



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"

Felipe Fantinato Hudari

SENSORES VOLTAMÉTRICOS BASEADOS EM ELETRODOS  
COMPÓSITOS E CARBONO VÍTREO MODIFICADOS COM GRAFENO,  
NANOTUBOS DE CARBONO E PARTÍCULAS MAGNÉTICAS E ELETRODO  
DE  $\text{TiO}_2$ NT AUTODOPADO PARA A DETERMINAÇÃO DE DIURÉTICOS EM  
FLUÍDOS BIOLÓGICOS

---

Araraquara

2019

Felipe Fantinato Hudari

SENSORES VOLTAMÉTRICOS BASEADOS EM ELETRODOS  
COMPÓSITOS E CARBONO VÍTREO MODIFICADOS COM GRAFENO,  
NANOTUBOS DE CARBONO E PARTÍCULAS MAGNÉTICAS E ELETRODO  
DE TiO<sub>2</sub>NT AUTODOPADO PARA A DETERMINAÇÃO DE DIURÉTICOS EM  
FLUÍDOS BIOLÓGICOS

Tese apresentada ao Instituto de Química da  
Universidade Estadual Paulista (Campus de Araraquara)  
para obtenção do Título de Doutor em Química

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria Valnice Boldrin Zanoni

---

Araraquara

2019

FICHA CATALOGRÁFICA

H883s Hudari, Felipe Fantinato  
Sensores voltamétricos baseados em eletrodos compósitos e carbono vítreo modificados com grafeno, nanotubos de carbono e partículas magnéticas e eletrodo de TiO<sub>2</sub>NT autodopado para a determinação de diuréticos em fluídos biológicos / Felipe Fantinato Hudari. – Araraquara : [s.n.], 2019  
127 f. : il.

Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Química

Orientador: Maria Valnice Boldrin Zanoni

1. Análise eletroquímica. 2. Diuréticos. 3. Eletrodo de carbono. 4. Dopagem em esportes. 5. Quimiometria. I. Título.

Elaboração: Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação  
Biblioteca do Instituto de Química, Unesp, câmpus de Araraquara

## CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: "Sensores voltamétricos baseados em eletrodos compósitos e carbono vítreo modificados com grafeno, nanotubos de carbono e partículas magnéticas e eletrodo de TiO<sub>2</sub>NT autodopado para a determinação de diuréticos em fluidos biológicos"

**AUTOR: FELIPE FANTINATO HUDARI**

**ORIENTADORA: MARIA VALNICE BOLDRIN**

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Doutor em QUÍMICA, pela Comissão Examinadora:



Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. HIDEKO YAMANAKA  
Departamento de Química Analítica / Instituto de Química - UNESP - Araraquara




Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. SONIA MARIA ALVES JORGE  
Departamento de Química e Bioquímica / Instituto de Biociências - UNESP - Botucatu



Prof. Dr. LEONARDO LATARO PAIM  
Departamento de Engenharia de Energia / Campus Experimental de Rosana - UNESP - Rosana



Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. SILVIA HELENA PIRES SERRANO  
Departamento de Química Fundamental / Instituto de Química - USP - São Paulo



Prof. Dr. MAGNO APARECIDO GONÇALVES TRINDADE  
Departamento de Química / Faculdade de Ciências Exatas e Tecnológicas - UFGD - Dourados

Araraquara, 28 de fevereiro de 2019

## DADOS CURRICULARES

### 1. DADOS PESSOAIS

**Nome:** Felipe Fantinato Hudari

**Nacionalidade:** Brasileiro

**Data de Nascimento:** 08/05/1990

**Naturalidade:** São José do Rio Preto

**Email:** felipe\_fhudari@hotmail.com

### 2. ENDEREÇO PROFISSIONAL

**Logradouro:** Rua Professor Francisco Degni, nº55

**CEP:** 14801-970

UNESP - Instituto de Química de Araraquara

Departamento de Analítica - Grupo de Eletroanalítica

Araraquara - São Paulo - Brasil

### 3. FORMAÇÃO ACADÊMICA

**2014-2019** Doutorado em Química Analítica.

Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP –  
Araraquara/SP.

Título: Sensores voltamétricos baseados em eletrodos compósitos e carbono vítreo modificados com grafeno, nanotubos de carbono e partículas magnéticas e eletrodo de TiO<sub>2</sub>NT autodopado para a determinação de diuréticos em fluídos biológicos.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria Valnice Boldrin Zanoni.

**2013 – 2014** Mestrado em Química Analítica.

Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP –  
Araraquara/SP.

Título: Eletrodos impressos descartáveis e de carbono vítreo modificados com grafeno e compósito de nanotubos de carbono-quitosana aplicados na determinação de corantes de cabelo.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria Valnice Boldrin Zanoni.

Co-orientador: Dr. Lucio César de Almeida.

**2009 – 2012** Graduação em Química Bacharel.

Universidade Estadual de Londrina, UEL – Londrina/PR

Título: Determinação voltamétrica de ácido úrico e n-acetil-p-aminofenol na presença de surfactante catiônico utilizando eletrodo de pasta de nanotubo de carbono.

Orientador: Prof. Dr. César Ricardo Teixeira Tarley.

#### **4. FORMAÇÃO COMPLEMENTAR**

**2016** – Avanços em Química Analítica e Bioenergia

**2013** – Métodos eletroquímicos de análises.

**2013** – Espectroscopia de impedância eletroquímica.

**2012** – RMN Aplicado e materiais.

**2011** – Cromatografia.

#### **5. PRODUÇÕES**

##### **5.1. Artigos completos publicados em periódicos**

1. Moraes, Paloma Bueno; HUDARI, FELIPE FANTINATO; Silva, João Pedro; ZANONI, MARIA VALNICE BOLDRIN. Enhanced Detection of Ponceau 4R Food Dye by Glassy Carbon Electrode Modified with Reduced Graphene Oxide. **JOURNAL OF THE BRAZILIAN CHEMICAL SOCIETY**, v. 29, p. 1237-1244, 2018.

2. BRITO, JULIANA FERREIRA DE; HUDARI, FELIPE FANTINATO; ZANONI, MARIA VALNICE BOLDRIN. Photoelectrocatalytic performance of nanostructured p-n junction NtTiO<sub>2</sub>/NsCuO electrode in the selective conversion of CO<sub>2</sub> to methanol at low bias potentials. **Journal of CO<sub>2</sub> Utilization**, v. 24, p. 81-88, 2018.

3. HUDARI, FELIPE F.; BESSEGATO, GUILHERME G.; BEDATTY FERNANDES, FLÁVIO C.; ZANONI, MARIA V. B.; BUENO, PAULO R.

Reagentless Detection of Low-Molecular-Weight Triamterene Using Self-Doped TiO<sub>2</sub> Nanotubes. **ANALYTICAL CHEMISTRY**, v. 90, p. 7651-7658, 2018.

4. HUDARI, FELIPE FANTINATO; ZANONI, MARIA VALNICE BOLDRIN. A glassy carbon electrode modified with reduced graphene oxide for sensitive determination of bumetanide in urine at levels required for doping analysis. **MICROCHIMICA ACTA**, p. 4117-4124, 2017.

5. BESSEGATO, GUILHERME GARCIA; HUDARI, FELIPE FANTINATO; ZANONI, MARIA VALNICE BOLDRIN. Self-doped TiO<sub>2</sub> nanotube electrodes: A powerful tool as a sensor platform for electroanalytical applications. **ELECTROCHIMICA ACTA**, v. 235, p. 527-533, 2017.

6. HUDARI, FELIPE FANTINATO; SOUZA, JOÃO CARLOS; ZANONI, MARIA VALNICE BOLDRIN. Adsorptive stripping voltammetry for simultaneous determination of hydrochlorothiazide and triamterene in hemodialysis samples using a multi-walled carbon nanotube-modified glassy carbon electrode. **TALANTA**, v. 179, p. 652-657, 2017.

7. HUDARI, FELIPE FANTINATO; COSTA FERREIRA, SERGIO LUIS; ZANONI, MARIA VALNICE BOLDRIN. Multi-responses Methodology Applied in the Electroanalytical Determination of Hair Dye by Using Printed Carbon Electrode Modified with Graphene. **Electroanalysis**, v. 28, p. 1085-1092, 2016.

8. HUDARI, FELIPE FANTINATO; DA SILVA, BIANCA FERREIRA; PIVIDORI, MARIA ISABEL; ZANONI, MARIA VALNICE BOLDRIN. Voltammetric sensor based on magnetic particles modified composite electrode for determination of triamterene in biological sample. **Journal of Solid State Electrochemistry**, v. 20, p. 2491-2501, 2016.

9. DE OLIVEIRA, RICARDO; HUDARI, FELIPE; FRANCO, JEFFERSON; ZANONI, MARIA. Carbon Nanotube-Based Electrochemical Sensor for the Determination of Anthraquinone Hair Dyes in Wastewaters. **Chemosensors**, v. 3, p. 22-35, 2015.

10. ZANONI, THALITA B.; HUDARI, FELIPE; MUNNIA, ARMELLE; PELUSO, MARCO; GODSCHALK, ROGER W.; ZANONI, MARIA VALNICE B.; DEN HARTOG, GERTJAN J.M.; BAST, AALT; BARROS, SILVIA B.M.; MARIA-ENGLER, SILVYA S.; HAGEMAN, GEJA J.; DE OLIVEIRA, DANIELLE PALMA. The oxidation of *p*-phenylenediamine, an ingredient used for permanent hair dyeing purposes, leads to the formation of hydroxyl radicals: Oxidative stress and DNA damage in human immortalized keratinocytes. **Toxicology Letters**, v. 239, p. 194-204, 2015.

11. Eduardo Henrique Duarte; William Pereira dos Santos; Felipe Fantinato Hudari; José Luiz Bott Neto; Elen Romão Sartori; Luiz Henrique Dall'antonia; Arnaldo César Pereira; César Ricardo Teixeira Tarley. A highly improved method for sensitive determination of amitriptyline in pharmaceutical formulations using an unmodified carbon nanotube electrode in the presence of sulfuric acid. **Talanta** (Oxford), v. 127, p. 26-32, 2014.

12. Felipe Fantinato Hudari; Lucio César de Almeida; Bianca Ferreira da Silva, Maria Valnice Boldrin Zanoni. Voltammetric sensor for simultaneous determination of *p*-phenylenediamine and resorcinol in permanent hair dyeing and tap water by composite carbon nanotubes/chitosan modified electrode. **Microchemical Journal**, v. 116, p. 261-268, 2014.

13. Felipe Fantinato Hudari; Eduardo Henrique Duarte; Arnaldo César Pereira, Luiz Henrique Dall'antonia; Lauro Tatsuo Kubota; César Ricardo Teixeira Tarley. Voltammetric method optimized by multi-response assays for the simultaneous measurements of uric acid and acetaminophen in urine in the presence of surfactant using MWCNT paste electrode. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 696, p. 52-58, 2013.



## **5.2. Capítulos de livros publicados**

1. FELIPE FANTINATO HUDARI; Michelle Fernanda Brugnera; MARIA VALNICE BOLDRIN ZANONI. Advances and Trends in Voltammetric Analysis of Dyes. In: InTech. (Org.). Applications of Voltammetric Analysis. 1ed.: InTech, 2017, p. 75-108.

2. HUDARI, F. F.; ZANONI, THALITA B.; CORREA, G. T.; DE OLIVEIRA, DANIELLE PALMA; ZANONI, MARIA VALNICE B. Corantes de cabelo. In: Zanoni, Maria V. Boldrin e Yamanaka, Hideko. (Org.). Corantes: caracterização química, toxicológica, métodos de detecção e tratamento. 1ed.São Paulo: Cultura Acadêmica, 2016, p. 87-104.

3. ROCHA, C. G.; ULIANA, C. V.; HUDARI, F. F.; ZANONI, MARIA VALNICE B.; YAMANAKA, H. Eletroanálise de corantes. In: Zanoni, Maria V. Boldrin e Yamanaka, Hideko. (Org.). Corantes: caracterização química, toxicológica, métodos de detecção e tratamento. 1ed.São Paulo: Cultura Acadêmica, 2016, v. 1, p. 159-177.

## **5.3. Resumos publicados em anais de congressos**

1. HUDARI, FELIPE FANTINATO; BESSEGATO, GUILHERME GARCIA; ZANONI, MARIA VALNICE B. Eletrodo de Nanotubos de TiO<sub>2</sub> Auto-Dopados Aplicado como Sensor Eletroanalítico para a Determinação de Triamtereno. In: XXI Simpósio Brasileiro de Eletroquímica e Eletroanalítica, 2017, Natal-RN. XXI Simpósio Brasileiro de Eletroquímica e Eletroanalítica, 2017.

2. HUDARI, F. F.; ZANONI, M. V. B. SIMULTANEOUS DETERMINATION OF HYDROCHLOROTHIAZIDE AND TRIAMTERENE IN BIOLOGICAL SAMPLE FOR ANTI-DOPING CONTROL BY VOLTAMMETRIC METHOD. In: 49th International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC), 2017, São Paulo-SP. 49th International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC), 2017.

3. ZANONI, M. V. B.; BESSEGATO, G. G.; HUDARI, F. F. A New Electroanalytical Approach to Semiconductor Self-doped TiO<sub>2</sub> Nanotubes Electrodes. In: International Society of Electrochemistry, 2016, Hague. International Society of Electrochemistry, 2016.
4. MORAES, P. B.; MARIA VALNICE BOLDRIN ZANONI; FELIPE FANTINATO HUDARI. Determinação simultânea dos corantes alimentícios Ponceau 4R e Vermelho 40 em meio aquoso usando eletrodos de carbono vítreo modificado com grafeno reduzido. In: 39ª Sociedade Brasileira de Química, 2016, Goiânia. 39ª Sociedade Brasileira de Química, 2016.
5. BESSEGATO, G. G.; HUDARI, F. F.; ZANONI, MARIA VALNICE B. Eletrodos de nanotubos de TiO<sub>2</sub> auto-dopados como uma nova plataforma para detecção eletroanalítica. In: 18º Encontro Nacional de Química Analítica, 2016, Florianópolis-SC. 18º Encontro Nacional de Química Analítica, 2016.
6. HUDARI, F. F.; ZANONI, MARIA VALNICE B. Sensor voltamétrico para análise de bumetanida em urina humana utilizando eletrodo de carbono vítreo modificado com óxido de grafeno reduzido. In: 18º Encontro Nacional de Química Analítica, 2016, Florianópolis-SC. 18º Encontro Nacional de Química Analítica, 2016.
7. FELIPE FANTINATO HUDARI; PIVIDORI, M. I.; MARIA VALNICE BOLDRIN ZANONI. Determination of Triamterene in biological sample using magnetic nanoparticles modified composite electrode. In: XX Simpósio Brasileiro de Eletroquímica e Eletroanalítica (SIBEE), 2015, Uberlândia-MG. XX Simpósio Brasileiro de Eletroquímica e Eletroanalítica (SIBEE), 2015.
8. FELIPE FANTINATO HUDARI; LUCIO CÉSAR DE ALMEIDA; MARIA VALNICE BOLDRIN ZANONI. SENSOR VOLTAMÉTRICO PARA DETERMINAÇÃO DE p-FENILENODIAMINA E RESORCINOL EM CORANTES DE CABELO. In: XXI Congresso da Sociedade Iberoamericana de Eletroquímica, 2014, La Serena-Chile. Sociedade Iberoamericana de Eletroquímica (SIBAE), 2014.

**9.** FELIPE FANTINATO HUDARI; BESSEGATO, G. G.; LUCIO CÉSAR DE ALMEIDA; FERREIRA, S. L. C.; MARIA VALNICE BOLDRIN ZANONI. Utilização de planejamento fatorial para determinação voltamétrica do corante basic blue 41 adotando eletrodo impresso de carbono modificado com grafeno. In: V Workshop de Quimiometria, 2014, Camaçari-BA. V Workshop de Quimiometria. Salvador-BA: Editora e Gráfica Vento Leste, 2014.

**10.** SANTOS, W. P. WILLIAM PEREIRA DOS SANTOS; FELIPE FANTINATO HUDARI; EDUARDO HENRIQUE DUARTE; LUIZ HENRIQUE DALL'ANTONIA; BRAZ, E. J. R. S.; ARNALDO CÉSAR PEREIRA; TARLEY, C. R. T. AVALIAÇÃO DE ELETRODO DE PASTA DE NANOTUBO DE CARBONO PARA DETERMINAÇÃO DE AMITRIPTILINA USANDO VOLTAMETRIA DE PULSO DIFERENCIAL. In: 17º Encontro Nacional de Química Analítica, 2013, Belo Horizonte-MG. ENQA, 2013.

**11.** FELIPE FANTINATO HUDARI; LUCIO CÉSAR DE ALMEIDA; MARIA VALNICE BOLDRIN ZANONI. DETERMINAÇÃO SIMULTÂNEA DE *p*-FENILENODIAMINA E RESORCINOL EM TINTURA PERMANENTE DE CABELO UTILIZANDO ELETRODO MODIFICADO DE QUITOSANA/NANOTUBO DE CARBONO. In: 17º Encontro Nacional de Química Analítica, 2013, Belo Horizonte-MG. ENQA, 2013.

**12.** HUDARI, F. F.; DUARTE, E. H.; DUARTE, R. R.; PEREIRA, A. C.; DALL ANTONIA, L. H.; KUBOTA, L. T.; TARLEY, C. R. T. Voltammetric Method Optimized by Multi-response Assays for the Simultaneous Measures of Uric Acid and Acetaminophen in Urine in the Presence of Surfactant Using MWCNT Paste Electrode. In: XIX Simpósio Brasileiro de Eletroquímica e Eletroanalítica, 2013, Campos do Jordão-SP. XIX Simpósio Brasileiro de Eletroquímica e Eletroanalítica, 2013.

**13.** HUDARI, F. F.; DUARTE, E. H.; TARLEY, C. R. T. Sensor Based on Multiwalled Carbon Nanotubes Pasta for Simultaneous Voltammetric Determination of Uric Acid and Paracetamol in Micellar Media. In: Sociedade Brasileira de Pesquisa em Materiais (SBPMat), 2012, Florianópolis-SC. Anais da Sociedade Brasileira de Pesquisa em Materiais (SBPMat), 2012.

**14.** DUARTE, E. H.; HUDARI, F. F.; CLAUSEN, D. N.; TARLEY, C. R. T. Estudo eletroquímico usando eletrodo de pasta de nanotubo de carbono em meio micelar para determinação de ácido ascórbico e paracetamol. In: Sociedade Ibero-Americana de Eletroquímica, 2012, Fortaleza-CE. Anais da Sociedade Ibero-Americana de Eletroquímica, 2012.

**15.** HUDARI, F. F.; DUARTE, E. H.; TARLEY, C. R. T. DETERMINAÇÃO DE ÁCIDO ÚRICO E PARACETAMOL UTILIZANDO ELETRODO DE PASTA DE NANOTUBO DE CARBONO EM MEIO MICELAR. In: XXVIII Semana da Química e V Jornada de Pós-Graduação em Química, 2012, Londrina-PR. Anais da XXVIII Semana da Química e V Jornada de Pós-Graduação em Química, 2012.

**16.** DUARTE, E. H.; HUDARI, F. F.; TARLEY, C. R. T. Determinação simultânea de N-acetil-*p*-aminofenol e ácido ascórbico em meio micelar usando eletrodo de NTC. In: XXVII Semana da Química e IV Jornada de Pós-Graduação em Química, 2011, Londrina-PR. Anais do XXVII Semana da Química e IV Jornada de Pós-Graduação em Química, 2011.

**17.** DUARTE, E. H.; HUDARI, F. F.; TARLEY, C. R. T. DETERMINAÇÃO VOLTAMÉTRICA SIMULTÂNEA DE N-ACETIL-P-AMINOFENOL E ÁCIDO ASCÓRBICO EM MEIO MICELAR USANDO ELETRODO DE PASTA DE NANOTUBO DE CARBONO. In: 16º Encontro Nacional de Química Analítica, 2011, Campos do Jordão-SP. Anais do 16º Encontro Nacional de Química Analítica, 2011

#### **5.4. Iniciação científica**

2011-2013: aluno de iniciação científica na Universidade Estadual de Londrina (UEL), orientado pelo Prof. Dr. César Ricardo Teixeira Tarley (Departamento de Química), atuando no desenvolvimento de métodos eletroanalíticos para determinação de fármacos.

2010-2011: estagiário no Instituto Agrônomo do Paraná (IAPAR), orientado pelo pesquisador Dr. Mário Miyazawa (Departamento de solos), atuando no desenvolvimento de métodos para determinação de nitrogênio.

#### **6. Supervisão Científica**

Supervisão Científica da aluna de iniciação científica (bolsista PIBIC/CNPq) Paloma Bueno de Moraes com o projeto intitulado “Desenvolvimento de um método eletroanalítico para a determinação simultânea dos corantes alimentícios Amarantho, Vermelho 40 e Azul Brilhante FCF utilizando eletrodo de carbono vítreo modificado com MWCNT/líquido iônico”.

#### **7. PARTICIPAÇÃO EM EVENTOS E CONGRESSOS**

1. 46<sup>th</sup> World Chemistry Congress, 40<sup>a</sup> Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química e IUPAC 49<sup>th</sup> General Assembly. (Congresso).
2. XXI Simpósio Brasileiro de Eletroquímica e Eletroanalítica. (Congresso).
3. 18<sup>o</sup> Encontro Nacional de Química Analítica. 2016. (Congresso).
4. 18<sup>o</sup> Encontro Nacional de Química Analítica. 2016. (Congresso).
5. XX Simpósio Brasileiro de Eletroquímica e Eletroanalítica (SIBEE). 2015. (Simpósio).
6. XXI Congresso da Sociedade Iberoamericana de Eletroquímica. La Serena/Chile. 2014
7. 17<sup>o</sup> Encontro Nacional de Química Analítica. Belo Horizonte/MG. 2013.
8. SOCIEDADE BRASILEIRA DE POLÍMEROS E MATERIAIS (SBPMat). Florianópolis/SC. 2012.

- 9.** XXVIII SEMANA DA QUÍMICA E V JORNADA DE PÓS-GRADUAÇÃO DA UEL. Londrina/PR. 2012.
- 10.** CONTRIBUIÇÕES HISTÓRICAS DA QUÍMICA À CARACTERIZAÇÃO E USO DE NANOPARTÍCULAS NA SOCIEDADE MODERNA. Londrina/PR. 2011.
- 11.** 16º Encontro Nacional de Química Analítica. Campos do Jordão/SP. 2011.
- 12.** XXVII SEMANA DA QUÍMICA E IV JORNADA DE PÓS-GRADUAÇÃO DA UEL. Londrina/PR. 2011.
- 13.** XXVI SEMANA DA QUÍMICA E III JORNADA DE PÓS-GRADUAÇÃO DA UEL. Londrina/PR. 2010.
- 14.** 1º CONGRESSO PARANAENSE DE EDUCAÇÃO EM QUÍMICA (CPEQUI). Londrina/PR. 2009.

## **Agradecimentos**

- A Deus por me dar saúde e poder concretizar mais uma etapa de minha vida;
- A Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria Valnice não apenas pela orientação, mas também pela ajuda, força, crescimento científico e intelectual e pela amizade. Além de orientadora, a senhora é como uma mãe para seus alunos, sempre ajudando o possível para o melhor de nós;
- Meus pais que financiaram e incentivaram minha graduação e que me deram a oportunidade de crescimento e hoje poder concluir mais uma etapa da minha caminhada profissional;
- Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” pelo amparo e aos professores que, durante o curso, proporcionaram crescimento intelectual, profissional e pessoal;
- Ao Grupo de Eletroanalítica de Araraquara (GEAr) pelo aprendizado e pelas colaborações;
- A Livia que muito me apoiou e me ajudou nos bons, mas, principalmente, nos piores momentos. Por estar do meu lado me fazendo feliz, somando e me ajudando em minhas conquistas;
- Aos colegas que sempre ajudaram em dificuldades e que fizeram deste curso muito especial.

## RESUMO

A aplicabilidade dos métodos analíticos na Química Forense tem como grande desafio a complexidade das matrizes biológicas (urina, fezes, suor, cabelos e pelos), o uso de técnicas com baixo limite de detecção, a avaliação de metabólitos gerados em baixa concentração após metabolização e a busca de técnicas e metodologias eficientes, porém de baixo custo. O objetivo do presente trabalho foi investigar novos métodos eletroanalíticos para determinação dos diuréticos bumetanida (BMT), hidroclorotiazida (HCT) e triantereno (TRT) em consonância com as diretrizes e controle da Agência Mundial Antidopagem. Sensores eletroquímicos foram desenvolvidos usando eletrodos compósitos, eletrodos de carbono vítreo e eletrodo de nanotubos de  $\text{TiO}_2$  tratados catodicamente modificados com partículas magnéticas, óxido de grafeno reduzido e nanotubos de carbono multiparedes para a determinação dos diuréticos BMT, HCT e TRT, proibidos pela Agência Mundial Antidoping (WADA). Para a determinação do diurético TRT foi desenvolvido um sensor baseado na modificação da superfície de um eletrodo compósito grafite-epoxy com partículas magnéticas funcionalizadas com grupo tosil. Após otimização multivariada dos parâmetros inerentes à técnica de voltametria de onda quadrada, uma curva de calibração foi construída no intervalo de 0,500 a 99,8  $\mu\text{mol L}^{-1}$  com limite de detecção de  $1,47 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ . O sensor foi aplicado em amostra de urina e comparado com a técnica de LC-MS/MS onde não houve diferença significativa no nível de 95% de confiança entre os métodos. Já para a determinação do diurético BMT, um sensor baseado em eletrodo de carbono vítreo modificado com óxido de grafeno reduzido foi desenvolvido a partir da eletrodeposição de uma solução de 0,1  $\text{mg mL}^{-1}$  de óxido de grafeno mantida em potencial de  $-1,4\text{V}$  por 500 s. Após otimização da velocidade de varredura ( $100 \text{ mV s}^{-1}$ ), pH (4,0) e tempo de acúmulo (25 s), uma relação linear foi encontrada no intervalo de 0,25 a 50  $\mu\text{mol L}^{-1}$  de BMT, onde foi encontrado um limite de detecção de 75  $\text{nmol L}^{-1}$ . O método foi aplicado em amostra de urina e comparado ao método de LC-MS/MS, onde não houve diferença significativa ao nível de 95% de confiança entre os métodos. Outro sensor baseado em eletrodo de carbono vítreo modificado com nanotubo de carbonos foi proposto para a determinação de HCT e TRT. Após otimização dos



parâmetros como pH (4,0),  $E_{ac}$  (0,80 V) e  $t_{ac}$  (40 s) e utilizando a técnica de varredura linear de redissolução adsortiva (LSAdSV), foi construída uma curva de calibração entre  $1,0 \times 10^{-7}$  a  $2,0 \times 10^{-5}$  mol L<sup>-1</sup> para ambos, HCT e TRT, onde foram encontrados os valores de  $2,8 \times 10^{-8}$  e  $2,9 \times 10^{-8}$  mol L<sup>-1</sup> para os limites de detecção da HCT e TRT, respectivamente. O método proposto foi aplicado eficientemente em amostra de urina sintética. Todos os sensores supracitados apresentaram limites de detecção e quantificação inferiores ao estipulado pela WADA (250 ng mL<sup>-1</sup>). Foi ainda desenvolvida uma nova plataforma sensorial baseada em eletrodo de nanotubos de TiO<sub>2</sub> autodopados com Ti<sup>+3</sup>, via redução eletroquímica em potencial de -2,5V. O semicondutor mostrou-se apto a monitorar a oxidação eletroquímica do diurético TRT. Curvas analíticas foram construídas no intervalo de 2 a 100 µmol L<sup>-1</sup> e um valor de limite de detecção de  $5,40 \times 10^{-7}$  foi encontrado utilizando a técnica de voltametria de varredura linear.

**Palavras-chave:** sensores eletroquímicos, análise de diuréticos, métodos eletroanalíticos, triantereno, hidroclorotiazida, bumetamida.

## ABSTRACT

The applicability of the analytical methods in Forensic Chemistry has as a great challenge the complexity of the biological matrices (urine, feces, sweat, hair and hair), the use of techniques with low limit of detection, the evaluation of metabolites generated in low concentration after metabolism and the search for efficient but cost-effective techniques and methodologies. The objective of the present study was to investigate new electroanalytical methods for the determination of diuretics bumetanide (BMT), hydrochlorothiazide (HCT) and trianterene (TRT) in accordance with the guidelines and control of the World Anti-Doping Agency. Electrochemical sensors were developed using composite electrodes, glassy carbon electrodes and self-doping TiO<sub>2</sub> nanotube electrodes modified with magnetic particles, reduced graphene oxide and carbon nanotubes for the determination of the diuretics BMT, HCT and TRT banned by the World Anti-Doping Agency (WADA). For the determination of the diuretic TRT, a sensor based on the modification of the surface of a composite graphite-epoxy electrode with magnetic particles functionalized with tosyl group was developed. After a multivariate optimization of the parameters inherent to the square wave voltammetry technique, a calibration curve was constructed in the range of 0.500 to 99.8  $\mu\text{mol L}^{-1}$  with a detection limit of  $1.47 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ . The sensor was applied in a urine sample and compared to the LC-MS/MS technique where there was no significant difference at the 95% level of confidence between the methods. For the determination of the diuretic BMT, a sensor based on glassy carbon electrode modified with reduced graphene oxide was developed from the electrodeposition of a solution of 0.1  $\text{mg mL}^{-1}$  of graphene oxide maintained at  $-1, 4\text{V}$  for 500 s. After optimization of the scan rate ( $100 \text{ mV s}^{-1}$ ), pH (4.0) and accumulation time (25 s), a linear relationship was found in the range of 0.26 to 50  $\mu\text{mol L}^{-1}$  of BMT, where a detection limit of 75  $\text{nmol L}^{-1}$  was found. The method was applied in a urine sample and compared to the LC-MS / MS method, where there was no significant difference at the 95% level of confinement between the methods. Another sensor based on carbon nanotube modified glassy carbon electrode was proposed for the determination of HCT and TRT. After optimization of the parameters such as pH (4.0),  $E_{ac}$  (0.80 V) and  $t_{ac}$  (40 s) and using the linear adsorptive redissolution

(LSAdSV) technique, a calibration curve was constructed between  $1.0 \times 10^{-7}$  to  $2.0 \times 10^{-5}$  mol L<sup>-1</sup> for both HCT and TRT, where values of  $2.8 \times 10^{-8}$  and  $2.9 \times 10^{-8}$  mol L<sup>-1</sup> for the detection limits of HCT and TRT, respectively. The proposed method was applied efficiently in a synthetic urine sample. All of the aforementioned sensors had limits of detection and quantification lower than that stipulated by the WADA (250 ng mL<sup>-1</sup>). It was also developed a new sensory platform of electrodes of TiO<sub>2</sub> nanotubes autopados with Ti<sup>+3</sup>, via electrochemical reduction in potential of -2.5V. The semiconductor was able to monitor the electrochemical oxidation of the diuretic TRT. Analytical curves were constructed in the range of 2 to 100 μmol L<sup>-1</sup> and a detection limit value of  $5.40 \times 10^{-7}$  was found using linear sweep voltammetry technique.

**Keywords:** electrochemical sensor, analysis of diuretics, electroanalytical method, trianterene, hydrochlorothiazide, bumetanide.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** – Representação dos nanotubos de carbono na forma de camada simples (SWCNT) e na forma de multicamadas (MWCNT).....38
- Figura 2** – Estrutura da Bumetanida (a), Hidroclorotiazida (b) e Triantereno (c).....47
- Figura 3** – Voltamogramas cíclicos para  $100 \mu\text{mol L}^{-1}$  de TRT em solução tampão  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  B-R (pH 4,0) utilizando eletrodo composto sem (a) e com (b) a modificação com partículas magnéticas funcionalizadas com grupo tosila (I); Voltamogramas cíclicos sucessivos para  $100 \mu\text{mol L}^{-1}$  de TRT em solução tampão  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  B-R (pH 6,0) utilizando EC-PM/TS (II). Velocidade de varredura:  $75 \text{ mV s}^{-1}$ .....55
- Figura 4** – Voltamogramas cíclicos para  $100 \mu\text{mol L}^{-1}$  do TRT em solução tampão B-R  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  (pH 6,0) para velocidades de varredura no intervalo de 5 a  $200 \text{ mV s}^{-1}$  (I) e relação linear entre  $i_{pa}$  vs  $v$  (II). Voltamogramas registrados sem agitação.....56
- Figura 5** – Voltamogramas de varredura linear para  $100 \mu\text{mol L}^{-1}$  do TRT em solução tampão B-R  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  em pH 4,0 (a), 5,0 (b), 6,0 (c), 7,0 (d), 8,0 (e) e 9,0 (f).  $v=75 \text{ mV s}^{-1}$  (I); Relação entre  $i_{pa}$  vs pH (II.a) e  $E_{pa}$  vs pH (II.b).....57
- Figura 6** – a) TIC da amostra controle; b) espectro de massas do pico detectado em 7,9 min em a); c) espectro de íon fragmento de  $m/z$  254; d) TIC da eletrólise da amostra; e) espectro de massas do pico detectado em 8,9 min em d) e f) espectro de íon fragmento de  $m/z$  252.....59
- Figura 7** – Voltamogramas de varredura linear (I,  $v=75 \text{ mV s}^{-1}$ ), pulso diferencial (II,  $E_{sw}=5 \text{ mV}$ ,  $\Delta E=50 \text{ mV}$ ) e onda quadrada (III,  $E_{sw}=2 \text{ mV}$ ,  $\Delta E=50 \text{ mV}$ ,  $f=30 \text{ Hz}$ ) para  $100 \mu\text{mol L}^{-1}$  de TRT em solução  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  de tampão B-R (pH 6).....60

- Figura 8** – Diagrama de Pareto das respostas obtidas no planejamento.....63
- Figura 9** – Superfície de resposta relacionando  $E_{sw}$ ,  $\Delta E$  e  $D.G$ .....65
- Figura 10** – Voltamogramas de onda quadrada em meio de solução tampão B-R 0,1 mol L<sup>-1</sup> (pH 6,0) (a) nas concentrações de TRT de 0,500 (b), 1,00(c), 2,02 (d), 7,56 (e), 17,6 (f), 32,7 (g), 52,7 (h), 72,6 (i) e a 99,8  $\mu\text{mol L}^{-1}$  (j) (I) e Relação entre  $i_{pa}$  vs [TRT] (II).  $f = 30$  Hz,  $\Delta E = 36,2$  mV,  $E_{sw} = 11,5$  mV.....66
- Figura 11** – Efeito na  $i_{pa}$  para uma concentração de 30  $\mu\text{mol L}^{-1}$  de TRT na presença de algumas substâncias que podem estar presentes na urina em solução tampão B-R 0,10 mol L<sup>-1</sup> (pH 6.0). CR (●), AU (■), UR (▲), GL (●) e AA (■).....67
- Figura 12** – Voltamogramas de onda quadrada registrado em solução tampão B-R 0,10 mol L<sup>-1</sup> (pH 6,0) para eletrólito suporte (a), adição de 2 mL de amostra (b) e sucessivas adição de padrão de TRT nas concentrações de 0,489 (c), 0,976 (d), 1,22 (e), 1,46 (f), 1,82 (g) e 2,31  $\mu\text{mol L}^{-1}$  (h) utilizando o EC-PM/TS (I). Figura inserida: Relação linear entre  $i_{pa}$  vs [TRT].  $f = 30,0$  Hz,  $\Delta E$ : 36,2 mV,  $E_{sw}$ : 11,5 mV.....69
- Figura 13** – Imagens de microscopia eletrônica de varredura para ECV/OG (I) e ECV/OGR (II) com magnificação de 25.000 vezes.....71
- Figura 14** – Gráficos de Nyquist (I) e voltamogramas cíclicos (II) utilizando solução sonda de 5 mmol L<sup>-1</sup> de  $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$  em 0,10 mol L<sup>-1</sup> de KCl para ECV (a), ECV/OG (b) e ECV/OGR (c). EIS: Frequência entre 10 kHz – 0,03 Hz, amplitude de 5 mV (rms) em potencial de circuito aberto (OCP). VC:  $v = 75$  mV s<sup>-1</sup>.....72
- Figura 15** – Voltamogramas cíclicos para 100  $\mu\text{mol L}^{-1}$  de BMT em solução tampão B–R 0,1 mol L<sup>-1</sup> (pH 7,0) utilizando ECV (a), ECV/OG (b) e ECV/OGR (c).  $v = 100$  mV s<sup>-1</sup>.....73

**Figura 16** – Voltamogramas cíclicos para 100  $\mu\text{mol L}^{-1}$  de BMT em solução tampão B–R 0,1  $\text{mol L}^{-1}$  (pH 7,0) utilizando ECV/OGR nas  $\nu$  de 2 (a), 5 (b), 7 (c), 20 (d), 30 (e), 40 (f), 50 (g), 75 (h) e 100  $\text{mV s}^{-1}$  (i) (I). Relação linear entre  $i_{pa}$  vs  $\nu$  (II).....74

**Figura 17** – Relação linear entre  $E_{pa}$  vs  $\ln \nu$ .....75

**Figura 18** – (I) TIC da amostra controle. (II) Espectro de massas para o pico no  $t_{tr}$ . de 9,3 min detectado em (I). (III) Cromatograma para o produto no  $t_{tr}$ . de 10,4 min com  $m/z$  363. (IV) Espectro de massas do produto detectado em (III). (V) Cromatograma para o produto no  $t_{tr}$ . de 8,5 min com  $m/z$  de 381. (VI) Espectro de massas do produto detectado em (V).....77

**Figura 19** – Relação de  $E_{pa}$  vs pH (a) e  $i_{pa}$  vs pH (b) para a oxidação da BMT.....78

**Figura 20** – Comparação entre as técnicas de voltametria de varredura linear (a,  $\nu = 75 \text{ mV s}^{-1}$ ), voltametria de pulso diferencial (b,  $E_{sw} = 5 \text{ mV}$ ,  $\Delta E = 25 \text{ mV}$ ) e voltametria de onda quadrada (c,  $E_{sw} = 4 \text{ mV}$ ,  $\Delta E = 25 \text{ mV}$ ,  $f = 20 \text{ Hz}$ ) para a oxidação de 50  $\mu\text{mol L}^{-1}$  de BMT em solução tampão B–R 0,1  $\text{mol L}^{-1}$  (pH 4,0).....79

**Figura 21** – Influência do tempo de acúmulo entre 0 – 40 s para 20  $\mu\text{mol L}^{-1}$  de BMT em solução tampão B–R 0,1  $\text{mol L}^{-1}$  (pH 4,0) por análises de voltametria de varredura linear.....80

**Figura 22** – Voltamogramas de varredura linear em solução tampão B–R 0,1  $\text{mol L}^{-1}$  (pH 4,0) (a) variando a concentração de BMT em 0,255 (b), 0,509 (c), 1,01 (d), 1,52 (e), 3,02 (f), 5,09 (g), 10,2 (h), 15,2 (i), 20,2 (j) e 50,0  $\mu\text{mol L}^{-1}$  (k) (I). Relação entre  $i_{pa}$  vs concentração de BMT (II).....81

**Figura 23** – Efeito na  $i_{pa}$  para a concentração de  $15 \mu\text{mol L}^{-1}$  de BMT na presença das substâncias AU (■), CR (●), GL (▲), UR (●) e FUR (■) em solução tampão B–R  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  (pH 4,0) (I). Voltamogramas de varredura linear para  $15 \mu\text{mol L}^{-1}$  de BMT na presença de  $30$  (a) e  $60 \mu\text{mol L}^{-1}$  (b) de FUR (II).....82

**Figura 24** – Voltamogramas de varredura linear para ECV/OGR em solução tampão B–R  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  (pH 4,0) (a), adição de  $4 \text{ mL}$  da amostra urina sintética (b) e sucessivas adições de solução padrão de BMT nas concentrações de  $1,00$  (c),  $2,00$  (d),  $3,00$  (e),  $4,00$  (f) e  $5,00 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$  (i) (I). Relação linear entre  $i_{pa}$  vs [BMT] (II).  $\nu$  de  $100 \text{ mV s}^{-1}$ .....84

**Figura 25** – Voltamogramas de varredura linear para ECV/OGR em solução tampão B–R  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  (pH 4,0) (a), adição de  $4 \text{ mL}$  da amostra de urina humana (b) e sucessivas adições de solução padrão de BMT nas concentrações de  $1,00$  (c),  $2,00$  (d),  $3,00$  (e),  $4,00$  (f) e  $5,00 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$  (i) (I). Relação linear entre  $i_{pa}$  vs [BMT] (II).  $\nu$  de  $100 \text{ mV s}^{-1}$ .....84

**Figura 26** – Gráficos de Nyquist utilizando solução de  $5,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$  de  $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$  em  $1,0 \text{ mol L}^{-1}$  de KCl para ECV (I) e ECV/MWCNT (II). Condições:  $10 \text{ kHz} - 0,03 \text{ Hz}$ ;  $5 \text{ mV rms}$  modulação sinusoidal no OCP.....86

**Figura 27** – Voltamogramas cíclicos para  $100 \mu\text{mol L}^{-1}$  de HCT (I), TRT (II), e HCT + TRT (III) utilizando ECV (a) e ECV/MWCNT (b) em solução tampão B–R  $0,10 \text{ mol L}^{-1}$  (pH 4,0).  $\nu = 75 \text{ mV s}^{-1}$ .....88

**Figura 28** – Voltamogramas cíclicos para  $100 \mu\text{mol L}^{-1}$  de HCT (I) e TRT (II) em solução tampão B–R  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  (pH 4,0) utilizando ECV/MWCNT nas  $\nu$  de  $2$  a  $100 \text{ mV s}^{-1}$ . Figuras inseridas: Relações lineares entre  $i_{pa}$  vs  $\nu$ .....89

**Figura 29** – Influência do pH na  $i_{pa}$  da HCT (■) e TRT (●) por meio de medidas utilizando voltametria de varredura linear.....90

**Figura 30** – Variação do  $E_{ac}$  (I) e do  $t_{ac}$  (II) na  $i_{pa}$  da HCT (■) e do TRT (●) por análises utilizando voltametria de varredura linear.....91

**Figura 31** – LSAdSV (I) em solução tampão B-R (pH 4,0) 0,1 mol L<sup>-1</sup> utilizando ECV/MWCNT variando a concentração de HCT e TRT em 0,1 (b), 0,2 (c), 0,5 (d), 1,0 (e) 5,0 (f), 10 (g) e 20 μmol L<sup>-1</sup> (h); relações lineares entre  $i_{pa}$  vs [HCT] (II) e  $i_{pa}$  vs [TRT] (III).  $v = 100$  mV s<sup>-1</sup>;  $E_{ac} = 0,80$  V;  $t_{ac} = 40$  s.....92

**Figura 32** – LSAdSV para ECV/MWCNT em solução tampão B-R 0,1 mol L<sup>-1</sup> (pH 4,0) (a), para a amostra (b) e as adições de padrões de 1 (c), 2 (d), 3(e), 4 (f) e 6 μmol L<sup>-1</sup> (g) (I). Relações lineares entre  $i_{pa}$  vs Concentração (II).....95

**Figura 33**– Imagens de MEV para os TiO<sub>2</sub>NT antes (a) e após (b) a polarização catódica e difratogramas de Raios-X (c) das amostras de TiO<sub>2</sub>NT (i) e P-TiO<sub>2</sub>NT (ii).....97

**Figura 34** – Voltamogramas cíclicos em solução de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,1 mol L<sup>-1</sup> para TiO<sub>2</sub>NT (I). 1º ciclo (-) e 2º ciclo (-).....98

**Figura 35** – Voltamogramas de voltametria cíclica para 5 mmol L<sup>-1</sup> [Fe(CN)<sub>6</sub>]<sup>4-</sup> em solução de KCl 0,1 mol L<sup>-1</sup> utilizando eletrodos de TiO<sub>2</sub>NT (a) e P-TiO<sub>2</sub>NT (b).....99

**Figura 36** – Gráficos de Nyquist para 5 mmol L<sup>-1</sup> da solução redox Fe(CN)<sub>6</sub><sup>3-/4-</sup> utilizando TiO<sub>2</sub>NT (a) e P-TiO<sub>2</sub>NT (b) (I); Gráficos capacitivos de Nyquist para TiO<sub>2</sub>NT (a) e P-TiO<sub>2</sub>NT em 0,1 mol L<sup>-1</sup> de solução tampão B-R pH 2,0 (II).....100

**Figura 37** – Voltamogramas cíclicos para solução de [Fe(CN)<sub>6</sub>]<sup>4-</sup> 5 mmol L<sup>-1</sup> em solução de KCl 0,1 mol L<sup>-1</sup>, após polarização catódica em solução KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,1 mol L<sup>-1</sup> nas seguintes condições de polarização: efeito do pH do eletrólito, aplicando -1,5 V por 5 min (I); efeito do potencial de polarização aplicado, em pH 10 (otimizado) por 5 min (II); efeito do tempo de polarização, em pH 10 (otimizado) aplicando potencial de -2,5 V (otimizado) (III).....102



**Figura 38** – Voltamogramas cíclicos em 0,1 mol L<sup>-1</sup> de solução tampão B-R (pH 2,0) (-) para 100 μmol L<sup>-1</sup> de TRT (-), FUR (-) e HCT (-) utilizando P-TiO<sub>2</sub>NT (a). Voltamogramas cíclicos em 0,1 mol L<sup>-1</sup> de solução tampão B-R (pH 2,0) (-) para 200 μmol L<sup>-1</sup> de TRT (-), FUR (-) e HCT (-) utilizando ECV (b).....103

**Figura 39** – Voltamogramas de varredura linear em solução tampão B-R 0,1 mol L<sup>-1</sup> (pH 2,0) (a) variando a concentração de BMT em 2,00 (b), 5,00 (c), 10,0 (d), 20,0 (e), 50,0 (f) e 100 mol L<sup>-1</sup> (g) (I). Relação entre  $i_{pa}$  vs concentração de TRT (II)..... 104

## LISTA DE ESQUEMAS

**Esquema 1** – Mecanismo de oxidação para o TRT.....60

**Esquema 2** – Mecanismo de oxidação para a BMT.....77

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> – Parâmetros e níveis estudados no planejamento fatorial $2^3$ .....	61
<b>Tabela 2</b> – Resultados do planejamento fatorial $2^3$ expressos em termos $i_{pa}$ , L.B., $d_i$ e $DG$ .....	62
<b>Tabela 3</b> – Matriz de Doehlert utilizada para otimização do $E_{sw}$ e $\Delta E$ .....	64
<b>Tabela 4</b> – ANOVA para os resultados adquiridos da Matriz de Doehlert.....	65
<b>Tabela 5</b> – Recuperações de TRT em amostras de água de torneira utilizando o eletrodo de EC-PM/TS.....	68
<b>Tabela 6</b> – Recuperações em amostras de água de torneira fortificadas com $15,00 \mu\text{mol L}^{-1}$ de BMT. $n= 3$ .....	83
<b>Tabela 7</b> – Resultados de ensaios de interferência empregando glicose, uréia, furosemida, ácido ascórbico, ácido úrico, creatinina e bumetanida.....	94
<b>Tabela 8</b> – Resultados da aplicação do sensor ECV/MWCNT em amostra de urina sintética.....	95

## LISTA DE EQUAÇÕES

<b>Equação 1.....</b>	<b>55</b>
<b>Equação 2.....</b>	<b>56</b>
<b>Equação 3.....</b>	<b>58</b>
<b>Equação 4.....</b>	<b>61</b>
<b>Equação 5.....</b>	<b>61</b>
<b>Equação 6.....</b>	<b>62</b>
<b>Equação 7.....</b>	<b>63</b>
<b>Equação 8.....</b>	<b>65</b>
<b>Equação 9.....</b>	<b>100</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS

$\Delta E$ : Amplitude de pulso;

**BMT**: Bumetanida;

**CLAE**: Cromatografia líquida de alta eficiência;

**CNT**: Nanotubos de carbono;

**D.G.**: Desejabilidade global.

**di**: Desejabilidade individual;

$E_{ac}$ : Potencial de acúmulo;

**EC**: Eletrodo compósito;

**EC-PM/TS**: Eletrodo compósito modificado com partículas magnéticas funcionalizadas com grupo tosil;

**ECV/MWCNT**: Eletrodo de carbono vítreo modificado com nanotubos de carbono multiparedes;

**ECV/OGR**: Eletrodo de carbono vítreo modificado com óxido de grafeno reduzido;

**ECV**: Eletrodo de carbono vítreo;

**EIE**: Espectroscopia de impedância eletroquímica;

$E_{pa}$ : Potencial de pico anódico;

$E_{sw}$ : Incremento de potencial;

$f$ : Frequência;

**HCT**: Hidroclorotiazida;

$i_{pa}$ : corrente de pico anódica;

**L.D.**: Limite de detecção;

**L.Q.**: Limite de quantificação;

**LSAdSV**: Voltametria de varredura linear de redissolução adsortiva.

**MWCNT**: Nanotubos de carbono multiparedes (multi-wall carbon nanotubes);

**OG**: Óxido de grafeno;

**OGR**: Óxido de grafeno reduzido;

**PM**: Partícula magnética;

**P-TiO<sub>2</sub>NT**: Eletrodo de nanotubos de titânio polarizado;

$R_{tc}$ : Resistência de transferência de carga;

$t_{ac}$ : Tempo de acúmulo;

**Tampão B-R**: Tampão Britton-Robinson;

**TiO<sub>2</sub>NT:** Eletrodo de nanotubos de titânio;

**TRT:** Triantenero;

**t<sub>r</sub>:** Tempo de retenção;

**WADA:** Agência mundial antidoping (World Anti-Dopping Agency);

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>32</b>
<b>1.1. Doping no esporte</b> .....	<b>32</b>
<b>1.2. Análise de diuréticos</b> .....	<b>33</b>
<b>1.3. Técnicas eletroquímicas</b> .....	<b>35</b>
1.3.1. Eletrodos modificados com nanotubos de carbono .....	37
1.3.2. Eletrodos modificados com Grafeno .....	40
1.3.3. Eletrodos modificados por partículas magnéticas.....	42
1.3.4. Eletrodos de nanotubos de TiO <sub>2</sub> auto-dopados .....	43
<b>2. OBJETIVO</b> .....	<b>47</b>
<b>3. PARTE EXPERIMENTAL</b> .....	<b>48</b>
<b>3.1. Reagentes e equipamentos</b> .....	<b>48</b>
<b>3.2. Preparo dos eletrodos</b> .....	<b>49</b>
3.2.1. Eletrodo compósito modificado com partículas magnéticas.....	49
3.2.2. Eletrodo de carbono vítreo modificado com óxido de grafeno reduzido.....	49
3.2.3. Eletrodo de carbono vítreo modificado com nanotubos de carbono.....	50
3.2.4. Eletrodo de nanotubos de TiO <sub>2</sub> polarizado.....	50
<b>3.3. Preparo das amostras e análises</b> .....	<b>50</b>
3.3.1. Preparo da amostra para as análises do Triantereno.....	50
3.3.2. Preparo da amostra para as análises da Bumetanida.....	51
3.3.3. Preparo da amostra para as análises da Hidroclorotiazida e Triantereno.....	52
<b>3.4. Análises eletroquímicas</b> .....	<b>52</b>
<b>3.5. Análises dos produtos da eletrólise por LC-MS/MS</b> .....	<b>53</b>
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>54</b>
<b>4.1. Sensor voltamétrico baseado em eletrodo compósito modificado com partículas magnéticas para determinação de Triantereno em amostra biológica</b> .....	<b>54</b>
4.1.1. Comportamento eletroquímico do TRT .....	54
4.1.2. Efeito da velocidade de varredura na oxidação do TRT .....	55
4.1.3. Estudo do pH.....	57

4.1.4. Medidas de Eletrólises para o TRT.....	58
4.1.5. Otimização Analítica.....	60
4.1.6. Curva analítica.....	66
4.1.7. Estudo de interferente.....	67
4.1.8. Aplicação do método proposto para análise de TRT em amostras de água e urina.....	68
4.1.9. Conclusões parciais.....	70
<b>4.2. Sensor eletroquímico baseado em eletrodo de carbono vítreo modificado com óxido de grafeno reduzido (ECV/OGR) para a determinação de bumetanida em urina no nível requerido para análises de doping.....</b>	<b>71</b>
4.2.1. Caracterização da superfície do ECV/OGR.....	71
4.2.2. Comportamento eletroquímico da Bumetanida.....	73
4.2.3. Mecanismo de oxidação eletroquímica da BMT.....	75
4.2.4. Otimização do método.....	77
4.2.5. Eficiência analítica.....	80
4.2.6. Estudo de interferentes.....	81
4.2.7. Aplicação do método proposto.....	82
4.2.8. Conclusões parciais.....	85
<b>4.3. Determinação simultânea de Hidroclorotiazida e Triantereno por voltametria de redissolução anódica utilizando eletrodo de carbono vítreo modificado com nanotubo de carbono multiparedes.....</b>	<b>86</b>
4.3.1. Caracterização eletroquímica do eletrodo modificado com MWCNT.....	86
4.3.2. Comportamento eletroquímico da HCT e TRT utilizando o ECV e o ECV/MWCNT.....	87
4.3.3. Otimização do método.....	90
4.3.4. Desempenho analítico.....	91
4.3.5. Estudo de interferentes.....	93
4.3.6. Aplicação do sensor ECV/MWCNT.....	94
4.3.7. Conclusões parciais.....	96
<b>4.4. Eletrodo de nanotubos de TiO<sub>2</sub> auto-dopados com TiO<sup>3+</sup>.....</b>	<b>97</b>
4.4.1. Caracterização dos eletrodos de TiO <sub>2</sub> NT e P-TiO <sub>2</sub> NT.....	97



4.4.2. Otimização das condições para polarização catódica.....	101
4.4.3. Aplicação do eletrodo P-TiO <sub>2</sub> NT para a determinação de TRT.....	103
4.4.4. Conclusões parciais.....	104
<b>5. CONCLUSÃO.....</b>	<b>106</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>107</b>

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1. Doping no esporte

Análises qualitativas e quantitativas são as bases do julgamento toxicológico competente em toxicologia clínica e forense. A confiabilidade da análise de dados é de extrema importância nestes campos, pois resultados não confiáveis podem levar a um excesso ou subestimação dos efeitos, a falsas interpretações ou a conclusões injustificadas.

Dentro deste contexto, métodos analíticos confiáveis, sensíveis, seletivos, econômicos e com alta precisão e exatidão tem sido o grande desafio para monitorar o abuso de substâncias proibidas pela análise de fluidos, tecidos e etc. Dentre elas, destacam-se os estimulantes, narcóticos, analgésicos, agentes anabolizantes, diuréticos, corticosteroides, betabloqueadores, carreadores de oxigênio, hormônios (eritropoietina, hormônio do crescimento, insulina), produtos mascarantes (para burlar as análises de controle) e etc [1,2], que são um dos grandes problemas para saúde pública, social e em competições desportivas profissionais. O uso abusivo destas substâncias é proibido pelos órgãos desportivos mundiais (“doping”), mas a análise dessas substâncias é ainda útil em diversos segmentos da sociedade tanto no cotidiano, no esporte ou com finalidade forense [3].

Na química forense, o entrave para o desenvolvimento de novos métodos analíticos é o grande desafio de se aplicar a metodologia em amostras de matrizes biológicas complexas (urina, fezes, suor, cabelos e pelos), que usualmente requerem longas etapas de limpeza da amostra e baixos limites de detecção, bem como monitoramento de metabólitos gerados em baixo nível após biotransformação no organismo. Portanto, o controle da dopagem requer métodos eficazes tanto para determinar a presença do composto controlado, quanto de seus metabólitos. A urina, que acumula os resíduos eliminados pelo organismo, é o material preferencial da coleta de amostras para estas análises, mas, para certos tipos de substâncias, a capacidade de detecção é maior quando a investigação é feita no sangue ou no plasma sanguíneo [4–6].

Segundo a Agência Mundial Antidoping (WADA – World Anti-Doping Agency), as substâncias proibidas em de 2019 [1] são: agentes anabólicos, hormônios peptídicos (fatores de crescimentos e substâncias relacionadas), beta-2 agonistas, moduladores hormonais (e metabólitos), diuréticos (e outros agentes mascarantes), estimulantes, narcóticos, canabinóides, glicocorticosteróides, álcool, e beta-bloqueadores, além de métodos proibidos como manipulação de sangue e componentes do sangue, manipulação química e física e dopagem genética. Visto que diversas destas substâncias são utilizadas por atletas, oferecendo-lhes vantagens ilegais, o monitoramento destes componentes dopantes em competidores requer detecção em níveis ao redor de  $\text{ng mL}^{-1}$  [7].

Dentre as diversas substâncias controladas pela WADA [8], estão os diuréticos. Na medicina, os diuréticos são utilizados para tratamentos da hipertensão arterial, combate da insuficiência cardíaca, cirrose, doença pulmonar, dentre outras [9,10]. No entanto, são controlados por aumentar o fluxo urinário e, conseqüentemente, diminuir a chance para a detecção de outras substâncias ilegais e influenciar no peso corporal dos atletas. Os diuréticos são controlados em exames antidoping a nível de  $250 \text{ ng mL}^{-1}$  [11].

Dentro deste contexto, seria de alta relevância investigar o desenvolvimento de sensores eletroquímicos aptos a identificar e quantificar diuréticos em baixas concentrações com precisão em matrizes biológicas complexas com o intuito de propor alternativas mais econômicas aos métodos sofisticados de análise.

## **1.2. Análise de diuréticos**

Dentre as substâncias proibidas pela WADA, destacam-se os diuréticos, os quais são utilizados para diminuição do peso corpóreo ou até mesmo para mascarar outras possíveis substâncias proibidas utilizadas pelo atleta. A lista de substâncias proibidas mais recente disponibilizada pela WADA é do ano de 2019 e contempla mais de 17 substâncias diuréticas que são tidas como proibidas [2]. Dentre esta classe, destacam-se os diuréticos Bumetanida, Hidroclorotiazida e Triantereno. A determinação oficial para a classe dos diuréticos é baseada na técnica de cromatografia gasosa de alta resolução

acoplada à espectrometria de massas [12]. Na literatura, alguns trabalhos são encontrados para a determinação destes diuréticos, os quais incluem métodos baseados em cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas [13,14], voltametria [15,16], espectrofotometria [17,18], amperometria [19], cromatografia líquida de alta eficiência [20], espectrofluorimetria [21] e cromatografia líquida de ultra performance [22].

Merás e co-autores [23] propuseram um método para determinação de triantereno (TRT) usando técnicas espectrofotométricas monitorada em comprimento de onda de 358 nm. O limite de detecção encontrado foi de 0,20  $\mu\text{g mL}^{-1}$  para TRT e recuperações entre 107 a 108% para medidas realizadas em amostras de soro e urina, respectivamente.

Santos e colaboradores [24] propõem o uso de eletrodo de diamante dopado com boro para determinação de hidroclorotiazida (HCT) e losartan (LOS). Para isso, o eletrodo foi submetido a um pré-tratamento anódico em 0,04 mol L<sup>-1</sup> de tampão B-R (pH 9,5). A onda anódica forneceu uma relação linear entre  $3,0 \times 10^{-6}$  a  $7,4 \times 10^{-5}$  mol L<sup>-1</sup> para ambas as substâncias e permitiu alcançar limites de detecção ao redor de  $1,2 \times 10^{-6}$  e  $9,5 \times 10^{-7}$  mol L<sup>-1</sup> para HCT e LOS, respectivamente.

Patel et al. [14] desenvolveram um método baseado em cromatografia líquida acoplada a espectrômetro de massas para a determinação de bumetanida em amostras de plasma humano. Por meio da separação utilizando uma coluna C18 e fase móvel constituída por metanol e 5 mmol L<sup>-1</sup> de trifluoracetato de amônio em água deionizada, pH 6,0 (80:20, v/v) com vazão de 0,60 mL min<sup>-1</sup>, foi possível encontrar um valor de 0,03 ng mL<sup>-1</sup> para o limite de detecção e faixa linear no intervalo de 0,30 a 200,0 ng mL<sup>-1</sup>.

No trabalho de Shah et al. [13], um método para a determinação de hidroclorotiazida e lisinopril foi desenvolvido baseado em medidas de cromatografia líquida acoplada a detector de espectrômetro de massas. Após otimização do método e utilizando uma coluna Hypersil Gold C18 (50 mm×3.0 mm, 5  $\mu\text{m}$ ) e fase móvel constituída por acetonitrila-5,0 mM e formiato de amônia (pH 4.5; 85:15, v/v), foi obtida uma relação linear entre 0,50 a 250,0 ng mL<sup>-1</sup> para ambos os analitos.

Já Eisele et al. [15] propuseram um método para a determinação simultânea de hidroclorotiazida e valsartan em amostra farmacêutica utilizando

eletrodo de diamante dopado com boro previamente tratado catodicamente. Por meio de medidas em solução tampão Britton-Robinson (pH 5,0) e utilizando a técnica de voltametria de onda quadrada, foram encontradas regiões lineares entre 1,97–88,1  $\mu\text{mol L}^{-1}$  e 9,88–220  $\mu\text{mol L}^{-1}$  e limites de detecção de 0,639  $\mu\text{mol L}^{-1}$  e 0,935  $\mu\text{mol L}^{-1}$  para a hidroclorotiazida e valsartan, respectivamente.

No trabalho de Tabrizi et al. [25], um método para a determinação de triantereno em amostra de plasma e urina humana foi proposto por meio de medidas espectrofluorimétricas. Por meio da utilização de extração em ponto nuvem das amostras, foram encontradas relações lineares entre 5,00-800 e 10,0-800  $\mu\text{g L}^{-1}$  e limites de detecção de 3,90 e 5,80  $\mu\text{g L}^{-1}$  quando aplicado em amostra de urina e plasma, respectivamente.

Nexhadale e Mojarrab [26] desenvolveram um método para a determinação de triantereno em amostras de serum e farmacêutica utilizando um sensor baseado em eletrodo de grafite modificado com nanotubos de carbono funcionalizados e polímero molecularmente impresso. Com o uso de otimização multivariada e medidas por voltametria de pulso diferencial, foram obtidas região linear e limite de detecção de 0,08–265  $\mu\text{mol L}^{-1}$  e 3,35  $\text{nmol L}^{-1}$ , respectivamente.

Assim, o desenvolvimento de sensores eletroquímicos para determinação de Bumetanida, Hidroclorotiazida e Triantereno utilizando eletrodos modificados poderia ser de grande valia para fornecer métodos analíticos simples, versáteis e alcance de baixos níveis de detecção e aplicação em matrizes de interesse biológico, visando contribuir para análises destas substâncias no controle do doping.

### **1.3. Técnicas eletroquímicas**

A eletroanalítica é a área da química analítica que aplica as técnicas eletroquímicas para a determinação de compostos orgânicos, inorgânicos e organometálicos nas mais variadas matrizes, solventes aquosos e não aquosos usando principalmente o monitoramento de reações de transferência de carga [27,28].

Desde a sua descoberta em 1920 pelo cientista tcheco Jaroslav Heyrovsky [29,30], as técnicas voltamétricas tiveram grandes avanços [31] ao passar das décadas e hoje se tornaram uma ferramenta muito importante para o estudo de reações e mecanismos eletroquímicos [32,33], estudos de modelo de catálise enzimática [29,34], estudos de radicais livres gerados eletroquimicamente [29,35], em química de coordenação [29,36], na monitorização ambiental [29,37], na conversão da energia solar [29,38], no controle de qualidade industrial [29], dentre outros.

Além das aplicações acima mencionadas, a voltametria vem ganhando grande destaque no desenvolvimento de novos métodos analíticos por apresentarem vantagens em relação as outras técnicas como simplicidade, baixo custo, tempo de análise relativamente curto e, em muitos casos, o preparo da amostra é dispensável ou mais simples quando comparado a outros métodos [29,39,40].

Aliado aos benefícios intrínsecos das técnicas voltamétricas, é possível ainda obter melhorias em relação à sensibilidade, seletividade e relação linear através da modificação da superfície dos eletrodos por grupos como nanotubos de carbono [41], grafeno [42], grafite [43], partículas magnéticas [44], polímeros molecularmente impressos [45], partículas metálicas [46], óxido de titânio [47], quitosana [48], dentre outros.

Na literatura, os sensores eletroquímicos baseados na utilização de métodos voltamétricos são utilizados para a determinação e/ou quantificação de inúmeras espécies, as quais podemos incluir corantes [41,42], íons metálicos [49], diuréticos [16,32,50], antibióticos [29,51], antieméticos [29,52], pesticidas [53], hipolipemiantes [29,54], antipsicóticos [29,55], cardiovascular [29,56], hipoglicêmico [29,57], analgésicos [29,58], anabolizantes [59], coagulantes [29,60], antiagregantes plaquetários [29,61], anti-helmínticos [29,62], sedativos [29,63], gastrointestinais [29,64], antidepressivos [29,65], antiarrítmicos [29,66], analgésicos opioides [29,67], vitaminas [29,68], anticolinesterásicos [29,69], antiadrenérgico [29,70], antiparkinsoniano [29,71], antialérgicos [29,72], antígeno [48] dentre outros.

Como exemplo da aplicabilidade, podemos citar o trabalho de Karikalan et al. [73] que desenvolveram um sensor eletroquímico baseado em eletrodo de carbono vítreo modificado com carbono dopado com nitrogênio para a

determinação de ácido cafeico em amostra de vinho tinto. A partir de medidas por voltametria de pulso diferencial em meio de solução tampão fosfato 0,05 mol L<sup>-1</sup> (pH 7,0), uma curva analítica linear foi encontrada na faixa de concentração de 0,01 a 350 µmol L<sup>-1</sup> além de limites de detecção e quantificação de 2,4 e 4,0 nmol L<sup>-1</sup>, respectivamente.

No trabalho de Silva et al. [74], um sensor eletroquímico foi desenvolvido baseado em eletrodo de pasta de grafite modificado com ftalocianina de cobalto (II) para a determinação dos ácidos cítrico, láctico, málico e tartárico em amostras de sucos de fruta. Após otimização por meio da utilização da resolução de curva multivariada com mínimos quadrados alternados e registrado os sinais por voltametria de onda quadrada, uma região linear foi encontrada no intervalo entre 10–100 µmol L<sup>-1</sup> para todos os analitos.

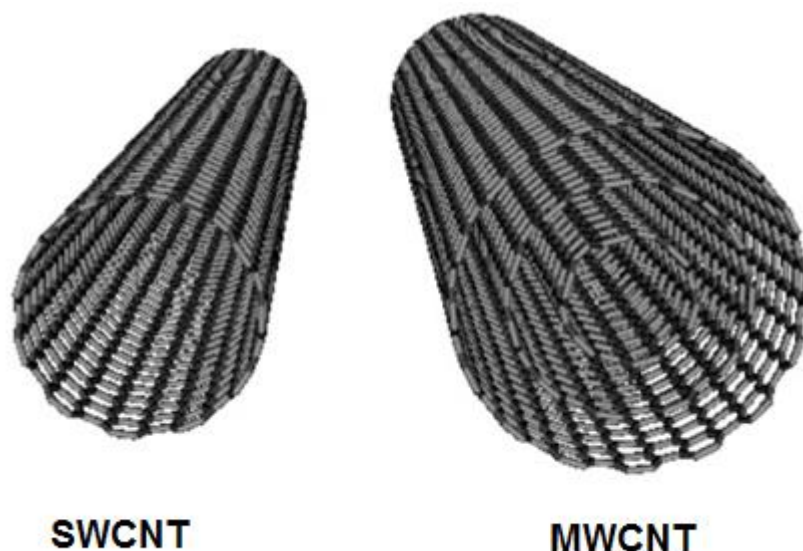
Kowalcze e Jakubowska [75] utilizaram um eletrodo de diamante dopado com boro para a determinação de carvacrol em amostra comercial de óleo essencial de orégano. A partir do tratamento catódico do eletrodo e utilizando a técnica de voltametria de pulso diferencial, foi encontrada uma região linear no intervalo de concentração de 0,29 a 15,03 mg L<sup>-1</sup> com limite de detecção de 0,02 mg L<sup>-1</sup>.

Assim, diante da grande versatilidade dos métodos voltamétricos e os baixos valores de limite de detecção reportado nos trabalhos, seria de grande interesse o estudo de novos sensores eletroquímicos baseados na modificação da superfície de eletrodos compósito e de carbono vítreo com partículas magnéticas, grafeno e nanotubos de carbono para a determinação de diuréticos em amostras de biológicas, como urina, visando o controle no monitoramento de doping.

### **1.3.1. Eletrodos modificados com nanotubos de carbono**

Desde a sua descoberta em 1991 pelo pesquisador Iijima [76], os nanotubos de carbono (CNT) tem chamado atenção pelas características intrínsecas do material tais como excelentes propriedades eletrônicas, térmica, mecânica e efeito catalítico [77], com ampla aplicabilidade como modelo em nanociência e nanotecnologia. Este material pode ser apresentado em duas formas: na forma de camada simples ("single-wall carbon nanotubes - SWNTs")

ou na forma de nanotubos multicamadas ("multi-wall carbon nanotubes - MWCNTs") (Figura 1) [78].



**Figura 1** – Representação dos nanotubos de carbono na forma de camada simples (SWCNT) e na forma de multicamadas (MWCNT).

Devido a sua grande habilidade para promover reações de transferências eletrônicas, grande intervalo de potencial e aumento da área ativa do eletrodo, os CNT são boas alternativas para o desenvolvimento de sensores eletroquímicos baseados na mudança da superfície dos eletrodos pelo seu recobrimento com CNT [79].

Os eletrodos modificados com CNT podem ser confeccionados de diversas maneiras incluindo dispersão em solvente ("Casting"), pasta, compósitos, dentre outros. No trabalho de Shahrokhian e Hafezi-Kahnamouei [80], a determinação de isoxsuprina em amostras clínicas e farmacêuticas foi proposta por meio da utilização de eletrodo de carbono vítreo modificado com MWCNTs decorados com nanopartículas de prata. Utilizando a técnica de voltametria de varredura linear e medidas em solução tampão B-R (pH 7,0), foram encontradas duas regiões lineares nos intervalos de 0,04–5,0  $\mu\text{mol L}^{-1}$  e 0,2–5,0  $\mu\text{mol L}^{-1}$  e limite de detecção de 12  $\text{nmol L}^{-1}$ .

No trabalho de Babaei e colaboradores [81], um método baseado em eletrodo de carbono vítreo modificado com compósito de MWCNT e quitosana foi desenvolvido para determinação simultânea de paracetamol e ácido úrico. Para isso, utilizou-se a técnica de voltametria de pulso diferencial em meio de



0,1 mol L<sup>-1</sup> de solução tampão fosfato (pH 7,0). Com isso, foi possível obter limites de detecção de 0,40 e 0,22 μmol L<sup>-1</sup> para ácido úrico e paracetamol, respectivamente, além de resultados satisfatórios na aplicação em amostras de soro e urina humana.

Em outro trabalho, Guo et al. [82] propuseram um eletrodo de carbono vítreo modificado com MWCNT/Nafion para a determinação de 8-hidroxiquinolina em cosméticos. A determinação foi realizada em 0,2 mol L<sup>-1</sup> de tampão acetado (pH 3,6) utilizando a técnica de voltametria de pulso diferencial. Nestas condições, encontrou-se faixa linear no intervalo de 2×10<sup>-8</sup> a 1,0×10<sup>-5</sup> mol L<sup>-1</sup> com limite de detecção de 9 nmol L<sup>-1</sup>. No trabalho de Duarte et al. [83], os pesquisadores confeccionaram um eletrodo de pasta de nanotubo de carbono utilizando óleo mineral (Nujol) como aglutinante, na proporção 22:78%, respectivamente, para determinação simultânea de acetaminofenol e ácido ascórbico. Medidas em 0,1 mol L<sup>-1</sup> de tampão fosfato (pH 7,0) + 0,3 mmol L<sup>-1</sup> do surfactante catiônico brometo de cetilpiridínio permitiram a determinação por voltametria de pulso diferencial e limites de detecção de 2,1 e 7,1 μmol L<sup>-1</sup>, respectivamente.

Yari e Shams [84] propuseram a determinação de Sulfametoxazol em amostras farmacêuticas e de urina utilizando eletrodo de carbono vítreo modificado com MWCNT decorados com prata. A partir de medidas em solução tampão fosfato (pH 6,0) e varreduras por voltametria de pulso diferencial, uma faixa linear foi encontrada entre 0,05–70 μmol L<sup>-1</sup> com limite de detecção de 0,01 μmol L<sup>-1</sup> após 2 min de tempo de acúmulo.

Deste modo, considerando a alta versatilidade dos materiais baseados em MWCNT para modificação de eletrodos, sua aplicação seria relevante para o desenvolvimento de sensores para quantificação de diuréticos controlados pela WADA.

### **1.3.2 Eletrodos modificados com Grafeno**

O uso de eletrodos modificados com óxido de grafeno tem merecido atenção devido as suas extraordinárias propriedades estruturais, elétricas, químicas, mecânicas e elevada área superficial [85–88]. O grafeno é uma folha

plana de átomos de carbono com ligações  $sp^2$ , densamente compactada e com espessura extremamente fina, reunidas em uma estrutura cristalina hexagonal.

Como exemplo da aplicação de grafeno no desenvolvimento de sensores eletroquímicos destacamos o trabalho de He et al. [89], em que os autores propuseram um sensor baseado em eletrodo de carbono vítreo modificado com compósito de óxido de grafeno/poli(glicina) para a determinação de simultânea de dopamina (DA), ácido úrico (AU), guanina (GU) e adenina (AD) em amostra de urina. Por meio de medidas em meio de solução 0,10 mol L<sup>-1</sup> de tampão acetato (pH 3,7) e utilizando a técnica de voltametria de pulso diferencial, foram encontradas faixas lineares no intervalo de 0,20–62, 0,10–105, 0,15–48 e 0,090–103  $\mu\text{mol L}^{-1}$  com limites de detecção de 0,011, 0,061, 0,026 e 0,030  $\mu\text{mol L}^{-1}$  para DA, AU, GU e AD, respectivamente.

Sunder et al. [90] desenvolveram um método voltamétrico para a determinação de L-DOPA em amostra de urina utilizando um eletrodo de carbono vítreo modificado com nanocompósito óxido de grafeno/óxido de ítrio. Mediante análises em solução tampão de citrato de fosfato 0,1 mol L<sup>-1</sup> (pH 3,5) e medidas por voltametria de onda quadrada, foi encontrada uma faixa linear entre 0,5 a 350  $\mu\text{mol L}^{-1}$  com limites de detecção e quantificação de 0,05 e 0,17  $\mu\text{mol L}^{-1}$ , respectivamente.

No trabalho de Eissa e co-autores [91], um eletrodo de carbono impresso modificado com grafeno foi proposto para a determinação de  $\beta$ -lactoglobulina. Através da técnica de voltametria de pulso diferencial em 10 mmol L<sup>-1</sup> de solução salina de tampão fosfato (pH 7,40), o limite de detecção encontrado foi de 0,85 pg mL<sup>-1</sup>.

Embora a utilização de óxido de grafeno tenha mostrado excelentes resultados para a modificação da superfície dos eletrodos, melhores condições podem ser adquiridas por meio da redução do óxido de grafeno. Tais melhorias são constatadas, pois, ligações  $sp^2$  são restauradas, aumentando a condutividade do material. Dentre os procedimentos para a redução do óxido de grafeno podemos citar os baseados em tratamentos químicos [92,93], térmicos [93,94], eletroquímicos [50,93] e por exposição à luz [93,95]. Dentre estes, a estratégia via redução eletroquímica vem ganhando destaque, uma vez que pode ser adquirida diretamente *in situ* por eletrodeposição [96] simplificando o processo de construção do sensor eletroanalítico.

Diante das melhorias adquiridas do material por meio de sua redução, esta forma do óxido de grafeno vem sendo muito utilizada para a confecção de sensores eletroquímicos. Como exemplo disso, Wiench et al. [97] desenvolveram um sensor baseado na modificação da superfície de um eletrodo de carbono vítreo com óxido de grafeno reduzido para a determinação de 4-nitrofenol em amostra de água de rio. Utilizando a técnica de voltametria de pulso diferencial e medidas em solução tampão acetato  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  (pH 4,2), uma curva analítica foi construída no intervalo de concentração de 50 a  $800 \mu\text{mol L}^{-1}$  e limite de detecção de  $42 \mu\text{mol L}^{-1}$ .

Wang e colaboradores [98] utilizaram um eletrodo de carbono impresso modificado com compósito de líquido iônico/grafeno reduzido eletroquimicamente recoberto por filme de bismuto para a determinação de traços de chumbo e cádmio. Utilizando voltametria de redissolução anódica por onda quadrada os autores alcançaram limite de detecção de 0,08 e  $0,10 \mu\text{g L}^{-1}$  para cádmio e chumbo, respectivamente.

Ozcan et al. [99] propuseram um eletrodo de carbono vítreo modificado com nanocompósito de óxido de grafeno reduzido/sílica para a determinação de fenitrothion em amostras de água do rio, urina, uva passa, tomate e laranja. Utilizando a técnica de voltametria de pulso diferencial e medidas em meio de solução tampão fosfato  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ , foi encontrada uma região linear no intervalo de concentração de 0,005 a  $1,0 \mu\text{mol L}^{-1}$  e limite de detecção de  $0,19 \text{ nmol L}^{-1}$ .

No trabalho de Piovesan et al. [100], a determinação de metilparabeno em amostra de produtos de higiene pessoal foi proposta utilizando eletrodo de carbono vítreo modificado com suspensão de óxido de grafeno reduzido/nanopartículas de ouro/quitosana. Sob condições otimizadas da técnica de voltametria de onda quadrada como rampa de potencial (3,0 mV), amplitude (40,0 mV) e frequência (50,0 Hz) e medidas em solução tampão fosfato (pH 8,0), uma curva analítica foi construída no intervalo de 0,03 a  $1,30 \mu\text{mol L}^{-1}$ , encontrando valores de limites de detecção e quantificação de 13,77 e  $41,73 \text{ nmol L}^{-1}$ , respectivamente.

Deste modo, considerando a alta versatilidade dos materiais baseados em óxido de grafeno reduzido para modificação de eletrodos, sua aplicação

seria relevante para o desenvolvimento de sensores para quantificação de diuréticos controlados pela WADA.

### **1.3.3. Eletrodos modificados por partículas magnéticas**

As partículas magnéticas (PM) são caracterizadas por serem elementos do tipo paramagnéticos que, quando submetidos a um campo magnético externo, seus elétrons desemparelhados se alinham, fazendo surgir um ímã. Entretanto, quando removido o campo magnético externo, a magnetização é perdida, pois a soma de todos os momentos de dipolo desordenados é igual a zero [101].

Devido a esta propriedade magnética, as PM têm apresentado grande aplicação como materiais de liberação controlada de drogas [102], terapia de câncer e outras terapias biológicas [103,104][105], hipertermia [106], separação magnética [106], ressonância magnética [106], sensores [107], e catálises [108,109]. Dentre os diversos tipos de partículas magnéticas, umas das mais promissoras são as partículas de óxido de ferro, podendo ser encontradas em vários tipos como: magnetita ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ), maghemita ( $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ ) e hematita ( $\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$ ) [110,111]. Dentre estas, a magnetita é a mais estudada devido ao seu comportamento superparamagnético em temperatura ambiente. Além desta característica,  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  é adequada para incorporação em áreas biológicas, pois não possuiu toxicidade e apresenta elevada biocompatibilidade [112].

A magnetita pode ser obtida por diversas maneiras tais como sol-gel, coprecipitação, hidrólises e decomposição térmica [113–116]. Através dos diferentes tipos de sínteses, pode-se adquirir tamanhos e formas diferentes para as PM. Um exemplo disso é a síntese por co-precipitação química [114], onde as partículas de magnetita são adquiridas em formato esférico com tamanhos menores que 25 nm. Entretanto, quando utilizado o método de hidrólise, as partículas são obtidas com morfologias cubo octaédricas com tamanhos superiores a 50 nm [117].

O interesse nas partículas de magnetita na área de eletroanalítica consiste na ampla facilidade de uso quando utilizada na modificação de eletrodos. Elas podem propiciar aumento da área superficial, aumento da pré-

concentração do analito por adsorção ou separação magnética atingindo baixos níveis de detecção [44,118].

Bagheri et al. [119] reportaram a utilização de eletrodos de pasta de MWCNT decorados com nanopartículas de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  para determinação voltamétrica de haloperidol. Por meio de medidas em  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  de tampão B-R (pH 7,5) utilizando a técnica de pulso diferencial e onda quadrada, encontrou-se relações lineares nos intervalos de  $1,2 \times 10^{-3}$  a  $0,52 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$  e  $6,5 \times 10^{-4}$  a  $0,52 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ , respectivamente. Os limites de detecção para a haloperidol foram  $7,02 \times 10^{-10}$  e  $1,33 \times 10^{-10} \text{ mol L}^{-1}$  para a técnica de pulso diferencial e para técnica de onda quadrada, respectivamente.

Yin e co-autores [120] confeccionaram um eletrodo de carbono vítreo modificado com nanopartículas de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -Quitossana-Grafeno para determinação de guanosina em amostras de urina. Por meio da técnica de pulso diferencial e medidas em  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  de tampão fosfato (pH 7,0), a relação linear e o limite de detecção foram  $2,0 \times 10^{-6}$  a  $3,5 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$  e  $7,5 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ , respectivamente.

Para a determinação de bisfenol A em leite, Yin e colaboradores [121] propuseram um método eletroanalítico baseado em eletrodo de carbono vítreo modificado com nanopartículas magnéticas de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ /poli(amidoamina). Por meio de análises em meio de tampão fosfato  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  (pH 7,0) e pela técnica de amperometria, a faixa linear e o limite de detecção foram  $1,00 \times 10^{-8}$  a  $3,07 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$  e  $5 \times 10^{-9} \text{ mol L}^{-1}$ , respectivamente.

A funcionalização das nanopartículas de magnetita tem sido investigada mais recentemente como plataformas promissoras para construção de sensores capazes de determinar analitos de forma seletiva em baixa concentração [122–124]. Deste modo, estes eletrodos, assim modificados, poderiam ser uma alternativa promissora para determinação de agentes anabolizantes e diuréticos em amostras de urina e sangue humano.

#### **1.3.4 Eletrodos de nanotubos de $\text{TiO}_2$ auto-dopados**

Nanomateriais altamente ordenados como nanotubos de  $\text{TiO}_2$  ( $\text{TiO}_2\text{NT}$ ) podem ser facilmente preparados por anodização eletroquímica e podem ser utilizados para diversas aplicações na área de fotoeletroquímica [125,126],

células solares sensibilizadas por corantes [127], dentre outras [128], pois apresentam benefícios como elevada área superficial e excelentes vias de percolação de elétrons para transferência de carga vetorial entre interfaces [125,129].

No entanto, por se tratar de um semicondutor do tipo-*n*, eletrodos baseados em TiO<sub>2</sub>NT não são frequentemente utilizados como sensores anódicos no desenvolvimento de métodos eletroanalíticos em decorrência de suas propriedades condutoras inadequadas. Isto ocorre, pois em materiais semicondutores a banda de valência (banda de maior energia ocupada por elétrons) e a banda de condução (banda vazia de menor energia) se encontram separadas por uma região de energia proibida, conhecida como energia de *band gap* ( $E_{bg}$ ). Assim, para que os semicondutores possam apresentar condutividade, tem-se a necessidade da aplicação de uma energia externa (como por exemplo radiação UV), sendo esta igual ou superior à  $E_{bg}$ , para que os elétrons sejam transferidos da banda de valência (BV) para a banda de condução (BC), criando assim portadores de cargas, representados pelo par elétron/buraco. Entretanto, nem todos os elétrons presentes na BV podem ser transferidos para a BC, podendo apenas serem promovidos os elétrons presentes acima da Energia de Fermi ( $E_F$ ), sendo esta a energia do estado preenchido mais alto a 0 K.

Além disso, outro comportamento importante deve ser levado em consideração quando o TiO<sub>2</sub>NT é utilizado como plataforma eletródica. Quando colocado em solução, a  $E_F$  do semicondutor geralmente será diferente (maior) do que o potencial eletroquímico do eletrólito de suporte [128,130]. Assim, para promover o equilíbrio do sistema, haverá um fluxo de carga do TiO<sub>2</sub>NT, fazendo com que a  $E_F$  do semicondutor diminua até atingir o equilíbrio. Como consequência desse fluxo de elétrons, ocorrerá um entortamento de bandas da região denominada camada de carga espacial [128,130]. O grau de entortamento das bandas pode ser controlado por meio da aplicação de um potencial no sistema. Entretanto, para cada tipo de semicondutor existe um potencial onde não haverá a região de carga espacial, ou seja, não ocorrerá o entortamento das bandas, sendo este conhecido como potencial de banda plana ( $E_{BP}$ )[128,130]. Esta situação corresponde ao potencial de carga zero do material eletródico [131]. Assim, quando o potencial externo aplicado é superior

ao  $E_{FB}$ , haverá o entortamento de bandas, fazendo com que elétrons sejam conduzidos para o contra-eletródo [128,131,130].

Diante do explanado, a utilização de eletrodos semicondutores, como por exemplo os baseados em  $TiO_2NT$ , como sensores eletroanalíticos sem fotoativação por irradiação UV tem sido pouco explorada até hoje, devido em grande parte as suas propriedades semicondutoras [132]. Assim, como tentativa para a utilização de eletrodos baseados em  $TiO_2NT$  no desenvolvimentos de métodos eletroanalíticos, alguns autores propuseram a modificação de sua superfície, como é o caso do trabalho de Mahshid e co-autores [133], onde um sensor baseado na eletrodeposição de nanopartículas de Pd, Pt e Au em eletrodos de nanotubos de  $TiO_2$  foi proposto para a determinação de dopamina. Utilizando voltametria de pulso diferencial, a faixa linear e o limite de detecção foram de  $5,0 \times 10^{-8}$  a  $3,0 \times 10^{-5}$  mol  $L^{-1}$  e  $3 \times 10^{-8}$  mol  $L^{-1}$ , respectivamente.

No trabalho de Wang e colaboradores [134], um sensor amperométrico não enzimático baseado em eletrodo de nanotubos de  $TiO_2$  decorados com nanopartículas de Pt foi proposto para a determinação de glicose. A partir de medidas por cronoamperometria em solução de NaOH  $0,1$  mol  $L^{-1}$ , foi encontrada resposta linear no intervalo de  $1$  a  $15$  mmol  $L^{-1}$  e limite de detecção de  $0,2$  mmol  $L^{-1}$ .

Outra forma de melhorar consideravelmente a condutividade dos materiais semicondutores, é por meio de sua dopagem. Neste processo são utilizados como impurezas determinados elementos que apresentam valência diferente do material semicondutor. Assim, quando um semicondutor, como por exemplo  $TiO_2NT$ , é dopado com espécies doadoras de elétrons, um novo nível energético surgirá em direção à BC, permitindo ao material semicondutor um caráter melhorado em sua condução elétrica sem a necessidade de sua ativação por fonte de energia externa (como por exemplo, por luz UV).

Recentemente, alguns trabalhos tem demonstrado que quando eletrodos de  $TiO_2NT$  são submetidos a tratamentos catódicos, um processo de auto-dopagem do material é promovido, permitindo a criação de estados  $Ti^{3+}$ , o que confere ao material um comportamento quase metálico [135,136] devido a criação de níveis energéticos mais próximos da BC. Assim, diante das melhorias adquiridas, os eletrodos de  $TiO_2NT$  auto-dopados tem sido utilizados

como supercapacitores [129,135,137–139], ânodos para baterias de íons lítio [140], ânodos para a geração de oxidantes [137,139,141,142] e para a degradação de contaminantes [143,144].

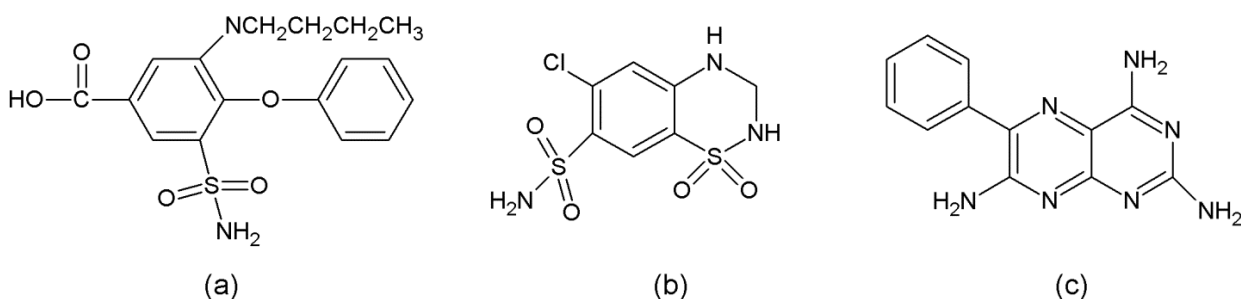
Deste modo, pretende-se investigar a utilização de eletrodos de nanotubos de TiO<sub>2</sub> auto-dopados como possíveis sensores eletroquímicos para a determinação de analitos, como por exemplo diuréticos, a fim de propor uma nova plataforma sensorial para o desenvolvimento de métodos eletroanalíticos.



## 2. OBJETIVO

Este trabalho tem por objetivo investigar novos métodos eletroanalíticos para a determinação dos diuréticos bumetanida, hidroclorotiazida e triantereno (Figura 2), substâncias proibidas pela Agência Mundial Antidopagem em concentrações compatíveis com os limites impostos mundialmente. Para isto pretende-se desenvolver sensores eletroquímicos para estes compostos utilizando:

- Eletrodo compósito modificado com partículas magnéticas funcionalizadas com grupo tosila;
- Eletrodos de carbono vítreo modificados com óxido de grafeno reduzido;
- Eletrodo de carbono vítreo modificado com nanotubos de carbono;
- Eletrodo de nanotubos de  $\text{TiO}_2$  auto-dopados eletroquimicamente.



**Figura 2** – Estrutura da Bumetanida (a), Hidroclorotiazida (b) e Triantereno (c).

### 3. PARTE EXPERIMENTAL

#### 3.1. Reagentes e equipamentos

Todos os reagentes utilizados no trabalho foram de grau analítico e as soluções foram preparadas com água ultrapura (Milli-Q® system, Millipore). Bumetanida (pureza  $\geq 98,0$  %), triantereno (grau de pureza  $\geq 99\%$ ), hidroclorotiazida, dimetilsulfóxido, óxido de grafeno, ácido úrico, glicose, ureia e creatinina foram obtidos da Sigma-Aldrich. Partículas magnéticas funcionalizadas com grupo tosila foram obtidas da Life Technologies®. Hexacianoferrato (III) de potássio e hexacianoferrato (II) de potássio tri-hidratado foram adquiridos da Neon. Ácido bórico, ácido fosfórico, ácido acético e cloreto de potássio foram adquiridos da Merck. Hidróxido de sódio, glicerol, fluoreto de amônio e sulfeto de sódio foram obtidos da Synth. Furosemida foi obtida da Purifarma. Folhas de Titânio foram adquiridas da empresa Realum, Brasil. MWCNT foi obtido da DROPSSENS. Soluções padrões de  $0,01 \text{ mol L}^{-1}$  de bumetanida, furosemida, triantereno e hidroclorotiazida foram preparadas em meio de etanol, etanol, dimetilsulfóxido e acetonitrila, respectivamente, e diluída posteriormente em  $0,10 \text{ mol L}^{-1}$  de solução tampão Britton–Robinson (B–R) utilizado como eletrólito suporte. O tampão B–R  $0,10 \text{ mol L}^{-1}$  foi preparado pela mistura dos ácidos fosfórico, acético e bórico ( $0,10 \text{ mol L}^{-1}$  de cada) com adições de volumes adequados de solução de hidróxido de sódio  $3 \text{ mol L}^{-1}$  para atingir o pH requerido. Medidas de pH foram feitas em um pHmetro TECNOPON mPA 210 pH-meter. Medidas de microscopia eletrônica de varredura foram feitas em um FEG-NEV; modelo JEOL 7500F. Os experimentos eletroquímicos (técnicas voltamétricas e espectroscopia de impedância eletroquímica) foram registrados em um potenciostato Autolab PGSTAT302N equipado com um módulo de FRA32 AC controlado pelo software NOVA. Análises por LC–MS/MS foram conduzidas em um cromatógrafo líquido de alta eficiência da 1200 Agilent Technologies acoplado a um espectrômetro de massas 3200 QTRAP (Linear Ion Trap Quadrupole LC–ESI–MS/MS).

## **3.2. Preparo dos eletrodos**

### **3.2.1. Eletrodo compósito modificado com partículas magnéticas**

Para a confecção do eletrodo compósito (com área geométrica de 0,60 cm<sup>2</sup>), inicialmente, foram misturados pó de grafite e resina epóxi na proporção de 1:4 (p/p). Em seguida, uma camada da pasta gerada foi inserida no interior de uma cavidade de um eletrodo de PVC. Na sequência, um pequeno ímã cilíndrico (3 mm de diâmetro) foi inserido na cavidade do eletrodo e, na sequência, a mesma foi preenchida com a pasta anteriormente citada. Em seguida, o eletrodo foi colocado no interior de uma estufa em temperatura de 40 °C por uma semana para obtenção do compósito rígido [145,146]. Uma alíquota de uma solução contendo 30 mg mL<sup>-1</sup> de partículas magnéticas funcionalizadas com grupo tosila (PM/TS) foi diluída em meio aquoso para gerar uma solução de 1 mg mL<sup>-1</sup>. Em seguida, 30 µL da solução de PM/TS previamente preparada foram adicionadas na superfície do eletrodo compósito. Após este procedimento, o eletrodo compósito foi deixado em repouso para evaporação do solvente e formação do filme de PM/TS na superfície do eletrodo.

### **3.2.2. Eletrodo de carbono vítreo modificado com óxido de grafeno reduzido**

Um eletrodo de carbono vítreo (ECV) com área geométrica de 0,14 cm<sup>2</sup> foi polido manualmente com uma lixa 4.000 e lavado com água destilada. Solução padrão de 4 mg mL<sup>-1</sup> de óxido de grafeno (OG) foi diluída 2 vezes com água ultrapura e colocada em banho ultrassom por 4 horas. Em seguida, a solução de OG foi diluída 1 vez com 0,20 mol L<sup>-1</sup> de solução de sulfato de sódio. A modificação do ECV, previamente limpo, foi feita por meio da eletrodeposição da solução de OG (1 mg mL<sup>-1</sup> em sulfato de sódio 0,10 mol L<sup>-1</sup>) aplicando um potencial de -1,4 V por 500 s [147]. Em seguida, o eletrodo de carbono vítreo modificado com óxido de grafeno reduzido (ECV/OGR) foi lavado com água destilada e mantido em temperatura ambiente por 15 min para secagem do filme.

### **3.2.3. Eletrodo de carbono vítreo modificado com nanotubos de carbono**

Primeiramente, 10 mg de MWCNT foi macerado em uma placa de petri e, na sequência, 1 mg do material foi inserido no interior de um béquer contendo 1 mL de N,N-dimetilformamida. Posteriormente, a mistura foi mantida por 30 min em banho ultrassom para dispersão dos MWCNT. Em seguida, uma alíquota de 2,5  $\mu\text{L}$  da suspensão de MWCNT-DMF foi adicionada na superfície de um eletrodo de carbono vítreo previamente limpo, com área geométrica de 0,14  $\text{cm}^2$ . Por fim, o eletrodo foi mantido em uma estufa a 60°C por 20 min para secagem e formação do filme.

### **3.2.4. Eletrodo de nanotubos de $\text{TiO}_2$ polarizado**

Os eletrodos de nanotubos de  $\text{TiO}_2$  ( $\text{TiO}_2\text{NT}$ ) foram preparados por anodização eletroquímica em eletrólito orgânico composto por 0,25% de fluoreto de amônio em glicerol contendo 10% de água. Uma folha de Ti de 2x1 cm previamente preparada foi submetida a 30 V por 50 h. Então, o eletrodo de  $\text{TiO}_2\text{NT}$  foi lavado e aquecido em 450 °C por 60 min [148]. O eletrodo de  $\text{TiO}_2\text{NT}$  “auto-dopado” (P- $\text{TiO}_2\text{NT}$ ) foi preparado por uma polarização catódica em solução de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0,1  $\text{mol L}^{-1}$ . O efeito da polarização foi avaliada em diferentes pH (3, 7 e 10), potencial aplicado (-1,5 V, -2,0 V e -2,5 V vs  $\text{Ag|AgCl}$  3  $\text{mol L}^{-1}$ ) e tempo de polarização (5, 10 e 20 min).

## **3.3. Preparo das amostras e análises**

### **3.3.1. Preparo da amostra para as análises do Triantereno**

O método foi aplicado para análises do diurético Triantereno (TRT) em amostra de urina humana utilizando o seguinte procedimento: 10 mL de uma amostra de urina, coletada de uma pessoa saudável que se voluntariou, foram fortificadas com 4,93  $\mu\text{mol L}^{-1}$  de TRT. 2 mL desta amostra foram adicionados em 8 mL de solução tampão B-R 0,1  $\text{mol L}^{-1}$  (pH 6,0) na célula eletroquímica e analisada sem nenhum prévio tratamento da amostra.

A mesma amostra foi submetida à análise por LC-MS/MS, após prévia diluição de 5 vezes e limpeza da amostra. Para o pré-tratamento, 2 mL da urina fortificada passou por um processo de extração em um cartucho contendo polímero poliestireno-divinilbenzeno (Phenomenex Strata-X 33u; 200 mg, 3 mL), previamente condicionado com metanol (3 mL) e água Milli-Q (3 mL). Após o carregamento da amostra, o sorvente foi lavado com 2 mL de água Milli-Q. Após secagem sob fluxo de gás nitrogênio por 1 min, o analito foi eluído com 2 mL de metanol e, então, uma alíquota (150 µL de amostra + 150 µL de água Milli-Q) foi inserida em frascos para análise no LC-MS/MS.

A fonte de íon foi operada em modo positivo do eletrospray em 600 °C nas seguintes condições de ionização: voltagem do íon spray de 5.500 V, pressão da cortina de gás de 20 psi, pressão do gás do nebulizador1 de 50 psi, pressão do gás do nebulizador2 de 50 psi, potencial de declustering de 31 V e potencial de entrada de 10 V [32].

Para a análise por cromatografia líquida (LC) utilizou-se uma fase móvel constituída por uma mistura de água ultrapura contendo 0,10% de ácido fórmico (A) e metanol (B) com eluição em diferentes gradientes: 0–2 min 30% B, 2–4 min 100% B, 4–5 min 100% B, 5–6 min 100–70% B, 6–10 min 70% B [149]. A vazão utilizada foi de 1 mL min<sup>-1</sup> com injeção de 20 µL da amostra.

### **3.3.2. Preparo da amostra para as análises da Bumetanida**

A amostra de urina sintética foi preparada pela mistura dos seguintes reagentes: 0,73 g de NaCl, 0,40 g de KCl, 0,28 g de CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O, 0,56 g de Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0,35 g de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,25 g de NH<sub>4</sub>Cl e 6,25 g de ureia, que foram adicionados em 250 mL de água [150,151]. Em seguida, a urina sintética foi fortificada com 6,86×10<sup>-7</sup> mol L<sup>-1</sup> de Bumetanida (BMT) (equivalente a 250 ng mL<sup>-1</sup>). Então, 4 mL da amostra de urina sintética foi inserida em uma célula eletroquímica contendo 6 mL de solução tampão B-R 0,1 mol L<sup>-1</sup> (pH 4,0).

A amostra de urina humana foi coletada de uma pessoa voluntária e saudável. 10 mL da amostra foram fortificadas com 6,86×10<sup>-7</sup> mol L<sup>-1</sup> de BMT (equivalente a 250 ng mL<sup>-1</sup>). Em seguida, 4 mL da amostra foram inseridas sem nenhum prévio tratamento em uma célula eletroquímica contendo 6 mL de solução tampão B-R 0,1 mol L<sup>-1</sup> (pH 4,0).

Para as análises da amostra de urina humana por LC–MS/MS, foi empregado o mesmo processo de extração da seção 3.3.1., porém, neste caso, foram utilizados 4 mL da amostra.

As ionizações em condições de modo positivo foram as mesmas descritas no item 3.3.1. Para a análise por LC utilizou-se a mesma fase móvel descrita na seção 3.3.1., contudo, com uma eluição com diferentes gradientes: 0–2 min 5% B, 2–12 min 5–100% B, 12–13 min 100% B, 13–14 min 100–5% B, e 14–20 min 5 % B [149]. A vazão utilizada foi de 1 mL min<sup>-1</sup> com injeção de 20 µL da amostra.

### **3.3.3. Preparo da amostra para as análises da Hidroclorotiazida e Triantereno**

A amostra de urina sintética para a determinação de Hidroclorotiazida (HCT) e Triantereno (TRT) foi preparada da mesma maneira como descrito na seção 3.3.2. Em seguida, uma alíquota de 10 mL foi fortificada com  $8,40 \times 10^{-7}$  e  $9,87 \times 10^{-7}$  mol L<sup>-1</sup> de HCT e TRT, respectivamente (equivalente a 250 ng mL<sup>-1</sup>). Para as análises eletroquímicas, 4 mL da amostra de urina, sem nenhum prévio tratamento, foi inserida em uma célula eletroquímica contendo 6 mL de solução tampão B–R 0,1 mol L<sup>-1</sup> (pH 4,0), resultando em uma concentração de  $3,36 \times 10^{-7}$  e  $3,95 \times 10^{-7}$  mol L<sup>-1</sup> de HCT e TRT, respectivamente.

### **3.4. Análises eletroquímicas**

Todas as medidas voltamétricas foram registradas em uma célula eletroquímica de 10,0 mL em um sistema convencional de três eletrodos sendo os eletrodos de trabalho, auxiliar (fio de platina) e referência (Ag|AgCl; KCl, 3 mol L<sup>-1</sup>).

As eletrólises dos diuréticos foram efetuadas utilizando um sistema convencional semelhante às análises voltamétricas, entretanto, com as seguintes diferenças: volume da célula de 75 mL e eletrodo auxiliar constituído de uma placa de Ti/Ru de 25 cm<sup>2</sup>. Para a eletrólise do TRT utilizou-se um

eletrodo de rede de platina e para a eletrólise da BMT foi utilizada uma placa de carbono vítreo.

Medidas de Espectroscopia de Impedância Eletroquímica foram registradas em solução 5 mmol L<sup>-1</sup> de Fe(CN)<sub>6</sub><sup>3-/4-</sup> em meio de solução 0,1 mol L<sup>-1</sup> de KCl, no intervalo de 10 kHz – 0.03 Hz, em OCP (0,220 V vs Ag|AgCl, KCl, 3 mol L<sup>-1</sup>).

### **3.5. Análises dos produtos da eletrólise por LC–MS/MS**

Os procedimentos mencionados a seguir foram os mesmos para as medidas do TRT e da BMT. Os produtos das eletrólises foram identificados por LC–MS/MS equipado com uma coluna com fase estacionária pentafluorofenil (Phenomenex Kinetex PFP; 150×4.6 mm; 5 µm). A fase móvel utilizada para a eluição das amostras foi a mesma utilizada na seção 3.3.1., entretanto, com a seguinte programação gradiente: 0–2 min 5 % B, 2–12 min 5–100 % B, 12–13 min 100 % B, 13–14 min 100–5 % B e 14–20 min 5 % B, usando vazão de 1 mL min<sup>-1</sup> e injeção de 20 µL da amostra[149].

As ionizações em condições de modo positivo foram as mesmas descritas no item 3.3.1. Os experimentos para investigação dos produtos de oxidação foram feitos pelo software LightSight® (SCIEX), onde uma série de reações pré-programadas foram investigadas com base no espectro de íons de fragmento do padrão TRT e BMT. Todos os experimentos foram testados por varredura de massa avançada e foram realizados Monitoramento de Reação Selecionado com a aquisição simultânea de experimentos com íons de fragmentos.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

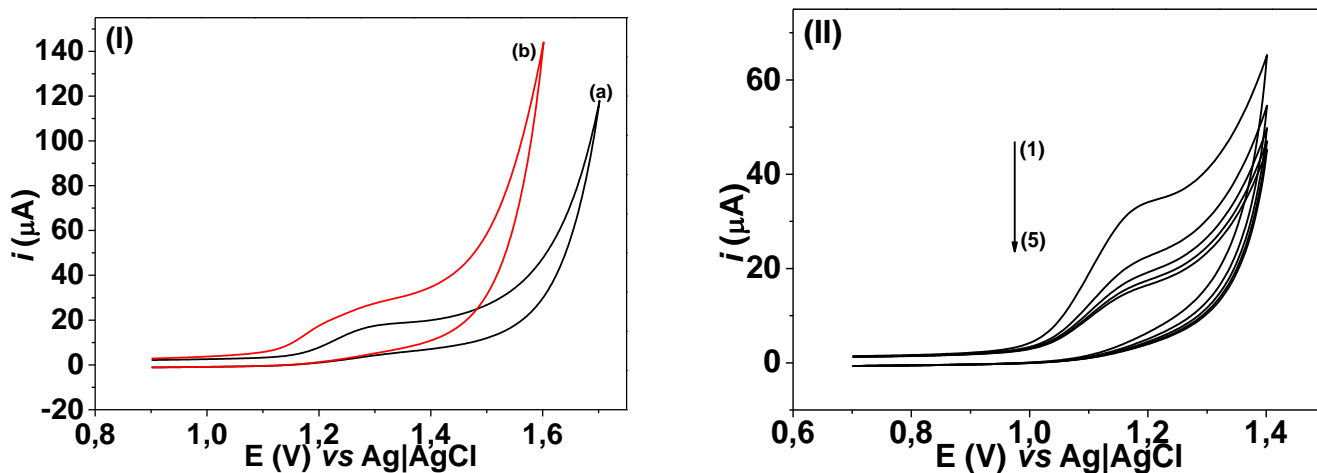
### 4.1. Sensor voltamétrico baseado em eletrodo compósito modificado com partículas magnéticas para determinação de Triantereno em amostra biológica

#### 4.1.1. Comportamento eletroquímico do TRT

Voltamogramas cíclicos obtidos para uma solução contendo  $100 \mu\text{mol L}^{-1}$  de TRT em solução tampão B-R  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  (pH 4,0) utilizando o eletrodo compósito de grafite + resina epóxi + imã antes e após a modificação com partículas magnéticas funcionalizadas com grupo tosil são mostrados na Figura 3.I. Quando utilizado eletrodo compósito sem modificação (EC) (Fig. 3.I.a), apenas um pico de oxidação é observado no potencial de 1,30 V com uma intensidade de pico anódica ( $i_{pa}$ ) de  $13,9 \mu\text{A}$ , indicando que o TRT apresenta um comportamento com características de processo irreversível [152]. Para o eletrodo compósito modificado com partículas magnéticas funcionalizadas com grupo tosil (EC-PM/TS), a oxidação do analito é verificada no potencial de 1,24 V com  $i_{pa}$  de  $17,4 \mu\text{A}$  (Fig. 3.I.b), indicando um aumento de aproximadamente 25% na  $i_{pa}$  quando comparado ao EC.

O efeito de ciclos sucessivos no comportamento voltamétrico do TRT utilizando o EC-PM/TS foi investigado e mostrado na Figura 3.II. Observa-se que em varreduras sucessivas, a  $i_{pa}$  do analito diminui drasticamente, indicando que o produto de oxidação do TRT adsorve na superfície do eletrodo. A adsorção espontânea é muito rápida, uma vez que não houve aumento de corrente variando o tempo de acúmulo no intervalo de 0 a 5 min. No entanto, para minimizar problemas e renovar a superfície, antes de cada análise, a solução foi agitada por 20 segundos para remover as espécies oxidadas.





**Figura 3** – Voltamogramas cíclicos para  $100 \mu\text{mol L}^{-1}$  de TRT em solução tampão  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  B-R (pH 4,0) utilizando eletrodo composto sem (a) e com (b) a modificação com partículas magnéticas funcionalizadas com grupo tosila (I); Voltamogramas cíclicos sucessivos para  $100 \mu\text{mol L}^{-1}$  de TRT em solução tampão  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  B-R (pH 6,0) utilizando EC-PM/TS (II). Velocidade de varredura:  $75 \text{ mV s}^{-1}$ .

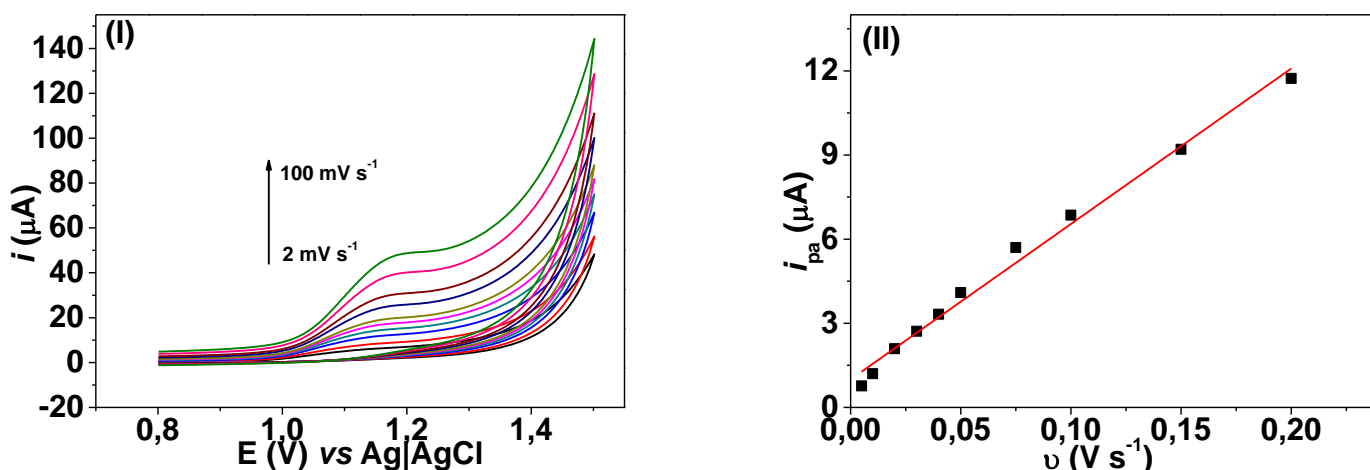
#### 4.1.2. Efeito da velocidade de varredura na oxidação do TRT

O efeito da velocidade de varredura ( $v$ ) sobre a intensidade da corrente de pico anódico foi investigado para  $100 \mu\text{mol L}^{-1}$  do TRT em solução tampão B-R  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  (pH 6,0). Na Figura 4.I, são mostrados os respectivos voltamogramas variando-se a  $v$  no intervalo entre 5 a  $200 \text{ mV s}^{-1}$ . A corrente anódica aumenta segundo uma relação linear com equação de  $i_{pa} = 5,54 \times 10^{-5}v + 9,98 \times 10^{-7}$  ( $R^2 = 0,990$ ), como mostrado na Figura 4.II. Este comportamento é indicativo de que a transferência de massa é controlada por processo de adsorção do analito [152].

A área eletroquimicamente ativa do eletrodo modificado foi calculada utilizando sistema de solução de hexacianoferrato (III) de potássio  $1 \text{ mmol L}^{-1}$  (molécula sonda) em KCl  $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ , com coeficiente difusional de oxidação tabelado em  $7,60 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$  e aplicando a equação de Randles-Sevcik (equação 1) [152],

$$i_{pa} = 2,69 \times 10^5 n^{3/2} A D_0^{1/2} C_0 v^{1/2} \quad (\text{Equação 1}),$$

onde  $i_{pa}$  é a intensidade de corrente anódica ( $\mu\text{A}$ ),  $n$  é o número de elétron,  $A$  é a área ativa do eletrodo ( $\text{cm}^2$ ),  $D_0$  é o coeficiente de difusão ( $\text{cm}^2 \text{s}^{-1}$ ),  $v^{1/2}$  é a raiz quadrada da velocidade de varredura ( $\text{V s}^{-1}$ ) e  $C_0$  é a concentração do analito ( $\text{mol cm}^{-3}$ ). Através do estudo de velocidade de varredura pela técnica de voltametria cíclica, foi possível encontrar a relação entre  $i_{pa}$  vs  $v^{1/2}$ , tendo como equação  $i_{pa} = 6,19 \times 10^{-4} v^{1/2} + 6,85 \times 10^{-5}$  ( $R^2 = 0,988$ ). Com isso, a área eletroquimicamente ativa do eletrodo modificado foi de  $0,167 \text{ cm}^2$ .



**Figura 4** – Voltamogramas cíclicos para  $100 \mu\text{mol L}^{-1}$  do TRT em solução tampão B-R  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  (pH 6,0) para velocidades de varredura no intervalo de 5 a  $200 \text{ mV s}^{-1}$  (I) e relação linear entre  $i_{pa}$  vs  $v$  (II). Voltamogramas registrados sem agitação.

Considerando a adsorção do analito, avaliou-se a concentração do diurético TRT na superfície do eletrodo modificado usando voltamogramas registrados no intervalo de  $v$  de 20 a  $75 \text{ mV s}^{-1}$  na concentração de  $100 \mu\text{mol L}^{-1}$  do diurético. Substituindo os valores na seguinte equação [152]:

$$i_{pa} = \frac{\alpha n^2 F^2 A v \Gamma}{2,718 RT} \quad (\text{Equação 2}),$$

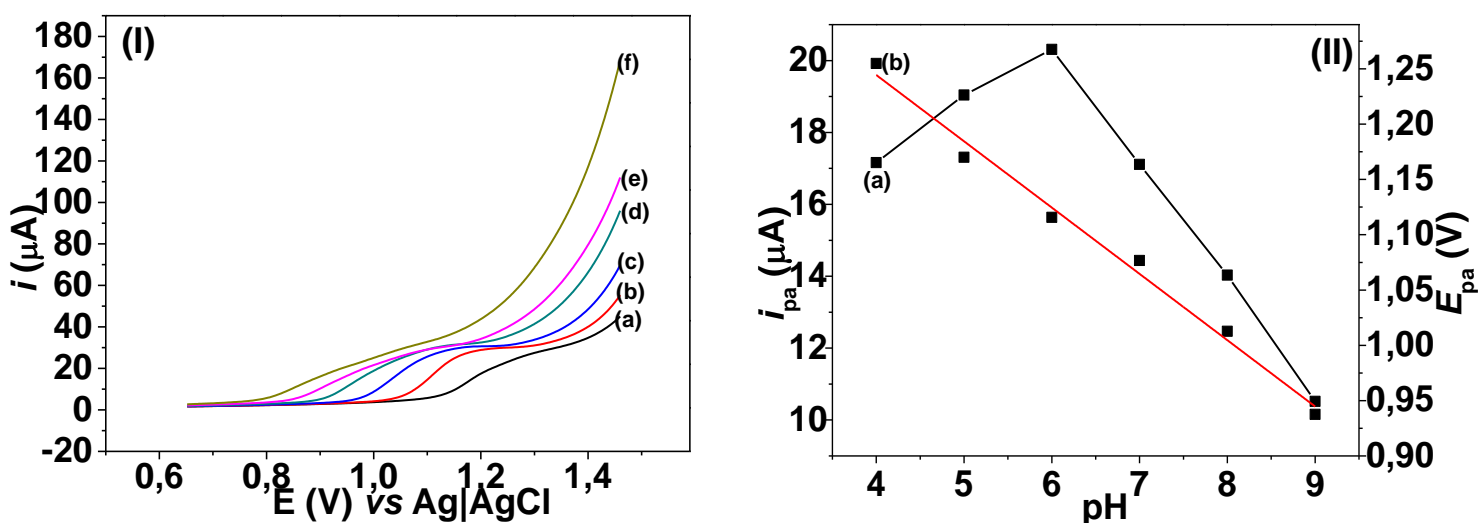
onde  $i_{pa}$  é a corrente de pico,  $\alpha$  é o coeficiente de transferência eletrônica,  $n$  é a quantidade de elétrons,  $F$  a constante de Faraday ( $96.485 \text{ s A mol}^{-1}$ ),  $v$  a velocidade de varredura,  $A$  a área ativa do eletrodo,  $\Gamma$  é a concentração superficial das espécies eletroativas,  $R$  é a constante dos gases ideais ( $8,314 \text{ J}$

mol<sup>-1</sup> K<sup>-1</sup>) e T a temperatura, a concentração superficial do TRT presente na superfície do EC-NPM/TS é de 1,05×10<sup>-10</sup> mol cm<sup>2</sup>. O valor de  $\alpha$  pode ser calculado a partir da equação  $n\alpha = \frac{47,7 \text{ mV}}{(E_{pa} - E_{1/2})}$  [153], que indica um valor de  $n\alpha = 1,68$ . Sabendo que  $n$  é 2 (seção 4.1.3 e 4.1.4), o valor de  $\alpha$  é 0,84.

#### 4.1.3. Estudo do pH

O efeito do pH na oxidação de 100  $\mu\text{mol L}^{-1}$  do TRT foi estudado utilizando a voltametria de varredura linear em meio de solução tampão B-R 0,1 mol L<sup>-1</sup> variando-se o valor de pH no intervalo de 4,0 a 9,0, onde os perfis voltamétricos são mostrados na Figura 5.I.

Como pode ser observado na Figura 5.II.a, maiores valores de  $i_{pa}$  foram encontrados pH 6, com  $i_{pa}$  de 20,3  $\mu\text{A}$ , além da melhor resolução de pico. Desta forma, as medidas posteriores foram realizadas em solução tampão B-R 0,1 mol L<sup>-1</sup> com pH = 6,0. Além disso, observa-se que, com o aumento do pH, o potencial de pico anódico ( $E_{pa}$ ) é deslocado para potenciais mais negativos (Figura 5.II.b), indicando que próton(s) participa(m) da reação de oxidação. Tal deslocamento apresenta um valor de coeficiente angular de  $-59,0 \text{ mV}/\alpha n$ , sugerindo que a relação de e<sup>-</sup>/H<sup>+</sup> para a oxidação do TRT é 1 [152].



**Figura 5** – Voltamogramas de varredura linear para 100  $\mu\text{mol L}^{-1}$  do TRT em solução tampão B-R 0,1 mol L<sup>-1</sup> em pH 4,0 (a), 5,0 (b), 6,0 (c), 7,0 (d), 8,0 (e) e 9,0 (f).  $v = 75 \text{ mV s}^{-1}$  (I); Relação entre  $i_{pa}$  vs pH (II.a) e  $E_{pa}$  vs pH (II.b).

De acordo com o predito para processos irreversíveis com adsorção do analito, a seguinte equação de Laviron [86] pode ser utilizada para calcular o número de elétrons,

$$E_{pa} = E^0 - \left(\frac{RT}{\alpha n T}\right) \ln\left(\frac{RTk_s}{\alpha n F}\right) + \left(\frac{RT}{\alpha n F}\right) \ln v \quad (\text{Equação 3}),$$

onde  $\alpha$  é o coeficiente de transferência eletrônica,  $k_s$  a constante da taxa de transferência de elétrons heterogênea,  $n$  o número de elétrons transferidos,  $v$  a velocidade de varredura e  $E^0$  o potencial formal redox. Assim, a relação  $\alpha n$  pode ser obtida pelo coeficiente angular da relação entre  $E_{pa}$  vs  $\ln v$ . Substituindo os valores de  $E_{pa}$  vs  $\ln v$  (0,0157),  $R$  (8,314 J mol<sup>-1</sup> K<sup>-1</sup>),  $T$  (298 K) e  $F$  (96.485 s A mol<sup>-1</sup>),  $\alpha n$  é igual a 1,63. Assim, sabendo que o valor de  $\alpha$  é 0,84, o número de elétrons que participam do processo de oxidação do TRT é 1,95 ( $n=2$ ), confirmando o valor encontrado na seção 4.1.4. Como a proporção de e<sup>-</sup>/H<sup>+</sup> é a mesma, a quantidade de prótons envolvidos na reação é igual a 2.

#### 4.1.4. Medidas de eletrólise para o TRT

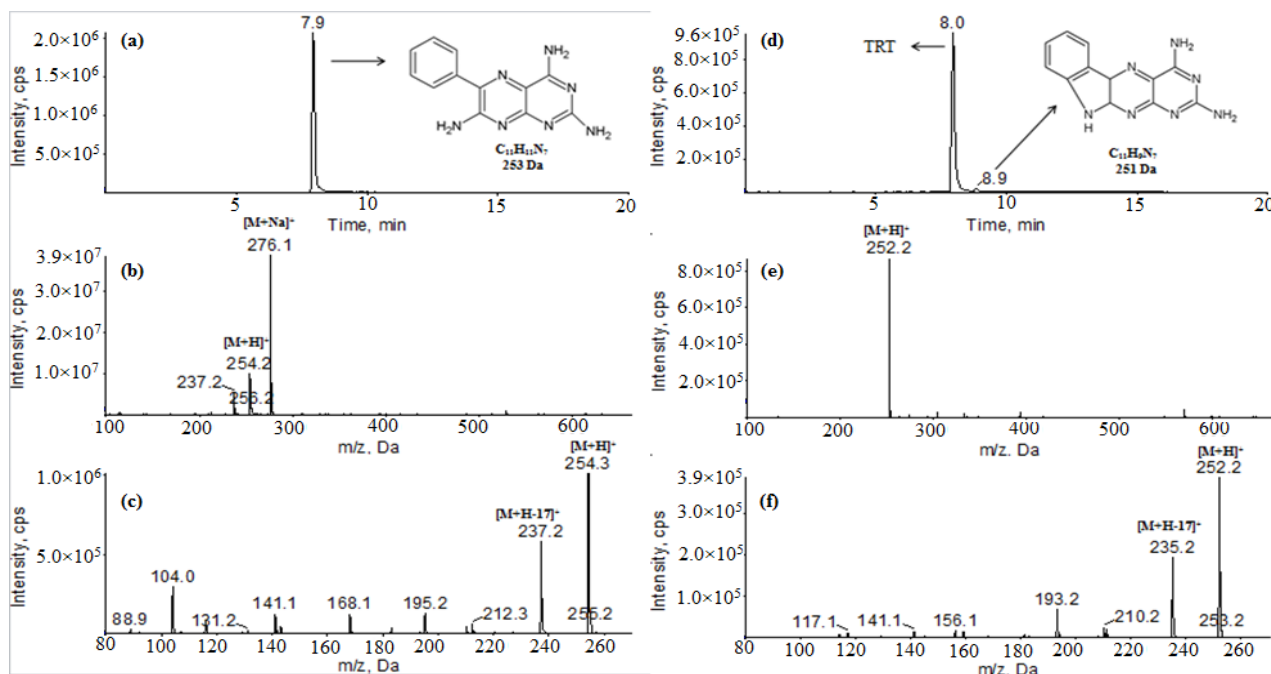
Para mais informações sobre o processo de oxidação do TRT, eletrólises a potencial controlado foram realizadas durante 3h de oxidações de 100 μmol L<sup>-1</sup> de TRT em solução tampão B-R 0,1 mol L<sup>-1</sup> (pH 6,0) utilizando eletrodo de Pt como eletrodo de trabalho. As eletrólises foram registradas em um potencial mais positivo do que o pico de oxidação observado neste eletrodo (+1,26 V vs Ag|AgCl; 3 mol L<sup>-1</sup>). A corrente foi registrada em função do tempo e o número de elétrons consumidos foi determinado. A corrente decai exponencialmente com o tempo e o valor de  $n$ , encontrado a partir da equação  $n = \frac{Q}{CF}$ , em que  $Q$  é a quantidade de carga (18,4 A s, encontrado a partir da integração do gráfico  $i$  vs  $t$  da eletrólise),  $C$  a concentração e  $F$  a constante de Faraday, foi igual a 2.

Após término das eletrólises, os produtos foram analisados por LC-MS/MS de acordo com o procedimento descrito na seção experimental 3.5. O cromatograma de íon total (TIC) da amostra controle (solução de TRT antes

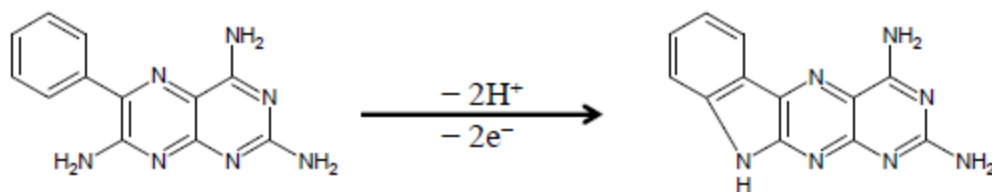
da eletrólise), apresenta um pico em 7,9 min (Fig. 6.a) com  $m/z$  254 correspondente ao TRT (MW. 253 Da,  $[M+H]^+$ ), Fig. 6.b.

A mesma análise foi feita após a eletrólise da solução de TRT e, como mostrada na Figura 6.d., o TRT ainda estava presente ( $m/z$  254 e tempo de retenção de 8,0 min), além de outro pico detectado em 8,9 min com  $m/z$  252 ( $[M+H]^+$ ), Fig. 6.e. Espectros de MS<sup>2</sup> foram feitos para ambos os compostos (TRT e seu produto). O espectro de fragmento de íon para o TRT (Fig. 6.c) mostra uma relação  $m/z$  237 correspondente a perda de 17 Da ( $-NH_3$ ),  $m/z$  212 (perda de 42 Da,  $-NCNH_2$ ),  $m/z$  195 (perda de 59 Da,  $-NH_3$  e  $-NCNH_2$ ). As mesmas perdas foram observadas para o produto de oxidação a medida que os fragmentos obtidos apresentaram relação de  $m/z$  de 235, 210 e 193 (Fig. 6.f). A alta similaridade entre ambos os espectros levou à proposta da estrutura encontrada na Fig. 6.d.

A partir dos dados apresentados, uma possível proposta para o mecanismo de oxidação do TRT é apresentada no esquema 1.



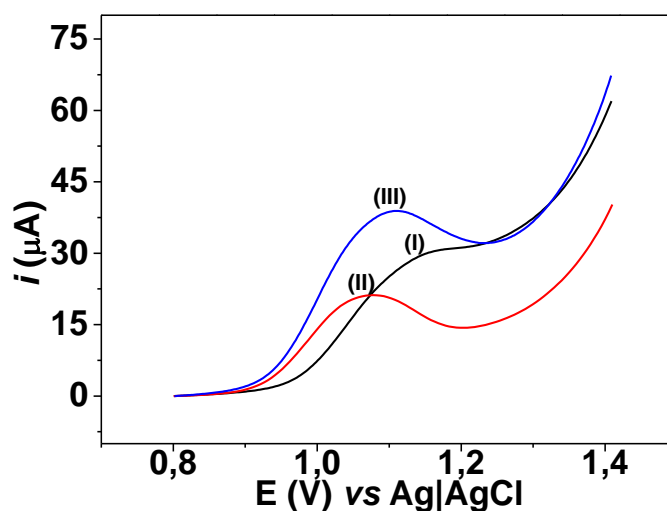
**Figura 6** – a) TIC da amostra controle; b) espectro de massas do pico detectado em 7,9 min em a); c) espectro de íon fragmento de  $m/z$  254; d) TIC da eletrólise da amostra; e) espectro de massas do pico detectado em 8,9 min em d) e f) espectro de íon fragmento de  $m/z$  252.



**Esquema 1** – Mecanismo de oxidação para o TRT.

#### 4.1.5. Otimização Analítica

A fim de obter baixos níveis de detecção do TRT em meio aquoso, diferentes modos de varredura foram testados com o intuito de melhorar a sensibilidade do método. A Figura 7 compara os voltamogramas registrados por varredura linear (I), pulso diferencial (II) e onda quadrada (III) utilizando  $100 \mu\text{mol L}^{-1}$  de TRT em solução tampão B-R  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  (pH 6,0). Observa-se um aumento de pico de aproximadamente 44 e 85% para a voltametria de onda quadrada quando comparada as voltametrias de varredura linear e de pulso diferencial, respectivamente. Sendo assim, a técnica de onda quadrada foi escolhida para a quantificação do diurético.



**Figura 7** – Voltamogramas de varredura linear (I,  $\nu = 75 \text{ mV s}^{-1}$ ), pulso diferencial (II,  $E_{\text{sw}} = 5 \text{ mV}$ ,  $\Delta E = 50 \text{ mV}$ ) e onda quadrada (III,  $E_{\text{sw}} = 2 \text{ mV}$ ,  $\Delta E = 50 \text{ mV}$ ,  $f = 30 \text{ Hz}$ ) para  $100 \mu\text{mol L}^{-1}$  de TRT em solução  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  de tampão B-R (pH 6).

Os parâmetros da técnica de voltametria de onda quadrada foram otimizados visando à determinação TRT, por meio do planejamento fatorial 2<sup>3</sup>, matriz de Doehlert e metodologia multi-respostas [154–157]. Na Tabela 1 estão reunidos os parâmetros estudados, bem como seus respectivos níveis.

**Tabela 1** – Parâmetros e níveis estudados no planejamento fatorial 2<sup>3</sup>.

Parâmetro	Mínimo (-)	Ponto Central (0)	Máximo (+)
$f$ (Hz)	30	55	80
$E_{sw}$ (mV)	2	6	10
$\Delta E$ (mV)	10	55	100

$f$ : frequência,  $E_{sw}$ : incremento de potencial,  $\Delta E$ : amplitude de pulso.

Os sinais analíticos ( $i_{pa}$  e Linha de base) provenientes do planejamento fatorial 2<sup>3</sup>, designados como desejabilidade global, são apresentados na Tabela 2. Além dos experimentos provenientes do planejamento fatorial 2<sup>3</sup>, foi incluído no planejamento o ponto central com o objetivo de averiguar o comportamento entre os pontos de mínimo (-) e máximo (+). Para o cálculo da desejabilidade global de cada experimento, foram determinadas as desejabilidades individuais ( $d_i$ ). A desejabilidade individual é expressa em um valor adimensional variando de 0 (resposta indesejada) à 1 (resposta desejada). Como o objetivo deste trabalho é maximizar a  $i_{pa}$ , a desejabilidade individual para cada experimento pode ser calculada através da equação 4:

$$d_{i_{pa}} = \frac{(y-L)}{(H-L)} \quad (\text{Equação 4}),$$

onde  $y$  é o valor adquirido experimentalmente,  $L$  o menor valor obtido entre todos os experimentos feitos e  $H$  o maior valor obtido entre todos os experimentos analisados.

Porém, para a Linha de base (L.B.), o menor valor é a melhor resposta, assim, o cálculo da desejabilidade individual para esta resposta pode ser feita através da equação 5:

$$d_{i_{L.B.}} = \frac{(H-y)}{(H-L)} \quad (\text{Equação 5}).$$

Desta forma, de posse das desejabilidades individuais, determinou-se a desejabilidade global (*D.G.*), por meio da média geométrica das desejabilidades individuais, como demonstrado na equação 6:

$$D.G. = \sqrt{(di_{i_{pa}})(di_{L.B.})} \quad (\text{Equação 6}).$$

Os resultados da otimização, expressos em termos de  $i_{pa}$ , L.B., *di* e *D.G.*, são mostrados na Tabela 2.

**Tabela 2** – Resultados do planejamento fatorial  $2^3$  expressos em termos  $i_{pa}$ , L.B., *di* e *DG*.

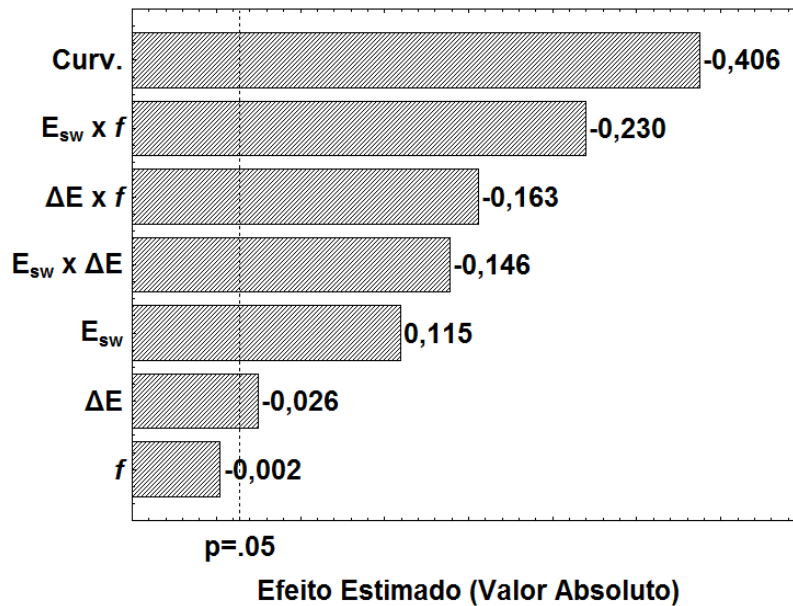
Exp.	$E_{sw}$	$\Delta E$	$f$	$i_{pa}$ ( $\mu A$ )	L.B. ( $\mu A$ )	<i>di</i> $i_{pa}$	<i>di</i> L.B.	<i>D.G.</i>
1	+	+	+	116	280	1,00	0,00	0,00
2	-	+	+	39,5	162	0,278	0,435	0,348
3	+	-	+	31,6	44,0	0,204	0,869	0,421
4	-	-	+	20,1	19,8	0,097	0,958	0,305
5	+	+	-	49,5	110	0,372	0,626	0,483
6	-	+	-	14,6	49,0	0,046	0,851	0,197
7	+	-	-	28,0	19,5	0,171	0,959	0,405
8	-	-	-	9,74	8,50	0,00	1,00	0,00
9*	0	0	0	50,5	98,0	0,382	0,670	0,506
9*	0	0	0	54,2	101	0,416	0,659	0,524
9*	0	0	0	52,5	99,0	0,400	0,667	0,517
9*	0	0	0	51,9	100	0,395	0,663	0,512
9*	0	0	0	50,9	99,0	0,386	0,667	0,507

*f*: frequência;  $E_{sw}$ : rampa de potencial;  $\Delta E$ : amplitude de pulso.\*replicas do ponto central.

As respostas em *D.G.* foram utilizadas para tratamento estatístico. Como mostrado na Figura 8, todos os parâmetros e interações apresentaram efeito negativo, exceto o parâmetro  $E_{sw}$ . Isso indica que as melhores respostas são obtidas quando os parâmetros  $\Delta E$  e  $f$  estão em seus menores níveis enquanto que, para o parâmetro  $E_{sw}$ , as melhores respostas são verificadas em seu



maior nível. Ao nível de significância de 95%, o efeito de todas as interações e parâmetros foram significativas, exceto para o parâmetro  $f$  que não se mostrou significativo para o método.



**Figura 8** – Diagrama de Pareto das respostas obtidas no planejamento.

Dentre todos os resultados mostrados no Diagrama de Pareto, a curvatura (Curv.) foi o estudo mais significativo para o trabalho. A Curv. é dada pela seguinte equação [158]:

$$\text{Curv.} = R_{ep} - R_{pc} \quad (\text{Equação 7}),$$

onde  $R_{ep}$  é a média das respostas obtidas a partir dos experimentos do planejamento fatorial e  $R_{pc}$  é a média das respostas obtidas para o ponto central. Assim, valor positivo indica que as melhores respostas são adquiridas para os pontos pertencentes ao planejamento fatorial enquanto que um valor negativo para a Curv., indica que os melhores resultados são encontrados para os pontos próximos ao ponto central. Assim, como mostrado na Fig. 8, o efeito para a Curv. apresentou um resultado negativo, indicando que as melhores respostas são obtidas para os valores do ponto central. Visto que os parâmetros  $E_{sw}$  e  $\Delta E$  se mostraram significativos para o método, um estudo mais detalhado foi realizado por meio da matriz de Doehlert. Como a  $f$  não

apresentou significância para o método ao nível de 95%, a frequência foi fixada em seu menor nível, ou seja, 30 Hz, pois, neste nível foram encontradas as melhores respostas.

Para a matriz de Doehlert, as mesmas respostas analíticas foram utilizadas, ou seja,  $i_{pa}$  e L.B. Assim, as respostas foram convertidas em termos de desejabilidades individuais, conforme as equações 4 e 5 e, em seguida, em desejabilidade global (Equação 6). Os resultados da matriz de Doehlert são expressos na Tabela 3.

**Tabela 3** – Matriz de Doehlert utilizada para otimização do  $E_{sw}$  e  $\Delta E$ .

Exp.	$E_{sw}$ (mV)	$\Delta E$ (mV)	$i_{pa}$ ( $\mu A$ )	L.B. ( $\mu A$ )	$d_i i_{pa}$	$d_i$ L.B.	D.G.
1	12 (0)	35 (0)	53,5	52,5	0,593	0,487	0,537
1	12 (0)	35 (0)	50,6	53,0	0,549	0,479	0,513
1	12 (0)	35 (0)	48,5	52,6	0,517	0,485	0,501
1	12 (0)	35 (0)	47,5	52,6	0,502	0,483	0,492
1	12 (0)	35 (0)	46,0	52,7	0,480	0,484	0,482
2	20 (1)	35 (0)	44,4	74,8	0,455	0,181	0,287
3	16 (0,5)	60 (0,866)	80,6	88,1	1,00	0,00	0,00
4	4 (-1)	35(0)	21,1	29,7	0,106	0,799	0,291
5	8 (-0,5)	10 (-0,866)	14,1	15,0	0,00	1,00	0,00
6	16 (0,5)	10 (-0,866)	19,6	24,4	0,083	0,871	0,268
7	8 (-0,5)	60 (0,866)	35,0	64,0	0,314	0,329	0,322

Por meio da Análise de Variância (ANOVA), verificou-se que os valores de  $F_{calculado}$  ( $F_{calc.}$ ) foram inferiores ao valor de  $F_{tabelado}$  ( $F_{tab.}$ ) para os parâmetros  $E_{sw}$  e  $\Delta E$ , ambos lineares, isto indica que os níveis para estes parâmetros foram estudados em um intervalo satisfatórios (Tabela 4). Além disso, o valor de  $F_{calc.}$  ( $QM_{falta\ de\ ajuste}/QM_{erro\ puro}$ ) foi de 0,903, sendo menor que o valor de  $F_{tab.}$ , que é de 7,71, indicando que os resultados se adequaram ao modelo linear quadrático, apresentando um valor de  $R^2$  de 0,994 e  $R^2$  ajustado de 0,988.

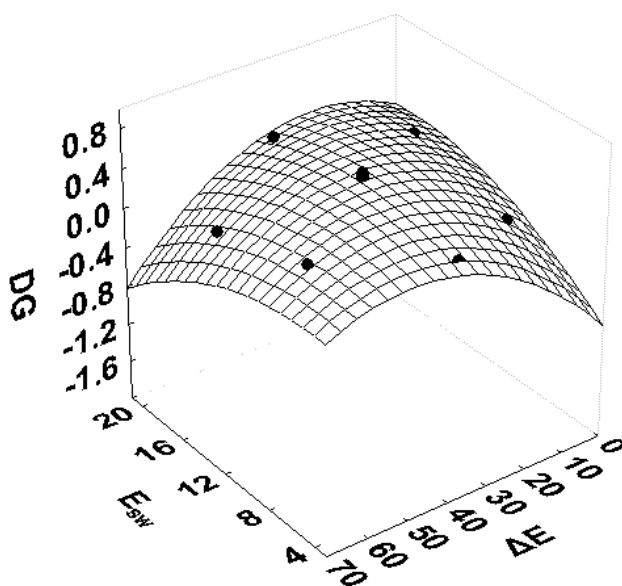
**Tabela 4 – ANOVA para os resultados adquiridos da Matriz de Doehlert.**

Fator	Soma de Quadrados (SQ)	Graus de Liberdade (GL)	Quadrados Médios (QM)	F <sub>calc.</sub>
$E_{sw}$	0,000314	1	0,000314	0,692
$E_{sw}^2$	0,0667	1	0,0667	147
$\Delta E$	0,000716	1	0,000716	1,58
$\Delta E^2$	0,234	1	0,234	516
$E_{sw} \times \Delta E$	0,0870	1	0,0870	192
Falta de ajuste	0,000410	1	0,000410	0,904
Erro puro	0,00181	4	0,000454	
Total	0,380	10		

Assim, o modelo estatístico obtido a partir da matriz de Doehlert é dado pela seguinte equação:

$$D.G.= 0,505 - 0,0100 \times E_{sw} - 0,216 \times E_{sw}^2 + 0,0130 \times \Delta E - 0,303 \times \Delta E^2 - 0,295 \times E_{sw} \times \Delta E \text{ (Equação 8).}$$

Com isso, o modelo estatístico acima foi derivado e, assim, obteve-se os valores de máximo de  $E_{sw}$  (11,5 mV) e  $\Delta E$  (36,2 mV). Na Figura 9 é mostrada a superfície de resposta proveniente da equação 8.

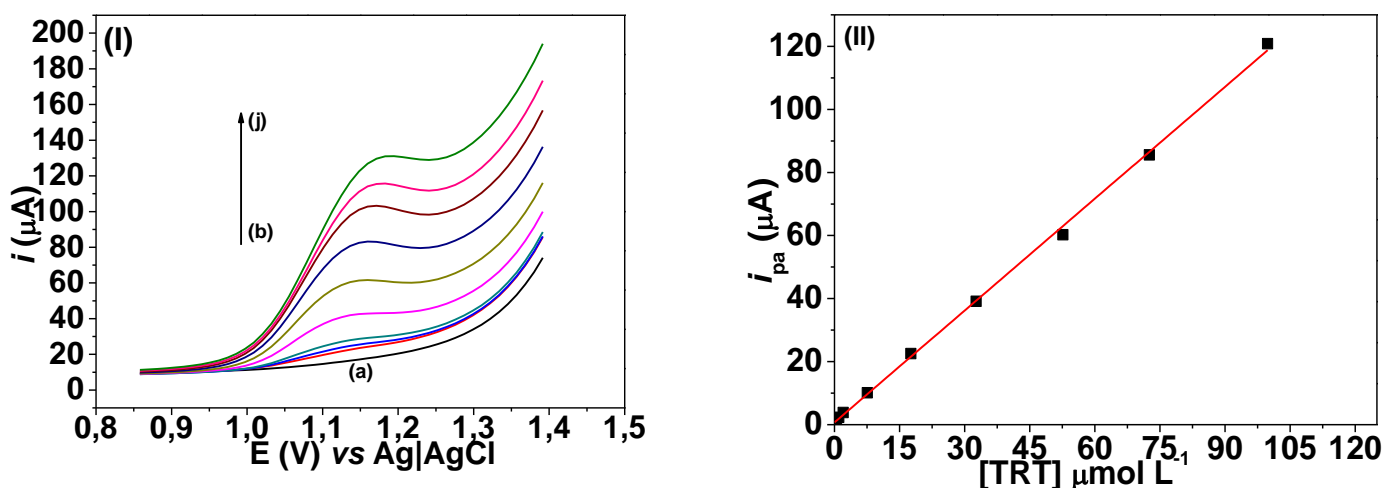


**Figura 9 – Superfície de resposta relacionando  $E_{sw}$ ,  $\Delta E$  e  $D.G.$**

#### 4.1.6. Curva analítica

Voltamogramas de onda quadrada para o diurético TRT em solução tampão B-R  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  (pH 6,0) sob as condições otimizadas foram registrados e as curvas são mostradas na Figura 10.I. Excelente relação linear foi encontrada no intervalo de  $0,500$  a  $99,8 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$  (Figura 10.II), apresentando a seguinte equação linear:  $i_{pa} = 1,18 \times [\text{TRT}] + 7,30 \times 10^{-8}$  ( $R^2 = 0,998$ ). Os limites de detecção (L.D.) e quantificação (L.Q.) foram calculados com base nas seguintes equações:  $\text{L.D.} = 3\text{std}/m$  e  $\text{L.Q.} = 10\text{std}/m$ , onde  $\text{std}$  é o desvio padrão de 10 voltamogramas de onda quadrada apenas com o eletrólito suporte (medindo a corrente no potencial onde ocorre a oxidação do analito), ou seja, o branco (solução tampão B-R  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  pH 6,0) e  $m$  o coeficiente angular da curva. Assim, os valores para L.D. e L.Q. foram  $1,47$  e  $4,91 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ , respectivamente.

A repetibilidade do método foi testada através de 10 análises consecutivas para soluções de TRT nas concentrações de  $1,50$  e  $80,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ , em que o desvio padrão relativo foi de  $4,10$  e  $3,24\%$ , respectivamente, indicando que o eletrodo proposto não é passivado entre medidas, uma vez que a solução é agitada entre as análises.

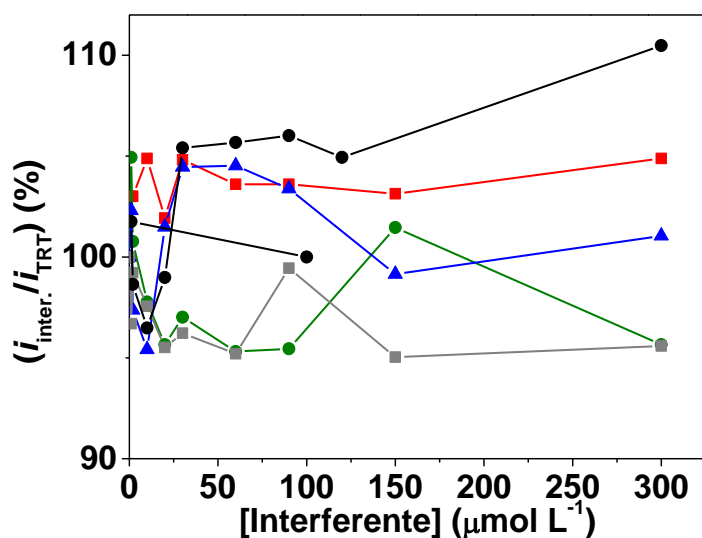


**Figura 10** – Voltamogramas de onda quadrada em meio de solução tampão B-R  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  (pH 6,0) (a) nas concentrações de TRT de  $0,500$  (b),  $1,00$ (c),  $2,02$  (d),  $7,56$  (e),  $17,6$  (f),  $32,7$  (g),  $52,7$  (h),  $72,6$  (i) e a  $99,8 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$  (j) (I) e Relação entre  $i_{pa}$  vs  $[\text{TRT}]$  (II).  $f = 30 \text{ Hz}$ ,  $\Delta E = 36,2 \text{ mV}$ ,  $E_{sw} = 11,5 \text{ mV}$ .

#### 4.1.7. Estudo de interferentes

Investigou-se a seguir a possibilidade da influência de possíveis compostos interferentes como ácido úrico (AU), ureia (UR), ácido ascórbico (AA), glicose (GL) e creatinina (CR) na  $i_{pa}$  e resolução de pico do analito de interesse.

Sob condições otimizadas, voltamogramas de onda quadrada foram registrados para uma solução contendo  $30 \mu\text{mol L}^{-1}$  de TRT e os possíveis interferentes em diferentes concentrações no intervalo de 1,00 a  $300 \mu\text{mol L}^{-1}$ . Como mostrado na Figura 11, a porcentagem entre a  $i_{pa}$  do TRT na presença de interferente ( $i_{inter.}$ ) sobre a  $i_{pa}$  do TRT ( $i_{TRT}$ ) para as substâncias AU (■), UR (▲), GL (●) e AA (■) ficaram no intervalo de 101–104%, 95,0–104%, 95,0–104% e 95,0–99,0%, respectivamente, indicando que estas substâncias não apresentaram interferência na resolução de pico e na  $i_{pa}$  do TRT no intervalo de concentração estudado. No entanto, para a CR (●), nenhuma interferência foi observada no intervalo de concentração entre 1,00 a  $120 \mu\text{mol L}^{-1}$ , onde a porcentagem entre  $i_{inter.}/i_{TRT}$  ficou entre 96,0–106%. Já para  $300 \mu\text{mol L}^{-1}$  de CR, a relação entre  $i_{inter.}/i_{TRT}$  foi de 110%, indicando que em altas concentrações, a CR pode ser um possível interferente na determinação de TRT.



**Figura 11** – Efeito na  $i_{pa}$  para uma concentração de  $30 \mu\text{mol L}^{-1}$  de TRT na presença de algumas substâncias que podem estar presentes na urina em solução tampão B-R  $0,10 \text{ mol L}^{-1}$  (pH 6.0). CR (●), AU (■), UR (▲), GL (●) e AA (■).

#### 4.1.8. Aplicação do método proposto para análise de TRT em amostras de água e urina

O sensor proposto foi aplicado em amostras de água de torneira para avaliar a recuperação do método. Para isso, amostras de água de torneira foram contaminadas propositalmente até gerar uma concentração de  $15,0 \mu\text{mol L}^{-1}$  de TRT. A recuperação foi testada por meio do método de adição de padrão, onde os valores adicionados e recuperados são mostrados na Tabela 5.

**Tabela 5** – Recuperações de TRT em amostras de água de torneira utilizando o eletrodo de EC-PM/TS.

Amostra	Amostra 1	Amostra 2	Amostra 3
Adicionado ( $\mu\text{mol L}^{-1}$ )	15,0	15,0	15,0
Encontrado ( $\mu\text{mol L}^{-1}$ )	$15,5 \pm 0,84$	$14,8 \pm 0,96$	$15,2 \pm 0,83$
Recuperado (%)	103	99,7	101
$t_{\text{cal.}}$	0,93	0,34	0,45

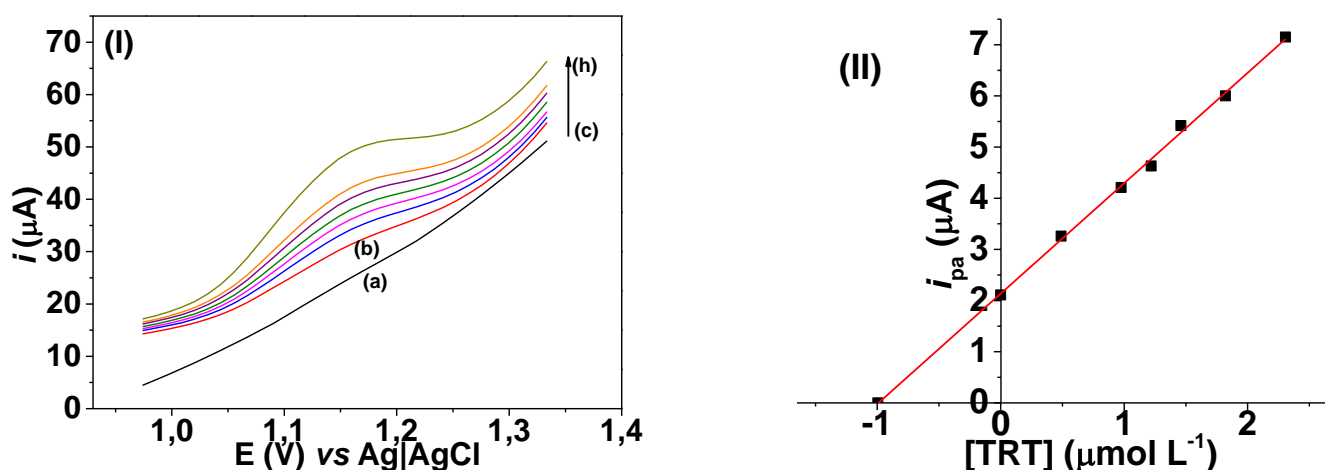
$t_{\text{tab.}} = 4,30$ ;  $n = 3$ .

Como podem ser observadas, para todas as amostras, as recuperações ficaram entre 99,7 a 103%. O valor de  $t$  calculado ( $t_{\text{calc.}}$ ) foi menor do que o valor de  $t$  tabelado ( $t_{\text{tab.}}$ ), indicando que não existe diferença significativa no nível de confiança de 95% entre a concentração fortificada e a recuperada. Além disso, as recuperações de TRT na água de torneira não excederam 3% de erro, indicando boa aplicabilidade do método.

Posteriormente, a aplicabilidade do EC-PM/TS foi testada para a determinação de TRT em amostra de urina humana. Conforme descrito na parte experimental (seção 3.3.1.), uma alíquota de urina fortificada com  $4,93 \mu\text{mol L}^{-1}$  de TRT foi adicionada na célula eletroquímica sem nenhum prévio tratamento da amostra.

Os respectivos voltamogramas são mostrados na Fig. 12.I antes ("a" para o eletrólito de suporte e "b" para a amostra de urina humana contaminada) e após (c até h) sucessivas adições de solução padrão de TRT. Uma excelente relação linear foi obtida, encontrando um valor de  $0,995 \pm 0,030$ . Entretanto,

como a amostra foi diluída 5 vezes, o valor real na amostra é de  $4,97 \pm 0,150 \mu\text{mol L}^{-1}$  (Fig. 12.II) na amostra.



**Figura 12** – Voltamogramas de onda quadrada registrado em solução tampão B-R  $0,10 \text{ mol L}^{-1}$  (pH 6,0) para eletrólito suporte (a), adição de 2 mL de amostra (b) e sucessivas adição de padrão de TRT nas concentrações de 0,489 (c), 0,976 (d), 1,22 (e), 1,46 (f), 1,82 (g) e  $2,31 \mu\text{mol L}^{-1}$  (h) utilizando o EC-PM/TS (I). Relação linear entre  $i_{pa}$  vs  $[\text{TRT}]$  (II).  $f$ : 30,0 Hz,  $\Delta E$ : 36,2 mV,  $E_{sw}$ : 11,5 mV.

O método foi comparado com a técnica de LC-MS/MS onde a amostra de urina foi previamente tratada como descrito na seção 3.3.1. O pico cromatográfico utilizado para a quantificação foi observado no  $t_{tr}$  de 3,39 min corresponde à transição mais intensa monitorada. Utilizando o método de adição de padrão, a concentração de TRT encontrada na amostra pela técnica LC-MS/MS foi de  $5,20 \pm 0,180 \mu\text{mol L}^{-1}$ .

Calculando o teste *t students* (teste *t* pareado), foi encontrado um valor de 3,83, onde o valor calculado é menor que o valor de  $t_{crit}$ . (4,30) [159]. Assim, os resultados de TRT encontrados na amostra de urina humana pelo método proposto não mostraram diferença significativa no nível de 95% de confiança em relação à técnica de LC-MS/MS.

#### **4.1.9. Conclusões parciais**

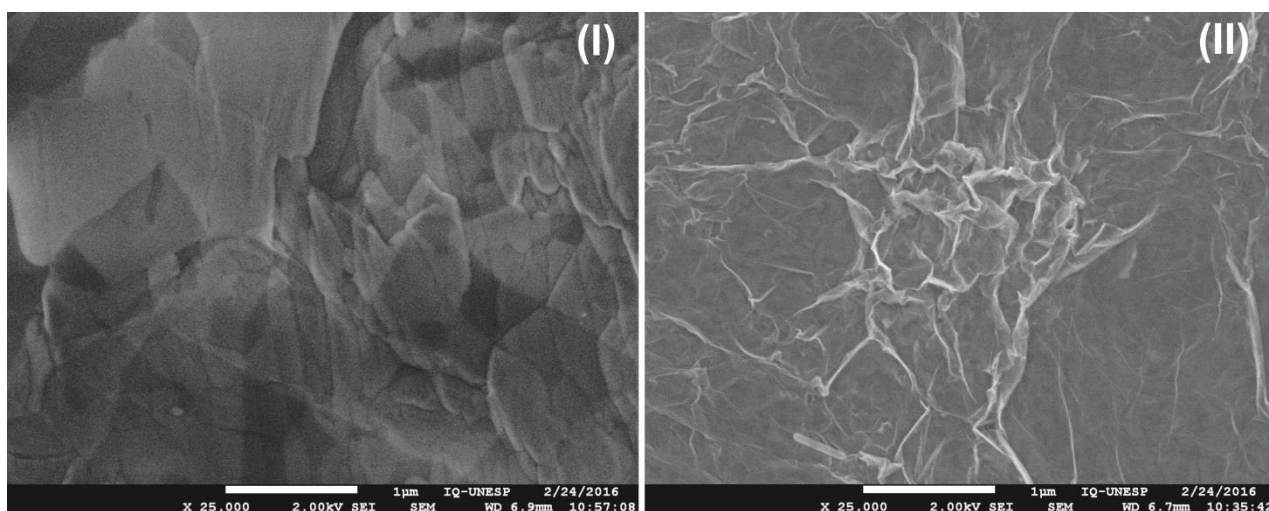
O sensor proposto, baseado em um eletrodo compósito grafite-epóxi modificado por partículas magnéticas funcionalizadas com grupo tosil (EC-PM/TS), mostrou-se eficaz para determinação do diurético Triantereno em amostra de urina humana. Após otimização multivariada dos parâmetros intrínsecos da voltametria de onda quadrada, construiu-se uma curva analítica em ampla faixa linear e baixo limite de detecção além de excelente repetibilidade para diferentes concentrações. O EC-PM/TS foi aplicado com sucesso em amostras de urina humana, onde não houve diferença significativa quando comparado à técnica de LC-MS/MS.



## 4.2. Sensor eletroquímico baseado em eletrodo de carbono vítreo modificado com óxido de grafeno reduzido (ECV/OGR) para a determinação de bumetanida em amostra de urina

### 4.2.1. Caracterização da superfície do ECV/OGR

A Figura 13 (Imagens I e II) mostra a morfologia da superfície dos eletrodos de carbono vítreo modificada por óxido de grafeno (OG) e óxido de grafeno reduzido (OGR), respectivamente. O ECV modificado com OG (Fig. 13.I) apresenta uma forma irregular com aspectos de blocos volumosos interligados e enrolados devido ao grande número de grupos oxigenados na superfície do OG [160,161]. Após a redução eletroquímica do OG (Fig. 13.II), é verificada uma superfície com grande rugosidade, observando o emparelhamento de várias camadas de folhas de grafeno [162].

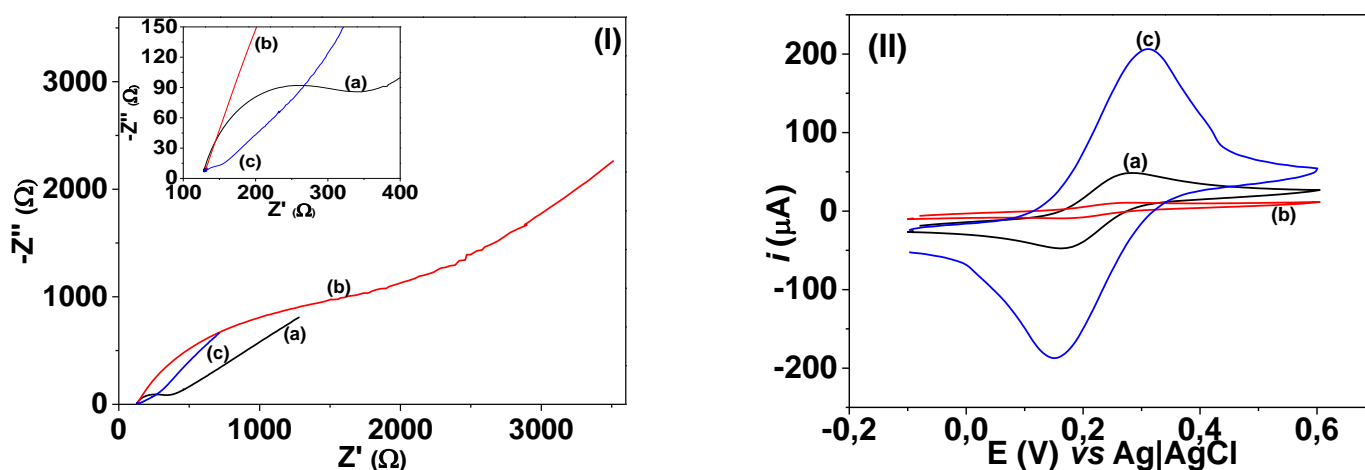


**Figura 13** – Imagens de microscopia eletrônica de varredura para ECV/OG (I) e ECV/OGR (II) com magnificação de 25.000 vezes.

A Figura 14.I compara a cinética de transferência de carga para o ECV (a), ECV/OG (b) e ECG/OGR (c) por medidas de espectroscopia de impedância eletroquímica (EIE). A resistência de transferência de carga ( $R_{tc}$ ) foi obtida por meio do semicírculo do gráfico de Nyquist utilizando uma solução sonda de 5 mmol L<sup>-1</sup> de Fe(CN)<sub>6</sub><sup>3-/4-</sup> em 0,10 mol L<sup>-1</sup> de KCl. O valor da  $R_{tc}$  para o ECV foi equivalente a 265 Ω, enquanto que, para o ECV/OG, o valor foi de 2,96 kΩ. O

alto valor da  $R_{tc}$  para o eletrodo modificado com OG pode ser explicado pela grande quantidade de grupos contendo oxigênio ( $-\text{COOH}$  e  $-\text{OH}$ ) na superfície do eletrodo, que reduz a condutividade do material devido a diminuição das ligações  $sp^2$  entre carbonos e o conseqüente aumento das ligações  $sp^3$  [160,163]. Em contrapartida, o baixo valor da  $R_{tc}= 62,6 \Omega$  foi encontrado para o ECV/OGR, sugerindo que, após uma prévia aplicação de potencial catódico, as ligações  $\pi$  entre carbonos são reconstituídas e, conseqüentemente, a condutividade do material aumenta [164].

Na Figura 14.II são mostrados os voltamogramas cíclicos para a solução sonda de  $5 \text{ mmol L}^{-1}$  de  $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$  em  $0,10 \text{ mol L}^{-1}$  de KCl utilizando o ECV (a), ECV/OG (b) e ECV/OGR (c). Todos os voltamogramas exibiram um comportamento reversível para a solução sonda, porém, com grande diferença na  $i_{pa}$ . A menor corrente anódica foi verificada para o ECV/OG, a qual é explicada pela menor condutividade e também pela repulsão eletrostática resultante das cargas negativas presentes no OG (grupos  $-\text{COO}^-$  desprotonados) e o complexo  $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$  [165]. Já a maior  $i_{pa}$  foi encontrada para o ECV/OGR, indicando que o óxido de grafeno reduzido aumenta a taxa de transferência eletrônica devido às suas propriedades físico-químicas únicas como a alta condutividade e elevada área superficial [166]. Tais dados corroboram com os resultados apresentados na Figura 14.I.

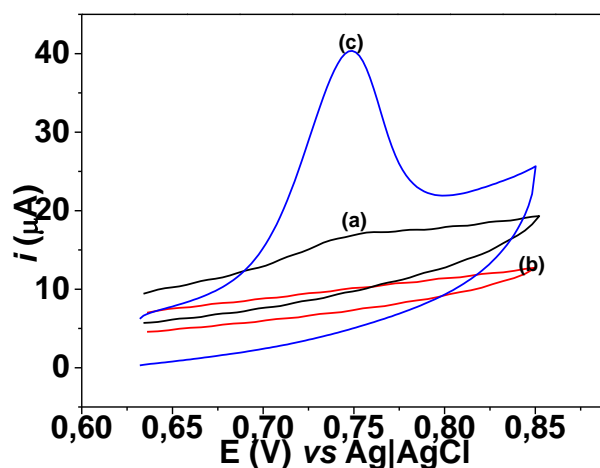


**Figura 14** – Gráficos de Nyquist (I) e voltamogramas cíclicos (II) utilizando solução de  $5 \text{ mmol L}^{-1}$  de  $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$  em  $0,10 \text{ mol L}^{-1}$  de KCl para ECV (a), ECV/OG (b) e ECV/OGR (c). EIS: Frequência entre 10 kHz – 0,03 Hz, amplitude de 5 mV (rms) em potencial de circuito aberto (OCP). VC:  $v= 75 \text{ mV s}^{-1}$ .

#### 4.2.2. Comportamento eletroquímico da Bumetanida

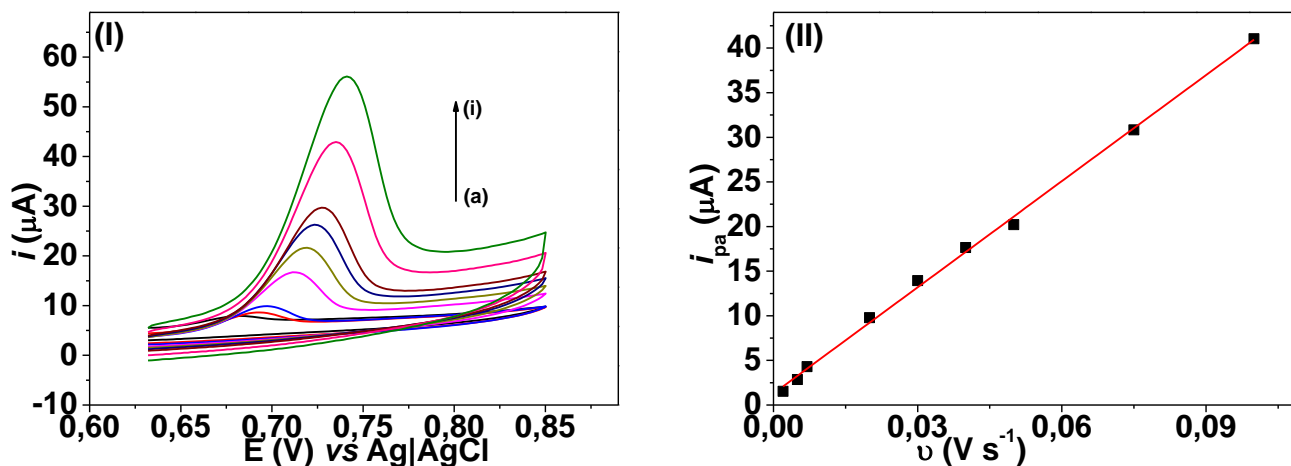
O comportamento eletroquímico de  $100 \mu\text{mol L}^{-1}$  de BMT foi estudado por voltametria cíclica em solução tampão B–R  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  (pH 7,0) sobre as superfícies do ECV (a), ECV/OG (b) e ECV/OGR (c). Como pode ser observado na Figura 15.a, a BMT apresenta apenas um pico de oxidação no ECV no  $E_{pa}$  de  $0,75 \text{ V}$  com  $i_{pa}$  de  $1,89 \mu\text{A}$ , caracterizando um processo irreversível [152].

No entanto, a oxidação eletroquímica da BMT sobre ECV/OG (Fig. 15.b) não apresenta nenhum pico voltamétrico. Isto confirma o discutido na seção 4.2.1., indicando que a menor condutividade do filme de OG ocorre devido à presença de grupos oxigenados. No entanto, o comportamento eletroquímico para a BMT na superfície do ECV/OGR é similar à oxidação no ECV, porém, com um aumento na  $i_{pa}$  de aproximadamente 13 vezes com relação ao eletrodo sem modificação (Fig. 15.c.). Este ganho de corrente pode ser explicado pelo aumento na condutividade do sensor devido à redução eletroquímica do material, resultando em uma diminuição da  $R_{tc}$  e, também, pelo aumento da área superficial do ECV/OGR (como mostrado a seguir nesta seção).



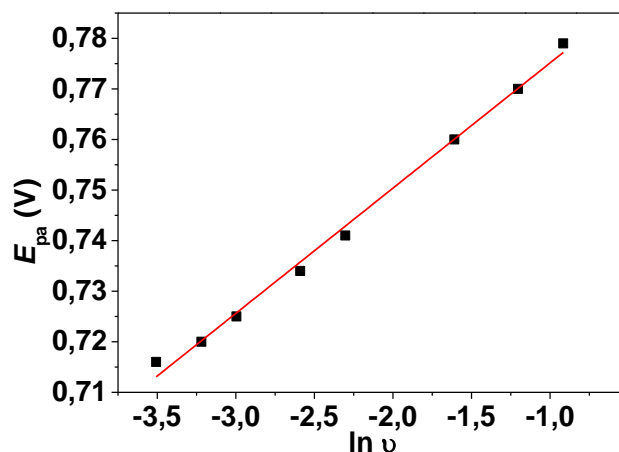
**Figura 15** – Voltamogramas cíclicos para  $100 \mu\text{mol L}^{-1}$  de BMT em solução tampão B–R  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  (pH 7,0) utilizando ECV (a), ECV/OG (b) e ECV/OGR (c).  $v = 100 \text{ mV s}^{-1}$ .

O efeito da velocidade de varredura ( $\nu$ ) na oxidação de  $100 \mu\text{mol L}^{-1}$  de BMT em solução tampão B-R  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  (pH 7,0) foi investigado no intervalo de 2 a  $100 \text{ mV s}^{-1}$  (Figura 16.I). Uma relação linear foi encontrada (Figura 16.II), seguindo a equação:  $i_{pa} = 3,96 \times 10^{-4} \nu + 1,30 \times 10^{-6}$  ( $R^2 = 0,998$ ), indicando que a transferência de massa é controlada pelo processo de adsorção [152].



**Figura 16** – Voltamogramas cíclicos para  $100 \mu\text{mol L}^{-1}$  de BMT em solução tampão B-R  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  (pH 7,0) utilizando ECV/OGR nas  $\nu$  de 2 (a), 5 (b), 7 (c), 20 (d), 30 (e), 40 (f), 50 (g), 75 (h) e  $100 \text{ mV s}^{-1}$  (i) (I). Relação linear entre  $i_{pa}$  vs  $\nu$  (II).

De acordo com Laviron, o número de elétron(s) envolvido(s) no processo de oxidação pode(m) ser calculado(s) por meio da equação 3. O valor de  $\alpha n$  calculado pelo coeficiente angular da relação entre  $E_{pa}$  vs  $\ln \nu$  (Figura 17), segue a equação  $E_{pa} = 0,0247 \ln \nu + 0,799$  ( $R^2 = 0,994$ ). Substituindo os valores de  $R$  ( $8,314 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$ ),  $T$  (298 K) e  $F$  ( $96.485 \text{ s A mol}^{-1}$ ), o valor de  $\alpha n$  é 1,04. Considerando  $\alpha = 0,5$  [31], o valor de  $n = 2,10$ , ou seja, o número de elétrons que participam do processo de oxidação da BMT são 2.



**Figura 17** – Relação linear entre  $E_{pa}$  vs  $\ln v$ .

A área eletroativa do eletrodo modificado foi calculada por medidas de voltametria cíclica [152] para uma solução sonda de  $1 \text{ mmol L}^{-1}$  de hexacianoferrato (III) de potássio em  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  KCl (coeficiente de difusão =  $7,60 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ ). Utilizando a Equação 1, a área eletroativa do ECV/OGR foi de  $0,233 \text{ cm}^2$ , que representa um aumento de aproximadamente 4 vezes comparada a área eletroativa do ECV ( $0,0554 \text{ cm}^2$ ).

O excesso superficial ( $\Gamma$ ) foi calculado para  $100 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$  de BMT em solução tampão B–R  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  (pH 7,0) para o ECV e ECV/OGR. Esta grandeza interfacial foi calculada a partir da equação 2, em que o valor do  $\Gamma$  para o ECV e ECV/OGR foram  $1,84 \times 10^{-10}$  e  $6,15 \times 10^{-10} \text{ mol cm}^{-2}$ , respectivamente. Estes valores são esperados, pois corroboram com o aumento da área superficial do ECV/OGR comparado ao eletrodo sem modificação.

#### 4.2.3. Mecanismo de oxidação eletroquímica da BMT

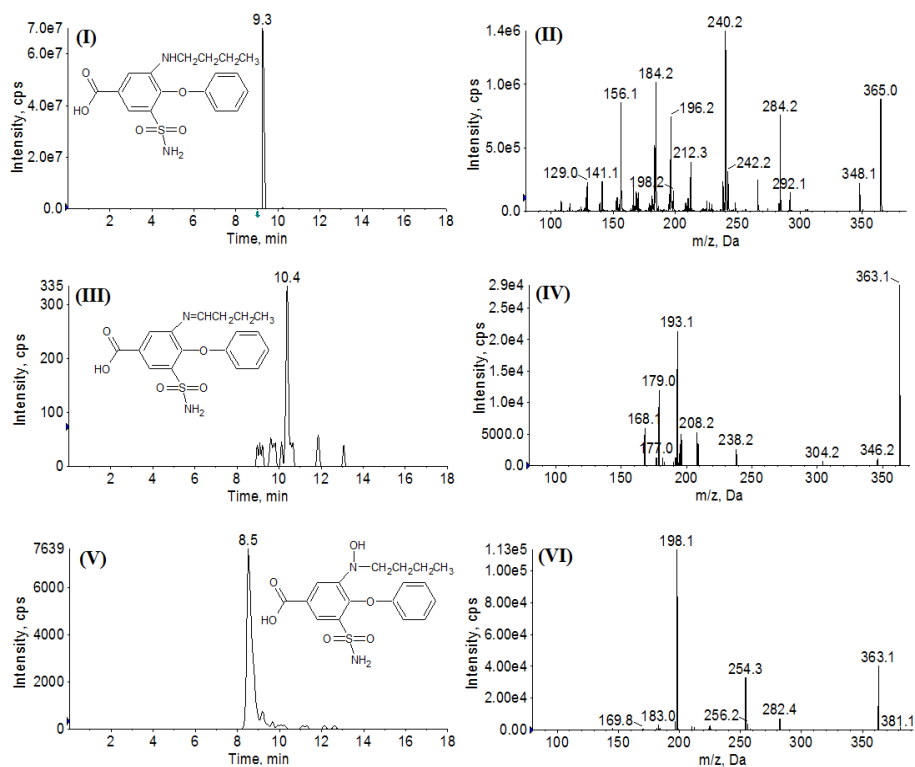
A fim de propor um mecanismo de oxidação eletroquímica para a Bumetanida, eletrólises a potencial controlado foram realizadas para  $100 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$  de BMT em solução tampão B–R  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  (pH 4,0) sob potencial de  $+0,96 \text{ V}$  por 3 h utilizando uma placa de carbono vítreo (com área geométrica de  $1,56 \text{ cm}^2$ ) sem e com a modificação com óxido de grafeno reduzido.

Após o término das eletrólises em ambos os eletrodos, ECV e ECV/OGR, os produtos foram analisados por LC-MS/MS como descrito na seção 3.5.

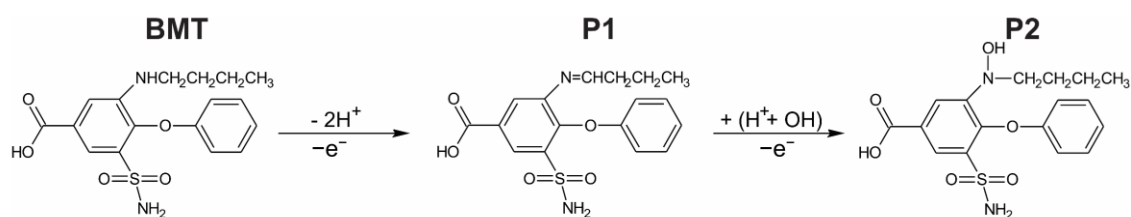
A Figura 18.I exibe o cromatograma de íons totais (TIC) para solução contendo BMT antes da eletrólise (solução controle). Nesta observa-se um pico característico no tempo de retenção ( $t_{tr}$ ) de 9,3 min com  $m/z$  365, correspondente ao diurético (MW. 364 Da,  $[M+H]^+$ ) (Fig. 18.II).

Após a eletrólise da BMT no ECV, além do pico do diurético no mesmo  $t_{tr}$  e relação  $m/z$ , dois produtos de oxidação foram detectados por LC-MS/MS. O produto com maior intensidade de sinal foi observado no  $t_{tr}$  de 10,4 min com  $m/z$  363 ( $[M+H]^+$ ) (Fig. 18.III) (P1). O espectro de fragmento de íons (Fig. 18.IV) mostrou  $m/z$  346 (perda de 17 Da,  $-NH_3$ ),  $m/z$  304 (perda de 42 Da,  $-CH_2CHCH_3$ ) e  $m/z$  238 (perda de 108 Da,  $-SO_2$  e  $-CO_2$ ). O segundo produto, e menor intensidade de sinal, foi encontrado no  $t_{tr}$  de 8,5 min com  $m/z$  381 ( $[M+H]^+$ ) (Fig. 18.V) (P2). O espectro de íons (Fig. 18. VI) mostrou  $m/z$  363 (perda de 18 Da,  $-H_2O$ ),  $m/z$  282 (perda de 81 Da,  $-NH_3$  e  $-SO_2$ ),  $m/z$  254 (perda de 28 Da,  $-CH_2CH_2$ ),  $m/z$  198 (perda de 56 Da,  $2 \times -CH_2CH_2$ ). No entanto, quando a BMT é eletrolisada utilizando ECV/OGR, além de seu pico em 9,3 min com  $m/z$  365, apenas o produto com  $m/z$  381 em 8,5 min foi detectado (P2). O espectro de fragmento de íons é semelhante ao mostrado na Figura 18. VI.

De acordo com os produtos gerados e os resultados eletroquímicos foi possível propor um mecanismo de oxidação eletroquímica para a BMT em meio aquoso conforme mostrado no esquema 2. A amina secundária na estrutura da BMT, em meio aquoso, é oxidada após a transferência de  $1e^-$  e  $2H^+$ , gerando o produto P1. Em seguida, ocorre a oxidação envolvendo  $1e^-$  e  $1H^+$  com a adição de um grupo hidroxila leva a geração de P2 no ECV. Entretanto, o processo de oxidação eletroquímica da BMT utilizando o ECV/OGR leva apenas a formação do produto P2. Isto pode ser um indicativo que o processo de oxidação é muito acelerado quando feito utilizando o eletrodo modificado e, assim, P1 é imediatamente oxidado para P2, detectado aqui apenas como produto final de oxidação.



**Figura 18** – (I) TIC da amostra controle. (II) Espectro de massas para o pico no  $t_{tr}$ . de 9,3 min detectado em (I). (III) Cromatograma para o produto no  $t_{tr}$ . de 10,4 min com  $m/z$  363. (IV) Espectro de massas do produto detectado em (III). (V) Cromatograma para o produto no  $t_{tr}$ . de 8,5 min com  $m/z$  de 381. (VI) Espectro de massas do produto detectado em (V).

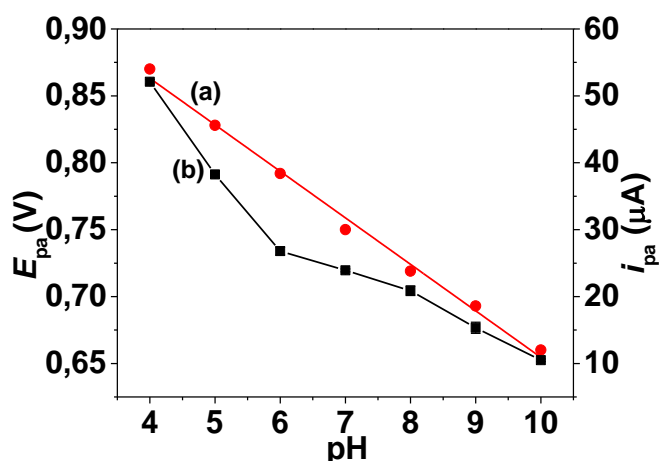


**Esquema 2** – Mecanismo de oxidação para a BMT.

#### 4.2.4. Otimização do método

Com o intuito de encontrar baixos níveis para a detecção da BMT utilizando o sensor baseado em ECG/OGR, alguns parâmetros foram otimizados como o pH, técnica voltamétrica (voltametrias de varredura linear, pulso diferencial e onda quadrada) e o tempo de acúmulo.

A Figura 19 ilustra o efeito do pH no intervalo de 4,0 a 10 no  $E_{pa}$  (a) e na  $i_{pa}$  (b) para  $100 \mu\text{mol L}^{-1}$  de BMT em solução tampão B–R  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  por voltametria de varredura linear.



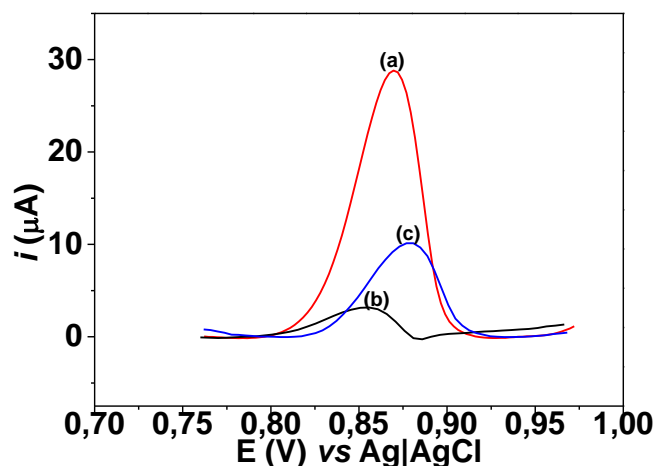
**Figura 19** – Relação de  $E_{pa}$  vs pH (a) e  $i_{pa}$  vs pH (b) para a oxidação da BMT.

O  $E_{pa}$  da BMT desloca-se para potenciais mais negativos com o aumento do pH (Fig. 19.a), indicando que prótons são envolvidos no processo de oxidação da BMT [167]. A relação entre  $E_{pa}$  vs pH apresenta uma linearidade que segue a seguinte equação:  $E_{pa} = -0,0347 \times \text{pH} + 1,00$  ( $R^2 = 0,993$ ). A maior  $i_{pa}$  foi observada em pH 4,0, enquanto que, com o aumento no valor de pH, a  $i_{pa}$  sofre um decaimento (Fig. 19.b). Esses resultados podem ser explicados pela interação  $\pi$ -Cátion entre o anel aromático do grafeno e o átomo de nitrogênio da molécula de BMT ( $\text{ArN}^+\text{H}_2\text{R}$ ), pois, em pH 4,0, a molécula de BMT estará protonada ( $\text{p}K_a$  3–5) [168]. Mesmo após a redução do óxido de grafeno, nem todos os grupos oxigenados são removidos [147,169]. Assim, os grupos  $-\text{COOH}$ , que ainda estão presentes na estrutura do óxido de grafeno reduzido, beneficiam a interação com a BMT, pois, em pH 4,0, esses grupos estarão desprotonados ( $-\text{COO}^-$ ), atraindo, por atração eletrostática, a região positiva da molécula de BMT. Com o aumento do pH de 5,0 a 10, a molécula de BMT estará desprotonada, com isso, haverá uma repulsão entre a BMT com os grupos  $-\text{COO}^-$  e, também, pela densidade  $\pi$  dos anéis do grafeno. Dessa forma, o pH 4,0 foi escolhido para os experimentos futuros.

O nível de detecção do sensor foi comparado entre as técnicas de voltametria de varredura linear (a), voltametria de pulso diferencial (b) e

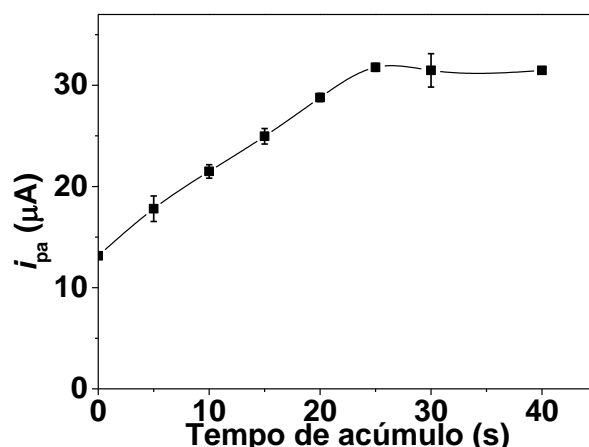


voltametria de onda quadrada (c). Os voltamogramas registrados para  $50 \mu\text{mol L}^{-1}$  de BMT em solução tampão B–R  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  (pH 4,0) são mostrados na Figura 20. A maior  $i_{pa}$  foi observada para a voltametria de varredura linear e, assim, esta técnica foi escolhida para a quantificação do diurético.



**Figura 20** – Comparação entre as técnicas de voltametria de varredura linear (a,  $v = 75 \text{ mV s}^{-1}$ ), voltametria de pulso diferencial (b,  $E_{sw} = 5 \text{ mV}$ ,  $\Delta E = 25 \text{ mV}$ ) e voltametria de onda quadrada (c,  $E_{sw} = 4 \text{ mV}$ ,  $\Delta E = 25 \text{ mV}$ ,  $f = 20 \text{ Hz}$ ) para a oxidação de  $50 \mu\text{mol L}^{-1}$  de BMT em solução tampão B–R  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  (pH 4,0).

Considerando que o processo de transferência de massa da BMT é controlado por adsorção, o efeito da pré-concentração de  $20 \mu\text{mol L}^{-1}$  de BMT foi investigado para diferentes tempos de acúmulo (5–40 s), como mostrado na Figura 21. A  $i_{pa}$  sofre um aumento com o aumento do tempo de acúmulo, indicando que a BMT pré-concentra na superfície do eletrodo modificado. O aumento de sinal é observado até 25 s de acumulação, ocorrendo um plateau para tempos superiores. Assim, o tempo de acúmulo da solução foi mantido por 25 s para os próximos experimentos.



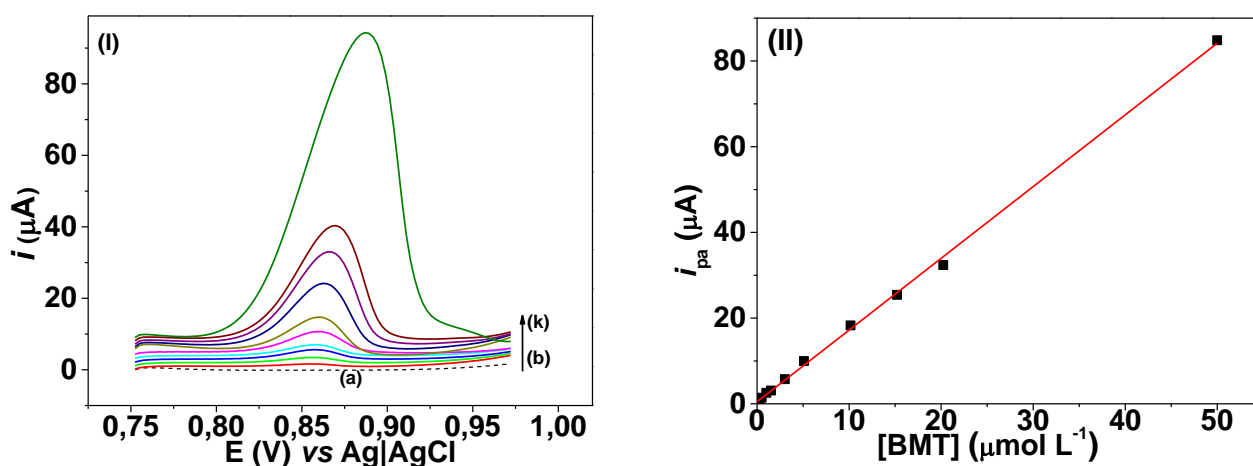
**Figura 21** – Influência do tempo de acúmulo entre 0 – 40 s para 20  $\mu\text{mol L}^{-1}$  de BMT em solução tampão B–R 0,1  $\text{mol L}^{-1}$  (pH 4,0) por análises de voltametria de varredura linear.

#### 4.2.5. Eficiência analítica

O desempenho analítico do método foi testado utilizando-se as condições otimizadas de pH (4,0), velocidade de varredura ( $100 \text{ mV s}^{-1}$ ) e tempo de acúmulo (25 s) entre medidas utilizando a técnica de voltametria de varredura linear, como mostrado na Figura 22.I. Uma curva analítica foi construída entre 0,255 a 50,0  $\mu\text{mol L}^{-1}$  de BMT, obtendo uma relação que segue a seguinte equação  $i_{pa} = 1,68[\text{BMT}] + 5,39 \times 10^{-7}$  ( $R^2 = 0,999$ ) (Fig. 22.II). Os L.D. e L.Q. foram calculados utilizando as seguintes equações:  $\text{L.D.} = 3\text{std}/m$  e  $\text{L.Q.} = 10\text{std}/m$ , onde *std* é o desvio padrão de 10 voltamogramas de onda quadrada apenas com o eletrólito suporte (medindo a corrente no potencial onde ocorre a oxidação do analito) e *m* o coeficiente angular da curva. Assim, os valores de L.D. e L.Q. foram 0,075 e  $0,25 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ , respectivamente. A relação linear encontrada é maior e o L.D. e o L.Q. são menores que os estudos na literatura [170].

A repetibilidade intra-dia foi verificada por 10 análises consecutivas para soluções contendo BMT nas concentrações de 0,50 e 15,0  $\mu\text{mol L}^{-1}$ , onde o desvio padrão relativo (DPR) foram de 3,40 e 2,70%, respectivamente. A repetibilidade entre 5 modificações foi analisada para as concentrações de 0,50 e 15,0  $\mu\text{mol L}^{-1}$  de BMT, sendo o valor encontrado para o DPR entre as 5 modificações ficaram no intervalo de 0,80 a 4,0% e 0,30 a 1,8%,

respectivamente. Estes dados indicam que o sensor proposto não é envenenado em análises consecutivas, uma vez a solução é agitada entre as medições. Além disso, o sensor é robusto, uma vez que apresentou baixos valores para DPR para os estudos de repetibilidade intra-dia e entre os eletrodos modificados.

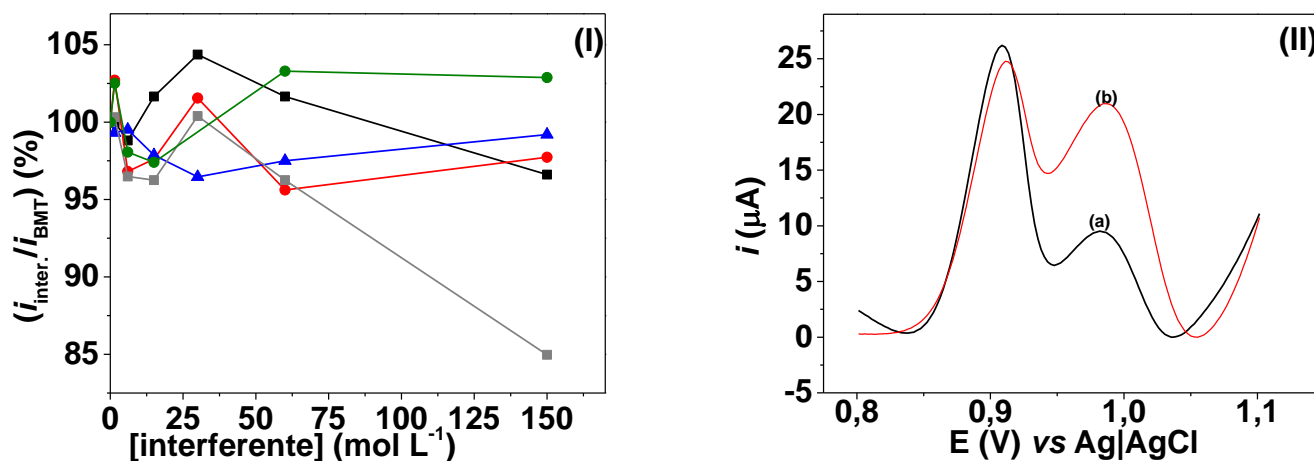


**Figura 22** – Voltamogramas de varredura linear em solução tampão B–R 0,1 mol L<sup>-1</sup> (pH 4,0) (a) variando a concentração de BMT em 0,255 (b), 0,509 (c), 1,01 (d), 1,52 (e), 3,02 (f), 5,09 (g), 10,2 (h), 15,2 (i), 20,2 (j) e 50,0 μmol L<sup>-1</sup> (k) (I). Relação entre  $i_{pa}$  vs concentração de BMT (II).

#### 4.2.6. Estudo de interferentes

A  $i_{pa}$  e a resolução do  $E_{pa}$  da BMT foram analisadas na presença de possíveis compostos interferentes como ácido úrico (AU), creatinina (CR), glicose (GL), ureia (UR) e furosemida (FUR). Sob as condições otimizadas, voltamogramas de varredura linear foram registrados para uma solução contendo 15 μmol L<sup>-1</sup> de BMT e os possíveis interferentes em diferentes concentrações no intervalo de 1,50 a 150 μmol L<sup>-1</sup>. Para todos os compostos testados, em todas as concentrações, exceto FUR, não foram observados sinais próximos ao da BMT, a qual permaneceu com pico voltamétrico definido e com boa resolução. Como pode ser observada na Figura 23.I, a porcentagem entre a  $i_{pa}$  do BMT na presença de interferentes ( $i_{inter.}$ ) sobre a  $i_{pa}$  da BMT ( $i_{BMT}$ ) para AU (■), CR (●), GL (▲) e UR (●) ficaram no intervalo de 98,8–104, 95,6–102, 96,5–99,5 e 97,5–103%, respectivamente, indicando que estas

substâncias, além de não apresentarem sobreposição de pico, não mostraram interferência na  $i_{pa}$  da BMT no intervalo de concentração estudado. No caso da FUR (■), um pico anódico foi observado no potencial de +0,994 V, como mostrado na Figura 23.II. Para uma concentração de FUR até 4 vezes maior (neste caso  $60 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) que a concentração de BMT, nenhuma interferência é observada na  $i_{pa}$  da BMT, pois a oxidação da furosemina ocorre 80 mV após a da BMT, permitindo a determinação de ambos, BMT e FUR, sem interferência nas concentrações estudadas. A relação de porcentagem entre a  $i_{pa}$  da BMT na presença de FUR ( $i_{inter.}$ ) sobre a  $i_{pa}$  da BMT ( $i_{BMT}$ ) para a concentração no intervalo de 1,5 a  $60 \mu\text{mol L}^{-1}$  ficou entre 96,2–100% (Fig. 23.I■).



**Figura 23** – Efeito na  $i_{pa}$  para a concentração de  $15 \mu\text{mol L}^{-1}$  de BMT na presença das substâncias AU (■), CR (●), GL (▲), UR (●) e FUR (■) em solução tampão B–R  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  (pH 4,0) (I). Voltamogramas de varredura linear para  $15 \mu\text{mol L}^{-1}$  de BMT na presença de  $30$  (a) e  $60 \mu\text{mol L}^{-1}$  (b) de FUR (II).

#### 4.2.7. Aplicação do método proposto

A eficiência do sensor ECV/OGR foi primeiramente verificada em análises de amostras de água de torneira contaminada com  $15,0 \mu\text{mol L}^{-1}$  de BMT. Como mostrada na Tabela 6, as recuperações do diurético ficaram no intervalo de 99,3 a 101%, indicando que o erro não é maior do que 1%. Além disso, o valor calculado de  $t$  ( $t_{calc.}$ ) foi menor do que o valor de  $t$  tabelado ( $t_{tab.}$ ), indicando que não existe diferença significativa ao nível de 95% de confiança

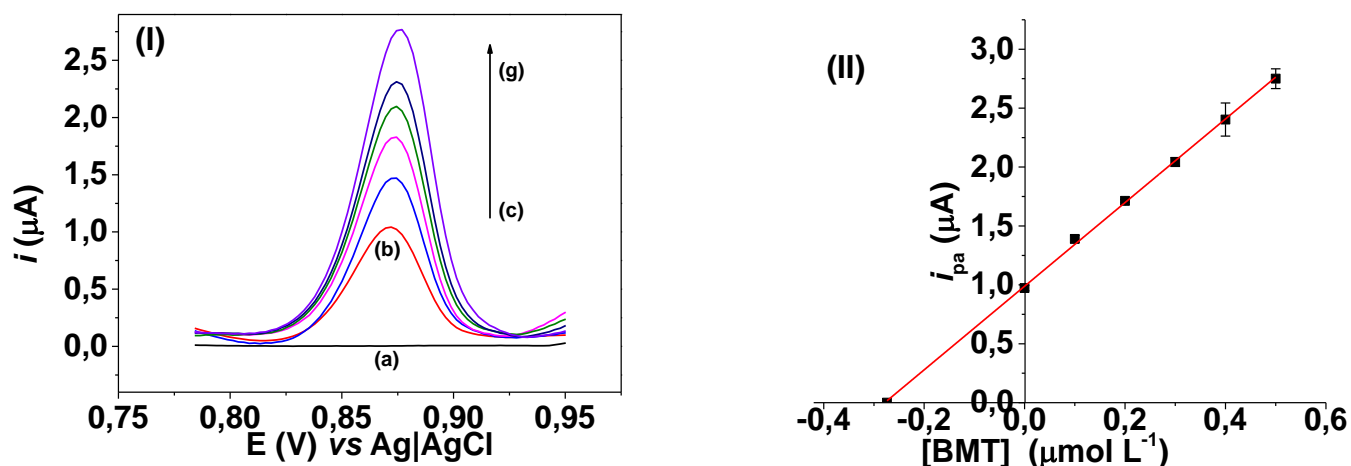
entre as concentrações fortificada e recuperada. Esses dados mostram a boa aplicabilidade do método proposto.

**Tabela 6** – Recuperações em amostras de água de torneira fortificadas com 15,00  $\mu\text{mol L}^{-1}$  de BMT.  $n= 3$ .

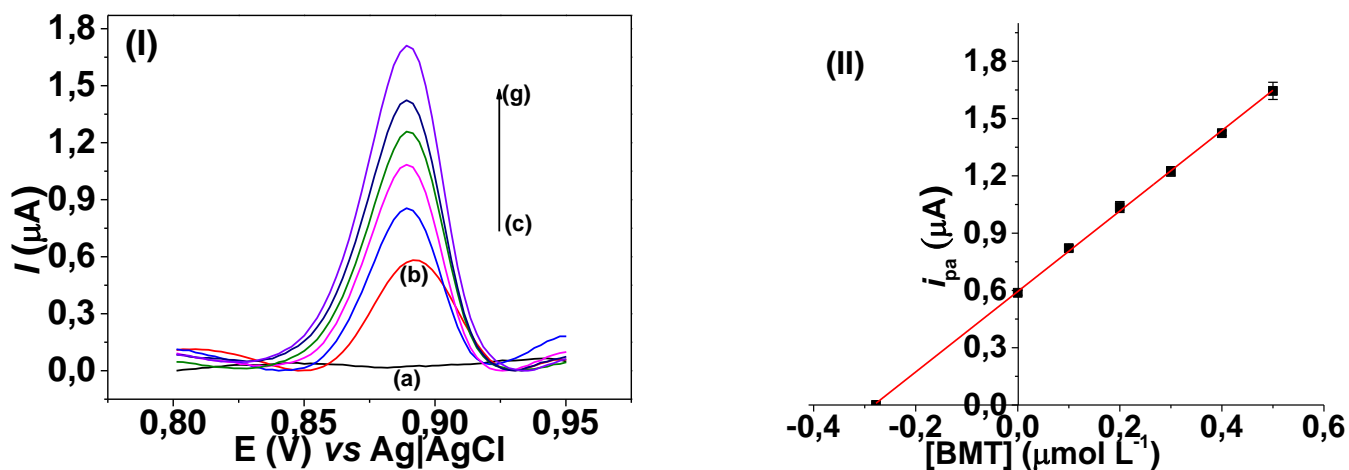
Amostra	Amostra 1	Amostra 2	Amostra 3
Adicionado ( $\mu\text{mol L}^{-1}$ )	15,0	15,0	15,0
Encontrado ( $\mu\text{mol L}^{-1}$ )	15,1 $\pm$ 0,306	15,1 $\pm$ 0,133	14,9 $\pm$ 0.304
Recuperado (%)	101	101	99,3
$t_{\text{cal}}$ .	0,905	0,352	0,759

A aplicabilidade do ECV/OGR também foi avaliada em amostra de urina sintética. 4 mL da amostra de urina previamente preparada (seção 3.3.2.), foi diretamente transferida em uma célula eletroquímica e os voltamogramas foram registrados nas condições otimizadas (Fig. 24.I). A concentração de BMT na amostra foi encontrada pelo método de adição de padrão, onde a curva foi construída no intervalo de 0,1 a 0,5  $\mu\text{mol L}^{-1}$  ( $R^2= 0,998$ ), como mostrada na Figura 24.II. Por meio da extrapolação da curva de adição de padrão, a concentração encontrada foi de  $2,68 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ . Visto que a amostra foi diluída 2,5 vezes (adição de 4 mL da amostra na célula eletroquímica com volume total de 10 mL), a concentração de BMT na amostra foi de  $6,72 (\pm 0,166) \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ .

A aplicabilidade do ECV/OGR também foi avaliada em amostras de urina humana, onde 4 mL da amostra foram previamente fortificadas com  $6,86 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$  (seção 3.3.2.) e transferida diretamente para a célula eletroquímica (Figura 25.I). A concentração de BMT na amostra foi calcula por meio do método de adição de padrão (Figura 25.II). Baseado nisso, o valor médio da concentração encontrada foi de  $6,97 (\pm 0,0488) \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$  (levando em consideração a diluição de 2,5 vezes).



**Figura 24** – Voltamogramas de varredura linear para ECV/OGR em solução tampão B–R  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  (pH 4,0) (a), adição de 4 mL da amostra urina sintética (b) e sucessivas adições de solução padrão de BMT nas concentrações de  $1,00$  (c),  $2,00$  (d),  $3,00$  (e),  $4,00$  (f) e  $5,00 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$  (i) (I). Relação linear entre  $i_{pa}$  vs [BMT] (II).  $v$  de  $100 \text{ mV s}^{-1}$ .



**Figura 25** – Voltamogramas de varredura linear para ECV/OGR em solução tampão B–R  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  (pH 4,0) (a), adição de 4 mL da amostra de urina humana (b) e sucessivas adições de solução padrão de BMT nas concentrações de  $1,00$  (c),  $2,00$  (d),  $3,00$  (e),  $4,00$  (f) e  $5,00 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$  (i) (I). Relação linear entre  $i_{pa}$  vs [BMT] (II).  $v$  de  $100 \text{ mV s}^{-1}$ .

O método foi comparado pela técnica de LC–MS/MS, onde a amostra de urina foi tratada previamente como descrita na seção 3.3.2. O pico cromatográfico usado para a quantificação da BMT foi observado no  $t_{tr}$  de 9,1 min. Por meio do método de adição de padrão, a concentração de BMT

encontrada foi de  $6,73 (\pm 0,113) \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ . Calculando o teste *t students* (teste t pareado), o valor encontrado foi de 0,511, que é menor do que o valor de *t* tabelado (4,30) [159]. Assim, o resultado não apresentou diferença significativa ao nível de 95% de confiança entre os dois métodos.

Os resultados mostram que o método proposto pode ser aplicado em amostra de atletas para controle de BMT em urina, pois o método apresenta limites de detecção e quantificação de 27,3 e 91,1 ng mL<sup>-1</sup>, respectivamente, que são inferiores ao requerido pela WADA (250 ng mL<sup>-1</sup>) [11,171], além de não apresentar diferença significativa com o método de referência quando aplicado em amostra de urina.

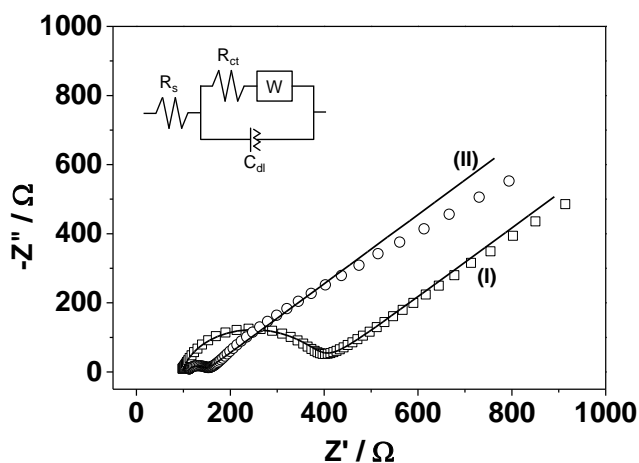
#### **4.2.8. Conclusões parciais**

A modificação do eletrodo com óxido de grafeno reduzido (OGR) diminuiu a resistência de transferência de carga e aumentou drasticamente a intensidade de pico da BMT em comparação ao ECV. O sensor foi empregado com sucesso em amostra de urina levando em consideração a concentração permitida da BMT pela WADA. A comparação foi realizada pelo método LC-MS/MS, onde não foi encontrada diferença significativa entre os dois métodos, indicando que o sensor ECV/OGR pode ser aplicado com sucesso em amostras de urina. Além disso, o fato deste sensor apresentar menor limite de detecção e maior relação linear em comparação com outros trabalhos relatados na literatura para a determinação do diurético BMT, torna-se uma alternativa adequada quando se trata de tais análises.

### 4.3. Determinação simultânea de Hidroclorotiazida e Triantereno por voltametria de redissolução anódica utilizando eletrodo de carbono vítreo modificado com nanotubo de carbono multiparedes

#### 4.3.1. Caracterização eletroquímica do eletrodo modificado com MWCNT

A Figura 26 apresenta as medidas de espectroscopia de impedância eletroquímica registradas para o eletrodo antes (I) e após (II) a modificação em solução de  $5 \text{ mmol L}^{-1} \text{ Fe(CN)}_6^{3-/4-}$  em  $0,1 \text{ mol L}^{-1} \text{ KCl}$ . A resistência de transferência de carga ( $R_{ct}$ ) do ECV sem modificação foi de  $288 \Omega$ . Após a modificação do eletrodo com MWCNT, a  $R_{ct}$  diminuiu para  $36,2 \Omega$ , que pode ser explicado pela excelente condutividade intrínseca do MWCNT. Os gráficos de Nyquist para os eletrodos foram ajustados utilizando o circuito de Randles (Figura 26 inserida).



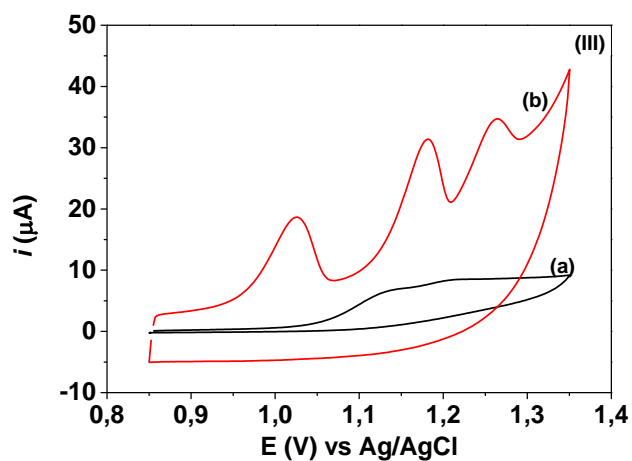
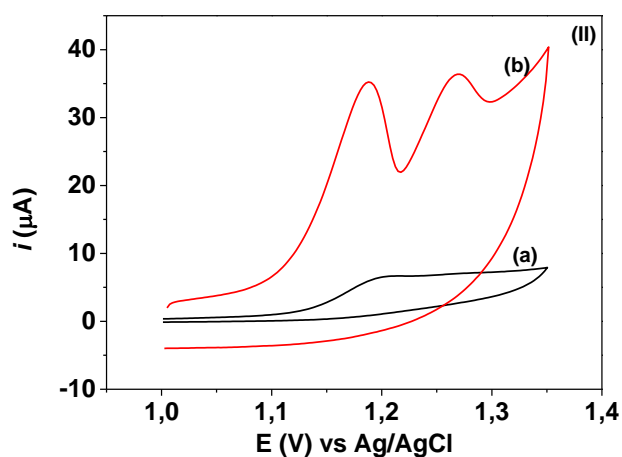
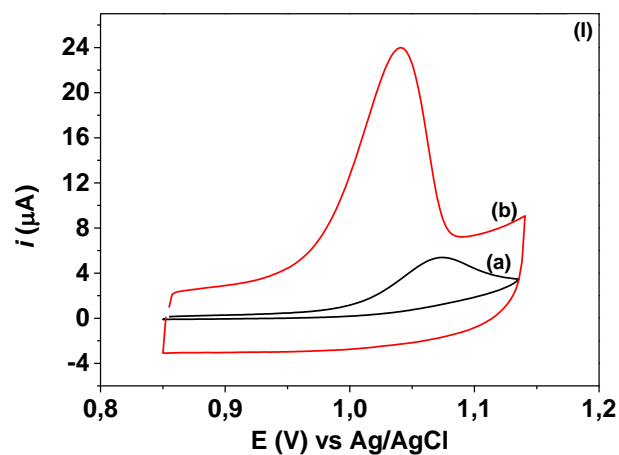
**Figura 26** – Gráficos de Nyquist utilizando solução de  $5,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$  de  $\text{Fe(CN)}_6^{3-/4-}$  em  $1,0 \text{ mol L}^{-1}$  de KCl para ECV (I) e ECV/MWCNT (II). Condições:  $10 \text{ kHz} - 0,03 \text{ Hz}$ ;  $5 \text{ mV rms}$  modulação sinusoidal no OCP.



#### 4.3.2. Comportamento eletroquímico da HCT e TRT utilizando o ECV e o ECV/MWCNT

A oxidação eletroquímica de  $100 \mu\text{mol L}^{-1}$  de HCT e TRT sobre o ECV em tampão B-R  $0,10 \text{ mol L}^{-1}$  (pH 4,0) é mostrada na Fig. 27. Para o eletrodo de carbono vítreo, a HCT (Fig. 27.I.a) apresentou um pico anódico ( $E_{pa}$ ) em 1,06 V, correspondendo a oxidação do grupo  $-\text{NH}-$  [24]. Já na varredura reversa, nenhum pico de redução foi observado, sendo um indicativo de comportamento irreversível [152]. Quando analisada a oxidação da HCT sobre o eletrodo de carbono vítreo modificado com nanotubos de carbono multiparedes (ECV/MWCNT) (Fig. 27.I.b), foi observado um deslocamento no  $E_{pa}$  para 1,01 V e também, um aumento de aproximadamente 6 vezes na intensidade do pico anódico. Já para o diurético TRT, utilizando o ECV (Fig. 27.II.a) resultou em um único pico de oxidação em 1,21 V, devido a oxidação do grupo  $\text{R}-\text{NH}_2$  [32], enquanto que para a varredura catódica nenhum pico foi observado, indicando que o comportamento eletroquímico do TRT apresenta características irreversíveis [152]. Para o ECV/MWCNT (Fig. 27.II.b), o  $E_{pa}$  do grupo  $\text{R}-\text{NH}_2$  do TRT é observado em 1,17 V (pico i) com um aumento de aproximadamente 10 vezes na  $i_{pa}$ , comparado ao eletrodo sem modificação. Além disso, na mesma varredura anódica, foi observado outro pico no potencial de 1,25 V (pico ii) sendo provavelmente devido a subsequente oxidação do grupo amina [172]. Tal resposta eletroanalítica não foi encontrada na varredura utilizando o ECV.

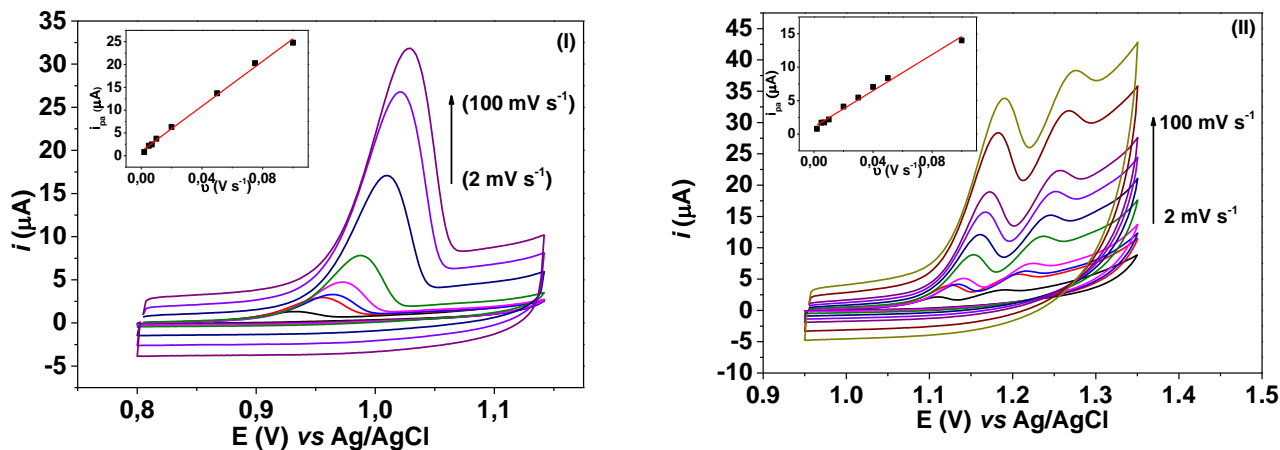
Para a detecção simultânea dos dois analitos sobre o ECV (Fig. 27.III.a), os picos de oxidação para HCT e TRT foram observados, porém, com sobreposição de ambos os picos, tornando dificultosa a quantificação dos analitos de maneira simultânea. No entanto, o uso do ECV/MWCNT (Fig. 27.III.b) resultou na separação dos picos de HCT e TRT, com  $\Delta E = 160 \text{ mV}$ , permitindo a determinação simultânea dos diuréticos.



**Figura 27** – Voltamogramas cíclicos para  $100 \mu\text{mol L}^{-1}$  de HCT (I), TRT (II), e HCT + TRT (III) utilizando ECV (a) e ECV/MWCNT (b) em solução tampão B–R  $0,10 \text{ mol L}^{-1}$  (pH 4,0).  $v = 75 \text{ mV s}^{-1}$ .

A fim de identificar o tipo de transporte de carga no sistema, foram registrados voltamogramas cíclicos no intervalo de 2 a 100  $\text{mV s}^{-1}$  para a oxidação de  $100 \mu\text{mol L}^{-1}$  HCT e TRT em solução tampão B–R  $0,10 \text{ mol L}^{-1}$  (pH 4,0). Como mostrado na Fig. 28, para HCT (I) e TRT (II), com o aumento da velocidade de varredura ( $v$ ), foram observados pequenos deslocamentos dos potenciais de pico anódico ( $E_{pa}$ ) dos analitos em direção a regiões mais positivas, o que é um indicativo de um típico comportamento de processo irreversível, o que corrobora com os resultados anteriormente mencionados.

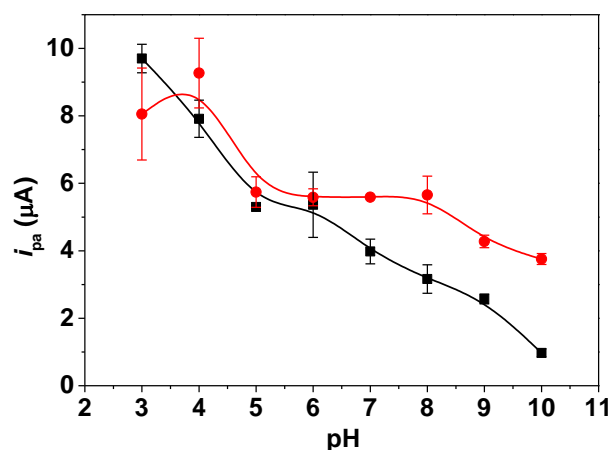
As relações lineares podem ser descritas pelas seguintes equações:  $i_{pa} / \mu\text{A} = 2,41 \times 10^{-4} v / \text{V s}^{-1} + 1,03 \times 10^{-6}$  ( $R^2 = 0,996$ ) e  $i_{pa} / \mu\text{A} = 1,34 \times 10^{-4} v / \text{V s}^{-1} + 9,76 \times 10^{-7}$  ( $R^2 = 0,990$ ) para HCT (Fig. 28.I inserida) e TRT (Fig. 28.II inserida), respectivamente. A partir disso, pode-se concluir que a transferência de carga para ambos os analitos é controlada pelo processo de adsorção [152]. Uma vez que os analitos podem ser monitorados em todas as velocidades de varredura analisadas, escolheu-se a velocidade de  $100 \text{ mV s}^{-1}$  para as demais análises por apresentar melhor relação sinal/distorção dos picos.



**Figura 28** – Voltamogramas cíclicos para  $100 \mu\text{mol L}^{-1}$  de HCT (I) e TRT (II) em solução tampão B–R  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  (pH 4,0) utilizando ECV/MWCNT nas  $v$  de 2 a  $100 \text{ mV s}^{-1}$ . Figuras inseridas: Relações lineares entre  $i_{pa}$  vs  $v$ .

### 4.3.3. Otimização do método

A fim de detectar simultaneamente a HCT e TRT em baixos níveis de concentração, foram feitos estudos dos parâmetros como pH, potencial de acúmulo e tempo de acúmulo para avaliar seus efeitos no sinal analítico dos diuréticos. Primeiramente, os comportamentos dos analitos foram avaliados em solução tampão B-R  $0,10 \text{ mol L}^{-1}$  no intervalo de pH entre 3 a 10. Para ambos os diuréticos, os maiores valores da  $i_{pa}$  foram encontrados em pH 3 e 4. Com o aumento no valor de pH, foram observados decréscimos na intensidade de sinal, tendo seu pior resultado em pH 10 (Fig. 29.■). No intervalo de pH estudado, a melhor separação entre os picos e detecção dos analitos foi observada em pH 4,0, o qual foi escolhido para o uso nas análises subsequentes. A medida que o valor de pH diminui, o  $E_{pa}$  desloca para valores mais positivos, tanto para a HCT como para o TRT (Fig. 29.●), admitindo as seguintes relações lineares:  $E_{pa} / V = -70,4 \times 10^{-3} \text{ pH} + 1,30$  ( $R^2 = 0,995$ ) para a HCT e  $E_{pa} / V = -51,0 \times 10^{-3} \text{ pH} + 1,37$  ( $R^2 = 0,994$ ) para o TRT. Os resultados indicam a mesma relação de  $e^-/H^+$  para o processo de oxidação dos diuréticos [24,32].

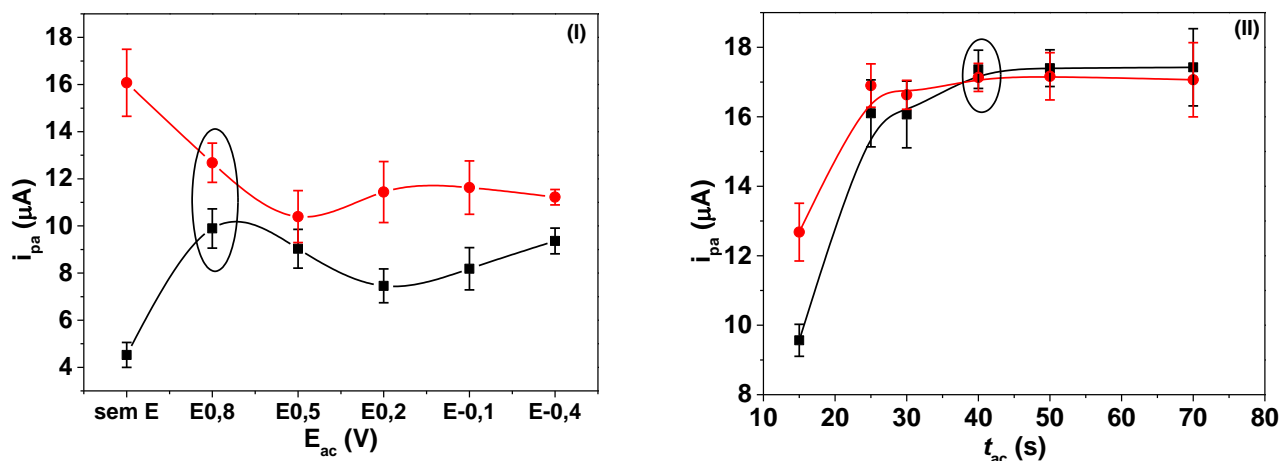


**Figura 29** – Influência do pH na  $i_{pa}$  da HCT (■) e TRT (●) por meio de medidas utilizando voltametria de varredura linear.

Visto que ambos os diuréticos apresentam transferência de carga controlada pelo processo de adsorção, estudos de pré-concentração foram realizados utilizando  $50 \mu\text{mol L}^{-1}$  da HCT (■) e TRT (●). O efeito do potencial de

acúmulo ( $E_{ac}$ ) sobre o valor da  $i_{pa}$  foi primeiramente avaliado na faixa de potencial entre 0,80 a -0,40 V, após agitação por 15 s, como mostrado na Fig. 30.I. Para ambos os analitos, o maior valor de  $i_{pa}$  foi observado em  $E_{ac}$  de 0,80 V, que foi, portanto, selecionado para as análises subsequentes.

O efeito do tempo de acúmulo ( $t_{ac}$ ) no valor da  $i_{pa}$  foi estudado na faixa de 15 a 70 s, utilizando  $50 \mu\text{mol L}^{-1}$  da HCT (■) e TRT (●) (Fig. 30.II). Para ambos os compostos, a  $i_{pa}$  aumentou a medida que o  $t_{ac}$  foi aumentado de 15 para 40 s. Em  $t_{ac}$  mais longos, um platô foi observado. Portanto, antes de cada medida, a solução foi submetida a uma pré-concentração durante 40 s em  $E_{ac}$  de 0,80 V.

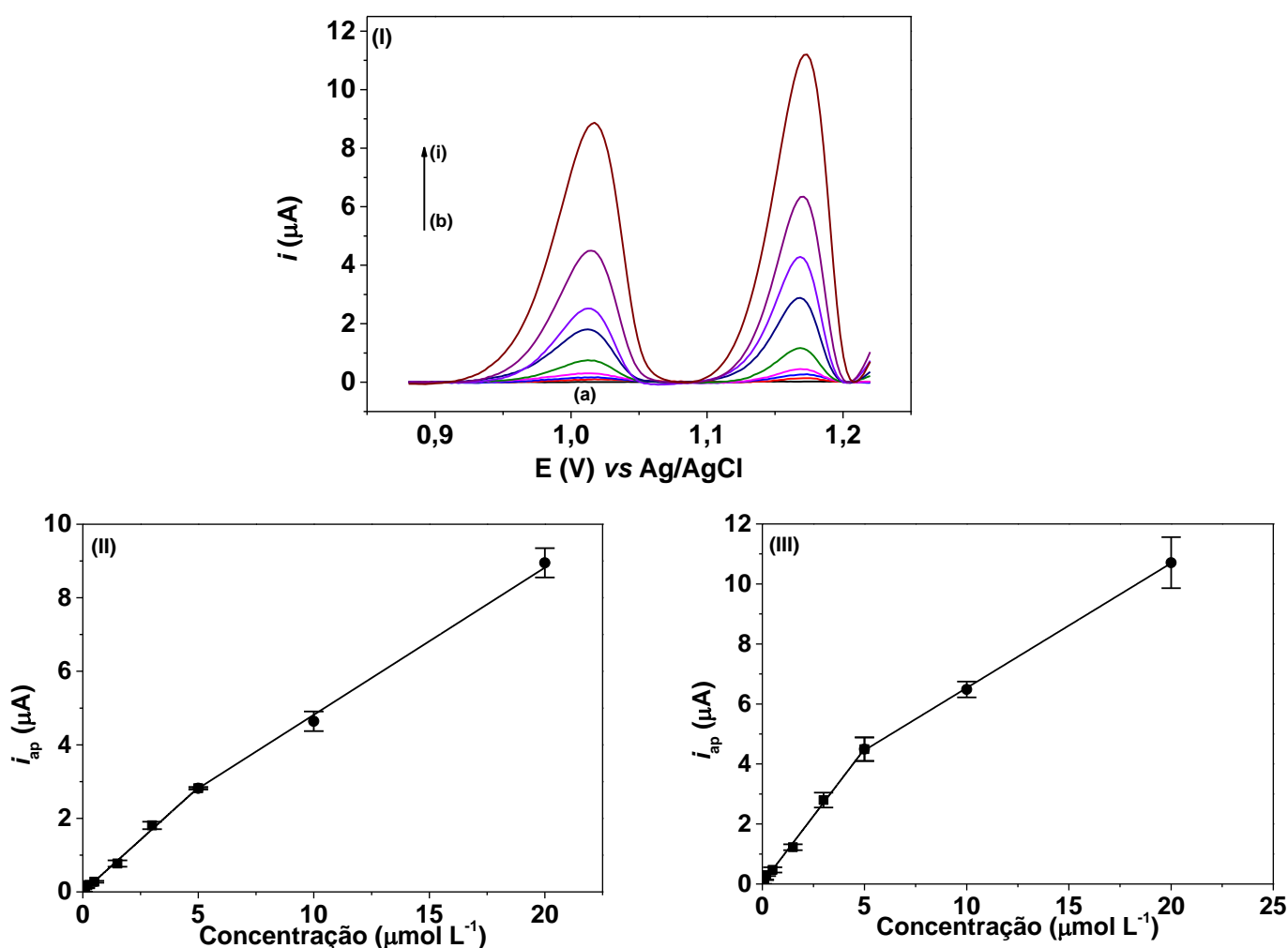


**Figura 30** – Variação do  $E_{ac}$  (I) e do  $t_{ac}$  (II) na  $i_{pa}$  da HCT (■) e do TRT (●) por análises utilizando voltametria de varredura linear.

#### 4.3.4. Desempenho analítico

Sob condições otimizadas de pH (4,0),  $E_{ac}$  (0,80 V) e  $t_{ac}$  (40 s), voltamogramas de varredura linear de redissolução adsorptiva (LSAdSV) foram registrados para HCT e TRT em solução tampão B-R  $0,10 \text{ mol L}^{-1}$  (pH 4,0), como mostrado na Fig. 31.I. Para ambos, HCT e TRT, duas regiões lineares foram encontradas no intervalo de concentração de  $1,0 \times 10^{-7}$  a  $2,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$  (Fig. 31.II). A primeira região linear foi encontrada no intervalo entre  $1,0 \times 10^{-7}$  a  $5,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ , descrito pelas equações:  $i_{pa} / \mu\text{A} = 0,565[\text{HCT}] / \mu\text{mol L}^{-1} + 2,06 \times 10^{-8}$  ( $R^2 = 0,996$ ) e  $i_{pa} / \mu\text{A} = 0,895[\text{TRT}] / \mu\text{mol L}^{-1} + 2,95 \times 10^{-7}$  ( $R^2 = 0,997$ ). A segunda relação linear foi observada entre  $5,0 \times 10^{-6}$  e  $2,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$

$L^{-1}$ , descrita pelas seguintes equações lineares:  $i_{pa} / \mu A = 0,412[HCT] / \mu mol L^{-1} + 6,62 \times 10^{-7}$  ( $R^2 = 0,997$ ) e  $i_{pa} / \mu A = 0,416[TRT] / \mu mol L^{-1} + 2,38 \times 10^{-6}$  ( $R^2 = 0,999$ ). Os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) foram calculados usando as expressões  $LD = 3std/m$  e  $LQ = 10std/m$ , onde  $std$  é o desvio padrão de 10 LSAdSVs obtidos apenas para o eletrólito de suporte (solução tampão B-R  $0,10 mol L^{-1}$  pH 4,0) e  $m$  é o coeficiente angular das equações da primeira região linear da curva de calibração. Sendo assim, os valores de LD foram  $2,8 \times 10^{-8}$  e  $2,9 \times 10^{-8} mol L^{-1}$  e os valores correspondentes ao LQ foram  $9,5 \times 10^{-8}$  e  $9,6 \times 10^{-8} mol L^{-1}$  para HCT e TRT, respectivamente.



**Figura 31** – LSAdSV (I) em solução tampão B-R (pH 4,0)  $0,1 mol L^{-1}$  utilizando ECV/MWCNT variando a concentração de HCT e TRT em 0,1 (b), 0,2 (c), 0,5 (d), 1,0 (e) 5,0 (f), 10 (g) e 20  $\mu mol L^{-1}$  (h); relações lineares entre  $i_{pa}$  vs [HCT] (II) e  $i_{pa}$  vs [TRT] (III).  $v = 100 mV s^{-1}$ ;  $E_{ac} = 0,80 V$ ;  $t_{ac} = 40 s$ .

A repetibilidade do método foi avaliada por meio de 10 análises nas concentrações de 0,500 e 15,0  $\mu\text{mol L}^{-1}$  de HCT e TRT. Os desvios padrões relativos obtidos foram de 4,25% (HCT) e 5,02% (TRT) para 0,500  $\mu\text{mol L}^{-1}$  e 5,98% (HCT) e 3,92% (TRT) para 15,0  $\mu\text{mol L}^{-1}$ , indicando que o eletrodo proposto não foi passivado durante análises consecutivas, uma vez que a solução foi agitada entre as medições.

#### 4.3.5. Estudo de interferentes

A fim de avaliar possíveis interferências na  $i_{pa}$  dos analitos, foram avaliados os efeitos de substâncias que poderiam agir como possíveis interferentes tais como glicose (GLI), ureia (UR), furosemida (FUR), ácido ascórbico (AA), ácido úrico (AU), creatinina (CR) e bumetanida (BMT), variando a concentração dos possíveis interferentes de 0,1 a 10 vezes a concentração de HCT e TRT (neste caso entre 0,3 a 30  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ).

A Tabela 7 mostra o intervalo de concentração estudada para cada possível interferente e os efeitos percentuais na  $i_{pa}$  de HCT e TRT. Na faixa de potencial estudada, não foram observados efeitos significativos na  $i_{pa}$  dos analitos quando analisados juntamente com GLI, UR, AA, AU e CR, em nenhuma das concentrações testadas, indicando que essas substâncias não interferiram nas respostas dos analitos. No entanto, para FUR e BMT, picos de oxidação foram encontrados na janela de potencial analisada, sendo nos potenciais de 0,965 e 1,13 V para a FUR e nos potenciais de 0,876 e 0,948 V para a BMT. No caso da FUR, para as concentrações entre 0,30 a 6,0  $\mu\text{mol L}^{-1}$ , não houve alterações significativas nos valores da  $i_{pa}$  para HCT e TRT. Entretanto, para concentrações mais elevadas, o pico de oxidação da FUR passou a interferir significativamente na resposta dos analitos. Já para a BMT, nenhuma interferência significativa no valor da  $i_{pa}$  do HCT foi observada, mesmo com a existência de um pico de oxidação no intervalo empregado. No entanto, a BMT apresentou interferência na resposta do TRT quando o interferente se encontrava presente em uma concentração 5 vezes maior que a concentração do TRT (neste caso quando a concentração da BMT excedia 15  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ).

**Tabela 7** – Resultados de ensaios de interferência empregando glicose, uréia, furosemida, ácido ascórbico, ácido úrico, creatinina e bumetanida.

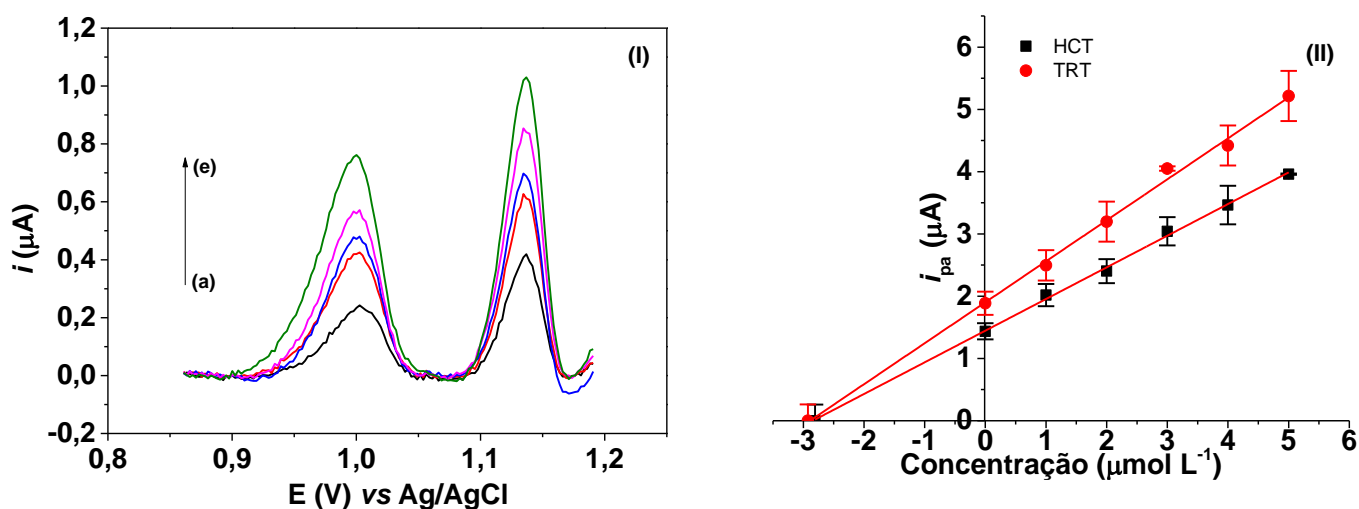
Interferente	Analito	Concentração ( $\mu\text{mol L}^{-1}$ )	% sinal
GLI	HCT	0,30-30	92,1-109
	TRT	0,30-30	90,8-99,1
UR	HCT	0,30-30	98,8-108
	TRT	0,30-30	90,4-102
FUR	HCT	0,30-6,0	91,6-106
	TRT	0,30-6,0	90,4-106
AA	HCT	0,30-30	92,4-109
	TRT	0,30-30	96,4-109
AU	HCT	0,30-30	90,7-103
	TRT	0,30-30	93,9-109
CR	HCT	0,30-30	90,5-100
	TRT	0,30-30	90,7-111
BMT	HCT	0,30-30	94,2-108
	TRT	0,30-15	92,8-111

#### 4.3.6. Aplicação do sensor ECV/MWCNT

A aplicabilidade do ECV/MWCNT foi avaliada em amostra de urina sintética. 4 mL da amostra de urina previamente preparada (seção 3.3.3.), foi diretamente transferida em uma célula eletroquímica e os voltamogramas foram registrados nas condições otimizadas (Fig. 32.I). A concentração de HCT e TRT na amostra foi encontrada pelo método de adição de padrão, onde a curva foi construída no intervalo de 0,2 a 0,6  $\mu\text{mol L}^{-1}$  ( $R^2= 0,998$ ), como



mostrada na Figura 32.II. Por meio da extrapolação da curva de adição de padrão, as concentrações encontradas foram de  $3,13 \times 10^{-7}$  e  $7,84 \times 10^{-7}$  mol L<sup>-1</sup> para HCT e TRT, respectivamente. Visto que a amostra foi diluída 2,5 vezes (adição de 4 mL da amostra na célula eletroquímica com volume total de 10 mL), as concentrações de HCT e TRT na amostra são mostradas na Tabela 8.



**Figura 32** – LSAdSV para ECV/MWCNT em solução tampão B–R 0,1 mol L<sup>-1</sup> (pH 4,0) (a), para a amostra (b) e as adições de padrões de 1 (c), 2 (d), 3(e), 4 (f) e 6  $\mu\text{mol L}^{-1}$  (g) (I). Relações lineares entre  $i_{pa}$  vs Concentração (II).

A aplicação do teste *t* de Student [159] mostrou que não houve diferenças significativas (com nível de confiança de 95%) entre as concentrações fortificada e recuperada. Os resultados demonstraram a satisfatória aplicabilidade do método para a determinação simultânea de HCT e TRT.

**Tabela 8** – Resultados da aplicação do sensor ECV/MWCNT em amostra de urina sintética.

Amostra de urina sintética		
Analito	HCT	TRT
Adicionado ( $\times 10^{-7}$ mol L <sup>-1</sup> )	8,40	9,87
Encontrado ( $\times 10^{-7}$ mol L <sup>-1</sup> )	$7,84 \pm 0,254$	$9,82 \pm 0,690$
<i>t</i> cal.	3,78	0,124

$t_{tab.} = 4,30$ ,  $n = 3$ .

#### **4.3.7. Conclusões parciais**

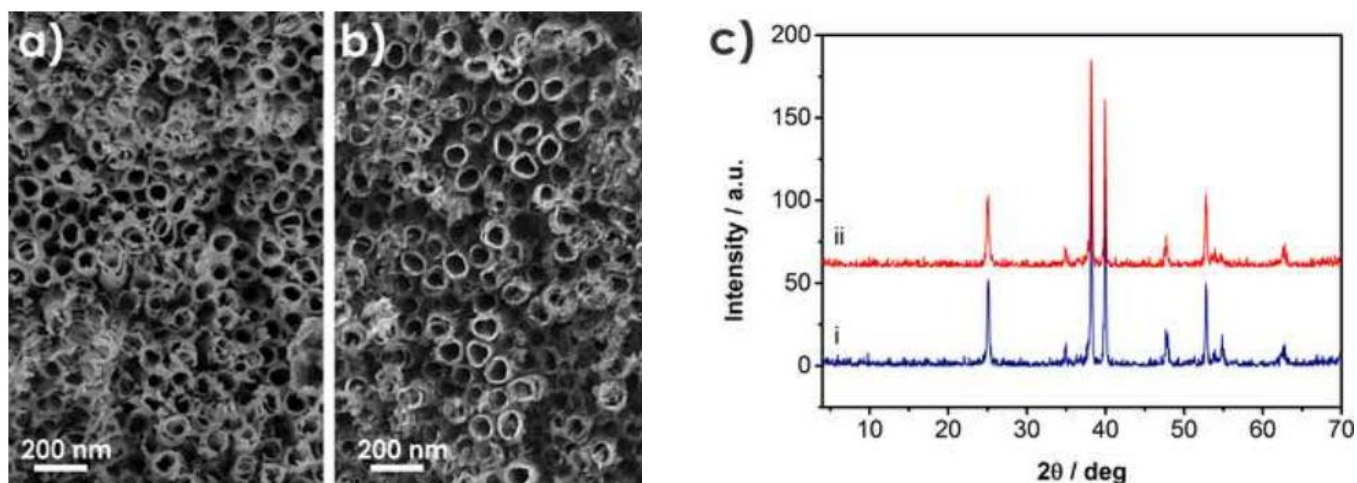
A modificação do eletrodo resultou em uma melhora na resistência de transferência de carga e um aumento na intensidade do sinal dos analitos, comparado ao eletrodo não modificado. O método permitiu a determinação simultânea de HCT e TRT, ao contrário da maioria dos métodos eletroanalíticos, onde apenas determinações individuais são possíveis. O método apresentou ampla faixa linear, baixos limites de detecção e excelente desempenho na determinação simultânea de HCT e TRT. O método foi aplicado eficazmente em amostra de urina sintética, não havendo diferença significativa entre a concentração fortificada e a concentração encontrada.

#### 4.4. Eletrodo de nanotubos de TiO<sub>2</sub> auto-dopados com Ti<sup>3+</sup>

##### 4.4.1. Caracterização dos eletrodos de TiO<sub>2</sub>NT e P-TiO<sub>2</sub>NT

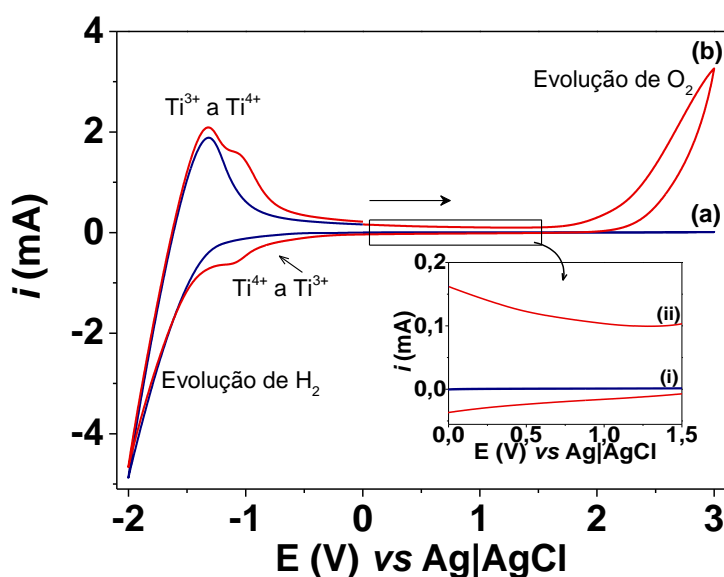
A Figura 33 mostra imagens de microscopia eletrônica de varredura (MEV) onde-se vê a formação dos nanotubos auto alinhados perpendiculares ao substrato metálico após o crescimento dos nanotubos por anodização eletroquímica sob potencial de 30 V por 50 h e calcinação a 450 °C por 60 min (a). A Imagem 33.b mostra a superfície do eletrodo submetido previamente a redução eletroquímica sob potencial de -2,5 V durante 5 min. Em ambos os eletrodos, TiO<sub>2</sub>NT (a) e P-TiO<sub>2</sub>NT (b), observa-se que a morfologia superficial não foi alterada. Para ambos os eletrodos, antes e após a polarização catódica, os tubos apresentaram um diâmetro médio de 80 nm, parede do tubo de 12 nm e comprimento de 2,4 μm.

Os difratogramas de Raios-X (Fig. 33.c) obtidos para TiO<sub>2</sub>NT e P-TiO<sub>2</sub>NT não apresentaram diferença significativa para os eletrodos antes (i) e após (ii) a polarização, em que os picos observados são atribuídos a fase anatase após calcinação a 450 ° C [173].



**Figura 33**– Imagens de MEV para os TiO<sub>2</sub>NT antes (a) e após (b) a polarização catódica e difratogramas de Raios-X (c) das amostras de TiO<sub>2</sub>NT (i) e P-TiO<sub>2</sub>NT (ii).

A Figura 34 mostra sucessivos ciclos voltamétricos obtidos para o eletrodo de TiO<sub>2</sub>NT em solução KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,1 mol L<sup>-1</sup>. No primeiro ciclo (a), nenhum pico anódico é observado na região de potencial entre 0 a 3,0 V, o que é esperado por se tratar de um semiconductor do tipo *n* sem ativação por irradiação de radiação UV [174]. Entretanto, quando a varredura de potencial atinge valores mais negativos do que -1,0 V, ocorre a redução parcial do Ti<sup>4+</sup> a Ti<sup>3+</sup>, acompanhada por intercalação de prótons (Ti<sup>IV</sup>O<sub>2</sub> + e<sup>-</sup> + H<sup>+</sup> ⇌ Ti<sup>III</sup>(O)(OH)) e evolução de H<sub>2</sub> [135]. A formação de altos níveis dos estados dopados Ti<sup>3+</sup> (até aproximadamente 1% de Ti<sup>4+</sup> pode ser reduzido a Ti<sup>3+</sup>) [11], confere um comportamento quase metálico ao material [135]. Deste modo, o voltamograma apresentou uma corrente significativa entre 0,0 e 1,7 V (curva b), correspondente à evolução de oxigênio. Isto evidencia a “ativação” do TiO<sub>2</sub>NT para reações anódicas quando submetido a prévia polarização catódica. Esse comportamento é considerado irreversível [17], uma vez que, mesmo após a oxidação de Ti<sup>3+</sup> em Ti<sup>4+</sup> a -1,3 V, o P-TiO<sub>2</sub>NT não é desativado e a condutividade apresentada é relativamente maior em relação ao primeiro ciclo.

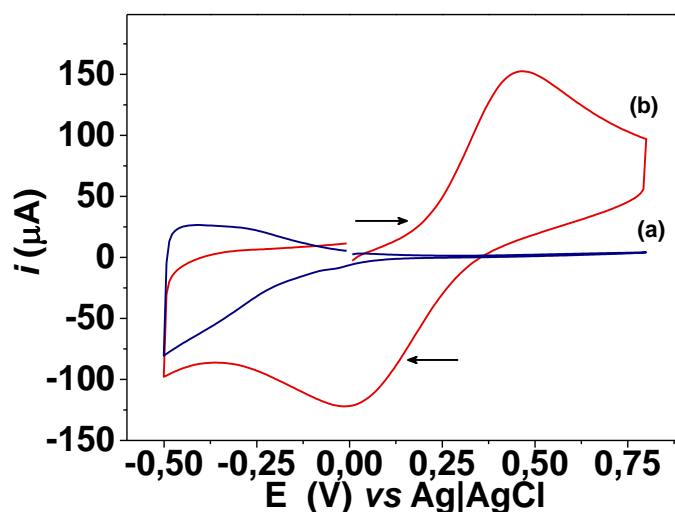


**Figura 34** – Voltamogramas cíclicos em solução de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,1 mol L<sup>-1</sup> para TiO<sub>2</sub>NT. 1<sup>o</sup> ciclo (-) e 2<sup>o</sup> ciclo (-).

A Figura 35 mostra voltamogramas cíclicos para a oxidação de 5 mmol L<sup>-1</sup> Fe(CN)<sub>6</sub><sup>4-</sup> em meio solução de KCl 0,1 mol L<sup>-1</sup> sobre eletrodo de TiO<sub>2</sub>NT nas condições otimizadas antes (a) e após (b) a polarização (seção 4.4.2).

Antes da polarização (a), nenhum pico correspondente à oxidação do  $\text{Fe}^{2+}$  é observado entre 0,0 a 0,75 V, mostrando que o material apresenta propriedades de um eletrodo semicondutor do tipo-*n*, e conseqüentemente, durante a varredura catódica não foi verificado o pico de redução do  $\text{Fe}^{3+}$ .

Porém, após o processo de polarização catódica do  $\text{TiO}_2\text{NT}$  (b), observa-se no voltamograma a oxidação do  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$  a  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$  com um pico bem definido em potencial de 0,46 V, e redução de  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$  a  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$  na varredura reversa em 0,0 V. Estes resultados indicam que a pré-redução do  $\text{Ti}^{4+}/\text{Ti}^{3+}$  no semicondutor altera suas propriedades condutivas, provavelmente devido a formação de estados intermediários que modificam o nível de Fermi do semicondutor e permite a oxidação do analito na interface quando os potenciais de redução do material são relativamente nivelados [175].

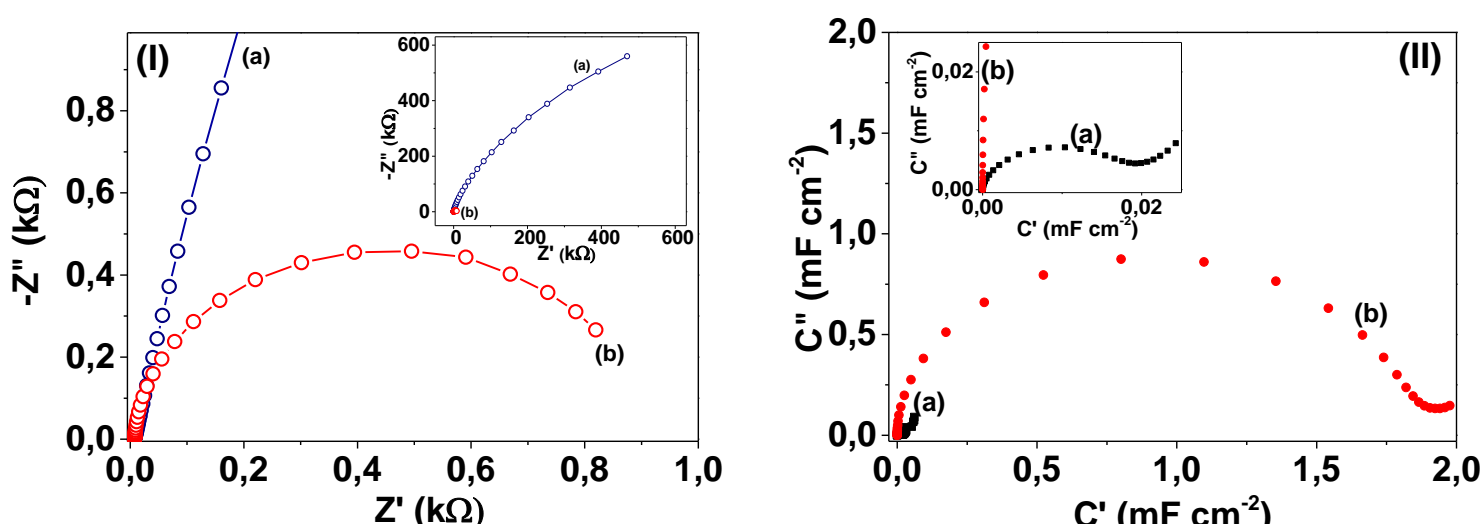


**Figura 35** – Voltamogramas de voltametria cíclica para  $5 \text{ mmol L}^{-1} [\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$  em solução de  $\text{KCl } 0,1 \text{ mol L}^{-1}$  utilizando eletrodos de  $\text{TiO}_2\text{NT}$  (a) e  $\text{P-TiO}_2\text{NT}$  (b).

Medidas de espectroscopia de impedância eletroquímica (EIE) para os eletrodos de  $\text{TiO}_2\text{NT}$  e  $\text{P-TiO}_2\text{NT}$  são comparadas na Figura 36.I. O eletrodo de  $\text{P-TiO}_2\text{NT}$  apresenta um semicírculo extremamente menor (curva b) em comparação com o eletrodo não dopado (curva a), o que implica em uma diminuição na resistência de transferência eletrônica quando realizado o processo de polarização do eletrodo. Esse comportamento foi relatado em trabalhos anteriores que tratam de  $\text{TiO}_2\text{NTs}$  auto-dopados [129,137,138,141]. A

resistência de transferência de carga ( $R_{tc}$ ) foi calculada medindo o diâmetro do semicírculo nos gráficos de Nyquist. O valor para a  $R_{tc}$  do eletrodo de P-TiO<sub>2</sub>NT foi de 1058,3  $\Omega$ . Já para o TiO<sub>2</sub>NT, o valor de resistência está na ordem de M $\Omega$ , o que significa uma magnitude de 1.000 vezes maior (Figura 36.I inserida).

Além disso, a capacitância eletroquímica, que é obtida diretamente ao tamanho do semicírculo no gráfico capacitivo de Nyquist (Figura 36.II), foi de  $1,9 \pm 0,1$  mF cm<sup>-2</sup> para o eletrodo de TiO<sub>2</sub>NT (a) e grandemente aumentada para  $19,2 \pm 0,1$   $\mu$ F cm<sup>-2</sup> para o P-TiO<sub>2</sub>NT (b), corroborando com as melhorias anteriormente mencionadas.



**Figura 36** – Gráficos de Nyquist para 5 mmol L<sup>-1</sup> da solução redox Fe(CN)<sub>6</sub><sup>3-/4-</sup> utilizando TiO<sub>2</sub>NT (a) e P-TiO<sub>2</sub>NT (b) (I); Gráficos capacitivos de Nyquist para TiO<sub>2</sub>NT (a) e P-TiO<sub>2</sub>NT em 0,1 mol L<sup>-1</sup> de solução tampão B-R pH 2,0 (II).

O número de portadores de carga, que são partículas que conduzem a corrente elétrica em um material, está associada ao carregamento da dupla camada elétrica na interface filme/eletrólito, podendo assim ser estimado pelo uso da equação de Mott-Schottky, a qual é representada pela seguinte equação [176]:

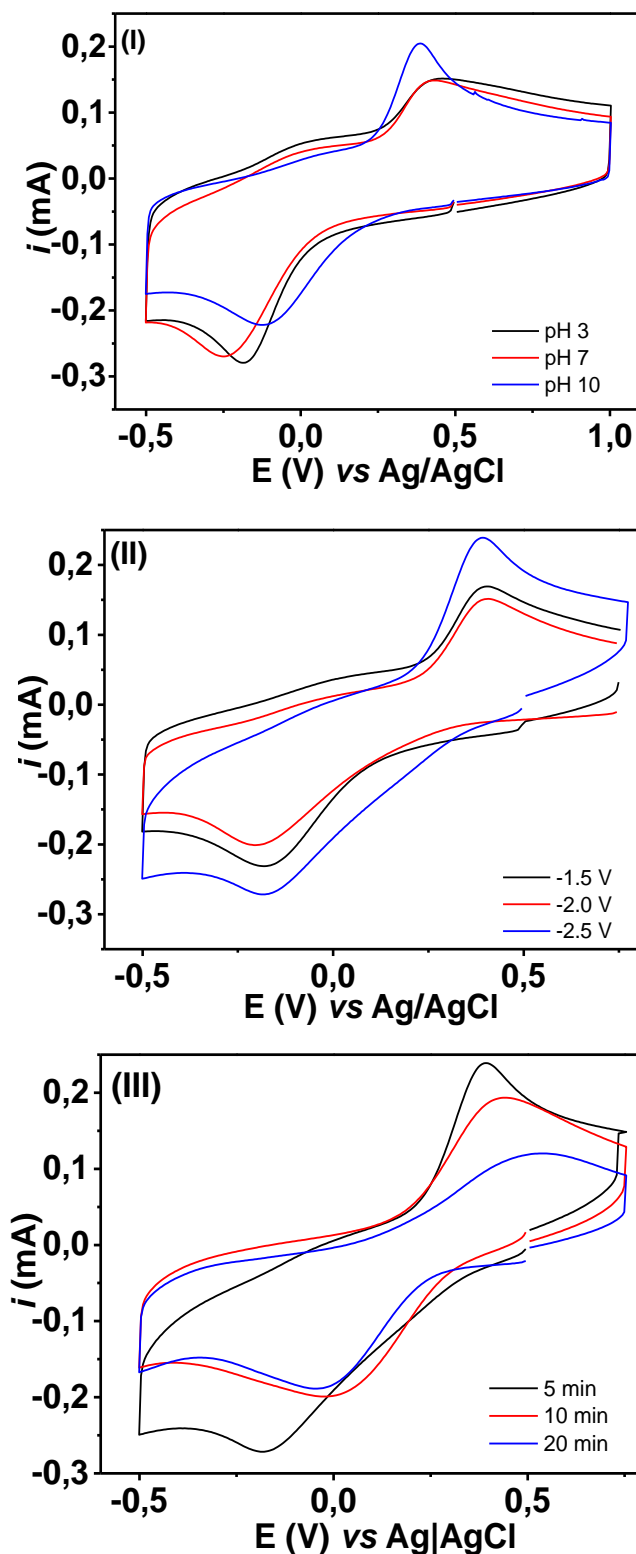
$$C_{SC}^{-2} = \left( \frac{2}{\epsilon \epsilon_0 e N_D} \right) \left( U - U_{fb} - \frac{kT}{e} \right) \quad \text{(Equação 9),}$$

onde  $C_{sc}$  representa a capacitância diferencial da camada de carga espacial,  $e$  é a carga elétrica elementar ( $1,6 \times 10^{-19}$  C);  $\epsilon_0$  é a permissividade no vácuo

( $8,86 \times 10^{-12} \text{ F m}^{-1}$ );  $\epsilon$  é a constante dielétrica (48 para anatase);  $U$  é o potencial de polarização aplicado;  $U_{fb}$  é o potencial de banda plana;  $k$  é a constante de Boltzmann;  $T$  é a temperatura e  $A$  é a área superficial. A área superficial foi calculada assumindo uma estrutura nanotubular idealizada, como demonstrado anteriormente [177]. Assim,  $N_D$  pode ser calculado a partir do coeficiente angular da relação entre  $C^{-2}$  vs  $U$ . O valor de  $N_D$  para os eletrodos de  $\text{TiO}_2\text{NT}$  e  $\text{P-TiO}_2\text{NT}$  foram  $9,24 \times 10^{18}$  e  $6,28 \times 10^{21} \text{ cm}^{-3}$ , respectivamente, mostrando que o eletrodo polarizado tem uma densidade de portadores de carga muito maior e melhoras nas propriedades de transferência de carga como resultado do processo de auto-dopagem, o que está de acordo com os dados do EIE.

#### 4.4.2. Otimização das condições para polarização catódica

A fim de encontrar as melhores condições para a polarização catódica, os parâmetros como pH do eletrólito (3, 7 e 10), potencial aplicado ( $-1,5 \text{ V}$ ,  $-2,0 \text{ V}$  e  $-2,5 \text{ V vs Ag|AgCl } 3 \text{ mol L}^{-1}$ ) e tempo de polarização (5, 10 e 20 min) foram otimizados objetivando melhorar o sinal analítico. Os respectivos voltamogramas são mostrados na Figura 37. As melhores condições, levando em consideração a  $i_{pa}$ , foram encontradas em pH 10, aplicando-se potencial de polarização de  $-2,5 \text{ V}$  por 5 min. A reação de intercalação é mais lenta em eletrólitos alcalinos, o que permite um controle mais preciso da sequência de reação [135]. Em potenciais mais negativos, a expansão mais forte da malha de  $\text{TiO}_2$  ocorre devido à intercalação de  $\text{H}^+$  e a evolução de  $\text{H}_2$ , o que pode, por sua vez, levar a uma maior extensão da formação de vacâncias de oxigênio nos  $\text{P-TiO}_2\text{NTs}$ . Desta forma, sob a polarização catódica ocorre uma provável clivagem das ligações  $\text{Ti-O}$  para formar vacâncias de oxigênio, ou até mesmo, levar à destruição dos nanotubos [129]. Deste modo, os nossos resultados mostram que é possível obter uma resposta anódica inexplorada para os eletrodos de  $\text{TiO}_2\text{NT}$  sem a necessidade de modificações externas, tais como recobrimento por polímeros, grafeno ou dopagem com íons metálicos [132,178,134,179,133]. A aplicação de uma simples polarização catódica se mostrou suficiente para garantir a condutividade do eletrodo de  $\text{TiO}_2\text{NT}$  e resposta anódica e, assim, criar uma nova plataforma a ser utilizada como sensor com grande potencialidade em eletroanalítica.

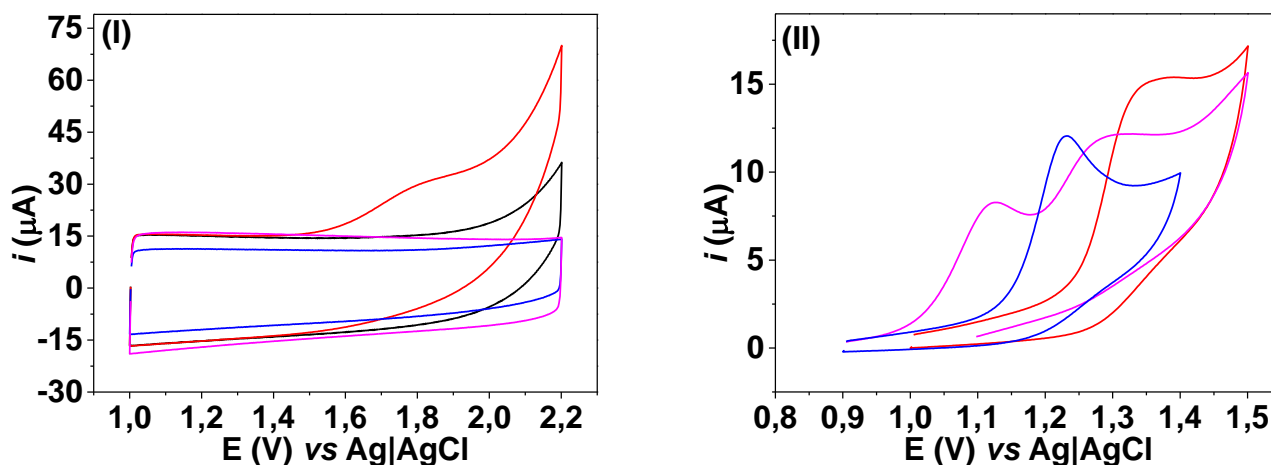


**Figura 37** – Voltamogramas cíclicos para solução de  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$  5 mmol L<sup>-1</sup> em solução de KCl 0,1 mol L<sup>-1</sup>, após polarização catódica em solução  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0,1 mol L<sup>-1</sup> nas seguintes condições de polarização: efeito do pH do eletrólito, aplicando -1,5 V por 5 min (I); efeito do potencial de polarização aplicado, em pH 10 (otimizado) por 5 min (II); efeito do tempo de polarização, em pH 10 (otimizado) aplicando potencial de -2,5 V (otimizado) (III).



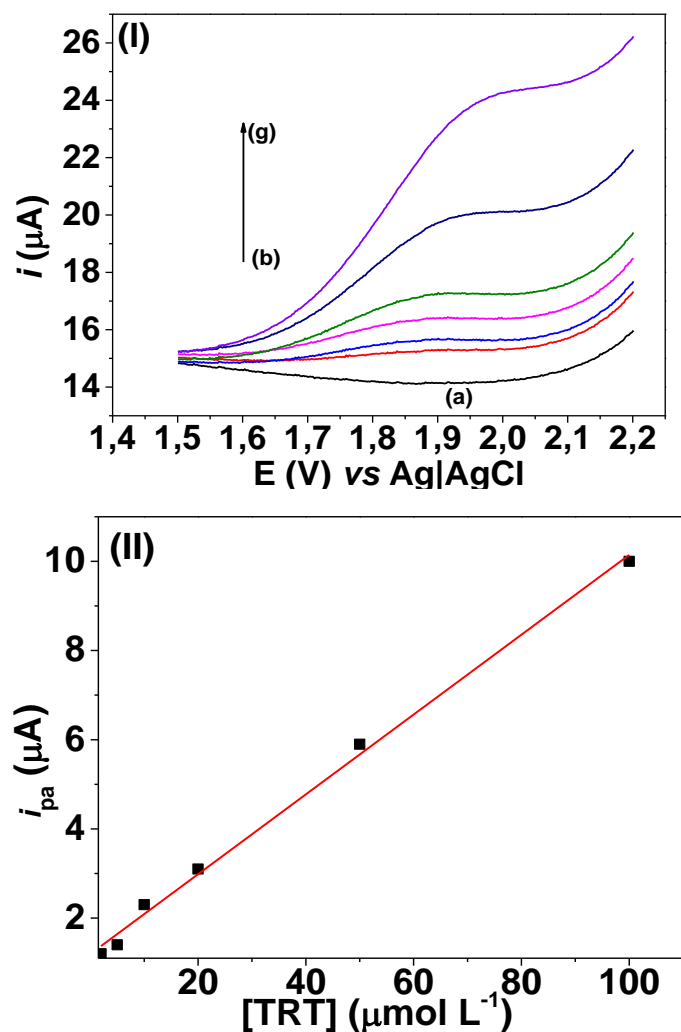
#### 4.4.3. Aplicação do eletrodo P-TiO<sub>2</sub>NT para a determinação de TRT

Visto que o sensor apresentou resposta na região anódica, o P-TiO<sub>2</sub>NT foi aplicado para a oxidação dos diuréticos furosemida (FUR), TRT e HCT. Como mostrado na Figura 38.I, na região estudada, o sensor apresentou resposta apenas para a molécula de TRT (-). Não se obteve resposta voltamétrica para FUR (-) e HCT (-), embora ambos apresentem picos de oxidação em eletrodo de carbono vítreo (Fig. 38.II). Isto mostra que a oxidação do analito requer que os níveis de energia dos estados Ti<sup>3+</sup> dopantes do material estejam alinhados com o estado HOMO (do inglês “highest occupied molecular orbital”) da molécula do TRT. Isto mostra que o material eletródico poderia ser interessante para a determinação de TRT frente a outros diuréticos, conferindo, ao mesmo, maior seletividade.



**Figura 38** – Voltamogramas cíclicos em 0,1 mol L<sup>-1</sup> de solução tampão B-R (pH 2,0) (-) para 100  $\mu\text{mol L}^{-1}$  de TRT (-), FUR (-) e HCT (-) utilizando P-TiO<sub>2</sub>NT (I). Voltamogramas cíclicos em 0,1 mol L<sup>-1</sup> de solução tampão B-R (pH 2,0) (-) para 200  $\mu\text{mol L}^{-1}$  de TRT (-), FUR (-) e HCT (-) utilizando ECV (II).

Considerando que o sensor baseado em P-TiO<sub>2</sub>NT pode ser utilizado para monitorar a oxidação do diurético TRT, uma curva analítica foi construída em solução tampão B-R 0,1 mol L<sup>-1</sup> (pH 2,0), como mostrado na Figura 39.I. Uma relação linear foi encontrada no intervalo de concentração entre 2 a 100  $\mu\text{mol L}^{-1}$  (Figura 39.II), gerando a equação  $i_{pa} = 0,0895[\text{TRT}] + 1,19 \times 10^{-6}$  ( $R^2 = 0,995$ ), com L.D. e L.Q. de  $5,40 \times 10^{-7}$  e  $1,80 \times 10^{-6}$  mo L<sup>-1</sup>, respectivamente.



**Figura 39** – Voltamogramas de varredura linear em solução tampão B–R 0,1 mol L<sup>-1</sup> (pH 2,0) (a) variando a concentração de TRT em 2,00 (b), 5,00 (c), 10,0 (d), 20,0 (e), 50,0 (f) e 100 mol L<sup>-1</sup> (g) (I). Relação entre *i*<sub>pa</sub> vs concentração de TRT (II).

#### 4.4.4. Conclusões parciais

A modificação eletroquímica do eletrodo de TiO<sub>2</sub>NT conferiu ao eletrodo um caráter quase metálico, permitindo sua aplicabilidade em regiões anódicas sem a necessidade de fotoativação. A partir desse processo, o eletrodo P-TiO<sub>2</sub>NT apresentou melhorias em suas propriedades condutivas em comparação ao TiO<sub>2</sub>NT. Após otimização dos parâmetros utilizados para a modificação eletroquímica do eletrodo, o P-TiO<sub>2</sub>NT foi aplicado para a oxidação eletroquímica do diurético TRT, o que permitiu encontrar uma ampla faixa linear e baixo valor para o L.D. Assim, a partir de um simples processo de redução

eletroquímico, foi possível a aplicabilidade de um semicondutor do tipo-n em regiões anódicas sem a necessidade de fotoativação ou qualquer outra modificação química de sua superfície.

## 5. CONCLUSÃO

Os resultados mostraram que 4 sensores eletroanalíticos foram construídos usando diferentes modificadores ou materiais eletródicos e permitiram a determinação de diuréticos em níveis compatíveis ao requerido em medidas forenses.

Os sensores eletrodo compósito modificado por partículas magnéticas funcionalizadas, eletrodo de carbono vítreo modificado com óxido de grafeno reduzido e eletrodo de carbono vítreo modificado com nanotubos de carbono se mostraram eficazes para a determinação de TRT, BMT e HCT e TRT simultaneamente, respectivamente, em amostra de urina sem a necessidade da etapa do preparo de amostra. Além disso, os níveis de detecção para todos os métodos utilizando os eletrodos modificados supracitados foram inferiores ao requerido pela WADA.

Além destes sensores, uma nova plataforma eletródica foi proposta, a partir de um eletrodo de nanotubos de  $\text{TiO}_2$  modificado pela aplicação de um potencial catódico por um tempo controlado. Este procedimento promove a ativação deste material sem a necessidade de irradiação na região UV como requerido em medidas de  $\text{TiO}_2$ . O eletrodo de P- $\text{TiO}_2$ NT foi aplicado para a oxidação de FUR, HCT e TRT, mostrando-se seletivo apenas para o TRT. Uma curva de calibração foi construída para o TRT, mostrando que o eletrodo P- $\text{TiO}_2$ NT tem grande potencial para sensor eletroanalítico.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] Prohibited Substances | List of Prohibited Substances and Methods, (n.d.). <http://list.wada-ama.org/prohibited-all-times/prohibited-substances/> (accessed March 9, 2016).
- [2] PROHIBITED LIST, (2019). [http://portaladmin.ihf.info/files/Uploads/NewsAttachments/0\\_wada\\_2019\\_english\\_prohibited\\_list.pdf](http://portaladmin.ihf.info/files/Uploads/NewsAttachments/0_wada_2019_english_prohibited_list.pdf) (accessed January 31, 2019).
- [3] K.C.. Ornelas, G.M.R.D.. Lucena, A QUÍMICA FORENSE NA DETECÇÃO DO DOPING: UMA REVISÃO SOBRE AS SUBSTÂNCIAS DE USO PROIBIDO E MÉTODOS PARA DETECÇÃO, (n.d.). <http://www.cpgls.ucg.br/7mostra/Artigos/SAUDE E BIOLOGICAS/QU%25C3%258DMICA FORENSE NA DETEC%25C3%2587%25C3%2583O DO DOPING.pdf> (accessed October 20, 2014).
- [4] G.G. Artioli, R.D.C. Hirata, A.H.L. Junior, A.H. Lancha Junior, Terapia gênica, doping genético e esporte:fundamentação e implicações para o futuro, *Rev. Bras. Med. Do Esporte.* 13 (2007) 349–354. doi:10.1590/S1517-86922007000500013.
- [5] F.I. de M. Sportive, Doping nos esportes, *Rev. Bras. Med. Do Esporte.* 4 (1998) 28. doi:10.1590/S1517-86921998000100008.
- [6] O. Tavares, Doping: argumentos em discussão, *Movimento.* 8 (2002) 41–55.
- [7] M.G. Feder, J.N. Cardoso, M.A.S. Marques, E.H. De Rose, Informações sobre o uso de medicamentos no esporte, *Rev. Bras. Med. Do Esporte.* 6 (2000) 125–130. doi:10.1590/S1517-86922000000400004.
- [8] K. Deventer, G. Baele, P. Van Eenoo, O.J.J. Pozo, F.T.T. Delbeke, P. Van Eenoo, O.J.J. Pozo, F.T.T. Delbeke, Stability of selected chlorinated thiazide diuretics, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 49 (2009) 519–524. doi:10.1016/j.jpba.2008.11.001.
- [9] K. Deventer, O.J. Pozo, P. Van Eenoo, F.T. Delbeke, P. Van Eenoo, F.T. Delbeke, Qualitative detection of diuretics and acidic metabolites of other doping agents in human urine by high-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry: Comparison between liquid–liquid extraction and direct injection, *J. Chromatogr. A.* 1216 (2009)

- 5819–5827. doi:10.1016/j.chroma.2009.06.003.
- [10] C. Goebel, G.J. Trout, R. Kazlauskas, Rapid screening method for diuretics in doping control using automated solid phase extraction and liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry, *Anal. Chim. Acta.* 502 (2004) 65–74. doi:10.1016/j.aca.2003.09.062.
- [11] K. Deventer, O.J.J. Pozo, P. Van Eenoo, F.T.T. Delbeke, P. Van Eenoo, F.T.T. Delbeke, Detection of urinary markers for thiazide diuretics after oral administration of hydrochlorothiazide and altizide-relevance to doping control analysis, *J. Chromatogr. A.* 1216 (2009) 2466–2473. doi:10.1016/j.chroma.2009.01.032.
- [12] F.R. de A. Neto, O papel do atleta na sociedade e o controle de dopagem no esporte, *Rev. Bras. Med. Do Esporte.* 7 (2001) 138–148.
- [13] J. V. Shah, P.A. Shah, P. V. Shah, M. Sanyal, P.S. Shrivastav, Fast and sensitive LC–MS/MS method for the simultaneous determination of lisinopril and hydrochlorothiazide in human plasma, *J. Pharm. Anal.* 7 (2017) 163–169. doi:10.1016/J.JPHA.2016.11.004.
- [14] D.S. Patel, N. Sharma, M.C. Patel, B.N. Patel, P.S. Shrivastav, M. Sanyal, Application of a rapid and sensitive liquid chromatography–tandem mass spectrometry method for determination of bumetanide in human plasma for a bioequivalence study, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 66 (2012) 365–370. doi:10.1016/j.jpba.2012.03.018.
- [15] A.P.P. Eisele, G.R. Mansano, F.M. de Oliveira, J. Casarin, C.R.T. Tarley, E.R. Sartori, Simultaneous determination of hydrochlorothiazide and valsartan in combined dosage forms: Electroanalytical performance of cathodically pretreated boron-doped diamond electrode, *J. Electroanal. Chem.* 732 (2014) 46–52. doi:10.1016/J.JELECHEM.2014.08.033.
- [16] F.F. Hudari, J.C. Souza, M.V.B. Zanoni, Adsorptive stripping voltammetry for simultaneous determination of hydrochlorothiazide and triamterene in hemodialysis samples using a multi-walled carbon nanotube-modified glassy carbon electrode, *Talanta.* 179 (2018) 652–657. doi:10.1016/J.TALANTA.2017.11.071.
- [17] G.A. Ibañez, G.M. Escandar, A.E. Mansilla, A.M. de la Peña, Determination of triamterene in pharmaceutical formulations and of triamterene and its main metabolite hydroxytriamterene sulfate in urine

- using solid-phase and aqueous solution luminescence, *Anal. Chim. Acta.* 538 (2005) 77–84. doi:10.1016/J.ACA.2005.02.001.
- [18] C.-B. Gong, Y.-B. Wei, L.-T. Liu, A.-X. Zheng, Y.-H. Yang, C. Chow, Q. Tang, Photoresponsive hollow molecularly imprinted polymer for trace triamterene in biological samples, *Mater. Sci. Eng. C.* 76 (2017) 568–578. doi:10.1016/J.MSEC.2017.03.135.
- [19] H. Heli, J. Pishahang, H.B. Amiri, N. Sattarahmady, Synthesis of nickel nanowrinkles and its application for the electrocatalytic oxidation and sensitive detection of hydrochlorothiazide, *Microchem. J.* 130 (2017) 205–212. doi:10.1016/J.MICROC.2016.09.005.
- [20] B. Otašević, J. Šljivić, A. Protić, N. Maljurić, A. Malenović, M. Zečević, Comparison of AQbD and grid point search methodology in the development of micellar HPLC method for the analysis of cilazapril and hydrochlorothiazide dosage form stability, *Microchem. J.* 145 (2019) 655–663. doi:10.1016/J.MICROC.2018.11.033.
- [21] M.L. Luis, J.M.G. Fraga, A.I. Jiménez, F. Jiménez, O. Hernández, J.J. Arias, Application of PLS regression to fluorimetric data for the determination of furosemide and triamterene in pharmaceutical preparations and triamterene in urine, *Talanta.* 62 (2004) 307–316. doi:10.1016/J.TALANTA.2003.07.010.
- [22] J. Vojta, A. Jedlička, P. Coufal, L. Janečková, A new, rapid, stability-indicating UPLC method for separation and determination of impurities in amlodipine besylate, valsartan and hydrochlorothiazide in their combined tablet dosage form, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 109 (2015) 36–44. doi:10.1016/J.JPBA.2015.01.059.
- [23] I.D. Merás, A.E. Mansilla, F.S. López, M.J.R. Gómez, Determination of triamterene and leucovorin in biological fluids by UV derivative-spectrophotometry and partial least-squares (PLS-1) calibration, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 27 (2002) 81–90.
- [24] M.C.G. Santos, C.R.T. Tarley, L.H. Dall'Antonia, E.R. Sartori, Evaluation of boron-doped diamond electrode for simultaneous voltammetric determination of hydrochlorothiazide and losartan in pharmaceutical formulations, *Sensors Actuators B Chem.* 188 (2013) 263–270.
- [25] A.B. Tabrizia, S. Naini, K. Parnian, S. Mohammadi, F.E. zad, S.P.

- Anvarian, A. Abdollahi, Determination of triamterene in human plasma and urine after its cloud point extraction, *Quim. Nova.* 37 (2014) 1182–1187.
- [26] A. Nezhadali, M. Mojarrab, Fabrication of an electrochemical molecularly imprinted polymer triamterene sensor based on multivariate optimization using multi-walled carbon nanotubes, *J. Electroanal. Chem.* 744 (2015) 85–94.
- [27] A.J. BARD, L.R. FAULKNER, POTENTIAL SWEEP METHODS, in: N.Y.J. Wiley (Ed.), *Electrochem. Methods Fundam. Appl.*, 2<sup>a</sup> ed., 2001: pp. 226–260.
- [28] P. Deng, Z. Xu, J. Li, Simultaneous determination of ascorbic acid and rutin in pharmaceutical preparations with electrochemical method based on multi-walled carbon nanotubes–chitosan composite film modified electrode, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 76 (2013) 234–242. doi:10.1016/j.jpba.2012.12.032.
- [29] V.K. Gupta, R. Jain, K. Radhapyari, N. Jadon, S. Agarwal, Voltammetric techniques for the assay of pharmaceuticals—A review, *Anal. Biochem.* 408 (2011) 179–196. doi:10.1016/J.AB.2010.09.027.
- [30] Skoog, West, Holler, Crouch, *Voltametria*, in: *Fundam. Da Química Analítica*, n.d.
- [31] S.D. Minteer, *Advances in Electroanalytical Chemistry*, *J. Am. Chem. Soc.* 140 (2018) 2701–2703. doi:10.1021/jacs.8b00986.
- [32] F.F. Hudari, B.F. da Silva, M.I. Pividori, M.V.B. Zanoni, Voltammetric sensor based on magnetic particles modified composite electrode for determination of triamterene in biological sample, *J. Solid State Electrochem.* 20 (2016) 2491–2501. doi:10.1007/s10008-015-3078-2.
- [33] F.F. Hudari, M.V.B. Zanoni, A glassy carbon electrode modified with reduced graphene oxide for sensitive determination of bumetanide in urine at levels required for doping analysis, *Microchim. Acta.* 184 (2017). doi:10.1007/s00604-017-2443-5.
- [34] Y.-M. Li, X.-T. Chen, J. Li, H.-H. Liu, Direct voltammetry and catalysis of hemoenzymes in methyl cellulose film, *Electrochim. Acta.* 49 (2004) 3195–3200. doi:10.1016/J.ELECTACTA.2004.02.033.
- [35] L.J. Núñez-Vergara, D. Farias, S. Bollo, J.. Squella, An electrochemical



- evidence of free radicals formation from flutamide and its reactivity with endo/xenobiotics of pharmacological relevance, *Bioelectrochemistry*. 53 (2001) 103–110. doi:10.1016/S0302-4598(00)00126-4.
- [36] V.K. Gupta, A.K. Singh, B. Gupta, A cerium(III) selective polyvinyl chloride membrane sensor based on a Schiff base complex of N,N'-bis[2-(salicylideneamino)ethyl]ethane-1,2-diamine, *Anal. Chim. Acta*. 575 (2006) 198–204. doi:10.1016/J.ACA.2006.05.090.
- [37] G. Macchi, The determination of ionic zinc in sea-water by anodic stripping voltammetry using ordinary capillary electrodes, *J. Electroanal. Chem.* 9 (1965) 290–298. doi:10.1016/0022-0728(65)80028-6.
- [38] G. Angulo, A. Kapturkiewicz, A. Palmaerts, L. Lutsen, T.J. Cleij, D. Vanderzande, Cyclic voltammetry studies of n-type polymers with non-alternant fluoranthene units, *Electrochim. Acta*. 54 (2009) 1584–1588. doi:10.1016/J.ELECTACTA.2008.09.045.
- [39] F.F. Hudari, E.H. Duarte, A.C. Pereira, L.H. Dall'Antonia, L.T. Kubota, C.R.T. Tarley, Voltammetric method optimized by multi-response assays for the simultaneous measurements of uric acid and acetaminophen in urine in the presence of surfactant using MWCNT paste electrode, *J. Electroanal. Chem.* 696 (2013). doi:10.1016/j.jelechem.2013.01.033.
- [40] S. Cheraghi, M. A. Taher, M. Bijad, H. Sadeghifar, A Review: Stripping Voltammetric Methods as a High Sensitive Strategy for Trace Analysis of Ions, Pharmaceutical and Food Samples, *Curr. Anal. Chem.* 13 (2017) 5–12.  
<https://www.ingentaconnect.com/contentone/ben/cac/2017/00000013/00000001/art00005#> (accessed February 1, 2019).
- [41] F.F. Hudari, L.C. de Almeida, B.F. da Silva, M.V.B. Zanoni, Voltammetric sensor for simultaneous determination of p-phenylenediamine and resorcinol in permanent hair dyeing and tap water by composite carbon nanotubes/chitosan modified electrode, *Microchem. J.* 116 (2014) 261–268. doi:10.1016/j.microc.2014.05.007.
- [42] F.F. Hudari, S.L. Costa Ferreira, M.V.B. Zanoni, Multi-responses Methodology Applied in the Electroanalytical Determination of Hair Dye by Using Printed Carbon Electrode Modified with Graphene, *Electroanalysis*. 28 (2016). doi:10.1002/elan.201501043.

- [43] Ryan R. Moore, Craig E. Banks, R.G. Compton, Basal Plane Pyrolytic Graphite Modified Electrodes: Comparison of Carbon Nanotubes and Graphite Powder as Electrocatalysts, *J. Electroanal. Chem.* 76 (2004) 2677–2682. doi:10.1021/AC040017Q.
- [44] G.T. Corrêa, A.A. Tanaka, M.I. Pividori, M.V.B. Zanoni, Use of a composite electrode modified with magnetic particles for electroanalysis of azo dye removed from dyed hair strands, *J. Electroanal. Chem.* 782 (2016) 26–31. doi:10.1016/J.JELECHEM.2016.09.044.
- [45] A.H.A. Hassan, L. Sappia, S.L. Moura, F.H.M. Ali, W.A. Moselhy, M. del P.T. Sotomayor, M.I. Pividori, Biomimetic magnetic sensor for electrochemical determination of scombrotoxin in fish, *Talanta*. 194 (2019) 997–1004. doi:10.1016/J.TALANTA.2018.10.066.
- [46] I.A. Mattioli, M. Baccarin, P. Cervini, É.T.G. Cavaleiro, Electrochemical investigation of a graphite-polyurethane composite electrode modified with electrodeposited gold nanoparticles in the voltammetric determination of tryptophan, *J. Electroanal. Chem.* 835 (2019) 212–219. doi:10.1016/J.JELECHEM.2018.12.056.
- [47] S. Tarahomi, G.H. Rounaghi, M.H.A. Zavar, L. Daneshvar, Electrochemical Sensor Based on TiO<sub>2</sub> Nanoparticles/Nafion Biocompatible Film Modified Glassy Carbon Electrode for Carbamazepine Determination in Pharmaceutical and Urine Samples, *J. Electrochem. Soc.* 165 (2018) B946–B952. doi:10.1149/2.1061816jes.
- [48] H. Thakur, N. Kaur, P. Sabherwal, D. Sareen, N. Prabhakar, Aptamer based voltammetric biosensor for the detection of Mycobacterium tuberculosis antigen MPT64, *Microchim. Acta*. 184 (2017) 1915–1922. doi:10.1007/s00604-017-2174-7.
- [49] D.E. Mays, A. Hussam, Voltammetric methods for determination and speciation of inorganic arsenic in the environment—A review, *Anal. Chim. Acta*. 646 (2009) 6–16. doi:10.1016/J.ACA.2009.05.006.
- [50] F.F. Hudari, M.V.B. Zanoni, A glassy carbon electrode modified with reduced graphene oxide for sensitive determination of bumetanide in urine at levels required for doping analysis, *Microchim. Acta*. 184 (2017) 4117–4124. doi:10.1007/s00604-017-2443-5.
- [51] H.S. El-Desoky, E.M. Ghoneim, M.M. Ghoneim, Voltammetric behavior

- and assay of the antibiotic drug cefazolin sodium in bulk form and pharmaceutical formulation at a mercury electrode, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 39 (2005) 1051–1056. doi:10.1016/J.JPBA.2005.05.020.
- [52] T. Wahdan, N.A. El-Ghany, “Determination of domperidone in tablet dosage form by anodic differential pulse voltammetry,” *Farm.* 60 (2005) 830–833. doi:10.1016/J.FARMAC.2005.07.001.
- [53] A. Wong, T. Silva, F. Caetano, M. Bergamini, L. Marcolino-Junior, O. Fatibello-Filho, B. Janegitz, A. Wong, T.A. Silva, F.R. Caetano, M.F. Bergamini, L.H. Marcolino-Junior, O. Fatibello-Filho, B.C. Janegitz, An Overview of Pesticide Monitoring at Environmental Samples Using Carbon Nanotubes-Based Electrochemical Sensors, *C.* 3 (2017) 8. doi:10.3390/c3010008.
- [54] X. Wang, N. Yang, Q. Wan, Cyclic voltammetric response of nicotinic acid and nicotinamide on a polycrystalline gold electrode, *Electrochim. Acta.* 52 (2006) 361–368. doi:10.1016/J.ELECTACTA.2006.05.014.
- [55] S.A. Ozkan, B. Dogan, B. Uslu, Voltammetric Analysis of the Novel Atypical Antipsychotic Drug Quetiapine in Human Serum and Urine, *Microchim. Acta.* 153 (2006) 27–35. doi:10.1007/s00604-005-0457-x.
- [56] G.K. Ziyatdinova, G.K. Budnikov, V.I. Pogorel'tsev, Determination of captopril in pharmaceutical forms by stripping voltammetry, *J. Anal. Chem.* 61 (2006) 798–800. doi:10.1134/S1061934806080144.
- [57] D.P. Santos, M.F. Bergamini, V.A.F.F.M. Santos, M. Furlan, M.V.B. Zanoni, Preconcentration of Rutin at a Poly Glutamic Acid Modified Electrode and its Determination by Square Wave Voltammetry, *Anal. Lett.* 40 (2007) 3430–3442. doi:10.1080/00032710701689107.
- [58] A. Abbaspour, R. Mirzajani, Electrochemical monitoring of piroxicam in different pharmaceutical forms with multi-walled carbon nanotubes paste electrode, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 44 (2007) 41–48. doi:10.1016/J.JPBA.2007.01.027.
- [59] A. Levent, A. Altun, Y. Yardım, Z. Şentürk, Sensitive voltammetric determination of testosterone in pharmaceuticals and human urine using a glassy carbon electrode in the presence of cationic surfactant, *Electrochim. Acta.* 128 (2014) 54–60.
- [60] R.N. Goyal, V.K. Gupta, S. Chatterjee, Voltammetric biosensors for the

- determination of paracetamol at carbon nanotube modified pyrolytic graphite electrode, *Sensors Actuators B Chem.* 149 (2010) 252–258. doi:10.1016/J.SNB.2010.05.019.
- [61] E. Türköz, A. Nur Onar, Determination of Ticlopidine in Pharmaceutical Products, *Anal. Lett.* 40 (2007) 2231–2240. doi:10.1080/00032710701566651.
- [62] R. Jain, N. Jadon, K. Radhapyari, Determination of antihelminthic drug pyrantel pamoate in bulk and pharmaceutical formulations using electro-analytical methods, *Talanta.* 70 (2006) 383–386. doi:10.1016/J.TALANTA.2006.02.061.
- [63] G.. El-Hefnawey, I.. El-Hallag, E.. Ghoneim, M.. Ghoneim, Voltammetric behavior and quantification of the sedative-hypnotic drug chlordiazepoxide in bulk form, pharmaceutical formulation and human serum at a mercury electrode, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 34 (2004) 75–86. doi:10.1016/J.JAPNA.2003.08.008.
- [64] B. Uslu, S. Yilmaz, S.A. Ozkan, Determination of olsalazine sodium in pharmaceuticals by differential pulse voltammetry., *Pharmazie.* 56 (2001) 629–632. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11534339> (accessed February 1, 2019).
- [65] H.P.A. Nouws, C. Delerue-Matos, A.A. Barros, Electrochemical Determination of Citalopram by Adsorptive Stripping Voltammetry– Determination in Pharmaceutical Products, *Anal. Lett.* 39 (2006) 1907–1915. doi:10.1080/00032710600721712.
- [66] Ş. Demircan, S. Kır, S.A. Ozkan, Electroanalytical Characterization of Verapamil and its Voltammetric Determination in Pharmaceuticals and Human Serum, *Anal. Lett.* 40 (2007) 1177–1195. doi:10.1080/00032710701298453.
- [67] B. Uslu, S.A. Özkan, Electroanalytical characteristics of piribedil and its differential pulse and square wave voltammetric determination in pharmaceuticals and human serum, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 31 (2003) 481–489. doi:10.1016/S0731-7085(02)00725-2.
- [68] E.M. Hassan, E.F. Khamis, E.I. El-Kimary, M.A. Barary, Development of a differential pulse voltammetric method for the determination of Silymarin/Vitamin E acetate mixture in pharmaceuticals, *Talanta.* 74

- (2008) 773–778. doi:10.1016/J.TALANTA.2007.07.006.
- [69] R. Jain, K. Radhapyari, N. Jadon, Adsorptive stripping voltammetric behavior and determination of anticholinergic agent oxybutynin chloride on a mercury electrode, *J. Colloid Interface Sci.* 314 (2007) 572–577. doi:10.1016/J.JCIS.2007.06.007.
- [70] G. Altiokka, Voltammetric determination of doxazosin in tablets using rotating platinum electrode, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 25 (2001) 387–391. doi:10.1016/S0731-7085(00)00515-X.
- [71] M. Abasq, P. Courtel, G. Burgot, Determination of Entacapone by Differential Pulse Polarography in Pharmaceutical Formulation, *Anal. Lett.* 41 (2008) 56–65. doi:10.1080/00032710701746774.
- [72] M.. Ghoneim, M.. Mabrouk, A.. Hassanein, A. Tawfik, Polarographic behaviour of loratadine and its direct determination in pharmaceutical formulation and human plasma by cathodic adsorptive stripping voltammetry, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 25 (2001) 933–939. doi:10.1016/S0731-7085(01)00384-3.
- [73] N. Karikalan, R. Karthik, S.-M. Chen, H.-A. Chen, A voltammetric determination of caffeic acid in red wines based on the nitrogen doped carbon modified glassy carbon electrode, *Sci. Rep.* 7 (2017) 45924. doi:10.1038/srep45924.
- [74] A.C. Silva, A.S. Lourenço, M.C.U. de Araujo, Simultaneous voltammetric determination of four organic acids in fruit juices using multiway calibration, *Food Chem.* 266 (2018) 232–239. doi:10.1016/J.FOODCHEM.2018.06.005.
- [75] M. Kowalcze, M. Jakubowska, Voltammetric determination of carvacrol on Boron Doped Diamond Electrode, *Anal. Chim. Acta.* 1045 (2019) 98–107. doi:10.1016/J.ACA.2018.08.061.
- [76] S. IJIMA, Helical microtubules of graphitic carbon, *Nature.* 354 (1991) 56–58.
- [77] I. MAZOV, V.L. KUZNETSOV, I.A. SIMONOVA, A.I. STADINICHENKO, A. V ISHCHEENKO, Oxidation behavior of multiwall carbon nanotubes with different diameters and morphology, *Appl. Surf. Sci.* 258 (2012) 6272–6280.
- [78] A.G.S. FILHO, S.B. FAGAN, FUNCIONALIZAÇÃO DE NANOTUBOS DE

- CARBONO, *Quim. Nova.* 30 (2007) 1695–1703.
- [79] A. BABAEI, A.R. TAHERI, M. AFRASIABI, A Multi-Walled Carbon Nanotube-Modified Glassy Carbon Electrode as a New Sensor for the Sensitive Simultaneous Determination of Paracetamol and Tramadol in Pharmaceutical Preparations and Biological Fluids, *J. Braz. Chem. Soc.* 22 (2011) 1549–1558.
- [80] S. Shahrokhian, M. Hafezi-Kahnamouei, Glassy carbon electrode modified with a nanocomposite of multi-walled carbon nanotube decorated with Ag nanoparticles for electrochemical investigation of Isoxsuprine, *J. Electroanal. Chem.* 825 (2018) 30–39.  
doi:10.1016/J.JELECHEM.2018.08.010.
- [81] A. BABAEI, D.J. GARRETT, A.J. DOWNARD, Selective Simultaneous Determination of Paracetamol and Uric Acid Using a Glassy Carbon Electrode Modified with Multiwalled Carbon Nanotube/Chitosan Composite, *Electroanalysis.* 23 (2011) 417 – 423.
- [82] S. GUO, X. WU, J. ZHOU, J. WANG, B. YANG, B. YE, MWNT/Nafion composite modified glassy carbon electrode as the voltammetric sensor for sensitive determination of 8-hydroxyquinoline in cosmetic, *J. Electroanal. Chem.* 655 (2011) 45–49.
- [83] E.H. DUARTE, L.T. KUBOTA, C.R.T. TARLEY, Carbon Nanotube Based Sensor for Simultaneous Determination of Acetaminophen and Ascorbic Acid Exploiting Multiple Response Optimization and Measures in the Presence of Surfactant, *Electroanalysis.* 24 (2012) 2291 – 2301.
- [84] A. Yari, A. Shams, Silver-filled MWCNT nanocomposite as a sensing element for voltammetric determination of sulfamethoxazole, *Anal. Chim. Acta.* 1039 (2018) 51–58. doi:10.1016/J.ACA.2018.07.061.
- [85] Y. Liu, YuLiu, X. Dong, P. Chen, Biological and chemical sensors based on graphene materials, *Chem. Soc. Rev.* 41 (2012) 2283–2307.  
doi:10.1039/C1CS15270J.
- [86] Y. Xu, H. Gao, M. Li, Z. Guo, H. Chen, Z. Jin, B. Yu, Electronic transport in monolayer graphene with extreme physical deformation: ab initio density functional calculation., *Nanotechnology.* 22 (2011) 365202.  
doi:10.1088/0957-4484/22/36/365202.
- [87] K. Kosowska, P. Domalik-Pyzik, M. Nocuń, J. Chłopek, Chitosan and

- graphene oxide/reduced graphene oxide hybrid nanocomposites – Evaluation of physicochemical properties, *Mater. Chem. Phys.* 216 (2018) 28–36. doi:10.1016/J.MATCHEMPHYS.2018.05.076.
- [88] O.O. Voitsihovska, R.M. Rudenko, V.Y. Povarchuk, A.A. Abakumov, I.B. Bychko, M.O. Stetsenko, M.P. Rudenko, The effect of electron irradiation on the electrical properties of reduced graphene oxide paper, *Mater. Lett.* 236 (2019) 334–336. doi:10.1016/J.MATLET.2018.10.119.
- [89] S. He, P. He, X. Zhang, X. Zhang, K. Liu, L. Jia, F. Dong, Poly(glycine)/graphene oxide modified glassy carbon electrode: Preparation, characterization and simultaneous electrochemical determination of dopamine, uric acid, guanine and adenine, *Anal. Chim. Acta.* 1031 (2018) 75–82. doi:10.1016/J.ACA.2018.06.020.
- [90] G.S. Shyam Sunder, A. Rohanifar, A.M. Devasurendra, J.R. Kirchhoff, Selective determination of L-DOPA at a graphene oxide/yttrium oxide modified glassy carbon electrode, *Electrochim. Acta.* (2019). doi:10.1016/J.ELECTACTA.2019.01.098.
- [91] S. Eissa, C. TLILI, L. L'HOCINE, M. ZOUROB, Electrochemical immunosensor for the milk allergen  $\beta$ -lactoglobulin based on electrografting of organic film on graphene modified screen-printed carbon electrodes, *Biosens. Bioelectron.* 38 (2012) 308–313. doi:10.1016/j.bios.2012.06.008.
- [92] S. Stankovich, D.A. Dikin, R.D. Piner, K.A. Kohlhaas, A. Kleinhammes, Y. Jia, Y. Wu, S.T. Nguyen, R.S. Ruoff, Synthesis of graphene-based nanosheets via chemical reduction of exfoliated graphite oxide, *Carbon N. Y.* 45 (2007) 1558–1565. doi:10.1016/J.CARBON.2007.02.034.
- [93] S. Schöche, N. Hong, M. Khorasaninejad, A. Ambrosio, E. Orabona, P. Maddalena, F. Capasso, Optical properties of graphene oxide and reduced graphene oxide determined by spectroscopic ellipsometry, *Appl. Surf. Sci.* 421 (2017) 778–782. doi:10.1016/J.APSUSC.2017.01.035.
- [94] M. Acik, Y.J. Chabal, A Review on Reducing Graphene Oxide for Band Gap Engineering, *J. Mater. Sci. Res.* 2 (2013) p101. doi:10.5539/jmsr.v2n1p101.
- [95] E. Orabona, A. Ambrosio, A. Longo, G. Carotenuto, L. Nicolais, P. Maddalena, Holographic patterning of graphene-oxide films by light-driven

- reduction, *Opt. Lett.* 39 (2014) 4263. doi:10.1364/OL.39.004263.
- [96] J. Ping, Y. Wang, K. Fan, J. Wu, Y. Ying, Direct electrochemical reduction of graphene oxide on ionic liquid doped screen-printed electrode and its electrochemical biosensing application., *Biosens. Bioelectron.* 28 (2011) 204–9. doi:10.1016/j.bios.2011.07.018.
- [97] P. Wiench, B. Grzyb, Z. González, R. Menéndez, B. Handke, G. Gryglewicz, pH robust electrochemical detection of 4-nitrophenol on a reduced graphene oxide modified glassy carbon electrode, *J. Electroanal. Chem.* 787 (2017) 80–87. doi:10.1016/J.JELECHEM.2017.01.040.
- [98] Z. WANG, H. WANG, Z. Zhang, G. LIU, Electrochemical determination of lead and cadmium in rice by a disposable bismuth/electrochemically reduced graphene/ionic liquid composite modified screen-printed electrode, *Sensors Actuators B Chem.* 199 (2014) 7–14. doi:10.1016/j.snb.2014.03.092.
- [99] A. Özcan, D. Topçuoğulları, A. Atılır Özcan, Fenitrothion sensing with reduced graphene oxide decorated fumed silica nanocomposite modified glassy carbon electrode, *Sensors Actuators B Chem.* 284 (2019) 179–185. doi:10.1016/J.SNB.2018.12.122.
- [100] J. V. Piovesan, E.R. Santana, A. Spinelli, Reduced graphene oxide/gold nanoparticles nanocomposite-modified glassy carbon electrode for determination of endocrine disruptor methylparaben, *J. Electroanal. Chem.* 813 (2018) 163–170. doi:10.1016/J.JELECHEM.2018.02.025.
- [101] E. Francisquini, J. Schoenmaker, J. Antonio Souza, Nanopartículas Magnéticas e suas Aplicações, in: *Química Supramol. E Nanotecnologia*, n.d.: pp. 269–289.
- [102] J. Yang, S.-B. Park, H.-G. Yoon, Y.-M. Huh, S. Haam, Preparation of poly  $\epsilon$ -caprolactone nanoparticles containing magnetite for magnetic drug carrier, *Int. J. Pharm.* 324 (2006) 185–190.
- [103] Z. Shan, C. Li, X. Zhang, K.D. Oakes, M.R. Servos, Q. Wu, H. Chen, X. Wang, Q. Huang, Y. Zhou, W. Yang, Temperature-dependent selective purification of plasmid DNA using magnetic nanoparticles in an RNase-free process, *Anal. Biochem.* 412 (2011) 117–119. doi:10.1016/j.ab.2011.01.012.
- [104] J.W.W. Liu, Y. Zhang, D. Chen, T. Yang, Z.P.P. Chen, S.Y.Y. Pan, N. Gu,



- Facile synthesis of high-magnetization  $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>/alginate/silica microspheres for isolation of plasma DNA, *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.* 341 (2009) 33–39.  
doi:10.1016/j.colsurfa.2009.03.033.
- [105] F.X. Hu, K.G. Neoh, E.T. Kang, Synthesis and in vitro anti-cancer evaluation of tamoxifen-loaded magnetite/PLLA composite nanoparticles, *Biomaterials*. 27 (2006) 5725–5733.
- [106] Z. Ma, H. Liu, Synthesis and surface modification of magnetic particles for application in biotechnology and biomedicine, *China Particuology*. 5 (2007) 1–10.
- [107] Y.-L. Luo, L.-H. Fan, F. Xu, Y.-S. Chen, C.-H. Zhang, Q.-B. Wei, Synthesis and characterization of Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>/PPy/P(MAA-co-AAm) trilayered composite microspheres with electric, magnetic and pH response characteristics, *Mater. Chem. Phys.* 120 (2010) 590–597.
- [108] J. Garcia, Y. Zhang, H. Taylor, O. Cespedes, M.E. Webb, D. Zhou, Multilayer enzyme-coupled magnetic nanoparticles as efficient reusable biocatalysts and biosensors, *Nanoscale*. 3 (2011) 3721–3730.  
doi:10.1039/c1nr10411j.
- [109] L. Kong, X. Lu, E. Jin, S. Jiang, X. Bian, W. Zhang, C. Wang, Constructing magnetic polyaniline/metal hybrid nanostructures using polyaniline/Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> composite hollow spheres as supports, *J. Solid State Chem.* 182 (2009) 2081–2087.
- [110] K. Petcharoena, A. Sirivat, Synthesis and characterization of magnetite nanoparticles via the chemical co-precipitation method, *Mater. Sci. Eng. B*. 177 (2012) 421–427.
- [111] A.R. Mahdavian, M.A.-S. Mirrahimib, Efficient separation of heavy metal cations by anchoring polyacrylic acid on superparamagnetic magnetite nanoparticles through surface modification, *Chem. Eng. J.* 159 (2010) 264–271.
- [112] R. Kumar, B.S. Inbaraj, B.H. Chen, Surface modification of superparamagnetic iron nanoparticles with calcium salt of poly( $\gamma$ -glutamic acid) as coating material, *Mater. Res. Bull.* 45 (2010) 1603–1607.
- [113] B. Una, Z. Durmus, H. Kavas, A. Baykal, M.S. Toprak, Synthesis, conductivity and dielectric characterization of salicylic acid–Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>

- nanocomposite, *Mater. Chem. Phys.* 123 (2010) 184–190.
- [114] X. Liu, M.D. Kaminski, Y. Guan, H. Chen, H. Liu, A.J. Rosengart, Preparation and characterization of hydrophobic superparamagnetic magnetite gel, *J. Magn. Magn. Mater.* 306 (2006) 248–253.
- [115] I.J. Bruce, J. Taylor, M. Todd, M.J. Davies, E. Borioni, C. Sangregorio, T. Sen, Synthesis, characterisation and application of silica-magnetite nanocomposites, *J. Magn. Magn. Mater.* 284 (2004) 145–160.
- [116] S. Asuha, B. Suyala, X. Siqintana, S. Zhao, Direct synthesis of Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanopowder by thermal decomposition of Fe–urea complex and its properties, *J. Alloys Compd.* 509 (2011) 2870–2873.
- [117] J. Mürbe, A. Rechtenbach, J. Töpfer, Synthesis and physical characterization of magnetite nanoparticles for biomedical applications, *Mater. Chem. Phys.* 110 (2008) 426–433.
- [118] Y. Poo-arporn, S. Pakapongpan, N. Chanlek, R.P. Poo-arporn, The development of disposable electrochemical sensor based on Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-doped reduced graphene oxide modified magnetic screen-printed electrode for ractopamine determination in pork sample, *Sensors Actuators B Chem.* 284 (2019) 164–171. doi:10.1016/J.SNB.2018.12.121.
- [119] H. Bagheri, A. Afkhami, Y. Panahi, H. Khoshshafar, A. Shirzadmehr, Facile stripping voltammetric determination of haloperidol using a high performance magnetite/carbon nanotube paste electrode in pharmaceutical and biological samples, *Mater. Sci. Eng. C.* 37 (2014) 264–270.
- [120] H. Yin, Y. Zhou, Q. Ma, S. Ai, Q. Chen, L. Zhu, Electrocatalytic oxidation behavior of guanosine at graphene, chitosan and Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoparticles modified glassy carbon electrode and its determination, *Talanta.* 82 (2010) 1193–1199.
- [121] H. Yin, L. Cui, Q. Chen, W. Shi, S. Ai, L. Zhu, L. Lu, Amperometric determination of bisphenol A in milk using PAMAM–Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> modified glassy carbon electrode, *Food Chem.* 125 (2011) 1097–1103.
- [122] F. Shahbazi, K. Amani, Synthesis, characterization and heterogeneous catalytic activity of diamine-modified silica-coated magnetite-polyoxometalate nanoparticles as a novel magnetically-recoverable nanocatalyst, *Catal. Commun.* 55 (2014) 57–64.

- [123] M. Moreno-Guzmán, A. González-Cortés, P. Yáñez-Sedeño, J.M. Pingarrón, A disposable electrochemical immunosensor for prolactin involving affinity reaction on streptavidin-functionalized magnetic particles, *Anal. Chim. Acta.* 692 (2011) 125–130.
- [124] N. Guan, C. Liu, D. Sun, J. Xu, A facile method to synthesize carboxyl-functionalized magnetic polystyrene nanospheres, *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.* 335 (2009) 174–180.
- [125] C.A. Grimes, G.K. Mor, *TiO<sub>2</sub> nanotube arrays: Synthesis, Properties, and Applications*, Springer, New York, 2009. doi:10.1007/978-1-4419-0068-5.
- [126] P. Roy, S. Berger, P. Schmuki, *TiO<sub>2</sub> Nanotubes: Synthesis and Applications*, *Angew. Chemie-International Ed.* 50 (2011) 2904–2939. doi:10.1002/anie.201001374.
- [127] M.A. Hossain, J. Park, J.Y. Ahn, C. Park, Y. Kim, S.H. Kim, D. Lee, Investigation of TiO<sub>2</sub> nanotubes/nanoparticles stacking sequences to improve power conversion efficiency of dye-sensitized solar cells, *Electrochim. Acta.* 173 (2015) 665–671. doi:10.1016/j.electacta.2015.05.141.
- [128] G.G. Bessegato, T.T. Guaraldo, J.F. de Brito, M.F. Brugnera, M.V.B. Zanoni, Achievements and Trends in Photoelectrocatalysis: from Environmental to Energy Applications, *Electrocatalysis.* 6 (2015) 415–441. doi:10.1007/s12678-015-0259-9.
- [129] H. Zhou, Y. Zhang, Electrochemically self-doped TiO<sub>2</sub> nanotube arrays for supercapacitors, *J. Phys. Chem. C.* 118 (2014) 5626–5636. doi:10.1021/jp4082883.
- [130] G. BESSEGATO, J. CARDOSO, M. ZANONI, CONTRIBUIÇÕES DA FOTOCATÁLISE HETEROGÊNEA E FOTOELETROCATÁLISE NO TRATAMENTO DE EFLUENTES CONTENDO CORANTES, in: *Caracter. QUÍMICA, TOXICOLÓGICA, MÉTODOS DETECÇÃO E Trat.*, 2016: pp. 261–340.
- [131] C. LONGO, ESTUDO DAS PROPRIEDADES MORFOLÓGICAS-ESTRUTURAIS E ELETROQUÍMICAS DE ELETRODOS DE SnO<sub>2</sub>, *Inst. QUÍMICA - Univ. SÃO PAULO/SÃO PAULO.* (1998).
- [132] W. Wang, Y. Xie, C. Xia, H. Du, F. Tian, Titanium dioxide nanotube arrays modified with a nanocomposite of silver nanoparticles and reduced

- graphene oxide for electrochemical sensing, *Microchim. Acta.* 181 (2014) 1325–1331. doi:10.1007/s00604-014-1258-x.
- [133] S. Mahshid, C. Li, S.S. Mahshid, M. Askari, A. Dolati, L. Yang, S. Luo, Q. Cai, Sensitive determination of dopamine in the presence of uric acid and ascorbic acid using TiO<sub>2</sub> nanotubes modified with Pd, Pt and Au nanoparticles., *Analyst.* 136 (2011) 2322–2329. doi:10.1039/c1an15021a.
- [134] Y. Wang, J. Chen, C. Zhou, L. Zhou, Y. Kong, H. Long, S. Zhong, A novel self-cleaning, non-enzymatic glucose sensor working under a very low applied potential based on a Pt nanoparticle-decorated TiO<sub>2</sub> nanotube array electrode, *Electrochim. Acta.* 115 (2014) 269–276. doi:10.1016/j.electacta.2013.09.173.
- [135] J.M. Macak, B.G. Gong, M. Hueppe, P. Schmuki, Filling of TiO<sub>2</sub> nanotubes by self-doping and electrodeposition, *Adv. Mater.* 19 (2007) 3027–3031. doi:10.1002/adma.200602549.
- [136] N. Sakai, A. Fujishima, T. Watanabe, K. Hashimoto, Highly Hydrophilic Surfaces of Cathodically Polarized Amorphous TiO<sub>2</sub> Electrodes, *J. Electrochem. Soc.* 148 (2001) E395–E398. doi:10.1149/1.1399279.
- [137] C. Kim, S. Kim, J. Lee, J. Kim, J. Yoon, Capacitive and oxidant generating properties of black-colored TiO<sub>2</sub> nanotube array fabricated by electrochemical self-doping., *ACS Appl. Mater. Interfaces.* 7 (2015) 7486–7491. doi:10.1021/acsami.5b00123.
- [138] H. Zhou, Y. Zhang, Enhancing the capacitance of TiO<sub>2</sub> nanotube arrays by a facile cathodic reduction process, *J. Power Sources.* 239 (2013) 128–131. doi:10.1016/j.jpowsour.2013.03.114.
- [139] C. Kim, S. Kim, S.P. Hong, J. Lee, J. Yoon, Effect of doping level of colored TiO<sub>2</sub> nanotube arrays fabricated by electrochemical self-doping on electrochemical properties, *Phys. Chem. Chem. Phys.* 18 (2016) 14370–14375. doi:10.1039/C6CP01799A.
- [140] J. Duan, H. Hou, X. Liu, C. Yan, S. Liu, R. Meng, Z. Hao, Y. Yao, Q. Liao, In situ Ti<sup>3+</sup>-doped TiO<sub>2</sub> nanotubes anode for lithium ion battery, *J. Porous Mater.* 23 (2016) 837–843. doi:10.1007/s10934-016-0139-6.
- [141] C. Kim, S. Kim, J. Choi, J. Lee, J.S. Kang, Y.E. Sung, J. Lee, W. Choi, J. Yoon, Blue TiO<sub>2</sub> nanotube array as an oxidant generating novel anode material fabricated by simple cathodic polarization, *Electrochim. Acta.* 141

- (2014) 113–119. doi:10.1016/j.electacta.2014.07.062.
- [142] Y. Yang, M.R. Hoffmann, Synthesis and Stabilization of Blue-Black TiO<sub>2</sub> Nanotube Arrays for Electrochemical Oxidant Generation and Wastewater Treatment, *Environ. Sci. Technol.* 50 (2016) 11888–11894. doi:10.1021/acs.est.6b03540.
- [143] W. Liao, J. Yang, H. Zhou, M. Murugananthan, Y. Zhang, Electrochemically Self-Doped TiO<sub>2</sub> Nanotube Arrays for Efficient Visible Light Photoelectrocatalytic Degradation of Contaminants, *Electrochim. Acta.* 136 (2014) 310–317. doi:10.1016/j.electacta.2014.05.091.
- [144] Q. Zheng, H.-J. Lee, J. Lee, W. Choi, N.-B. Park, C. Lee, Electrochromic titania nanotube arrays for the enhanced photocatalytic degradation of phenol and pharmaceutical compounds, *Chem. Eng. J.* 249 (2014) 285–292. doi:10.1016/j.cej.2014.03.111.
- [145] A. Lermo, E. Zacco, J. Barak, M. Delwiche, S. Campoy, J. Barbé, S. Alegret, M.I. Pividori, Towards Q-PCR of pathogenic bacteria with improved electrochemical double-tagged genosensing detection, *Biosens. Bioelectron.* 23 (2008) 1805–1811.
- [146] A. Erdem, M.I. Pividori, A. Lermo, A. Bonanni, M. del Valle, S. Alegret, Genomagnetic assay based on label-free electrochemical detection using magneto-composite electrodes, *Sensors Actuators B.* 114 (2006) 591–598.
- [147] M. Hilder, B. Winther-Jensen, D. Li, M. Forsyth, D.R. MacFarlane, Direct electro-deposition of graphene from aqueous suspensions., *Phys. Chem. Chem. Phys.* 13 (2011) 9187–9193. doi:10.1039/c1cp20173e.
- [148] G.G. Bessegato, J.C. Cardoso, B.F. da Silva, M.V.B. Zanoni, Combination of photoelectrocatalysis and ozonation: A novel and powerful approach applied in Acid Yellow 1 mineralization, *Appl. Catal. B Environ.* 180 (2016) 161–168. doi:10.1016/j.apcatb.2015.06.013.
- [149] G.J. Murray, J.P. Danaceau, Simultaneous extraction and screening of diuretics, beta-blockers, selected stimulants and steroids in human urine by HPLC-MS/MS and UPLC-MS/MS, *J. Chromatogr. B.* 877 (2009) 3857–3864. doi:10.1016/j.jchromb.2009.09.036.
- [150] A. Wong, C.A. Razzino, T.A. Silva, O. Fatibello-Filho, Square-wave voltammetric determination of clindamycin using a glassy carbon

- electrode modified with graphene oxide and gold nanoparticles within a crosslinked chitosan film, *Sensors Actuators B Chem.* 231 (2016) 183–193. doi:10.1016/j.snb.2016.03.014.
- [151] N. Laube, B. Mohr, A. Hesse, Laser-probe-based investigation of the evolution of particle size distributions of calcium oxalate particles formed in artificial urines, *J. Cryst. Growth.* 233 (2001) 367–374. doi:10.1016/S0022-0248(01)01547-0.
- [152] A.J. Bard, L.R. Faulkner, *ELECTROCHEMICAL METHODS Fundamentals and Applications*, 2nd ed., Wiley, New York, 2001.
- [153] N.P. SHETTI, L. V SAMPANGI, R.N. HEGDE, S. NANDIBEWOR, Electrochemical Oxidation of Loop Diuretic Furosemide at Gold Electrode and its Analytical Applications, *Int. Journal Electrochem. Sci.* 4 (2009) 104–121.
- [154] B.B. NETO, I.S. SCARMINIO, R.E. BRUNS, Como Variar Tudo ao Mesmo Tempo, in: Bookman (Ed.), *COMO FAZER Exp.*, 4<sup>a</sup> ed., 2010: pp. 99–163.
- [155] S.L.C. FERREIRA, W.N.L. SANTOS, C.M. QUINTELLA, B.B. NETO, J.M. BOSQUE-SENDRA, Doehlert matrix: a chemometric tool for analytical chemistry—review, *Talanta.* 63 (2004) 1061–1067.
- [156] F.F. Hudari, E.H. Duarte, A.C. Pereira, L.H. Dall’Antonia, L.T. Kubota, C.R.T. Tarley, Voltammetric method optimized by multi-response assays for the simultaneous measurements of uric acid and acetaminophen in urine in the presence of surfactant using MWCNT paste electrode, *J. Electroanal. Chem.* 696 (2013) 52–58. doi:10.1016/j.jelechem.2013.01.033.
- [157] F.F. Hudari, S.L. Costa Ferreira, M.V.B. Zanoni, Multi-responses Methodology Applied in the Electroanalytical Determination of Hair Dye by Using Printed Carbon Electrode Modified with Graphene, *Electroanalysis.* 28 (2016) 1085–1092. doi:10.1002/elan.201501043.
- [158] R.M. JESUS, L.O.B. SILVA, J.T. CASTRO, A.D.A. NETO, R.M. JESUS, S.L.C. FERREIRA, Determination of mercury in phosphate fertilizers by cold vapor atomic absorption spectrometry, *Talanta.* 106 (2013) 293–297.
- [159] J.C. Miller, J.N. Miller, *Statistics for Analytical Chemistry*, second, Ellis Horwood Limited, England, 1988.

- [160] R. Dong, L. Liu, Preparation and properties of acrylic resin coating modified by functional graphene oxide, *Appl. Surf. Sci.* 368 (2016) 378–387. doi:10.1016/j.apsusc.2016.01.275.
- [161] E. Treossi, M. Melucci, A. Liscio, M. Gazzano, P. Samorì, V. Palermo, High-contrast visualization of graphene oxide on dye-sensitized glass, quartz, and silicon by fluorescence quenching., *J. Am. Chem. Soc.* 131 (2009) 15576–15577. doi:10.1021/ja9055382.
- [162] K.-Q. Deng, J. Zhou, X.-F. Li, Direct electrochemical reduction of graphene oxide and its application to determination of L-tryptophan and L-tyrosine., *Colloids Surf. B. Biointerfaces.* 101 (2013) 183–188. doi:10.1016/j.colsurfb.2012.06.007.
- [163] T.-Q. Xu, Q.-L. Zhang, J.-N. Zheng, Z.-Y. Lv, J. Wei, A.-J. Wang, J.-J. Feng, Simultaneous determination of dopamine and uric acid in the presence of ascorbic acid using Pt nanoparticles supported on reduced graphene oxide, *Electrochim. Acta.* 115 (2014) 109–115. doi:10.1016/j.electacta.2013.10.147.
- [164] G. Kucinskis, G. Bajars, J. Kleperis, Graphene in lithium ion battery cathode materials: A review, *J. Power Sources.* 240 (2013) 66–79. doi:10.1016/j.jpowsour.2013.03.160.
- [165] J. Ping, J. Wu, Y. Wang, Y. Ying, Simultaneous determination of ascorbic acid, dopamine and uric acid using high-performance screen-printed graphene electrode., *Biosens. Bioelectron.* 34 (2012) 70–76. doi:10.1016/j.bios.2012.01.016.
- [166] H. Filik, G. Çetintaş, A.A. Avan, S. Aydar, S.N. Koç, İ. Boz, Square-wave stripping voltammetric determination of caffeic acid on electrochemically reduced graphene oxide-Nafion composite film., *Talanta.* 116 (2013) 245–250. doi:10.1016/j.talanta.2013.05.031.
- [167] W. Zhang, J. Zheng, J. Shi, Z. Lin, Q. Huang, H. Zhang, C. Wei, J. Chen, S. Hu, A. Hao, Nafion covered core-shell structured Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@graphene nanospheres modified electrode for highly selective detection of dopamine., *Anal. Chim. Acta.* 853 (2015) 285–290. doi:10.1016/j.aca.2014.10.032.
- [168] B. Song, A.K. Galande, K. Kodukula, W.H. Moos, S.M. Miller, Evaluation of the pK<sub>a</sub> values and ionization sequence of bumetanide using <sup>1</sup>H and

- 13C NMR and UV spectroscopy, *Drug Dev. Res.* 72 (2011) 416–426.  
doi:10.1002/ddr.20443.
- [169] L. Stobinski, B. Lesiak, A. Malolepszy, M. Mazurkiewicz, B. Mierzwa, J. Zemek, P. Jiricek, I. Bieloshapka, Graphene oxide and reduced graphene oxide studied by the XRD, TEM and electron spectroscopy methods, *J. Electron Spectros. Relat. Phenomena.* 195 (2014) 145–154.  
doi:10.1016/j.elspec.2014.07.003.
- [170] M. Regina dos Santos Ruy, E. Carneiro Figueira, M. Del Pilar Taboada Sotomayor, Electroanalytical determination of bumetanide employing a biomimetic sensor for detection of doping in sports, *Anal. Methods.* 6 (2014) 5792–5798. doi:10.1039/C4AY00255E.
- [171] WADA (World Anti-Doping Agency), Technical document: minimum required performance limits for detection of prohibited substances, (n.d.).  
[https://wada-main-prod.s3.amazonaws.com/resources/files/WADA\\_TD2010MRPLv1.0\\_Minimum Required Performance Levels\\_Sept 01 2010\\_EN.pdf](https://wada-main-prod.s3.amazonaws.com/resources/files/WADA_TD2010MRPLv1.0_Minimum Required Performance Levels_Sept 01 2010_EN.pdf) (accessed June 27, 2016).
- [172] M.M. Baizer, H. Lund, *Organic electrochemistry—an introduction and a guide*, 2nd ed., New York, 1983.
- [173] G.G. Bessegato, J.C. Cardoso, M.V.B. Zanoni, Enhanced photoelectrocatalytic degradation of an acid dye with boron-doped TiO<sub>2</sub> nanotube anodes, *Catal. Today.* 240 (2015) 100–106.  
doi:10.1016/j.cattod.2014.03.073.
- [174] P.A. Carneiro, M.E. Osugi, J.J. Sene, M.A. Anderson, M.V.B. Zanoni, Evaluation of color removal and degradation of a reactive textile azo dye on nanoporous TiO<sub>2</sub> thin-film electrodes, *Electrochim. Acta.* 49 (2004) 3807–3820. doi:10.1016/j.electacta.2003.12.057.
- [175] G.G. Bessegato, F.F. Hudari, M.V.B. Zanoni, Self-doped TiO<sub>2</sub> nanotube electrodes: A powerful tool as a sensor platform for electroanalytical applications, *Electrochim. Acta.* 235 (2017).  
doi:10.1016/j.electacta.2017.03.141.
- [176] A.G. Muñoz, Q. Chen, P. Schmuki, Interfacial properties of self-organized TiO<sub>2</sub> nanotubes studied by impedance spectroscopy, *J. Solid State Electrochem.* 11 (2007) 1077–1084. doi:10.1007/s10008-006-0241-9.



- [177] K. Shankar, G.K. Mor, H.E. Prakasam, S. Yoriya, M. Paulose, O.K. Varghese, C.A. Grimes, Highly-ordered TiO<sub>2</sub> nanotube arrays up to 220  $\mu\text{m}$  in length: use in water photoelectrolysis and dye-sensitized solar cells, *Nanotechnology*. 18 (2007) 065707–065787. doi:10.1088/0957-4484/18/6/065707.
- [178] Y.-Y. Song, Z. Gao, K. Lee, P. Schmuki, A self-cleaning nonenzymatic glucose detection system based on titania nanotube arrays modified with platinum nanoparticles, *Electrochem. Commun.* 13 (2011) 1217–1220. doi:10.1016/j.elecom.2011.08.040.
- [179] S. Yu, X. Peng, G. Cao, M. Zhou, L. Qiao, J. Yao, H. He, Ni nanoparticles decorated titania nanotube arrays as efficient nonenzymatic glucose sensor, *Electrochim. Acta.* 76 (2012) 512–517. doi:10.1016/j.electacta.2012.05.079.