

UNIVERSIDADE FEDERAL DOS VALES DO JEQUITINHONHA E MUCURI

Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas

Karla Aparecida de Oliveira Souza

**DESENVOLVIMENTO DE UM MÉTODO DE TRIAGEM ELETROQUÍMICO PARA
APLICAÇÃO NO CONTROLE DE *DOPING* DA AMILORIDA EM AMOSTRAS DE
URINA USANDO O ELETRODO DE DIAMANTE DOPADO COM BORO**

Diamantina

2021

Karla Aparecida de Oliveira Souza

**DESENVOLVIMENTO DE UM MÉTODO DE TRIAGEM ELETROQUÍMICO PARA
APLICAÇÃO NO CONTROLE DE *DOPING* DA AMILORIDA EM AMOSTRAS DE
URINA USANDO O ELETRODO DE DIAMANTE DOPADO COM BORO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Wallans Torres Pio dos Santos

Diamantina

2021

Catálogo na fonte - Sisbi/UFVJM

S729d Souza, Karla Aparecida de Oliveira
2021 Desenvolvimento de um método de triagem eletroquímico para aplicação no controle de doping da amilorida em amostras de urina usando o eletrodo de diamante dopado com boro [manuscrito] / Karla Aparecida de Oliveira Souza. -- Diamantina, 2021.
83 p. : il.

Orientador: Prof. Wallans Torres Pio dos Santos.

Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) -- Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Diamantina, 2021.

1. Doping. 2. Diuréticos. 3. Mecanismo - eletroquímico. 4. Métodos - eletroanalíticos. 5. BDDE. I. Santos, Wallans Torres Pio dos. II. Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri. III. Título.



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DOS VALES DO JEQUITINHONHA E MUCURI

KARLA APARECIDA DE OLIVEIRA SOUZA

DESENVOLVIMENTO DE UM MÉTODO DE TRIAGEM ELETROQUÍMICO PARA APLICAÇÃO NO CONTROLE DE DOPING DA AMILORIDA EM AMOSTRAS DE URINA USANDO O ELETRODO DE DIAMANTE DOPADO COM BORO

Dissertação apresentada ao programa de
PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
da Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri,
nível de Mestrado, como requisito parcial para obtenção
do título de **MESTRA EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

Orientador: Prof. Dr. **WALLANS TORRES PIO DOS SANTOS**

Data de aprovação 16/07/2021.

Prof. Dr. WALLANS TORRES PIO DOS SANTOS - (UFVJM)

Presidente

Prof. Dr. FÁBIO PIO DORNAS - (UFVJM)

Membro Interno

Prof. Dra. CRISTIANE LUISA JOST- (UFSC)

Membro Externo

DIAMANTINA

JULHO/2021



Documento assinado eletronicamente por **Wallans Torres Pio dos Santos, Servidor**, em 16/07/2021, às 17:07, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Cristiane Luisa Jost, Usuário Externo**, em 16/07/2021, às 17:10, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Fabio Pio Dornas, Servidor**, em 21/07/2021, às 10:54, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufvjm.edu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **0411413** e o código CRC **EA8837CE**.

*Dedico este trabalho aos meus pais, pelo
encorajamento e incentivo.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço inicialmente a Deus, minha fonte de proteção e que sempre atendeu aos meus pedidos;

À minha família, especialmente meus pais, Alírio e Fátima, que são minha base, minha fonte de inspiração, que sempre apoiaram cada passo da minha vida, sempre acreditaram em mim e nunca me deixaram desistir. Obrigada por todo amor e suporte!

Ao meu namorado, Bruno, que nunca mediu esforços para me ajudar, por todo amor e compreensão;

Às minhas amigas de república, pela amizade durante todos esses anos de convivência;

Agradeço aos meus colegas do GPED, pelas novas amizades e momentos de descontração, especialmente ao Dilton, que além de colega e vizinho foi meu braço direito durante todo esse curso;

Ao meu orientador, Prof. Wallans, por todo o ensinamento, orientação e confiança depositados em mim;

Agradeço à minha Universidade, UFVJM, pela minha formação desde a graduação;

A todos que direta, ou indiretamente, contribuíram para a minha formação pessoal e profissional.

Finalmente, à FAPEMIG, pela bolsa de estudo concedida.

“Nascer, crescer, morrer, renascer ainda e progredir sempre, tal é a
lei.”

(Allan Kardec)

RESUMO

A amilorida (AMI) é um natriurético poupador de potássio. Este medicamento é usado para tratar hipertensão, insuficiência cardíaca e cirrose hepática. Devido aos seus efeitos diuréticos, a AMI é proibida no controle de *doping* e de interesse da Agência Mundial *Antidoping* (WADA). Nas competições esportivas, os diuréticos são usados principalmente para perda de peso, o que é muito importante para algumas práticas de esportes de luta como boxe, caratê, judô e outras. Da mesma forma, drogas diuréticas são tomadas intencionalmente por muitos atletas para diminuir a concentração na urina de outras drogas ingeridas e mascarar o uso de substâncias proibidas pela WADA. Embora existam muitos métodos de análise em amostras de urina para controle de dopagem, notadamente por LC-MS e GC-MS, o desenvolvimento de métodos de triagem para auxiliar e ampliar o espectro de exames *antidoping* nos atletas é de extremo interesse para aplicação em grandes competições esportivas. Neste contexto, os métodos eletroanalíticos são bastante atrativos para uma triagem de drogas proibidas em amostras biológicas, apresentando sensores simples, rápidos, portáteis e de baixo custo. Embora os métodos eletroanalíticos tenham sido relatados para detecção da AMI em amostras farmacêuticas, incluindo o uso de eletrodo de diamante dopado com boro (BDDE), eles não foram aplicados em amostras de urina para uma possível aplicação no controle de *doping*. Dessa forma, apresentamos um estudo mais completo do comportamento eletroquímico da AMI no BDDE, mostrando, pela primeira vez, um processo de redução desse fármaco para sua detecção seletiva e rápida em amostras de urina por meio da voltametria de redissolução catódica de onda quadrada (SWCSV). A solução tampão Britton-Robinson (B-R) 0,1 mol L⁻¹ pH 2,0 foi escolhida como eletrólito de suporte para detecção da AMI, onde três processos de oxidação foram apresentados no BDDE em +0,3 V, +1,3 V e +1,5 V (vs Ag/AgCl). Além disso, um processo redox em torno de +0,15V e um novo processo de redução em -0,3 V foram observados para AMI. Este novo processo de redução foi usado para determinar AMI devido à sua maior seletividade, uma vez que essa estratégia analítica permitiu a detecção do analito na urina sem interferência dos ácidos ascórbico e úrico. O método proposto apresentou um desempenho analítico satisfatório para determinação da AMI, sendo obtida uma ampla faixa linear de trabalho entre 0,5 e 55,1 μmol L⁻¹ (r² = 0,99) com um limite de detecção (0,15 μmol L⁻¹) suficientemente baixo para atender os requisitos exigidos pela WADA em análises de diuréticos na urina. Portanto, o método proposto demonstra uma alternativa atraente para a determinação de AMI na urina e sua possível aplicação de triagem no controle de *doping*.

Palavras-chave: Amostras Biológicas, Diuréticos, Mecanismo Eletroquímico, Métodos Eletroanalíticos, Testes *Antidoping*.

ABSTRACT

Amiloride (AMI) is a potassium-sparing natriuretic. This drug is used to treat hypertension, heart failure, and liver cirrhosis. Due to its diuretic effects, AMI is banned in doping control and of great interest to the World Anti-Doping Agency (WADA). In sports competitions, diuretics are mainly used for weight loss, which is very important for some fighting sports, such as boxing, karate, judo, and others. Similarly, diuretic drugs are intentionally taken by many athletes to decrease the concentration in the urine of other ingested drugs and to mask the use of substances banned by WADA. Although, many analytical methods have been reported in urine samples for doping control, mainly, by LC-MS and GC-MS, the development of simple and fast screening methods is of great interest to application in major sporting competitions, since these preliminary tests can provide a large-scale anti-doping analysis in athletes. In this context, electroanalytical methods are very attractive as screening tests in doping control, offering also a portable and low-cost analysis. Even though some methods have been reported for detection of AMI in pharmaceutical samples, including the use of boron doped diamond electrodes (BDDE), these reports have not been applied in urine samples for application in doping control. Thereby, we present a complete study of the electrochemical behavior of AMI on BDDE, showing, for the first time, a reduction process of this drug for its selective detection in urine samples by square wave cathodic stripping voltammetry (SWCSV). 0.1 mol L⁻¹ Britton-Robinson (B-R) buffer solution (pH 2.0) was chosen as the supporting electrolyte for detection of AMI, where three irreversible oxidation processes were presented on BDDE at +0.3 V, +1.3 V and +1.5 V (vs Ag/AgCl). In addition, a redox process at around +0.15 V and a new reduction process at -0.3 V were observed for AMI. The new reduction process was selected to determine AMI due to its higher selectivity, since this analytical strategy allowed the detection of the analyte in urine without interference from ascorbic and uric acids. The proposed method provided a good analytical performance for AMI determination with a wide linear working range between 0.5 and 55.1 μmol L⁻¹ ($r^2 = 0.99$) and a limit of detection (0.15 μmol L⁻¹), which is sufficiently low, according to WAD, to assess urine sample containing diuretic drugs in anti-doping testing. Therefore, the proposed method demonstrates an attractive alternative for the determination of AMI in urine and its possible screening application in doping control.

Keywords: Anti-Doping Analyses, Diuretic Drugs, Biological Samples, Electroanalytical Methods, Electrochemical Mechanism.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - Estrutura química da AMI.22
- Figura 2** - (A) Variação do potencial aplicado com o tempo. E_i = potencial inicial, E_f = potencial final, E_{max} = potencial máximo, E_{min} = potencial mínimo. A taxa de varredura $|dE/dt| = v$. (B) Voltamograma representativo de processo de oxidação e redução quase-reversível para paracetamol em eletrodo de ouro. E_{pa} = potencial de pico anódico, E_{pc} = potencial de pico catódico, I_{pa} = corrente de pico anódico e I_{pc} = corrente de pico catódico.....26
- Figura 3** - (A) sinal de excitação para DPV e (B) curva diferencial.28
- Figura 4** - (A) sinal de excitação da SWV e (B) representação esquemática de um voltamograma de onda quadrada de um sistema reversível.29
- Figura 5** - Superfície do eletrodo BDD após tratamento (A) Catódico e (B) Anódico.32
- Figura 6** - Potenciostato/galvanostato Autolab/PGSTAT 101.36
- Figura 7** - (A) Célula eletroquímica utilizada nos estudos contendo a) eletrodo de referência, b) eletrodo auxiliar, c) eletrodo de trabalho e d) placa de cobre. (B) Visualização do tamanho real da placa de BDDE em comparação a uma moeda. (C) Imagem obtida MEV da morfologia da superfície do BDDE usado neste trabalho.37
- Figura 8** - Voltamogramas obtidos por CV de $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ AMI em soluções tampão B-R $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ com diferentes valores de pH no BDDE. Todos os potenciais de varreduras foram iniciados em $-1,5 \text{ V}$ na direção positiva para $+2,2 \text{ V}$ com uma taxa de varredura de 50 mV s^{-1} , onde os CVs completos são mostrados em (A) e a inserção é um zoom dos processos redox da AMI. Para uma melhor visualização desses processos eletroquímicos, as linhas dos CVs foram recortadas e plotadas separadamente em torno de $+0,3 \text{ V}$ (B); $+1,3 \text{ V}$ e $+1,5 \text{ V}$ (C); e $-0,3 \text{ V}$ (D).....41
- Figura 9** - CV obtido no BDDE em $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ tampão B-R pH 2,0 sem (linha preta) e com adição de $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ AMI (linha vermelha). Todos os potenciais de varreduras foram iniciados em $-1,5 \text{ V}$ na direção positiva com uma taxa de varredura de 50 mV s^{-1} . A inserção é um zoom para mostrar um ligeiro processo de redução da AMI em torno de $+0,15 \text{ V}$43
- Figura 10** - CVs de solução AMI $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 2,0 (linha preta) e tampão B-R $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 2,0 (linha vermelha) no BDDE. Taxa de varredura: 50 mV s^{-1} . Todos os potenciais de varreduras foram iniciados em $-0,6 \text{ V}$ na direção positiva....44
- Figura 11** - CVs da solução de AMI a $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ em tampão B-R $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 2,0 após pré-tratamento catódico (linha preta) e anódico (linha vermelha) do BDDE. Taxa de varredura

50 mV s ⁻¹ . Todos os potenciais de varreduras foram iniciados em -1,5 V na direção positiva para +2,2 V.	45
Figura 12 - CVs em diferentes velocidades de varredura (10 a 800 mV s ⁻¹) para 1,0 mmol L ⁻¹ de AMI em 0,1 mol L ⁻¹ tampão BR pH 2,0 no BDDE. Todos os potenciais de varreduras foram iniciados em -1,5 V na direção positiva para 2,2 V.	46
Figura 13 - Gráfico da corrente de pico (I _p) vs raiz quadrada da velocidade de varredura (v ^{1/2}) obtida a partir da Fig. 12 para os processos eletroquímicos da AMI no BDDE: Ox ₁ (A), Ox ₂ (B), Ox ₃ (C) e Red ₂ (D).	47
Figura 14 - Gráfico da corrente de pico (I _p) vs velocidade de varredura (v) obtida a partir da Fig. 12 para os processos eletroquímicos da AMI no BDDE: Ox ₁ (A), Ox ₂ (B), Ox ₃ (C) e Red ₂ (D).	47
Figura 15 - Gráfico de log I _p vs log v obtido a partir da Figura 12 para os processos eletroquímicos da AMI no BDDE: Ox ₁ (A), Ox ₂ (B), Ox ₃ (C) e Red ₂ (D).	48
Figura 16 - CVs registrados em BDDE em tampão B-R pH 2,0 com taxa de varredura: 50 mVs ⁻¹ com diferentes janelas de potencial em (A) de -0,5 V a +0,5 V sem (linha preta) e com adição de 1,0 mmol L ⁻¹ AMI (linha vermelha) e em (B) de -0,6 V a 1,3 V para a primeira varredura (linha preta) e a segunda varredura (linha vermelha), além de -0,6 a 2,2 V para a primeira varredura (linha verde) e a segunda varredura (linha azul). A inserção é um zoom para mostrar claramente um processo de redução de AMI em torno de +0,15 V com seu processo redox reversível. Todas os potenciais de varreduras se iniciaram em -0,5V no sentido catódico.	49
Figura 17 - (A) CVs registrados em solução 1,0 mmol L ⁻¹ AMI em tampão B-R 0,1 mol L ⁻¹ pH 2,0 no BDDE. As varreduras foram iniciadas em diferentes potenciais (E ₀ , de -0,5 a -1,5 V) na direção positiva com uma taxa de varredura de 50 mV s ⁻¹ . A inserção é um zoom para mostrar claramente o processo de oxidação de AMI em torno de +0,4 V. (B) CV obtido usando GCE com filme de mercúrio em tampão B-R 0,1 mol L ⁻¹ pH 2 sem (linha preta) e com adição de 1,0 mmol L ⁻¹ de AMI (linha vermelha). Taxa de varredura de 50 mV s ⁻¹	50
Figura 18 - Gráficos da relação entre E _p vs pH no BDDE obtido a partir da Figura 8 para processos eletroquímicos da AMI na Ox ₁ (A), Ox ₂ (B), Ox ₃ (C) e Red ₂ (D).	52
Figura 19 - (A) Voltamogramas obtidos para AMI 1,0 mmol L ⁻¹ em tampão B-R 0,1 mol L ⁻¹ em diferentes valores de pH com potencial de acumulação de +1,3 V por 30s. Taxa de varredura de 50 m Vs ⁻¹ . Todos os potenciais de varredura iniciaram em 0,4V no sentido catódico. (B) Gráfico dos potenciais de picos (E _{pa} e E _{pc}) da AMI vs pH no BDDE obtido a partir da Figura19A.	53

Figura 20 - (A) Voltamogramas obtidos para AMI 1,0 mmol L ⁻¹ em tampão B-R 0,1 mol L ⁻¹ pH 2,0 em diferentes velocidades de varredura com potencial de acumulação de +1,3 V por 30s. (B) Gráfico da corrente de pico (I _{pc} e I _{pa}) vs v ^{1/2} obtida a partir da Figura 20A.....	54
Figura 21 - Voltamogramas de onda quadrada registrados em solução 1,0 mmol L ⁻¹ AMI em tampão B-R 0,1 mol L ⁻¹ pH 2,0 no BDDE. Step: 5mV, amplitude: 30mV e frequência: 25Hz.	56
Figura 22 - Voltamogramas cíclico registrados em solução 1,0 mmol L ⁻¹ AMI em tampão B-R 0,1 mol L ⁻¹ pH 2,0 no BDDE. Velocidade de varredura: 10 mV s ⁻¹ (A) . Gráfico de Tafel para a Ox ₂ da AMI a + 1,3 V (B)	57
Figura 23 - Espectros FTIR da AMI (espectro preto) e os produtos de eletrooxidação a +1,3 V (espectro vermelho) e 1,8 V (espectro azul) (A) . Sobreposição espectral na região do infravermelho do alongamento da amida (B) e do alongamento C = O (C)	61
Figura 24 - (A) CVs registrados no BDDE em tampão B- R 0,1 mol L ⁻¹ pH 2 com adição de soluções padrão de 10 μmol L ⁻¹ de AMI (linha azul) ou AU (linha preta) ou AA (linha vermelha). Todas as varreduras potenciais foram iniciadas em - 1,5 V na direção positiva com uma taxa de varredura de 50 mVs ⁻¹ . (B) SWCSVs registrados no BDDE em tampão B- R 0,1 mol L ⁻¹ pH 2,0 para 10 μmol L ⁻¹ de AMI (linha azul), AU (linha preta) e AA (linha vermelha). Amplitude: 80 mV, frequência: 70 Hz, step: 8 mV, tacc: 15 s, Eacc: 1,8 V.....	63
Figura 25 - Voltamogramas registrados em solução 1,0 mmol L ⁻¹ AMI em tampão B-R 0,1 mol L ⁻¹ pH 2,0 no BDDE para otimizações dos parâmetros da técnica de SWCSV. (A) step, (B) amplitude e (C) frequência.....	64
Figura 26 - Voltamogramas registrados em solução 1,0 mmol L ⁻¹ AMI em tampão B-R 0,1 mol L ⁻¹ pH 2,0 no BDDE para otimizações dos parâmetros da técnica de SWCSV. (A) potencial de acumulação e (B) tempo de acumulação.....	64
Figura 27 - Voltamogramas registrados em solução 1,0 mmol L ⁻¹ AMI em tampão B-R 0,1 mol L ⁻¹ pH 2,0 no BDDE para as técnicas otimizadas SWCSV (linha vermelha) step:8,0 mV, amplitude:80 mV, frequência: 70 hz, t _{ac} : 15 s e E _{ac} :1,8 V; e DPCSV (linha preta) step: 12, 0 mV, amplitude: 100 mV, tempo de modulação: 10 ms, intervalo de tempo: 0,1 s, t _{ac} : 15 s e E _{ac} :1,8 V.	65
Figura 28 - SWCSVs para concentrações de 0,51 a 55,1 μmolL ⁻¹ AMI em 0,1 mol L ⁻¹ tampão B -R pH 2,0 no BDDE. Amplitude: 80 mV, frequência: 70 Hz, step: 8 mV, t _{ac} : 15 s, E _{ac} : 1,8 V. A inserção é o gráfico de regressão linear correspondente. A ampliação mostra os sinais mensuráveis obtidos nas menores concentrações.....	66

- Figura 29** - SWCSVs registrados de 10 medições de $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ AMI em $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ tampão B-R pH 2,0 em três BDDEs diferentes mostrados em **(A)**, **(B)** e **(C)**. Os parâmetros eletroquímicos foram os mesmos da Figura 28. **(D)** Gráfico das correntes de pico vs número de medições realizadas em três BDDEs diferentes. 67
- Figura 30** - SWCSVs de $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ AMI em tampão B-R $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 2,0 no mesmo BDDE em dias diferentes com tratamento catódico **(A)** e anódico **(B)**. Os parâmetros eletroquímicos foram os mesmos da Figura 28. As inserções são os gráficos de I_p vs. número de medições realizadas em 10 dias diferentes. 69
- Figura 31** - Voltamogramas obtidos por SWCSV no BDDE em tampão B – R $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 2,0 contendo apenas $10 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ AMI antes (linhas pretas) e após a adição de diferentes razões de concentração para AMI: UA em **(A)** de 1: 1 a 1: 100; e para AMI: AA em **(B)** de 1: 1 a 1: 1000. Os parâmetros eletroquímicos foram os mesmos da Figura 28. 70

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Estudos de adição e recuperação da AMI em amostras de urina utilizando o método proposto.	71
Tabela 2 - Comparação dos métodos eletroanalíticos relatados para determinação de AMI com o método proposto.	73

LISTA DE SIGLAS

AA	Ácido ascórbico
AMI	Amilorida
AU	Ácido úrico
BDDE	Eletrodo de diamante dopado com boro, do inglês <i>Boron-Doped Diamond Electrode</i>
B-R	Britton-Robinson
CV	Voltametria cíclica, do inglês <i>Cyclic Voltammetry</i>
DME	Eletrodo de mercúrio suspenso, do inglês <i>Dropping Mercury Electrode</i>
DPCSV	Voltametria de redissolução catódica de pulso diferencial, do inglês, <i>Differential Pulse Cathodic Stripping Voltammetry</i>
DPR	Desvio Padrão Relativo
DPV	Voltametria de pulso diferencial, do inglês <i>Differential Pulse Voltammetry</i>
E_p	Potencial de pico
E_{pa}	Potencial de pico anódico
E_{pc}	Potencial de pico catódico
FTIR	Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier
GCE	Eletrodo de carbono vítreo, do inglês <i>Glassy Carbono Electrode</i>
GC-MS	Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas, do inglês <i>Gas Chromatography - Mass Spectrometry</i>
HMDE	Eletrodo de gota de mercúrio suspensa, do inglês <i>Hanging Mercury Drop Electrode</i>)
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência, do inglês, <i>High Performance Liquid Chromatography</i>
I_p	Corrente de pico
I_{pa}	Corrente de pico anódico
I_{pc}	Corrente de pico catódico
LC-MS	Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas, do inglês <i>Liquid Chromatography - Mass Spectrometry</i>
LOD	Limite de Detecção
LOQ	Limite de Quantificação
m	coeficiente angular

MRPL	Limites Mínimos de Desempenho Exigidos, do inglês <i>Minimum Required Performance Levels</i>
mV	Milivolts
<i>n</i>	Número de elétrons
Ox	Oxidação
Red	Redução
SWCSV	voltametria de redissolução catódica de onda quadrada, do inglês <i>Square Wave Cathodic Stripping Voltammetry</i>
SWV	Voltametria de onda quadrada, do inglês <i>Square Wave Voltammetry</i>
V	Volts
WADA	Agência Mundial <i>Antidoping</i> , do inglês <i>World Anti-Doping Agency</i>

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
1.1 <i>Doping</i>	16
1.2 Diuréticos	19
1.3 Amilorida	21
1.4 Métodos para determinação da Amilorida.....	23
1.5 Técnicas eletroquímicas	24
1.5.1 <i>Voltametria cíclica</i>	26
1.5.2 <i>Voltametria de pulso diferencial</i>.....	27
1.5.3 <i>Voltametria de onda quadrada</i>	28
1.5.4 <i>Voltametria de redissolução</i>.....	29
1.6 Eletrodo de Diamante Dopado com Boro	30
2 OBJETIVOS	34
2.1 Objetivo geral.....	34
2.2 Objetivos específicos	34
3 PARTE EXPERIMENTAL	35
3.1 Reagentes e soluções	35
3.2 Instrumentação	36
3.3 Detecção eletroquímica.....	37
3.4 Estudos de repetibilidade e reprodutibilidade	38
3.5 Estudo de linearidade e sensibilidade	38
3.6 Estudos de adição e recuperação	39
3.7 Cálculo do número de elétrons	39
3.8 Estudos de interferentes	40
3.9 Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier	40

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES	41
4.1 Comportamento eletroquímico da AMI	41
4.2 Caracterização do mecanismo proposto por análise FTIR.....	60
4.3 Otimização da SWCSV e dos parâmetros analíticos para determinação da AMI .	62
4.4 Estudos de interferentes e adição e recuperação de AMI em amostras de urina ...	69
4.5 Comparações dos métodos eletroanalíticos para determinação de AMI.....	72
5 CONCLUSÕES.....	75
REFERÊNCIAS	76
PRODUÇÕES CIENTÍFICAS DURANTE REALIZAÇÃO DO MESTRADO.....	82

1 INTRODUÇÃO

1.1 *Doping*

O homem sempre tentou melhorar seu desempenho físico. Na história, o uso de substâncias para aumentar a performance ocorre desde as antigas civilizações. Esse desejo de aumentar o próprio rendimento para obter melhores resultados na prática esportiva levou os atletas a buscarem alternativas por meio de qualquer método: legal ou ilegal, saudável ou prejudicial à saúde (MAZZEO; D'ELIA; RAIOLA, 2018). Todavia, as competições esportivas são realizadas para testarem as capacidades naturais dos atletas. Todos os tipos de esporte nessas competições possuem um conjunto de regras estabelecido para garantir que os atletas se desenvolvam e possam competir em um ambiente justo e livre de qualquer ameaça. A violação às essas regras é considerada como *doping*.

O *doping* representa uma ameaça ao esporte em todo o mundo, prejudicando o princípio da competição aberta e justa (MAZZEO; D'ELIA; RAIOLA, 2018). Além disso, o uso de substâncias proibidas durante várias décadas, por muitos atletas profissionais, especialmente durante as competições, não só podem melhorar o desempenho físico dos mesmos como pode levar a riscos sérios e prejudiciais à saúde, incluindo a morte (AL GHOBAIN *et al.*, 2016). Em 1999, a fim de regular, monitorar e controlar o uso de substâncias em todo o mundo, foi criada e estabelecida a WADA (do inglês, *World Anti-doping Agency*). A WADA produz uma lista de substâncias proibidas que é atualizada anualmente e documenta as substâncias e métodos proibidos de uso dentro e fora das competições. Entende-se como métodos proibidos pela WADA (WADA, 2021a):

- I. **Manipulação do sangue e componentes sanguíneos**, sendo proibidos:
 - (a) Administração ou reintrodução no sistema circulatório de qualquer quantidade de sangue autólogo, alogênico (homólogo) ou heterólogo, ou produtos derivados de células vermelhas do sangue, de qualquer origem.
 - (b) Aumentar artificialmente a capacidade de captação, transporte ou troca tecidual de oxigênio. Incluindo, mas não limitando a: perfluoroquímicos; efaproxiral e produtos modificados da hemoglobina, por exemplo, substitutos do sangue baseados em

hemoglobina e produtos de hemoglobina microencapsulados, excluindo a suplementação de oxigênio por inalação.

(c) Qualquer forma de manipulação intravascular do sangue ou de seus componentes por meios físicos ou químicos.

II. **Manipulação química ou física**, os seguintes são proibidos:

(a) Adulterar ou tentar adulterar, alterar a integridade ou validade das amostras coletadas durante um controle de *doping*. Incluindo, mas não limitando a: substituição da amostra e/ou adulteração, por exemplo adição de proteases à amostra.

(b) Infusões intravenosas ou injeção de mais de 100ml num período de 12h, exceto se recebido legitimamente no curso de tratamentos hospitalares, procedimentos cirúrgicos ou de diagnóstico.

III. **Doping genético e celular**:

(a) Uso de ácidos nucleicos ou seus análogos, que possam alterar a sequência genômica e/ou alterar a expressão genética por qualquer mecanismo. Isto inclui, mas não se limita a edição de genes, silenciamento de genes ou tecnologias de transferência genética.

(b) O uso de células normais ou geneticamente modificadas.

Para que uma substância de melhoria de desempenho seja classificada como *doping* e seja incluída na lista de proibidas pela WADA, dois dos três critérios seguintes devem ser atendidos:

(I) a substância aumenta ou tem o potencial de aumentar o desempenho;

(II) a substância representa um risco real ou potencial para a saúde do atleta e;

(III) a substância viola o espírito do esporte (AL GHOBAIN *et al.*, 2016; VLAD *et al.*, 2018; WORLD-ANTI DOPING AGENCY, 2021b).

Assim, a lista de substâncias proibidas (WADA, 2021a) é parte do Código Mundial de *Anti-Doping* (WADA, 2021b), ambos fornecidos anualmente pela WADA. Os grupos de substâncias proibidas mais comumente detectados são agentes anabolizantes e estimulantes, as quais dependem da modalidade esportiva (AGUILAR-NAVARRO *et al.*, 2020), como no: halterofilismo, atletismo, rúgbi, hóquei e voleibol apresentam proporções de anabolizantes altas. Ciclismo, atletismo e rúgbi apresentaram proporções atipicamente elevadas de hormônios peptídicos e fatores de crescimento. Diuréticos (foco deste trabalho

representado por um dos medicamentos desta classe) e agentes mascaradores são mais comumente encontrados no boxe, luta livre, taekwondo, judô, tiro e ginástica do que em outros esportes. Ciclismo, remo, esportes aquáticos, tênis, ginástica e hóquei no gelo apresentaram proporções anormalmente altas de estimulantes.

A WADA também estabelece que, de acordo com seu Código, o *doping* é concebido de diferentes maneiras, incluindo diferentes significados específicos, como:

- i. a presença de uma substância proibida ou de seus metabólitos ou marcadores na amostra de um atleta;
- ii. a posse, uso ou tentativa de uso de substâncias ou métodos proibidos;
- iii. a recusa ou a omissão, sem justificativa convincente, de submeter-se à coleta de amostra;
- iv. a violação dos requisitos aplicáveis com relação à disponibilidade do atleta para testes fora da competição;
- v. a adulteração ou tentativa de adulterar qualquer parte do controle de dopagem;
- vi. o tráfico ou tentativa de tráfico de qualquer substância ou método proibido;
- vii. a administração ou tentativa de administração a qualquer atleta de quaisquer métodos ou substâncias proibidas, ou a assistência, encorajamento, auxílio, cumplicidade, encobrimento ou qualquer outro tipo de cumplicidade envolvendo uma violação das regras antidopagem ou qualquer tentativa de violação das regras antidopagem (MAZZEO; D'ELIA; RAIOLA, 2018; WADA, 2021b).

Dessa forma, os testes para controle de *doping* são extremamente importantes para combater o *doping* no esporte. Nesse sentido, os laboratórios credenciados para realizar os exames de *antidoping* têm um papel importante nas análises destas substâncias proibidas, que já estejam incluídas na lista da WADA, bem como na descoberta de novas substâncias. Esses laboratórios possuem todos os critérios analíticos e as metodologias recomendadas pela WADA para os testes *antidoping* (MAZZEO; D'ELIA; RAIOLA, 2018). Esses testes fornecem a identificação, geralmente seguida de quantificação das substâncias proibidas. A fim de obter resultados em acordo de laboratórios credenciados pela WADA, níveis mínimos de desempenho exigidos para métodos analíticos foram estabelecidos, definindo os requisitos mínimos de sensibilidade para a análise das substâncias (WADA, 2019).

Os testes de *doping* são realizados em amostras biológicas coletadas de atletas tanto dentro como fora de competições. As análises de *antidoping* de rotina têm como matriz biológica de escolha as amostras de urina. Em alguns casos, também são utilizadas matrizes

hemáticas (soro, plasma e sangue total). A urina se apresenta vantajosa em relação ao sangue por disponibilizar volumes relativamente grandes e a coleta não ser invasiva. Ao contrário, nas amostras de sangue a coleta é invasiva e fornece um volume limitado. Dessa forma, a maioria das análises *antidoping* é realizada em urina, onde as investigações sobre a presença de um composto proibido são rotineiramente realizadas por meio de um fluxo de trabalho comum, iniciando com uma triagem inicial seguida de um procedimento de confirmação (PROTTI; MANDRIOLI; MERCOLINI, 2019).

Os métodos considerados de referência para identificação e confirmação do *doping* são os baseados em espectrometria de massas (MS - do inglês, *mass spectrometry*) acoplada as técnicas cromatográficas como GC-MS (do inglês, *gas chromatography with mass spectrometry*) e LC-MS (do inglês, *liquid chromatography with mass spectrometry*). No que tange aos métodos de triagem usados na identificação preliminar de drogas, esses devem ser rápidos, seletivos e sensíveis o suficiente para auxiliar na identificação pelos métodos confirmatórios e ampliar o espectro de análise de atletas. Neste sentido, apesar da robustez, alta seletividade e sensibilidade obtido pelos métodos baseados em LC-MS e CG-MS, esses não são adequados para serem aplicados como métodos de triagem devido à complexidade e necessidade de laboratórios de grande porte para utilização dessas técnicas.

Cabe destacar que, a lista de substâncias proibidas da WADA (WADA, 2021a) inclui uma ampla gama de compostos, o que demanda dos laboratórios antidopagem uma variedade alta de metodologias analíticas. Além disso, as técnicas de triagem e confirmação devem ser continuamente atualizadas, uma vez que novas substâncias são anualmente incluídas na lista da WADA. Entre esses desafios analíticos no controle *doping*, destaca-se o desenvolvimento de métodos para análise de substâncias diuréticas, as quais serão abordadas a seguir.

1.2 Diuréticos

Os diuréticos são medicamentos usados para aumentar o fluxo urinário, promovendo a excreção de água pelos rins e de eletrólitos (especialmente sódio e íons cloreto). Por apresentar essas propriedades farmacológicas, essas substâncias são frequentemente usadas para aliviar a retenção de sal ou água e para o tratamento de diversas doenças, como: as cardíacas (ex. hipertensão), hepáticas, renais ou pulmonares (GOEBEL; TROUT; KAZLAUSKAS, 2004; MORRA *et al.*, 2006). A família dos diuréticos inclui

compostos com estruturas moleculares, propriedades físicas e químicas amplamente diferentes. Do ponto de vista farmacológico, além dos diuréticos osmóticos, como manitol e sorbitol, quatro grupos de diferentes drogas que atuam no rim são classificados em:

- Inibidores da anidrase carbônica, bloqueando a reabsorção de HCO_3^- do túbulo próximo (por exemplo, acetazolamida);
- Tiazidas, inibindo o co-transporte Na^+/Cl^- no túbulo distal (por exemplo, hidroclorotiazida);
- Diuréticos da alça, caracterizados pelo rápido início da inibição do co-transporte $\text{Na}^+/\text{K}^+ /2\text{Cl}^-$ na alça de Henle (por exemplo, furosemida);
- Diuréticos poupadores de potássio, inibindo a reabsorção ativa de sódio na porção final do túbulo distal e na parte proximal do ducto coletor (por exemplo, amilorida) (CADWALLADER *et al.*, 2010; DE WILDE *et al.*, 2018; MORRA *et al.*, 2006).

Qualquer que seja a classificação dos diuréticos, quase todos são proibidos nos esportes e uso dessas substâncias é considerado *doping* devido aos seus efeitos no organismo humano. Os diuréticos podem ser usados indevidamente por três principais motivos:

- forçar a diurese e conseguir uma rápida perda de peso antes da competição, em esportes envolvendo categorias de peso (por exemplo, judô);
- aliviar a retenção de água induzida pela ingestão de esteróides anabólicos androgênicos (por exemplo, fisiculturistas);
- mascarar o uso de outros agentes dopantes, alterando seu mecanismo de excreção, principalmente reduzindo sua concentração na urina.

Este último efeito dos diuréticos pode ser obtido diretamente pelo aumento do volume urinário ou, indiretamente, pela alteração do pH urinário, reduzindo assim a excreção urinária de agentes dopantes ácidos/básicos. Portanto, justifica-se a proibição do uso de diuréticos nas competições esportivas, sendo essas substâncias listadas como proibidas pela WADA (CADWALLADER *et al.*, 2010; DE WILDE *et al.*, 2018; GOEBEL; TROUT; KAZLAUSKAS, 2004; MORRA *et al.*, 2006; WADA, 2021a). Conforme mencionado anteriormente, a WADA estabelece os critérios analíticos para determinação dessas substâncias proibidas, sendo um dos mais importantes a capacidade mínima de detecção para

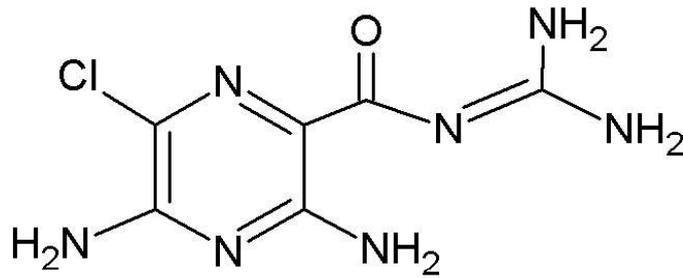
os métodos de análises chamados de Limites Mínimos de Desempenho Exigidos (MRPL, do inglês *Minimum Required Performance Levels*) (WADA, 2019).

O MRLP para cada analito na classe dos diuréticos é de 200 ng/ml (MORRA *et al.*, 2006; WADA, 2019). Esses valores do MRLP (200 ng/ml) são, em geral, alcançados pelos métodos convencionalmente usados para a detecção de diuréticos, que são baseados nas técnicas cromatográficas com detecção espectrométrica, principalmente, LC/MS e GC/MS (CADWALLADER *et al.*, 2010; DE WILDE *et al.*, 2018; MORRA *et al.*, 2006). Nesse contexto, apesar da alta sensibilidade, seletividade e robustez, esses métodos são complexos e requerem grande infraestrutura e tempo para realização das análises *antidoping*. A complexidade e morosidade no controle de *doping* apresentam problemas, principalmente, no caso de grandes eventos esportivos internacionais, como nos Jogos Olímpicos, onde os relatórios dos testes devem ser transmitidos às autoridades esportivas em até 24 horas após a recepção das amostras de urina (MORRA *et al.*, 2006). Assim, o desenvolvimento de métodos alternativos e mais rápidos que possam auxiliar as análises *antidoping* é de grande interesse para o controle de *doping* (MORRA *et al.*, 2006), como no caso de diuréticos. Neste contexto, dentre essas substâncias, a AMI é objeto de estudo deste trabalho, a qual será relatada no próximo item.

1.3 Amilorida

A AMI (3,5-diamino-*N*-carbamimidoil-6-cloropirazina-2-carboxamida), cuja estrutura é apresentada na Figura 1, é um diurético da classe dos poupadores de potássio. Essa substância inibe a reabsorção de sódio por meio dos canais epiteliais de sódio nos túbulos contorcidos distais e nos ductos coletores do rim. É uma base fraca com um pKa de 8,7 e peso molecular de 229,627 g/mol. Apresenta-se como um pó de coloração amarelo-claro ou amarelo-esverdeado, pouco solúvel em água, em isopropanol e álcool etílico absoluto, mas facilmente solúvel em dimetilsulfóxido (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2019). Na prática médica, a AMI é indicada em estados edematosos e para a conservação de potássio adjuvante à tiazida ou diuréticos de alça para tratamento da hipertensão, insuficiência cardíaca congestiva e cirrose hepática com ascite (GOODMAN, 2005; SUN; SEVER, 2020).

Figura 1 - Estrutura química da AMI.



A farmacocinética indica que a AMI é absorvida pelo trato gastrointestinal de forma incompleta e tem uma biodisponibilidade oral em torno de 50%. Após a administração, o início da atividade diurética geralmente ocorre em 2 horas. O pico da diurese ocorre dentro de 6–10 h. Os efeitos diuréticos persistem por cerca de 24 horas após a administração. A AMI não é metabolizada pelo fígado. Cerca de 50% de uma dose oral é excretada de forma inalterada pelos rins na urina, aproximadamente 40% são excretados nas fezes. Em pacientes com função renal normal, a AMI tem meia-vida sérica de 6–9 h (GOODMAN, 2005; PERALTA; FERNÁNDEZ; MASI, 2011; SUN; SEVER, 2020).

O efeito adverso mais perigoso da AMI é a hipercaliemia devido aos seus efeitos poupadores de potássio. A AMI também é associada a efeitos colaterais nos sistemas nervoso central, endócrino, gastrointestinal, músculo-esquelético, dermatológico e hematológico. Os efeitos adversos mais comuns incluem náuseas, vômitos, diarreia e dor de cabeça. O tratamento crônico com AMI também pode aumentar as concentrações séricas de ácido úrico devido ao aumento da reabsorção no túbulo proximal (SUN; SEVER, 2020).

A AMI exibe uma faixa terapêutica extremamente baixa (0,5-25 ng ml⁻¹). A faixa terapêutica é a medida de concentração plasmática de um fármaco que se encontra entre a faixa de efeito terapêutico e a faixa de efeito adverso/tóxico, ou seja, uma leve sobredosagem desse medicamento apresenta sérios riscos à saúde do paciente. A dose terapêutica da AMI varia de 5 a 20 mg por dia, sendo essa faixa de dosagem suficiente para confirmação do *doping* por um atleta (PERALTA; FERNÁNDEZ; MASI, 2011). Vale ressaltar que, doses baixas de AMI levam à excreção urinária de alto volume, exigindo métodos altamente sensíveis para sua detecção em amostras de urina. Os métodos já reportados para detecção de AMI são apresentados a seguir.

1.4 Métodos para determinação da Amilorida

Várias técnicas têm sido relatadas na literatura para determinação de AMI tanto em formulações farmacêuticas quanto em amostras biológicas. Entre as metodologias analíticas da AMI, destacam-se os métodos de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC - do inglês, *high performance liquid chromatography*) com diversos detectores (AHMED; ATIA; MOHAMED, 2011; GOEBEL; TROUT; KAZLAUSKAS, 2004; MOREIRA; MOREAU, 2005; SHAH *et al.*, 2017) e os espectroscópicos com diferentes tratamentos das amostras (CHEN *et al.*, 2019; DOMÍNGUEZ-VIDAL; ORTEGA-BARRALES; MOLINA-DÍAZ, 2002; PERALTA; FERNÁNDEZ; MASI, 2010, 2011; TANG *et al.*, 2016). Apesar desses métodos apresentarem robustez, alta seletividade e sensibilidade, conforme supracitado, pode haver inconvenientes para aplicação dessas metodologias no controle de *doping*, os quais estão relacionados, principalmente, à baixa frequência analítica e complexidade para análises de rotina. Além disso, os métodos cromatográficos, em geral, utilizam solventes orgânicos nas etapas de extração e/ou separação dos compostos, tornando essas análises não ambientalmente amigáveis. Uma alternativa para minimizar esses inconvenientes seria a aplicação de métodos de triagem simples e rápidos, diminuindo assim o grande número de amostras e, conseqüentemente, a maior rapidez na confirmação dos casos de *doping*. Neste contexto, os métodos eletroanalíticos têm-se mostrado promissores para aplicação no controle de *doping* (DOS SANTOS; AMIN; COMPTON, 2019; DOS SANTOS; COMPTON, 2019; LIMA; DOS SANTOS; COMPTON, 2019) apresentando alta frequência analítica, baixa geração de resíduos e uma adequada sensibilidade e seletividade para detecção de analitos eletroativos em amostras biológicas. Além disso, os sensores eletroquímicos usados não são dispendiosos e apresentam um baixo consumo de amostras, simplicidade e portabilidade para aplicação em teste de triagem.

As técnicas eletroanalíticas também têm sido reportadas para a determinação de AMI em matrizes farmacêuticas e biológicas (ALLAFCHIAN; ENSAFI, 2010; ARIDA; MAGHRABI; ZAYED, 2014; DESAI; SRIVASTAVA, 2012; EL-HEFNAWY *et al.*, 2004; ENSAFI; ALLAFCHIAN, 2008; HAMMAM, 2004; KHORSHED; KHAIRY; BANKS, 2019; MARTÍN *et al.*, 1999; MIRMOMTAZ; ENSAFI; SOLEIMANIAN-ZAD, 2009; MORAES *et al.*, 2017; NASCIMENTO *et al.*, 2020; PEREIRA *et al.*, 2016; ZAYED; ARIDA, 2013). Nesses métodos eletroanalíticos reportados para a detecção da AMI, diferentes eletrodos de trabalho foram utilizados, como: um eletrodo de grafite modificado ds-

DNA (MIRMOMTAZ; ENSAFI; SOLEIMANIAN-ZAD, 2009); eletrodo de carbono impresso (SPE, do inglês, *screen-printed electrodes*) (KHORSHEH; KHAIRY; BANKS, 2019); eletrodo de carbono vítreo (GCE, do inglês, *glassy carbono electrode*) não modificado (NASCIMENTO *et al.*, 2020); GCE modificado com filme de nanotubo-nanocompósito de Nafion-carbono (DESAI; SRIVASTAVA, 2012), eletrodo de pasta de carbono (ZAYED; ARIDA, 2013); eletrodos de gota de mercúrio suspenso (HMDE, do inglês *Hanging Mercury Drop Electrode*) (EL-HEFNAWY *et al.*, 2004; HAMMAM, 2004); e dois trabalhos com eletrodo de diamante dopado com boro (BDDE, do inglês *Boron-Doped Diamond Electrode*) (MORAES *et al.*, 2017; PEREIRA *et al.*, 2016). Entre todos esses eletrodos usados para detectar a AMI, o BDDE é destacado devido sua alta estabilidade e ampla janela de potencial.

Um dos trabalhos reportados para determinar AMI, usou o BDDE acoplado ao sistema de análise de injeção em batelada com detecção por amperometria de múltiplos pulsos (PEREIRA *et al.*, 2016). O outro trabalho utilizou o BDDE com voltametria de onda quadrada para detectar a AMI (MORAES *et al.*, 2017). No entanto, nesses dois trabalhos, as aplicações das técnicas foram apenas para determinação da AMI em amostras de formulações farmacêuticas. Além disso, nessas aplicações, os autores não exploraram toda janela de potencial do BDDE, não sendo observado todos processos redox da AMI. Por outro lado, o presente trabalho também propõe o uso do BDDE para detectar a AMI, porém investigando todo potencial deste sensor associado à voltametria de redissolução catódica de onda quadrada (SWCSV- do inglês, *square wave cathodic stripping voltammetry*) para aplicação de um método simples e rápido de triagem em amostras de urina. As próximas seções irão fazer uma breve descrição teórica das técnicas utilizadas neste trabalho, bem como do sensor de BDDE.

1.5 Técnicas eletroquímicas

As técnicas eletroquímicas têm o potencial de fornecer informações fundamentais sobre as propriedades intrínsecas das substâncias. Estudos de oxidação e redução em vários meios, estudos de adsorção em superfícies e de mecanismos de transferência de elétrons, exemplificam algumas das suas aplicações (DESAI; SRIVASTAVA, 2012; SOUZA; MACHADO; AVACA, 2003). Estas técnicas relacionam os efeitos químicos que ocorrem na superfície de um eletrodo com a transferência de elétrons ou carga em uma célula eletroquímica. Isso possibilita o estabelecimento de relações diretas entre a concentração do

analito e alguma propriedade elétrica, como corrente, potencial, condutividade, resistência ou carga (BARD; FAULKNER, 2000; SOUZA; MACHADO; AVACA, 2003; WANG, 2001).

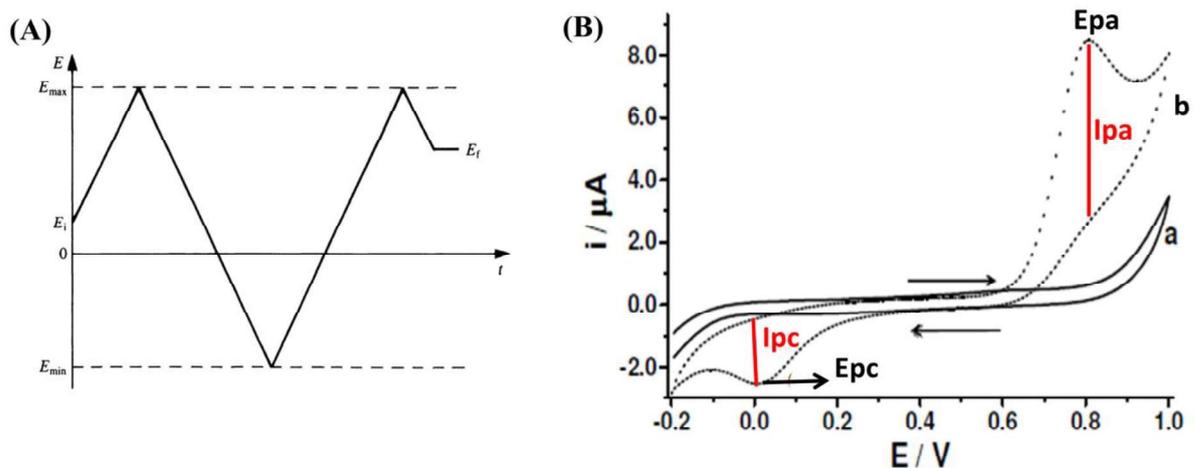
Essas técnicas apresentam ampla aplicabilidade em diversas áreas de análises como medicina, biologia molecular, bioquímica, química ambiental e físico-química (SOUZA; MACHADO; AVACA, 2003). A expansão dessa aplicabilidade está relacionada às inúmeras vantagens apresentadas, como: baixo custo da instrumentação e dos materiais utilizados, quando comparados às técnicas cromatográficas e espectroscópicas; simplicidade de aplicação; menor tempo de análise; possibilidade de automação e alta sensibilidade e seletividade. Além disso, uma grande vantagem apresentada por estas técnicas consiste na possibilidade das medidas serem realizadas praticamente direto na amostra, realizando, em geral, apenas uma diluição simples, sem a necessidade de etapas de pré-tratamento complexas e tediosas da amostra. Outra vantagem importante frente aos métodos espectrofotométricos, é possibilidade da análise de materiais coloridos ou amostras contendo partículas sólidas dispersas (DESAI; SRIVASTAVA, 2012; SOUZA; MACHADO; AVACA, 2003).

Dentre as técnicas eletroanalíticas, destaca-se a voltametria, onde as informações sobre o analito baseiam-se na medida de corrente, resultante de uma reação de oxidação ou redução, que é provocada por uma eletrólise aplicando uma diferença de potencial na superfície de um eletrodo de trabalho (sensor) em uma célula eletroquímica (BARD; FAULKNER, 2000; BRETT; BRETT, 1993; SKOOG *et al.*, 2007). A célula é constituída de três eletrodos imersos em uma solução contendo o analito e também um excesso de um eletrólito não reativo chamado de eletrólito de suporte. O eletrodo de trabalho, também denominado como sensor eletroquímico, é um dos três eletrodos onde o potencial varia linearmente com o tempo. Na superfície deste eletrodo é onde ocorre o processo de oxidação e/ou redução da espécie eletroativa da solução. O eletrodo de referência tem um potencial que permanece constante, sendo responsável por controlar o valor do potencial aplicado ao eletrodo de trabalho. O terceiro é um contra-eletrodo, também conhecido como eletrodo auxiliar, responsável por fechar o circuito e manter o eletrodo de trabalho no potencial aplicado durante as análises. Na célula, a corrente flui entre o eletrodo de trabalho e o eletrodo auxiliar (SKOOG *et al.*, 2007). As técnicas voltamétricas que foram utilizadas neste trabalho serão discutidas em seguida.

1.5.1 Voltametria cíclica

A voltametria cíclica (CV, do inglês *Cyclic Voltammetry*) é uma técnica eletroanalítica importante e amplamente utilizada. Sua principal utilização se dá no sentido de gerar informações qualitativas sobre os processos eletroquímicos. Com esta técnica é possível avaliar os estudos das reações redox, a detecção de intermediários de reação e a observação e acompanhamento de reações envolvendo produtos formados nos eletrodos. A técnica consiste de aplicação de potencial em uma direção até atingir um vértice, que em seguida inverte-se a varredura na direção contrária, enquanto a corrente é medida em todo momento no eletrodo de trabalho. A resposta da corrente que é medida em um eletrodo é excitada na forma de uma onda triangular (Figura 2A). A onda triangular produz a varredura no sentido direto e depois no sentido inverso. O potencial onde ocorre a reversão é chamado potencial de inversão. A varredura para potências mais positivos é denominada varredura anódica e para potências mais negativos, que é conhecida como varredura catódica (SKOOG *et al.*, 2007). O gráfico gerado por esse sinal de excitação é dado por corrente versus a varredura do potencial, chamado de voltamograma, sendo um modelo deste representado na Figura 2B.

Figura 2 - (A) Variação do potencial aplicado com o tempo. E_i = potencial inicial, E_f = potencial final, E_{max} = potencial máximo, E_{min} = potencial mínimo. A taxa de varredura $|dE/dt| = v$. **(B)** Voltamograma representativo de processo de oxidação e redução quase-reversível para paracetamol em eletrodo de ouro. E_{pa} = potencial de pico anódico, E_{pc} = potencial de pico catódico, I_{pa} = corrente de pico anódico e I_{pc} = corrente de pico catódico.



Fonte: adaptado de (BRETT; BRETT, 1993; DOS SANTOS *et al.*, 2008).

Durante a varredura da CV, caso o analito possua eletroatividade, reações de oxidação e/ou redução irão ocorrer na superfície do eletrodo de trabalho, conforme mostrado no voltamograma em pontilhado na Figura 2B. Neste voltamograma é possível observar a

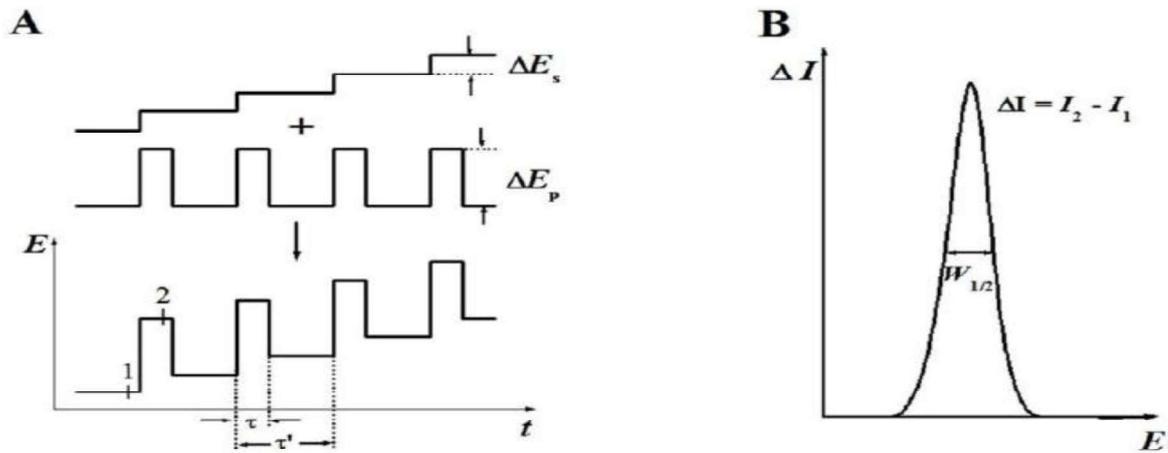
formação de um pico de oxidação à medida que o potencial se desloca no sentido anódico (valores mais positivos). Da mesma forma, no sentido catódico (valores mais negativos) observa-se a formação de um pico de redução. A corrente medida aumenta até atingir uma corrente de pico (I_p), tanto para o pico anódico (I_{pa}), quanto para o catódico (I_{pc}), depois esta cai por esgotamento do analito na superfície do eletrodo de trabalho. As I_p são geradas nos seus respectivos potenciais de pico (E_p), anódico (E_{pa}) e catódico (E_{pc}). Cabe ressaltar que são registradas duas correntes nos voltamogramas, a corrente capacitiva e a corrente faradaica. A primeira está relacionada com uma corrente de carga residual do sistema, resultante do carregamento da dupla camada elétrica na interface eletrodo/solução sem a ocorrência de qualquer processo de oxidação/redução. A segunda está relacionada com a transferência de elétrons resultante dos processos de oxidação e redução na célula eletroquímica (SKOOG *et al.*, 2007).

Analisando a CV é possível obter informações do comportamento eletroquímico e outros parâmetros do composto em estudo, bem como realizar a quantificação do analito, uma vez que a corrente gerada é proporcional à concentração do analito na célula eletroquímica. No entanto, devido à contribuição da corrente capacitiva, a CV não possui grande sensibilidade, sendo mais utilizada para análises qualitativas. Todavia, outras técnicas mais sensíveis de voltametria são atualmente usadas para determinação e quantificação de compostos eletroativos, as quais são abordadas neste trabalho e apresentadas a seguir.

1.5.2 Voltametria de pulso diferencial

A voltametria de pulso diferencial (DPV, do inglês *Differential Pulse Voltammetry*) consiste de aplicação de pulsos de potencial de igual amplitude (ΔE_p) sobre uma varredura em forma de escada com incremento (ΔE_s) em intervalos de tempo. As medidas de corrente são feitas de forma alternada, uma antes da aplicação do pulso (I_1), corrente capacitiva, e outra imediatamente após o final do pulso (I_2), corrente faradaica (Figura 3A). A diferença da corrente de pulso é registrada em função do aumento linear da voltagem resultando em uma curva diferencial com um pico. A Figura 3B representa o voltamograma de pulso diferencial gerado, mostrando um pico de forma gaussiana, onde é possível observar que este apresenta melhores definições se comparado aos gerados pela CV. A altura do pico é diretamente proporcional à concentração do analito em estudo (BARD; FAULKNER, 2000; BRETT; BRETT, 1993; SKOOG *et al.*, 2007).

Figura 3 - (A) sinal de excitação para DPV e (B) curva diferencial.



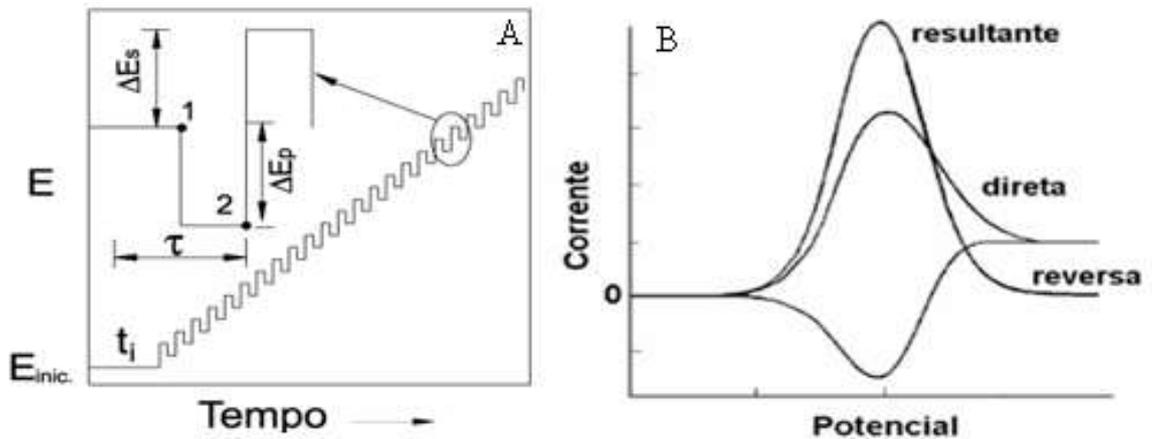
Fonte: Adaptado (BRETT; BRETT, 1993).

Esta técnica tem como vantagem maior sensibilidade quando comparado à CV e apresenta limites de detecção significativamente menores. Esse fato é devido à melhora na obtenção da corrente faradaica, uma vez que após aplicação do pulso de potencial, a corrente faradaica decai menos que a corrente capacitiva, gerando uma maior diferença entre as correntes medidas (BARD; FAULKNER, 2000; BRETT; BRETT, 1993; SKOOG *et al.*, 2007).

1.5.3 Voltametria de onda quadrada

A voltametria de onda quadrada (SWV, do inglês *Square Wave Voltammetry*) consiste na aplicação de uma variação de potencial (ΔE_p) na forma de onda sobreposto a uma rampa de potencial na forma de escada de altura constante (ΔE_s) (Figura 4A). As correntes elétricas são medidas no final do pulso direto (1- catódico) e reverso (2- anódico), resultando em um pico de sinal obtido diferencialmente. O gráfico, ou voltamograma gerado por esse sinal de excitação, é dado por corrente versus a varredura do potencial, sendo um modelo deste representado na Figura 4B (BARD; FAULKNER, 2000; BRETT; BRETT, 1993; SKOOG *et al.*, 2007; SOUZA; MACHADO; AVACA, 2003).

Figura 4 - (A) sinal de excitação da SWV e (B) representação esquemática de um voltamograma de onda quadrada de um sistema reversível.



Fonte: SOUZA, MACHADO e AVACA, 2003.

Conforme demonstrado na Figura 4B, nesta técnica é obtido como resposta três tipos de curva: a corrente I_1 , registrada no final do pulso direto (corrente direta), a corrente I_2 , registrada no final do pulso reverso (corrente reversa) e a corrente total ΔI (corrente resultante) que corresponde à diferença entre essas duas anteriores. A corrente I_2 possui sinal contrário a I_1 , logo, a diferença entre as duas correntes resulta, no final, em uma somatória. (SOUZA; MACHADO; AVACA, 2003).

A SWV apresenta as seguintes vantagens em comparação às outras técnicas de pulso: elevada sensibilidade, onde há excelente discriminação entre a corrente capacitiva e a corrente faradaica; rápido tempo de análise, uma vez que os experimentos podem ser executados em alta velocidade de varredura e baixo consumo de espécies eletroativas. Além disso, enquanto na DPV um ciclo é caracterizado por um único pulso, na SWV ele é caracterizado por dois ciclos, onde a medida da corrente é feita no final do primeiro pulso e no final do segundo pulso. Com isso, em processos de oxirredução reversíveis, a SWV se apresenta mais sensível, visto que a resultante das correntes é a somatória da corrente direta e da reversa levando a um aumento de intensidade de sinal (SKOOG *et al.*, 2007; SOUZA; MACHADO; AVACA, 2003).

1.5.4 Voltametria de redissolução

As técnicas de redissolução (do inglês, *stripping*) consistem em uma etapa de pré concentração quantitativa do analito no eletrodo de trabalho seguida de uma etapa de detecção

voltamétrica. Inicialmente o analito é depositado na superfície do eletrodo e, após determinado tempo de eletrodeposição, aplica-se um procedimento voltamétrico. Nesta segunda etapa o analito é retirado ou redissolvido do eletrodo. Como consequência, há maior aumento da corrente medida com diminuição significativa dos limites de detecção alcançados para estas substâncias, já que a etapa de eletrodeposição concentra o analito e permite a determinação de quantidades bastante baixas (SKOOG *et al.*, 2007).

As principais técnicas que se utilizam de processos de pré-concentração são: stripping voltamétrico anódico e stripping voltamétrico catódico. Nos métodos de stripping anódico, o eletrodo de trabalho funciona como um cátodo durante a etapa de deposição e como um ânodo, na etapa de redissolução, com o analito sendo oxidado de volta à sua forma original. Em um método de stripping catódico, o eletrodo funciona como um ânodo durante a etapa de deposição e como um cátodo, na de redissolução. A pré-concentração pode ser realizada por adsorção ou aplicando-se um potencial de deposição.

Nos métodos de stripping adsorptivo (AdSV, do inglês, *adsorptive stripping voltammetry*) ocorre uma adsorção física do analito na superfície do eletrodo de trabalho. Após o acúmulo, o material depositado é determinado por medidas voltamétricas e então, redissolvido para a solução. Estes métodos são bastante similares aos de stripping anódico e catódico e podem também ser associados, ou seja, se uma molécula é adsorvida e seu produto gerado é usado para detecção, tem-se uma voltametria de redissolução adsorptiva catódica (ou anódica).

O presente trabalho utiliza a técnica de SWCSV onde o analito alvo é pré-acumulado por eletrodeposição e posteriormente redissolvido para a solução através da varredura catódica de onda quadrada. É importante destacar que para o aumento na magnitude de corrente e, conseqüentemente, um ganho de sensibilidade, o potencial aplicado no eletrodo de trabalho e o tempo desta aplicação, precisam ser avaliados e otimizados.

1.6 Eletrodo de Diamante Dopado com Boro

O diamante é um isolante elétrico, porém pode suportar campos elétricos muito intensos, sendo assim, um material atraente para ser utilizado em aplicações eletrônicas, principalmente quando se torna condutor pela introdução de portadores de carga. O boro pode ser incorporado ao diamante para produzir um material semiconductor e vem sendo um dos mais utilizados, onde os níveis de dopagem podem variar de 10 a 20000ppm (SALAZAR-BANDA *et al.*, 2006). As características semicondutoras fornecidas ao diamante permitiram o

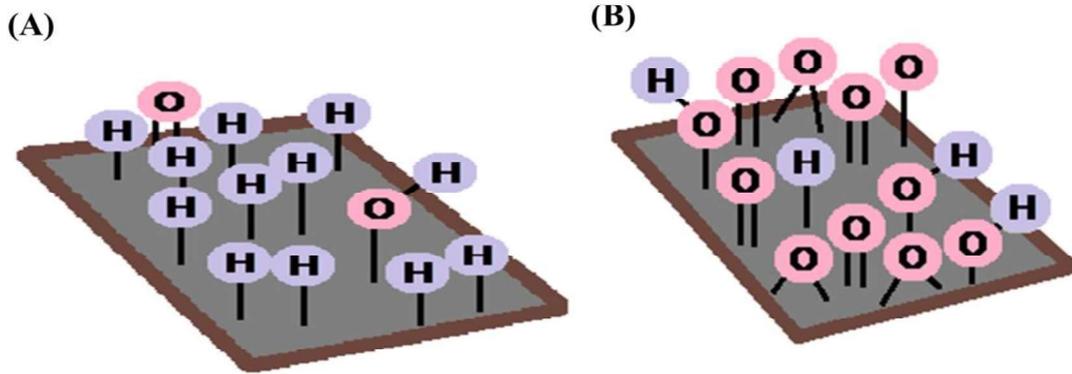
seu uso em diferentes áreas, incluindo o desenvolvimento de eletrodos para aplicações eletroquímicas. O BDDE tem sido extensivamente estudado e utilizado em diversas áreas da eletroquímica nos últimos anos. Este fato é devido às suas propriedades favoráveis (LOURENCAO *et al.*, 2020; SALAZAR-BANDA *et al.*, 2006; SOUSA *et al.*, 2019), como:

- ampla janela de potencial que permite a investigação de numerosas espécies eletroativas em potenciais altamente catódicos ou anódicos;
- baixa capacitância da dupla camada, juntamente com uma baixa corrente de fundo, resultando em relações sinal-ruído favoráveis para uma detecção de alta sensibilidade;
- resistência à espécies adsorventes, tornando-os altamente resistentes à incrustação na superfície do eletrodo que, conseqüentemente, aumenta a estabilidade da reposta eletroquímica no BDDE;
- cinética de transferência de carga rápida para muitos sistemas redox e,
- estabilidade microestrutural sob condições adversas, quando comparadas à maioria dos eletrodos sólidos.

Estas características tornam o BDD um material de eletrodo muito atraente e versátil para aplicações analíticas.

Cabe ressaltar que, o uso do BDDE em eletroanálise é dependente das suas propriedades físicas, químicas e eletrônicas. Essas propriedades são comumente afetadas pela quantidade e tipo de dopante, fatores morfológicos e defeitos no filme, presença de impurezas (carbono sp^2), orientação cristalográfica e terminação de superfície (hidrogênio ou oxigênio). Esta terminação superficial pode ser gerada usando tratamentos eletroquímicos de redução ou de oxidação (OLIVEIRA; OLIVEIRA-BRETT, 2010; SALAZAR-BANDA *et al.*, 2006). Dessa forma o tratamento da superfície do BDDE pode ser catódico ou anódico. No tratamento catódico, ocorre a redução da água fazendo com que a superfície do eletrodo apresente terminações em hidrogênio, conforme evidenciado na Figura 5A. Já no tratamento anódico, ocorre a oxidação da água fazendo com que a superfície do eletrodo apresente terminações em oxigênio conforme evidenciado na Figura 5B (SALAZAR-BANDA *et al.*, 2006).

Figura 5 - Superfície do eletrodo BDD após tratamento (A) Catódico e (B) Anódico.



Fonte: (SOUZA, 2018).

A terminação superficial é o fator mais complexo que pode influenciar na resposta eletroquímica do BDDE. Se por um lado o eletrodo constituído por terminações superficiais de hidrogênio apresenta caráter hidrofóbico, afinidade eletrônica negativa e alta condutividade, por outro, as terminações superficiais em oxigênio possuem natureza hidrofílica, apresenta afinidade eletrônica positiva e tem baixa condutividade (OLIVEIRA; OLIVEIRA-BRETT, 2010; SOUSA *et al.*, 2019).

A literatura relata muitos trabalhos utilizando o tratamento anódico para polarização do BDDE. No entanto, estudos realizados por Oliveira e Oliveira-Brett (2010), sobre o efeito causado pelo pré-tratamento eletroquímico catódico sobre a resposta eletroquímica do BDDE, demonstraram, através de CV, DPV e espectroscopia de impedância eletroquímica, superioridade do BDDE após tratamento catódico frente à polarização anódica. A interação e adsorção das espécies eletroativas na superfície do BDDE pré-tratada catodicamente é facilitada pela maior condutividade do BDDE (maior velocidade de transferência de carga). O BDDE pré-tratado anodicamente é influenciado pela adsorção de radicais hidroxilas durante o tratamento, logo a superfície não se encontra completamente inerte levando uma queda na resposta (OLIVEIRA; OLIVEIRA-BRETT, 2010).

Os pré-tratamentos eletroquímicos adequados podem ser uma forma de obter propriedades de detecção mais adequadas como, por exemplo, maior intensidade do sinal, melhor definição do pico e/ou deslocamento benéfico do potencial redox. Dessa forma, uma comparação entre a resposta eletroquímica do eletrodo pre-tratado catodicamente e do eletrodo pré-tratado anodicamente deve ser feita a fim de obter as melhores condições para detecção dos analitos eletroativos no BDDE (LOURENCAO *et al.*, 2020).

Dessa forma, considerando todas as propriedades abordadas, o presente trabalho apresenta o desenvolvimento de um método para determinação seletiva da AMI usando SWCSV em BDDE para aplicação em amostras de urina.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Desenvolver um método eletroanalítico simples, rápido e de baixo custo para determinação sensível e seletiva da AMI em amostras de urina para controle de *doping* usando BDDE.

2.2 Objetivos específicos

- Investigar o comportamento eletroquímico da AMI no BDDE em diferentes eletrólitos e pH por CV;
- Escolher o melhor pH e eletrólito para detectar a AMI;
- Otimizar as técnicas voltamétricas pulsadas, DPV e SWV, a fim de escolher a melhor técnica para determinação da AMI;
- Otimizar os parâmetros analíticos como, limite de detecção (LOD), limite de quantificação (LOQ), linearidade, reprodutibilidade e repetibilidade para determinação da AMI;
- Realizar estudos de adição e recuperação para avaliar os efeitos de matriz, bem como investigar os possíveis interferentes nas amostras de urina;
- Determinar o número de elétrons envolvidos nas reações da AMI utilizando BDDE e investigar os respectivos mecanismos.
- Aplicar o método desenvolvido em amostras reais de urina.

3 PARTE EXPERIMENTAL

3.1 Reagentes e soluções

Os reagentes utilizados no preparo das soluções de analitos e eletrólitos suporte foram de grau analítico com pureza superior a 99 %. As soluções foram preparadas utilizando água deionizada obtida pelo sistema de purificação Mili-Q plus (Millipore), cuja resistividade foi igual ou superior a 18,2 MΩ cm. AMI foi obtida da Sigma-Aldrich (Lancashire, Reino Unido). A solução estoque de AMI a 10^{-2} mol L⁻¹ foi preparada em metanol de grau HPLC e então diluída nos eletrólitos de suporte estudados neste trabalho.

O estudo de pH entre 2 a 12 foi conduzido em soluções tampão B-R, conforme procedimento de preparação descrito por Fatibello-Filho (2016) para obtenção de uma força iônica (0,1 M) constante em todos pHs avaliados. Os reagentes utilizados na preparação deste tampão foram ácido acético, ácido bórico e ácido fosfórico adquiridos da Merck (Rio de Janeiro, Brasil) e o pH foi ajustado pela adição de uma solução de 1,0 mol L⁻¹ de hidróxido de sódio ou ácido clorídrico da Vetec (Duque de Caxias, Brasil). Outros reagentes para o estudo de eletrólito foram utilizados: ácido sulfúrico e ácido clorídrico da Dinâmica® (Diadema, Brasil). Ainda o ácido sulfúrico foi utilizado para tratamento e limpeza do BDDE.

Os estudos de interferência foram realizados na presença de ácido ascórbico (AA) e ácido úrico (AU), ambos da Sigma-Aldrich (Lancashire, Reino Unido). Os padrões AA e AU foram diluídos no eletrólito otimizado em concentrações de 1,0 a 1000 vezes maiores do que as soluções de AMI.

As amostras de urina humana foram coletadas de voluntários saudáveis em frasco coletor universal estéril e analisadas dentro de até 2 horas após coleta. Os frascos com as amostras foram envoltos de papel alumínio para evitar qualquer reação sensível à luz dos componentes da urina. Os voluntários não fizeram uso da AMI ou de qualquer outra medicação e nenhum procedimento adicional foi necessário. As urinas coletadas foram diluídas 10 vezes em eletrólito suporte otimizado para detecção pelo método proposto e utilizadas para estudos de adição e recuperação da AMI.

Um gás de nitrogênio puro foi borbulhado em todas as soluções estudadas por 5 minutos para remover o oxigênio antes das análises por CV.

3.2 Instrumentação

As medições eletroquímicas foram realizadas em um potenciostato/galvanostato PGSTAT 101 da Autolab (Eco Chemie, Holanda) (Figura 6) acoplado a um computador e controlado pelo software NOVA 2.1.

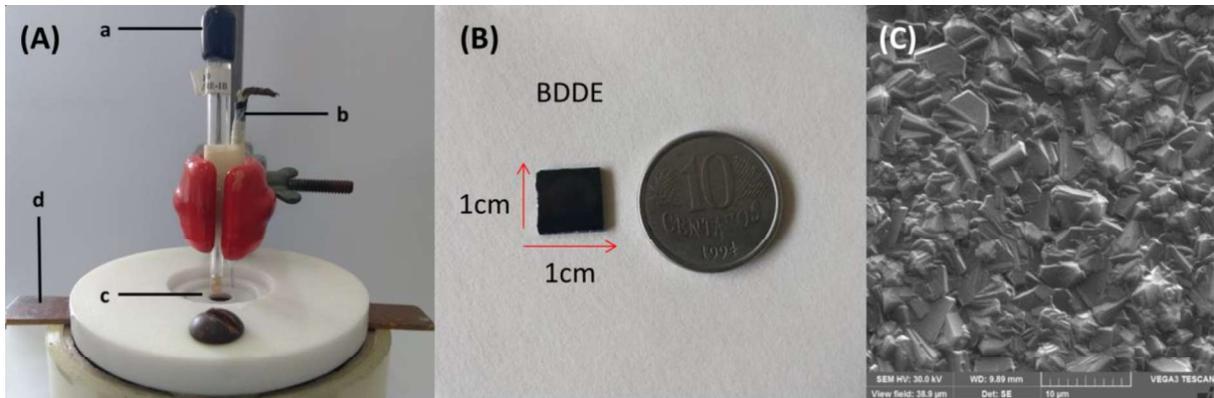
Figura 6 - Potenciostato/galvanostato Autolab/PGSTAT 101.



Fonte: Metrohm.

Os estudos voltamétricos foram realizados em uma célula eletroquímica contendo três eletrodos (Figura 7A), cujo compartimento tinha capacidade de volume de dois mililitros. Um eletrodo de Ag/AgCl (KCl_{sat}) (Figura 7A-a) e um fio de platina (Figura 7A-b) foram usados como eletrodos de referência e auxiliar, respectivamente. O eletrodo de trabalho utilizado foi uma placa (1 cm x 1 cm) contendo um filme de diamante dopado com boro com nível de dopagem de 8000 ppm (NeoCoat SA, La Chaux-de-Fonds, Suíça) (Figura 7A-c). A área de trabalho do eletrodo ($0,13 \text{ cm}^2$) foi definida pressionando a placa de diamante dopado com boro contra um O-ring (diâmetro de 0,4 cm de borracha adequada colocada em um orifício no fundo da célula). O contato elétrico do eletrodo de trabalho foi feito através de uma placa de cobre (Figura 7A-d). O eletrodo de trabalho de diamante dopado com boro pode ser melhor visualizado na Figura 7 B, assim como a morfologia de sua superfície obtida por microscópio eletrônico de varredura (MEV) na Figura 7 C.

Figura 7 - (A) Célula eletroquímica utilizada nos estudos contendo a) eletrodo de referência, b) eletrodo auxiliar, c) eletrodo de trabalho e d) placa de cobre. **(B)** Visualização do tamanho real da placa de BDDE em comparação a uma moeda. **(C)** Imagem obtida MEV da morfologia da superfície do BDDE usado neste trabalho.



Fonte: (A) (TEÓFILO, 2018).
(B) e (C): próprio autor.

A morfologia superficial do BDDE foi examinada usando um microscópio eletrônico de varredura da TESCAN modelo VEGA3 LMH (República Tcheca).

As análises dos produtos de eletrólise usados para determinação do mecanismo de oxirredução proposto neste trabalho foram realizadas por espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) em um espectrômetro da Varian modelo 640-IR.

3.3 Detecção eletroquímica

O comportamento eletroquímico da AMI em BDDE foi inicialmente investigado por CV em pH 2 a 12 utilizando o tampão B-R. Definido o pH que apresentava melhor sinal analítico, outros eletrólitos suporte foram testados e comparados. Foram também utilizadas soluções de ácido clorídrico e ácido sulfúrico.

Foi avaliado o efeito da ativação eletroquímica prévia da superfície do BDDE, cujo pré-tratamento catódico e anódico foram realizados. O BDDE foi pré-tratado catodicamente aplicando +0,001 A por 120 s e, em seguida, aplicou-se -0,030 A por 360 s em 0,5 mol L⁻¹ H₂SO₄. Para o tratamento anódico, o inverso foi realizado, aplicando primeiramente -0,030 A por 360 s seguido por +0,001 A por 120 s (SALAZAR-BANDA *et al.*, 2010). O melhor pré-tratamento foi escolhido em função da melhor resposta eletroquímica para detecção da AMI, considerando a sensibilidade e estabilidade do sinal obtido. O pré-tratamento do BDDE foi realizado antes do início de cada análise.

Para o comportamento eletroquímico da AMI em regiões mais catódicas foi utilizado um GCE modificado com filme de mercúrio. A superfície do GCE foi polida com alumina, lavada e sonificada por 60 segundos em metanol. O mercúrio foi depositado a partir de solução de Hg (II) $1,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ em tampão B-R $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 2 aplicando-se as seguintes condições: Potencial de deposição = - 1,0 V e tempo de deposição = 60 s.

Os parâmetros SWCSV foram otimizados para detecção de AMI estudando a variação da amplitude de 10–100 mV, escada de potencial (*step*) de 2–12 mV, frequência de 10–100 Hz, potencial de acumulação de 1,2–2,2 V e tempo de acumulação de 0–60 s.

As medidas voltamétricas foram realizadas em soluções desaeradas através de borbulhamento de gás nitrogênio por 5 min antes das análises por CV.

3.4 Estudos de repetibilidade e reprodutibilidade

Os estudos de repetibilidade e reprodutibilidade foram realizados usando três BDDEs diferentes, nos quais dez ($N= 10$) voltamogramas consecutivos de soluções padrão AMI foram registrados por SWCSV sem pré-tratamento do eletrodo de trabalho entre as medições. Os desvios padrão relativos (DPR) obtidos das correntes de pico de AMI foram calculados conforme a Equação 1:

$$\text{DPR} = \frac{s \times 100}{\bar{x}} \quad (1)$$

onde s é o desvio padrão e \bar{x} é a média das correntes de pico apresentadas em cada análise.

O mesmo BDDE também foi avaliado em dias diferentes com pré-tratamento catódico e anódico entre as medições ($N= 10$). O DPR também foi calculado para as correntes de pico da AMI.

3.5 Estudo de linearidade e sensibilidade

A curva analítica foi avaliada em triplicata para determinação da AMI após todas as otimizações dos parâmetros da SWCSV. A sensibilidade da metodologia foi obtida pela inclinação da regressão linear da curva de calibração analítica, sendo a partir desse valor realizado o cálculo do LOD e LOQ, conforme Equações 2 e 3, respectivamente.

$$\text{LOD} = \frac{3 \times s_b}{m} \quad (2)$$

$$\text{LOQ} = \frac{10 \times s_b}{m} \quad (3)$$

onde S_b é o desvio padrão do branco e m é o coeficiente angular da regressão obtida da curva analítica.

3.6 Estudos de adição e recuperação

Estudos de adição e recuperação foram realizados para determinação da AMI em amostras de urina. Volumes conhecidos de amostras padrão foram preparados em concentrações crescentes e adicionados às amostras de urina previamente diluídas no eletrólito suporte selecionado (10 vezes). Cada uma das soluções foi preparada e analisada em triplicata. A taxa de recuperação foi calculada a partir das correntes de pico geradas conforme equação abaixo:

$$\%_{REcuperação} = \frac{[A_D]-[A]}{[P_A]} \times 100 \quad (4)$$

onde A_d é a concentração da amostra dopada, A é a concentração da amostra e P_A é a concentração do padrão que foi adicionada na amostra.

3.7 Cálculo do número de elétrons

A fim de propor um mecanismo de oxirredução para todos os processos eletroquímicos da AMI apresentados no BDDE, foi investigada a relação do número de elétrons e prótons envolvidos em cada processo redox. O número de elétrons foi calculado usando curvas de Tafel corrigidas para transporte de massa e pela técnica de SWV, onde é possível estimar o valor do coeficiente de transferência de carga (α) na superfície do eletrodo de trabalho, de acordo com a Equação 5 abaixo (FATOUROS; KRULIC, 1998):

$$\alpha = \frac{1,7 RT}{w_{1/2} F} \quad (5)$$

onde R corresponde à constante dos gases ($8,314 \text{ J K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$), T à temperatura ($298,15 \text{ K}$), F é a constante de Faraday (96485 C mol^{-1}) e $w_{1/2}$ corresponde à largura do pico à meia altura, para o voltamograma de onda quadrada. A SWV foi realizada com parâmetros específicos: step de 5 mV , amplitude de 30 mV e frequência de 25 Hz (BARD; FAULKNER, 2000; BRETT; BRETT, 1993). O valor da largura do pico a meia altura encontrado foi substituído na Equação (5).

O gráfico de Tafel foi construído a partir de pontos obtidos na CV em baixa velocidade de varredura, 10 mV s^{-1} , com comportamento linear entre o logaritmo natural da

corrente versus o potencial. Diante do coeficiente angular da reta, este foi substituído na Equação 6 abaixo:

$$n = \frac{RTb}{\alpha F} \quad (6)$$

onde n corresponde ao número de elétrons, R a constante dos gases, T a temperatura, b é o coeficiente angular da reta de Tafel, α é o coeficiente de transferência de carga obtido pela Equação (5), e F a constante de Faraday.

3.8 Estudos de interferentes

A fim de determinar AMI em amostras de urina, foram avaliados os principais interferentes encontrados nesta amostra biológica, o AU e AA. Dessa forma, foram analisadas soluções de AMI na presença de AU e AA. As interferências foram avaliadas mantendo a concentração de AMI constante e aumentando as concentrações de AU ou AA (de 1 até 1000). A concentração de AU foi aumentada apenas até 100 vezes devido à sua baixa solubilidade no eletrólito suporte otimizado para detecção da AMI.

3.9 Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier

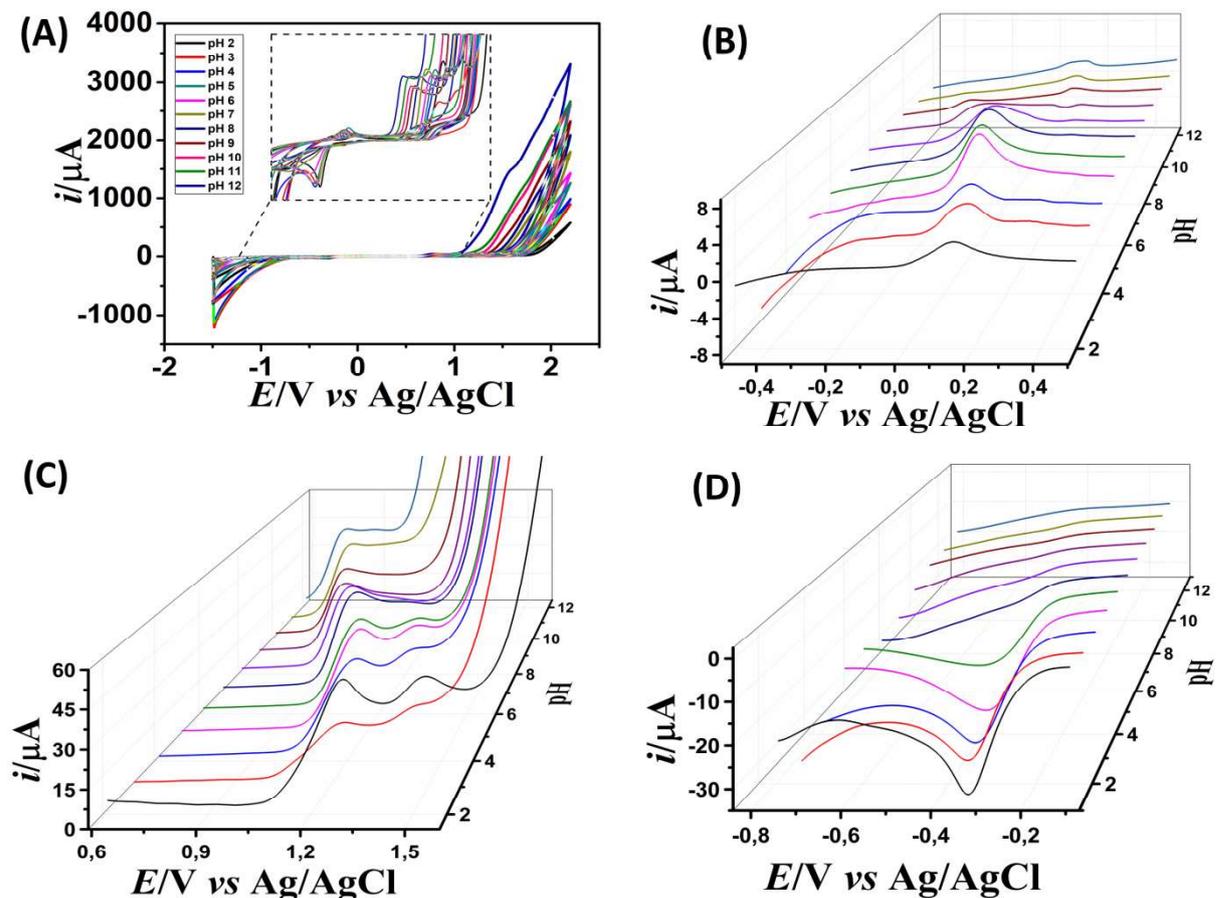
Os produtos dos processos de oxidação da AMI foram analisados usando FTIR. Uma eletrólise de solução de AMI foi realizada (após pré-tratamento catódico) usando a técnica de cronoamperometria com potenciais aplicados a +1,3 V ou a +1,8 V (vs Ag/AgCl), ambos por três horas. Os produtos de reação obtidos foram liofilizados e analisados. Os espectros de FTIR foram obtidos em peletes prensados de KBr (40,0 mg de KBr anidro) preparados com 1,0 mg do material sólido coletado (eletrolisado e liofilizado) ou com pó de padrão analítico AMI. Os espectros foram registrados na faixa espectral de 400 a 4000 cm^{-1} usando 4 cm^{-1} de resolução e 64 varreduras.

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 Comportamento eletroquímico da AMI

O comportamento eletroquímico da solução de $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ de AMI foi investigado por CV usando o BDDE em $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de soluções tampão B-R na faixa de pH de 2,0 a 12,0 (Figura 8A), cujo estudo mostrou que os processos eletroquímicos são dependentes do pH. No sentido de melhorar a visualização de cada processo redox da AMI nesse estudo de pH, recortes dos CV foram plotados para esses processos nas Figuras 8B, 8C e 8D.

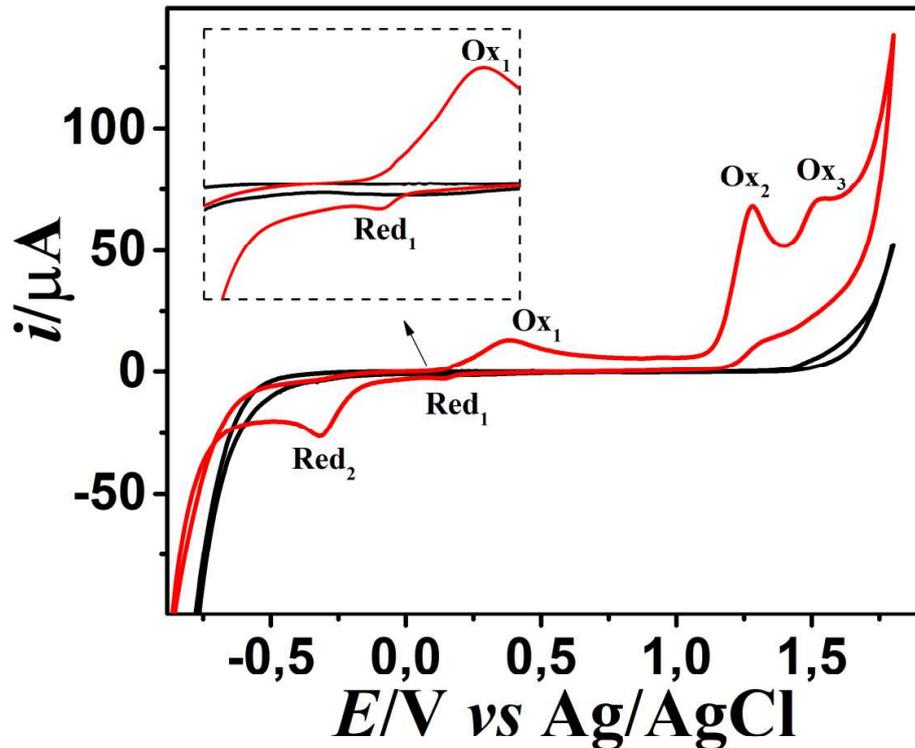
Figura 8 - Voltamogramas obtidos por CV de $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ AMI em soluções tampão B-R $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ com diferentes valores de pH no BDDE. Todos os potenciais de varreduras foram iniciados em $-1,5 \text{ V}$ na direção positiva para $+2,2 \text{ V}$ com uma taxa de varredura de 50 mV s^{-1} , onde os CVs completos são mostrados em (A) e a inserção é um zoom dos processos redox da AMI. Para uma melhor visualização desses processos eletroquímicos, as linhas dos CVs foram recortadas e plotadas separadamente em torno de $+0,3 \text{ V}$ (B); $+1,3 \text{ V}$ e $+1,5 \text{ V}$ (C); e $-0,3 \text{ V}$ (D).



Como pode ser visto na Figura 8A, devido à ampla janela de potencial estudada no BDDE neste estudo de pH (1,5 V a 2,2 V), as altas correntes capacitivas geradas nas descargas da água, tanto na sua oxidação quanto na redução, dificultaram a visualização dos processos faradaicos da AMI no BDDE. Dessa forma, inserido na Figura 8A, pode ser visto a ampliação para mostrar a região de potencial dos processos eletroquímicos do analito. É possível observar a formação de quatro processos. O primeiro processo, melhor visualizado na Figura 8B, é uma oxidação por volta de +0,3V que teve sua corrente de pico aumentada conforme foi aumentando o valor de pH. Esse aumento se deu do pH 2,0 ao pH 9,0, sendo diminuído no pH 10 e não mais aparecendo no pH 11 e 12. Ainda, pode-se observar um leve deslocamento dos potenciais de pico para potenciais mais negativos à medida que o pH foi aumentando. Posteriormente, dois processos de oxidação são visualizados, um por volta de +1,3V e ou outro por volta de +1,5V, conforme demonstrado na Figura 8C. Essas oxidações apresentaram melhores definições de pico em pH mais ácidos, quando, a partir do pH 8, não se consegue ter uma boa separação dos mesmos, se apresentando apenas como um pico após o pH 9. Nestes dois processos também há a influência do pH nos potenciais de pico, sendo estes deslocado para esquerda, ou seja, também no sentido de potenciais mais negativos. O quarto processo eletroquímico visualizado neste estudo é um processo de redução por volta de -0,3 V, melhor representado pela Figura 8D. Neste processo, os picos apresentaram maiores correntes e melhores definições em baixos pH, de 2 a 5. A partir do pH 6 não é possível visualizar mais nenhum processo de redução ocorrendo para a AMI. Da mesma forma que os outros processos eletroquímicos, também há influência do pH nos potenciais de pico, sendo estes deslocados levemente para potenciais mais negativos com o aumento do pH.

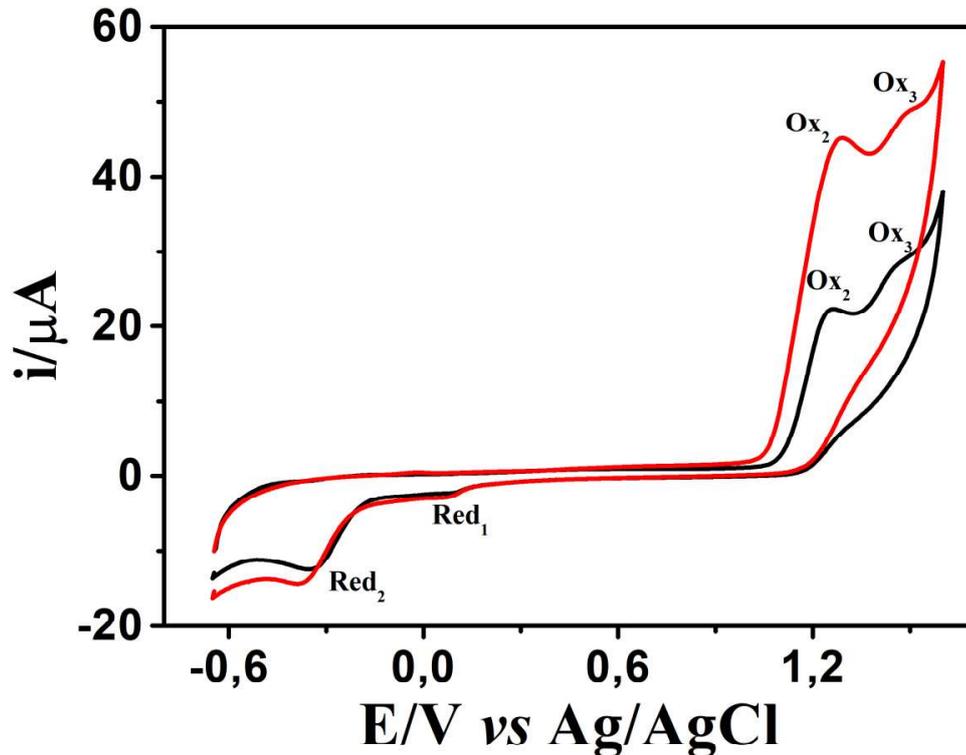
Devido ao objetivo de detectar a AMI em amostras de urina e sabendo que nesta matriz biológica há sempre a presença de dois compostos eletroativos, AA e AU, foi escolhido, para a detecção, um processo de redução deste composto no BDDE. Isso porque, o AA e AU possuem processos de oxidação bem definidos em diferentes sensores eletroquímicos, tal como no BDDE (LIMA *et al.*, 2018). Deste modo, o pH 2,0 foi escolhido devido às correntes de pico mais altas e bem definidas para um processo de redução da AMI em torno de -0,3 V. O CV da AMI no BDDE em 0,1 mol L⁻¹ solução tampão B-R em pH 2,0 é mostrado, separadamente, na Figura 9.

Figura 9 - CV obtido no BDDE em $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ tampão B-R pH 2,0 sem (linha preta) e com adição de $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ AMI (linha vermelha). Todos os potenciais de varreduras foram iniciados em $-1,5 \text{ V}$ na direção positiva com uma taxa de varredura de 50 mV s^{-1} . A inserção é um zoom para mostrar um ligeiro processo de redução da AMI em torno de $+0,15 \text{ V}$.



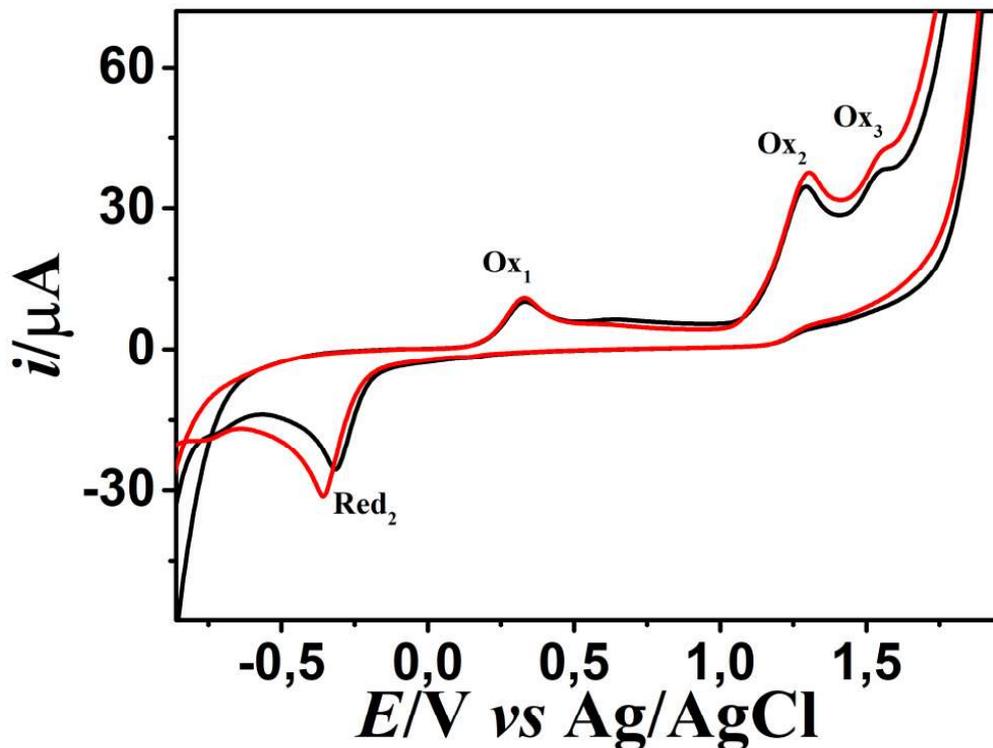
A Figura 9 mostra cinco processos eletroquímicos para AMI no BDDE em solução tampão BR pH 2,0, dos quais três são processos de oxidação em torno de $+0,3 \text{ V}$ (Ox_1), $+1,3 \text{ V}$ (Ox_2) e $+1,5 \text{ V}$ (Ox_3), e dois são processos de redução em torno de $+0,2 \text{ V}$ (Red_1) (melhor notado na inserção da Figura 9) e em $-0,3 \text{ V}$ (Red_2). Outros eletrólitos suporte em meios mais ácidos formam também avaliados com o intuito de buscar as melhores condições eletrolíticas para detectar a AMI no BDDE. No entanto, em meio de ácido sulfúrico, em concentração superior a $0,01 \text{ mol L}^{-1}$, independentemente do meio ácido, $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ de AMI precipitou nestas soluções. Enquanto na presença de ácido clorídrico $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ nenhuma precipitação foi observada após a adição de $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ de AMI. Esse fenômeno provavelmente ocorreu devido à precipitação de um sal da AMI com o sulfato, uma vez que houve precipitação também da AMI quando foi adicionada em $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de solução de sulfato de sódio, mesmo em meio ácido com adição de ácido clorídrico $0,1 \text{ mol L}^{-1}$. De qualquer forma, os voltamogramas realizados em meio de ácido clorídrico não apresentaram picos definidos da AMI. Assim, um outro eletrólito suporte em pH 2,0 foi avaliado, como a solução tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, conforme mostrado na Figura 10.

Figura 10 - CVs de solução AMI $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 2,0 (linha preta) e tampão B-R $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 2,0 (linha vermelha) no BDDE. Taxa de varredura: 50 mV s^{-1} . Todos os potenciais de varreduras foram iniciados em $-0,6 \text{ V}$ na direção positiva.



A Figura 10 demonstra que em pH 2,0 usando o tampão fosfato (voltamograma em preto) as I_p foram inferiores quando comparadas às obtidas no tampão B-R (voltamograma em vermelho), principalmente, para os processos Ox₂ e Ox₃ da AMI. No processo de interesse para detectar a AMI, o Red₂, o tampão B-R mostrou que I_{pc} também foi ligeiramente superior, justificando sua escolha e utilização nos próximos estudos como eletrólito suporte para determinar esse diurético em urina. Cabe mencionar que, o primeiro processo de oxidação da AMI (Ox₁) não foi notado em ambos eletrólitos. O motivo da ausência deste processo eletroquímico foi devido à menor janela de potencial avaliada no BDDE nesse estudo mostrado na Figura 10. O entendimento desse comportamento eletroquímico e dos demais processos relacionados à AMI são abordados posteriormente e a avaliação dos diferentes pré-tratamentos (catódicos ou anódicos) do BDDE utilizando CV em solução tampão BR pH 2,0 (Figura 11).

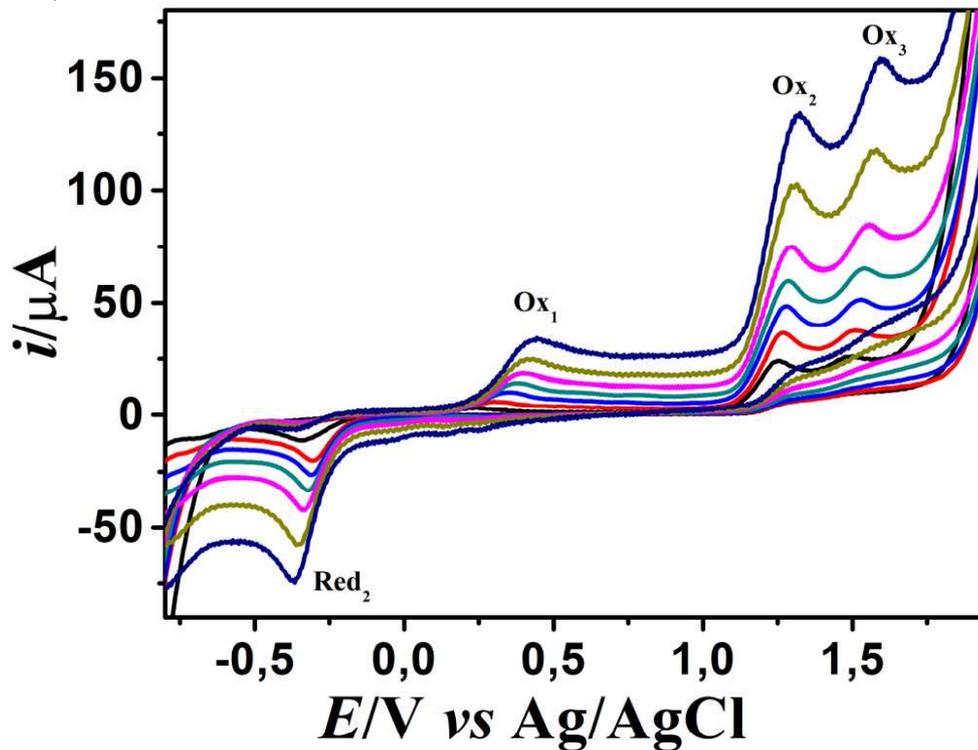
Figura 11 - CVs da solução de AMI a $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ em tampão B-R $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 2,0 após pré-tratamento catódico (linha preta) e anódico (linha vermelha) do BDDE. Taxa de varredura 50 mV s^{-1} . Todos os potenciais de varreduras foram iniciados em $-1,5 \text{ V}$ na direção positiva para $+2,2 \text{ V}$.



Apesar do CV apresentado na Figura 11 ter sido recortado para melhor visualização dos processos redox da AMI, é possível notar que o potencial do início de varredura na CV foi realizado em um valor que $-1,0 \text{ V}$ e, nesse caso, o Ox_1 é novamente observado no BDDE. Em relação ao comportamento eletroquímico da AMI em função dos pré-tratamentos do BDDE, há uma pequena diferença na I_p para os processos redox da AMI em Ox_2 e Ox_3 e uma diferença um pouco mais significativa na I_{pc} na Red_2 . Embora, o pré-tratamento anódico tenha mostrado um maior I_{pc} para detectar a AMI, o pré-tratamento catódico do BDDE foi selecionado devido a sua melhor estabilidade da resposta, como já demonstrado em outros trabalhos usando este eletrodo (BRETT; BRETT, 1993; MORAES *et al.*, 2017). Nesse trabalho também demonstramos, após otimização da técnica de SWV, que uma maior repetibilidade do sinal para detectar a AMI foi obtida usando o pré-tratamento catódico. A justificativa para maiores I_p para AMI no tratamento anódico do BDDE pode ser devido a melhor afinidade dessa molécula com as terminações de oxigênio geradas nesse tratamento.

O estudo da taxa de varredura também foi realizado pela técnica CV com o objetivo de avaliar o controle do transporte de massa da AMI no BDDE referente aos processos redox deste analito (Figura 12).

Figura 12 - CVs em diferentes velocidades de varredura (10 a 800 mV s^{-1}) para 1,0 mmol L^{-1} de AMI em 0,1 mol L^{-1} tampão BR pH 2,0 no BDDE. Todos os potenciais de varreduras foram iniciados em -1,5 V na direção positiva para 2,2 V.



Como pode ser visto na Figura 12, as I_p para todos os processos eletroquímicos de AMI aumentam com a velocidade de varredura no BDDE, mostrando também um ligeiro deslocamento dos E_p . Neste estudo, as I_p para os processos redox de AMI apresentaram um comportamento mais linear em relação à raiz quadrada da velocidade de varredura ($v^{1/2}$) (Figura 13) do que em função apenas de v (Figura 14), sugerindo que esses processos eletroquímicos são controlados por difusão no BDDE.

Figura 13 - Gráfico da corrente de pico (I_p) vs raiz quadrada da velocidade de varredura ($v^{1/2}$) obtida a partir da Fig. 12 para os processos eletroquímicos da AMI no BDDE: Ox₁ (A), Ox₂ (B), Ox₃ (C) e Red₂ (D).

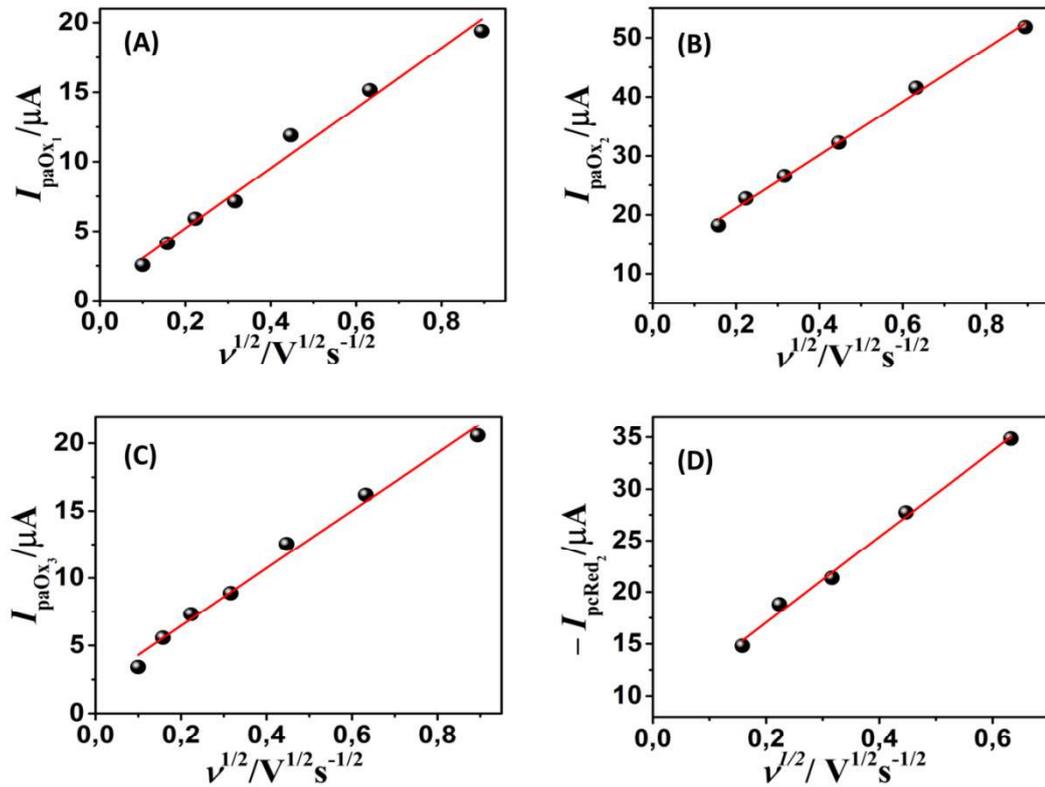
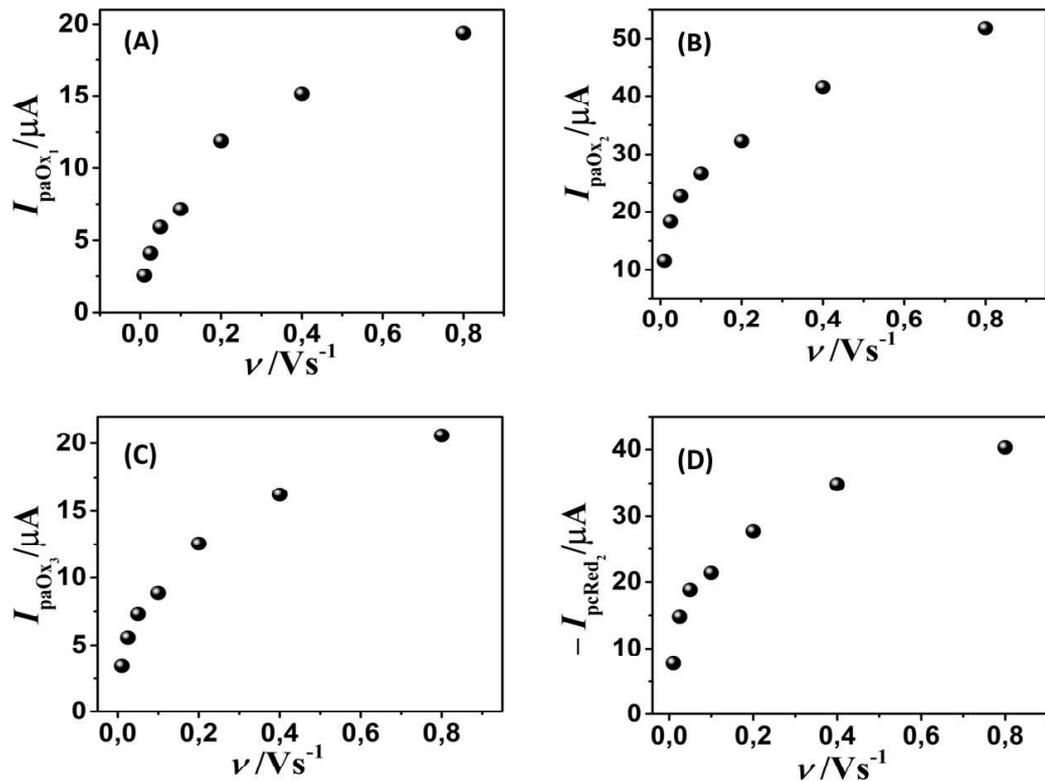


Figura 14 - Gráfico da corrente de pico (I_p) vs velocidade de varredura (v) obtida a partir da Fig. 12 para os processos eletroquímicos da AMI no BDDE: Ox₁ (A), Ox₂ (B), Ox₃ (C) e Red₂ (D).



Conforme observado no estudo de velocidade de varredura, os coeficientes de correlação lineares (r^2) dos gráficos I_p vs $v^{1/2}$ (Figura 13) foram melhores e todos maiores do que 0,99, cuja as regressões obtidas são dadas pelas seguintes equações:

$$I_{paOxi_1}(\mu A) = 0,89 (\pm 0,01) + 21,63 (\pm 0,01)v^{1/2} (mV s^{-1}) \quad (7)$$

$$I_{paOxi_2}(\mu A) = 1,21 (\pm 0,07) + 45,1 (\pm 1,3)v^{1/2} (mV s^{-1}) \quad (8)$$

$$I_{paOxi_3}(\mu A) = 2,16 (\pm 0,04) + 21,14 (\pm 0,09)v^{1/2} (mV s^{-1}) \quad (9)$$

$$I_{pcRed_2}(\mu A) = -8,73 (\pm 0,07) + 41,6 (\pm 1,8)v^{1/2} (mV s^{-1}) \quad (10)$$

No sentido de comprovar se o transporte de massa dessas reações redox da AMI é realmente controlado por difusão no BDDE, foram avaliados os gráficos de $\log I_p$ vs $\log v$ dos CVs, (Figura 15), os quais também mostram relações lineares ($r^2 > 0,99$), cujas regressões são dadas pelas seguintes equações:

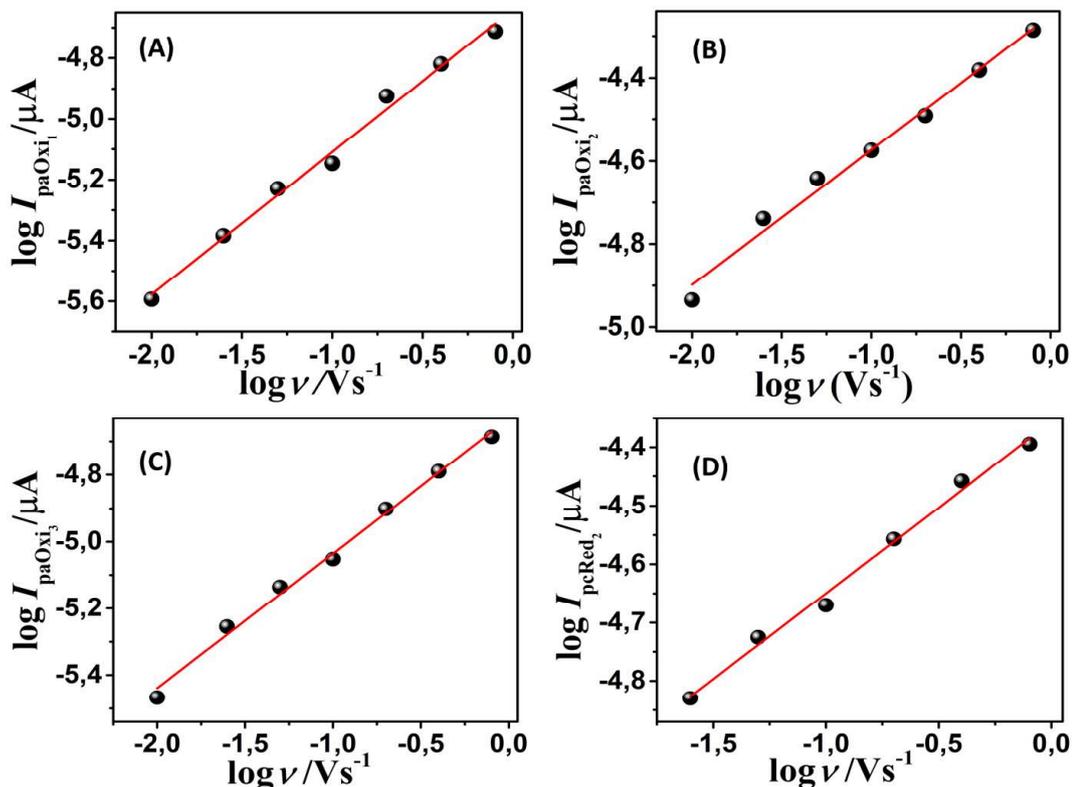
$$\log I_{paOxi_1}(\mu A) = -4,64 (\pm 0,02) + 0,47 (\pm 0,02) \log v (mV s^{-1}) \quad (11)$$

$$\log I_{paOxi_2}(\mu A) = -4,25 (\pm 0,02) + 0,38 (\pm 0,02) \log v (mV s^{-1}) \quad (12)$$

$$\log I_{paOxi_3}(\mu A) = -4,63 (\pm 0,02) + 0,41 (\pm 0,01) \log v (mV s^{-1}) \quad (13)$$

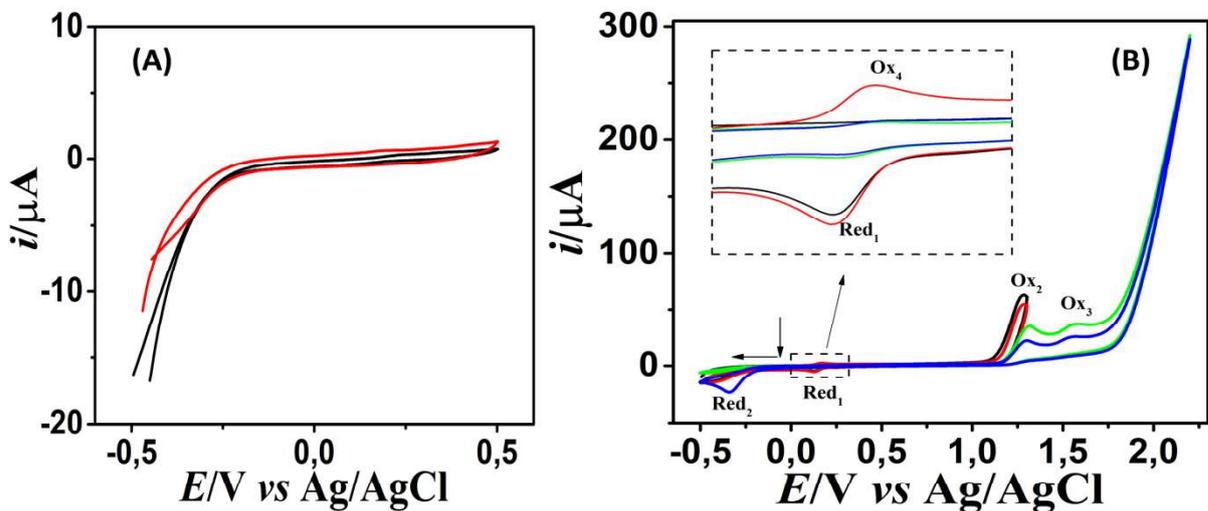
$$\log I_{pcRed_3}(\mu A) = -4,35 (\pm 0,01) + 0,30 (\pm 0,01) \log v (mV s^{-1}) \quad (14)$$

Figura 15 - Gráfico de $\log I_p$ vs $\log v$ obtido a partir da Figura 12 para os processos eletroquímicos da AMI no BDDE: Ox₁ (A), Ox₂ (B), Ox₃ (C) e Red₂ (D).



Os valores dos coeficientes angulares obtidos nas regressões lineares do estudo entre $\log I_p$ vs $\log \nu$ (Figura 15) são próximos a 0,5 para todos os processos redox da AMI no BDDE, corroborando e indicando que esses processos eletroquímicos são todos controlados por difusão (BRETT; BRETT, 1993). A dependência desses processos eletroquímicos da AMI no BDDE foi avaliada em varreduras sucessivas neste eletrodo com diferentes janelas de potencial (Figura 16).

Figura 16 - CVs registrados em BDDE em tampão B-R pH 2,0 com taxa de varredura: 50 mVs^{-1} com diferentes janelas de potencial em (A) de -0,5 V a +0,5 V sem (linha preta) e com adição de $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ AMI (linha vermelha) e em (B) de -0,6 V a 1,3 V para a primeira varredura (linha preta) e a segunda varredura (linha vermelha), além de -0,6 a 2,2 V para a primeira varredura (linha verde) e a segunda varredura (linha azul). A inserção é um zoom para mostrar claramente um processo de redução de AMI em torno de +0,15 V com seu processo redox reversível. Todas os potencias de varreduras se iniciaram em -0,5V no sentido catódico.



Nota-se na Figura 16A que quando o CV foi realizado na janela de potencial mais estreita, de -0,5 a +0,5 V, nenhum processo eletroquímico foi observado para AMI no BDDE em tampão B-R pH 2,0, indicando uma dependência do processo Ox_1 e dos processos Red_1 Red_2 com outros processos redox apresentados anteriormente para esta droga na Figura 9. Por outro lado, a Figura 16B mostra que as Red_1 e Red_2 da AMI são dependentes de Ox_2 e Ox_3 , respectivamente. A dependência da Red_1 pode ser confirmada quando a janela de potencial teve o potencial de inversão na CV no E_p da Ox_2 , uma vez que nessa condição o produto oxidado neste processo é agora reduzido e notado (Red_1), como pode ser melhor visualizado na ampliação do voltamograma em preto (para primeira varredura) na Figura 16B.

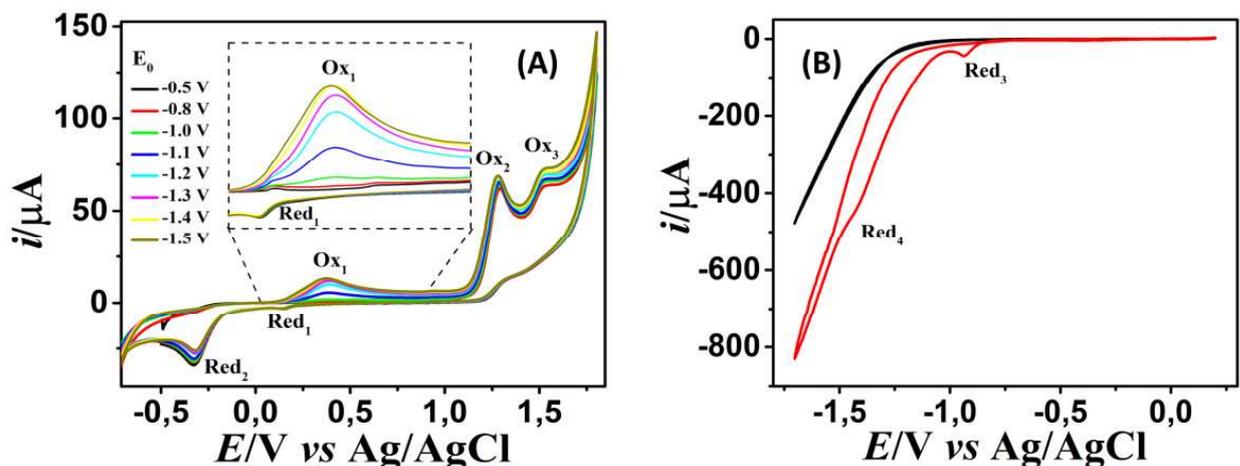
Além disso, nessa mesma janela de potencial, a inserção da Figura 16B mostra um novo processo de oxidação (Ox_4) em torno de +0,15 V para AMI na segunda varredura no BDDE (voltamograma em vermelho), indicando um processo eletroquímico reversível (Red_1/Ox_4) que está relacionado ao produto da redução gerada na Red_1 , visto que a Ox_4 só é

apresentada na segunda varredura. Na ampliação da Figura 16B, este processo reversível (Red_1/Ox_4) de AMI ($\Delta E_p = 30 \text{ mV}$) tem suas I_p mais nítidas quando o potencial de inversão na CV é finalizado no E_p da Ox_2 (em +1,3 V), indicando que na Ox_3 , provavelmente, ocorre a oxidação do produto gerada em Ox_2 , e assim, diminui a quantidade de espécies para o processo redox Red_1/Ox_4 .

Cabe destacar que a Red_2 não foi observada quando a janela de potencial teve o potencial de inversão finalizado no E_p da Ox_2 , tanto para primeira quanto para segunda varredura da CV. Dessa forma, a dependência da Red_2 pode ser relacionada ao processo Ox_3 , pois este processo somente foi exibido quando o potencial de inversão na CV foi finalizado após o Ox_3 (voltamograma em azul da Figura 16B). É importante mencionar que, o início da varredura foi realizado, primeiramente, sempre em direção à região catódica, conforme indicado pelas setas na Figura 16B, e por isso na primeira varredura (voltamograma em verde) a Red_2 não é apresentado, o que também confirma sua dependência de outros processos eletroquímicos no BDDE.

Por fim, é preciso novamente ressaltar que, nos estudos realizados na Figura 16, não foi observado o primeiro processo de oxidação da AMI (Ox_1) a +0,3 V no BDDE devido à menor janela catódica neste estudo (com potencial de inversão em -0,5 V). Desse modo, outras janelas de potenciais mais catódicas foram investigadas para avaliar a geração da Ox_1 usando o BDDE, bem como um GCE modificado com filme de mercúrio para verificar algum processo de redução da AMI em valores de potencial mais baixos do que -0,6 V (Figura 17).

Figura 17 - (A) CVs registrados em solução $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ AMI em tampão B-R $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 2,0 no BDDE. As varreduras foram iniciadas em diferentes potenciais (E_0 , de -0,5 a -1,5 V) na direção positiva com uma taxa de varredura de 50 mV s^{-1} . A inserção é um zoom para mostrar claramente o processo de oxidação de AMI em torno de +0,4 V. **(B)** CV obtido usando GCE com filme de mercúrio em tampão B-R $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 2 sem (linha preta) e com adição de $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ de AMI (linha vermelha). Taxa de varredura de 50 mV s^{-1} .

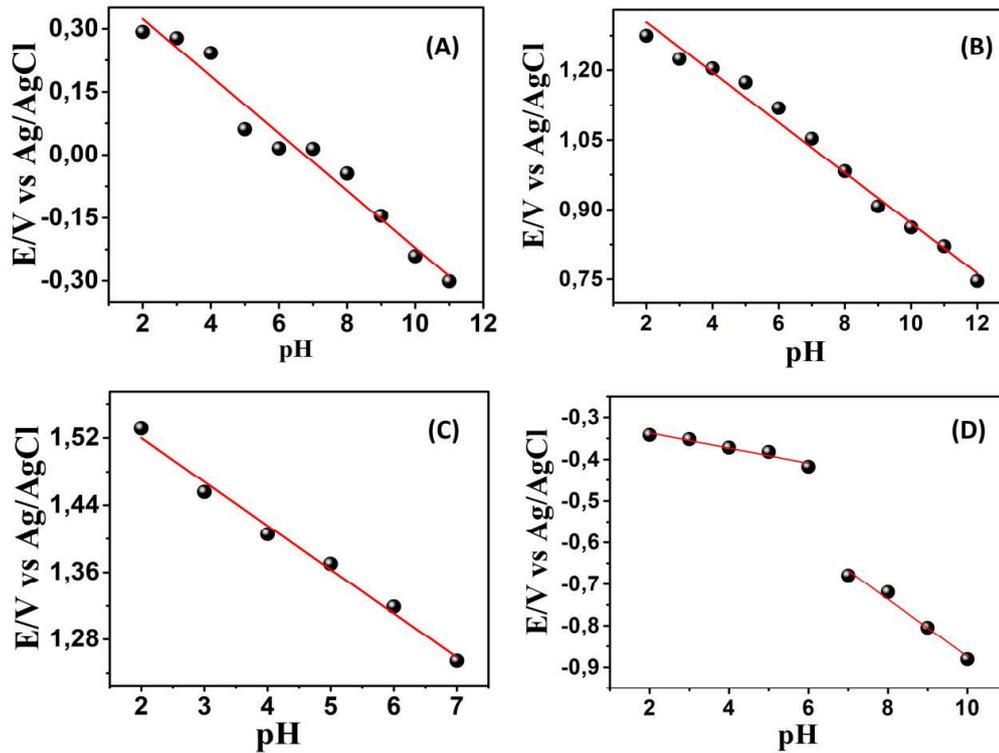


Como pode ser visto na Figura 17A, a Ox₁ da AMI em +0,3 V é claramente notado no BDDE quando as varreduras foram iniciadas em potenciais E₀ menores que -1,0 V (voltamograma em verde). De acordo com este estudo apresentado na Figura 17A, a primeira oxidação processo de AMI é dependente de algum produto gerado por outro processo de redução na superfície do BDDE em potenciais negativos maiores que -1,0 V. Todavia, devido à descarga do solvente (redução da água) no BDDE nessa faixa de potencial, não é possível observar um processo de redução da AMI usando este eletrodo. Por outro lado, de fato processos de redução da AMI já foram reportados em potenciais altamente negativos usando o eletrodo de mercúrio suspenso (DME – do inglês *dropping mercury electrode*) (MARTÍN *et al.*, 1999), onde dois processos catódicos foram observados com E_{pc} a -0,9 e -1,3 V (vs Ag/AgCl) em meio 0,04 M ácido bórico/borato de sódio pH 9,0. Nesse sentido, a fim de confirmar este comportamento eletroquímico da AMI, foi usado um GCE modificado com um filme de mercúrio para mimetizar a janela de potencial catódico do DME. A Figura 17B mostra esse estudo que evidencia os dois processos de redução da AMI (-0,9 e -1,4 V) e corrobora os resultados com o estudo anterior reportado usando o DME (MARTÍN *et al.*, 1999).

Considerando todos esses processos eletroquímicos observados para AMI, o complexo comportamento eletroquímico desta droga não foi devidamente apresentado em trabalhos anteriores. Como por exemplo, usando o mesmo BDDE, dois trabalhos reportaram apenas um processo de oxidação em torno de +0,9 V (vs Ag/AgCl) para AMI (MORAES *et al.*, 2017; PEREIRA *et al.*, 2016). Nesses trabalhos a ampla janela de potencial do BDDE, notadamente na faixa catódica, não foi explorada e discutida para a detecção de AMI. Por outro lado, pela primeira vez, o presente trabalho mostra que a AMI possui diversos processos eletroquímicos no BDDE, os quais estão quase todos correlacionados. É importante mencionar que alguns desses processos eletroquímicos da AMI no BDDE estão sendo apresentados de forma inédita para essa molécula, como por exemplo, a Ox₁ (em +0,3 V) e Red₂ (em -0,3 V).

Dessa forma, como apresentamos uma alteração da eletroquímica da AMI no BDDE com uma abordagem inovadora, avaliamos também neste trabalho uma proposta de mecanismo para todos esses processos de oxirredução. Inicialmente foi investigada a relação do número de elétrons e prótons envolvidos em cada processo redox usando os dados do estudo de pH mostrado na Figura 8. Esses dados foram usados para elaborar os gráficos de E_p vs pH para os processos redox da AMI, cujo os resultados para Ox₁, Ox₂, Ox₃ e Red₂ são apresentados na Figura 18.

Figura 18 - Gráficos da relação entre E_p vs pH no BDDE obtido a partir da Figura 8 para processos eletroquímicos da AMI na Ox_1 (A), Ox_2 (B), Ox_3 (C) e Red_2 (D).



Como pode ser observado na Figura 18, o E_p para todos os processos redox de AMI diminuiu linearmente com o aumento do pH, mas em diferentes faixas de pH. As regressões lineares (E_p vs pH) obtidas ($r^2 > 0,98$) entre pH 2,0 e 12,0 para Ox_1 (Figura 18A) e para Ox_2 (Figura 18B) são apresentadas nas equações 15 e 16, respectivamente.

$$E_{paOx_1}(V) = 0,46 (\pm 0,03) - 0,068 (\pm 0,004) pH \quad e \quad (15)$$

$$E_{paOx_2}(V) = 1,42 (\pm 0,02) - 0,054 (\pm 0,002) pH \quad (16)$$

Devido ao processo Ox_3 da AMI não ser observado após pH 7,0 em BDDE (Figura 8C), a faixa linear (E_p vs pH) foi obtida neste caso entre pH 2,0 a 7,0 (Figura. 18C), cuja regressão linear ($r^2 = 0,99$) é mostrada na equação 17.

$$E_{paOx_3}V = 1,62 (\pm 0,01) - 0,052 (\pm 0,003) pH \quad (17)$$

Para o processo Red_2 da AMI, duas faixas lineares (E_p vs pH) foram apresentadas (Figura 18D), (I) entre pH 2,0 e 6,0 e (II) entre pH 7,0 e 10, cujas regressões lineares foram obtidas com $r^2 > 0,98$ e são mostradas nas equações 18 e 19, respectivamente.

$$(I) E_{pcRed_2} = -0,27 (\pm 0,01) - 0,024 (\pm 0,001) pH \quad (18)$$

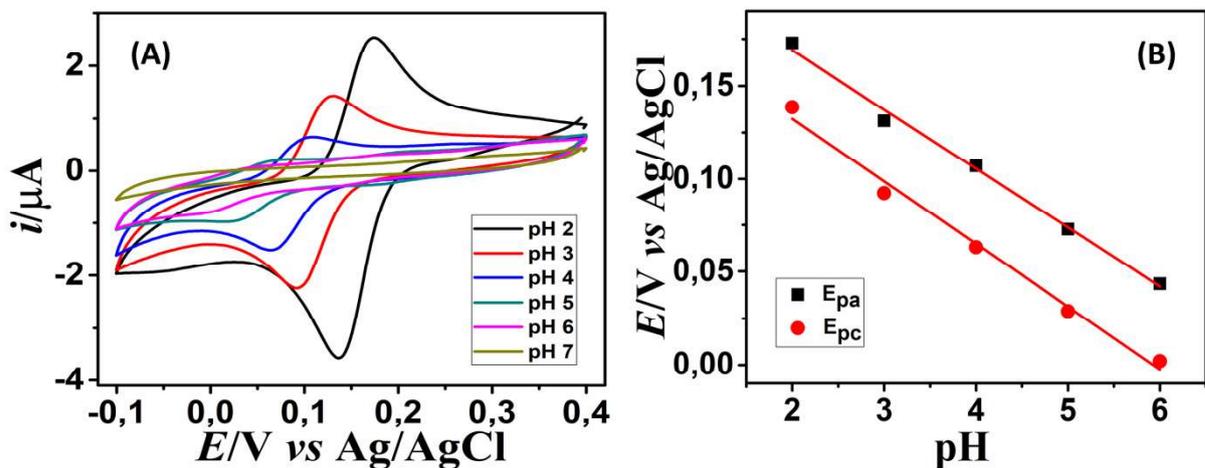
$$(II) E_{pcRed_2} = -0,19 (\pm 0,04) - 0,068 (\pm 0,005) pH \quad (19)$$

Os valores dos coeficientes angulares (m) obtidos para a maioria das equações das regressões lineares (15,16, 17 e 19) estão próximos do valor teórico (0,0592 V/pH), sugerindo

pela equação de Nernst que esses processos redox envolvem o mesmo número de elétrons e prótons (BRETT; BRETT, 1993). Por outro lado, para o processo Red_2 , na primeira faixa linear (pH 2 a 6,0), o valor de m é próximo à metade do valor teórico (0,0592 V/ pH), indicando neste caso o envolvimento de dois elétrons para cada próton nesse processo de redução (BRETT; BRETT, 1993).

A avaliação da relação de E_p vs pH para o processo eletroquímico reversível de AMI (Red_1/Ox_4) foi também realizada, cujo estudo de pH foi feito aplicando previamente um potencial de +1,3 V (Ox_2) no BDDE para gerar o respectivo processo redox (Figura 19A). Os dados gerados neste estudo foram coletados para elaboração do gráfico de E_p vs pH (Figura 19B).

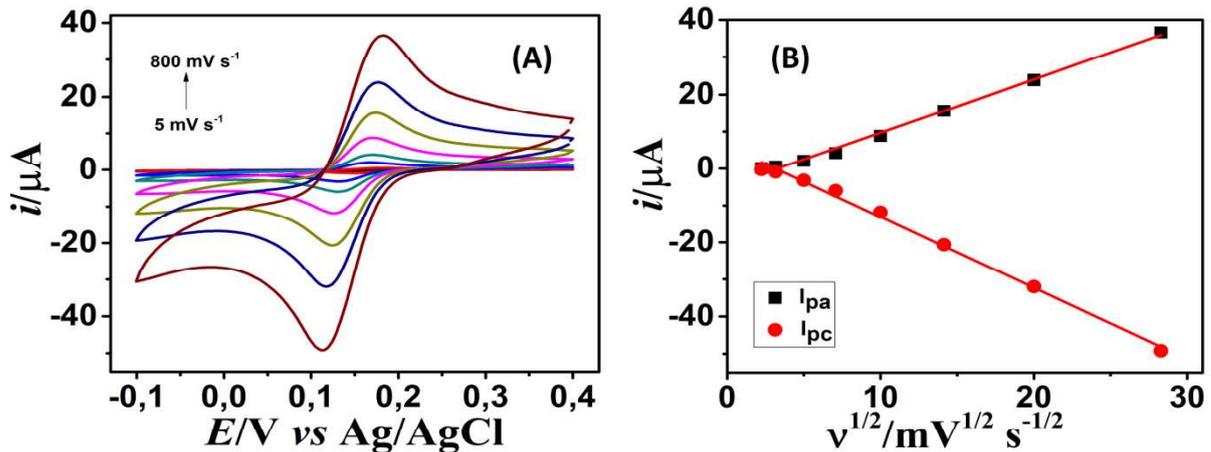
Figura 19 - (A) Voltamogramas obtidos para AMI 1,0 mmol L⁻¹ em tampão B-R 0,1 mol L⁻¹ em diferentes valores de pH com potencial de acumulação de +1,3 V por 30s. Taxa de varredura de 50 m Vs⁻¹. Todos os potenciais de varredura iniciaram em 0,4V no sentido catódico. (B) Gráfico dos potenciais de picos (E_{pa} e E_{pc}) da AMI vs pH no BDDE obtido a partir da Figura 19A.



Como pode ser visto na Figura 19A, o processo reversível da AMI (Red_1/Ox_4) é também dependente do pH em BDDE. Vale ressaltar que, após pH 6,0, este processo reversível não foi observado no BDDE, conforme mostrado na Figura 19A para pH 7,0. Este comportamento eletroquímico também foi observado no GCE para AMI (NASCIMENTO et al., 2020) sugerindo que uma molécula protonada pode ser mais facilmente reduzida para formar este par redox reversível. Além disso, o gráfico de E_p vs pH (Figura 19B) apresentou uma faixa linear ($r^2 > 0,99$) entre pH 2,0 e 6,0 para o Red_1/Ox_4 , ambos com m (V pH⁻¹) semelhantes: para $E_{paOx4} = 0,032$ ($\pm 0,001$) e para $E_{pcRed1} = 0,034$ ($\pm 0,002$), indicando que este processo reversível envolve dois elétrons para cada próton. Como esse processo ainda não estava bem definido anteriormente, apresentamos também o seu estudo de velocidade de

varredura (Figura 20) no BDDE, usando, da mesma forma anterior, um potencial de acumulação em +1,3 V (Ox_2) para gerar os produtos a serem reduzidos (Red_1) e, posteriormente, oxidados (Ox_4) na superfície desse eletrodo.

Figura 20 - (A) Voltamogramas obtidos para AMI 1,0 mmol L⁻¹ em tampão B-R 0,1 mol L⁻¹ pH 2,0 em diferentes velocidades de varredura com potencial de acumulação de +1,3 V por 30s. (B) Gráfico da corrente de pico (I_{pc} e I_{pa}) vs $v^{1/2}$ obtida a partir da Figura 20A.



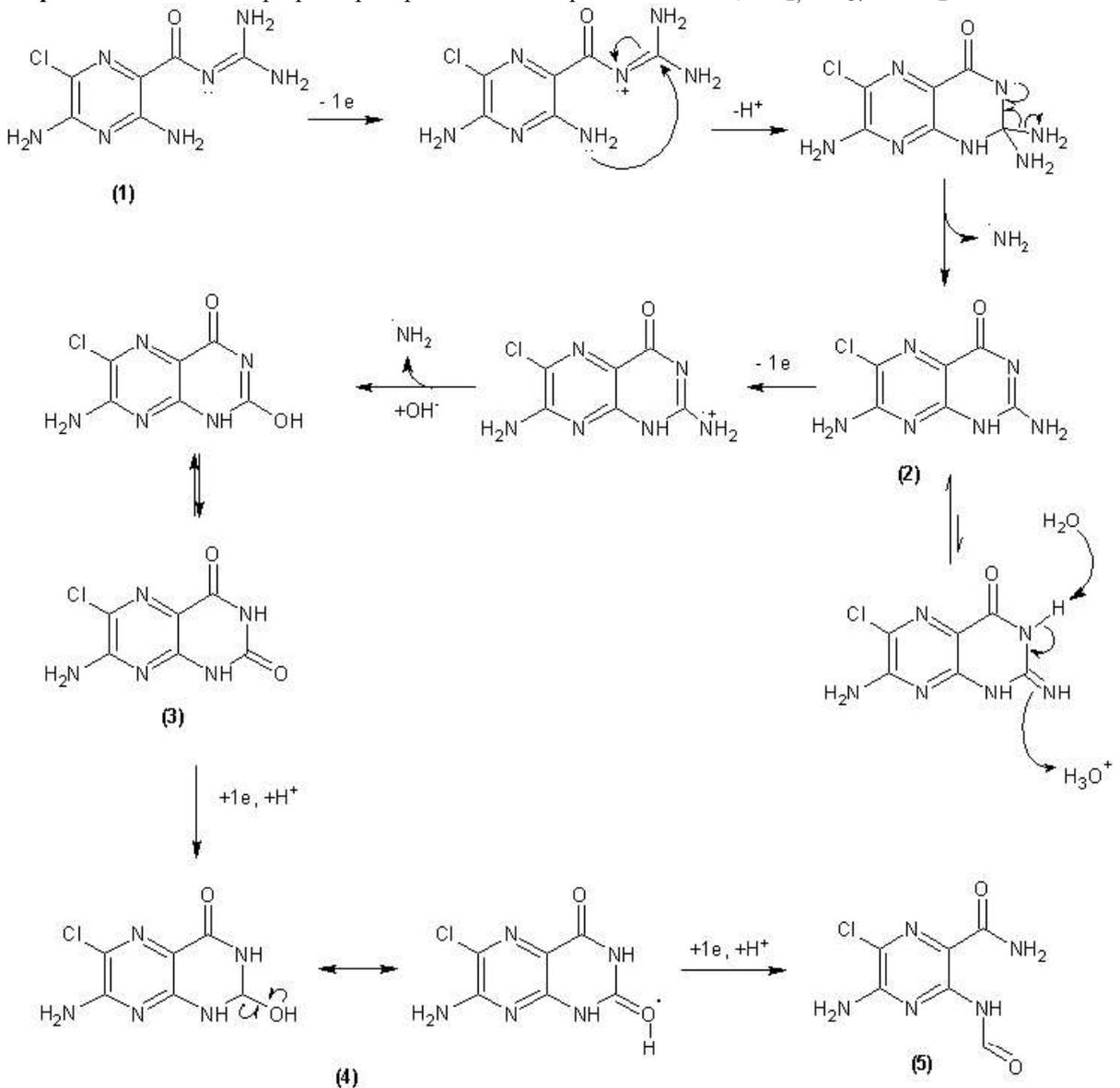
De acordo com o estudo de velocidade de varredura apresentado na Figura 20, a relação linear obtida entre I_p vs $v^{1/2}$ sugerem que o processo reversível é controlado por difusão no BDDE. Dessa forma, o número de elétrons foi estimado em 2,0 (dois) para este processo eletroquímico, baseando esse cálculo na relação teórica apresentada na equação 20 (BARD; FAULKNER, 2000).

$$\Delta E_p = E_{pc} - E_{pa} (\Delta E_p = 34 mV) \quad (20)$$

Com base em todos os resultados obtidos para o comportamento eletroquímico da AMI no BDDE, os mecanismos de reação foram propostos para todos os processos apresentados deste diurético (Esquemas 1, Esquema 2 e Esquema 3), os quais podem ser resumidos da seguinte forma:

- (I) Ox_1 : oxidação irreversível a +0,3 V do produto gerado em altos potenciais negativos (Red_3 e Red_4);
- (II) Ox_2 : oxidação irreversível a +1,3 V;
- (III) Ox_3 : oxidação irreversível a +1,5 V;
- (IV) Red_2 : redução irreversível em -0,3 V do produto gerado em +1,5 V (Ox_3).
- (V) Red_1/Ox_4 : redução/oxidação reversível em + 0,12 / 0,15 V do produto gerado em +1,3 V (Ox_2).

Esquema 1 . Mecanismo proposto para processos eletroquímicos da AMI, Ox₂, Ox₃, e Red₂ no BDDE.



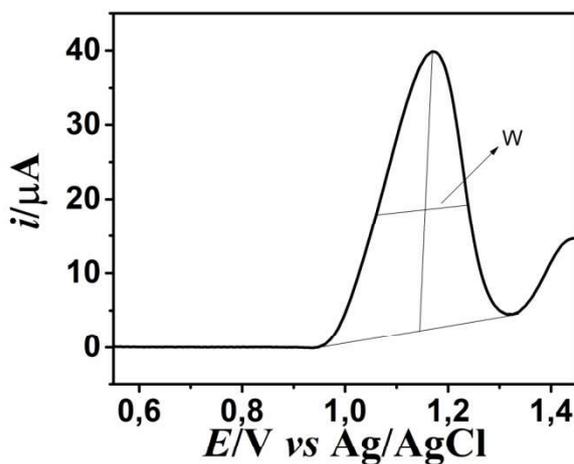
Como novamente mostrado no Esquema 1, a estrutura da AMI (Figura 1) consiste em um anel de pirazina contendo dois grupos amina, um cloro e um alquil-guanidina anexados. O curso da eletrooxidação de AMI é notavelmente complexo, conforme mostrado no Esquema 1. As espécies envolvidas no mecanismo estão principalmente relacionadas ao grupo guanidina, no qual a oxidação anódica das iminas geralmente ocorre com adição nucleofílica ao carbono da ligação dupla $C=N$ (MASUI; OHMORI, 1973)(M'HALLA, 1978). Portanto, o processo de oxidação (Ox₂ em +1,3 V) da AMI (1) envolve a perda de um elétron e um próton, levando a uma reação intramolecular entre a guanidina e o grupo aromático de amina primário. Consequentemente, o composto bicíclico (2) é formado com partes de um NH₂ radical como grupo de saída. Além disso, como pode ser visto no Esquema 1, é possível a formação de outro produto (tautômero) a partir do composto (2), o que foi

sugerido diretamente a partir da oxidação de AMI a +1,3 V em GCE (NASCIMENTO *et al.*, 2020). No entanto, nesta proposta atual o produto oxidado a 1,3 V (composto 2) representa o tautômero quimicamente mais estável da estrutura anterior apresentada para o produto oxidado no GCE (NASCIMENTO *et al.*, 2020). Além disso, de acordo com estudos eletroquímicos e conceitos de reações de química orgânica, esse mecanismo de reação anterior usando um GCE precisa ser corrigido envolvendo apenas um elétron e um próton transferidos. Outra correção a ser feita no mecanismo deste processo no GCE é a perda de um grupo amina ($-\text{NH}_2$), que não foi apresentada no mecanismo proposto anteriormente (NASCIMENTO *et al.*, 2020).

O processo de oxidação subsequente (a Ox₃ em +1,5 V) é caracterizado pela transferência de um elétron e uma perda de um segundo radical amina com adição simultânea de um grupo hidroxila, resultando no composto (3). Então, o composto (4) é formado por uma etapa de um elétron e um próton resultante da reação de redução (Red₂ em -0,3 V) do composto (3). Finalmente, o composto (4) pode passar por uma etapa adicional com ganho de mais um elétron e um próton através de um processo de redução irreversível para formar o composto (5), corroborando com os CVs de AMI no BDDE (Figuras 9 e 16).

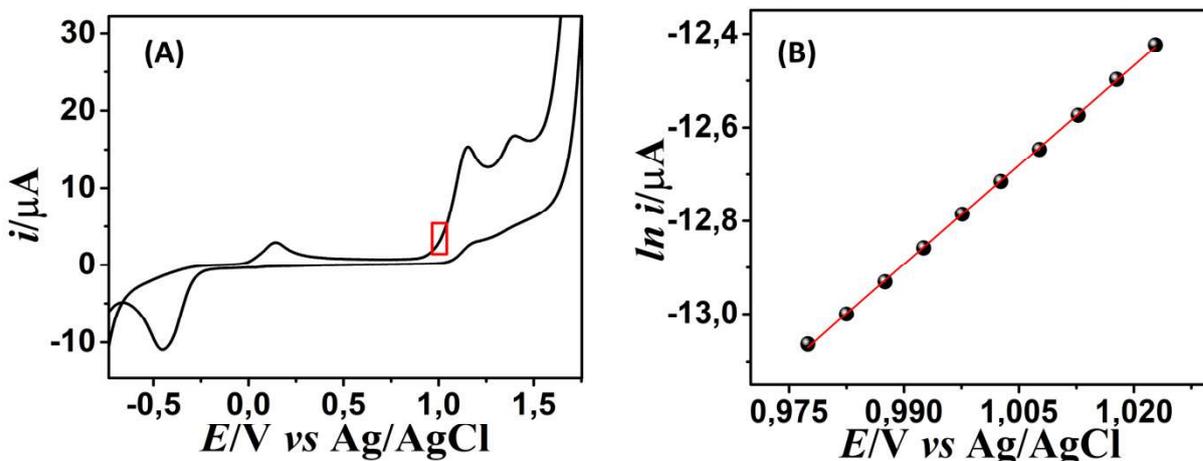
A fim de apoiar o mecanismo eletroquímico proposto, o número de elétrons (n) envolvidos no processo de oxidação da AMI na Ox₂ foi calculado usando curvas de Tafel corrigidas para transporte de massa e a técnica de SWV (FATOUROS; KRULIC, 1998). A Figura 21 apresenta a SWV no BDDE em solução de tampão B-R, pH 2, de onde foi adquirido o valor da medida da largura de pico a meia altura (W), para realizar o cálculo do coeficiente de transferência de carga (α) para encontrar o n do processo Ox₂ da AMI no BDDE.

Figura 21 - Voltamogramas de onda quadrada registrados em solução 1,0 mmol L⁻¹ AMI em tampão B-R 0,1 mol L⁻¹ pH 2,0 no BDDE. Step: 5mV, amplitude: 30mV e frequência: 25Hz.



O valor de W encontrado (0.15996V) pela Figura 21 foi substituído na Equação (5), já descrita na parte experimental, sendo o valor de α estimado em 0,2730. Para a construção da curva de Tafel, foram utilizados os primeiros dez pontos lineares obtidos da CV (Figura 22 A) para o processo Ox_2 da AMI, usando uma baixa velocidade de varredura (10 mV s^{-1}). Os dados coletados foram plotados em um gráfico de potencial versus o logaritmo natural da corrente (Figura 22 B).

Figura 22 - Voltamogramas cíclico registrados em solução $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ AMI em tampão B-R $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 2,0 no BDDE. Velocidade de varredura: 10 mV s^{-1} (A). Gráfico de Tafel para a Ox_2 da AMI a +1,3 V (B).



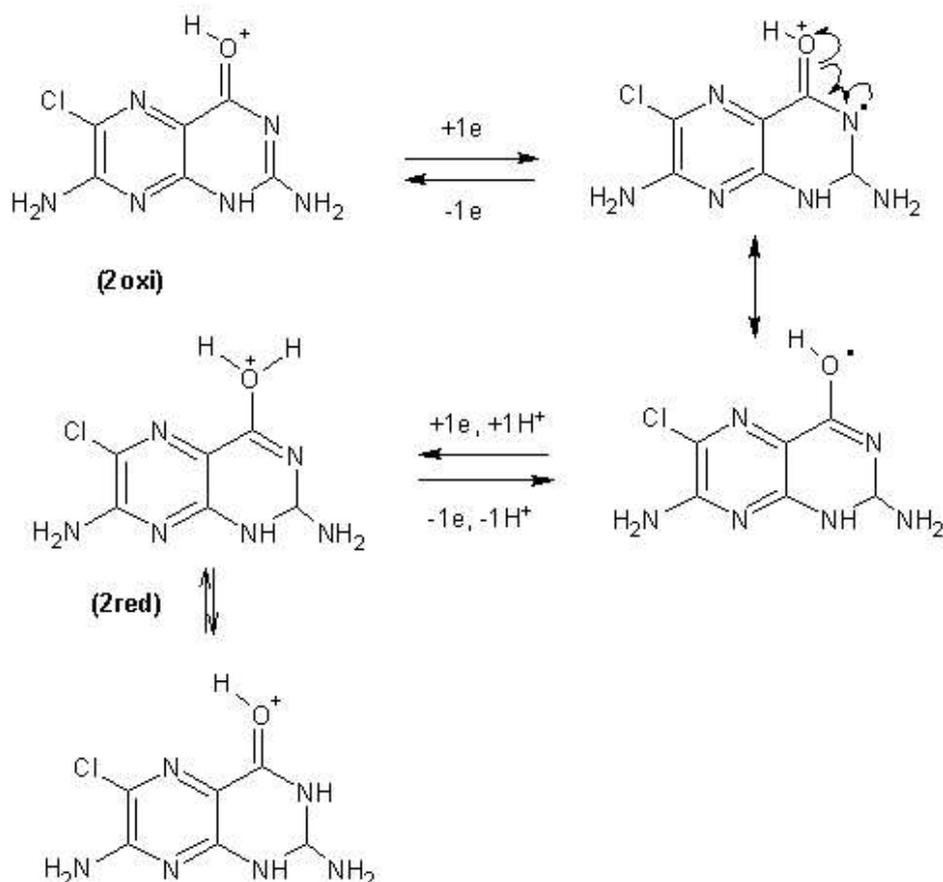
A curva de Tafel apresentada na Figura 22B mostrou linearidade ($r^2 = 0,999$) com seguinte regressão linear:

$$\ln(i) = -26,910 (\pm 0,082) + 14,16 (\pm 0,082)E \quad (20)$$

Onde o m da equação 20 foi substituído na equação 6 para o cálculo do n (1,3) envolvidos na Ox_2 da AMI, cujo valor pode ser estimado como 1,0 (um) elétron corroborando com mecanismo sugerido no esquema 1 para este processo eletroquímico.

Como observado na Figura 16B, o processo reversível Red_1/Ox_4 é dependente do Ox_2 da AMI e, portanto, precisa ser primeiramente reduzido do composto (2) mostrado no Esquema 1. Nesse sentido, o Esquema 2 propõe um mecanismo de reação para este processo eletroquímico. Vale ressaltar que, neste mecanismo proposto, o processo reversível inicia-se pelo composto 2 (produto oxidado no Ox_2 em 1,3 V), que representa um tautômero quimicamente mais estável, conforme mostrado no Esquema 1.

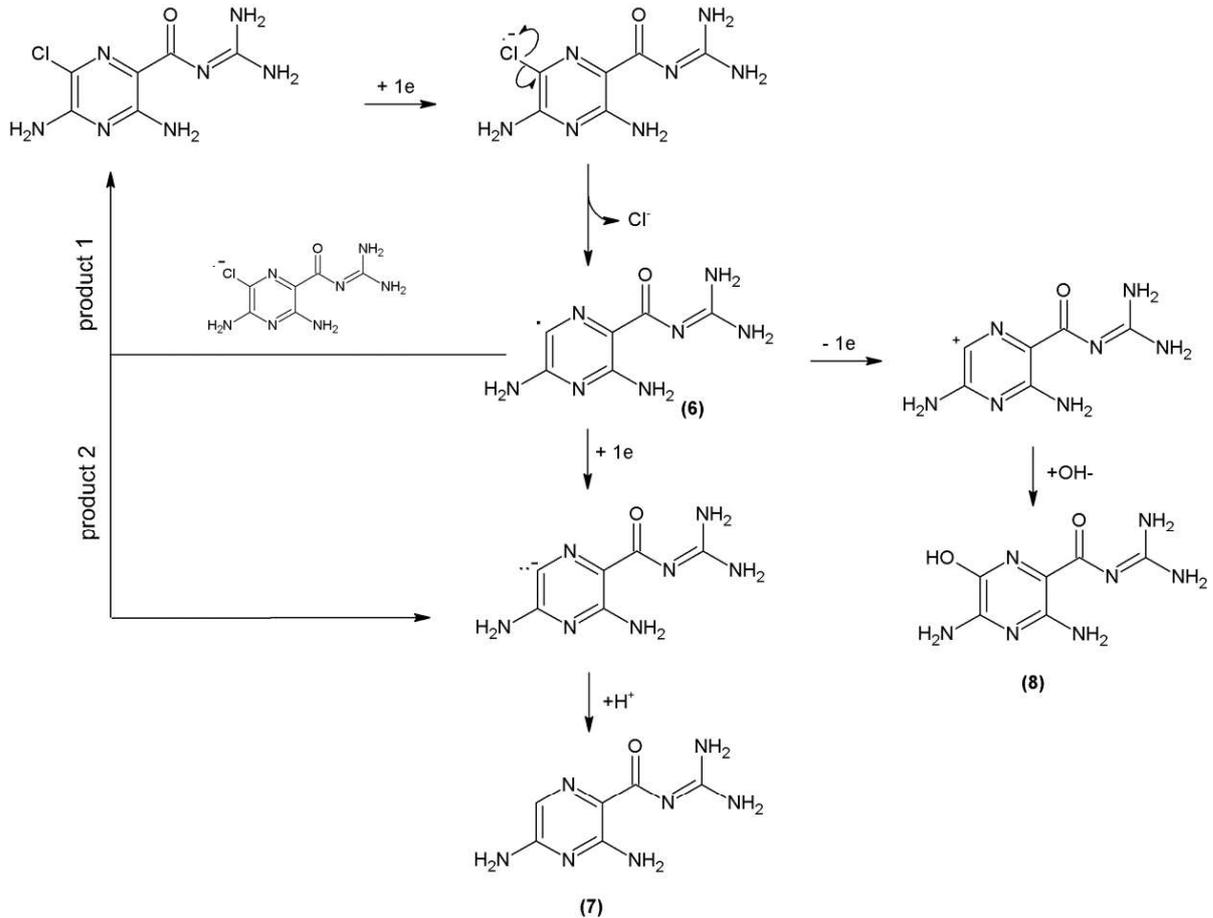
Esquema 2 . Mecanismo proposto para o processo eletroquímico reversível Red₁/Ox₄ da AMI no BDDE.



Como pode ser observado no Esquema 2, a etapa do mecanismo de reação é caracterizada pela transferência de um elétron para o nitrogênio sp^2 . O produto reduzido (2red) é formado após uma segunda etapa de um elétron e um próton, que na presença de meio ácido existe em equilíbrio rápido com um tautômérico. Um mecanismo de reação também foi descrito anteriormente usando um GCE para este processo reversível de AMI (NASCIMENTO *et al.*, 2020). No entanto, neste trabalho anterior, o processo reversível em GCE começa a partir de um tautômero quimicamente menos estável do que o composto (2). Além disso, uma reação de ciclização é relatada neste processo reversível como uma reação polar, que pode ser difícil em meio ácido. Nessa condição, a maioria dos grupos amino são protonados e, conseqüentemente, devem prevenir o ataque nucleofílico no grupo guanidina. Diferentemente do que já havia sido proposto, foi apresentado neste trabalho (Esquema 2) uma reação completamente radical, que é mais consistente para uma descrição reversível do processo.

O Esquema 3 mostra o mecanismo de reação para os processos de redução da AMI em altos potenciais negativos (Red₃ e Red₄), os quais geram o produto para a oxidação irreversível (Ox₁) a +0,3 V no BDDE.

Esquema 3 . Mecanismo proposto para processos de redução de IAM em altos potenciais negativos no BDDE e a oxidação do produto gerado nesses potenciais.



O Esquema 3 mostra que o processo de redução em altos potenciais para AMI é atribuído à redução eletroquímica dos haloaromáticos (M'HALLA; PINSON; SAVEANT, 1978). Na primeira etapa (Red₃), o composto do radical ânion é formado pela perda de um elétron, que leva ao radical neutro (6) após a clivagem do grupo de saída do cloreto. Subsequentemente, a redução adicional (Red₄) envolvendo etapa de um elétron e um próton resulta no composto (7). Isso implica que o intermediário (6) é mais fácil de reduzir do que o material de partida (ANDRIEUX *et al.*, 1979). Assim, o processo de oxidação irreversível Ox₁ inicia a partir do radical neutro (6) por meio de uma reação envolvendo a perda de um elétron e adição de um grupo hidroxila, que gera o derivado fenol (8). Nesse sentido, pela proposta apresentada, a Ox₁ da AMI é gerada pelo processo Red₃ no BDDE. Vale destacar que, as oxidações de fenol envolvendo radicais fenoxi levam a processos de

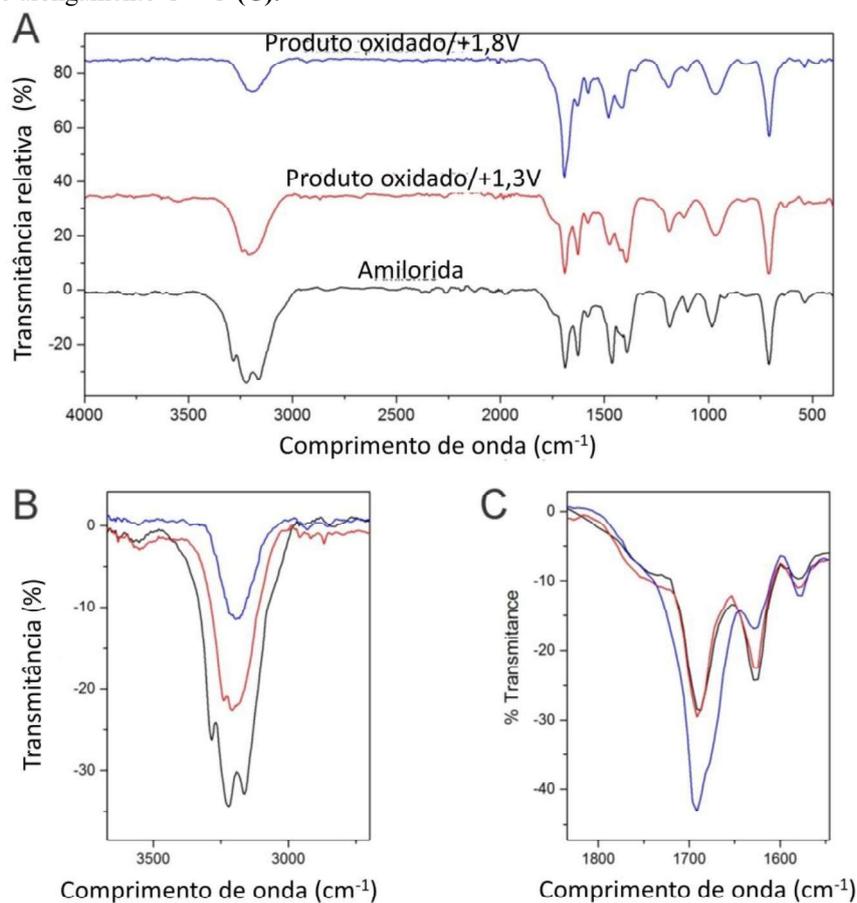
acoplamento C-C a partir da substituição orto ou para conduzida por grupos de retirada de elétrons (EVANS; JIMENEZ; KELLY, 1984). No entanto, a presença de dois grupos doadores de amino e a ausência de carbono aromático não substituído dificultam ou mesmo impedem a ocorrência de eletrooxidação do fenol do composto (8), o que está de acordo com os CVs registrados no BDDE, uma vez que os processos de oxidação da AMI para Ox₂ (em +1,3 V) e Ox₃ (em +1,5 V) são independentes desta oxidação da Ox₁ (em +0,3 V).

No intuito de confirmar a proposta do mecanismo (Esquema 1, 2 e 3), os produtos gerados nos processos Ox₂ e Ox₃ foram avaliados por FTIR após uma eletrólise da solução de AMI no BDDE, cujos resultados são apresentados a seguir.

4.2 Caracterização do mecanismo proposto por análise FTIR

Os produtos dos processos Ox₂ e Ox₃ da AMI foram analisados usando a técnica de FTIR. Para tanto, foi realizada a eletrólise das soluções de AMI no BDDE pela técnica de cronoamperometria com potenciais aplicados a +1,3 V ou +1,8 V, ambos por 3 horas. Os produtos de reação obtidos foram liofilizados. Desse modo, a caracterização de FTIR dos produtos de eletrooxidação de AMI em +1,3 V e +1,8 V foram realizadas para confirmar as estruturas dos compostos (2) e (3) mostradas no Esquema 1, respectivamente. A Figura 23 mostra os espectros de FTIR coletados para a AMI e seus produtos de eletrooxidação.

Figura 23 - Espectros FTIR da AMI (espectro preto) e os produtos de eletrooxidação a +1,3 V (espectro vermelho) e 1,8 V (espectro azul) (A). Sobreposição espectral na região do infravermelho do alongamento da amida (B) e do alongamento C = O (C).



Na Figura 23, o espectro de AMI foi analisado em comparação com a literatura (GUMIENICZEK *et al.*, 2018; MAZZO, 1986), cuja banda dupla entre 3690 e 3000 cm⁻¹ é atribuída ao alongamento N-H de aminas primárias de grupos aromáticos e guanidina. O alongamento das ligações C=O é prontamente identificado pela banda intensa em 1690 cm⁻¹ e a deformação angular simétrica das ligações N-H em 1570 cm⁻¹. As bandas estreitas entre 1510 e 1375 cm⁻¹ estão relacionados com o alongamento C=C, e a banda em 1,625 cm⁻¹ com alongamento C=N. A deformação axial da ligação C-Cl é caracterizada pela banda forte a 720 cm⁻¹.

Após a eletrooxidação de AMI em +1,3 V (Ox₂), vibrações semelhantes de carbonila e anel aromático também foram visualizados no espectro deste produto (Figura 23A), indicando que essas porções são preservadas. No entanto, intensidades relativas mais baixas significativas do alongamento da banda N-H (3690 - 3000 cm⁻¹) são observadas quando comparadas ao espectro do padrão inalterado da AMI (Figura 23B). Este achado está de acordo com o mecanismo de eletrooxidação proposto para o composto (2) e confirma a

perda do grupo amino da guanidina. Além disso, a banda única de alongamento N-H sugere a presença de grupo amino secundário, como consequência da etapa de ciclização.

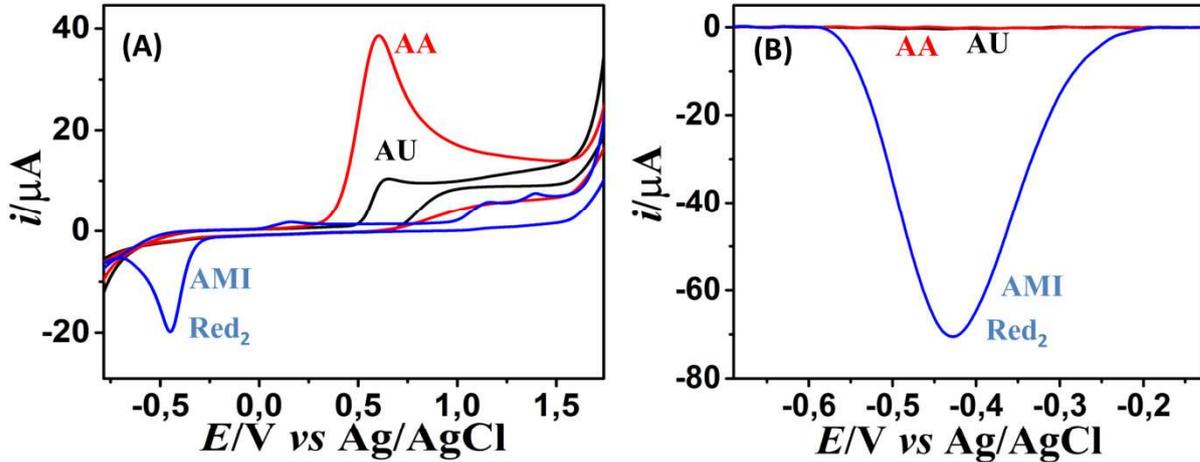
Em relação à eletrooxidação do AMI a +1,8 V, no espectro IR do produto oxidado também foram observados os alongamentos $C=C$ e $C=N$, juntamente com a banda característica de baixa intensidade do alongamento C-Cl a 720 cm^{-1} , o que confirma a integridade do anel aromático. A menor intensidade relativa de deformação axial N-H é observada para o produto oxidado da eletrooxidação Ox_3 a + 1,8 V em comparação com o espectro do produto da eletrooxidação Ox_2 a 1,3 V (Figura 23B). Ao mesmo tempo aumentos significativos são observados para o alongamento $C=O$ (Figura 23C), indicando a segunda etapa envolvendo a perda de outro grupo amino e a formação de outro grupo carbonila, como sugerido na estrutura do composto 3, corroborando com a dependência do processo Red_2 com Ox_3 .

Assim, considerando os estudos realizados para confirmação dos produtos gerados pela eletrólise da AMI, o mecanismo eletroquímico proposto (Esquema 1-3) neste trabalho apresenta plausibilidade e pode ser usado para desenvolvimento de diferentes aplicações na área de eletroquímica. Uma dessas aplicações é o uso de um novo processo eletroquímico para uma detecção seletiva da AMI em matrizes mais complexas, como amostras de urina. Essa estratégia de detecção é baseada na utilização da Red_2 para detecção da AMI no BDDE. Dessa forma, a otimização de uma técnica voltamétrica mais sensível para detectar esse diurético pela Red_2 é apresentada a seguir.

4.3 Otimização da SWCSV e dos parâmetros analíticos para determinação da AMI

Como o objetivo principal deste trabalho foi a detecção de AMI na urina, a interferência do AU e AA foram avaliados tanto por CV em tampão BR pH 2,0 em BDDE (Figura 24A), quanto pela técnica de SWCSV (Figura 24B). A justificativa desse estudo de interferência é devido à presença em altas concentrações desses compostos na urina humana (LIMA *et al.*, 2018; MATOS *et al.*, 2000), bem como a eletroatividade de ambos em vários sensores eletroquímicos, como no BDDE (GUEDES *et al.*, 2016; LIMA *et al.*, 2018; SANJUÁN *et al.*, ; ŠVORC *et al.*, 2017).

Figura 24 - (A) CVs registrados no BDDE em tampão B- R 0,1 mol L⁻¹ pH 2 com adição de soluções padrão de 10 μmol L⁻¹ de AMI (linha azul) ou AU (linha preta) ou AA (linha vermelha). Todas as varreduras potenciais foram iniciadas em -1,5 V na direção positiva com uma taxa de varredura de 50 mVs⁻¹. (B) SWCSVs registrados no BDDE em tampão B- R 0,1 mol L⁻¹ pH 2,0 para 10 μmol L⁻¹ de AMI (linha azul), AU (linha preta) e AA (linha vermelha). Amplitude: 80 mV, frequência: 70 Hz, step: 8 mV, tacc: 15 s, Eacc: 1,8 V.



Como esperado (LIMA *et al.*, 2018), o AA e o AU mostram processos eletroquímicos de oxidação no BDDE (Figura 24A), que são praticamente sobrepostos aos processos de oxidação da AMI. Nesse contexto, o processo de redução (Red₂) da AMI a -0,3 V no BDDE indica uma detecção mais seletiva desse fármaco em amostras de urina e, dessa forma, justifica o seu uso para uma determinação seletiva desse diurético por SWCSV, como pode ser visto na Figura 24B.

Os parâmetros experimentais da técnica de SWCSV, como escada de potencial (step) (Figura 25A), amplitude (Figura 25B) e frequência (Figura 25C), bem como o tempo de acumulação (t_{ac}) (Figura 25A) e o potencial de acumulação (E_{ac}) (Figura 26B), foram todos otimizados de forma univariada para detecção de AMI.

Figura 25 - Voltamogramas registrados em solução $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ AMI em tampão B-R $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 2,0 no BDDE para otimizações dos parâmetros da técnica de SWCSV. (A) step, (B) amplitude e (C) frequência.

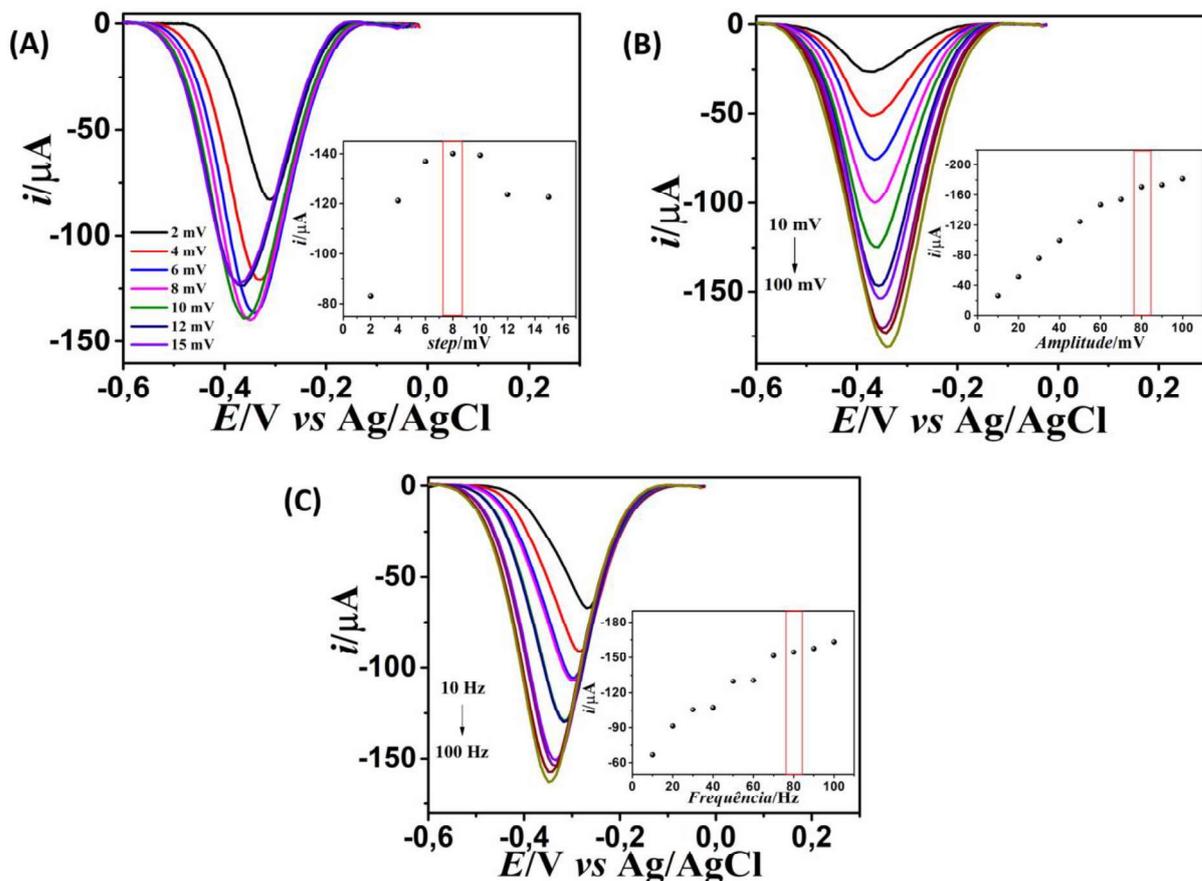
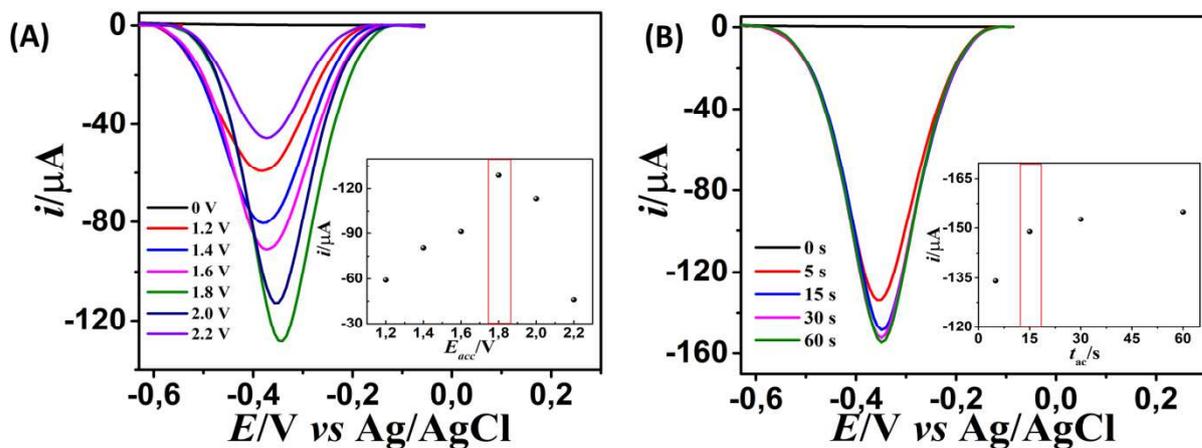


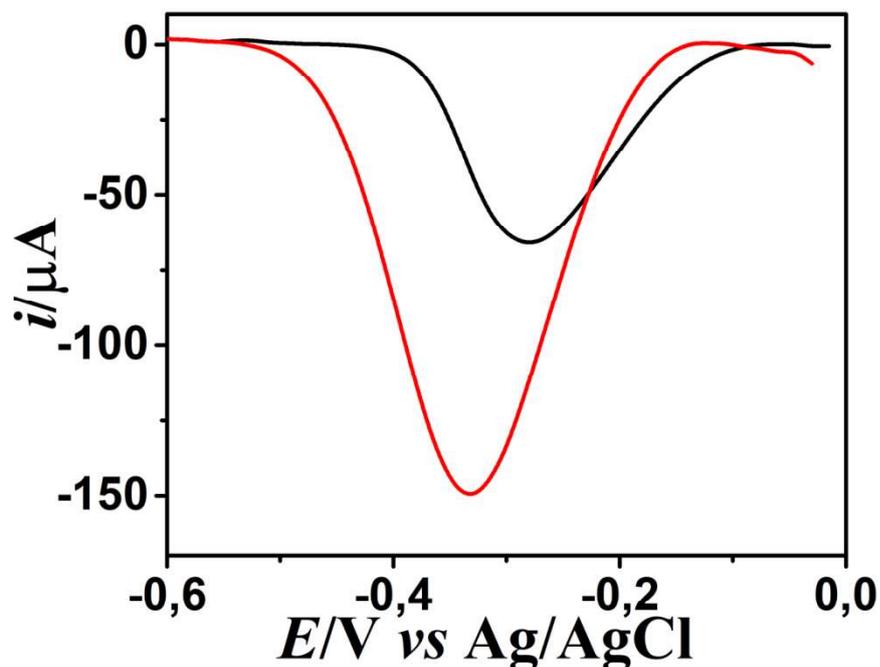
Figura 26 - Voltamogramas registrados em solução $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ AMI em tampão B-R $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 2,0 no BDDE para otimizações dos parâmetros da técnica de SWCSV. (A) potencial de acumulação e (B) tempo de acumulação.



As melhores condições para cada parâmetro avaliado nas Figuras 25 e 26 são mostradas em destaque na inserção dessas Figuras, sendo essas baseadas em função das maiores e mais estáveis I_{pc} obtidas no E_{pc} do Red₂ da AMI. Os parâmetros otimizados para

determinação de AMI por SWCSV usando BDDE foram: step de 8,0 mV, amplitude de 80 mV, frequência de 70 hz, t_{ac} de 15 s e E_{ac} em 1,8 V. No sentido de avaliar outra técnica voltamétrica pulsada para detectar AMI pela redissolução catódica, a voltametria de redissolução catódica de pulso diferencial (DPCSV, do inglês, *differential pulse cathodic stripping voltammetry*) também foi otimizada para a determinação da AMI. As melhores condições obtidas pela DPCSV foram: step de 12, 0 mV, amplitude de 100 mV, tempo de modulação de 10 ms e intervalo de tempo de 0,1 s, mantendo os mesmos valores de t_{ac} e E_{ac} previamente otimizados. Considerando as condições otimizadas para detectar a AMI por SWCSV ou DPCSV, a Figura 27 apresenta uma comparação das respostas eletroquímicas obtidas por essas técnicas no BDDE.

Figura 27 - Voltamogramas registrados em solução 1,0 mmol L⁻¹ AMI em tampão B-R 0,1 mol L⁻¹ pH 2,0 no BDDE para as técnicas otimizadas SWCSV (linha vermelha) step:8,0 mV, amplitude:80 mV, frequência: 70 hz, t_{ac} : 15 s e E_{ac} :1,8 V; e DPCSV (linha preta) step: 12, 0 mV, amplitude: 100 mV, tempo de modulação: 10 ms, intervalo de tempo: 0,1 s, t_{ac} : 15 s e E_{ac} :1,8 V.

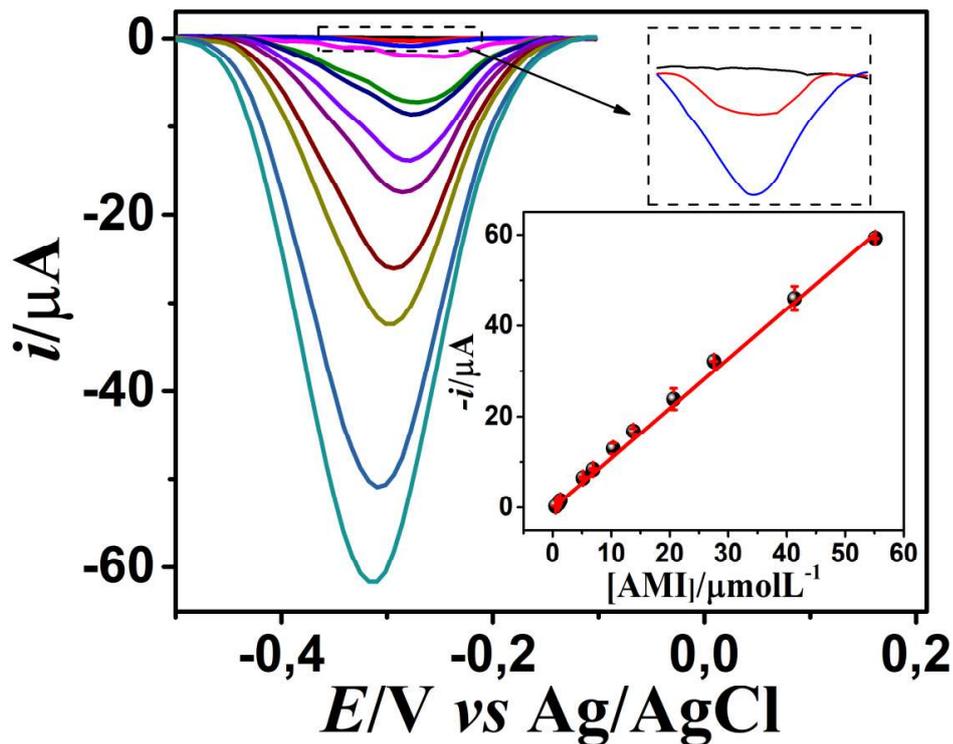


Como pode ser visualizado na Figura 27, a técnica de SWCSV apresentou maior I_{pc} para redução da AMI no BDDE quando comparada ao sinal obtido pela DPCSV. Visto que o Red₂ da AMI é caracterizado como um processo eletroquímico irreversível no BDDE, teoricamente a diferença da I_{pc} obtida pelas duas técnicas voltamétricas (SWCSV e DPCSV) não deveria ter sido significativa. Entretanto, como o processo Red₂ da AMI não apresentou características de transporte de massa por adsorção no BDDE (Figuras 12, 13 e 14), o uso de uma técnica de redissolução mais rápida pode ser favorável para detectar o composto gerado

na etapa de acumulação, antes que essa espécie difunda para seio (*bulk*) da solução e se distancie da superfície do eletrodo. Assim, a SWCSV de fato pode oferecer uma maior I_{pc} para detecção pela Red_2 da AMI, uma vez que essa técnica apresenta, nas condições otimizadas, uma velocidade de varredura (560 mV s^{-1}) 4,7 vezes superior à DPCSV (120 mV s^{-1}).

Dessa forma, a SWCSV foi selecionada para otimizar os parâmetros analíticos para determinação da AMI em urina. O primeiro parâmetro avaliado foi a curva analítica (Figura 28), onde a detecção da AMI foi realizada, em triplicata, para soluções padrão deste analito ($0,1$ a $110 \mu\text{mol L}^{-1}$) em tampão B-R (pH 2,0).

Figura 28 - SWCSVs para concentrações de $0,51$ a $55,1 \mu\text{mol L}^{-1}$ AMI em $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ tampão B-R pH 2,0 no BDDE. Amplitude: 80 mV , frequência: 70 Hz , step: 8 mV , $t_{ac} : 15 \text{ s}$, $E_{ac} : 1,8 \text{ V}$. A inserção é o gráfico de regressão linear correspondente. A ampliação mostra os sinais mensuráveis obtidos nas menores concentrações.



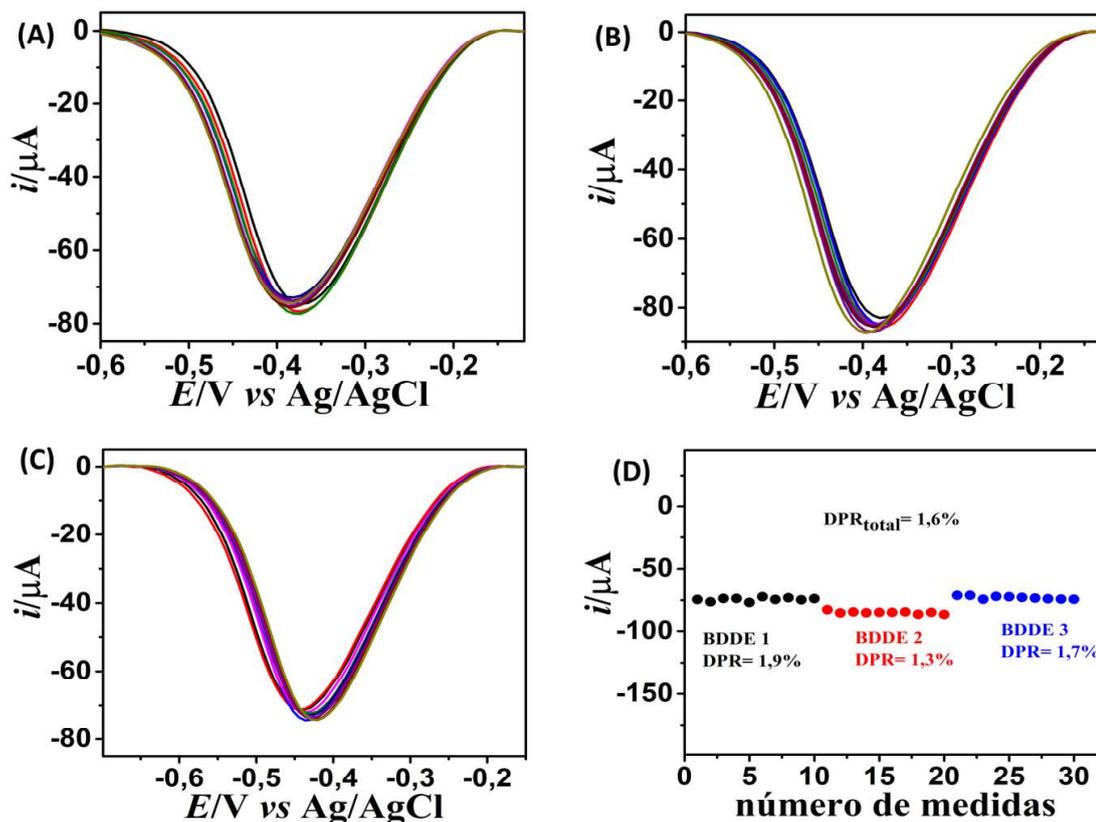
Como pode ser visto na Figura 28, as I_{pc} da AMI são proporcionais a concentração deste analito, sendo obtida uma curva analítica de calibração (inserção no Figura 28) para o processo Red_2 da AMI no BDDE (em $-0,3 \text{ V}$) com uma ampla faixa linear de $0,5$ a $55,1 \mu\text{mol L}^{-1}$ ($r^2 = 0,99$). A respectiva equação de regressão linear obtida é dada por:

$$-I_{pc_{Red_2}}/\mu\text{A} = -1,1 \times 10^{-7} (\pm 2,5 \times 10^{-7}) + 1,10 (\pm 0,01) \mu\text{A}/\mu\text{mol L}^{-1} \quad (21)$$

Considerando o desvio padrão das soluções tampão B-R pH 2,0 (branco) detectadas por SWCSV e a inclinação da curva analítica obtida na Figura 28, o LOD e LOQ foram estimados em $0,15 \mu\text{mol L}^{-1}$ e $0,50 \mu\text{mol L}^{-1}$, respectivamente. Como a WADA exige dos métodos analíticos um MRPL (mínimo LOD) de 200 ng / mL para aplicação no controle de dopagem de drogas diuréticas em urina humana, o LOD obtido (34 ng / mL) por SWCSV usando BDDE permite que o método proposto seja aplicado à análise antidopagem deste analito. Além disso, como pode ser visto na ampliação inserida na Figura 28, o menor sinal mensurável de AMI (voltamograma em preto) foi obtido para $0,51 \mu\text{mol L}^{-1}$ (115 ng / mL), o qual é ainda menor que MRPL exigido pela WADA para diuréticos, como seria o caso da AMI.

Os estudos de repetibilidade e reprodutibilidade do método proposto foram realizados usando o mesmo e três BDDEs diferentes, nos quais dez (10) voltamogramas consecutivos de soluções padrão AMI foram registrados por SWCSV sem pré-tratamento desses eletrodos de trabalho entre as medições (Figura 29 A-C).

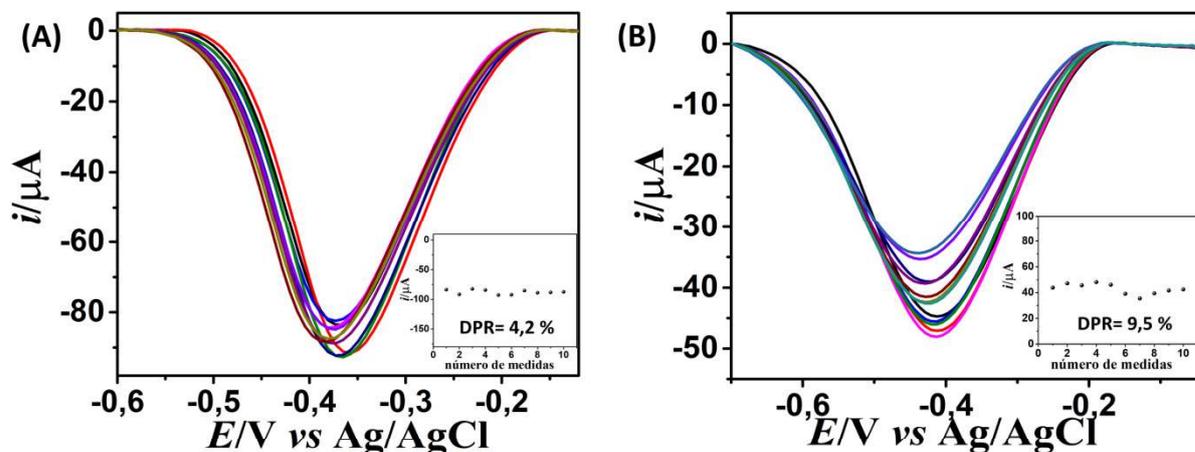
Figura 29 - SWCSVs registrados de 10 medições de $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ AMI em $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ tampão B-R pH 2,0 em três BDDEs diferentes mostrados em (A), (B) e (C). Os parâmetros eletroquímicos foram os mesmos da Figura 28. (D) Gráfico das correntes de pico vs número de medições realizadas em três BDDEs diferentes.



Como pode ser observado na Figura 29A-C, os E_{pc} da Red₂ da AMI praticamente não foram alterados usando um mesmo BDDE. Todavia, é possível notar um maior deslocamento do E_{pc} quando diferentes BDDE foram usados, cujo motivo pode ser devido à diferença no material de dopagem desses eletrodos de trabalho ou mesmo algum problema nos eletrodos de referência usados nesta investigação. Esse inconveniente no deslocamento do E_{pc} não apresenta um grande problema para realizar a triagem de AMI pelo método proposto, uma vez que esta mudança pode ser ajustada realizando uma análise prévia da solução padrão deste analito no BDDE.

No que tange aos DPRs obtidos das I_{pc} de AMI na Red₂ (Figura 29A-C), esses desvios foram menores que 2,0% ($N = 10$) para cada um dos BDDEs, indicando a possibilidade de reutilização do sensor eletroquímico proposto por pelo menos 10 vezes sem realizar nenhum pré-tratamento do eletrodo. Além disso, a Figura 29D mostra que a média das I_{pc} para Red₂ da AMI usando três BDDEs diferentes apresenta uma alta reprodutibilidade (intereletrodo) com um DPR de 1,6% ($N = 3$). O mesmo BDDE também foi avaliado em dias diferentes ($N = 10$) com pré-tratamento catódico e anódico entre as medições (Figura 30), mostrando um DPR razoável de 4,2% ($N = 10$) para I_{pc} da AMI quando foi usado tratamento catódico (Figura 30A) e um DPR de 9,5% ($N = 10$) quando foi usado tratamento anódico (Figura 30 B). Como pode ser observado na Figura 30, o pré-tratamento catódico do BDDE apresenta uma melhor estabilidade da resposta e, assim, uma maior repetibilidade do sinal. Desse modo, a detecção de AMI pelo método proposto apresenta uma alta estabilidade das respostas eletroquímicas para I_{pc} utilizando o mesmo ou diferentes BDDEs, indicando um grande potencial para aplicação na triagem deste analito em urina. Os estudos dos interferentes e aplicação do método proposto em urina são apresentados a seguir.

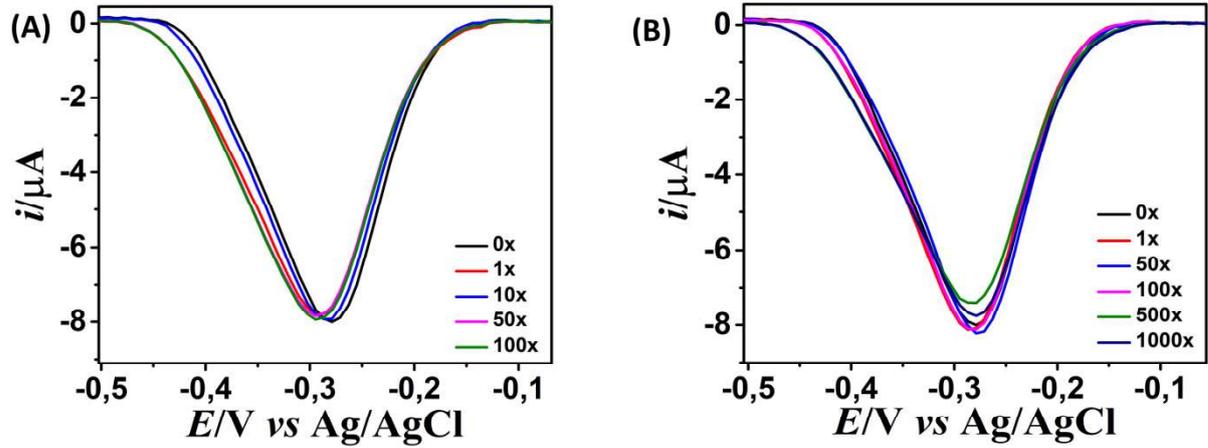
Figura 30 - SWCSVs de $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ AMI em tampão B-R $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 2,0 no mesmo BDDE em dias diferentes com tratamento catódico (A) e anódico (B). Os parâmetros eletroquímicos foram os mesmos da Figura 28. As inserções são os gráficos de I_p vs. número de medições realizadas em 10 dias diferentes.



4.4 Estudos de interferentes e adição e recuperação de AMI em amostras de urina

Devido à alta concentração de AA e AU na urina (LIMA *et al.*, 2018; MATOS *et al.*, 2000), esses compostos podem ser considerados os principais interferentes para uma detecção eletroquímica nessas amostras. Isso porque ambos são eletroativos, sendo relatado um processo de oxidação irreversível para AA ou AU usando vários eletrodos de trabalho (ABELLÁN-LLOBREGAT *et al.*, 2017, 2018; JUSTINO *et al.*, 2013; MATOS *et al.*, 2000), bem como no BDDE (GUEDES *et al.*, 2016; LIMA *et al.*, 2018; SANJUÁN *et al.*, ; ŠVORC *et al.*, 2017), o que também foi confirmado neste trabalho na Figura 24. Embora, o processo Red_2 da AMI permita detectar seletivamente este analito sem qualquer sobreposição com processos de oxidação de AA e AU no BDDE, como mostrado por CV (Figura 24A) e por SWCSV (Figura 24B), foi também investigado a resposta eletroquímica da AMI na presença de altas concentrações de AU (Figura 31A) e AA (Figura 31B).

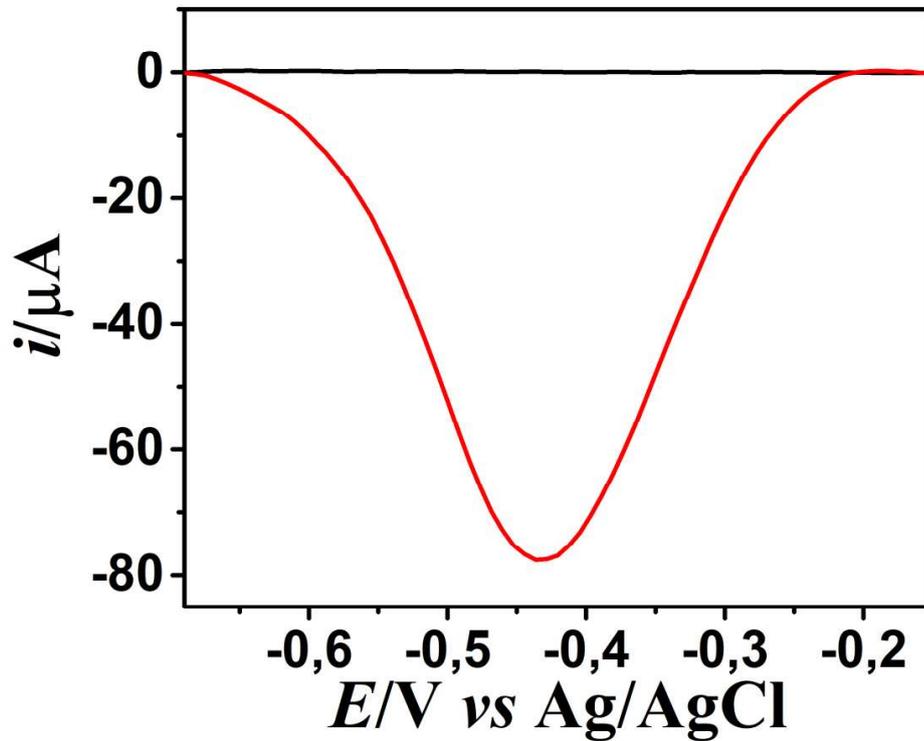
Figura 31 - Voltamogramas obtidos por SWCSV no BDDE em tampão B – R 0,1 mol L⁻¹ pH 2,0 contendo apenas 10 μmol L⁻¹ AMI antes (linhas pretas) e após a adição de diferentes razões de concentração para AMI: UA em (A) de 1: 1 a 1: 100; e para AMI: AA em (B) de 1: 1 a 1: 1000. Os parâmetros eletroquímicos foram os mesmos da Figura 28.



Como pode ser observado na Figura 31, o sinal de resposta eletroquímica do AMI permanece constante mesmo na presença de AU (Figura 31A) e AA (Figura 31B) em altas concentrações, indicando que não há interferência significativa para detecção de AMI no BDDE em concentrações até 100 e 1000 vezes maiores que AU e AA, respectivamente. Vale ressaltar que, soluções de AU em concentração maior que 100,0 μmol L⁻¹ foram precipitadas no eletrólito suporte (tampão BR 0,1 M pH 2,0) e, portanto, o AU na urina em concentração maior que 100 vezes à da AMI não é considerado um potencial interferente para a detecção desta droga diurética.

Estudos de adição e recuperação de AMI em amostra de urina humana também foram avaliados em voluntários saudáveis, que não ingeriram essa droga antes dessas análises. A Figura 32 mostra os voltamogramas obtidos por SWSCV no BDDE para uma amostra de urina sem (linha preta) e com adição de AMI (linha vermelha).

Figura 32. SWCSVs no BDDE em tampão B-R $0,1 \text{ molL}^{-1}$ pH 2,0 contendo amostras de urina (diluídas 10 vezes) sem (linha preta) e com adição de $10 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ AMI (linha vermelha). Os parâmetros eletroquímicos foram os mesmos da Figura 28 .



Como pode ser verificado na Figura 32, a urina humana investigada não apresentou nenhum processo de redução em torno de $-0,3 \text{ V}$ usando um BDDE (linha preta), o que sugere uma detecção seletiva de AMI nesta amostra biológica usando a Red_2 deste analito. Além disso, a adição de soluções padrão de AMI em amostras de urina humana apresentou ótimas recuperações, as quais foram próximas a 100%, conforme mostrado na Tabela 1, indicando ausência de efeito de matriz para detecção de AMI pelo método proposto.

Tabela 1 - Estudos de adição e recuperação da AMI em amostras de urina utilizando o método proposto.

Adicionado ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	Esperado ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	Encontrado ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	Recuperação (%)
0.0	0.0	0.0	--
10.0	10.0	9.89 (± 0.2)	98.9
25.0	25.0	25.3 (± 0.2)	101.0
40.0	40.0	39.7 (± 0.1)	99.21

A ausência de efeito de matriz permite fazer a determinação da AMI a partir da curva de calibração externa, não sendo necessário fazer uma calibração de adição de padrão para a quantificação do medicamento. Isso garante uma maior agilidade nas análises tornando o método mais rápido.

Vale ressaltar que a quantidade de AMI inalterado na urina pode ser encontrada entre 10,9 a 43,5 μmol , uma vez que cerca de 50% de uma dose oral é excretada dessa forma (PERALTA; FERNÁNDEZ; MASI, 2011). Desse modo, mesmo considerando uma diluição de 10 vezes para as amostras de urina, o sinal mensurável para detecção de AMI pelo método proposto ($0,5 \mu\text{mol L}^{-1}$, ampliação mostrada na Figura 28) é baixo o suficiente para possibilitar sua aplicação no controle de dopagem deste diurético. Além disso, conforme mencionado, o LOD obtido pelo método proposto está dentro dos MRPLs exigidos pela WADA para a determinação de diuréticos (WADA, 2019) como a AMI.

4.5 Comparações dos métodos eletroanalíticos para determinação de AMI

A Tabela 2 mostra uma comparação dos principais parâmetros analíticos obtidos para a determinação de AMI usando o método proposto e outros métodos eletroanalíticos.

Tabela 2 - Comparação dos métodos eletroanalíticos relatados para determinação de AMI com o método proposto.

Técnica	Eletrodo	Faixa linear/ (μmolL^{-1})	LOD/ (μmolL^{-1})	Amostra	Referência
DPP	DME	24-80	-	Farmacêutica	(MARTÍN <i>et al.</i> , 1999)
DPAdCSV	HMDE	25- 2.5×10^2	10	Farmacêutica	(EL-HEFNAWY <i>et al.</i> , 2004)
SWAdCSV	HMDE	2×10^{-3} - 2×10^{-1}	1.9×10^{-3}	Farmacêutica e biológica	(HAMMA M, 2004)
AdSDPV	NAF-CNT-GCE	9.07×10^{-3} -50.6	7.02×10^{-3}	Farmacêutica e biológica	(DESAI; SRIVASTAVA, 2012)
DPV	GCE	9.90-90.9	5.19	Biológica	(NASCIMENTO <i>et al.</i> , 2020)
DPV	Ds-DNA-PGE	0.75-240	0.5	Farmacêutica e biológica	(MIRMOMTAZ; ENSAFI; SOLEIMANIAN-ZAD, 2009)
DPV	CPE	2.6-18.4	1.13	Farmacêutica	(ZAYED; ARIDA, 2013)
DPV	SPE	0.33-22.8	0.18	Farmacêutica e biológica	(KHORSHED; KHAIRY; BANKS, 2019)
SWV	BDDE	8.7-125	0.09	Farmacêutica	(MORAES <i>et al.</i> , 2017)
BIA-MPA	BDDE	13.1- 697.8	0.57	Farmacêutica	(PEREIRA <i>et al.</i> , 2016)
SWCSV	BDDE	0.5-55.1	0.15	Biológica	Presente trabalho

Polarografia de pulso diferencial (DPP- do inglês *differential pulse polarography*); eletrodo de mercúrio suspenso (DME – do inglês *dropping mercury electrode*); voltametria de redissolução catódica adsortiva de pulso diferencial (DPAdCSV- do inglês *differential-pulse adsorptive cathodic stripping voltammetry*); voltametria de redissolução catódica adsortiva de onda quadradra (SWAdCSV- do inglês *square-wave adsorptive cathodic stripping voltammetry*); voltametria de redissolução adsortiva de pulso diferencial (AdSDPV – do

inglês *adsorptive stripping differential pulse voltammetry*); eletrodo de carbono vítreo modificado de filme de nanotubo-nanocompósito de Nafion-carbono (NAF-CNT-GCE- do inglês *Nafion-carbon nanotube-nanocomposite film modified glassy carbon electrode*); voltametria de pulso diferencial (DPV- do inglês *Differential pulse voltammetry*); Eletrodo de grafite lapiseira modificado com ds-DNA (Ds-DNA-PGE- do inglês *ds-DNA-modified pencil graphite electrode*); eletrodo de pasta de carbono (CPE - do inglês *carbon paste electrode*); eletrodo de carbono impresso (SPE - do inglês *screen-printed carbon electrode*); voltametria de onda quadrada (SWV – do inglês *square wave voltammetry*); análise de injeção em lote com amperometria de pulso múltiplo (BIA-MPA – do inglês *batch injection analysis system with multiple pulse amperometric*)

Conforme mostrado na Tabela 2, o método proposto exibe um LOD semelhante ou inferior aos reportados por alguns métodos eletroanalíticos, como no caso da utilização de sensores baseados em SPE, CPE e GCE. O menor LOD para detecção de AMI foi alcançado usando um eletrodo de mercúrio de trabalho com técnica de SWAdCSV (HAMMAM, 2004). No entanto, devido à toxicidade do mercúrio, o uso deste sensor como eletrodo de trabalho apresenta uma desvantagem ambiental. Um GCE modificado com nanotubos de carbono e nafion também apresenta um LOD inferior ao do sensor eletroquímico proposto. No entanto, o uso de um BDDE para aplicação no controle de dopagem pode ser mais atraente para a determinação de AMI devido à sua simplicidade e possibilidade de reutilização. Embora um sensor eletroquímico mais simples baseado em eletrodo impressos (SPE) descartáveis também seja relatado (Tabela 2) com uma boa sensibilidade para detecção de AMI, esses sensores geralmente não podem ser reutilizados e ainda são relativamente caros para uma aplicação em análises de rotina. Por outro lado, recentemente, estão sendo comercializados SPEs com eletrodos de trabalho baseados em um filme BDD, o que possibilita a reprodução do presente trabalho para um sistema de detecção eletroquímico de baixo custo com maior portabilidade e simplicidade de aplicação na triagem da AMI em urina.

Como também pode ser visto na Tabela 2, outros eletrodos de trabalho baseados em BDD foram relatados para detectar AMI (MORAES *et al.*, 2017; PEREIRA *et al.*, 2016). No entanto, esses relatórios têm usado diferentes técnicas eletroanalíticas, como SWV (MORAES *et al.*, 2017), e análise de injeção em lote com amperometria de pulso múltiplo (BIA-MPA) (PEREIRA *et al.*, 2016). Além disso, outros processos eletroquímicos foram utilizados por esses métodos para detecção de AMI no BDDE, os quais apresentaram LOD superior ao método proposto, bem como aplicação apenas em formulações farmacêuticas.

5 CONCLUSÕES

O presente trabalho apresentou, pela primeira vez, um completo estudo do comportamento eletroquímico da AMI, mostrando diferentes processos redox no BDDE. O produto gerado pelos processos de oxidação da AMI foram avaliados por técnicas de FTIR, sendo possível propor um mecanismo de reação para todos os processos redox deste diurético. Um processo de redução ainda não relatado para AMI foi demonstrado neste trabalho, permitindo a detecção seletiva e sensível desse diurético em amostras de urina por SWCSV. O desempenho analítico do método proposto proporcionou uma análise de triagem atraente com baixo LOD ($0,15 \mu\text{mol L}^{-1}$), alta reprodutibilidade e baixo custo para aplicação no controle de dopagem de AMI em amostras de urina. Portanto, o uso do BDDE com detecção por SWCSV demonstra ser uma alternativa, simples, sensível e seletiva para auxiliar exames *antidoping* da AMI, fornecendo uma identificação e quantificação preliminar deste diurético em urina humana.

REFERÊNCIAS

- ABELLÁN-LLOBREGAT, A.; VIDAL L.; RODRÍGUEZ-AMARO, R.; BERENGUER-MURCIA, Á.; CANALS, A.; MORALLÓN, E. Au-IDA microelectrodes modified with Au-doped graphene oxide for the simultaneous determination of uric acid and ascorbic acid in urine samples. **Electrochimica Acta**, v. 227, p. 275–284, 10 fev. 2017.
- ABELLÁN-LLOBREGAT, A.; VIDAL L.; RODRÍGUEZ-AMARO, R.; CANALS, A.; MORALLÓN, E. Evaluation of herringbone carbon nanotubes-modified electrodes for the simultaneous determination of ascorbic acid and uric acid. **Electrochimica Acta**, v. 285, p. 284–291, 20 set. 2018.
- AGUILAR-NAVARRO, M.; SALINERO, J. J.; MUÑOZ-GUERRA, J.; PLATA, M. M.; COSO, J. Sport-Specific Use of Doping Substances: Analysis of World Anti-Doping Agency Doping Control Tests between 2014 and 2017. **Substance Use and Misuse**, v. 55, n. 8, p. 1361–1369, 2020.
- AHMED, S.; ATIA, N. N.; MOHAMED, N. A. Dual separation mode for simultaneous determination of antihypertensive drug combinations by high-performance liquid chromatography. **Talanta**, v. 84, n. 3, p. 666–672, 2011.
- AL GHOBAIN, M.; KONBAZ, M. S.; ALMASSAD, A.; ALSULTAN, A.; AL SHUBAILI, M.; ALSHABANH, O. Prevalence, knowledge and attitude of prohibited substances use (doping) among Saudi sport players. **Substance Abuse: Treatment, Prevention, and Policy**, v. 11, n. 1, p. 4–9, 2016.
- ALLAFCHIAN, A.; ENSAFI, A. A. A DNA-Based coated wire membrane sensor for selective determination of amiloride in pharmaceutical compounds, plasma and urine. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 21, n. 3, p. 564–570, 2010.
- ANDRIEUX, C. P.; BLOCMAN, C.; DUMAS-BOUCHIAT, J. M.; SAVEANT ET AL, J. M. Heterogeneous and Homogeneous Electron Transfers to Aromatic Halides. An Electrochemical Redox Catalysis Study in the Halobenzene and Halopyridine Series. **Journal of the American Chemical Society**, v. 101, n. 13, p. 3431–3441, 1 jun. 1979.
- ARIDA, H. A.; MAGHRABI, I. A.; ZAYED, S. I. Development of new thin-film micro-sensor for potentiometric determination of amiloride. **International Journal of Electrochemical Science**, v. 9, n. 6, p. 2728–2736, 2014.
- BARD, A. J.; FAULKNER, L. R. **Electrochemical Methods Fundamentals and applications**. 2^a ed. v. 2, 2000.
- BRETT, C. M. A.; BRETT, A. M. O. **electrochemistry: Principles, methods, and applications**, v. 44, 1993.
- CADWALLADER, A. B.; DE LA TORRE, X.; TIERI, A.; BOTRÈ, F. The abuse of diuretics as performance-enhancing drugs and masking agents in sport doping: Pharmacology, toxicology and analysis. **British Journal of Pharmacology**, v. 161, n. 1, p. 1–16, 2010.
- CHEN, W.; XIONG, Y.; WANG, W.; WU, T.; LI, L.; KANG, Q.; DU Y. Assembly of a

UV-LED induced fluorescence system for rapid determination of amiloride in pharmaceutical tablet and human serum. **Talanta**, v. 203, n. April, p. 77–82, 2019.

DE WILDE, L.; ROELS, K.; POLET, M.; EENOO, P.V.; DEVENTER, K. Identification and confirmation of diuretics and masking agents in urine by turbulent flow online solid-phase extraction coupled with liquid chromatography-triple quadrupole mass spectrometry for doping control. **Journal of Chromatography A**, v. 1579, p. 31–40, 2018.

DESAI, P. B.; SRIVASTAVA, A. K. Determination of amiloride at Nafion-CNT-nano-composite film sensor employing adsorptive stripping differential pulse voltammetry. **Sensors and Actuators, B: Chemical**, v. 169, p. 341–348, 2012.

DOMÍNGUEZ-VIDAL, A.; ORTEGA-BARRALES, P.; MOLINA-DÍAZ, A. Fast flow-injection fluorimetric determination of amiloride by using a solid sensing zone. **Talanta**, v. 56, n. 6, p. 1005–1013, 2002.

DOS SANTOS, W. T. P.; DE ALMEIDA, E. G. N.; FERREIRA, H. E. A.; GIMENES, D. T.; RICHTER, E. M. Simultaneous flow injection analysis of paracetamol and ascorbic acid with multiple pulse amperometric detection. **Electroanalysis**, v. 20, n. 17, p. 1878–1883, 2008.

DOS SANTOS, W. T. P.; AMIN, H. M. A.; COMPTON, R. G. A nano-carbon electrode optimized for adsorptive stripping voltammetry: Application to detection of the stimulant selegiline in authentic saliva. **Sensors and Actuators, B: Chemical**, v. 279, n. July 2018, p. 433–439, 2019.

DOS SANTOS, W. T. P.; COMPTON, R. G. A simple method to detect the stimulant modafinil in authentic saliva using a carbon-nanotube screen-printed electrode with adsorptive stripping voltammetry. **Sensors and Actuators, B: Chemical**, v. 285, n. November 2018, p. 137–144, 2019.

EL-HEFNAWY, G. B.; EL-HALLAG, I. S.; GHONEIM, E. M.; GHONEIM, M. M. Electrochemical behavior and determination of amiloride drug in bulk form and pharmaceutical formulation at mercury electrodes. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 34, n. 5, p. 899–907, 2004.

ENSAFI, A. A.; ALLAFCHIAN, A. R. Novel and selective potentiometric membrane sensor for amiloride determination in pharmaceutical compounds and urine. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 47, n. 4–5, p. 802–806, 2008.

EVANS, D. H.; JIMENEZ, P. J.; KELLY, M. J. Reversible dimerization of phenoxyl radicals formed by anodic oxidation of phenolates. A quantitative study by cyclic voltammetry. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 163, n. 1–2, p. 145–157, 23 mar. 1984.

FARMACOPEIA BRASILEIRA. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária- ANVISA. Volume II – Monografias Insumos Farmacêuticos e Especialidades**. 6^a edição ed. [s.l: s.n.].

FATIBELLO-FILHO, O. Equilíbrio químico: aplicações em química analítica. São Carlos: EdUFSCar, 2016.

FATOUROS, N.; KRULIC, D. Contribution to the study of square wave voltammetry in the case of simple irreversible reactions. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 443, n. 2, p. 262–265, 1998.

GOEBEL, C.; TROUT, G. J.; KAZLAUSKAS, R. Rapid screening method for diuretics in doping control using automated solid phase extraction and liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, v. 502, n. 1, p. 65–74, 2004.

GOODMAN, G. **As bases farmacológicas da terapêutica**. 10^a edição ed. 2005.

GUEDES, T. D. J.; ALECRIM, M. F.; OLIVEIRA, F. M.; LIMA, A. B.; BARBOSA, S. L.; DOS SANTOS, W. T. P. Determination of prazosin in pharmaceutical samples by flow injection analysis with multiple-pulse amperometric detection using boron-doped diamond electrode. **Journal of Solid State Electrochemistry**, 2016.

GUMIENICZEK, A.; TRĘBACZ, H.; KOMSTA, Ł.; ATRAS, A.; JOPA, B.; SZUMIŁO, M.; POPIOŁEK, Ł. DSC, FT-IR, NIR, NIR-PCA and NIR-ANOVA for determination of chemical stability of diuretic drugs: Impact of excipients. **Open Chemistry**, v. 16, n. 1, p. 116–132, 2 mar. 2018.

HAMMAM, E. Behavior and quantification studies of amiloride drug using cyclic and square-wave adsorptive stripping voltammetry at a mercury electrode. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 34, n. 5, p. 1109–1116, 2004.

JUSTINO, D. D.; LAGE, A. L. A.; SOUTO, D. E. P.; SILVA, J. V.; DOS SANTOS, W. T. P.; LUZ, R. C. S.; DAMOS, F. S. Study of the effects of surface pK_a and electron transfer kinetics of electroactive 4-nitrothiophenol/4-mercaptobenzoic acid binary SAM on the simultaneous determination of epinephrine and uric acid. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 703, p. 158–165, 15 ago. 2013.

KHORSHED, A. A.; KHAIRY, M.; BANKS, C. E. Electrochemical determination of antihypertensive drugs by employing costless and portable unmodified screen-printed electrodes. **Talanta**, v. 198, n. February, p. 447–456, 2019.

LIMA, A. B.; DE OLIVEIRA, F. M.; GUEDES, T. J.; SOUSA, R. M. F.; MUNOZ, R. A. A.; DOS SANTOS, W. T. P. Altered electrochemistry of oxcarbazepine on cathodically treated boron-doped diamond electrode: Selective detection by pulsed amperometric detection coupled to flow-injection analysis. **Electrochimica Acta**, v. 260, n. 2018, p. 564–570, 2018.

LIMA, A. B.; DOS SANTOS, W. T. P.; COMPTON, R. G. Simple and Sensitive Determination of Sibutramine in Slimming Tea Beverages Using a Carbon Screen-printed Electrode with Adsorptive Stripping Voltammetry. **Electroanalysis**, v. 31, n. 5, p. 975–980, 2019.

LOURENCAO, B. C.; BROCCENSCHI, R. F.; MEDEIROS, R. A.; FATIBELLO-FILHO, O.; ROCHA-FILHO, R. C. Analytical Applications of Electrochemically Pretreated Boron-Doped Diamond Electrodes. **ChemElectroChem**, v. 7, n. 6, p. 1291–1311, 2020.

M'HALLA, F.; PINSON, J.; SAVEANT, J. M. Hydrogen atom abstraction and solvent

involvement in the electrochemistry of haloaromatics. Reduction of 4-bromobenzophenone in dimethylsulfoxide. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 89, n. 2, p. 347–361, 25 maio 1978.

MARTÍN, M. E.; HERNÁNDEZ, O. M.; JIMÉNEZ, A. I.; ARIAS, J. J.; JIMÉNEZ, F. Partial least-squares method in analysis by differential pulse polarography. Simultaneous determination of amiloride and hydrochlorothiazide in pharmaceutical preparations. **Analytica Chimica Acta**, v. 381, n. 2–3, p. 247–256, 1999.

MASUI, M.; OHMORI, H. Anodic oxidation of Schiff's bases. Part II. Anodic pyridination of N-benzylidene-p-anisidines in acetonitriie. **Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 2**, n. 8, p. 1112–1117, 1973.

MATOS, R. C.; AUGELLI, M. A.; LAGO, C. L.; ANGNES, L. Flow injection analysis-amperometric determination of ascorbic and uric acids in urine using arrays of gold microelectrodes modified by electrodeposition of palladium. **Analytica Chimica Acta**, v. 404, n. 1, p. 151–157, 10 jan. 2000.

MAZZEO, F.; D'ELIA, F.; RAIOLA, G. Drugs in sport: Doping development and ethical analysis. **Sport Science**, v. 11, n. 1, p. 106–112, 2018.

MAZZO, D. J. Amiloride Hydrochloride. **Analytical Profiles of Drug Substances and Excipients**, v. 15, n. C, p. 1–34, 1 jan. 1986.

MIRMOMTAZ, E.; ENSAFI, A. A.; SOLEIMANIAN-ZAD, S. Determination of amiloride using a ds-DNA-modified pencil graphite electrode based on guanine and adenine signals. **Electrochimica Acta**, v. 54, n. 3, p. 1141–1146, 2009.

MORAES, J. T.; SALAMANCA-NETO, C. A. R.; ŠVORC, L.; SARTORI, E. R. Advanced sensing performance towards simultaneous determination of quaternary mixture of antihypertensives using boron-doped diamond electrode. **Microchemical Journal**, v. 134, p. 173–180, 2017.

MOREIRA, V.; MOREAU, R. L. M. Liquid chromatographic screening test for some diuretics of doping interest in human urine. **Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies**, v. 28, n. 17, p. 2753–2768, 2005.

MORRA, V.; DAVIT, P.; CAPRA, P.; VINCENTI, M.; DI STILO, A.; BOTRÈ, F. Fast gas chromatographic/mass spectrometric determination of diuretics and masking agents in human urine. Development and validation of a productive screening protocol for antidoping analysis. **Journal of Chromatography A**, v. 1135, n. 2, p. 219–229, 2006.

NASCIMENTO, T. O.; LEITE, F. R. F.; MOURÃO, H. A. J. L.; MALAGUTTI, A. R. Development of an electroanalytical methodology using differential pulse voltammetry for amiloride determination. **Journal of Solid State Electrochemistry**, v. 24, n. 8, p. 1735–1741, 2020.

OLIVEIRA, S. C. B.; OLIVEIRA-BRETT, A. M. Voltammetric and electrochemical impedance spectroscopy characterization of a cathodic and anodic pre-treated boron doped diamond electrode. **Electrochimica Acta**, v. 55, n. 15, p. 4599–4605, 2010.

PERALTA, C. M.; FERNÁNDEZ, L. P.; MASI, A. N. A novel application of immobilization on membranes for the separation and spectrofluorimetric quantification of amiloride and furosemide in pharmaceutical samples. **Analytica Chimica Acta**, v. 661, n. 1, p. 85–90, 2010.

PERALTA, C. M.; FERNÁNDEZ, L. P.; MASI, A. N. Solid phase extraction using nylon membranes with fluorescence detection as a fast and sensitive method for Amiloride and Furosemide determination in urine samples. **Microchemical Journal**, v. 98, n. 1, p. 39–43, 2011.

PEREIRA, P. F.; DA SILVA, W. P.; MARRA, M. C.; MUNOZ, R. A. A.; RICHTER, E. M. A high-throughput BIA-MPA method for the simultaneous determination of amiloride and furosemide. **Analytical Methods**, v. 8, n. 44, p. 7959–7965, 2016.

PROTTI, M.; MANDRIOLI, R.; MERCOLINI, L. Perspectives and strategies for anti-doping analysis. **Bioanalysis**, v. 11, n. 3, p. 149–152, 2019.

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

SALAZAR-BANDA, G. R.; DE CARVALHO, A. E.; ANDRADE, L.S.; ROCHA-FILHO, R. C.; AVACA, L. A. On the activation and physical degradation of boron-doped diamond surfaces brought on by cathodic pretreatments. **Journal of Applied Electrochemistry**, v. 40, n. 10, p. 1817–1827, 2010.

SANJUÁN, I.; BROTONS, A.; HERNÁNDEZ-IBÁÑEZ, N.; FOSTER, C. W.; BANKS, C. E.; INIESTA, J. **Boron-doped diamond electrodes explored for the electroanalytical detection of 7-methylguanine and applied for its sensing within urine samples.** *Electrochimica Acta*. Anais...Elsevier Ltd, abr.

SHAH, J. V.; SHAH, P. A.; SANYAL, M.; SHRIVASTAV, P. S. Simultaneous quantification of amiloride and hydrochlorothiazide in human plasma by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **Journal of Pharmaceutical Analysis**, v. 7, n. 5, p. 288–296, 2017.

SKOOG et al. **Fundamentos de Química Analítica**, v. 15, 2007.

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

SOUZA, D. DE; MACHADO, S. A. S.; AVACA, L. A. Voltametria de onda quadrada. Primeira parte: aspectos teóricos. **Química Nova**, v. 26, n. 1, p. 81–89, 2003.

SOUZA, G. A. Identificação e determinação de novas substâncias psicoativas em amostras de selos por técnicas voltamétricas usando eletrodo de diamante dopado com boro. Dissertação

Programa de Pós-Graduação em Química. Universidade Federal Dos Vales Do Jequitinhonha E Mucuri, Diamantina, 2018.

SUN, Q.; SEVER, P. Amiloride: A review. **JRAAS - Journal of the Renin-Angiotensin-Aldosterone System**, v. 21, n. 4, 2020.

ŠVORC, L.; BOROVSÁ, K.; CINKOVÁ, KR.; STANKOVIC, D. M.; PLANKOVÁ, A. Advanced electrochemical platform for determination of cytostatic drug flutamide in various matrices using a boron-doped diamond electrode. **Electrochimica Acta**, v. 251, p. 621–630, 10 out. 2017.

TANG, J.; LI, X.; FENG, Y.; LIANG, B. Simultaneous determination of amiloride and hydrochlorothiazide in a compound tablet by diffuse reflectance spectroscopy and chemometrics. **Journal of Applied Spectroscopy**, v. 83, n. 4, 2016.

TEÓFILO, K. R. Determinação de 3,4-metilenodioximetanfetamina (ecstasy) por voltametria de pulso diferencial em comprimidos e saliva utilizando o eletrodo de diamante dopado com boro. Dissertação, Pós-Graduação em Química. Universidade Dos Vales Do Jequitinhonha E Mucuri, Diamantina, 2018.

VLAD, R. A.; HANCU, G.; POPESCU, G. C.; LUNGU, I. A. Doping in sports, a never-ending story? **Advanced Pharmaceutical Bulletin**, v. 8, n. 4, p. 529–534, 2018.

WADA. WADA Technical Document-TD2019MRPL Minimum Required Performance Levels For Detection And Identification Of Non-Threshold Substances. Disponível em: <<https://www.wada-ama.org/en/what-we-do/science-medical/laboratories>>. Acesso em: 29 jun. 2021.

WADA. The 2021 WADA Prohibited List. **World Anti-Doping**, n. JA, p. 1–24, 2021a.

WADA. World Anti-Doping Code. **World Anti-Doping**, p. 1–184, 2021b.

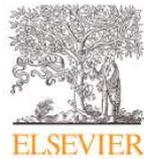
WANG, J. **Analytical electrochemistry**. 2^a ed. v. 38, 2001.

ZAYED, S. I. M.; ARIDA, H. A. M. Preparation of carbon paste electrodes and its using in voltammetric determination of amiloride hydrochloride using in the treatment of high blood pressure. **International Journal of Electrochemical Science**, v. 8, n. 1, p. 1340–1348, 2013.

PRODUÇÕES CIENTÍFICAS DURANTE REALIZAÇÃO DO MESTRADO

Artigos completos publicados em periódicos

Electrochimica Acta 373 (2021) 137891



Contents lists available at [ScienceDirect](https://www.sciencedirect.com)

Electrochimica Acta

journal homepage: www.elsevier.com/locate/electacta



Altered electrochemistry of amiloride drug on boron-doped diamond electrode: Rapid and selective detection in urine by square-wave cathodic stripping voltammetry for application in doping control



Karla A.O. Souza^a, Ana M.F. Nunes^a, Dilton M. Pimentel^b, Rodrigo M. Verly^b, Eric S. Gil^c, Andréa R. Malagutti^a, Wallans T.P. dos Santos^{a,*}

^a Departamento de Farmácia, Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, Campus JK, Diamantina, Minas Gerais 39100000, Brazil

^b Departamento de Química, Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, Campus JK, Diamantina, Minas Gerais 39100000, Brazil

^c Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Goiás (UFG), Goiânia, GO 74605-220, Brazil

Fator de impacto: 6.215

<https://doi.org/10.1016/j.electacta.2021.137891>

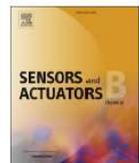
Sensors & Actuators: B. Chemical 344 (2021) 130229



Contents lists available at [ScienceDirect](https://www.sciencedirect.com)

Sensors and Actuators: B. Chemical

journal homepage: www.elsevier.com/locate/snb



Rapid and simple voltammetric screening method for Lysergic Acid Diethylamide (LSD) detection in seized samples using a boron-doped diamond electrode



Dilton M. Pimentel^a, Luciano C. Arantes^b, Luan M. Santos^a, Karla A.O. Souza^c, Rodrigo M. Verly^a, Sandro L. Barbosa^c, Wallans T.P. dos Santos^{c,*}

^a Departamento de Química, Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, 39100-000, Diamantina, MG, Brazil

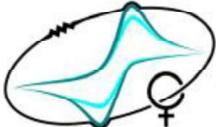
^b Seção de Perícias e Análises Laboratoriais, Instituto de Criminalística, Polícia Civil do Distrito Federal, 70610-907, Brasília, DF, Brazil

^c Departamento de Farmácia, Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, 39100-000, Diamantina, MG, Brazil

Fator de impacto: 7.100

<https://doi.org/10.1016/j.snb.2021.130229>

Trabalhos apresentados em eventos científicos



II Fronteiras em eletroquímica e eletroanalítica:
avangos realizados por jovens Mulheres cientistas

II FRONTIERS IN ELECTROCHEMISTRY AND ELECTROANALYSIS: ADVANCES MADE BY YOUNG FEMALE SCIENTISTS

WE CERTIFY THAT THE WORK ENTITLED

Altered electrochemistry of amiloride drug on boron-doped diamond electrode: Selective and sensitive detection in urine by square-wave cathodic stripping voltammetry for application in doping control

was presented by Karla Aparecida de Oliveira Souza in the electronic poster section of the *II Frontiers in Electrochemistry and Electroanalysis: Advances Made by Young Female Scientists*, held between the 11th and 12th of February 2021.

Brazil, March 07th 2021.

Maiara O. Salles
Prof. Dr. Maiara oliveira Salles
General Chair

Cecilia de Carvalho Castro e Silva
Prof. Dr. Cecilia de Carvalho Castro e Silva
General Chair



UNIVERSIDADE FEDERAL
DO RIO DE JANEIRO



instituto de química
Universidade Federal do Rio de Janeiro

43ª REUNIÃO ANUAL
VIRTUAL DA SBQ
DE 5 A 16 DE OUTUBRO/2020

Certificamos que o trabalho intitulado:
Altered Electrochemistry of Amiloride Drug on Boron-Doped Diamond Electrode: Studies for Selective Detection in Urine by Square Wave Voltammetry and Application in the Doping Control

De autoria de
Karla Aparecida de Oliveira Souza, Ana Mara Fonseca, Dilton Martins Pimentel, Andréa Renata Malagutti, Wallans Torres Pio dos Santos

foi submetido, aprovado e apresentado na divisão de *Eletroquímica e Eletroanalítica - ELE* como *Sessão Coordenada PG - Pós Graduando* da 43ª Reunião Anual Virtual da SBQ, que ocorreu nos dias 5 a 16 de outubro de 2020.

Secretaria Geral da SBQ
Presidente da Comissão Organizadora da 43ª RASBQ

Certification by Galoá

