $200 \mu\text{L}$. Em (B) gráfico relacionando os valores de corrente de pico com a raiz quadrada da velocidade de varredura.

Observa-se que o perfil obtido é de uma típica reação eletroquímica reversível onde a velocidade do processo eletroquímico é governada pela difusão da espécie eletroativa até a superfície do eletrodo [38]. Na Figura 70B, nota-se que os valores de corrente de pico catódicos e anódicos são linearmente proporcionais à raiz quadrada da velocidade de varredura entre 10 e 500 mV s^{-1} , obtendo-se o mesmo comportamento relatado para essa espécie eletroativa que o reportado para eletrodos comerciais.

Em seguida, verificou-se a potencialidade do sensor para diversas aplicações analíticas (explosivos, análises ambientais e de metais tóxicos). Avaliou-se a eletroatividade do ácido pícrico neste sensor, conforme reportado na Figura 71A.

Figura 71 - (A) Voltamogramas cíclicos registrados em um único sensor em papel na presença (linha vermelha) e ausência (linha preta) de 5 mmol L⁻¹ de ácido pícrico. Velocidade de varredura de 100 mV s⁻¹. Em (B) Voltamogramas de pulso diferencial registrados para diferentes concentrações de ácido pícrico: 0,2 a 1,1 mmol L⁻¹. Volume de solução: 200µL. Parâmetros: passo de potencial de 0,03 V e amplitude de 0,05 V. Eletrólito suporte: tampão acetato pH = 4,7.

Na Figura 71A, nota-se que na ausência de ácido pícrico, obtém-se um sinal de oxidação próximo de 0 V que corresponde a dissolução dos íons prata para o meio que na varredura de volta, são reduzidos próximo a -0,1 V. Já quando é adicionado ácido pícrico, nota-se um expressivo e bem definido pico de redução próximo a -0,8 V, além da diminuição/desaparecimento do pico de redução da prata, o pode indicar que o ácido pícrico adsorve na superfície do eletrodo de prata dificultando o processo de dissolução da prata. Verificado a possibilidade de análise dessa espécie, utilizou-se a voltametria de pulso diferencial com o intuito de aumentar a sensibilidade do método proposto. Utilizando essa técnica adicionou-se sucessivamente 10 µL de uma solução de referência de ácido pícrico utilizando um único sensor de papel para construção de uma curva analítica (Figura 71B) (faixa de concentração de ácido pícrico: 0,2 a 1,1 mmol L⁻¹). A regressão linear da curva obtida foi: $I_C \text{ (mA)} = -2,15 \times 10^{-6} + 0,158 (C_{PA}/\text{mmol L}^{-1})$, $R^2 = 0,999$ e $I_D \text{ (mA)} = 6,68 \times 10^{-4} + -0,458, C_{PA}/\text{mmol L}^{-1}$, $R^2 = 0,996$).

Observa-se que com o aumento da concentração de ácido pícrico, ocorre o aumento linear de sinal para a redução deste composto, curva D da Figura 71B, além da diminuição proporcional do sinal de redução da prata, curva C, mostrando que ambos os sinais podem ser utilizados para a quantificação deste composto. Foi possível estimar o limite de detecção como sendo de $30 \mu\text{mol L}^{-1}$ para a curva D e cerca de $11 \mu\text{mol L}^{-1}$ se utilizado a curva C da Figura 71B.

O sensor também foi aplicado para o monitoramento de cloreto em solução aquosa, uma vez que, é conhecida a grande afinidade de íons prata por haleto [133]. Assim, realizaram-se varreduras de potencial para potenciais positivos, de forma a liberar íons prata da superfície do eletrodo e esses íons eram precipitados na presença de cloreto. Com isso, na varredura inversa o haleto de prata era reduzido. A Figura 72 mostra os voltamogramas registrados em diferentes concentrações de cloreto.

Figura 72 - Voltamogramas cíclicos registrados utilizando um único sensor em papel para diferentes concentrações de cloreto: 38 a $500 \mu\text{mol L}^{-1}$. Volume de solução: $200 \mu\text{L}$. Eletrólito suporte: solução de ácido sulfúrico $0,5 \text{ mol L}^{-1}$. Velocidade de varredura de 50 mV s^{-1} .

Observa-se na Figura 72 que ocorre um aumento tanto dos valores de corrente de pico catódico como anódico, porém, para os sinais de redução, nota-se que ocorre um deslocamento de potencial de pico com o aumento da concentração de cloreto. Com o intuito de se obter maior especificidade e sensibilidade, foi utilizado os valores de pico de redução

para construir da curva analítica reportada na Figura 72. A equação da reta obtida foi: $-I \text{ (mA)} = 0,008 + 537 (C_{\text{Cl}^-}/\mu\text{mol L}^{-1}, R^2 = 0,999)$. Obteve-se uma linearidade em uma faixa ampla de concentrações (38 a $500 \mu\text{mol L}^{-1}$) e sob as melhores condições, foi possível calcular um limite de detecção de $7 \mu\text{mol L}^{-1}$.

Por fim, avaliou-se a possibilidade de detecção de íons Pb^{2+} visando ao monitoramento de resíduos de disparo de arma de fogo, como viés forense. Registraram-se voltamogramas de onda quadrada em soluções contendo diferentes concentrações de chumbo. As análises foram realizadas utilizando uma etapa de pré-concentração que consistiu em aplicar -1 V por 20 segundos e então realizar o registro voltamétrico para dissolução do metal depositado sobre a superfície do eletrodo de trabalho. O tempo de pré-concentração é relativamente curto devido ao contra eletrodo também ser de prata e dessa forma, durante esse período ele está constantemente sendo oxidado. Assim, foram utilizados 2 eletrodos em papel para a construção da curva analítica apresentada na Figura 73.

Figura 73 - Voltamogramas de onda quadrada registrados com 2 sistemas eletroquímicos em papel (as 4 primeiras análises registradas utilizando 1 dispositivo e as 3 últimas com um segundo dispositivo eletroquímico) em solução de tampão acetato pH 4,7 para adições sucessivas de $10 \mu\text{L}$ de solução estoque de nitrato de chumbo. Concentração final: $9 - 48 \mu\text{mol L}^{-1}$. Parâmetros: frequência de 20 Hz , amplitude de 10 mV e passo de potencial de 10 mV . Deposição por 20 s a -1 V .

A Figura 73 demonstra a aplicabilidade desse sistema para análise de chumbo, sendo que foi obtida uma linearidade entre 9 e 48 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e uma equação da reta de $I (\mu\text{A}) = -15,88 + 5,284 (C_{\text{Pb}^{2+}} / \mu\text{mol L}^{-1}, R^2 = 0,995)$. Nas melhores condições foi possível obter um limite de detecção de 1,7 $\mu\text{mol L}^{-1}$.

Avaliou-se a estabilidade e repetibilidade do sensor, através da medida do pico de corrente para voltamogramas registrados em uma solução de cloreto de sódio (1 mmol L^{-1}) em eletrólito apropriado. Para esse experimento foram realizadas 15 medidas e o desvio padrão das medidas foi igual a 0,9% para um mesmo sensor.

Como o processo de fabricação é simples e manual, obteve-se uma reprodutibilidade que pode ser considerada aceitável, com um desvio padrão de 8% para 25 sistemas desenvolvidos (medidas feitas da mesma maneira que no parágrafo anterior). Análises que requeiram uma precisão menor que 8%, poderão ser realizadas utilizando um padrão interno, ou utilizando uma espécie eletroativa como o cloreto de hexamin rutênio para determinar a área eletroativa previamente e trabalhar com dados normalizados (densidade de corrente).

Algumas das vantagens do dispositivo proposto é o baixo custo do papel sulfite utilizado como substrato, como previamente mencionado, sem necessidade de um processo de isolamento com um polímero sobre a face de trás do dispositivo para evitar perda de solução durante as medições [47, 48, 134], além de que não foi observado deformações do papel quando molhado pelo líquido durante as análises como observado com os dispositivos feitos com papel cromatográfico. A Tabela 5 apresenta uma comparação entre os substratos, eletrodos, materiais e instrumentação necessária para a fabricação de alguns dispositivos baseados em papel relatados na literatura.

Tabela 5 - Comparação entre os substratos, eletrodos, materiais e instrumentação necessária para a fabricação de sistemas eletroquímicos à base de papel relatados na literatura

Referências	Substrato	Eletrodos	Materiais e instrumentação necessária
Dossi e colaboradores [48]	Papel filtro com camada de polietileno	Desenho a lápis	Impressora de cera, chapa de aquecimento, processo de isolamento térmico
Santhiago e colaboradores [45]	Papel cromatográfico	Grafite (lápis) e tinta e tinta de prata	Impressora de cera, chapa de aquecimento e folha de transparência
Dungchai e colaboradores [37]	Papel filtro e fotorresiste	Tintas de carbono e cloreto de prata	Impressora a laser, fotolitografia, aplicador de fotorresiste, lâmpada UV, limpador à plasma
Nie e colaboradores [38]	Papel cromatográfico e fotorresiste ou mistura de papel celulósico e poliéster	Tintas de carbon e cloreto de prata	Fotolitografia ou impressora de cera, lâmpada UV e chapa de aquecimento
Dossi e colaboradores [47]	Papel filtro com camada de	Duplo desenho a lápis	Impressora de cera, chapa de aquecimento e processo de isolamento térmico
Trabalho desenvolvido [39]	Papel sulfite	Tinta de prata	Impressora de cera, prensa térmica e folha de transparência

Como reportado na Tabela 5, o método proposto é um dos procedimentos mais simples e requer equipamentos menos sofisticados em comparação com outros artigos descritos na literatura. O custo da tinta de prata é maior do que o grafite de lápis como material de eletrodo, porém, o nosso processo de fabricação também comporta o acoplamento de um grafite como aquela abordagem. Assim, a escolha do material de eletrodo pode ser efetuada pelo usuário, dependendo do problema analítico.

Análise de compostos perigosos e/ou intoxicantes

➤ **Deteccão de explosivos**

1. Preâmbulo

A crescente preocupação com a segurança pública devido às ameaças terroristas torna necessário o uso e/ou desenvolvimento de dispositivos de deteção rápida e sensível de explosivos comerciais e caseiros para melhorar a vigilância contra os malfeitores [135]. Novos dispositivos inovadores, proporcionando a capacidade efetiva de deteção em tempo real, e no local, são particularmente necessários para aplicações práticas que vão desde postos de controle na estrada até o rastreio de bagagem de passageiros [135]. A implantação em todos os aeroportos e em numerosas instalações governamentais e públicas exige sistemas de monitoramento de baixo custo, miniaturizados e com alta sensibilidade. Além disso, tais sistemas devem ser extremamente rápidos e oferecer baixa taxa de falsos alarmes. Da mesma forma, esses dispositivos portáteis são desejados para analisar os detritos em locais de pós-explosão, e para a análise dos locais contaminados (antes da aplicação das etapas de remediação) [135].

Ácido pícrico ou 2,4,6-trinitrofenol é um dos compostos explosivos que podem ser utilizados para a fabricação de armas e explosivos. A deteção de explosivos é importante nas investigações forenses e criminais, além do ponto de vista da saúde ambiental e da segurança [136]. Dada à importância do monitoramento dessas espécies visando à melhora da segurança militar e das análises forenses, é interessante o desenvolvimento de um método de análise simples, rápido e barato para a sua deteção e quantificação [137]. Assim, em colaboração com o aluno de iniciação científica João Junqueira, desenvolveu um método eletroanalítico acoplado com análise por injeção em fluxo para quantificação desse composto.

➤ Detecção eletroquímica de ácido pícrico

2. Materiais e Métodos

2.1. Reagentes

Foram utilizados nos experimentos: ácido acético, acetona, acetonitrila, ácido bórico, ácido cítrico, ácido clorídrico, metanol, acetato de sódio, hidróxido de sódio, fosfato de sódio dibásico, fosfato de sódio monobásico, sulfato de sódio, tetraborato de sódio, ácido sulfúrico que foram adquiridos da Merck (Darmstadt, Alemanha). O ácido pícrico foi comprado as empresa Reagen (Rio de Janeiro, Brasil) e o nitrobenzeno, a partir da empresa Carlo Erba (Milão, Itália).

2.2. Instrumentação

Os testes eletroquímicos foram realizados em um sistema de três eletrodos, sendo testados eletrodos comerciais de platina, ouro, carbono vítreo, cobre e bismuto como eletrodos de trabalho, eletrodo de Ag/AgCl como eletrodo de referência [67] e fio de platina como eletrodo auxiliar. Foi utilizado um potenciostato μ Autolab da Autolab Eco Chemie B.V. com software de aquisição de dados fornecidos pelo fabricante.

A quantificação de ácido pícrico foi realizada por análise de injeção em fluxo (FIA) com detecção eletroquímica usando $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de tampão fosfato ($\text{pH} = 7,4$) como uma solução transportadora. Todos os parâmetros envolvidos na FIA foram otimizados e as melhores condições foram: potencial: $-0,9 \text{ V}$ vs Ag/AgCl, vazão: $4,0 \text{ mL min}^{-1}$ e volume de amostra: $75 \text{ }\mu\text{L}$.

3. Resultados e Discussão

O desenvolvimento de sensores eletroquímicos para quantificação de explosivos é focado na possibilidade de medições *in situ*, elevada sensibilidade e seletividade, além de instrumentação de baixo custo.

Dessa forma, a resposta eletroquímica do ácido pícrico foi avaliada utilizando-se cinco diferentes eletrodos (ouro, bismuto, carbono vítreo, cobre e platina). Os voltamogramas cíclicos foram registrados em solução de $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de tampão fosfato contendo 5 mmol L^{-1} de ácido pícrico, Figura 74.

Figura 74- Voltamogramas cíclicos registrados em uma solução tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ ($\text{pH} = 7,4$), na ausência (linha a tracejado) e na presença (linha cheia), de 5 mmol L^{-1} de ácido pícrico. Eletrodos de trabalho utilizados: (A) ouro ($r = 0,78$ milímetros), (B) bismuto ($r = 0,33$ milímetros), (C) carbono vítreo ($r = 0,71$ milímetros), (D) cobre ($r = 1,02$ milímetros) e (E) platina ($r = 0,76$ milímetros). Velocidade de varredura de 50 mV s^{-1} .

Observa-se que todos os eletrodos, exceto de platina (voltamograma Figura 74E), apresentam um sinal de resposta faradáica para a redução do ácido pícrico. Nos eletrodos de carbono vítreo e ouro (voltamogramas Figura 74A e Figura 74C), a redução de ácido pícrico ocorre por volta de -1,0 V com valores de densidade de corrente da ordem de -80 e -130 mA mm⁻², respectivamente. As melhores respostas foram obtidas com os eletrodos de bismuto e cobre (voltamogramas Figura 74B e Figura 74D) e o sinal faradáico aparece em potenciais menos negativos do que os encontrados utilizando eletrodos de carbono vítreo e de ouro. Com o eletrodo de bismuto, observa-se um pico de corrente de -136 mA mm⁻² em -0,63 V, enquanto que o eletrodo de cobre um valor de corrente de pico de -145 mm⁻² mA em um potencial muito similar (-0,67 V) é observado. Com base nestes resultados, o cobre foi escolhido como o material eletródico do eletrodo de trabalho, devido ao melhor sinal analítico em comparação com os outros eletrodos metálicos estudados.

A redução do ácido pícrico sobre a superfície de cobre foi avaliada em diferentes valores de pH. Os eletrólitos utilizados foram os seguintes: 0,1 mol L⁻¹ de sulfato de sódio (pH = 2,2), 0,1 mol L⁻¹ de tampão acetato (pH = 4,7), 0,1 mol L⁻¹ de tampão fosfato (pH = 7,4), 0,1 mol L⁻¹ de tampão borato (pH = 9,1) e 0,1 mol L⁻¹ de NaOH (pH = 13). Os voltamogramas obtidos em cada valor de pH são mostrados na Figura 75.

Figura 75 - Voltamogramas cíclicos registrados com eletrodo de cobre, na ausência (linha tracejada) e na presença (linha cheia), de 5 mmol L⁻¹ de ácido pícrico. Os eletrólitos utilizados: (A) sulfato de sódio (pH ajustado para 2,2 com H₂SO₄), (B) tampão acetato (pH = 4,7), (C) tampão fosfato (pH = 7,4), (D) tampão borato (pH = 9,1) e (E) solução de NaOH (pH = 13), todas as soluções a 0,1 mol L⁻¹. Velocidade de varredura de 50 mVs⁻¹.

O pico relacionado com o processo de redução de ácido pícrico pode ser observado em todas as condições. Nota-se na Figura 75 que ocorre um deslocamento de potenciais de picos para valores mais negativos com o aumento de pH, como já observado por Ni e colaboradores [138]. Esse comportamento está relacionado com o fato do ácido pícrico ser desprotonado em meio mais alcalinos e, como resultado, a carga negativa do oxigênio é fortemente estabilizada pelos grupos nitro, dificultando o processo de redução desses grupos.

Em valores de pH mais baixos (pH 2,2, Figura 75A), é possível observar dois processos catódicos sobrepostos, corrente de pico (-0,4 V e -0,5 V). Em potencial mais elevado, -0,85 V, observa-se um processo de redução com um baixo valor de corrente. Este processo pode ser claramente visualizado em concentrações baixas de ácido pícrico e

utilizando a técnica de pulso diferencial. Relatos anteriores da literatura sobre a redução eletroquímica de nitro explosivos, como por exemplo, o TNT (2,4,6-trinitrotolueno) [139-141], mostram que a redução do grupo nitro geralmente ocorre em duas etapas, através da redução do amino grupo de hidroxilamina (Eq. 1), seguido pela redução da hidroxilamina a amina (Eq. 2).

Os voltamogramas registrados nas Figura 75(A e B) apresentam valores de corrente similares e de aproximadamente -250 μ A. Ao aumentar o valor de pH para 7,4, um pico de redução muito maior é observado (quase duas vezes maior do que a valores de pH mais baixos). Com um aumento contínuo no pH, os valores de corrente diminuem.

Trabalhos anteriores [138, 142] demonstraram que em condições moderadamente ácidas, os compostos nitro aromáticos são reduzidos a hidroxilaminas em dois passos envolvendo quatro elétrons (Eq. 1). Na primeira etapa lenta (Eq. 4), o composto nitro é reduzido a um ânion radical ($RNO_2^{\bullet-}$). Na segunda etapa (Eq. 5), três elétrons e quatro prótons são consumidos e um radical é reduzido para uma hidroxilamina ($RNHOH$) [138, 142]. No entanto, tem sido relatado na literatura [143], que em meio fortemente alcalino, o primeiro passo (Eq. 4) envolve uma absorção rápida reversível de um elétron, e uma segunda etapa correspondente a Eq. 5, seria o processo lento e irreversível de três elétrons. Assim, um decréscimo na corrente dos picos sobrepostos e uma mudança no potencial do segundo processo para valores mais negativos podem ser observados em condições ácidas, o que pode explicar o novo processo observado em potenciais mais negativos e a diminuição da corrente sobre o aumento dos valores de pH acima de 7 da Figura 75 (D e E). Assim, a solução tampão de fosfato (pH = 7,4) foi escolhida como eletrólito suporte visando obter um melhor desempenho analítico.

Após os estudos voltamétricos, a análise do ácido pícrico foi realizada em sistema de análise por injeção em fluxo. Os parâmetros experimentais foram avaliados com a finalidade de obter os melhores parâmetros analíticos. O primeiro parâmetro avaliado foi o potencial aplicado ao eletrodo de trabalho em condições hidrodinâmicas, Figura 76.

Figura 76- Voltamograma hidrodinâmico em FIA utilizando eletrodo de cobre obtido após injeções de solução 1 mmol L^{-1} de ácido pícrico. Vazão: 2 mL min^{-1} , volume de amostra: 75 μL e solução transportadora: $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de tampão fosfato ($\text{pH} = 7,4$).

Na Figura 76, observa-se que a maior corrente catódica foi obtida em $-0,9 \text{ V}$, sendo que em valores de potenciais mais elevados, a corrente diminui. Esse comportamento, pode estar associado a redução eletroquímica de íons hidrônio na superfície do eletrodo em potenciais maiores que $-0,9 \text{ V}$ (diminuição da concentração local dessa espécie), afetando assim o processo eletroquímico de redução do ácido pícrico, ver Eq. 3, e diminuindo o valor da corrente catódica. Com base nesse comportamento do voltamograma hidrodinâmico, o valor de $E = -0,9 \text{ V}$ (contra $\text{Ag} / \text{AgCl}_{(\text{KCl sat})}$) foi escolhido como o potencial de trabalho.

A Figura 77 mostra o estudo para verificar as melhores condições de trabalho (vazão e volume de amostra). A partir da Figura 77A, é possível observar que ocorre o aumento do valor de corrente com a vazão até o valor de $4,0 \text{ mL min}^{-1}$. Isso confirma que até esta vazão, a redução eletroquímica é governada pelo transporte de massa, ou seja, ela é a etapa limitante. Já para valores mais elevados de vazão, o processo de transferência eletrônica passa a ser o

processo limitante da velocidade, limitando assim, a corrente referente ao processo de redução do ácido pícrico.

Figura 77- (A) Valores de corrente de pico registradas em função da vazão para injeções de solução de 0,1 mol L⁻¹ de tampão fosfato (pH = 7,4) com 1 mmol L⁻¹ de ácido pícrico. Potencial: -0,9 V, volume da amostra de 75 μL. (B) Valores de corrente de pico registradas em função do volume de amostra injetado (0,1 mol L⁻¹ de solução tampão fosfato (pH = 7,4) com 1 mmol L⁻¹ de ácido pícrico). Potencial: -0,9 V, vazão: 4 mL min⁻¹. Solução transportadora 0,1 mol L⁻¹ de solução tampão fosfato (pH = 7,4).

Para obter a melhor sensibilidade do método analítico desenvolvido sem consumir mais solução transportadora, uma vazão de 4,0 mL min⁻¹ foi escolhida. Por outro lado, não se observa alterações significativas nos valores de pico de corrente com o aumento do volume da amostra. Por esta razão, o volume de 75 μL de amostra foi escolhido. Nestas condições experimentais, a frequência de amostragem foi calculada como sendo de 550 amostras h⁻¹.

Em seguida, uma curva analítica foi construída, e uma relação linear entre a corrente de pico e concentração foi obtida na faixa de 20 - 300 μmol L⁻¹ (Figura 78).

Figura 78– Fiagrama obtido para injeções de soluções com diferentes concentrações de ácido pícrico: 20 (a), 40 (b), 60 (c), 100 (d), 300 (e) e 500 (f) $\mu\text{mol L}^{-1}$. Detalhe: curva de calibração analítica. Potencial: $-0,9\text{ V}$, vazão: 4 mL min^{-1} , volume de amostra: $75\text{ }\mu\text{L}$ e solução transportadora: $0,1\text{ mol L}^{-1}$ de solução tampão fosfato ($\text{pH} = 7,4$).

A regressão linear da reta apresentou a seguinte equação $((I / \text{mA}) = - 2,6 + 0,18(\text{C}_{\text{ácido pícrico}} / \mu\text{mol L}^{-1}))$ e $R^2 = 0,996$. O limite de detecção do método e a repetibilidade foram estimadas como sendo de $6\text{ }\mu\text{mol L}^{-1}$ e 3% ($n = 10$), respectivamente. Além disso, a falta de efeito de memória do sistema observada na Figura 78 pode ser atribuída à configuração do sistema de injeção de fluxo e / ou devido ao volume de amostra injetada ser pequeno.

Algumas das vantagens do método proposto é a utilização de eletrodos não modificados quimicamente e de material simples para fabricação do dispositivo eletroquímico para a rápida detecção de explosivos. Dispositivos descartáveis descritas na literatura [77] podem ser fabricados para medições *in situ*. A Figura 79 mostra um voltamograma cíclico registrado para um pequeno volume de amostra ($300\text{ }\mu\text{L}$) na presença e na ausência de explosivo ácido pícrico utilizando um dispositivo descartável feito de cobre,

conforme descrito na parte experimental, e demonstra a potencialidade da utilização destes dispositivos e do método proposto para uma detecção rápida e em campo.

Figura 79- Voltamogramas cíclicos registrados em solução $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de tampão fosfato ($\text{pH} = 7,4$), na ausência (linha tracejada) e na presença (linha cheia), de 5 mmol L^{-1} de ácido pícrico. Velocidade de varredura de 50 mV s^{-1} . Volume da amostra: $300 \text{ }\mu\text{L}$.

Verificou-se o efeito de interferência de três explosivos (TATP, HMTD e nitrobenzeno) no sinal analítico por análise em fluxo nas mesmas condições de análise do ácido pícrico. Nos experimentos realizados somente o nitrobenzeno mostrou-se um potencialmente interferente usando o método proposto. Sabe-se da literatura [135] que a redução dos compostos nitro aromáticos é fortemente influenciada pela posição e quantidade desses grupos no anel. Dessa forma, a redução do nitrobenzeno ocorre em potencial diferente do ácido pícrico e assim, com auxílio de tratamentos quimiométricos pode ser facilmente resolvido o problema de interferência.

➤ **Análise colorimétrica para detecção de ácido pícrico**

Utilizando método colorimétrico apresentado anteriormente, baseado na formação do complexo colorido (alaranjado) por meio da reação de ácido pícrico com creatinina em meio

alcalino, realizou-se a construção dos *spots* em papel filtro para a análise do ácido pícrico baseado na reação de Jaffé, com o intuito de criar dispositivo colorimétrico para quantificação e discriminação quimiométrica de drogas de abuso para espécies não eletroativas. Vale destacar, que se escolheu o ácido pícrico para análise, devido à sua alta aplicabilidade para o desenvolvimento de métodos visando à aplicação forense, e como uma molécula modelo enquanto se espera pelos padrões das drogas de abuso.

Na Figura 80 está apresentado a otimização do volume das soluções de ácido pícrico e creatinina em meio alcalino (NaOH 0,1 mol L⁻¹) adicionados aos *spots*. Ambos estavam em concentração de 0,1 mol L⁻¹.

Figura 80– Análise colorimétrica em papel de ácido pícrico com base na reação de Jaffé. A primeira linha de *spots* corresponde ao branco analítico, ou seja, só solução de creatinina 0,1 mol L⁻¹ e na segunda linha é mostrado o efeito do aumento do volume das soluções de ácido pícrico e creatinina em meio alcalino (NaOH 0,1 mol L⁻¹), ambos em concentração de 0,1 mol L⁻¹ (de 1 a 10 µL da direita para a esquerda). Tamanho do *Spot* de reação: d = 1cm.

Observa-se que com o aumento do volume das soluções até cerca de 8 µL ocorre um aumento da intensidade da cor, indicando a possibilidade de uma maior detectabilidade do método proposto. Esse fato deve-se que para volumes maiores de soluções, há um maior tempo de reação até que estas sequem no papel o que deve diminuir drasticamente a cinética de formação do aduto colorido (complexo de Janovsky, Esquema da Figura 5). Assim, o volume de 8 µL de cada solução foi escolhido como ótimo para os próximos experimentos.

Em seguida, avaliou-se o efeito da concentração da solução adicionada em cada *spot*, com o intuito de melhorar a sensibilidade do método proposto, Figura 81.

Figura 81 - Análise colorimétrica em papel de ácido pícrico com base na reação de Jaffé. A primeira linha de spots corresponde ao branco analítico, ou seja, só solução de creatinina em meio básico pH 13 (16 μL de cada concentração avaliada: 5, 10, 20, 30, 50, 80 e 100 mmol L^{-1}) e na segunda linha ilustra o efeito da adição de 8 μL de ácido pícrico 0,1 mol L^{-1} e 8 μL de cada uma das concentrações de creatinina (da direita para a esquerda, respectivamente). Tamanho do *Spot* de reação: $d = 1 \text{ cm}$.

Observa-se que com o aumento da concentração da creatinina ocorre um aumento na formação do aduto colorido (alaranjado), concluindo que a cinética da reação demonstra ser dependente da concentração das espécies. Concentrações superiores a 100 mmol L^{-1} de creatinina foram avaliadas (não mostrado) e não resultaram em um aumento significativo da intensidade de cor.

Encontrado os melhores parâmetros, avaliou-se o comportamento da variação da concentração de ácido pícrico, Figura 82.

Figura 82– Análise de ácido pícrico em duplicata por teste colorimétrico em papel. Soluções de creatinina 0,1 mol L^{-1} em pH 13 e concentrações de ácido pícrico avaliadas foram: 0,3, 0,5, 0,8, 1, 2 e 3 mmol L^{-1} (da direita para a esquerda, respectivamente). Os spots das três primeiras colunas representam o branco (creatinina 0,1 mol L^{-1} em pH 13). Volume adicionado de cada solução: 8 μL e diâmetro do spot de 1 cm.

Para melhor visualização dos resultados e análises quantitativas, construiu-se uma curva de calibração, avaliando os valores do padrão B (sigla de azul, do inglês blue) em função da concentração do ácido pícrico (Figura 83). O padrão B é um dos componentes do padrão tricromático, RGB em que a sigla vem das três cores que a compõem: vermelho,

verde e azul, que quando combinadas geram as demais cores. Esses padrões podem ser extraídos pela análise da imagem obtida com uma câmera fotográfica e utilizando um software editor de imagens.

Figura 83– Curva de calibração para análise de ácido pícrico por teste colorimétrico em papel. Soluções de creatinina 0,1 mol L⁻¹ em pH 13 e concentrações de ácido pícrico avaliadas foram: 0,3, 0,5, 0,8, 1, 2 e 3 mmol L⁻¹. Ao lado encontra-se o gráfico linearizado.

Observa-se um perfil de decaimento da resposta de sinal analítico avaliado (padrão azul) em função da concentração do ácido pícrico, o que é concordante, uma vez que, o azul é aproximadamente a cor complementar à cor analisada (laranja-avermelhado) pelo disco de Newton. Ao lado, encontra-se um gráfico linearizado, observando uma boa adequação na faixa de concentrações estudada.

Nota-se uma grande variância dos resultados, uma vez que estes são influenciados pela forma de aquisição da imagem (distância a ser fotografada e tempo após a adição das soluções), que é facilmente contornado fixando um mesmo local e suporte para câmera fotográfica e controlando o tempo para aquisição de fotos. Contudo como a ideia seria o desenvolvimento de dispositivos simples para análise em campo, e tendo em vista a dificuldade de controle preciso de temperatura e umidade nesse caso, avaliamos o comportamento para análises sem nos preocuparmos com esses parâmetros, em um primeiro momento.

Nas melhores condições, calculou-se o limite de detecção e quantificação como sendo de 75 e 230 $\mu\text{mol L}^{-1}$, respectivamente, demonstrando ser uma alternativa viável para análises em campo principalmente do ponto de vista semi-quantitativo.

Testaram-se alguns compostos explosivos como possíveis interferentes do método, como o HMTD, TATP e nitrobenzeno, sendo que os dois primeiros não reagem com a creatinina e o nitrobenzeno não apresentou alteração de cor. Dessa forma, testes quimiométricos poderão ser utilizados como alternativa para discriminação qualitativa destes compostos no futuro.

O método desenvolvido é interessante do ponto de vista prático e apresenta um baixo custo, uma vez que papel é uma matriz barata e abundante e não requer utilização de materiais específicos de laboratório ou soluções complexas, o que permite a utilização em ambientes remotos (difícil acesso) ou com pouca infraestrutura para análise de suspeita da presença de agentes explosivos.

➤ **Discriminação colorimétrica de explosivos**

1. Preâmbulo

Tradicionalmente em centros urbanos que requerem alta vigilância/fiscalização contra possíveis atentados terroristas com uso de bombas, como aeroportos, zonas portuárias, regiões de fronteiras, embaixadas, entre outros, a fiscalização e detecção de compostos explosivos é geralmente realizado com instrumentação de alto nível que reflete em elevado custo e, assim, baixa acessibilidade a todos os países e/ou regiões com baixa infra-estrutura e orçamento reduzido. Outra possibilidade é a utilização de cães farejadores altamente treinados e com elevada sensibilidade para identificação a esses compostos em que foram treinados. Cães podem farejar explosivos a longas distâncias, e dependendo do treinamento podem apresentar elevada robustez para discriminar esses compostos de outros odores mascarantes, porém eles estão sujeitos ao “vício” de exaustivos treinamentos aos mesmos

compostos, além do que continuamente elaboram-se moléculas sintéticas com propriedades semelhantes, mas com características que propiciem burlar essa detecção.

Os sensores químicos são uma estratégia de detecção alternativa, pois têm potencial para imitar o sistema canino, que é conhecido por ser o método mais viável e móvel para a detecção de uma ampla gama de substâncias suspeitas [144]. Assim, em colaboração com Maiara S. Oliveira e Gabriel N. Meloni desenvolvemos um método simples e robusto para detectar e discriminar amostras de explosivos de duas das principais classes, os nitro-explosivos e os peroxi-explosivos. Para tanto, fizemos uso de um método colorimétrico em papel com a utilização de aparelho celular (iPhone 4S) para captação da imagem e um software para extração dos dados de cor (padrão RGB).

2. Materiais e Métodos

2.1. Reagentes

Foram utilizados os seguintes reagentes: acetonitrila, acetona, ácido cítrico, ácido clorídrico, peróxido de hidrogênio, metanol, cloreto de potássio, ferricianeto de potássio, iodeto de potássio e hidróxido de sódio foram obtidos da Merck (Darmstadt, Alemanha). O 4-amino-2-nitrofenol, anilina, creatinina e cloreto de ferro foi obtido da Sigma Aldrich. Ácido pícrico foi obtido da Reagen (Rio de Janeiro, Brasil). Nitrobenzeno foi obtido da Carlo Erba (Milano, Itália). Todas as soluções de explosivos foram realizadas pela dissolução do explosivo sólido em acetonitrila/metanol (1:1). Os reagentes escolhidos para reagir com os explosivos foram: solução de KI 20 mmol L⁻¹ em ácido clorídrico 1 mol L⁻¹, solução de creatinina 100 mmol L⁻¹ em NaOH 0,1 mol L⁻¹ e anilina grau analítico (99,5%).

Os peroxi-explosivos, triperóxido de triacetona (TATP) e hexametileno-triperóxido-diamina (HMTD) foram sintetizados como reportado na literatura [145, 146].

2.2. Sensor Colorimétrico

Para os testes colorimétricos, foi utilizado um iPhone 4S em um suporte construído para tal smartphone. A extração dos valores de RGB foi realizada por um software desenvolvido para iOS.

Os testes colorimétricos foram realizados utilizando papel de filtro como substrato fabricado com a tecnologia de impressão de cera (impressora de cera Xerox (Norwalk, Connecticut, EUA), conforme já descrito em trabalhos anteriores. Os padrões de impressão consistiram em círculos brancos com um diâmetro de 0,9 cm e com 2,9 cm de distância um do outro, dispostos em um triângulo equilátero sobre um fundo preto (cera). E a metodologia de preparação e utilização do sensor foi conforme o trabalho já reportado no capítulo anterior.

Nas análises colorimétricas, utilizaram-se três diferentes reagentes (KI, creatinina e anilina) para os cinco compostos explosivos (TATP - triperóxido de triacetona, HMTD - hexametileno triperóxido diamina, NB - nitrobenzeno, ácido pícrico, e 4A2NP - 4-amino -2-nitrofenol); cada reagente foi colocado em conjunto com cada um dos explosivos, bem como com o solvente utilizado para dissolver os explosivos (acetonitrila: metanol, 1:1). Os testes foram realizados da seguinte forma: uma gota de 10 μ L do reagente foi colocada sobre um dos pontos e, subsequentemente, uma gota do mesmo volume de um dos explosivos foi colocado no mesmo local. A massa utilizada para explosivos durante os testes colorimétricos foi de 1 mg de nitrobenzeno, 21 μ g para HMTD, 22 μ g para TATP, 23 μ g de ácido pícrico e 15 μ g para 4A2NP.

As condições experimentais foram obtidas com base na melhor resposta analítica levando em consideração algumas características do método proposto: a área que pode ser fotografada e, conseqüentemente, a distribuição espacial dos pontos e seus tamanhos foram limitados pelo campo de visão da câmera sobre o suporte com câmara fechada.

O volume total das soluções utilizadas foi determinado pelo tamanho dos spots previamente fixado. A fim de manter um compromisso entre a velocidade a que o papel absorve a solução e a taxa à qual a solução evapora-se e obter uma cor homogênea durante todo o experimento, o volume de 10 μ L de cada solução foi escolhido como o melhor.

A Figura 84 ilustra o processo de produção ate obtenção dos dados de cor das imagens resultantes após o teste. As fotografias foram tiradas com a câmera de um iPhone 4S da

Apple e um aplicativo no iOS foi desenvolvido por Gabriel N. Meloni com a finalidade de medir os valores RGB de cada spot.

Figura 84- Representação esquemática das etapas de construção, processo de medida para extração e análise dos valores do padrão RGB para a discriminação dos explosivos.

2.3. Suporte para o smartphone

A fim de fixar a distância focal e eliminar a dependência da luz externa durante a aquisição da foto, construiu-se um suporte para afixar o iPhone em polimetilmetacrilato utilizando uma máquina a laser (Gravograph, La Chapelle St Luc, França). O dispositivo possui uma câmara contendo quatro LEDs brancos que proporcionava a iluminação constante para aquisição da imagem. Esse suporte é o mesmo reportado para análises do capítulo anterior.

3. Resultados e discussão

A discriminação entre esses 5 explosivos foi possível obter utilizando apenas 3 simples reagentes: creatinina em meio básico, solução de anilina e solução ácida de iodeto.

Os nitrofenóis reagem com a creatinina em meio básico através da reação de Jaffé [68, 69] formando um aduto colorido laranja-avermelhado. Já o nitrobenzeno reage com a anilina formando um composto marrom, através de uma adaptação do teste de Franchimont [147].

Os peroxi explosivos degradam em meio ácido formando peróxidos orgânicos e esses reagem com o iodeto formando um composto marrom.

Utilizamos dois métodos não supervisionados, Principal Components Analysis (PCA) e Hierarchical Cluster Analysis (HCA), para discriminação e reconhecimento de similaridades entre as amostras de explosivos e assim avaliar a melhor condição experimental. PCA reduz o número de variáveis, criando autovetores ortogonais (componentes principais - PCs) que contêm a variância máxima possível [148]. HCA calcula a distância entre todas as amostras e os apresenta em um gráfico 2D chamado de dendrograma

Avaliou-se o tempo entre a aplicação dos reagentes e aquisição da imagem para melhor discriminação dos explosivos, de 0 a 15 minutos, e o valor ótimo para discriminação das 5 amostras foi de 15 minutos. Os valores de entrada para análises quimiométricas foram sempre a diferença dos padrões de cor RGB do branco analítico e amostra.

A Figura 85 ilustra o gráfico de escores obtidos sobre as melhores condições, bem como a representação das cores obtidas.

Figura 85– A) Sinais colorimétricos para as cinco amostras de explosivos utilizando três reagentes diferentes: 1 - Creatinina, 2 - KI / H⁺, 3 - anilina. Gráfico de escores (PCA) mostrando a separação dos 5 diferentes grupos (amostras de explosivos).

Utilizando esse método, é possível a quantificação entre 0,2 µg a 0,1 mg de explosivos, esses resultados foram obtidos levando em conta o menor valor de massa da

curva de calibração construída, Figura 86, através da correlação entre distancia euclidiana e a massa de cada explosivo, conforme metodologia proposta por [149].

Figura 86- curva de calibração obtida para os explosivos usando a distância euclidiana (ED) dos valores RGB contra a massa.

Esse método desenvolvido é totalmente portátil e de fácil operação, sendo necessário apenas um aparelho celular com o aplicativo para aquisição de padrões de cor (RGB) através de uma fotografia do teste realizado, sendo assim, com promissora aplicabilidade para detecção/discriminação de suspeita de bombas em atentados terroristas ou screening em áreas alfandegárias, por exemplo, através do simples esfregaço do kit sobre áreas de análises.

➤ Detecção de composto intoxicante (melamina)

1. Preâmbulo

A melamina (2,4,6-triamino-1,3,5-triazina; $\text{C}_3\text{H}_6\text{N}_6$; Mel) é adicionada aos produtos de leite cru para aumentar o teor de proteína aparente, uma vez que o teor de nitrogênio na estrutura da melamina é de 66%. Dessa forma, ao adicioná-la aos produtos alimentares, como

o leite, ela eleva a concentração de nitrogênio resultando em uma falsa aparência de um nível mais elevado de proteína pelo método de Kjeldahl [150]. Desde 2007, dois casos de adulteração de leite pela adição de melamina e seus análogos amelina, amelida, e ácido cianúrico foram registrados. O primeiro caso resultou em um grande surto de doença renal, e foi associado com as mortes de cães e gatos nos Estados Unidos devido à contaminação de produtos alimentares para esses animais [151, 152]. Em 2008, a contaminação de melamina no leite e fórmulas infantis foi relatada, o que causou pedras nos rins e insuficiência renal em muitas pessoas; até o final de 2008, cerca de 300 mil pessoas foram afetadas, e também foram relatadas algumas mortes de crianças. Assim, um método simples e confiável para a detecção de melamina no leite é necessário para controlar esta situação, que se tornou uma preocupação global de saúde [151, 153].

2. Materiais e Métodos

2.1. Reagentes

Foram utilizados os seguintes reagentes: melamina obtida da Sigma Aldrich (Brasil; ácido acético, acetato de sódio, ácido ascórbico, ácido sulfúrico, fosfato de sódio, tetraborato de sódio, ácido fosfórico, ácido bórico, cloreto de potássio e hidróxido de sódio foram obtidos da Merck (Darmstadt, Alemanha). As amostras de leite foram obtidas em supermercados locais.

2.2. Análises eletroquímicas

As análises para a caracterização dos processos eletroquímicos foram realizados utilizando voltametria cíclica com eletrodo de cobre em uma janela de potencial de -0,6 a 0,1 V a 100 mV s⁻¹. E posteriormente para elevar a sensibilidade, trocou-se para voltametria de pulso diferencial em uma janela de 0,1 a -0,5 V com valores de passo e amplitude de potencial sendo de 0,01 e 0,2 V respectivamente, e para pré-concentrar íons de cobre, foi aplicado 0,1 V por 120 segundos antes de cada registro voltamétrico.

As medidas utilizando microbalança eletroquímica de cristal de quartzo (EQCM) foram realizadas no módulo EQCM do potenciostato PGSTAT 128N e software NOVA 1.9 disponibilizado pelo fabricante. As análises foram realizadas em solução de ácido sulfúrico

0,25 mol L⁻¹ com 0,1 mol L⁻¹ de cloreto utilizando um cristal piezoelétrico de ouro de 6 MHz e corte AT com área piezoativa de 0,385 mm² e um eletrodo auxiliar também de ouro, com referência comercial de Ag/AgCl. Para análise no EQCM, primeiramente foi realizado um depósito de sulfato de cobre 0,5 mol L⁻¹ em meio de ácido sulfúrico 0,25 mol L⁻¹ aplicando-se -0,25 V por 10 segundos sobre o eletrodo de ouro do cristal piezoelétrico e este sensor foi utilizado para acompanhar a variação de frequência em meio com e sem a melamina.

3. Resultados e discussão

Na literatura, há um trabalho que relata a formação de complexo entre melamina e cobre em condições alcalinas [154] que possibilitava o monitoramento desta espécie. Porém, os autores reportavam a necessidade de meio alcalino e presença de cloreto para a formação dessa espécie de complexo entre melamina-cobre. Contudo não apresentava nenhum estudo dessas condições de formação desse complexo formado. Adicionalmente, o mecanismo proposto pelos autores, parecia ser incoerente uma vez que em meio alcalino, o cobre deveria ser hidrolisado e possivelmente formar hidroxí-complexos.

No trabalho de Zhu e colaboradores [154], eles adicionavam intencionalmente à amostra uma quantidade de sulfato de cobre para a formação do complexo e depois utilizava um eletrodo de carbono vítreo modificado com nanotubos de carbono de paredes múltiplas para a detecção do complexo formado. Assim, buscou-se o desenvolvimento de um método mais elegante e simples utilizando o eletrodo de cobre como sensor, já que é possível liberar in-situ um pouco de cobre durante a análise, evitando contaminar a amostra com esta espécie. Além disso, não seria necessário o trabalho laborioso de modificação da superfície do eletrodo.

Inicialmente, registraram-se voltamogramas cíclicos em soluções contendo diferentes valores de pH na presença e na ausência de cloreto, Figura 87.

Figura 87– Voltamogramas cíclicos registrados com eletrodo de cobre com (-) e sem (--) a adição de melamina ($0,5 \text{ mmol L}^{-1}$) para diferentes meios: (1) ácido sulfúrico $0,25 \text{ mol L}^{-1}$, (2) tampão acetato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 4,6, (3) tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ em pH 7,4, (4) tampão borato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ e pH 9,1 e (5) solução de NaOH 1 mol L^{-1} . A coluna A apresenta meio sem adição de cloreto e na coluna B foi adicionado $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de cloreto no eletrólito suporte. Velocidade de varredura: 100 mV s^{-1} .

Os voltamogramas foram registrados de $-0,6 \text{ V}$ a $0,1 \text{ V}$ e, assim, nota-se que a partir de $E > 0 \text{ V}$, é possível oxidar o cobre da superfície do eletrodo para o meio o que propiciaria a formação do complexo entre Cu e melamina. Observa-se que para meios alcalinos ($\text{pH} > 7$), Figura 87 (3A a 5A) ocorre um alargamento e antecipação dos sinais de oxidação do cobre que é devido à formação do hidroxí-complexo de cobre. Adicionalmente, em meio contendo melamina, Figura 87 (3B a 5B) não se observa sinal faradaico distinto do branco analítico para a possível formação do complexo reportado por Zhu [154].

É possível observar na Figura 87, que apenas em condição bem ácida e em meio contendo cloreto a presença de um sinal faradaico de redução pode ser observada (Figura 87-1B).

Assim, avaliou-se a melhor concentração de cloreto no meio visando à obtenção de um sinal que resultaria em uma maior detectabilidade para a quantificação da melamina, Figura 88.

Figura 88– Voltamogramas cíclicos utilizando eletrodo de cobre para meios sem (--) e com 1 mmol L⁻¹ de melamina (-) em solução de ácido sulfúrico 0,25 mol L⁻¹ com adição de 10 mmol L⁻¹ de cloreto (A), 0,1 mol L⁻¹ de cloreto (B) e 1 mol L⁻¹ de cloreto (C). Velocidade de varredura: 100 mVs⁻¹.

Nota-se a importância da presença de cloreto para o sinal da melamina, uma vez que, em solução contendo até 10 mmol L⁻¹ de cloreto, não se observa sinal para a melamina e em meios contendo muito cloreto (1 mol L⁻¹), ocorre uma supressão do sinal, o que deve estar relacionado a competição entre cloreto e melamina pelos íons cobres liberados no meio. Assim, a melhor condição foi escolhida como sendo de 0,1 mol L⁻¹ de cloreto adicionado ao eletrólito suporte.

Para melhor compreender o mecanismo de resposta da melamina, realizou-se experimentos utilizando EQCM simultaneamente ao registro voltamétrico nas condições otimizadas, Figura 89.

Figura 89 – A) Voltamogramas cíclicos registrados utilizando cristal piezoelétrico de quartzo com cobre eletrodepositado em a superfície de ouro em uma solução sem (--) e com a adição de melamina (concentração final: 1 mmol L⁻¹) (-). Eletrólito de suporte: ácido sulfúrico 0,25 mol L⁻¹ + cloreto de potássio 0,1 mol L⁻¹. Velocidade de varredura: 50 mVs⁻¹. Em (B), variação de frequência com a varredura de potencial.

Sabe-se que o pK_a da melamina é por volta de 5,0 [155], nas condições trabalhadas, a melamina encontra-se predominantemente na forma protonada e este fato dificulta a quelação entre o cobre e esta espécie. Sabe-se ainda da literatura, que algumas resinas de melamina são extratoras de metais através da interação iônica entre esta e o cloro-complexos desses íons [156-158]. Assim, podemos propor que o sinal monitorado deve-se a formação de um par iônico entre melamina e uma espécie aniônica de cloreto de cobre ($MELH^+[CuCl_2]^-$).

Para melhor entender o mecanismo, o gráfico de variação de frequência obtida foi dividido em 4 regiões, conforme a Figura 89B. Em meios sem cloreto, ao aplicarmos potenciais maiores que zero, observamos a oxidação do cobre (região 1), conforme a equação 1.

Ao liberar íons cobre para o meio, forma-se cloreto de cobre que são adsorvidos sobre a superfície do eletrodo (equação 2), ocasionando o decréscimo de frequência (aumento de massa), região 2.

Cálculos utilizando a lei de Faraday mostram que a razão $\Delta m/q$ obtida é concordante com a formação da espécie de cloreto de cobre. Em 3, a razão $\Delta m/q$ obtida é concordante com a formação das espécies da equação 2 e 3, em uma proporção de 65% e 35% para CuCl e CuCl_2^- , respectivamente. Sabe-se que em presença de haletos, é possível estabilizar a espécie de Cu(I) e assim há a formação e estabilidade de CuCl_2^- .

Na região 4, observa-se um aumento da frequência, ou seja, diminuição da massa que é devido à redeposição de cobre metálico e perda dos cloretos das espécies formadas, equações 4 e 5.

Já quando na presença da melamina, nota-se na Figura 89B que o perfil obtido é semelhante, mas com alterações nos valores de frequência medidos. Conforme dito anteriormente, a melamina nas condições trabalhadas, encontra-se protonada, equação 6.

Observa-se que na região 2, ocorre uma maior diminuição da frequência quando comparado com o experimento na ausência de melamina. Essa diminuição da frequência está relacionada à formação das espécies de cloreto de cobre mais a formação do par iônico entre melamina e o cloreto de cobre aniônico, equação 7. Essa proposta é concordante com os valores de $\Delta m/q$ obtidos.

Na região 3, encontrou-se resultado similar a região 2 e assim, o sinal deve-se a competição entre a formação da espécie de cloreto de cobre e o par iônico. Já na região 4, nota-se um aumento da frequência, perda da massa, que é devido à redeposição do cobre para a forma metálica, a liberação dos cloretos e da melamina do par iônico formado (equação 8), bem como os complexos de cloreto de cobre adsorvidos (equações 4 e 5).

Com base nas conclusões acima, a Figura 90 mostra um esquema do mecanismo proposto após o estudo realizado.

Figura 90- Esquema do mecanismo de formação e redução do par iônico entre melamina e o cloreto de cobre.

Depois de avaliado o mecanismo, trocamos a técnica para voltametria de pulso diferencial com o intuito de melhorar a sensibilidade para quantificação da melamina. Otimizaram-se os valores dos parâmetros da técnica e para elevar a detectabilidade, avaliou-se um tempo de pré-concentração que consistia em aplicar 0,1 V por um dado tempo antes da análise para liberar mais íons cobre para o meio. O tempo ótimo foi de 240 segundos e após todas as otimizações, construiu-se uma curva analítica, Figura 91.

Figura 91– Voltamogramas de pulso diferencial registrados com eletrodo de cobre em meio contendo ácido sulfúrico $0,25 \text{ mol L}^{-1}$ + cloreto de potássio $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (--) e com adições de 5, 15, 25, 45, 60 e 90 μmol L^{-1} de melamina (-). Parâmetros: Passo de potencial de $0,01 \text{ V}$ e amplitude de $0,2 \text{ V}$. Ao lado a curva analítica obtida.

Nas melhores condições, obteve-se uma linearidade entre 5 e 90 μmol L^{-1} de melamina e uma equação da reta de: $(I/A) = 3,32 \times 10^{-4} + 98,6 (C/ \text{μmol L}^{-1})$ ($R^2 = 0,995$). O limite de detecção foi estimado em $0,85 \text{ μmol L}^{-1}$ e a repetibilidade do método foi avaliada para a análise de 20 sucessivos registros apresentando um desvio padrão de 1%.

É possível notar que o pico de sinal obtido é largo e pode sofrer um pequeno deslocamento para a região mais negativa. Esse comportamento pode ser justificado, uma vez que o mecanismo envolve uma etapa de adsorção prévia e sabe-se que esses processos apresentam, em geral, uma cinética lenta, o qual limita o processo de transferência de carga.

Melamina pode ser detectada na urina como um marcador de intoxicação [159, 160], porém devido aos constantes relatos de adulteração alimentar, mais especificamente em leite, aplicou-se para a análise deste composto nessa matriz, porém, avaliou-se antes a possibilidade de interferência de algumas substâncias presentes na matriz do leite. A Tabela 6 ilustra os resultados obtidos.

Tabela 6 – Avaliação de algumas possíveis substâncias interferentes para quantificação de melamina pelo método proposto.

Interferentes	Sinal de Corrente / mA
Branco	(27,7 ± 0,8)
Ácido ascórbico	(26,8 ± 0,7)
Glicose	(26,9 ± 0,6)
Lactose	(26,1 ± 1,1)

As concentrações das espécies possivelmente interferentes eram de 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e as análises foram realizadas em triplicata. Após verificar a ausência de interferência das principais espécies presentes em leite, avaliou-se a recuperação do método para a adição de 200 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de melamina diretamente em amostras comerciais de leite integral e obteve-se recuperações em uma faixa de 93 a 104%.

Wearable Sensors

1. Preâmbulo

Durante o doutoramento, foi realizado um estágio de pesquisa de 6 meses sob a supervisão do Prof. Dr. Joseph Wang, na Universidade de San Diego na Califórnia. Durante esse período, trabalhou-se na confecção de sensores com características portáteis e utilizáveis junto ao corpo para monitoramento constante de compostos de interesse, os chamados *wearable sensors*.

O desenvolvimento de *wearable sensors* é uma área interessante e relativamente recente, sendo que o grupo do Prof. Dr. J. Wang uma referência nesse campo de pesquisa. Procurou-se desenvolver esses *wearable sensors* como uma forma de adquirir o conhecimento e experiência para fabricar esses dispositivos para uma aplicação futura para o monitoramento contínuo de drogas de abuso diretamente sobre o corpo e com intuito de análise toxicológica.

Um dos maiores desafios do ponto de vista de aplicação destes sensores são as etapas de fabricação, transferência para o corpo e a aquisição de sinal, ou seja, o processo de engenharia do sistema, uma vez que do ponto de vista químico, a realização de modificações químicas visando sensibilidade e seletividade para as análises estão bem estabelecidos. Salvo a necessidade de utilizar substâncias não tóxicas e biocompatíveis.

Wearable sensors podem fornecer informações significativas sobre o estado de saúde e o desempenho dos indivíduos [161]. Os primeiros esforços neste campo resultaram em uma variedade de sensores físicos para monitorar a atividade e os sinais vitais como a frequência cardíaca, temperatura corpórea, taxa de respiração, ou movimento corporal [162]. Recentemente, estes estudos foram ampliados para o monitoramento de forma não invasiva dos eletrólitos e metabólitos na epiderme baseado em eletrodos flexíveis do tipo tatuagem temporárias que aderem à superfície da pele [60, 64, 65].

➤ **Deteção de Zn^{2+} em suor com sensor eletroquímico tipo tatuagem**

Zinco é um importante elemento em níveis traço para processos bioquímicos, sendo relevante para enzimas, hormônios e fatores relacionados à transcrição [163]. Mudanças na

concentração de Zn^{2+} em biofluidos podem ser usadas como indicadores para amplos estados fisiológicos, tais como danos musculares devido ao estresse físico e o sistema imunológico [164, 165]. Cordova e colaboradores observaram em seres humanos uma diminuição da resistência durante atividade física associada com a variação do metabolismo de zinco devido ao aumento de sua excreção e ao estresse [166].

A transpiração representa uma via importante para a excreção de zinco, que conduz à sua deficiência no organismo [167]. A identificação da perda de zinco durante a atividade física é extremamente importante, porém, atualmente não existem ferramentas para a detecção em tempo real de níveis traços (níveis fisiológicos) de metais no suor.

A concentração de Zn^{2+} na transpiração humana depende do estado nutricional e da saúde dos indivíduos. Falta de Zn^{2+} faz com que indivíduos sintam fadiga facilmente. O nível fisiológico de Zn^{2+} no suor humano é muito baixo e varia entre 0,39 a 1,56 ppm segundo relatos da literatura [168-170].

2. Materiais e Métodos

2.1. Reagentes e Instrumentação

Todos os reagentes utilizados foram de grau analítico e empregados como recebidos. Zinco, bismuto, chumbo, cádmio e cobre foram soluções padrão absorção atômica (1000 mg L^{-1} em ácido nítrico). Cloreto de sódio, tampão acetato de sódio pH = 4,6, Nafion® (5% em peso) foram adquiridos da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). As medidas eletroquímicas foram realizadas utilizando um potenciostato tipo μ Autolab II (Eco Chemie, Holanda).

2.2. Fabricação dos sensores tipo tatuagem temporária

Foi utilizado um design “NE” para o sensor tatuagem (Figura 92A) que é a abreviatura do nome do departamento, "nanoengineering". O processo de fabricação dos eletrodos *screen-printed* no papel de transferência temporária para tatuagem (HPS LLC, Rhome, TX) é semelhante ao trabalho anterior do grupo [64]. Subsequentemente, o eletrodo

de trabalho de carbono foi modificado pela adição de 2 μL de Nafion®. Após um período de secagem, cerca de 3 horas, foi eletrodepositado um filme de bismuto sobre a superfície do eletrodo modificado, através da aplicação de um potencial de -0,8 V durante 4 min utilizando uma solução de 50 ppm de bismuto (em tampão de acetato 0,1 mol L⁻¹).

2.3. Avaliação *in-vitro* do sensor tipo tatuagem

Voltametria de onda quadrada com redissolução anódica foi utilizada para caracterizar o perfil eletroquímico do sensor de tatuagem. A fim de avaliar o desempenho *in-vitro*, os sensores foram transferidos para um substrato plástico para testes de calibração e de estabilidade da resposta eletroquímica.

Utilizou-se uma malha têxtil flexível (GORETEX) para a realização de testes de tensão mecânica. O esquema da Figura 92 B representa o procedimento eletroquímico para análise. Utilizou-se um potencial de -1,4 V para pré-concentração do zinco durante 120 s, e uma faixa de potencial para análise de -1,4 a - 0,4 V. Os parâmetros ótimos foram: frequência de 25 Hz, amplitude de 25 mV, e passo de potencial de 4 mV em tampão acetato (pH 4,6) contendo 0,1 mol L⁻¹ de NaCl.

Utilizou-se uma etapa de limpeza da superfície do eletrodo após cada análise, que consistia em aplicar um potencial de -0,4 V por 2 min para remover traços de metais remanescentes após a redissolução anódica. Construiu-se uma curva de calibração para o Zn²⁺ numa faixa de 0,1 a 2,0 ppm. As propriedades de tensão mecânica foram verificadas por repetitivas dobraduras até 90° e estiramento dos sensores de até 10 % por 5 s sobre o substrato textil GORETEX. Os sensores foram relaxados por 5 segundos e esse procedimento repetido 5 vezes após cada medida eletroquímica por onda quadrada para avaliação da resposta de zinco para uma concentração de 1 ppm. Estes procedimentos foram realizados visando mimetizar as propriedades viscoelásticas da pele.

2.4. Testes do sensor sobre o corpo

Estudos sobre a epiderme foram realizados como descritos em trabalho prévio do grupo [60], e em conformidade com o protocolo que foi aprovado pelo Conselho de Revisão

Institucional da Universidade da Califórnia. Foram feitas análises em 7 voluntários (2 mulheres e 5 homens). Os sensores foram transferidos para o braço do indivíduo para o monitoramento da concentração do zinco eliminado no suor durante atividades físicas (Figura 92).

Para realização dos testes eletroquímicos, foi solicitado aos voluntários a realização de exercícios (pedalar) sobre uma bicicleta ergométrica. Após suar, cerca de 15 min de exercício intenso, foram registrados voltamogramas com o sensor anexado ao corpo e coletado parte do suor para análise ex-situ para quantificação do zinco por adição de padrão.

Figura 92- (A) Ilustração esquemática do sensor tipo tatuagem temporária e da composição do eletrodo modificado ex-situ através da eletrodeposição de bismuto e adição de Nafion. (B) Procedimento eletroquímico para detecção de Zn²⁺ (C) Monitoramento de zinco em tempo real durante atividade física com o sensor transferido sobre o braço do indivíduo.

3. Resultados e discussão

Na detecção eletroquímica, o potencial para deposição e detecção de Zn(II) é muito negativo (perto da evolução de hidrogênio) em comparação com outros metais a níveis traço. Assim, tornou-se necessário o uso de eletrodos modificados por filme fino de bismuto com o intuito de aumentar o sobrepotencial para a evolução do hidrogênio [171]. Eletrodos de bismuto são inócuos ambientalmente, simples de utilizar, têm maior sensibilidade frente aos

eletrodos metálicos convencionais, corrente de pico bem definida, uma grande janela de potencial negativo e pouco sensível ao oxigênio dissolvido, tornando-o extremamente útil para a eletroanálise de metais [171, 172]. Eletrodos de filme de bismuto eletrodepositados ex-situ têm sido utilizados devido à sua elevada estabilidade. A esse sensor, foi acoplada uma camada de Nafion que facilita a pré-concentração de íons metálicos, devido a sua natureza aniônica e, além disso, minimiza a adsorção de proteínas e outros compostos orgânicos [173] existentes no suor, permitindo assim um aumento da resposta de pico de corrente e com boa estabilidade de resposta no suor humano.

Inicialmente, foi realizada a caracterização in-vitro do sensor, para tanto, foram registrados voltamogramas de onda quadrada em 100 μL de tampão acetato (pH 4,6) contendo 0,1 mol L^{-1} NaCl aplicado sobre o sensor. O NaCl foi adicionado ao tampão para simular a composição de cloreto no suor humano, o que melhora o sinal voltamétrico de Zn^{2+} , conforme a literatura [168]. A Figura 93 ilustra típicos voltamogramas de redissolução anódica de zinco obtido com o sensor modificado com filme de bismuto e camada de Náfion. A concentração avaliada de zinco varia entre 0,1 a 2,0 ppm, cobrindo o nível fisiológico em que esse metal é encontrado no suor.

Figura 93- Caracterização in-vitro dos sensores tipo tatuagem para análise de Zn^{2+} . (A) Voltamogramas de redissolução anódica para o aumento da concentração de Zn^{2+} na faixa de 0 a 2,0 ppm. Ao lado, encontra-se inserida a curva de calibração correspondente. (B) Teste de estabilidade para resposta de 1ppm de zinco para 6 repetitivas varreduras, bem como o gráfico de resposta relativa da intensidade de pico de corrente para esses voltamogramas.

Parâmetros: tampão acetato (pH 4,6) contendo 0,1 mol L⁻¹ de NaCl; potencial de deposição de -1,4V por 120 s; frequência de 25 Hz, amplitude de 25 mV e passo de potencial de 4 mV.

O eletrodo tipo tatuagem modificado com Náfion e bismuto proporciona uma resposta bem definida para o tempo de 2 min de deposição de zinco. O pico de redissolução anódica aparece em um potencial próximo de -1,1 V *vs* Ag/AgCl. Um pico de redissolução do Zn²⁺ pode ocorrer em um potencial menos negativo devido ao equilíbrio entre Zn(II) e Cl⁻, o que também proporciona uma melhora da intensidade de pico de corrente [168].

Na Figura 93 observa que o pico de corrente aumenta proporcionalmente com o aumento da concentração do Zn²⁺, conforme curva de calibração que apresenta uma sensibilidade de 23,8 µA/ppm ($R^2 = 0,999$). O limite de detecção foi estimado como sendo de 0,05 ppm com base na relação sinal/ruído ($3\sigma/S = 3$).

Em seguida, avaliou-se a repetibilidade do sensor tatuagem para uma solução de 1 ppm de Zn(II) (Figura 93B). Para 6 medidas sucessivas, cerca de 94,7% do sinal foi mantido, o que reflete a estabilidade da resposta de Zn para esse sensor (desvio padrão relativo de 5,2 %).

O monitoramento de compostos sobre a epiderme requer uma avaliação da resistência do sensor contra deformações mecânicas durante uma variedade de atividades físicas. Assim, o sensor de tatuagem foi inicialmente transferido para um pulso humano, onde ele pode enfrentar grandes e frequentes movimentos (Figura 94).

O sensor foi submetido a 100 repetitivas dobraduras e estiramentos para mimetizar um stress mecânico severo que pode ser submetido durante as atividades físicas diárias. Nenhum dano para o eletrodo de tatuagem após estes ciclos de tensão foi observado (Figura 94 (A, B)). Além disso, a resposta eletroquímica foi mantida sob 30 desses ciclos de tensão mecânicas repetidas, refletindo a robustez do sensor em suportar os esforços de deformação durante o exercício (Figura 94 C).

Figura 94- Fotografias do sensor de tatuagem "NE" transferido para um pulso humano para testes de tensão mecânica, que envolvem (A) dobraduras e (B) estiramentos. (a) flexão e alongamento do pulso com o sensor; (b) o sensor de tatuagem durante os testes de dobragem e alongamento e (c) o sensor após 100 testes de dobradura e estiramento. (C) Resposta relativa para o pico de redissolução anódica para a concentração de 1 ppm de Zn durante uma série de 30 dessas deformações, sendo registrado voltamogramas após uma série de cada 5 dos testes de alongamento (direita) e flexão (esquerda).

Após toda caracterização in-vitro e verificada a boa resistência do sensor, foi avaliado o desempenho eletroquímico sobre o corpo humano durante atividade física. O sensor do tipo tatuagem foi transferido para a deltoide do indivíduo a ser monitorado, Figura 92A, conforme trabalhos prévios [60, 64]. Durante cada teste, os voluntários pedalarão cerca de 15 min até surgir uma quantidade visível de suor sobre a pele para formação da "célula eletroquímica" essencial para a detecção de Zn(II) com uma corrente de fundo estável e uma separação de picos bem definido. A Figura 95 ilustra três voltamogramas representativos para análise no corpo durante atividade física (A-C). Estes resultados mostram picos bem definidos para a redissolução anódica do Zn^{2+} em potencial próximo de -1,15 V indicando que o *wearable Zn*

sensor pode ser utilizado com êxito para detectar a presença de Zn^{2+} no suor durante o exercício físico.

Figura 95- (A-C) Voltamogramas de redissolução anódica registrados sobre o corpo para monitoramento de Zn^{2+} no suor durante atividade física de três diferentes indivíduos. (D) Voltamogramas para adição sucessiva de solução padrão de Zn^{2+} sobre amostra de suor coletado e utilizando o sensor tatuagem. Parâmetros idênticos aos valores ótimos reportados acima

O voltamograma do indivíduo A mostra um pequeno pico adicional em torno de -0,6 V (Figura 95A), atribuída à possível presença de chumbo no suor, e reflete a capacidade de análise de outros metais no mesmo sensor. O comportamento dos picos detectados de Zn^{2+} quando o sensor é operado sobre o corpo apresenta pequenas alterações como um sinal mais largo e uma maior corrente de fundo, quando comparado com os testes in-vitro (tampão acetato), o que é resultado da matriz mais complexa do suor humano em relação ao tampão acetato. Além da possível formação de compostos intermetálicos entre Zn e Cu, haja vista

que esse último pode ser encontrado em altas concentrações no suor humano ($0,4 \mu\text{mol L}^{-1}$ a $33,2 \mu\text{mol L}^{-1}$) [174].

Finalmente, para quantificar a quantidade de Zn(II) em suor, a amostra de suor de um dos indivíduos foi coletada e analisada. Foi realizada a análise por adição de padrão in vitro dessa amostra de suor sem nenhum pré-tratamento prévio (Figura 95 D). O valor de zinco encontrado nessa amostra de suor foi 0,34 ppm, o que é consistente com a faixa relatada na literatura (0,39 a 1,56 ppm) [104]. Esta ampla faixa de concentração de Zn no suor pode ser atribuída a diferenças na absorção diária de alimentos, bebidas, medicamentos, estado de saúde juntamente com outros efeitos ambientais e metabólicos.

➤ Detecção de ácido úrico em saliva

1. Preâmbulo

Saliva é um importante fluído biológico para análises fisiopatológicas em seres humanos, sendo uma forma alternativa a análise sanguínea. A utilização da saliva tem muitas vantagens, incluindo o seu método simples e não invasivo de coleta (sem necessidade de perfuração para coleta, como a de sangue) e seu armazenamento fácil e de baixo custo [175]. Uso da saliva para monitorar o estado de saúde e doença de um indivíduo é um objetivo altamente desejável para a investigação e promoção da saúde [175].

Os primeiros trabalhos com sensores eletroquímicos salivares foram demonstrados por Graf na década de 1960, medindo os níveis de pH e de íon fluoreto [176, 177]. Recentemente, o grupo dos professores D. Diamont e J. Wang têm publicado trabalhos utilizando eletrodos screen-printed para construção de sensores potenciométricos e amperométricos para monitoramento de pH e alguns metabólitos [178, 179]. Apesar destes avanços recentes, o desempenho de biossensores portáteis para o monitoramento em tempo real dos marcadores químicos é limitado pelo pequeno número de analitos alvo demonstrados e a falta de transmissão de dados sem fio integrado as plataformas de medição [180].

Ácido úrico (UA) é o produto final do metabolismo das purinas no corpo humano. Uma concentração anormal de UA é um biomarcador para várias doenças, incluindo a

hiperuricemia, gota, síndrome de Lesch-Nyhan, e síndrome renal [181, 182], UA também pode ser um indicador de estresse físico induzindo espécies reativas de oxigênio, atuando como um captador de radicais livres [183]. Shibasaki [184] e Soukup [185] encontraram uma boa correlação entre os níveis de sangue e saliva para UA, demonstrando que este metabólito pode ser monitorado na saliva de uma forma não invasiva, sem necessidade de coleta de sangue.

2. Materiais e Métodos

2.1. Reagentes e instrumentação

Uricase (5 U/mg) de origem da espécie *Candida*, o-fenilenodiamina (OPD), ácido láctico (LA), glicose, ácido ascórbico (AA), acetaminofen (ACT), ácido úrico (UA), sulfato de sódio, cloreto de sódio, cloreto de cálcio, cloreto de potássio, ácido cítrico, tiocianato de potássio, cloreto de amônio, potássio monobásico, potássio dibásico, albumina bovina sérica (BSA) e gluteraldeído foram obtidos da Sigma Aldrich (St. Louis, MO) e foram usados sem prévia purificação ou modificação. Alopurinol® 150 mg foi obtido em farmácias locais.

Uma impressora “screen printer” semiautomática MPM SPM (Speedline Technologies, Franklin, MA) foi usada para imprimir os eletrodos. Os designs dos eletrodos foram feitos em AutoCAD (Autodesk, San Rafael, CA). Utilizou-se um potenciostato da CH Instruments (Austin, TX) modelo 621A para testes de caracterização. E um dispositivo portátil eletrônico com transmissão wireless para aquisição dos valores de corrente.

2.2. Fabricação e modificação química do biossensor no protetor bucal

Os biossensores no protetor bucal foram impressos em substrato flexível PET com três camadas separadas. Primeiro, utilizou-se uma tinta condutiva Ag/AgCl (124-36, medical grade, Creative Materials Inc., MA USA) para imprimir o eletrodo de referência. Uma tinta de grafite com azul da prússia (C2070424P2, Gwent Inc., Torfaen, Reino Unido) foi usada para fabricar os eletrodos de trabalho e contra eletrodos. Por fim, uma camada de isolante foi

impressa com pasta dielétrica da Dupont 5036 (Wilmington, DE, USA) para definir a área dos eletrodos.

Após as etapas de impressão, as camadas impressas foram curadas a 80 °C por 20 min. O eletrodo de trabalho possuía diâmetro de 3 mm e foi adicionalmente modificado com enzima uricase e uma membrana polimérica para proteção contra passivação da superfície eletródica pela adsorção de substâncias orgânicas presentes. Para tanto, 3,0 mg de uricase foram preparadas com 2 mg de BSA e 1 µL de uma solução de glutaraldeído 8% em 200 µL de tampão fosfato. 3 µL dessa solução foram adicionadas sobre a superfície do eletrodo de trabalho e deixado secar por 30 min. Por fim, eletropolimerizou-se a o-fenilenodiamina (OPD) sobre a camada de enzima através da aplicação de 0,6 V por 5 minutos em meio de tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ (pH 7,0) contendo 10 mmol L⁻¹ de OPD, 5 mmol L⁻¹ de sulfato de sódio para minimizar a adsorção dos constituintes da saliva. A Figura 96B esquematiza a composição química do eletrodo de trabalho modificado sobre a plataforma do protetor bucal. O biossensor fabricado foi anexado ao protetor bucal e feito os contatos elétricos com fios à placa de circuito miniaturizada para aquisição e transmissão dos dados em tempo real.

Figura 96- (A) Fotografia do biossensor em protetor bucal integrando a placa de circuito amperométrico sem fio. (B) Esquema da composição do eletrodo de trabalho de carbono com azul da Prússia (AP) contendo uricase para análise de UA salivar. (C) Fotografia da placa de circuito amperométrico sem fio: lado da frente (esquerda) e no verso (direita).

2.3. Avaliação eletroquímica em saliva artificial

O desempenho eletroquímico do biossensor para ácido úrico na saliva foi primeiramente avaliado em saliva artificial que possui uma concentração de eletrólitos semelhantes a saliva humana[186].

A saliva artificial foi preparada por dissolução de 5 mmol L⁻¹ de NaCl, 1 mmol L⁻¹ de CaCl₂, 15 mmol L⁻¹ de KCl, 1 mmol L⁻¹ de ácido cítrico, 1,1 mmol L⁻¹ de KSCN, e 4 mmol L⁻¹ de NH₄Cl em água destilada. O pH da saliva artificial foi ajustado para 6,7 que é uma média do pH da saliva humana saudável [187]. As medidas cronoamperométricas do ácido úrico utilizando o biossensor foram realizadas em potencial de -0,3 V durante 60 s após 1 min de incubação na solução da amostra. A curva de calibração foi obtida com incrementos de 50 µmol L⁻¹ de UA até 1 mmol L⁻¹ em 100 µL de saliva artificial.

A estabilidade do biossensor foi avaliada numa solução de 350 µmol L⁻¹ de UA em intervalos de 10 min durante 2 horas de funcionamento. O sensor foi mantido em saliva artificial entre tais medições sucessivas. A seletividade foi avaliada na mesma concentração de UA (350 µmol L⁻¹) em saliva artificial, sob agitação e na presença de interferentes fisiológicas relevantes: 200 µmol L⁻¹ de AA, 800 µmol L⁻¹ de glicose, 100 µmol L⁻¹ de ACT e 1 mmol L⁻¹ de LA. A concentração de cada interferente foi escolhido levando em consideração um possível incremento na concentração pela ingestão de suplementos, doenças e práticas de exercícios [188-190].

2.4. Avaliação eletroquímica em saliva humana não diluída

As amostras de saliva humana foram recolhidas de alguns voluntários usando o método "salivação passiva" [191]. As amostras recolhidas foram diretamente utilizadas para as medidas eletroquímicas sem qualquer tratamento. A concentração de UA nas amostras de saliva foi determinada através do método de adição de padrão, empregando as mesmas condições experimentais usadas com o teste em saliva artificial (E = -0,3 V durante 60 s). Resumidamente, 100 µL de saliva foram adicionados sobre a superfície do eletrodo e então incubados durante 60 s antes de realizar a medida.

Subsequentemente, a amostra de saliva foi misturada com a solução padrão de UA para obter uma concentração de $0,2 \text{ mmol L}^{-1}$, seguida por 60 s de incubação de antes da medição de corrente, repetindo o processo até 1 mmol L^{-1} de ácido úrico.

O teste de estabilidade em amostras reais de saliva foi realizado de forma a obter um registro amperométrico a cada 20 minutos e a amostra foi substituída a cada medida, considerando a taxa de fluxo de saliva na boca (não estimulado: 1 ml / min , estimulada: 2 ml / min) [192], mas mantendo o sensor imerso em saliva entre tais operações sucessivas.

2.5. Monitoramento do ácido úrico salivar em paciente hiperuricêmico sobre tratamento

Visando demonstrar uma utilidade prática do sensor desenvolvido para monitorar as condições de saúde, os níveis de ácido úrico salivar foram monitorados em dois tipos de voluntários: um paciente hiperuricêmico e um voluntário saudável. Para verificar as flutuações nos níveis de UA durante o dia, a saliva foi recolhida e medida a cada uma hora, sem qualquer tratamento adicional por um período de tempo de 5 h. Cada amostra foi medida pelo método de adição de padrão para quantificar a quantidade da UA na amostra de saliva, como indicado na Secção 2.4. O paciente que apresentava hiperuricemia, ao final dos testes fez o uso de Alopurinol® 150 mg, administrado por via oral na dose de dois comprimidos/dia durante 4 dias. Em cada um destes quatro dias, coletaram-se amostras de saliva em três momentos distintos e a concentração correspondente de UA foi estimado através do método de adição de padrão conforme descrito na Secção 2.4.

3. Resultados e Discussão

É bem estabelecido na literatura que existe uma alta correlação entre o nível de UA no sangue e o salivar [184, 185]. Desta forma, os níveis de UA salivares refletem os níveis de UA no sangue, de modo que esse pode ser estimado por meio do monitoramento não invasivo ou minimamente invasivo de UA salivar. Biossensores eletroquímicos são métodos atraentes

para detecção de UA devido às suas vantagens, tais como miniaturização, alta sensibilidade e custo [193-195]. Apesar destas vantagens, a detecção eletroquímica de UA tem vários desafios a serem superados. O primeiro desafio é a necessidade de elevada seletividade em relação ao ácido ascórbico (AA), que é uma espécie eletroativa comumente presente nos biofluidos e que apresenta potencial de oxidação semelhante ao do UA. A fim de evitar a interferência do AA, a enzima uricase pode ser utilizada para oferecer seletividade, produzindo peróxido de hidrogênio e alantoína [195-197]. O peróxido de hidrogênio gerado pode ser eletroquimicamente monitorado para determinar a concentração de UA, seja pela sua oxidação ou redução. Essa reação química está descrita na Figura 96B. Devido ao maior sobrepotencial na reação de oxidação do peróxido, outras espécies eletroativas na saliva podem interferir com o sinal através da sua própria oxidação. Portanto, a utilização da redução do peróxido de hidrogênio é preferível e um mediador catalítico é normalmente utilizado para diminuir o potencial necessário, tais como os análogos do azul da Prússia [198]. A saliva é uma matriz complexa devido à sua elevada viscosidade (diminuindo o processo de transferência de massa), alta concentração de proteínas (induz a passivação do eletrodo quando polarizado), e as espécies eletroativas (causam interferência através da oxidação). Portanto, a modificação do eletrodo é altamente necessária para a medição eletroquímica direta nessa matriz, especialmente para monitoramento contínuo.

A membrana de polifenilenodiamina (OPD) é bem conhecida por sua capacidade de rejeitar espécies eletroativas e prevenir a bio-passivação eletródica [179]. Além disso, um transdutor contendo azul da Prússia oferece detecção catódica seletiva para o peróxido de hidrogênio produzido pela reação enzimática do UA [198].

Primeiramente, o desempenho eletroquímico do biossensor proposto foi avaliado em saliva artificial. O nível de UA salivar normal para uma pessoa saudável varia de $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ a $250 \mu\text{mol L}^{-1}$ [184, 185]. A fim de garantir o monitoramento de UA em pacientes com hiperuricemia para aplicações de diagnóstico e tratamento, um intervalo dinâmico de concentrações de UA na faixa de 0 a 1 mmol L^{-1} foi avaliado. A Figura 97A exibe os cronoamperogramas para o aumento das concentrações de UA em incrementos de $50 \mu\text{mol L}^{-1}$ em saliva artificial. Os dados indicam que o biossensor apresenta boa sensibilidade ao UA. A resposta de corrente é proporcional a concentração de UA na faixa estudada, resultando na curva de calibração linear exibido Figura 97A. A equação da reta apresenta uma sensibilidade de $2,32 \mu\text{A} / \text{mmol L}^{-1}$ e coeficiente de correlação $R^2 = 0,998$.

Figura 97- Desempenho eletroquímico em saliva artificial (A) Cronoamperogramas obtidos em diferentes concentrações de UA (incrementos de 50 $\mu mol L^{-1}$ até concentração final de 1 $mmol L^{-1}$). A curva de calibração resultante encontra-se inserida ao lado. (B) Estabilidade da resposta eletroquímica para a concentração de 350 $\mu mol L^{-1}$ de UA durante uma operação de 2 h, com medições efetuadas em intervalos de 10 min. Ao lado encontra-se inserido o gráfico de corrente relativa versus o tempo estudado. Todas os testes foram realizados com potencial aplicado de -0,3 V (vs Ag/AgCl) e um tempo de amostragem de corrente de 60 s.

Uma vez que a saliva humana é uma matriz muito complexa contendo vários interferentes, a seletividade deve ser assegurada para aplicações reais. Avaliou-se esse parâmetro pela medição contínua sob condições de potencial fixo e a agitação, na presença das espécies relevantes de saliva humana, incluindo a glicose, lactato, ácido ascórbico, e acetaminofen [179, 187, 189, 190, 199], Figura 98.

Figura 98- Seletividade do biossensor em protetor bucal. Cronoamperograma registrado em saliva artificial para a adição de UA na concentração de $350 \mu\text{mol L}^{-1}$ e na presença de potenciais interferentes fisiológicos ($200 \mu\text{mol L}^{-1}$ de ácido ascórbico, $800 \mu\text{mol L}^{-1}$ de glicose, $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ de acetaminofen, 1 mmol L^{-1} de lactato). Condições como na Figura 97.

Como mostrado na Figura 98, o biossensor exibe uma nítida resposta a $350 \mu\text{mol L}^{-1}$ de UA e uma resposta negligenciável para outras espécies potencialmente interferentes, vale destacar que este teste foi realizado sob agitação constante e por isso apresenta um sinal de fundo ruidoso. Conforme Figura 97B, o biossensor apresentou uma boa estabilidade para a condição analisada ($350 \mu\text{mol L}^{-1}$ de UA) para um período de 2 horas com medições em intervalos de 10 min, (desvio padrão relativo (RSD): 3,5%). Esta resposta estável indica uma eficaz imobilização da enzima devido à reação de reticulação entre BSA e gluteraldeído, bem como a camada de OPD eletropolimerizado.

Em seguida, o desempenho do biossensor foi testado na saliva humana não diluída através do método por adição de padrão (descrito na Seção 2.4). Como ilustrado na Figura 99, o biossensor oferece uma resposta favorável a diferentes concentrações de ácido úrico em saliva humana não diluída, exibindo cronoamperogramas bem definidos.

A curva de calibração resultante, mostrado na Figura 99A, apresenta boa sensibilidade e linearidade (sensibilidade de $1,08 \mu\text{A} / \text{mmol L}^{-1}$; coeficiente de correlação $R^2 = 0,999$). Com base nesse dado, o nível de UA salivar pode ser estimado como sendo de $488 \mu\text{mol L}^{-1}$.

Apesar da presença de numerosos potenciais interferentes na matriz da saliva, por exemplo, compostos eletroativos coexistentes e proteínas, o biossensor oferece uma resposta de corrente bem definida e distinta dentro dos níveis fisiológicos do UA salivar.

Figura 99- Desempenho eletroquímico na saliva humana não diluída. (A) Resposta cronoamperométrica de saliva humana não diluída e enriquecida com concentrações crescentes de UA em incrementos de 0,2 mmol L⁻¹. A curva de calibração resultante é mostrada inserida ao lado. (B) Estabilidade da resposta na amostra de saliva humana enriquecida com 350 μM L⁻¹ de UA. Medidas repetidas foram realizadas a intervalos de 20 minutos ao longo de um período de 2 h. O gráfico inserido reporta a corrente relativa com base na resposta da corrente inicial ($t = 0$ s). O sensor foi mantido na saliva entre tais medições sucessivas. Potencial aplicado de -0,3 V e $t = 60$ s.

A estabilidade do biossensor foi avaliada em saliva humana em intervalos de 20 min durante 2 h a fim de confirmar a ausência de passivação de proteínas presentes na saliva. As respostas para o UA salivar mostradas na Figura 99B indica que o sensor desenvolvido é promissor para o monitoramento contínuo do status de saúde do usuário. Além disso, a boa linearidade e estabilidade da resposta (RSD de 4,9%) fornecem evidências de que o sistema é aplicável para o monitoramento real de indivíduos que apresentem distúrbios de gota aguda, diabetes e/ou estresse oxidativo induzido por exercícios, distúrbios esses que estão relacionados com os níveis de UA do indivíduo.

O monitoramento de UA pode ser aplicado numa variedade de campos, especialmente em cuidados de saúde e aplicações clínicas, incluindo o diagnóstico e acompanhamento do tratamento de doença. O novo biossensor desenvolvido em protetor bucal para UA foi testado para uso prático em uma aplicação típica (acompanhamento da hiperuricemia). Neste estudo, o UA salivar foi monitorado e comparado com a saliva recolhida de um voluntário saudável e

de um paciente hiperuricêmico que já foi diagnosticado por um médico como tendo um nível elevado UA em níveis séricos. A Figura 100A mostra os níveis de UA salivar monitorado tanto para o controle do indivíduo saudável quanto do paciente hiperuricêmico, medidas realizadas em intervalos de uma hora durante 5 horas.

Figura 100- Monitoramento dos níveis de UA salivar para voluntário saudável (•) e um paciente hiperuricêmico (■) obtidos com o biossensor em protetor bucal ao longo de um período de 5 h.

O nível de UA salivar foi estimado através do método por adição de padrão. Ambos os indivíduos demonstram níveis de UA salivar consistentes com pequenas variações, as quais são devidas ao fato de que o UA salivar pode ser influenciado pelo ritmo circadiano durante o dia e por ingestão de bebidas e alimentos. Apesar destas pequenas variações, houve uma diferença significativa nos níveis de UA salivar encontrado entre o voluntário saudável e do hiperuricêmico ($178,5 \pm 20,7 \mu\text{mol L}^{-1}$) e ($822,6 \pm 26,25 \mu\text{mol L}^{-1}$), respectivamente. Estes dados suportam a adequabilidade do biossensor em protetor bucal desenvolvido como uma ferramenta de diagnóstico não invasivo para a hiperuricemia.

O paciente com hiperuricemia não tratada no teste mostrou um alto nível de UA salivar durante o teste por 5 h. Em seguida, foi feito o uso de medicação adequada para normalizar os níveis de UA. O acompanhamento deste tratamento de hiperuricemia sob medicação é demonstrado na Figura 101. O paciente, neste teste fez o uso de 2 comprimidos ao dia de Alopurinol® 150 mg, o qual inibe a atividade da xantina oxidase e, assim, a

produção de UA. O paciente submetido à administração de Alopurinol® por 4 dias consecutivos teve sua saliva analisada pelo sensor proposto 3 vezes ao dia para monitorar o nível de UA salivar.

Figura 101- Monitoramento do nível de UA salivar sem tratamento (dia 0) e ao longo de 4 dias de tratamento de hiperuricemia com Alopurinol®. O resultado é obtido pela média de triplicatas com o biossensor desenvolvido.

Alopurinol® ajuda a controlar os níveis de UA durante o período de uso ocasional. Como mostrado na Figura 101, um elevado nível de UA salivar ($816,4 \pm 10,5$ $\mu\text{mol L}^{-1}$) foi medido no dia zero. Depois, durante o uso da medicação, os níveis de UA salivar diminuiu dia a dia aproximando-se do nível normal dentro de 4 dias, refletindo a eficácia do Alopurinol®. Este estudo demonstra que o biossensor no protetor bucal para UA pode ser utilizado para monitorar o tratamento da hiperuricemia, possibilitando o tratamento de gota aguda, que requer uma determinação rápida e precisa do efeito do tratamento, assim como o acompanhamento contínuo de UA para pacientes diabéticos e atletas.

➤ Conclusões Finais

Foram desenvolvidos métodos eletroanalíticos para detecção e quantificação de alguns compostos comumente encontrados na adulteração de amostras de drogas de abuso (procaína, fenacetina, aminopirina, paracetamol, levamisol), além da cocaína e estudos fundamentais sobre o comportamento eletroquímico desses compostos. Empregaram-se também métodos eletroquímicos para quantificação de compostos tóxicos e perigosos, como por exemplo, explosivos (ácido pícrico) e melamina. Os trabalhos utilizando sensores eletroquímicos contemplam modificações eletroquímicas das superfícies eletródicas, utilização de sensores com polímeros molecularmente impressos (MIP) para obtenção de seletividade e sensibilidade e novos eletrodos descartáveis em papel.

Fabricaram-se dispositivos analíticos descartáveis em plataformas de papel empregando a técnica de produção de padrões com cera (*wax printing*) e detecção eletroquímica e/ou colorimétrica para quantificação de alguns dos principais adulterantes de amostras de apreensão de cocaína, como procaína e fenacetina, bem como análises e discriminações de compostos explosivos (peroxi e nitro compostos) nessas plataformas portáteis e de baixo custo possibilitando novas perspectivas em análises forenses rápidas diretamente no local necessário.

Foram desenvolvidos, pela primeira vez, métodos para análises de micronutrientes no suor (zinco) e um metabólito (ácido úrico) na saliva usando os chamados *wearable sensors*, em que os sensores são operados diretamente no corpo humano possibilitando a análise em tempo real.

➤ **Perspectivas Futuras**

Com a obtenção dos padrões analíticos das drogas de abuso e seus metabólitos, realizar a caracterização eletroquímica e retomar estudos para o desenvolvimento de uma língua eletrônica capaz de detectar e discriminar o abuso de drogas em amostras de urina.

Desenvolver novos dispositivos analíticos portáteis para análise de triagem pericial das drogas apreendidas, principalmente do tipo colorimétrico em papel por apresentar uma rápida resposta e não necessitar de aparatos extras e nem profissional bem treinado para operar.

Com relação aos dispositivos eletroanalíticos em papel, deve-se testar outros materiais eletródicos visando expandir a gama de aplicações, e se possível acoplar a detecção colorimétrica e eletroquímica visando maior robustez nas análises.

Buscar o desenvolvimento de novos *wearable sensors* que a meu ver possui um vasto campo de aplicação e com grande relevância nas áreas médicas/clínica e ambiental.

➤ Referências bibliográficas

1. Medeiros, K.T., et al., *Representações sociais do uso e abuso de drogas entre familiares de usuários*. Psicologia em Estudo, 2013. **18**: p. 269-279.
2. NEVES, G.D.O., *Caracterização de amostras de cocaína apreendidas pela polícia civil do estado de Rondônia* Dissertação de mestrado, 2013, Universidade Federal de Rondônia.
3. Neerman, M.E., *Drugs of abuse: Analyses and ingested agents that can induce interference or cross-reactivity*. Labmedicine, 2006. **37**(6): p. 358-361.
4. Musile, G., et al., *The development of paper microfluidic devices for presumptive drug detection*. Analytical Methods, 2015. **7**(19): p. 8025-8033.
5. Lanaro, R., et al., *Identificação química da clorofenilpiperazina (CPP) em comprimidos apreendidos*. Quimica Nova, 2010. **33**: p. 725-729.
6. Conceição, V.N., et al., *Estudo do teste de Scott via técnicas espectroscópicas: um método alternativo para diferenciar cloridrato de cocaína e seus adulterantes*. Quimica Nova, 2014. **37**: p. 1538-1544.
7. Swiatko, J., P.R. De Forest, and M.S. Zedeck, *Further studies on spot tests and microcrystal tests for identification of cocaine*. Journal of Forensic Sciences, 2003. **48**(3): p. 581-585.
8. Namera, A., et al., *Comprehensive review of the detection methods for synthetic cannabinoids and cathinones*. Forensic Toxicology, 2015. **33**(2): p. 175-194.
9. Baciú, T., et al., *Recent trends in analytical methods and separation techniques for drugs of abuse in hair*. Analytica Chimica Acta, 2015. **856**: p. 1-26.
10. Jha, S.K., K. Hayashi, and R.D.S. Yadava, *Drugs of Abuse and their Detection Methodologies: Contribution of Chemical Sensor*. Current Organic Chemistry, 2015. **19**(12): p. 1191-1201.
11. Vogliardi, S., et al., *Sample preparation methods for determination of drugs of abuse in hair samples: A review*. Analytica Chimica Acta, 2015. **857**: p. 1-27.
12. D'Elia, V., G. Montalvo Garcia, and C. Garcia Ruiz, *Spectroscopic Trends for the Determination of Illicit Drugs in Oral Fluid*. Applied Spectroscopy Reviews, 2015. **50**(9): p. 775-796.

13. Botelho, E.D., et al., *Chemical Profiling of Cocaine Seized by Brazilian Federal Police in 2009-2012: Major Components*. Journal of the Brazilian Chemical Society, 2014. **25**(4): p. 611-618.
14. Maldaner, A.O., et al., *Chemical profiling of street cocaine from different Brazilian regions*. Journal of Brazilian Chemical Society, 2016. **27**(4): p. 719-726.
15. Zacca, J.J., et al., *Brazilian Federal Police drug chemical profiling - The PeQui Project*. Science & Justice, 2014. **54**(4): p. 300-306.
16. Evrard, I., S. Legleye, and A. Cadet-Tairou, *Composition, purity and perceived quality of street cocaine in France*. International Journal of Drug Policy, 2010. **21**(5): p. 399-406.
17. Brunt, T.M., et al., *An analysis of cocaine powder in the Netherlands: content and health hazards due to adulterants*. Addiction, 2009. **104**(5): p. 798-805.
18. Cole, C., et al., *Adulterants in illicit drugs: a review of empirical evidence*. Drug Testing and Analysis, 2011. **3**(2): p. 89-96.
19. Fucci, N. and N. De Giovanni, *Adulterants encountered in the illicit cocaine market*. Forensic Science International, 1998. **95**(3): p. 247-252.
20. Magalhaes, E.J., et al., *Evaluation of the composition of street cocaine seized in two regions of Brazil*. Science & Justice, 2013. **53**(4): p. 425-432.
21. Maietti, S., et al., *Cocaine adulterants used as marker compounds*. Journal of Mass Spectrometry, 2009. **44**(7): p. 1124-1126.
22. CARVALHO, D.G.M., A.F., *Quality of cocaine seized in 197 in the street-drug market of São Paulo*. Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas, 2003. **39**: p. 71-75.
23. Pagano, B., et al., *Use of NMR in profiling of cocaine seizures*. Forensic Science International, 2013. **231**(1-3): p. 120-124.
24. Liana, D.D., et al., *Recent Advances in Paper-Based Sensors*. Sensors, 2012. **12**(9): p. 11505-11526.
25. Martinez, A.W., et al., *Patterned paper as a platform for inexpensive, low-volume, portable bioassays*. Angewandte Chemie-International Edition, 2007. **46**(8): p. 1318-1320.
26. Martinez, A.W., et al., *Diagnostics for the Developing World: Microfluidic Paper-Based Analytical Devices*. Analytical Chemistry, 2010. **82**(1): p. 3-10.
27. Hillis, M.O., *The history of microanalysis*. J. Chem. Educ, 1945. **22**(7): p. 348-351.

28. Comer, J.P., *Semiquantitative specific test paper for glucose in urine*. Analytical Chemistry, 1956. **28**(11): p. 1748-1750.
29. Chen, Y.-H., Z.-K. Kuo, and C.-M. Cheng, *Paper - a potential platform in pharmaceutical development*. Trends in Biotechnology, 2015. **33**(1): p. 4-9.
30. Cate, D.M., et al., *Recent Developments in Paper-Based Microfluidic Devices*. Analytical Chemistry, 2015. **87**(1): p. 19-41.
31. Martinez, A.W., et al., *Simple telemedicine for developing regions: Camera phones and paper-based microfluidic devices for real-time, off-site diagnosis*. Analytical Chemistry, 2008. **80**(10): p. 3699-3707.
32. Maxwell, E.J., A.D. Mazzeo, and G.M. Whitesides, *Paper-based electroanalytical devices for accessible diagnostic testing*. Mrs Bulletin, 2013. **38**(4): p. 309-314.
33. Nery, E.W. and L.T. Kubota, *Sensing approaches on paper-based devices: a review*. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2013. **405**(24): p. 7573-7595.
34. Salles, M.O., et al., *Explosive colorimetric discrimination using a smartphone, paper device and chemometrical approach*. Analytical Methods, 2014. **6**: p. 2047-2052.
35. Bueno, L., et al., *Use of plastic-based analytical device, smartphone and chemometric tools to discriminate amines*. Rsc Advances, 2015. **5**(26): p. 20148-20154.
36. Jia, M.-Y., et al., *The calibration of cellphone camera-based colorimetric sensor array and its application in the determination of glucose in urine*. Biosensors & Bioelectronics, 2015. **74**: p. 1029-1037.
37. Dungchai, W., O. Chailapakul, and C.S. Henry, *Electrochemical Detection for Paper-Based Microfluidics*. Analytical Chemistry, 2009. **81**(14): p. 5821-5826.
38. Nie, Z.H., et al., *Electrochemical sensing in paper-based microfluidic devices*. Lab on a Chip, 2010. **10**(4): p. 477-483.
39. de Araujo, W.R. and T.R.L.C. Paixao, *Fabrication of disposable electrochemical devices using silver ink and office paper*. Analyst, 2014. **139**(11): p. 2742-2747.
40. Teerapanich, P., et al., *Development and Improvement of Carbon Nanotube-Based Ammonia Gas Sensors Using Ink-Jet Printed Interdigitated Electrodes*. Ieee Transactions on Nanotechnology, 2013. **12**(2): p. 255-262.
41. Wu, J.-T., et al., *Direct ink-jet printing of silver nitrate-silver nanowire hybrid inks to fabricate silver conductive lines*. Journal of Materials Chemistry, 2012. **22**(31): p. 15599-15605.

42. Shiroma, L.Y., et al., *Separation and electrochemical detection of paracetamol and 4-aminophenol in a paper-based microfluidic device*. *Analytica Chimica Acta*, 2012. **725**: p. 44-50.
43. Mensah, S.T., et al., *Nanomolar Detection Limits of Cd²⁺, Ag⁺, and K⁺ Using Paper-Strip Ion-Selective Electrodes*. *Analytical Chemistry*, 2014. **86**(15): p. 7269-7273.
44. Santhiago, M., C.S. Henry, and L.T. Kubota, *Low cost, simple three dimensional electrochemical paper-based analytical device for determination of p-nitrophenol*. *Electrochimica Acta*, 2014. **130**: p. 771-777.
45. Santhiago, M. and L.T. Kubota, *A new approach for paper-based analytical devices with electrochemical detection based on graphite pencil electrodes*. *Sensors and Actuators B-Chemical*, 2013. **177**: p. 224-230.
46. Dossi, N., et al., *Doped pencil leads for drawing modified electrodes on paper-based electrochemical devices*. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 2014. **722**: p. 90-94.
47. Dossi, N., et al., *Pencil-Drawn Dual Electrode Detectors to Discriminate Between Analytes Comigrating on Paper-Based Fluidic Devices but Undergoing Electrochemical Processes with Different Reversibility*. *Electroanalysis* 2013. **25**(11): p. 2515-2522.
48. Dossi, N., et al., *Pencil-drawn paper supported electrodes as simple electrochemical detectors for paper-based fluidic devices*. *Electrophoresis*, 2013. **34**(14): p. 2085-2091.
49. Fosdick, S.E., et al., *Wire, Mesh, and Fiber Electrodes for Paper-Based Electroanalytical Devices*. *Analytical Chemistry*, 2014. **86**(7): p. 3659-3666.
50. Adkins, J.A. and C.S. Henry, *Electrochemical detection in paper-based analytical devices using microwire electrodes*. *Analytica Chimica Acta*, 2015. **891**: p. 247-254.
51. Li, X., D.R. Ballerini, and W. Shen, *A perspective on paper-based microfluidics: Current status and future trends*. *Biomicrofluidics*, 2012. **6**(1).
52. Liu, M., C. Zhang, and F. Liu, *Understanding wax screen-printing: A novel patterning process for microfluidic cloth-based analytical devices*. *Analytica Chimica Acta*, 2015. **891**: p. 234-246.
53. Bruzewicz, D.A., M. Reches, and G.M. Whitesides, *Low-cost printing of poly(dimethylsiloxane) barriers to define microchannels in paper*. *Analytical Chemistry*, 2008. **80**(9): p. 3387-3392.

54. Olkkonen, J., K. Lehtinen, and T. Erho, *Flexographically Printed Fluidic Structures in Paper*. Analytical Chemistry, 2010. **82**(24): p. 10246-10250.
55. Coltro, W.K.T., et al., *Microsistemas de análises químicas: introdução, tecnologias de fabricação, instrumentação e aplicações*. Quimica Nova, 2007. **30**: p. 1986-2000.
56. Dornelas, K.L., *Fabricação de dispositivos microfluídicos a base de papel utilizando materiais de baixo custo*. Dissertação de mestrado, 2013, Universidade Federal de Minas Gerais.
57. Carrilho, E., A.W. Martinez, and G.M. Whitesides, *Understanding Wax Printing: A Simple Micropatterning Process for Paper-Based Microfluidics*. Analytical Chemistry, 2009. **81**(16): p. 7091-7095.
58. Lu, Y., et al., *Fabrication and Characterization of Paper-Based Microfluidics Prepared in Nitrocellulose Membrane By Wax Printing*. Analytical Chemistry, 2010. **82**(1): p. 329-335.
59. Garcia, P.d.T., et al., *A handheld stamping process to fabricate microfluidic paper-based analytical devices with chemically modified surface for clinical assays*. Rsc Advances, 2014. **4**(71): p. 37637-37644.
60. Bandodkar, A.J., et al., *Tattoo-based potentiometric ion-selective sensors for epidermal pH monitoring*. Analyst, 2013. **138**(1): p. 123-128.
61. Bandodkar, A.J., W. Jia, and J. Wang, *Tattoo-Based Wearable Electrochemical Devices: A Review*. Electroanalysis, 2015. **27**(3): p. 562-572.
62. Windmiller, J.R. and J. Wang, *Wearable Electrochemical Sensors and Biosensors: A Review*. Electroanalysis, 2013. **25**(1): p. 29-46.
63. Patel, S., et al., *A review of wearable sensors and systems with application in rehabilitation*. Journal of Neuroengineering and Rehabilitation, 2012. **9**.
64. Jia, W., et al., *Electrochemical Tattoo Biosensors for Real-Time Noninvasive Lactate Monitoring in Human Perspiration*. Analytical Chemistry, 2013. **85**(14): p. 6553-6560.
65. Windmiller, J.R., et al., *Electrochemical sensing based on printable temporary transfer tattoos*. Chemical Communications, 2012. **48**(54): p. 6794-6796.
66. Dasgupta, A., *The effects of adulterants and selected ingested compounds on drugs-of-abuse testing in urine*. American Journal of Clinical Pathology, 2007. **128**(3): p. 491-503.
67. Pedrotti, J.J., L. Angnes, and I.G.R. Gutz, *Miniaturized reference electrodes with microporous polymer junctions*. Electroanalysis, 1996. **8**(7): p. 673-675.

68. Bonsnes, R.W. and H.H. Taussky, *On the colorimetric determination of creatinine by the jaffe reaction*. Journal of Biological Chemistry, 1945. **158**(3): p. 581-591.
69. Husdan, H. and A. Rapoport, *Estimation of creatinine by jaffe reaction - a comparison of 3 methods*. Clinical Chemistry, 1968. **14**(3): p. 222-&.
70. Weber, J.A. and A.P. Vanzanten, *Interferences in current methods for measurements of creatinine*. Clinical Chemistry, 1991. **37**(5): p. 695-700.
71. Caraway, W.T. and C.W. Kammeyer, *Chemical interference by drugs and other substances with clinical laboratory test procedures*. Clinica Chimica Acta, 1972. **41**(1): p. 395-&.
72. Diamandis, E.P., M.A. Koupparis, and T.P. Hadjiioannou, *Kinetic potentiometric determination of creatinine in urine with a picrate-ion-selective electrode*. Microchemical Journal, 1977. **22**(4): p. 498-504.
73. Vanpilsun, J.F., et al., *Determination of creatine, creatinine, arginine, guanidinoacetic acid, guanidine, and methylguanidine in biological fluids*. Journal of Biological Chemistry, 1956. **222**(1): p. 225-236.
74. Vandevenne, M., H. Vandenbussche, and A. Verstraete, *Detection time of drugs of abuse in urine*. Acta Clinica Belgica, 2000. **55**(6): p. 323-333.
75. Vlasov, Y., et al., *Nonspecific sensor arrays ("electronic tongue") for chemical analysis of liquids (IUPAC Technical Report)*. Pure and Applied Chemistry, 2005. **77**(11): p. 1965-1983.
76. Hayashi, K., et al., *Multichannel taste sensor using lipid-membranes*. Sensors and Actuators B-Chemical, 1990. **2**(3): p. 205-213.
77. Novakowski, W., M. Bertotti, and T.R.L.C. Paixao, *Use of copper and gold electrodes as sensitive elements for fabrication of an electronic tongue: Discrimination of wines and whiskies*. Microchemical Journal, 2011. **99**(1): p. 145-151.
78. Bueno, L. and T.R.L.C. Paixao, *A copper interdigitated electrode and chemometrical tools used for the discrimination of the adulteration of ethanol fuel with water*. Talanta, 2011. **87**: p. 210-215.
79. Wei, Z., J. Wang, and L. Ye, *Classification and prediction of rice wines with different marked ages by using a voltammetric electronic tongue*. Biosensors & Bioelectronics, 2011. **26**(12): p. 4767-4773.

80. Apetrei, C., et al., *Combination of an e-nose, an e-tongue and an e-eye for the characterisation of olive oils with different degree of bitterness*. *Analytica Chimica Acta*, 2010. **663**(1): p. 91-97.
81. Rodriguez-Mendez, M.L., et al., *Electronic tongue based on voltammetric electrodes modified with materials showing complementary electroactive properties. Applications*. *Microchimica Acta*, 2008. **163**(1-2): p. 23-31.
82. Scampicchio, M., et al., *Amperometric electronic tongue for food analysis*. *Microchimica Acta*, 2008. **163**(1-2): p. 11-21.
83. Wold, S., K. Esbensen, and P. Geladi, *Principal component analysis*. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 1987. **2**(1-3): p. 37-52.
84. Christie, O.H.J., *Introduction to multivariate methodology, an alternative way?* *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 1995. **29**(2): p. 177-188.
85. Uppuluri, P., et al., *Characteristics of Candida albicans Biofilms Grown in a Synthetic Urine Medium*. *Journal of Clinical Microbiology*, 2009. **47**(12): p. 4078-4083.
86. Kilmartin, P.A., *Electrochemical detection of natural antioxidants: Principles and protocols*. *Antioxidants & Redox Signaling*, 2001. **3**(6): p. 941-955.
87. Gandra, P.G., A.A. Alves, and D.V. de Macedo, *Electrochemical determination of antioxidant capacity for physical exercise evaluation*. *Quimica Nova*, 2004. **27**(6): p. 980-985.
88. Islam, S.K.N., K.J. Hossain, and M. Ahsan, *Serum vitamin E, C and A status of the drug addicts undergoing detoxification: influence of drug habit, sexual practice and lifestyle factors*. *European Journal of Clinical Nutrition*, 2001. **55**(11): p. 1022-1027.
89. Cunha-Oliveira, T., A.C. Rego, and C.R. Oliveira, *Oxidative Stress and Drugs of Abuse: An Update*. *Mini-Reviews in Organic Chemistry*, 2013. **10**(4): p. 321-334.
90. Gawad, S.S.A.E., et al., *Effects of Drug Addiction on Antioxidant Vitamins and Nitric Oxide Levels*. *J. Basic. Appl. Sci. Res*, 2011. **1**(6): p. 485-491.
91. FLORIANI, G., *Desenvolvimento e validação de método por clae para análise de cocaína, seus produtos de degradação e adulterantes*. Dissertação de mestrado, 2012. Universidade Federal do Paraná.
92. BOTELHO, E.D., *Desenvolvimento de uma nova metodologia analítica para identificação e quantificação de truxilinas em amostras de cocaína baseada em Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada à Espectrometria de Massas (CLAE-EM)*. Dissertação de mestrado, 2011. Universidade de Brasília.

93. de Araujo, W.R., et al., *Development of an electroanalytical method for the quantification of aminopyrine in seized cocaine samples*. Microchemical Journal, 2015. **121**: p. 213-218.
94. Yin, H., et al., *Determination aminopyrine in pharmaceutical formulations based on APTS-Fe₃O₄ nanoparticles modified glassy carbon electrode*. Journal of Solid State Electrochemistry, 2012. **16**(2): p. 731-738.
95. Lin, D., et al., *Determination of Aminopyrine in Human Plasma by LC-MS-MS*. Chromatographia, 2010. **71**(9-10): p. 927-931.
96. Shesser, R., R. Jotte, and J. Olshaker, *The contribution of impurities to the acute morbidity of illegal drug-use*. American Journal of Emergency Medicine, 1991. **9**(4): p. 336-342.
97. Sharma, P.S., F. D'Souza, and W. Kutner, *Molecular imprinting for selective chemical sensing of hazardous compounds and drugs of abuse*. Trac-Trends in Analytical Chemistry, 2012. **34**: p. 59-77.
98. Reddy, S.M., G. Sette, and Q. Phan, *Electrochemical probing of selective haemoglobin binding in hydrogel-based molecularly imprinted polymers*. Electrochimica Acta, 2011. **56**(25): p. 9203-9208.
99. Diaz-Garcia, M.E. and R.B. Laino, *Molecular imprinting in sol-gel materials: Recent developments and applications*. Microchimica Acta, 2005. **149**(1-2): p. 19-36.
100. Tan, Y.G., et al., *A new assay system for phenacetin using biomimic bulk acoustic wave sensor with a molecularly imprinted polymer coating*. Sensors and Actuators B-Chemical, 2001. **73**(2-3): p. 179-184.
101. Ozcan, L., M. Sahin, and Y. Sahin, *Electrochemical preparation of a molecularly imprinted polypyrrole-modified pencil graphite electrode for determination of ascorbic acid*. Sensors, 2008. **8**(9): p. 5792-5805.
102. Kong, Y., et al., *Molecularly Imprinted Polypyrrole Prepared by Electrodeposition for the Selective Recognition of Tryptophan Enantiomers*. Journal of Applied Polymer Science, 2010. **115**(4): p. 1952-1957.
103. Jara-Ulloa, P., et al., *Polypyrrole Molecularly Imprinted Modified Glassy Carbon Electrode for the Recognition of Gallic Acid*. Journal of the Electrochemical Society, 2013. **160**(4): p. H243-H246.
104. Wang, J. and M. Musameh, *Carbon-nanotubes doped polypyrrole glucose biosensor*. Analytica Chimica Acta, 2005. **539**(1-2): p. 209-213.

105. <http://www.apcf.org.br/Noticias/AgenciaAPCF/tabid/341/post/projeto-pequi-perfil-qu-mico-desvenda-o-dna-das-drogas-que-entram-no-brasil/Default.aspx>, - Acessado em 17/12/2013.
106. Bussy, U., et al., *In situ NMR spectroelectrochemistry for the structure elucidation of unstable intermediate metabolites*. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2013. **405**(17): p. 5817-5824.
107. Nouri-Nigjeh, E., et al., *Electrochemical oxidation by square-wave potential pulses in the imitation of phenacetin to acetaminophen biotransformation*. Analyst, 2011. **136**(23): p. 5064-5067.
108. Bussy, U., et al., *Understanding the degradation of electrochemically-generated reactive drug metabolites by quantitative NMR*. Talanta, 2013. **116**: p. 554-558.
109. Jakobs, R.C.M., L.J.J. Janssen, and E. Barendrecht, *Hydroquinone oxidation and para-benzoquinone reduction at polypyrrole and poly-n-methylpyrrole electrodes*. Electrochimica Acta, 1985. **30**(10): p. 1313-1321.
110. Nagaraja, P., K.C.S. Murthy, and K.S. Rangappa, *Spectrophotometric method for the determination of paracetamol and phenacetin*. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 1998. **17**(3): p. 501-506.
111. Hegde, M., et al., *Novel Levamisole Derivative Induces Extrinsic Pathway of Apoptosis in Cancer Cells and Inhibits Tumor Progression in Mice*. Plos One, 2012. **7**(9).
112. Chang, A., J. Osterloh, and J. Thomas, *Levamisole: A Dangerous New Cocaine Adulterant*. Clinical Pharmacology & Therapeutics, 2010. **88**(3): p. 408-411.
113. Wolford, A., et al., *Immune-Mediated Agranulocytosis Caused by the Cocaine Adulterant Levamisole: A Case for Reactive Metabolite(s) Involvement*. Drug Metabolism and Disposition, 2012. **40**(6): p. 1067-1075.
114. Lourencao, B.C., et al., *Amperometric flow-injection determination of the anthelmintic drugs ivermectin and levamisole using electrochemically pretreated boron-doped diamond electrodes*. Sensors and Actuators B: Chemical, 2016. **222**: p. 181-189.
115. Xiao, Y., J. Li, and C. Fu, *A sensitive method for the determination of levamisole in serum by electrochemiluminescence*. Luminescence, 2014. **29**(2): p. 183-187.
116. Bergamini, M.F., et al., *Flow injection amperometric determination of procaine in pharmaceutical formulation using a screen-printed carbon electrode*. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2007. **43**(1): p. 315-319.

117. Felix, F.S. and L. Angnes, *Fast and accurate analysis of drugs using amperometry associated with flow injection analysis*. Journal of Pharmaceutical Sciences, 2010. **99**(12): p. 4784-4804.
118. Nageswara Rao, R. and V. Nagaraju, *An overview of the recent trends in development of HPLC methods for determination of impurities in drugs*. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2003. **33**(3): p. 335-377.
119. Magalhães, E.J., *Desenvolvimento de métodos para quantificação de drogas em matrizes de interesse forense*. Tese de doutorado, 2012, Universidade Federal de Minas Gerais.
120. Salles, M.O., et al., *Explosive colorimetric discrimination using a smartphone, paper device and chemometrical approach*. Analytical Methods, 2014. **6**(7): p. 2047-2052.
121. Choi, S., et al., *Paper-based 3D microfluidic device for multiple bioassays*. Sensors and Actuators B-Chemical, 2015. **219**: p. 245-250.
122. Eltarras, M.F.M. and Z. Sheribah, *On the analysis of procaine hydrochloride by diazotization and coupling reaction*. Analytical Letters Part B-Clinical and Biochemical Analysis, 1982. **15**(6): p. 559-572.
123. Belal, S., et al., *Colorimetric determination of some pharmaceutical primary aromatic-amines*. Talanta, 1978. **25**(5): p. 290-291.
124. Yin, H.S., et al., *Electrochemical behavior of phenacetin on CdSe microspheres modified glassy carbon electrode and its simultaneous determination with paracetamol and 4-aminophenol*. Analytical Methods, 2012. **4**(5): p. 1445-1451.
125. Tam, S.K., K.Y. Fung, and K.M. Ng, *Copper pastes using bimodal particles for flexible printed electronics*. Journal of Materials Science, 2016. **51**(4): p. 1914-1922.
126. Nascimento, V.B. and L. Angnes, *Eletrodos fabricados por "silk-screen"*. Quimica Nova, 1998. **21**: p. 614-629.
127. Wang, J. and B.M. Tian, *Screen-printed stripping voltammetric potentiometric electrodes for decentralized testing of trace lead*. Analytical Chemistry, 1992. **64**(15): p. 1706-1709.
128. da Silva, I.S., et al., *Direct nitrate sensing in water using an array of copper-microelectrodes from flat flexible cables*. Sensors and Actuators B: Chemical, 2013.
129. Moreira, F.T.C., et al., *Screen-printed electrode produced by printed-circuit board technology. Application to cancer biomarker detection by means of plastic antibody as sensing material*. Sensors and Actuators B-Chemical, 2016. **223**: p. 927-935.

130. Daniel, D. and I.G.R. Gutz, *Quick production of gold electrode sets or arrays and of microfluidic flow cells based on heat transfer of laser printed toner masks onto compact discs*. *Electrochemistry Communications*, 2003. **5**(9): p. 782-786.
131. Angnes, L., et al., *Gold Electrodes from Recordable CDs*. *Analytical Chemistry*, 2000. **72**(21): p. 5503-5506.
132. Lowinsohn, D., et al., *Disposable Gold Electrodes with Reproducible Area Using Recordable CDs and Toner Masks*. *Electroanalysis*, 2006. **18**(1): p. 89-94.
133. Chiu, M.-H., et al., *A disposable screen-printed silver strip sensor for single drop analysis of halide in biological samples*. *Biosensors and Bioelectronics*, 2009. **24**(10): p. 3008-3013.
134. Rattanarat, P., et al., *Multilayer Paper-Based Device for Colorimetric and Electrochemical Quantification of Metals*. *Analytical Chemistry*, 2014. **86**(7): p. 3555-3562.
135. Wang, J., *Electrochemical sensing of explosives*. *Electroanalysis*, 2007. **19**(4): p. 415-423.
136. Toal, S.J. and W.C. Trogler, *Polymer sensors for nitroaromatic explosives detection*. *Journal of Materials Chemistry*, 2006. **16**(28): p. 2871-2883.
137. Caygill, J.S., F. Davis, and S.P.J. Higson, *Current trends in explosive detection techniques*. *Talanta*, 2012. **88**: p. 14-29.
138. Ni, Y., L. Wang, and S. Kokot, *Simultaneous determination of nitrobenzene and nitro-substituted phenols by differential pulse voltammetry and chemometrics*. *Analytica Chimica Acta*, 2001. **431**(1): p. 101-113.
139. Zang, J., et al., *Electrochemical detection of ultratrace nitroaromatic explosives using ordered mesoporous carbon*. *Analytica Chimica Acta*, 2011. **683**(2): p. 187-191.
140. Bratin, K., et al., *Determination of nitro aromatic, nitramine, and nitrate ester explosive compounds in explosive mixtures and gunshot residue by liquid-chromatography and reductive electrochemical detection*. *Analytica Chimica Acta*, 1981. **130**(2): p. 295-311.
141. Zhang, H.X., et al., *Electrochemical sensor for detecting ultratrace nitroaromatic compounds using mesoporous SiO₂-modified electrode*. *Analytical Chemistry*, 2006. **78**(6): p. 1967-1971.
142. Carbajo, J., et al., *Voltammetric studies of aromatic nitro compounds: pH-dependence on decay of the nitro radical anion in mixed media*. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 2000. **494**(1): p. 69-76.

143. Vyskocil, V., et al., *Voltammetric Determination of Selected Nitro Compounds at a Polished Silver Solid Amalgam Composite Electrode*. *Electroanalysis*, 2011. **23**(1): p. 129-139.
144. Sekhar, P.K., et al., *Trace detection and discrimination of explosives using electrochemical potentiometric gas sensors*. *Journal of Hazardous Materials*, 2011. **190**(1-3): p. 125-132.
145. Pachman, J. and R. Matyas, *Study of TATP: Stability of TATP solutions*. *Forensic Science International*, 2011. **207**(1-3): p. 212-214.
146. Guo, C.L., J. Persons, and G.S. Harbison, *Helical chirality in hexamethylene triperoxide diamine*. *Magnetic Resonance in Chemistry*, 2006. **44**(9): p. 832-837.
147. Simkins, J.L.M.a.R.J.J., *The identification of traces of explosives by field spot tests*. 1973.
148. Bro, R. and A.K. Smilde, *Principal component analysis*. *Analytical Methods*, 2014. **6**(9): p. 2812-2831.
149. Feng, L., et al., *Colorimetric determination of copper(II) ions by filtration on sol-gel membrane doped with diphenylcarbazide*. *Talanta*, 2011. **84**(3): p. 913-917.
150. Yang, S.P., et al., *Detection of Melamine in Milk Products by Surface Desorption Atmospheric Pressure Chemical Ionization Mass Spectrometry*. *Analytical Chemistry*, 2009. **81**(7): p. 2426-2436.
151. Sun, F.X., et al., *Analytical methods and recent developments in the detection of melamine*. *Trac-Trends in Analytical Chemistry*, 2010. **29**(11): p. 1239-1249.
152. Dobson, R.L.M., et al., *Identification and characterization of toxicity of contaminants in pet food leading to an outbreak of renal toxicity in cats and dogs*. *Toxicological Sciences*, 2008. **106**(1): p. 251-262.
153. Chan, E.Y.Y., S.M. Griffiths, and C.W. Chan, *Public-health risks of melamine in milk products*. *Lancet*, 2008. **372**(9648): p. 1444-1445.
154. Zhu, H., et al., *Electrochemical sensor for melamine based on its copper complex*. *Chemical Communications*, 2010. **46**(13): p. 2259-2261.
155. Pietrzyk, A., et al., *Melamine Acoustic Chemosensor Based on Molecularly Imprinted Polymer Film*. *Analytical Chemistry*, 2009. **81**(24): p. 10061-10070.
156. Birinci, E., M. Gulfen, and A.O. Aydin, *Separation and recovery of palladium(II) from base metal ions by melamine-formaldehyde-thiourea (MFT) chelating resin*. *Hydrometallurgy*, 2009. **95**(1-2): p. 15-21.

157. Aydin, A., M. Imamoglu, and M. Gulfen, *Separation and recovery of gold(III) from base metal ions using melamine-formaldehyde-thiourea chelating resin*. Journal of Applied Polymer Science, 2008. **107**(2): p. 1201-1206.
158. Yirikoglu, H. and M. Gulfen, *Separation and recovery of Silver(I) ions from base metal ions by melamine-formaldehyde-thiourea (MFT) chelating resin*. Separation Science and Technology, 2008. **43**(2): p. 376-388.
159. Panuwet, P., et al., *Quantification of melamine in human urine using cation-exchange based high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry*. Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences, 2012. **887**: p. 48-54.
160. Tang, X.S., et al., *Flow-injection chemiluminescence determination of melamine in urine and plasma*. Luminescence, 2012. **27**(3): p. 229-233.
161. Diamond, D., et al., *Wireless sensor networks and chemo-/biosensing*. Chemical Reviews, 2008. **108**(2): p. 652-679.
162. Kim, D.-H., et al., *Flexible and Stretchable Electronics for Biointegrated Devices*. Annual Review of Biomedical Engineering, Vol 14, 2012. **14**: p. 113-128.
163. Heyland, D.K., et al., *Zinc supplementation in critically ill patients: A key pharmaconutrient?* Journal of Parenteral and Enteral Nutrition, 2008. **32**(5): p. 509-519.
164. Cordova, A. and M. Alvarezmon, *Behavior of zinc in physical exercise - a special reference to immunity and fatigue*. Neuroscience and Biobehavioral Reviews, 1995. **19**(3): p. 439-445.
165. Noakes, T.D., *Effect of exercise on serum enzyme-activities in humans*. Sports Medicine, 1987. **4**(4): p. 245-267.
166. Cordova, A. and F.J. Navas, *Effect of training on zinc metabolism: Changes in serum and sweat zinc concentrations in sportsmen*. Annals of Nutrition and Metabolism, 1998. **42**(5): p. 274-282.
167. Tipton, K., et al., *Zinc loss in sweat of athletes exercising in hot and neutral temperatures*. International Journal of Sport Nutrition, 1993. **3**(3): p. 261-271.
168. Crew, A., D.C. Cowell, and J.P. Hart, *Development of an anodic stripping voltammetric assay, using a disposable mercury-free screen-printed carbon electrode, for the determination of zinc in human sweat*. Talanta, 2008. **75**(5): p. 1221-1226.
169. Omokhodion, F.O. and J.M. Howard, *Trace-elements in the sweat of acclimatized persons*. Clinica Chimica Acta, 1994. **231**(1): p. 23-28.

170. Stauber, J.L. and T.M. Florence, *The determination of trace-metals in sweat by anodic-stripping voltammetry*. Science of the Total Environment, 1987. **60**: p. 263-271.
171. Wang, J., et al., *Bismuth-coated carbon electrodes for anodic stripping voltammetry*. Analytical Chemistry, 2000. **72**(14): p. 3218-3222.
172. Jothimuthu, P., et al., *Zinc Detection in Serum by Anodic Stripping Voltammetry on Microfabricated Bismuth Electrodes*. Electroanalysis, 2013. **25**(2): p. 401-407.
173. Yue, W., et al., *The Application of Nafion Metal Catalyst Free Carbon Nanotube Modified Gold Electrode: Voltammetric Zinc Detection in Serum*. Electroanalysis, 2013. **25**(10): p. 2259-2267.
174. de Souza, A.P.R., et al., *The use of a gold disc microelectrode for the determination of copper in human sweat*. Talanta, 2010. **83**(1): p. 167-170.
175. Lima, D.P., et al., *Saliva: reflection of the body*. International Journal of Infectious Diseases, 2010. **14**(3): p. E184-E188.
176. Graf, H. and Muhleman.Hr, *Telemetry of plaque ph from interdental area*. Helvetica Odontologica Acta, 1966. **10**(2): p. 94-&.
177. Graf, H. and Muhleman.Hr, *Oral telemetry of fluoride ion activity*. Archives of Oral Biology, 1969. **14**(3): p. 259-&.
178. Zuliani, C., G. Matzeu, and D. Diamond, *A potentiometric disposable sensor strip for measuring pH in saliva*. Electrochimica Acta, 2014. **132**: p. 292-296.
179. Kim, J., et al., *Non-invasive mouthguard biosensor for continuous salivary monitoring of metabolites*. Analyst, 2014. **139**(7): p. 1632-1636.
180. Diamond, D., et al., *Integration of analytical measurements and wireless communications - Current issues and future strategies*. Talanta, 2008. **75**(3): p. 606-612.
181. Merriman, T.R. and N. Dalbeth, *The genetic basis of hyperuricaemia and gout*. Joint Bone Spine, 2011. **78**(1): p. 35-40.
182. Nakagawa, T., et al., *A causal role for uric acid in fructose-induced metabolic syndrome*. American Journal of Physiology-Renal Physiology, 2006. **290**(3): p. F625-F631.
183. Owen-Smith, B., J. Quiney, and J. Read, *Salivary urate in gout, exercise, and diurnal variation*. Lancet, 1998. **351**(9120): p. 1932-1932.

184. Shibasaki, K., et al., *Uric acid concentration in saliva and its changes with the patients receiving treatment for hyperuricemia*. Metabolomics, 2012. **8**(3): p. 484-491.
185. Soukup, M., et al., *Salivary uric acid as a noninvasive biomarker of metabolic syndrome*. Diabetology & Metabolic Syndrome, 2012. **4**.
186. Ballesta Claver, J., M.C. Valencia Miron, and L.F. Capitan-Vallvey, *Disposable electrochemiluminescent biosensor for lactate determination in saliva*. Analyst, 2009. **134**(7): p. 1423-1432.
187. Chicharro, J.L., et al., *Saliva composition and exercise*. Sports Medicine, 1998. **26**(1): p. 17-27.
188. Makila, E. and Kirveska, P., *A study of ascorbic acid in human saliva*. Archives of Oral Biology, 1969. **14**(11): p. 1285-&.
189. Smith, M., et al., *A comparison of serum and saliva paracetamol concentrations*. British Journal of Clinical Pharmacology, 1991. **31**(5): p. 553-555.
190. Yousri, N.A., et al., *A systems view of type 2 diabetes-associated metabolic perturbations in saliva, blood and urine at different timescales of glycaemic control*. Diabetologia, 2015. **58**(8): p. 1855-1867.
191. Navazesh, M., *Methods for collecting saliva*. Annals of the New York Academy of Sciences, 1993. **694**: p. 72-77.
192. Humphrey, S.P. and R.T. Williamson, *A review of saliva: Normal composition, flow, and function*. Journal of Prosthetic Dentistry, 2001. **85**(2): p. 162-169.
193. Dutt, J.S.N., et al., *Diagnostic implications of uric acid in electroanalytical measurements*. Electroanalysis, 2005. **17**(14): p. 1233-1243.
194. Chu, Q.C., et al., *Determination of uric acid in human saliva and urine using miniaturized capillary electrophoresis with amperometric detection*. Chromatographia, 2007. **65**(3-4): p. 179-184.
195. Thakur, B. and S.N. Sawant, *Polyaniline/prussian-blue-based amperometric biosensor for detection of uric acid*. ChemPlusChem, 2013. **78**(2): p. 166-174.
196. Erden, P.E. and E. Kiliç, *A review of enzymatic uric acid biosensors based on amperometric detection*. Talanta, 2013. **107**: p. 312-323.
197. Piermarini, S., et al., *Uricase biosensor based on a screen-printed electrode modified with Prussian blue for detection of uric acid in human blood serum*. Sensors and Actuators, B: Chemical, 2013. **179**: p. 170-174.

198. Ricci, F. and G. Palleschi, *Sensor and biosensor preparation, optimisation and applications of Prussian Blue modified electrodes*. Biosensors and Bioelectronics, 2005. **21**(3): p. 389-407.
199. Abikshyeet, P., V. Ramesh, and N. Oza, *Glucose estimation in the salivary secretion of diabetes mellitus patients*. Diabetes, Metabolic Syndrome and Obesity: Targets and Therapy, 2012. **5**: p. 149-154.

Súmula Curricular

DADOS PESSOAIS

Nome: William Reis de Araujo

Local e data de nascimento: São José do Rio Preto, 06/02/1991.

EDUCAÇÃO

Ensino Fundamental: Escola Estadual Professor Daud Jorge Simão, São José do Rio Preto, 2005.

Ensino Médio: Colégio Interativo, São José do Rio Preto, 2008.

Ensino Superior: Graduação em Ciência e Tecnologia, Universidade Federal do ABC, Santo André, 2011.

Bacharelado em Química, Universidade Federal do ABC, Santo André, 2011.

FORMAÇÃO COMPLEMENTAR

2012- Making good measurements in forensic chemistry- Encontro Nacional de Química Forense, ENQFOR, Brasil.

2011- 34º Workshop Energia e sensores- Sociedade Brasileira de Química, SBQ, Brasil.

2011- Mini-curso: Modelagem eletroquímica- Sociedade Brasileira de Química, SBQ, Brasil.

Monitorias (Programa de aperfeiçoamento do ensino)

QFL4220- Química Analítica II, 2012.

QFL1200- Química Analítica Qualitativa, 2012.

QFL2242- Química Analítica Instrumental, 2013.

QFL4210- Química Analítica I, 2013.

OCUPAÇÃO

Bolsista de Doutorado Direto, FAPESP (2011/19903-5), 2012-2016.

Bolsa de estágio de pesquisa no exterior, FAPESP BEPE (2014/00788-0), 2014.

PUBLICAÇÕES (Artigos científicos e resumos em congresso)

1. SILVA, THALITA; DE ARAUJO, WILLIAM; MUNOZ, RODRIGO; RICHTER, EDUARDO; SANTANA, MÁRIO; COLTRO, WENDELL; PAIXÃO, THIAGO. Simple and Sensitive Paper-Based Device Coupling Electrochemical Sample Pretreatment and Colorimetric Detection. *Analytical Chemistry*, v. 88 (10), p. 5145-5151, 2016.

2. SALLES, MAIARA O.; ARAUJO, WILLIAM R.; PAIXÃO, THIAGO R. L. C. Development of a Molecularly Imprinted Modified Electrode to Evaluate Phenacetin Based on the Preconcentration of Acetaminophen. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, v. 27, p. 54-61, 2016.

3. KIM, JAYOUNG ; DE ARAUJO, WILLIAM R.; SAMEK, IZABELA A.; BANDODKAR, AMAY J.; JIA, WENZHAO; BRUNETTI, BARBARA; PAIXÃO, THIAGO R.L.C.; WANG, JOSEPH. Wearable temporary tattoo sensor for real-time trace-metal monitoring in human sweat. *Electrochemistry Communications*, v. 51, p. 41-45, 2015.

4. KASSAL, PETAR ; KIM, JAYOUNG ; KUMAR, RAJAN ; DE ARAUJO, WILLIAM R. ; STEINBERG, IVANA MURKOVI'; STEINBERG, MATTHEW D.; WANG, JOSEPH. Smart Bandage with Wireless Connectivity for Uric Acid Biosensing as an Indicator of Wound Status. *Electrochemistry Communications*, v. 56, p. 6-10, 2015.

5. DE ARAUJO, WILLIAM R.; MALDANER, ADRIANO O.; COSTA, JOSÉ L.; PAIXÃO, THIAGO R.L.C. Development of an electroanalytical method for the quantification of aminopyrine in seized cocaine samples. *Microchemical Journal*, v. 121, p. 213-218, 2015.

6. SELVA, THIAGO M. G.; ARAUJO, WILLIAM R.; PAIXÃO, THIAGO R. L. C. Non-Invasive Salivary Electrochemical Quantification of Paraquat Poisoning Using Boron Doped Diamond Electrode. *Electroanalysis*, v. 27, p. 1642-1648, 2015.
7. KIM, JAYOUNG; IMANI, SOMAYEH; DE ARAUJO, WILLIAM R.; WARCHALL, JULIAN; VALDÉS-RAMÍREZ, GABRIELA; PAIXÃO, THIAGO R.L.C.; MERCIER, PATRICK P.; WANG, JOSEPH. Wearable salivary uric acid mouthguard biosensor with integrated wireless electronics. *Biosensors & Bioelectronics*, v. 74, p. 1061-1068, 2015.
8. de ARAUJO, W.R.; PAIXÃO, THIAGO R.L.C. Use of copper electrode for melamine quantification in milk. *Electrochimica Acta*, v. 117, p. 379-384, 2014.
9. ARAUJO, WILLIAM; PAIXÃO, THIAGO R. L. C. Fabrication of disposable electrochemical devices using silver ink and office paper. *Analyst*, v. 139, p. 2742-2747, 2014.
10. BUENO, LÍGIA; de ARAUJO, WILLIAM R.; SALLES, MAIARA; KUSSUDA, MARCOS; PAIXÃO, THIAGO R. L. C. Voltammetric Electronic Tongue for Discrimination of Milk Adulterated with Urea, Formaldehyde and Melamine. *Chemosensors*, v. 2, p. 251-266, 2014.
11. SALLES, MAIARA O.; MELONI, GABRIEL; ARAUJO, WILLIAM R.; PAIXÃO, THIAGO R. L. C. Explosive Colorimetric Discrimination Using a Smartphone, Paper Device and Chemometrical Approach. *Analytical Methods*, v. 6, p. 2047-2052, 2014.
12. DA SILVA, IRANALDO S.; DE ARAUJO, WILLIAM R ; PAIXÃO, THIAGO R. L. C.; ANGNES, LÚCIO. Direct nitrate sensing in water using an array of copper-microelectrodes from flat flexible cables. *Sensors and Actuators. B, Chemical*, v. 188, p. 94-98, 2013.

13. ARAUJO, W. R.; SALLES, M. O.; PAIXAO, THIAGO R. L. C. Development of an enzymeless electroanalytical method for the indirect detection of creatinine in urine samples. *Sensors and Actuators. B, Chemical*, v. 173, p. 847-851, 2012.

14. Junqueira, J. R. C; ARAUJO, W. R.; SALLES, M. O.; PAIXAO, T. R. L. C. Flow injection analysis of picric acid explosive using a copper electrode as electrochemical detector. *Talanta*, v. 104, p. 162-168, 2012.

15. ARAUJO, W. R.; PAIXAO, T. R. L. C. Amperometric Detection of Ranitidine Using Glassy Carbon Modified with Ruthenium Oxide Hexacyanoferrate Adapted in a Flow Injection System. *Electroanalysis*, v. 23, p. 2549-2554, 2011.

RESUMOS PUBLICADOS EM ANAIS DE CONGRESSOS

de ARAUJO, W.R.; Silva, T. G. ; PAIXAO, Thiago R.L.C. A Simple and Sensitive Paper-Based Device Coupling Electrochemical Sample Pretreatment and Colorimetric Detection. In: 67th The Pittsburgh Conference on Analytical Chemistry and Applied Spectroscopy, 2016, Atlanta.

de Araujo, William R.; Paixão, Thiago R.L.C. Electrochemical Detection of Aminopyrine in Seized Cocaine Samples. In: 66th The Pittsburgh Conference on Analytical Chemistry and Applied Spectroscopy, 2015, New Orleans.

SELVA, T. M. G.; DE ARAUJO, WILLIAM; Paixão, Thiago R. L. C. Determinação não invasiva de paraquat em saliva utilizando eletrodo de diamante dopado com boro. In: XX Simpósio Brasileiro de Eletroquímica e Eletroanalítica, 2015, Uberlândia.

SILVA, J. R.; DE ARAUJO, WILLIAM; Paixão, Thiago R. L. C. Eletrodos descartáveis em papel: dispositivos baseados em grafite para quantificação de metais. In: XX Simpósio Brasileiro de Eletroquímica e Eletroanalítica, 2015, Uberlândia.

DE ARAUJO, WILLIAM R.; Paixão, Thiago R. L. C.; WANG, JOSEPH Sensor tipo tatuagem temporária para monitoramento em tempo real de zinco em suor humano. In: XX Simpósio Brasileiro de Eletroquímica e Eletroanalítica, 2015, Uberlândia. XX

Meloni, Gabriel N.; COSTA, E. T.; de Araújo, W. R.; SALLES, M. Oliveira ; PAIXÃO, T. R. L. C. Colorimetric Wax Toner Paper-Based Device for Field Explosive Testing. In: 65th The Pittsburgh Conference on Analytical Chemistry and Applied Spectroscopy, 2014, Chicago. 65th The Pittsburgh Conference on Analytical Chemistry and Applied Spectroscopy.

Bueno, L.; de Araújo, W. R.; SALLES, M.Oliveira; PAIXÃO, T. R. L. C. Use of a voltammetric electronic tongue for discrimination of milk adulteration with urea, formaldehyde and melamine. In: 65th The Pittsburgh Conference on Analytical Chemistry and Applied Spectroscopy, 2014, Chicago.

Paixão, Thiago R.L.C.; de Araujo, William R.; Salles, Maiara O. Development of a molecular imprinted modified electrode for quantification of phenacetin. In: XXIII International Materials Research Congress 2014, Cancún.

SELVA, T. M. G.; de Araujo, William R.; Paixão, Thiago R.L.C. Electrochemical Determination of Aldicarb Pesticide Using Platinum Electrode and a Derivatization Process. In: 65th Annual Meeting of the International Society of Electrochemistry, 2014, Lausanne.

de Araujo, William R.; Paixão, Thiago R. L. C. Fabrication of Disposable Electrochemical Devices Using Silver Ink and Office Paper: Application for Aqueous and Airborne Explosive Detection. In: 65th Annual Meeting of the International Society of Electrochemistry, 2014, Lausanne.

SILVA, J. R.; de Araujo, William R.; Paixão, Thiago R. L. C. A Simple Office Paper-Based Electrochemical Device for Stripping Voltammetric Detection of Metal Ions. In: 65th Annual Meeting of the International Society of Electrochemistry, 2014, Lausanne.

ARAUJO, WILLIAM R. de; Paixão, Thiago R.L.C. Desenvolvimento de sensor eletroquímico para detecção de procaína e benzocaína na presença de cocaína. In: XIX Simpósio Brasileiro de Eletroquímica e Eletroanalítica, 2013, Campos do Jordão.

Salles, Maiara O.; de Araujo, William R.; JUNQUEIRA, JOÃO R.C.; Paixão, Thiago R. L. C. A Novel Electrochemical Picric Acid Sensor Based on Cu Electrode. In: 64th The Pittsburgh Conference on Analytical Chemistry and Applied Spectroscopy, 2013, Philadelphia.

Meloni, Gabriel N.; COSTA, E. T.; de Araujo, William R.; Salles, Maiara O.; Paixão, Thiago R. L. C. Development of RGB extraction values software and chamber case to collect information of electronic colorimetric tongues. In: 64th The Pittsburgh Conference on Analytical Chemistry and Applied Spectroscopy, 2013, Philadelphia.

de Araujo, William R.; Paixão, Thiago R. L. C. Use of electrochemical sensor with chemometric tool for a rapid screening test to detect cocaine in urine samples. In: 64th The Pittsburgh Conference on Analytical Chemistry and Applied Spectroscopy, 2013, Philadelphia.

Paixão, Thiago R. L. C.; Salles, Maiara O. ; Bueno, L. ; de Araujo, William R. ; REDDY, S. M. ; EL-SHARIF, H. F. ; NARAYAN, R. . Development of electronic tongues based on low cost fabrication process and modified electrodes aiming to on-site discrimination of forensic, clinical and food samples. In: THERMEC'2013 - International Conference on Processing & Manufacturing of Advanced Materials (Processing, Fabrication, Properties, Applications), 2013, Las Vegas.

de Araujo, William R.; Salles, Maiara O.; Paixão, Thiago R. L. C. Electrochemical determination of creatinine by differential pulse voltammetry using Jaffé's Reaction. In: 63rd Annual Meeting of the International Society of Electrochemistry, 2012, Praga.

JUNQUEIRA, J. R. C.; de Araujo, William R.; Salles, Maiara O.; Paixão, Thiago R. L. C. Utilização de eletrodo de cobre visando à quantificação de explosivos. In: 3º Encontro Nacional de Química Forense, 2012, Ribeirão Preto.

de Araujo, William R.; Salles, Maiara O.; Paixão, Thiago R. L. C. Desenvolvimento de método analítico colorimétrico em papel para detecção de explosivo (ácido pícrico). In: 3º Encontro Nacional de Química Forense, 2012, Ribeirão Preto.

de Araújo, W. R.; Paixão, Thiago R. L. C. Desenvolvimento de método analítico para determinação de nitrato em solo. In: 34a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2011, Florianópolis.

Anexos

Tabela 7 - Teores médios de adulterantes encontrados nas apreensões analisadas.

AMOSTRA	Benzo caina	Parace tamol*	Fenac etina	Cafei na	Lido caina	Amino pirina	Leva misol	Procai na	Hidro xizina	Diltia zem	Cocaina	Cis- cinamoil cocaina	Trans- cinamoil cocaina
1	n.d.	n.d.	n.d.	40,2	9,7	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	10,3	0,3	0,3
2	n.d.	n.d.	n.d.	24,6	2,3	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	7,0	n.d.	0,1
3	n.d.	n.d.	6,4	n.d.	1,1	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	60,2	3,6	3,1
4	n.d.	n.d.	4,2	33,7	5,8	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	21,7	0,5	0,4
5	n.d.	n.d.	1,3	39,2	12,1	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	5,5	0,3	0,3
6	n.d.	n.d.	13,7	2,7	0,9	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	40,8	2,5	2,0
7	n.d.	sim	1,4	22,4	1,4	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	16,8	0,6	0,4
8	n.d.	n.d.	n.d.	46,8	0,8	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	10,6	0,6	n.d.
9	n.d.	n.d.	1,3	41,7	3,5	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	18,4	0,4	0,4
10	n.d.	n.d.	0,7	23,0	12,7	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	27,1	1,6	1,2
11	n.d.	n.d.	1,1	20,5	0,8	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	56,1	2,6	2,6
12	n.d.	n.d.	1,4	0,8	0,9	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	1,3	0,3	n.d.
13	n.d.	sim	0,7	30,6	6,7	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	10,7	n.d.	n.d.
14	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,8	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	2,1	0,4	0,3
15	n.d.	n.d.	n.d.	45,8	24,3	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	11,5	0,6	0,7
16	n.d.	n.d.	n.d.	37,3	9,0	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	14,0	0,5	0,8
17	n.d.	n.d.	n.d.	9,4	13,1	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	22,0	1,1	1,0
18	n.d.	n.d.	n.d.	31,9	5,9	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	43,7	1,1	0,8
19	n.d.	n.d.	n.d.	38,2	8,4	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	27,6	1,3	1,1
20	n.d.	n.d.	1,4	0,8	0,8	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	1,9	0,3	n.d.
21	n.d.	n.d.	0,9	22,0	0,7	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	55,3	2,4	2,6
22	n.d.	n.d.	0,9	22,5	0,9	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	53,4	2,6	2,4

23	n.d.	n.d.	0,7	33,3	21,2	n.d.	2,7	n.d.	n.d.	n.d.	24,1	0,3	0,3
24	n.d.	n.d.	11,8	39,3	1,6	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	21,6	1,0	0,8
25	n.d.	n.d.	1,5	19,7	1n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	11,5	0,5	0,5
26	n.d.	n.d.	0,8	31,6	8,5	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	19,5	0,3	n.d.
27	n.d.	n.d.	n.d.	59,7	2,8	n.d.	6,3	n.d.	n.d.	n.d.	16,9	n.d.	n.d.
28	n.d.	n.d.	n.d.	58,6	0,7	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	10,9	0,4	0,5
29	n.d.	n.d.	3,7	66,4	0,7	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	18,1	1,3	1,4
30	n.d.	n.d.	n.d.	56,6	2,3	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	23,5	1,4	1,3
31	n.d.	n.d.	0,7	2n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	45,5	1,8	1,9
32	n.d.	n.d.	1,1	n.d.	n.d.	sim	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	81,6	4,0	2,9
33	n.d.	n.d.	n.d.	80,8	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	8,0	0,4	0,5
34	n.d.	n.d.	n.d.	39,9	8,6	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	12,0	0,5	0,6
35	n.d.	n.d.	19,4	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	72,7	5,1	4,1
36	n.d.	n.d.	n.d.	33,1	4,6	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	21,9	n.d.	n.d.
37	n.d.	n.d.	n.d.	6n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	11,1	0,4	0,6
38	n.d.	n.d.	n.d.	43,8	3,4	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	9,4	0,6	0,6
39	n.d.	n.d.	n.d.	12,8	2,6	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	6,1	n.d.	n.d.
40	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	7,2	n.d.	n.d.
41	n.d.	n.d.	n.d.	0,7	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	91,8	6,1	4,2
42	n.d.	n.d.	n.d.	2,8	2,7	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,3	n.d.	n.d.
43	0,8	n.d.	n.d.	65,7	1,8	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	15,2	0,7	0,6
44	n.d.	n.d.	n.d.	35,4	34,4	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	16,9	0,8	0,9
45	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	52,9	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
46	n.d.	n.d.	n.d.	96,4	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
47	n.d.	n.d.	n.d.	98,4	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
48	n.d.	n.d.	n.d.	97,0	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
49	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	98,4	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
50	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	99,2	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

*qualitativo; n.d. = não detectado.