

**UNIVERSIDADE FEDERAL DOS VALES DO JEQUITINHONHA E MUCURI**

**Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas**

**Fernando de Jesus Souza**

**TRIAGEM E DETERMINAÇÃO DE MODAFINIL EM SALIVA HUMANA E AMOSTRAS  
FARMACÊUTICAS USANDO MÉTODOS ELETROQUÍMICOS**

**Diamantina-MG**

**Agosto/2021**

**Fernando de Jesus Souza**

**TRIAGEM E DETERMINAÇÃO DE MODAFINIL EM SALIVA HUMANA E AMOSTRAS  
FARMACÊUTICAS USANDO MÉTODOS ELETROQUÍMICOS**

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

Orientador: Prof. Dr. Wallans Torres Pio dos Santos

**Diamantina-MG**

**Agosto/2021**

Catálogo na fonte - Sisbi/UFVJM

S729 Souza, Fernando de Jesus  
2021 TRIAGEM E DETERMINAÇÃO DE MODAFINIL EM SALIVA HUMANA E  
AMOSTRAS FARMACÊUTICAS USANDO MÉTODOS ELETROQUÍMICOS  
[manuscrito] / Fernando de Jesus Souza. -- Diamantina, 2021.  
102 p. : il.

Orientador: Prof. Wallans Torres Pio dos Santos.

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

1. MODAFINIL. 2. CONTROLE DE DOPING. 3. CONTROLE DE  
QUALIDADE DE MEDICAMENTOS. 4. MPA-BIA. 5. DIAMANTE DOPADO COM  
BORO. I. Pio dos Santos, Wallans Torres . II. Universidade  
Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri. III. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRVJM  
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).  
Bibliotecário Rodrigo Martins Cruz / CRB6-2886  
Técnico em T.I. Thales Francisco Mota Carvalho



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO**  
**UNIVERSIDADE FEDERAL DOS VALES DO JEQUITINHONHA E MUCURI**

**FOLHA DE APROVAÇÃO**

**Fernando de Jesus Souza**

**TRIAGEM E DETERMINAÇÃO DE MODAFINIL EM SALIVA HUMANA E AMOSTRAS  
FARMACÊUTICAS USANDO MÉTODOS ELETROQUÍMICOS**

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

Orientador: Prof. Dr. Wallans Torres Pio dos Santos

Data de aprovação 06/08/2021.

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

Presidente

**Prof. Dr. SANDRO LUIZ BARBOSA DOS SANTOS (UFVJM)**

Membro Interno

**Prof. Dr. RODRIGO ALEJANDRO ABARZA MUNOZ (UFU)**

Membro Externo

**Diamantina**

**Agosto/2021**



Documento assinado eletronicamente por **Wallans Torres Pio dos Santos, Servidor**, em 06/08/2021, às 12:29, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Rodrigo Alejandro Abarza Munoz, Usuário Externo**, em 06/08/2021, às 12:30, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Sandro Luiz Barbosa dos Santos, Coordenador(a)**, em 06/08/2021, às 12:30, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de](#)

[outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site

[https://sei.ufvim.edu.br/sei/controlador\\_externo.php?](https://sei.ufvim.edu.br/sei/controlador_externo.php?)

[acao=documento\\_conferir&id\\_orgao\\_acesso\\_externo=0](#), informando o código verificador **0425286** eo código CRC **A3B44DA0**.

## **AGRADECIMENTOS**

Em meio a tantas provações e turbulências durante os últimos meses, chego a este momento com o coração cheio de Gratidão e Fé.

Agradeço primeiramente a Deus que sempre guiou os meus passos e à Nossa Senhora Aparecida, a qual sou devoto, me cobrindo com o seu manto protetor e iluminando os meus caminhos.

Agradeço a minha família pelo apoio e encorajamento que sempre deram aos meus estudos.

Agradeço também aos meus irmãos de Fé do Terço dos Homens pelas orações e intenções nas preces concedidas.

Aos parentes e amigos que compreenderam meus momentos de ausência, sempre foram por motivos de incansáveis leituras e experimentos.

Não posso deixar de agradecer à Secretaria Municipal de Saúde de Diamantina, pela possibilidade de flexibilização de horários, para que eu conseguisse conciliar trabalho e mestrado. Em especial à minha equipe do Laboratório Municipal de Análises Clínicas pelos meus “poucos” momentos de estresse e pelo apoio de sempre, obrigado!

Agradeço a todos os professores da UFVJM, os quais tive a satisfação de ser discente em algum momento.

Aos amigos do grupo de pesquisa GPED, meu muito obrigado pelo compartilhamento de ideias e aprendizado. Em especial um agradecimento ao Dilton, que sempre esteve ali presente, não só como servidor da UFVJM, mas como um braço direito sendo solícito a todo tempo.

E para finalizar, um agradecimento em tom até de desculpas por algum momento que não correspondo às expectativas durante a pesquisa, ao Prof. Orientador Wallans, meu muito obrigado pela amizade, paciência e por transmitir tamanho conhecimento a nós alunos.

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



*“A sorte favorece a mente bem preparada.”*

Louis Pasteur





## RESUMO

O Modafinil (MODA) é um fármaco usado para os tratamentos da narcolepsia, sonolência diurna e apneia do sono. Todavia, devido a essa droga não apresentar aparentemente efeitos colaterais, vários usuários estão administrando-a para privação do sono e aumento do poder de concentração. Esses efeitos levaram o MODA a ser vulgarmente conhecido como “pílula da inteligência”, sendo também inserido em 2004 na lista de substâncias proibidas em competições esportivas pela WADA (*World Anti-Doping Agency*). O controle de *doping* e de qualidade de medicamentos utilizam geralmente métodos analíticos de grande porte baseados na cromatografia com diversos detectores. No entanto, métodos mais simples e rápidos para triagem e doseamento de medicamentos são uma alternativa atraente para ampliar os exames *antidoping* de atletas e diminuir custos no controle de qualidade da rotina farmacêutica. Além disso, métodos portáteis para triagem em amostra de saliva podem auxiliar o controle de *doping* e aumentar consideravelmente o número de análises em atletas durante grandes competições esportivas. Nessas perspectivas, o presente trabalho propõe a detecção e quantificação do MODA em saliva humana e formulações farmacêuticas por métodos eletroanalíticos usando o eletrodo de diamante dopado com boro (BDDE). Os métodos eletroanalíticos avaliados neste trabalho foram baseados nas técnicas de voltametria e amperometria de múltiplos pulsos (MPA) acoplada a análise por injeção em batelada (BIA). O BDDE acoplado ao BIA-MPA apresentou uma detecção seletiva e sensível com um limite de detecção ( $0,10 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) suficientemente baixo para determinação de MODA em saliva humana e em formulações farmacêuticas. O sistema BDDE-BIA-MPA proporcionou ainda uma boa estabilidade da resposta eletroquímica para detecção do MODA com um baixo desvio padrão relativo (*DPR*) de 3,1% ( $N=10$ ). A determinação do MODA usando esse sistema de detecção foi extremamente rápida (aproximadamente 150 determinações por hora), permitindo uma grande vantagem frente aos demais métodos reportados para aplicações em análises de rotina ou métodos de triagem desta droga. Portanto, o desempenho analítico do método proposto apresenta uma análise portátil, simples, rápida e de baixo custo com grande potencial para aplicação no controle de *doping* do MODA em amostras de saliva, bem como no controle de qualidade deste fármaco em medicamentos nas indústrias farmacêuticas.

**Palavras chaves:** Modafinil; Pílula da Inteligência; Controle de *Doping*; Controle de qualidade de Medicamentos; Amperometria de Múltiplos Pulsos; Análise por Injeção em Batelada; Diamante Dopado com Boro.



## ABSTRACT

Modafinil (MODA) is a drug used to treat narcolepsy, daytime sleepiness and sleep apnea. However, because this drug does not appear to have side effects, several users are administering it for sleep deprivation and increased concentration power. These effects led MODA to be commonly known as the “intelligence pill”, and in 2004 it was also included in the list of substances banned in sports competitions by the WADA (World Anti-Doping Agency). Doping and drug quality control generally use large analytical methods based on multi-detector chromatography. However, simpler and faster methods for screening and dosing drugs are an attractive alternative to expand anti-doping tests in athletes and reduce costs in the quality control of routine pharmaceuticals. In addition, portable methods for screening saliva samples can help control doping and considerably increase the number of analyzes in athletes during major sports competitions. In these perspectives, the present work proposes the detection and quantification of MODA in human saliva and pharmaceutical formulations by electroanalytical methods using the boron-doped diamond electrode (BDDE). The electroanalytical methods evaluated in this work were based on voltammetry and multiple pulse amperometry (MPA) techniques coupled with batch injection analysis (BIA). BDDE coupled to BIA-MPA showed selective and sensitive detection with a detection limit ( $0.10 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) low enough for MODA determination in human saliva and in pharmaceutical formulations. The BDDE-BIA-MPA system also provided a good stability of the electrochemical response for MODA detection with a low relative standard deviation (3.1%,  $N=10$ ). The determination of MODA using this detection system was ultra-fast (approximately 150 determinations per hour), allowing a great advantage over other reported methods for applications in routine analysis or screening methods for this drug. Therefore, the analytical performance of the proposed method presents a portable, simple, fast and low-cost analysis with great potential for application in the doping control of MODA in saliva samples, as well as in the quality control of this drug in medicines in the pharmaceutical industries.

**Keywords:** Modafinil; Intelligence Pill; Doping Control; Medicines quality control; Multiple Pulse Amperometry; Batch Injection Analysis; Diamond Doped with Boron.



## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Estrutura química do MODA com indicação do pKa na molécula.....	27
Figura 2 – Representação esquemática do sinal de excitação e um voltamograma obtidos pela célula eletroquímica usada na CV. Onde: Ei: potencial inicial; Es: potencial de inversão; Ef: potencial final; ET: eletrodo de trabalho; ER: eletrodo de referência e EA: eletrodo auxiliar.....	40
Figura 3 – Decaimento da corrente faradáica e capacitiva em função do tempo.....	41
Figura 4 – (A) – aplicação do potencial na DPV em função do tempo. (B) – exemplo de voltamograma de pulso diferencial de um composto eletroativo.....	42
Figura 5 – Esquema de aplicação do pulso em SWV.....	43
Figura 6 – Esquema de voltamogramas de onda quadrada hipotéticos para (A) Sistemas reversíveis e (B) para sistemas irreversíveis.....	43
Figura 7 - Degrau único esquemático na amperometria convencional do potencial aplicado (a) e o pico de corrente (b) e três degraus aplicados em sequência na MPA e os respectivos sinais coletados do potencial (c) e da corrente (d).....	45
Figura 8 - Etapas operacionais de um sistema BIA com detecção amperométrica.....	48
Figura 9 - Superfície do BDDE após tratamento (A) Catódico e (B) Anódico.....	51
Figura 10 - Salivette® (A) Tubo que contém as demais estruturas do kit. (B) Rolo cilíndrico de algodão que mede aproximadamente 1 cm de espessura e 3,5 cm de comprimento utilizado para coleta de saliva.....	54
Figura 11 - A) Potenciostato AutoLab modelo PGSTAT101. B) Potenciostato $\mu$ AutoLab TYPE III.....	55
Figura 12 - Célula eletroquímica utilizada nas análises voltamétricas estacionárias sendo: a) ER, b) EA, c) ET (BDDE) e d) placa de cobre para contato elétrico do ET.....	56
Figura 13 - Célula eletroquímica utilizada nas análises por BIA, nas quais usa a pipeta eletrônica semi-automática <i>Eppendorf Multipette</i> com ponteira de 1000 $\mu$ L e os eletrodos de trabalho	

BBDE (vermelho) conectado em uma placa de cobre, o de referência (azul) e o auxiliar (preto).....	57
Figura 14 - Voltamogramas obtidos a partir da análise em CV de MODA 1,0 mmol L <sup>-1</sup> em TBR na escala de pH de 2,0 a 12,0 (A a K).....	63
Figura 15 - Distribuição de pH da molécula de MODA.....	66
Figura 16 - VCs obtidos no BDDE em meio de H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 0,25 mol L <sup>-1</sup> (linha preta) e com adição de MODA a 1,0 mmol L <sup>-1</sup> (linha vermelha). Velocidade de varredura 50 mV s <sup>-1</sup> .....	67
Figura 17 - Voltamogramas obtidos por DPV no BDDE em diferentes concentrações do H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> para detecção do MODA. Em A) H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 0,10 mol L <sup>-1</sup> , em B) H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 0,25 mol L <sup>-1</sup> e em C) H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 0,50 mol L <sup>-1</sup> . Os parâmetros de amplitude e de incremento de potencial foram de 90 e 6 mV, respectivamente.....	68
Esquema 1 - Reação de oxidação da molécula original (I) para o MODA sulfonado (II).....	69
Figura 18 - VCs mostrando o comportamento do MODA após tratamento anódico (linha preta) e após tratamento catódico (linha vermelha).....	69
Figura 19 - Em A) Estudo da velocidade de varredura do MODA 1,0 mmol L <sup>-1</sup> em H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 0,25 mol L <sup>-1</sup> sobre o eletrodo de BDDE, mostrando os VCs de <i>E<sub>pa</sub></i> vs <i>I<sub>pa</sub></i> em diferentes velocidades de varredura; Na inserção em A, Regressão linear do log da velocidade de pico em relação ao log da velocidade de varredura. E em B) Regressão linear das correntes de pico em relação à raiz da velocidade de varredura.....	70
Figura 20 - Gráficos da otimização da DPV usando uma solução de MODA 1,0 mmol L <sup>-1</sup> em H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 0,25 mol L <sup>-1</sup> sobre a superfície de BDDE: A) Otimização do incremento de Potencial; B) Otimização da Amplitude; C) Otimização do Tempo de Modulação e D) Otimização do Intervalo de Tempo.....	72
Figura 21 - Gráficos da otimização da SWV usando uma solução de MODA 1,0 mmol L <sup>-1</sup> em H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 0,25 mol L <sup>-1</sup> sobre a superfície de BDDE: A) Otimização do incremento de Potencial; B) Otimização da Amplitude e C) Otimização da Frequência.....	73
Figura 22 - A) Estudo de repetibilidade do MODA em DPV e B) Estudo de repetibilidade do MODA em SWV. Ambas utilizando MODA 1,0 mmol L <sup>-1</sup> em H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 0,25 mol L <sup>-1</sup> sobre a superfície de BDDE.....	74

Figura 23 - Estudo de linearidade por DPV do MODA em H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 0,25 mol L <sup>-1</sup> sobre o BDDE após tratamento catódico entre as análises. A) VCs obtidos de soluções de MODA em concentrações de 1,0 a 110 μmol L <sup>-1</sup> . B) Regressão linear da <i>I<sub>pa</sub></i> do MODA em função das concentrações.....	75
Figura 24 - Estudo de linearidade por SWV do MODA em H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 0,25 mol L <sup>-1</sup> sobre o BDDE após tratamento catódico entre as análises. A) VCs obtidos de soluções de MODA em concentrações de 1,0 a 110 μmol L <sup>-1</sup> . B) Regressão linear da <i>I<sub>pa</sub></i> do MODA em função das concentrações.....	75
Figura 25 - Amperograma obtido pela injeção em triplicata de MODA 10 μmol L <sup>-1</sup> em H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 0,25 mol L <sup>-1</sup> , usando o sistema BIA-MPA sobre BDDE variando os pulsos de potenciais aplicados de +1,1 a +1,9 V.....	77
Figura 26 - Amperogramas obtidos pela injeção em triplicata de MODA 10 μmol L <sup>-1</sup> em H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 0,25 mol L <sup>-1</sup> , para avaliação do tempo de aplicação no potencial de +1,8V.....	78
Figura 27 - Amperogramas obtidos pela injeção em triplicata de MODA 10 μmol L <sup>-1</sup> em H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 0,25 mol L <sup>-1</sup> , para avaliação do volume de injeção no potencial de +1,8V.....	80
Figura 28 - Amperogramas obtidos pela injeção em triplicata de MODA 10 μmol L <sup>-1</sup> em H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 0,25 mol L <sup>-1</sup> , para avaliação da velocidade de injeção no potencial de +1,8V.....	81
Figura 29 - Amperogramas obtidos pela injeção de 10 amostras de MODA 10 μmol L <sup>-1</sup> em H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 0,25 mol L <sup>-1</sup> , para avaliação da agitação da solução no interior da célula BIA no potencial de +1,8V.....	82
Figura 30 - Amperogramas obtidos pela detecção por BIA-MPA de 10 injeções consecutivas de MODA a 1,0 μmol L <sup>-1</sup> em H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 0,25 mol L <sup>-1</sup> monitorando os potenciais <i>E<sub>det1</sub></i> e <i>E<sub>det2</sub></i> . Volume de injeção de 40 μL. Velocidade de injeção de 146 μLs <sup>-1</sup> .....	84
Figura 31 - A e C: Biagramas obtidos pela injeção em triplicata de amostras de MODA de 0,1 μmol L <sup>-1</sup> a 80 μmol L <sup>-1</sup> em H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 0,25 mol L <sup>-1</sup> em <i>E<sub>det1</sub></i> e <i>E<sub>det2</sub></i> , respectivamente . B e D: Curvas analíticas com regressões lineares dos respectivos biagramas de <i>E<sub>det1</sub></i> e <i>E<sub>det2</sub></i> .....	85
Figura 32 - A e C: Amperogramas do estudo de linearidade da adição padrão do MODA em amostras de saliva obtidos de concentrações de 3 a 13 μmol L <sup>-1</sup> de MODA em <i>E<sub>det1</sub></i> e <i>E<sub>det2</sub></i> ,	



respectivamente. B e D: Respectivas regressões lineares obtidas a partir da curva analítica de adição padrão em  $Edet_1$  e  $Edet_2$ .....88

Figura 33 - A) Amperogramas obtidos das soluções do comprimido de MODA a  $14 \mu\text{mol L}^{-1}$  (teórica), do padrão de MODA a  $10 \mu\text{mol L}^{-1}$  e das duas soluções juntas (C+P) em  $Edet_1$ . B) Amperogramas obtidos das soluções do comprimido de MODA a  $14 \mu\text{mol L}^{-1}$ , do padrão de MODA a  $10 \mu\text{mol L}^{-1}$  e das duas soluções juntas (C+P) em  $Edet_2$ .....91

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Propriedades físico-químicas do MODA.....	28
Tabela 2 – Principais nomes comerciais de medicamentos contendo o MODA como princípio ativo.....	29
Tabela 3 – Métodos analíticos para determinação do MODA.....	37
Tabela 4 - Métodos eletroanalíticos usando o sistema de detecção por BDDE-BIA-MPA.....	52
Tabela 5 – Lista de reagentes utilizados nos experimentos.....	53
Tabela 6 - Parâmetros otimizados para a detecção de MODA por DPV.....	72
Tabela 7 - Parâmetros otimizados para a detecção de MODA por SWV.....	73
Tabela 8 - Comparação de parâmetros analíticos entre DPV e SWV para detecção do MODA em triplicata (N=3).....	76
Tabela 9 - Parâmetros otimizados para a detecção de MODA pelo sistema BIA-MPA.....	83
Tabela 10 - Dados do estudo da relação entre as médias das correntes $I_{pa1}$ e $I_{pa2}$ nos $E_{det1}$ e $E_{det2}$ em função da concentração de MODA.....	87
Tabela 11 - Estudo de adição padrão na amostra de saliva humana em triplicata no $E_{det1}$ .....	90
Tabela 12 - Dados obtidos do estudo de adição e recuperação relacionando a média das $I_{pa1}$ com as concentrações do comprimido de MODA.....	91
Tabela 13 – Relação da média $I_{pa1}$ e $I_{pa2}$ nos pulsos de potencial $E_{det1}$ e $E_{det2}$ .....	92

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AA - Ácido Ascórbico

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

AU - Ácido Úrico

BDDE – Sigla em inglês de *Boron Doped Diamond Electrode* (Eletrodo de Diamante Dopado com Boro)

BIA - Sigla em inglês de *Batch Injection Analysis* (Análise por injeção em batelada)

BIA-MPA – Análise por injeção em batelada utilizando amperometria de múltiplos pulsos.

CNT-SPE-AdSV – Sigla em inglês de Carbon NanoTubes-Screen Printed Electrode-Adsorptive Voltammetry (Voltametria de redissolução adsortiva com eletrodo impresso de nanotubos de carbono)

CV – Sigla em inglês de *Cyclic Voltammetry* (Voltametria Cíclica)

DPR - Desvio Padrão Relativo

DPV – Sigla em inglês de *Differential Pulse Voltammetry* (Voltametria de Pulso Diferencial)

EA – Eletrodo Auxiliar

EMA – Sigla em inglês de *European Medicines Agency* (Agência Europeia de Medicamentos)

Epa – Potencial de pico anódico

ER – Eletrodo de Referência

ET – Eletrodo de Trabalho

FDA – Sigla em inglês de *Food na Drug Administration*

GC-MS – Sigla em inglês de *Gas Chromatography with Mass Spectrometry Detection* (Cromatografia gasosa com detecção no espectrômetro de massas)

HPLC – Sigla em inglês de *High Performance Liquid Chromatography* (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência)

Ipa – Corrente de pico anódico

LOD - Limite de Detecção

LOQ - Limite de Quantificação

MODA – Modafinil

MPA - Sigla em inglês de *Multiple Pulse Amperometry* (Amperometria de Múltiplos Pulsos)

SNGPC - Sistema Nacional de Gerenciamento de Produtos Controlados

Ph. Eur. – Sigla em inglês de *Pharmacopeia Europen* (Farmacopeia Europeia)

SWV- Sigla em inglês de *Square Wave Voltammetry* (Voltametria de Onda Quadrada)

USP – Sigla em inglês de United States Pharmacopeia

UV- Ultravioleta

VCs – Voltamogramas Cíclicos

WADA - Sigla em inglês de *World Anti-doping Agency* (Agência Mundial Antidopagem)

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	23
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	26
<b>2.1 Objetivo Geral</b> .....	26
<b>2.2 Objetivos Específicos</b> .....	26
<b>3 REFERENCIAL TEÓRICO</b> .....	27
<b>3.1 Modafinil (MODA)</b> .....	27
3.1.1 Farmacodinâmica do MODA.....	29
3.1.2 Farmacocinética do MODA.....	30
3.1.3 Uso indiscriminado do MODA.....	31
3.1.4 MODA no <i>doping</i> .....	32
<b>3.2 Amostras de saliva no controle de <i>doping</i></b> .....	33
<b>3.3 Controle de qualidade na fabricação de medicamentos</b> .....	34
<b>3.4 Métodos de determinação do MODA</b> .....	36
<b>3.5 Técnicas Eletroanalíticas</b> .....	38
3.5.1 Voltametria Cíclica (CV).....	39
3.5.2 Voltametria de Pulso Diferencial (DPV).....	41
3.5.3 Voltametria de Onda Quadrada (SWV).....	42
3.5.4 Técnicas Amperométricas.....	44
3.5.5 Amperometria de Múltiplos Pulsos (MPA).....	45
<b>3.6 Sistema BIA</b> .....	47
<b>3.7 Eletrodo de Diamante Dopado com Boro (BDDE)</b> .....	50
<b>4 PARTE EXPERIMENTAL</b> .....	53
<b>4.1 Reagentes, soluções e amostras</b> .....	53
<b>4.2 Instrumentação</b> .....	55

<b>4.3 Detecção Eletroquímica</b> .....	57
<b>4.4 Estudos dos parâmetros eletroquímicos do MODA por técnicas voltamétricas</b> .....	58
4.4.1 Otimização dos parâmetros da SWV e DPV.....	59
<b>4.5 Otimização da técnica amperométrica</b> .....	59
<b>4.6 Avaliação dos parâmetros analíticos</b> .....	60
4.6.1 Análise de repetibilidade.....	60
4.6.2 Estudo de linearidade do método.....	61
4.6.3 Teste de adição e recuperação do MODA em amostras de saliva e formulação farmacêutica.....	61
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	62
<b>5.1 Comportamento eletroquímico do MODA</b> .....	62
5.1.1 Avaliação do pré-tratamento da superfície do BDDE.....	68
5.1.2 Estudo da velocidade de varredura.....	69
<b>5.2 Detecção do MODA em sistema estacionário por DPV e SWV</b> .....	70
5.2.1 Análise de repetibilidade.....	73
5.2.2 Estudo da linearidade e cálculo de LOD e LOQ.....	73
<b>5.3 Detecção do MODA pelo sistema hidrodinâmico BIA-MPA</b> .....	76
5.3.1 Otimização do potencial e do tempo de aplicação no sistema BIA.....	76
5.3.2 Otimização do volume e velocidade de injeção e da agitação do sistema BIA-MPA.....	78
5.3.3 Análise de repetibilidade.....	82
5.3.4 Estudo de linearidade e cálculo de LOD e LOQ.....	84
<b>5.4 Relação do sinal de corrente de pico dos potenciais +1,8/+1,9 V</b> .....	85
<b>5.5 Determinação do MODA em saliva humana</b> .....	86
5.5.1 Estudo de adição e recuperação em amostras de saliva humana.....	87
<b>5.6 Determinação do MODA em amostras farmacêuticas</b> .....	89
5.6.1 Adição e recuperação no comprimido de MODA.....	89

<b>6 CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS.....</b>	<b>92</b>
<b>7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>93</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A busca por melhores resultados, treinamentos incessantes, conciliado por muitas vezes com alimentações restritas e balanceadas tornam a vida dos atletas uma verdadeira pressão por vitórias. É a partir daí que os atletas buscam o alívio abusando de substâncias lícitas e até ilícitas antes, durante ou depois das competições. No intuito de controlar esses abusos, anualmente a Agência Mundial Antidopagem (WADA, sigla em inglês de *World Anti-doping Agency*) divulga uma lista em que são oferecidas orientações a respeito das substâncias e métodos proibidos em competições esportivas. A ideia básica é nortear os atletas e seus respectivos departamentos médicos a conhecerem o que deve ser evitado em competições, assumindo a corresponsabilidade pelo processo de controle de uso antes, durante e após a prática esportiva.

De acordo com a WADA, o controle *antidoping* deve ocorrer durante o período das competições e entre os eventos esportivos. O controle *antidoping* entre as competições pode ser feito a qualquer momento (no treinamento, na casa do atleta ou próximo a competição) e consiste na identificação e quantificação de agentes anabólicos e com atividade antiestrogênica, beta-2-agonista, diuréticos, estimulantes do sistema nervoso e agentes mascarantes (DE ROSE, 2008; WADA, 2009).

O Modafinil (MODA) é uma das substâncias banidas em competições esportivas e foi inserido na listagem da WADA no ano de 2004 (THE PROHIBITED LIST WADA, 2004), devido aos casos notificados no ano anterior, que comprovaram o seu uso em competições pela equipe de atletismo norte-americano (USOC, 2003). O MODA é um fármaco sintético que age no sistema nervoso central, embora sua ação farmacológica ainda não esteja bem elucidada na literatura, este fármaco foi desenvolvido para tratamento de uma doença chamada narcolepsia, que consiste no sono súbito e incontrolável, aparentemente sem motivo e que ocorre várias vezes no decorrer do dia (QU *et al.*, 2008). Além disso, o MODA também mostrou evidências para tratamento de déficit de atenção e hiperatividade (REPANTIS *et al.*, 2010). O que se sabe a respeito da ação da substância no organismo é o aumento de neurotransmissores, como dopamina, norepinefrina, acetilcolina e serotonina nas fendas sinápticas, os quais têm relação direta com o estado de alerta e vigília do sono.

Logo quando foi lançado no mercado em 1994, na França, o MODA atraiu o interesse dos militares que passaram a utilizá-lo com o intuito de inibir o sono por muitas horas, havendo relatos que soldados ficavam até 60 horas sem dormir e, o mais interessante, sem apresentar efeitos colaterais (WRAIR, 1998). Hoje em dia, o uso do MODA está indiscriminado por pessoas sem indicação prévia nos mais diversos seguimentos, seja em competições



esportivas pelos atletas, no desenvolvimento de pesquisas pelos cientistas e até na educação por estudantes em geral (VOLKOW *et al.*, 2009), todos com objetivo de inibir o sono e aumentar a concentração.

Em dezembro de 1998, a FDA (sigla em inglês de *Food and Drug Administration*) aprovou a venda do MODA nos Estados Unidos para o tratamento da narcolepsia, e a Cephalon (Empresa BioFarmacêutica Americana) vende hoje, cerca de US\$ 200 milhões do fármaco por ano. Isso representa uma grande quantidade de medicação para a narcolepsia – mais que a população norte-americana de narcolépticos poderia consumir, suspeitam muitos observadores (TULLY, 2003). “Há uma enorme quantidade usada sem autorização de psiquiatras para usos diversos”, diz Helene Emsellem, que dirige o Center for Sleep and Wake Disorders, em Chevy Chase, Maryland.

No Brasil, o MODA é comercializado pelo nome de referência Stavigile®, inserido na Portaria da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) nº 344, de 1998 (RDC nº 63, 2007), que regulamenta os medicamentos controlados no país, sendo necessário receituário médico A3 (receita amarela) para a sua aquisição. Segundo as Diretrizes Brasileiras para o Tratamento da Narcolepsia (ALÓE *et al.*, 2010), o MODA é indicado como a primeira escolha para o tratamento da sonolência diurna excessiva. Entretanto pelos registros de movimentação no Sistema Nacional de Gerenciamento de Produtos Controlados (SNGPC, Ministério da Saúde) do medicamento no país (RDC nº 319, 2019), há indícios de vendas ilegais com receitas falsas ou ainda comércio deste medicamento falsificado, uma vez que, segundo as mesmas diretrizes, a incidência da doença no Brasil é de apenas 1,37 por 100.000 habitantes por ano.

Para controle do *doping*, atualmente a WADA utiliza amostras de urina, sangue ou ambas dos atletas como matriz biológica para a realização dos testes nas competições. As amostras dos atletas são analisadas por métodos considerados padrão-ouro em detecção de substâncias (PEREIRA *et al.*, 2008; WADA, 2009), como por exemplo, a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC, sigla em inglês de *High Performance Liquid Chromatography*) com detecção por espectrometria de massas (MS, sigla em inglês de *Mass Spectrometry*) e a Cromatografia Gasosa com acoplado ao Espectrômetro de Massas (GC-MS, sigla em inglês de *Gas Chromatography with Mass Spectrometry Detection*). Entretanto essas técnicas são complexas e de grande porte para aplicação como métodos simples e rápidos de triagem, sendo necessário uma grande infraestrutura de laboratório para realização das análises. Além disso, a coleta de amostras de urina apresenta um inconveniente para realização de um grande número de análises em grandes competições esportivas. Por conseguinte, os testes ficam

limitados a uma amostragem reduzida e demorada, o que pode ser um fator limitante na execução de punições adequadas aos atletas.

No que tange ao doseamento de fármacos no setor de controle de qualidade, as indústrias farmacêuticas também utilizam equipamentos baseados em HPLC, porém, principalmente, com detecção no ultravioleta (UV) (USP, 2011). Embora essa técnica seja robusta e seletiva para ser aplicada no controle qualidade de medicamentos, sua amostragem requer em geral várias etapas de tratamento de amostra, além de ser uma análise dispendiosa e com grande geração de resíduos orgânicos.

Por conseguinte, o desenvolvimento de um método simples e rápido para determinação do MODA que possibilite uma aplicação *in loco* é de grande interesse no controle de *doping*. Além disso, o uso de amostras de saliva pode auxiliar na triagem em exames *antidoping* oferecendo uma coleta menos invasiva em relação a de sangue e mais simples com relação a de urina (MOURA *et al.*, 2007). Aliado a esse desempenho analítico, métodos de baixo custo e ambientalmente amigáveis para detecção do MODA são também atrativos para serem utilizados no controle de qualidade de medicamentos em indústrias farmacêuticas. Nesse contexto de aplicações, os métodos eletroquímicos são uma alternativa que apresenta uma adequada sensibilidade e seletividade para detecção de fármacos, além do grande potencial de miniaturização e portabilidade (WANG, 2001; DE SOUZA, 2003; PACHECO *et al.*, 2013). Considerando essas perspectivas, o presente trabalho propõe um método para triagem de MODA em amostras de saliva e sua determinação e amostras farmacêuticas usando, pela primeira vez, um sensor eletroquímico altamente estável, o eletrodo de diamante dopado com boro (BDDE, sigla em inglês de *Boron Doped Diamond Electrode*). No intuito de aumentar portabilidade, rapidez e estabilidade do método proposto para detecção do MODA, o uso do BDDE foi aliado às técnicas de voltametria e amperometria de múltiplos pulsos (MPA, sigla em inglês de *Multiple Pulse Amperometry*) acoplada a análise por injeção em batelada (BIA, sigla em inglês de *Batch Injection Analysis*).

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo Geral

Desenvolver um método de triagem simples e rápido para detectar o MODA em amostras de saliva humana por métodos eletroquímicos usando o BDDE, propondo também um doseamento de baixo custo para controle de qualidade deste fármaco.

### 2.2 Objetivos Específicos

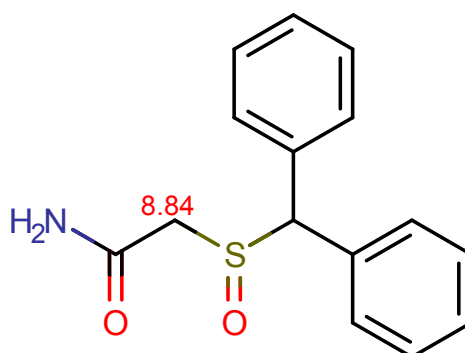
- Avaliar o comportamento eletroquímico da molécula Modafinila através de Voltametria Cíclica (CV, sigla em inglês de *Cyclic Voltammetry*) utilizando o BDDE como eletrodo de trabalho;
- Realizar o estudo de pH e dos demais parâmetros eletroquímicos do MODA;
- Comparar os tratamentos catódico e anódico do BDDE para detecção do MODA;
- Analisar quais as técnicas eletroquímicas de maior sensibilidade e especificidade para o MODA: DPV (sigla em inglês de *Differential Pulse Voltammetry*), SWV (sigla em inglês de *Square Wave Voltammetry*) e MPA em BIA;
- Otimizar os parâmetros analíticos para a determinação do MODA;
- Aplicação do método em amostras em saliva humana e amostras de comprimidos;
- Realizar a validação do método.

### 3 REFERENCIAL TEÓRICO

#### 3.1 Modafinil (MODA)

O MODA é um fármaco sintético produzido originalmente na França, no início dos anos 90 pelos laboratórios LAFON, e rapidamente difundido por vários países. O uso e controle do MODA foi regulamentado inicialmente na farmacopeia europeia (Ph. Eur.) e posteriormente na norte-americana (USP). No Brasil é produzido pela Libbs Farmacêutica Ltda, comercializado com o nome de Stavigile® nas apresentações em comprimidos de 100 e 200 mg. O MODA pertence à classe de compostos orgânicos conhecidos como difenilmetanos, os quais apresentam um grupo metano em que dois átomos de hidrogênio são substituídos por dois grupos fenil. Na Figura 1 é apresentada a estrutura molecular do MODA, que forma um composto racêmico, denominado quimicamente pela IUPAC (sigla em inglês de *International Union of Pure and Applied Chemistry*) como 2-[(difenilmetano)-sufinil] acetamida.

Figura 1 - Estrutura molecular do MODA com indicação do pKa na molécula.



Fonte: CHEMICALIZE, 2021.

Como mostrado na Figura 1, a fórmula química do MODA pode ser representada por C<sub>15</sub>H<sub>15</sub>NO<sub>2</sub>S, cujos grupos funcionais como a amida, o sulfóxido e os dois anéis aromáticos em sua estrutura atribuem à molécula características físico-químicas definidas conforme mostra na Tabela 1. O pKa do MODA é reportado como sendo em torno de 8,84 e a molécula está 100 % distribuída nesta conformação em meio ácido (CHEMICALIZE, 2021).

Tabela 1 - Propriedades Físico-Químicas do MODA.

Fórmula molecular	C <sub>15</sub> H <sub>15</sub> NO <sub>2</sub> S
Massa molar	273,35 g mol <sup>-1</sup>
Temperatura de armazenamento	2 – 8 °C
Temperatura de fusão	164 – 166 °C
Solubilidade em água	0,62 g L <sup>-1</sup>
Solubilidade em metanol	Moderada
pKa	8,84

Fonte: CHEMICALIZE, 2021.

Alguns estudos mostraram que o MODA foi bem tolerado e obteve resultados satisfatórios em pacientes com déficit de atenção e hiperatividade, melhorando a capacidade de concentração e raciocínio dos pacientes (REPANTIS *et al.*, 2010). Além disso, este fármaco apresentou vantagens por desenvolver efeitos colaterais leves como, cefaleia e náuseas, efeitos esses considerados bem mais brandos com relação aos do metilfenidato (Ritalina®) (CHERLAND; FITZPATRICK, 1999), que é usado para a mesma finalidade terapêutica. Segundo as Diretrizes Brasileiras para Tratamento de Narcolepsia, o MODA é o fármaco indicado como primeira escolha para o tratamento da sonolência diurna (ALÓE *et al.*, 2010).

Nos Estados Unidos, o MODA é aprovado pela FDA para o tratamento da narcolepsia e apneia do sono (FDA, 1999). Por outro lado, em 2010 a Agência Europeia de Medicamentos (EMA, sigla em inglês de *European Medicines Agency*) atualizou a lista de indicações do medicamento para apenas sonolência ligada a narcolepsia (EMA, 2010). O princípio ativo Modafinil possui vários nomes comerciais usados em diferentes medicamentos dependendo do país, sendo alguns deles apresentados na Tabela 2.

Tabela 2 - Principais nomes comerciais de medicamentos contendo o MODA como princípio ativo.

Stavigile	Brasil
Provigil	EUA, Reino Unido
Modiodal	França, Portugal, México
Vigil	Alemanha
Modapro	Índia
Modavigil	Austrália
Alertec	Canadá
Vigicer	Argentina
Mentix	Chile
Modasomil	Áustria, Suíça
Vigia	Colômbia

Observa-se então, que o MODA encontra-se disponível em diversas partes do mundo e cada país o regulamenta de forma distinta, contudo, na maioria das vezes, seu uso seja restrito e controlado por órgãos sanitários de saúde. Para entender melhor a ação farmacológica do MODA, os dois próximos tópicos apresentam as características farmacodinâmicas e farmacocinéticas deste fármaco.

### 3.1.1 Farmacodinâmica do MODA

O MODA é farmacologicamente classificado como estimulante atípico do sistema nervoso central, em função de sua estrutura química, dos seus mecanismos de ação farmacodinâmicos e pelos efeitos neurocomportamentais distintos dos estimulantes tradicionais (ALÓE *et al.*, 2010). Embora seu mecanismo de ação não esteja totalmente esclarecido, estudos mostram que o MODA age aumentando a concentração de norepinefrina, acetilcolina, serotonina na fenda sináptica e bloqueia a proteína transportadora da recaptção de dopamina (DAT) e, conseqüentemente, também aumenta a neurotransmissão dopaminérgica D1-D2 meso-córtico-límbica (QU *et al.*, 2008), os quais são neurotransmissores ligados intimamente com o centro de sono e vigília do cérebro.

O MODA é um estimulante não-anfetamínico que promove o estado de vigília. Seu mecanismo de ação exato é desconhecido, mas seu efeito parece estar ligado à potencialização

da atividade dopaminérgica e possivelmente alfa1-adrenérgica especificamente no cérebro (QU *et al.*, 2008).

### 3.1.2 Farmacocinética do MODA

O MODA apresenta boa biodisponibilidade no corpo humano e é bem absorvido por via oral, atingindo concentrações plasmáticas máximas em 2 a 4 horas após a administração e o estado de equilíbrio farmacocinético em 2 a 4 dias (ROBERTSON; HELLRIEGEL, 2003). Sua farmacocinética independe da dose entre 200 e 600 mg/dia e a meia-vida de eliminação é de aproximadamente 12 a 15 horas, o que reflete amplamente a farmacocinética do enantiômero - *L* de vida mais longa (WONG *et al.*, 1999). O MODA é eliminado por metabolismo, principalmente hepático (90%), com subsequente excreção na urina, em que menos de 10% da dose administrada é excretada como fármaco inalterado (ROBERTSON; HELLRIEGEL, 2003). Esse metabolismo ocorre principalmente por meio de desamidação hidrolítica, S-oxidação, hidroxilação do anel aromático e conjugação com glucuronídeo. Os metabólitos excretados do MODA têm contribuições menores das vias oxidativas mediadas pelo citocromo P450 (CYP), sendo que apenas dois destes metabólitos atingem concentrações apreciáveis no plasma e são farmacologicamente inativos, sendo eles: ácido modafinil e sulfona modafinil (SCHAWARTZ, 2009).

O MODA está bem distribuído no tecido corporal com um volume aparente de distribuição (aproximadamente 0,9 L kg<sup>-1</sup>) maior do que o volume de água corporal total (0,6 L kg<sup>-1</sup>) (ROBERTSON, JP., HELLRIEGEL, ET, 2003). No plasma humano, *in vitro*, o MODA liga-se moderadamente às proteínas plasmáticas (aproximadamente 60%, principalmente à albumina) (SCHAWARTZ, 2009). Importante destacar que, pesquisadores da Università Cattolica del Sacro Cuore, na Itália, realizaram um estudo no qual identificaram uma concentração de 10 µmol L<sup>-1</sup> de MODA na saliva humana após uma dose de 100 mg (ROSSI *et al.*, 2008). Este estudo foi usado como base para desenvolver um método eletroquímico suficientemente sensível para triagem de MODA em saliva humana.

Apresentadas as principais características farmacodinâmicas e farmacocinéticas do MODA, cabe ressaltar que alguns fatores podem variar de acordo com o organismo de cada indivíduo. Por isso a importância de o uso do MODA ser sempre por recomendação médica, evitando, portanto, a automedicação e o consumo abusivo.

### 3.1.3 Uso indiscriminado do MODA

Estimulantes do sistema nervoso central (SNC) são usados, frequentemente, para promover uma melhora cognitiva, que é definida pela ingestão de substâncias, por indivíduos saudáveis, para aumentar funções mentais como memória, atenção, concentração, vigília e/ou inteligência (CHATTERJEE, 2004). Alguns podem ser empregados no tratamento de doenças e distúrbios como Transtorno do Déficit de Atenção e Hiperatividade (TDAH), narcolepsia e apneia obstrutiva do sono. Entre os principais efeitos apreciados pelos usuários de estimulantes do SNC encontram-se aumento da concentração e da capacidade de memorização, raciocínio mais rápido e diminuição do sono noturno (REPANTIS *et al.*, 2010). As principais substâncias utilizadas para essa finalidade são: cafeína, MDMA, metilfenidato, Modafinil, piracetam, bebidas energéticas e anfetaminas. Embora os mecanismos de ação específicos possam variar, os psicoestimulantes geralmente atuam direta ou indiretamente através da dopamina que está relacionada a recompensa, motivação, atenção e excitação (VOLKOW *et al.*, 2009).

Embora o MODA tenha sido desenvolvido inicialmente para tratamento da narcolepsia, assim que o medicamento foi lançado no mercado atraiu o interesse dos militares do exército Francês e logo em seguida o exército norte-americano começou a testá-lo (CHERLAND; FITZPATRICK, 1999). Um estudo do governo francês concluiu que o MODA permite que indivíduos saudáveis fiquem acordados por mais de 60 horas, sem apresentar efeitos colaterais significativos (FFL, 1994). A partir daí o MODA foi-se espalhando entre as instituições militares e hoje ele é distribuído de forma rotineira aos soldados americanos (principalmente pilotos da aeronáutica e soldados que precisam trabalhar durante a noite) (CALDWELL, 2004). A busca por aprimoramento cognitivo vem sendo pesquisada e implementada em instituições militares. Outro estudo de 2004 mostra que o MODA atenuou os efeitos da privação de sono em pilotos da força aérea americana (CALDWELL e CALDWELL *et al.*, 2004, MORENO, 2006). Segundo dados de 2012 divulgados pela Royal Society, a principal associação científica britânica, os governos americano e britânico têm prescrito o MODA para soldados envolvidos em operações militares que exigem elevado nível de concentração e longos períodos sem dormir (THE ROYAL SOCIETY, 2012).

Outro destaque de uso indiscriminado de MODA vem dos estudantes (ARAÚJO e FACHIN, 2015), principalmente os que se dedicam aos concursos públicos, constituindo um dos principais grupos vulneráveis ao consumo abusivo dessas substâncias com o objetivo de potencializar as atividades mentais.

Conforme já mencionados em alguns estudos (RKI, 2011; KUDLOW *et al.*, 2013; DIETZ *et al.*, 2016; ), os estudantes que obtêm um bom rendimento nas provas graças ao uso



de *smart drugs*, expressão referente à “drogas inteligentes”, como o MODA, estão cometendo um ato de desonestidade intelectual tão grave quanto plagiar um trabalho ou colar numa prova. A ideia aqui é que o desempenho na prova, nesse caso, não resultaria do mérito do estudante, mas do efeito da droga. A Universidade de Duke (Estados Unidos), por exemplo, estabelece um “código de conduta” para seus estudantes, entre as práticas de “desonestidade acadêmica” listadas no código consta: “o uso não autorizado de medicamentos, que exigem receitas médicas, para aprimorar a performance acadêmica” (DUKE, 2021).

Nos dias atuais muito tem se falado no “*doping científico*”, em que vários cientistas e pesquisadores têm relatado cada vez mais o uso do MODA para se manterem mais tempo acordados, sem perder o raciocínio e concentração (STIX, 2009). Uso esse que conferiu o apelido de “pílula da inteligência” ao MODA (TULLY *et al.*, 2003). Um quinto dos cientistas usa drogas para turbinar seu desempenho, diz uma pesquisa da revista britânica Nature (NATURE, 2008).

### 3.1.4 MODA no *doping*

Por todos os efeitos benéficos do MODA, o seu uso tornou-se indiscriminado em toda parte, mesmo sendo classificado como medicamento controlado na maioria dos países, o comércio mostra indícios de vendas ilegais sem o devido receituário (TULLY, 2003). O MODA ficou mais em evidência no ano de 2003 quando um atleta norte-americano Calvin Harrison, especialista nos 400 metros, foi excluído da equipe de atletismo do Estados Unidos (EUA) que iria disputar as Olimpíadas de Atenas em 2004. Harrison, de 30 anos, teve um teste *antidoping* positivo para o MODA no dia 21 de junho de 2003 e foi suspenso por dois anos a partir de 26 de julho de 2004 (USOC, 2003). Na mesma equipe americana, traços do MODA foram detectados na urina do velocista Kelli White, ganhador de dois ouros (100 m e 200 m) no Mundial de Atletismo, em Paris (USOC, 2004). Diversos casos, em outros esportes foram relatados no mesmo ano, como em um campeonato de xadrez na Espanha (EL PAÍS, 2017). Por esses e outros motivos o MODA foi inserido em 2004 pela WADA na listagem de substâncias proibidas em competições esportivas, o qual ainda consta na listagem mais atual (THE PROHIBITED LIST WADA, 2021).

A WADA é uma organização internacional fundada em 1999, sediada inicialmente na Suíça e depois baseada no Canadá (PARK, 2005). Do mesmo modo que outras agências internacionais, ela possui escritórios regionais na Europa, África, Ásia e América Latina. Sua função é orientar atividades de pesquisa e educação para o monitoramento do código mundial *antidoping*. Este código regulamenta as substâncias banidas das atividades desportivas, bem

como os testes e normas técnicas que devem ser usados para sua detecção (WADA, 2014). Nos últimos anos, essas substâncias vêm compondo listas cada vez mais extensas, *pari passu* com o desenvolvimento de testes laboratoriais mais complexos e dispendiosos. A WADA é considerada pela Convenção Internacional Contra o *Doping* no Esporte, das Nações Unidas, como a agência de referência na regulamentação do *doping* (UNESCO, 2005).

Em relação às metodologias analíticas empregadas no controle *antidoping* estabelecidas pela WADA, são divididas em 3 etapas: coleta da amostra, *screening* (triagem) e confirmação do resultado (PEREIRA *et al.*, 2008; WADA, 2009). Portanto, o controle do *doping* pode ser efetuado em amostra de urina, sangue ou ambos. Durante a coleta é verificado algum tipo de manipulação física ou química da amostra biológica (urina ou sangue). A amostra biológica passa por um *screening* que é realizado através de imunoensaio, eletroforese de focalização isoeletrica (eritropoetina sintética), cromatografia líquida (LC) e cromatografia gasosa (GC) (PEREIRA *et al.*, 2008; WADA, 2009). Nesse sentido, buscando evitar a manipulação das amostras é que a saliva surge como uma alternativa de matriz biológica para controle de *doping*.

### **3.2 Amostras de saliva no controle de *doping***

A saliva é uma secreção aquosa encontrada na boca, representada por uma complexa mistura de produtos secretórios (orgânicos e inorgânicos) de glândulas salivares e de outras substâncias provenientes da mucosa da orofaringe, vias aéreas superiores, refluxo gastrintestinal, fluido do sulco gengival, restos alimentares e componentes derivados do sangue (DODDS, 2005).

A saliva é composta por aproximadamente 99,1% de água e 0,9% de outros componentes, destes incluem-se as substâncias inorgânicas como os íons de cloreto, sódio, potássio, cálcio, fosfato, fluoreto, bicarbonato e substâncias orgânicas como albumina, ácido úrico, ácido ascórbico, creatinina, lactato, aminoácidos, além de alguns hormônios (MACHADO, 2007; MOURA *et al.*, 2007; SCHÜTZEMBERGER *et al.*, 2007).

A ideia da utilização da saliva como matriz de análise para métodos de diagnóstico existe há muito tempo, desde 1975, quando Dawes sugeriu que a criação da nova metodologia poderia ser pertinente e viável devido à facilidade da coleta desses fluidos e a quantidade de informações determinantes em seus constituintes (DAWES, 1975).

O fato de a saliva possuir um método simples e não invasivo de coleta, bem como armazenamento fácil e de baixo custo quando comparada à coleta de sangue, tem despertado grande interesse em diversas áreas com o intuito de ser um exame complementar (MOURA *et*

*al.*, 2007). Aliado a adição de técnicas modernas e aparelhos de instrumentação química observa-se, atualmente, a ascensão do seu uso para investigações laboratoriais com aplicabilidade em finalidades de detecção de substâncias e análises clínicas nas áreas médica e odontológica (MEDINA *et al.*, 2004). Além disso, os recentes avanços científicos e tecnológicos estão produzindo melhoras continuadas em aspectos como a determinação dos componentes salivares, a obtenção de amostras comparativas e o aumento da especificidade e da sensibilidade dos procedimentos utilizados. Estes progressos apontam para uma nova era, em que o diagnóstico molecular na cavidade bucal terá grande importância (SLAVKIN, 1999).

Na literatura existem vários trabalhos utilizando técnicas eletroanalíticas publicados a respeito da utilização da saliva humana em testes de identificação de substâncias proibidas no *doping*. Um deles foi detectando o fármaco Selegilina (DOS SANTOS; AMIN; COMPTON, 2019a) e o outro detectando o próprio MODA (DOS SANTOS; COMPTON, 2019b).

Conquanto, um dos principais desafios de se trabalhar com saliva em técnicas eletroquímicas é a questão dos possíveis interferentes que sofrem processos de oxirredução. O ácido úrico (AU) e o ácido ascórbico (AA) funcionam como importantes agentes antioxidantes não enzimáticos, representando mais de 85% da atividade antioxidante total da saliva de indivíduos saudáveis (MOORE *et al.*, 1994; BATTINO *et al.*, 2002; MUSSAVIRA; DHARMALINGAM; SUKUMARAN, 2015). Os níveis de AA e AU encontrados na saliva humana foram de  $1,0 \mu\text{mol L}^{-1}$  e 200 a  $300 \mu\text{mol L}^{-1}$ , respectivamente (SHETTY, 2013; CASTAGNOLA *et al.*, 2002).

### **3.3 Controle de qualidade na fabricação de medicamentos**

Especialistas são unânimes ao afirmar que para se obter medicamentos eficazes e seguros é imprescindível o controle da qualidade dos insumos farmacêuticos ativos (IFAs) (CONDESSA, 2005). Os IFAs são farmoquímicos, mais conhecidos como princípios ativos, sendo a principal matéria-prima dos medicamentos. Existe uma rotina de análise em medicamentos que deve ser realizada com frequência em laboratórios, pois somente desta forma os pacientes que consumirão este produto terão a garantia de que estarão recebendo um medicamento seguro e de qualidade. Todo este cuidado é devido aos acontecimentos constantes com medicamentos falsificados, adulterados e alterados (ANVISA, 2010). Outros fatores também são responsáveis por hoje termos uma atenção maior na produção de medicamentos, como por exemplo, as falhas que aconteciam durante o processo de fabricação ou, também, a má conservação dos produtos (FIOCRUZ, 2019). Dessa forma, o controle de qualidade de

medicamentos na indústria farmacêutica é considerado uma das etapas mais importante do processo industrial.

Em suma, o Controle de Qualidade é o conjunto de medidas destinadas a garantir, a qualquer momento, a produção de lotes de medicamentos e demais produtos, que satisfaçam às normas de identidade, atividade, teor, pureza, eficácia e inocuidade (BRASIL, 2010).

Com a publicação da RDC 301 em agosto de 2019, as diretrizes de Boas Práticas de Fabricação de Medicamentos foram finalmente atualizadas. Após quase 10 anos sem sofrer modificações, a nova resolução veio substituir a RDC 17/2010. Além disso, outras 14 instruções normativas sobre boas práticas de fabricação foram atualizadas, criando um novo marco regulatório do setor (ANVISA, 2020). Diante de um cenário de constante inovação, a modernização no regulamento significa melhoria na qualidade dos processos e mais oportunidades de exportação para a indústria farmacêutica brasileira (CGMP, 2020). Os impactos da RDC 301 na indústria farmacêutica são visíveis tanto no mercado interno quanto externo. Isso porque, na maioria dos países, a importação de medicamentos só é aceita mediante o cumprimento de normas internacionais. Ou seja, é preciso que o país exportador obedeça às diretrizes globais, levando em conta não somente a legislação interna sobre Boas Práticas de Fabricação de Medicamentos.

Desse modo, o país torna-se mais competitivo e apto a filiar-se ao Esquema de Cooperação em Inspeção Farmacêutica (Pharmaceutical Inspection Co-operation Scheme – PIC/S). Ao passo que se torna equivalente a outros 47 países que adotam os guias PIC/S. O principal objetivo na elaboração da RDC 301 em substituição à RDC 17 foi seguir as diretrizes gerais do PIC/S. Dessa maneira, estabeleceu-se os requisitos mínimos de Boas Práticas de Fabricação de Medicamentos para todas as empresas envolvidas na fabricação de remédios, inclusive aqueles em caráter experimental.

Os métodos oficiais propostos nas farmacopeias para o controle de qualidade de medicamentos são na sua maioria baseados nos cromatográficos com detectores MS ou UV. Atualmente, o mais utilizado é o HPLC acoplado à detecção UV (USP and Ph. Eur). Estes métodos são robustos e seletivos, porém frente a outras ferramentas analíticas, apresentam alguns empecilhos, tais como: alto custo na obtenção e manutenção dos equipamentos, reagentes dispendiosos com grande geração de resíduos para as análises de rotina, baixa frequência analítica devido aos tediosos e recorrentes tratamentos de amostras, complexidade de operação precisando de mão-de-obra altamente capacitada. Desta forma, o desenvolvimento de métodos de baixo custo para as análises de controle de qualidade é de interesse da indústria farmacêutica e, principalmente, de extrema importância para as farmácias de manipulação de

pequeno porte. Além disso, a busca por métodos mais rápidos e ambientalmente amigáveis é uma tendência atual no desenvolvimento de novos métodos analíticos.

Neste cenário, surgem as técnicas eletroquímicas que permitem o desenvolvimento de metodologias analíticas sensíveis, seletivas, rápidas, simples e baixo custo (quando comparados com técnicas cromatográficas) e com menores impactos ambientais por não utilizarem solventes orgânicos. Entretanto, apresentam alguns problemas associados à baixa reprodutibilidade entre as análises. Assim, com o intuito de facilitar as análises e tornar o método mais reprodutível, algumas estratégias vêm sendo realizadas, dentre elas, o uso da amperometria de múltiplos pulsos (MPA) acoplado a sistemas automatizados de análise com utilização de eletrodos de trabalho mais estáveis (QUINTINO, 2002). Na MPA há a possibilidade de aplicação de dois ou mais pulsos de potencial, proporcionando a identificação de outros processos eletroquímicos da espécie analisada, além da utilização de um dos pulsos para realização da limpeza eletroquímica do eletrodo de trabalho, tornando assim a detecção eletroquímica mais reprodutível. A associação com sistemas de análise com injeção por batelada BIA (do inglês “*Batch Injection Analysis*”), proporciona uma melhor frequência analítica, redução na geração de resíduos e maior sensibilidade frente a outras técnicas eletroquímicas estacionárias (DOS SANTOS *et al.*, 2011; GIMENES *et al.*, 2015; FELIX e ANGNES, 2010).

Considerando todas essas perspectivas para determinar o MODA em amostras de saliva e farmacêuticas, um levantamento geral dos métodos reportados para determinar esse fármaco é apresentado a seguir, destacando também as possíveis aplicações já realizadas no controle de qualidade e de *doping* desta droga.

### 3.4 Métodos de determinação do MODA

Na literatura são encontrados alguns métodos para a determinação do MODA, tanto em amostras biológicas quanto em amostras farmacêuticas. Conforme mostra a Tabela 3, chama-se atenção para os dois métodos que correlacionam com o método proposto, o segundo que o MODA foi detectado na saliva por meio de GC-MS e o sexto que detectou por métodos voltamétricos utilizando nanotubos de carbono também na saliva. Observa-se que ambos possuem *LOD* (sigla de Limite de Detecção) maiores que o *LOD* do método proposto, o que indica que este possui maior sensibilidade na detecção do MODA.

Tabela 3 - Métodos analíticos para determinação de MODA

<b>Método Analítico</b>	<b>Tipo de Amostra</b>	<b>LOD (<math>\mu\text{mol L}^{-1}</math>)</b>	<b>Referência</b>
GC-MS <sup>1</sup>	Urina	0,109	Tseng <i>et al.</i> , 2005.
GC-MS <sup>2</sup>	Saliva	10	Strano-Rossi <i>et al.</i> , 2007.
GC-MS <sup>3</sup>	Urina	73	Strano-Rossi <i>et al.</i> , 2007.
HPLC-RP <sup>4</sup>	Farmacêutica	3,65	Younus, <i>et al.</i> , 2013.
LC-UV <sup>5</sup>	Farmacêutica	0,055	Harvanová <i>et al.</i> , 2017.
SPE-CNT-AdSV <sup>6</sup>	Saliva	2,0	Dos Santos <i>et al.</i> , 2019.

<sup>1</sup>Cromatografia gasosa com detecção no espectrômetro de massas. <sup>2</sup>Cromatografia gasosa com detecção no espectrômetro de massas. <sup>3</sup>Cromatografia gasosa com detecção no espectrômetro de massas. <sup>4</sup>HPLC de fase reversa. <sup>5</sup>Cromatografia líquida com detecção no ultravioleta. <sup>6</sup>Voltametria de redissolução adsorptiva com eletrodo impresso de nanotubos de carbono.

Fonte: Próprio autor.

Como supracitadas, essas técnicas cromatográficas apresentam inconvenientes para serem usadas como métodos simples de triagem do MODA no controle de *doping*, bem como alto custo para o doseamento deste fármaco no controle de qualidade. Embora há um trabalho usando um método mais simples para detectar o MODA em saliva com um sensor eletroquímico baseado em eletrodos impressos de nanotubos de carbono (DOS SANTOS, 2018), a técnica de voltametria de redissolução adsorptiva usada requer um tempo de aproximadamente 30 minutos para executar uma análise. Assim, o desenvolvimento de métodos eletroquímicos mais rápidos e automatizados são ainda de grande interesse para determinação do MODA. Além disso, o uso de eletrodos mais estáveis e reutilizáveis podem oferecer um menor custo para aplicação no *doping* e no controle de qualidade do MODA. Nesse sentido, o método proposto neste trabalho, pela primeira vez, usando o BDDE com sistema BIA-MPA para detecção do MODA tem grande potencial para essas aplicações analíticas.

Nos próximos itens são apresentados uma breve abordagem teórica sobre as técnicas eletroquímicas usadas neste trabalho, bem como do BDDE.

### 3.5 Técnicas eletroanalíticas

A eletroanalítica é um ramo da química analítica que é composta por um conjunto de métodos qualitativos e quantitativos que utiliza as características elétricas a fim de mensurar o analito a partir de fenômenos onde a espécie redox interage fisicamente e/ou quimicamente com os demais componentes do meio, ou mesmo com as interfaces. Essas interações podem ser notadas através do emprego de perturbações controladas ao sistema, como por exemplo, a aplicação de uma diferença de potencial e as medidas, conhecidas por sinais eletroquímicos que podem ser relacionadas com parâmetros intrínsecos da espécie avaliada (PACHECO, 2013; SKOOG, 2009).

Dentre as vantagens que diferem as técnicas eletroquímicas das demais pode citar a possibilidade de as análises serem realizadas diretamente na amostra após uma simples diluição em eletrólito suporte, sem a necessidade de etapas de pré-tratamento mais complexas. Além disso, o baixo custo instrumental e operacional, comparado principalmente às técnicas cromatográficas, aliado a boa sensibilidade e rapidez da detecção, colocaram as técnicas eletroquímicas como uma alternativa em várias aplicações analíticas (WANG, 2001; DE SOUZA, 2003; PACHECO, *et al.*, 2013).

Para a realização das análises eletroquímicas é necessário o uso de uma célula eletroquímica, na qual é inserida uma solução do eletrólito suporte, contendo ou não o analito e, normalmente, três eletrodos, sendo esses de trabalho (ET), de referência (ER) e auxiliar (EA). O ET é onde ocorre o processo de oxidação e/ou redução da espécie eletroativa existente na solução. Neste eletrodo é aplicada uma diferença de potencial que fará com que esse processo de oxirredução ocorra. Já o ER, como o próprio nome já diz, é responsável por controlar o valor do potencial aplicado ao ET, para isso o seu potencial deve ser conhecido e constante, ou seja, servirá de referência. E o EA, também conhecido como contra-eletrodo é responsável por fechar o circuito e manter o ET no potencial constante aplicado durante as análises. Isto é, enquanto a diferença de potencial é aplicada entre o ET e o ER sem passagem apreciável de corrente, entre o ET e o EA haverá uma passagem de corrente para fechar o circuito (SKOOG, *et al.*, 1979; PACHECO, *et al.*, 2013).

Os ER e ET usados em potenciometria e voltametria precisam encontrar-se em condições tais que sobre eles não haja qualquer suspeita quando estiverem operando. O ER responde por cerca de 80% dos problemas nas medições potenciométricas (GALSTER, 1991). Nos sistemas voltamétricos, eletrodos de referência defeituosos podem acarretar desde voltamogramas irregulares, até a completa destruição da superfície do ET quando, sem o valor

de referência garantido durante a varredura, os potenciais fornecidos pelo potenciostato tornam-se desgovernadamente altos.

Desde que o eletrólito suporte esteja em excesso, em relação ao analito, o transporte de massa da espécie eletroativa até a superfície do ET pode ocorrer por:

a) Difusão, na qual a espécie eletroativa é direcionada até a superfície do ET devido à sua concentração na camada de Nernst ser inferior à sua concentração no seio da solução. Neste caso a técnica é denominada estacionária;

b) Convecção, na qual a espécie eletroativa alimenta a camada de Nernst pelo movimento da solução, criado devido a uma agitação mecânica ou fluxo direcionado ao eletrodo. Neste caso a técnica é denominada hidrodinâmica. Cabe destacar que, mesmo com a convecção, o transporte de massa do analito para superfície do eletrodo pode ser transportado por difusão. Todavia, a camada de difusão de Nernst será menor em sistemas hidrodinâmicos frente aos estacionários, proporcionando um aumento da sensibilidade para detecção eletroquímica.

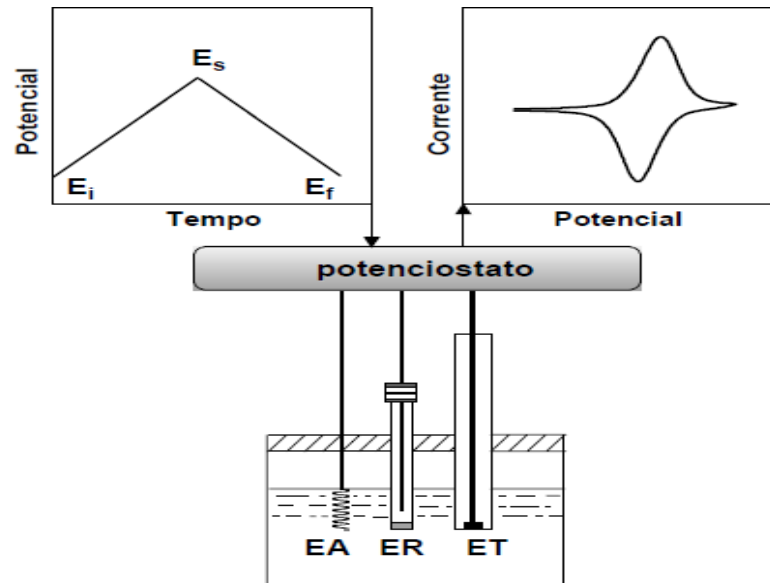
Os eletrodos são conectados a um potenciostato interfaceado a um computador, que realiza o controle das variáveis da técnica eletroquímica utilizada e registra os resultados obtidos. Dentre as técnicas eletroquímicas mais utilizadas, destacam-se a CV, as voltametrias de pulso (onda quadrada – SWV e pulso diferencial – DPV, e a amperometria de múltiplos pulsos (MPA).

### **3.5.1 Voltametria Cíclica (CV)**

A voltametria é uma técnica que possibilita obter informações sobre reações de oxidação ou redução em diversas condições, permitindo avaliar qualitativamente e quantitativamente determinado composto. A CV é geralmente a primeira técnica selecionada na investigação do comportamento eletroquímico de um sistema que contém espécies eletroativas e vem sendo amplamente aplicada em compostos inorgânicos e orgânicos. Essa técnica consiste na aplicação de um potencial que varia entre um valor máximo e mínimo em função do tempo e o voltamograma é a representação dos processos de oxidação e de redução que acontecem na superfície do ET gerado pelas correntes de pico anódica e catódica (TORMIM, 2012). A Figura 2 mostra um esquema de como acontece o processo em um experimento básico de CV.



**FIGURA 2** - Representação esquemática do sinal de excitação e um voltamograma obtidos pela célula eletroquímica usada na CV. Onde:  $E_i$ : potencial inicial;  $E_s$ : potencial de inversão;  $E_f$ : potencial final; ET: eletrodo de trabalho; ER: eletrodo de referência e EA: eletrodo auxiliar.



Fonte: QUINTINO, 2003

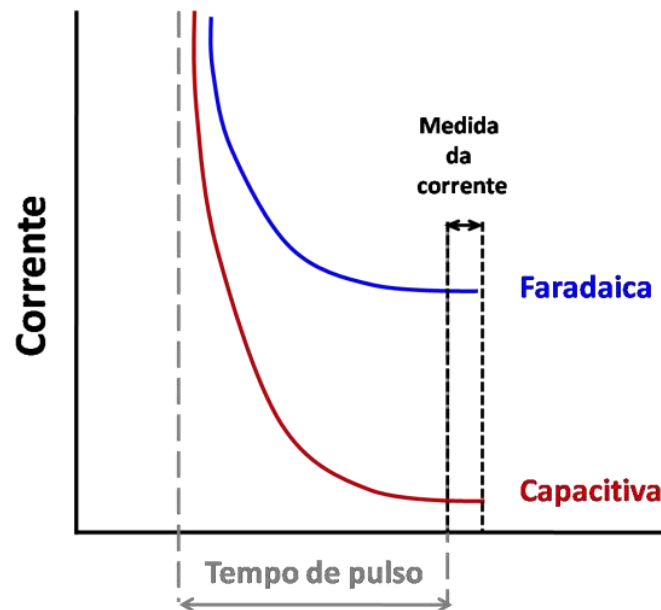
A varredura desse potencial é feita no sentido direto, depois inverso, sendo que os potenciais em que ocorre a mudança de sentido são os potenciais de inversão ( $E_s$ ). Durante a varredura a corrente é medida podendo haver respostas anódicas ou catódicas, o que vai depender do ET, da faixa de varredura e do composto que está sendo analisado (PACHECO, W. F. *et al.*, 2013).

Vale ressaltar que, várias varreduras de potencial podem ser obtidas na CV e não necessariamente precisa ser registrado um ciclo completo nessas varreduras. Além disso, diversas informações podem ser retiradas através da CV, como estudo das espécies redox difundidas livremente na solução e também de espécies imobilizadas na superfície do eletrodo. Embora a CV, normalmente seja a primeira técnica a ser aplicada em um estudo eletroanalítico (SKOOG, *et al.* 1979; WANG, 2006), devido à contribuição da corrente capacitiva não possui grande sensibilidade, sendo sua utilização em eletroanálise limitada quando precisa-se quantificar analitos em baixas concentrações.

Com o intuito de minimizar as intercorrências causadas pela corrente capacitiva na CV, as técnicas de pulso, como por exemplo a DPV e SWV, fornecem opções de análises que consistem em medir a melhor razão entre correntes faradáica e capacitiva (DE SOUZA; MACHADO; AVACA, 2003).

A Figura 3 mostra a dependência da corrente capacitiva e faradáica em função do tempo, após a aplicação de um pulso de potencial. O decaimento da corrente capacitiva é mais rápido (função exponencial:  $e^{-t/RC}$ ) do que o decaimento da faradáica (função linear:  $t^{-1/2}$ ) (SOUZA, 2003). A corrente no final do pulso tem uma contribuição do processo redox do analito muito maior do que a corrente capacitiva.

Figura 3 - Decaimento da corrente faradáica e capacitiva em função do tempo.



Fonte: DE SOUZA; MACHADO; AVACA, 2003.

Assim, a sensibilidade das técnicas de pulso é maior do que a obtida com as técnicas de CV. A DPV e a SWV são as técnicas de pulso mais utilizadas em métodos eletroanalíticos e são discutidas a seguir.

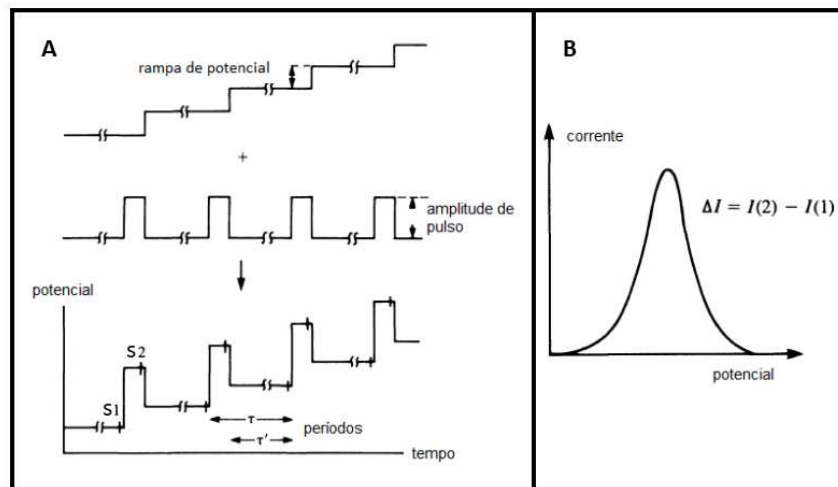
### 3.5.2 Voltametria de Pulso Diferencial (DPV)

A DPV se caracteriza por ser uma técnica em que pulsos de mesma amplitude são aplicados sobrepostos a uma rampa de potencial. A nomenclatura diferencial está relacionada ao fato de não ocorrer retorno ao pulso inicial, e sim a outro pulso, após a perturbação, gerando assim uma rampa de potencial (SKOOG *et al.*, 2006).

A Figura 4A mostra um exemplo esquemático de como ocorre na DPV, a primeira corrente ( $S_1$ ) se refere à corrente antes do pulso, e a segunda ( $S_2$ ) se refere à corrente após a aplicação do pulso e a diferença entre as correntes é plotada num gráfico *versus* o potencial aplicado. Enquanto a capacitiva decresce exponencialmente, a faradáica decresce linearmente. Sendo assim, ao fazer a segunda leitura em um tempo ideal, possibilita que a corrente capacitiva

tenha diminuído o suficiente para ser desconsiderada, minimizando consideravelmente a contribuição da corrente de fundo. (SKOOG, *et al.*, 1979; PACHECO, *et al.*, 2013). Dessa forma é originado um voltamograma cujos picos referentes aos processos faradaicos apresentam uma forma gaussiana conforme mostrado na Figura 4B o voltamograma do pico resultante das correntes.

Figura 4 - A) aplicação do potencial na DPV em função do tempo. B) exemplo de voltamograma de pulso diferencial de um composto eletroativo.

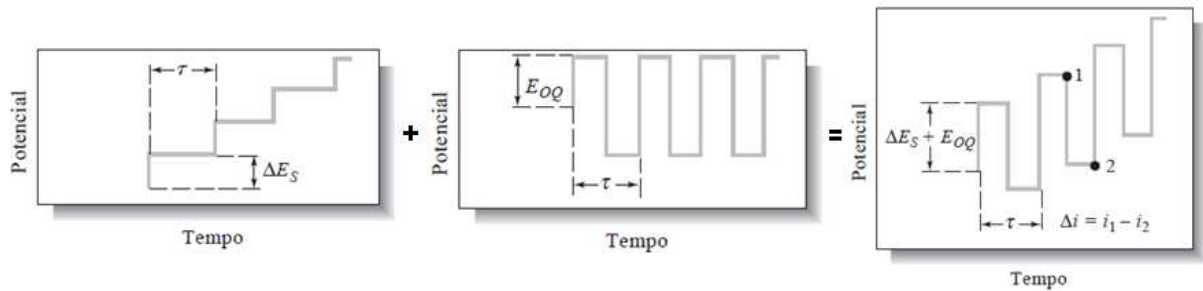


Fonte: PACHECO, *et al.*, 2013.

### 3.5.3 Voltametria de Onda Quadrada (SWV)

A SWV é uma técnica na qual o pico resultante é proveniente da sobreposição de pulsos de potencial com certa amplitude, largura e frequência. As medidas de corrente são feitas no final dos pulsos diretos e reversos, para o decaimento da corrente capacitiva, e após derivação, o sinal é a intensidade de corrente resultante (SOUZA, 2004). As correntes produzidas pelo pulso direto catódico e o inverso anódico são somadas em módulo, e um voltamograma com pico proporcional à concentração é obtido. A Figura 5 é um exemplo esquemático da diferença entre essas correntes em um gráfico que relaciona a rampa de potencial aplicado versus a corrente (SKOOG *et al.*, 1979).

Figura 5 - Esquema de aplicação do pulso em SWV.

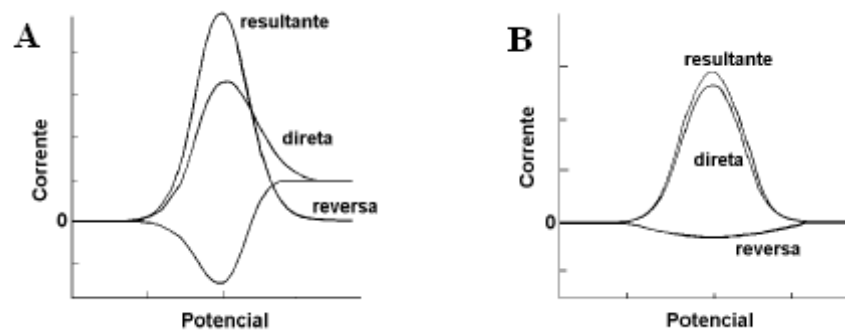


Fonte: SKOOG *et al.*, 1979.

A SWV é uma técnica sofisticada que faz uso da tecnologia computacional não somente para a implementação de experimentos, mas também para prever as respostas teóricas destes, podendo desta forma comparar os resultados teóricos com os experimentais (JOHN, *et al.*, 1981).

A Figura 6A apresenta um esquema dos voltamogramas de onda quadrada para sistemas reversíveis e na Figura 6B para sistemas irreversíveis. Nos voltamogramas obtidos pela SWV a corrente direta e reversa, correspondentes aos processos anódicos (ou catódicos) e catódica (ou anódica), respectivamente, podem ser observadas para os processos reversíveis, bem como a corrente resultante (somatória das correntes obtidas). Para os processos irreversíveis, apenas a corrente direta de um dos processos será monitorada (DE SOUZA; MACHADO; AVACA, 2003).

Figura 6 - Esquema de voltamogramas de onda quadrada hipotéticos. A) Sistemas Reversíveis. B) Sistemas Irreversíveis.



Fonte: DE SOUZA; MACHADO; AVACA, 2003.

A voltametria de onda quadrada permite também obter relações lineares entre  $I_p$  (corrente de pico) *versus* concentração da espécie eletroativa no seio da solução. Com a

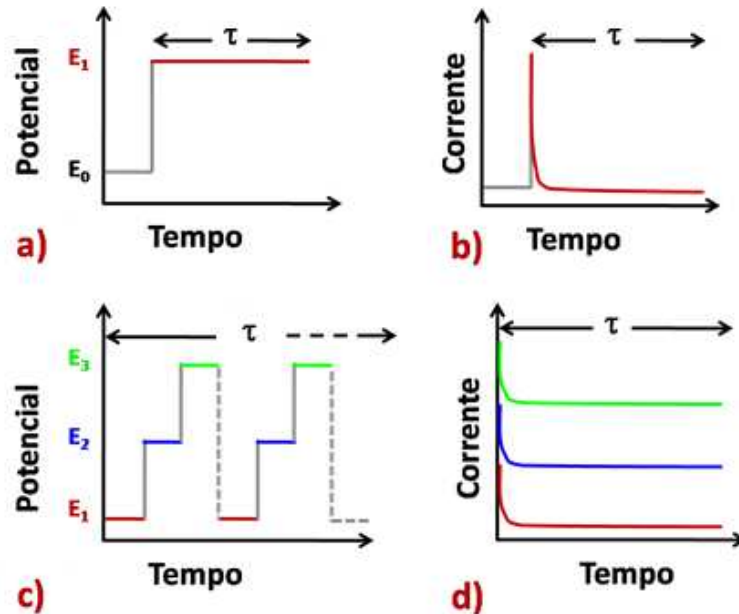
diminuição do período aumenta-se a sensibilidade da técnica, pois a corrente de pico é inversamente proporcional a este.

Vale destacar que, a SWV pode alcançar velocidades de varredura extremamente rápidas, diminuindo o tempo de análise de 3 a 5 minutos para poucos segundos. Além disso, enquanto na DPV um ciclo é caracterizado por um único pulso, na SWV ele se caracteriza por dois, onde esses são realizados no sentido anódico e catódico e a medida da corrente é feita ao final do primeiro e ao final do segundo pulso. Isso faz com que para processos reversíveis, a SWV seja mais sensível, visto a diferença entre as correntes originará uma resultante com o dobro da intensidade (DE SOUZA, 2003; PACHECO, *et al.*, 2013).

#### **3.5.4 Técnicas Amperométricas**

A amperometria consiste em aplicar um potencial fixo e constante ( $E_1$ ) durante certo intervalo de tempo ( $\tau$ ) no ET, conforme representado na Figura 7a, que é definido de acordo com potenciais de oxidação/redução dos analitos. Como resposta o detector monitora a corrente faradáica que decai exponencialmente com o tempo, tal como representada na Figura 7b (BRETT *et al.*, 1994; DOS SANTOS *et al.*, 2008; PEREIRA *et al.*, 2016a). O registro da corrente em função do tempo é denominado como amperograma. Na Figura 7c é apresentado um esquema no qual são aplicados três pulsos de potencial ( $E_1$ ,  $E_2$ ,  $E_3$ ) em sequência no ET, durante um certo período ( $\tau$ ). Como resposta a MPA fornece amperogramas distintos, cada qual correspondendo a um pulso aplicado, conforme mostrado na Figura 7d.

Figura 7 - Degrau único esquemático na amperometria convencional do potencial aplicado (a) e o pico de corrente (b) e três degraus aplicados em sequência na MPA e os respectivos sinais coletados do potencial (c) e da corrente (d).



Fonte: Adaptado de CARDOSO *et al.*, 2016.

As técnicas amperométricas são utilizadas em eletroanálise desde que seja selecionado um potencial suficiente para promover um processo faradáico, oxidação ou redução na superfície do ET. Na amperometria a corrente capacitiva é mínima, pois a dupla camada elétrica é constante no decorrer de toda a medida. Uma das grandes limitações da amperometria é a adsorção de impurezas, de espécies eletroativas ou produtos de reações redox na superfície do ET, causando o envenenamento gradativo do ET e proporcional diminuição dos sinais de corrente, o que compromete diretamente na reprodutibilidade dos sinais. Para contornar este problema, é proposto na literatura o uso da MPA pois o envenenamento do ET pode ser eliminado ou minimizado pela aplicação de pulso de potencial de limpeza ou de condicionamento alternados com o(s) pulso(s) de detecção (DOS SANTOS, 2011).

### 3.5.5 Amperometria de Múltiplos Pulsos (MPA)

Dentre as técnicas amperométricas, destaca-se a MPA, a qual consiste em aplicar pulsos de potencial em sequência e monitorar simultaneamente o sinal eletroquímico da espécie analítica nos diferentes pulsos de potencial. A aplicação de um pulso de potencial adicional, por exemplo, pode ser empregada para constante limpeza eletroquímica do eletrodo.

A MPA contorna de forma simples as limitações da amperometria convencional em relação à realizar determinação simultânea e ainda, a estabilidade do sinal eletroquímico em função do tempo, visto que em sistemas em fluxo, permite que a resposta do eletrodo apresente estabilidade por um período de tempo maior devido a possibilidade de utilização de um potencial para a periódica limpeza eletroquímica realizada durante o experimento, evitando ou diminuindo a contaminação da superfície do eletrodo (OLIVEIRA *et al.*, 2016a; DOS SANTOS *et al.*, 2008; DOS SANTOS *et al.*, 2011).

A MPA é uma técnica disponibilizada, segundo nosso conhecimento, pelo *software* GPES que controla os potenciostatos comercializados pela empresa Metrohm/AutoLab (Eco Chemie) e permite a aplicação de até 10 pulsos de potenciais com a possibilidade de aquisição da corrente em função do tempo em cada pulso de potencial (o que corresponde à aquisição de 10 amperogramas distintos "sequencialmente"). Na Figura 7C é apresentado um esquema no qual são aplicados três pulsos de potencial ( $E1$ ,  $E2$ ,  $E3$ ) em sequência sobre o ET, durante um certo período de tempo, como resposta a MPA fornece três amperogramas distintos, cada qual correspondendo a um pulso aplicado (Figura 7D).

As variáveis a serem definidas no *software* são a sequência de pulsos de potencial ("wave form") e o tempo de aplicação de cada pulso, mínimo de 30 milissegundos. Apesar do tempo de aplicação de pulso ser em geral muito pequena, a leitura da corrente é efetuada apenas nos últimos 5 milissegundos, também com o objetivo do decaimento da corrente capacitiva.

Neste contexto, a MPA possibilita a aplicação de vários pulsos de potencial em um único eletrodo de trabalho, o que pode contornar as limitações da amperometria convencional (CA) e também permite o monitoramento de mais de um sinal analítico pertencente aos processos eletroquímicos das espécies analisadas, ou seja, em um pulso de potencial pode ser monitorado o sinal da oxidação e no outro o sinal de redução, proporcionando à técnica, maior seletividade em amostras complexas, como as de fluidos biológicos (GIMENES *et al.*, 2010; DOS SANTOS *et al.*, 2011).

A MPA possibilita também a quantificação seletiva de dois compostos eletroativos presentes em uma mesma amostra (DOS SANTOS, 2008). Um composto é diretamente detectado em um primeiro pulso de potencial (sem interferência da outra espécie). Em um segundo pulso de potencial (de maior intensidade), ambos os compostos presentes na amostra são oxidados e o segundo composto é detectado indiretamente (2º pulso espécie).

### 3.6 Sistema BIA

Um dos principais obstáculos dos métodos eletroanalíticos está relacionado a baixa reprodutibilidade dos resultados obtidos devido aos problemas de contaminação e/ou passivação da superfície do sensor eletroquímico (ET). Uma alternativa para contornar estes inconvenientes é o uso de técnicas eletroquímicas que proporcionem maior robustez da análise, promovendo o desenvolvimento de métodos mais vantajosos e mais passíveis de fato para aplicações em diversas áreas, como no controle de *doping* e no de qualidade. Dentre esses sistemas, destaca-se o uso do sistema de Análise de Injeção em Fluxo (FIA, sigla em inglês de *Flow Injection Analysis*) e do sistema de Análise de Injeção em Batelada (BIA, sigla em inglês de *Batch Injection Analysis*), que são sistemas bastante explorados tanto na área de pesquisa como em indústrias, pois apresentam além das vantagens citadas, uma alta frequência analítica, portabilidade e maior automatização das análises (DOS SANTOS, *et al.*, 2011). Esses sistemas podem aumentar a reprodutibilidade na detecção eletroquímica devido ao menor contato do analito com a superfície do ET, possibilitando ainda, no caso do sistema FIA, uma limpeza do sensor pela contínua passagem do eletrólito e no caso do sistema BIA, uma constante agitação da solução no interior da célula eletroquímica.

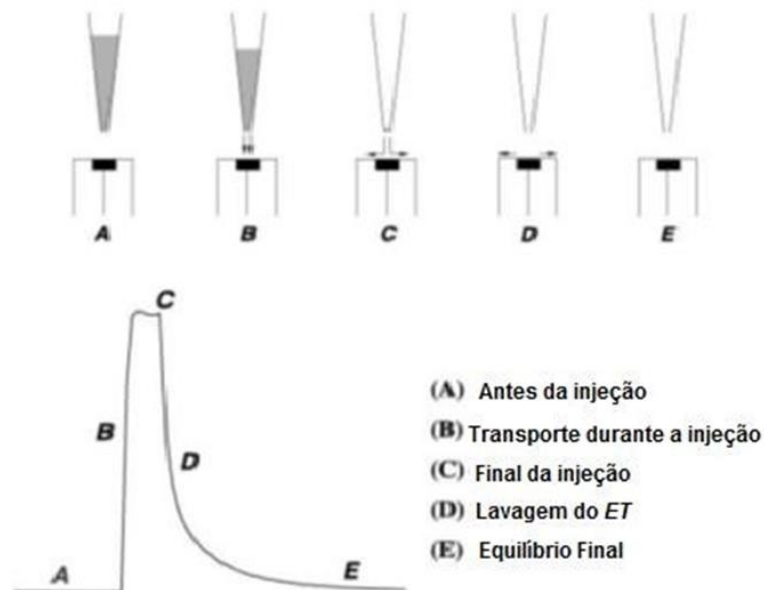
As análises por BIA são uma alternativa atraente ao sistema FIA para o desenvolvimento de métodos analíticos para fins de rotina, conforme mostrado no estudo de Tormin e Muñoz em 2012, em que desenvolveram métodos rápidos para determinação de antioxidantes em biodiesel, alcançando uma frequência analítica de 120 injeções por hora. O sistema BIA, em geral, apresenta maior frequência analítica e portabilidade para aplicações que requerem realização *in loco* e um grande número de análises, como no controle de *doping* e no controle de qualidade, por exemplo. A menor portabilidade do sistema FIA pode ser associada à necessidade do uso de bombas propulsoras, injetores e conectores para carregamento da amostra (TROJANOWICZ, QUINTINO, 2009).

O sistema BIA foi apresentado pela primeira vez por Wang e Taha em 1991, uma técnica analítica baseada na injeção de pequenos volumes do analito na superfície de um detector fixado em uma pequena distância cerca de 2 a 3 mm a partir da ponta de uma ponteira (WANG, 1992). A evolução desta técnica vem crescendo em diversas aplicações, como mostra estudos recentes sobre o sistema BIA com detecção eletroquímica (RIBEIRO *et al.*, 2019; CARDOZO *et al.*, 2016; CUNHA *et al.*, 2013; TORMIN *et al.*, 2012). Nesses estudos os métodos analíticos empregando detectores amperométricos são destacados, apresentando vantagens como: simplicidade, rapidez, eficiência, seletividade, baixo custo e baixo consumo de reagente e alta frequência analítica.



Em vários trabalhos o sistema BIA é utilizado com detecção amperométrica de potencial constante. Nestes casos, o sinal obtido é um pico transiente, na qual a altura ou área da corrente de pico é proporcional à concentração do analito. Este comportamento é ilustrado na Figura 8, retirada de um artigo de revisão publicado por Quintino e Angnes em 2004.

Figura 8 - Etapas operacionais de um sistema BIA com detecção amperométrica.



Fonte: QUINTINO e ANGNES, 2004.

Como mostra a Figura 9, as seguintes etapas são observadas:

- A. Antes da injeção: Corrente de fundo constante, devido apenas a capacitiva do eletrólito, ausência de transferência de elétrons na interface eletrodo/solução;
- B. Transporte do analito durante a injeção: Aumento significativo da corrente faradáica, devido à reação redox do analito, oxidação ou redução, que é transportado mecanicamente pelo injetor até a superfície do ET;
- C. Final da injeção do analito: Obtenção de um máximo de corrente, patamar de corrente faradáica, valor que é constante durante um curto intervalo de tempo;
- D. Lavagem do ET: Diminuição acentuada da corrente devido ao fim da injeção mecânica da pipeta eletrônica. Este evento é promovido devido à mudança do transporte mecânico para o difusional, no qual a amostra é diluída no eletrólito ( $\approx 1000$  vezes).

E. Equilíbrio final: Após a diluição completa do analito no eletrólito a concentração do analito é pequena e uniforme em toda a célula BIA, restabelecendo praticamente o mesmo equilíbrio existente antes da injeção da solução (Etapa A). O alcance deste equilíbrio pode ser acelerado pela convecção criada por um agitador inserido na célula BIA.

Inicialmente, os volumes de solução eletrolítica, dentro da célula, utilizados nesta técnica, variavam entre 250 a 700 mL (WANG & TAHA, 1991; QUINTINO & ANGNES, 2004). No entanto, estudos têm demonstrado que podem ser realizados experimentos BIA com células de menores volumes, em que o volume de eletrólito suporte é suficiente para proporcionar a diluição do analito ou padrão, após obtido o sinal transiente, mantendo as mesmas características atraentes das células de grandes volumes. Além disso, proporcionam o desenvolvimento de sistemas portáteis miniaturizados e evitam o desperdício de reagentes (TORMIN *et al.*, 2014; QUINTINO & ANGNES, 2004; OLIVEIRA *et al.*, 2016b).

O uso do sistema BIA com detecção por MPA surgiu pela primeira vez em 2011 (DA SILVA *et al.*, 2011) e vem sendo usado em vários trabalhos que empregam este sistema de injeção, tanto para determinações de compostos individuais quanto em análises simultâneas em diversas amostras, com destaque para as formulações farmacêuticas (STEFANO *et al.*, 2012; PEREIRA *et al.*, 2013; CUNHA *et al.*, 2013; SILVA *et al.*, 2014; FREITAS *et al.*, 2015; ANDRADE *et al.*, 2016). Em todos estes trabalhos a MPA mostrou ser vantajosa frente à amperometria convencional, pois permite a aplicação de vários pulsos que podem ser utilizados para a quantificação simultânea de dois ou três compostos e/ou para a constante limpeza da superfície do ET. Além disso, o uso de um eletrodo altamente estável, como o BDDE, pode contribuir com a boa estabilidade da resposta eletroquímica, por isso as características e vantagens do BDDE são abordadas a seguir.

### **3.7 Eletrodo de Diamante Dopado com Boro (BDDE)**

Ainda sobre as vantagens dos métodos eletroanalíticos, não se pode deixar de citar a grande variedade de materiais dos quais os ET podem ser compostos sendo esses, capazes de produzir resultados bastante específicos para uma variedade de espécies. Essa é uma grande vantagem do método eletroanalítico, principalmente, porque possui facilidade de alteração do material para análise da espécie permitindo que o sistema seja adequado de acordo com a necessidade de interação química da amostra na elaboração do sensor, aumentando a seletividade, sensibilidade e especificidade do método. A variedade desses eletrodos também é

facilmente acoplada aos sistemas BIA ou FIA somente pela alteração da célula de trabalho ou ainda por pequenas modificações na superfície do ET (LOWINSOHN; BERTOTTI, 2006).

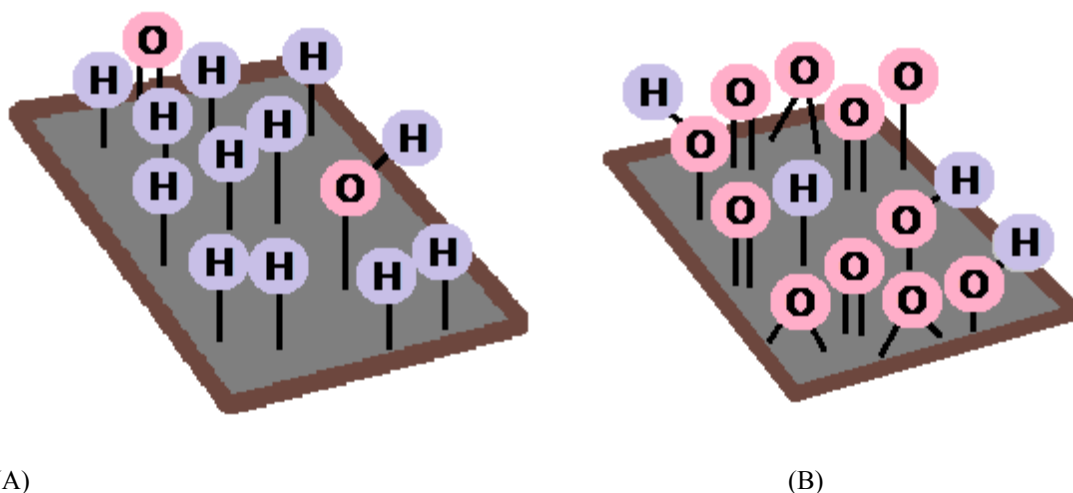
Dentro da química analítica, o desenvolvimento de sensores eletroquímicos tem sido um dos setores majoritários e que tem crescido rapidamente, em especial pelos novos desafios instituídos por amostras de importância industrial, clínica, forense e ambiental, levando a ampliação da procura por sensores com características peculiares, como: alta sensibilidade, seletividade e estabilidade (FREIRE, PESSOA e KUBOTA, 2003). Neste contexto, o BDDE tem chamado atenção para as aplicações nas diversas áreas da eletroquímica para a determinação de compostos orgânicos e inorgânicos em uma ampla variedade de amostras (PLESKOV & BAIRU, 2003), devido à superioridade de suas propriedades eletroquímicas em relação aos outros alótropos do carbono, como o carbono vítreo e o pirolítico (RAO & FUJISHIMA, 2000). Revisões mais recentes mostram que o BDDE vem sendo bastante utilizado em métodos eletroquímicos (CUNHA *et al.*, 2013; ROCHA FILHO *et al.*, 2015; ALECRIM *et al.*, 2016; SOUZA *et al.*, 2018).

As várias propriedades atrativas do BDDE incluem uma larga janela eletroquímica de potencial de oxidação e de redução, entre as reações de desprendimento de hidrogênio e oxigênio em meio aquoso e não aquoso; alta estabilidade química e mecânica e alta resistência contra a corrosão; baixas correntes capacitivas e baixa sensibilidade ao oxigênio dissolvido (PLESKOV, 2002); estabilidade de resposta em longo prazo; fraca adsorção de moléculas polares. Dependendo do pH, o BDDE apresenta a evolução de hidrogênio que começa em -1,5 V e a evolução de oxigênio em + 2,3 V *versus* Ag/AgCl (KCl 3,0 mol L<sup>-1</sup>), ou seja, uma janela de potencial considerável sendo geralmente maior que 3,0 V.

O desempenho BDDE é dependente das condições de pré-tratamento do eletrodo limpeza e/ou ativação. Na literatura são encontrados protocolos utilizando polimento mecânico, lavagem com isopropanol, tratamento térmico e polarização eletroquímica (ZOSKI, 2007). Nesta última, mais usada, em meio de solução de ácido sulfúrico o BDDE pode ser submetido à polarização (SUFFREDINI, 2004):

- Catódica, aplicando-se um potencial ou corrente negativa suficiente para ocorrer a redução da água (eletrólise) gerando gás hidrogênio, deixando a superfície do BDDE funcionalizada com terminações de hidrogênio, conforme mostra a Figura 9A;
- Anódica, aplicando-se um potencial ou corrente positiva suficiente para promover a oxidação da água (eletrólise) para a geração de gás oxigênio, o que conseqüentemente funcionaliza a superfície do BDDE com grupos terminados em oxigênio, conforme mostra a Figura 9B.

Figura 9 - Superfície do BDDE após tratamento (A) Catódico e (B) Anódico.



(A)  
Fonte: SOUZA, 2018.

Como pode ser observado na Figura 9, é de suma importância que o pré-tratamento seja realizado, uma vez que ele altera a superfície do eletrodo de trabalho, e com isso, um mesmo analito pode apresentar diferentes perfis de acordo com cada um dos tratamentos. Há uma tendência de moléculas ou grupos eletroativos mais polares apresentarem uma maior afinidade com tratamento anódico do BDDE. Por outro lado, o tratamento catódico pode mostrar melhor resultados com moléculas ou grupos mais hidrofóbicos, ou seja, mais apolares. Dessa forma, o comportamento eletroquímico de cada molécula no BDDE deve ser sempre avaliado usando os dois tipos de pré-tratamentos (cátodico ou anódico).

Considerando toda potencialidade do BDDE, o sistema de detecção composto por BDDE-BIA-MPA vem sendo muito utilizado em métodos eletroanalíticos, sendo alguns mais recentes mostrado na Tabela 4.

Tabela 4 - Métodos eletroanalíticos usando o sistema de detecção por BDDE-BIA-MPA.

<b>Analito</b>	<b>Pré-trat.</b>	<b>Faixa linear</b>	<b>LOD</b>	<b>Freq. Analit. (inj/h)</b>	<b>DPR</b>	<b>Amostra</b>	<b>Ref.</b>
BHA e BHT	Catódico	0,5 $\mu\text{mol}$ a 1,5 $\text{mmol L}^{-1}$	<100 $\text{nmol L}^{-1}$	170	<1% n = 10	Biodiesel	Tormin <i>et al.</i> , 2012.
Hidroquinona	Catódico	10 a 2000 $\mu\text{mol L}^{-1}$	0,016 $\mu\text{mol L}^{-1}$	108	0,45% n = 20	Farmac.	Cunha <i>et al.</i> , 2013.
Sulfametoxazol e Trimetoprima	Catódico	40 a 198 $\mu\text{mol L}^{-1}$	0,6 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (mín)	75	2,9% (máx.) n = 10	Farmac.	Pereira <i>et al.</i> , 2015.
Anlodipino e Atenolol	Catódico	5 a 25 $\mu\text{mol L}^{-1}$	0,074 $\mu\text{mol L}^{-1}$	70	<3,2% n = 10	Farmac.	Da Silva <i>et al.</i> , 2015.

Fonte: Próprio autor.

Como pode ser visto na Tabela 4, o sistema de detecção BDDE-BIA-MPA apresenta um desempenho analítico atrativo para aplicação em diversas áreas. Nessa perspectiva, o presente trabalho apresenta, pela primeira vez, a determinação do MODA por BDDE-BIA-MPA em amostras de saliva e formulações farmacêuticas.

## 4 PARTE EXPERIMENTAL

### 4.1 Reagentes, soluções e amostras

Os reagentes e soluções utilizados nos experimentos são de pureza analítica (PA), conforme mostrado na Tabela 5 e todas as diluições necessárias foram preparadas usando água deionizada de alta pureza ( $R \geq 18 \text{M}\Omega\text{cm}$ ) obtida de um sistema de purificação de água Milli-Q PLUS (Millipore, Bedford, MA, USA).

Tabela 5 – Lista de reagentes utilizados nos experimentos.

Produto	Empresa	Cidade/País	MM ( $\text{g mol}^{-1}$ )	Pureza/ Dosagem
Ácido Acético Glacial	Proquímica	Rio de Janeiro / Brasil	60,05	99,7%
Acido Bórico	Vetec	Diadema / Brasil	61,83	99,5%
Acido Fosfórico	Proquímica	Diadema / Brasil	97,99	85%
Cloreto de Potássio	Vetec	Duque de Caxias / Brasil	74,55	$\geq 99\%$
Hidróxido de Sódio	Alphatec	Duque de Caxias / Brasil	40	$\geq 97\%$
Acido Sulfúrico	Dinâmica	Diadema / Brasil	98,08	$\geq 95\%$
Metanol grau HPLC	PanReac	Barcelona / Espanha	32,04	99,9%
Ácido Úrico	Dinâmica	Diadema / Brasil	168	98%
Ácido Ascórbico	Dinâmica	Diadema / Brasil	176	99%

Fonte: Próprio autor.

A solução de Tampão Britton Robinson (TBR)  $0,04 \text{ mol L}^{-1}$  foi preparada pela mistura equimolar de ácido acético, ácido fosfórico e ácido bórico em balão volumétrico de 500 mL. Posteriormente, alíquotas destas soluções tiveram o pH ajustado para 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 e 12, adicionando-se solução de hidróxido de sódio  $0,2 \text{ mol L}^{-1}$  para obtenção de força iônica  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ , conforme descrito por Fatibello-Filho (2016). Ressalta-se que no preparo do TBR acrescentou-se 10% de metanol HPLC, devido o padrão do MODA ser diluído nos mesmos 10% de metanol HPLC.

As soluções de ácido sulfúrico foram preparadas pela diluição de volumes apropriados do ácido concentrado (PA) em água deionizada. Para o preparo do branco, foi utilizado o acréscimo de 10% de metanol HPLC.

A solução estoque de MODA do fabricante ToCris Bioscience (Bristol, UK) foi preparada a partir do pó do fármaco em metanol HPLC a uma concentração de  $10 \text{ mmol L}^{-1}$ .

As amostras de comprimidos de Stavigile® (nome comercial do MODA) foram adquiridas em farmácia comercial na cidade de Diamantina-MG. Foram pesados 4 comprimidos de peso médio 252,0 mg. Macerados em grau e com auxílio de pistilo, e então pesou-se 580 mg do pó macerado. Consequentemente, diluiu-se o pó pesado em 60 mL de metanol HPLC e logo em seguida, essa solução ficou durante 30 minutos em um sonicador. A partir daí a solução ficou em torno de 24 h em temperatura de 2 a 8 °C. Após esse período de extração, foi realizada a centrifugação e retirado o sobrenadante, o qual constitui a amostra de trabalho do comprimido.

As amostras de saliva utilizadas nos testes foram obtidas de voluntários de ambos os sexos e de diferentes idades. A coleta foi realizada através do dispositivo Salivette® (Figura 10), que consiste em um rolo de algodão hidrófilo que mede cerca de 1 cm de espessura e 3,5 cm de comprimento, envolto por um tubo de plástico de fundo cônico que pode ser levado à centrífuga para extração da saliva. Durante a coleta o algodão permaneceu sob a língua por 2 min, para que a saliva fosse absorvida, sendo depois centrifugado à 2800 rpm por 5 min para recuperação da amostra. A coleta pelo Salivette® foi realizada permitindo a obtenção de até 2 mL de saliva.

Figura 10 – Dispositivo de coleta Salivette®. A) Tubo que contém as demais estruturas do kit. B) Rolo cilíndrico de algodão que mede aproximadamente 1 cm de espessura e 3,5 cm de comprimento utilizado para coleta de saliva.



Fonte: Próprio autor

A coleta da amostra foi realizada em no máximo 1,0 h antes das análises pelos métodos eletroquímicos, de acordo com as recomendações indicadas para a coleta de saliva que

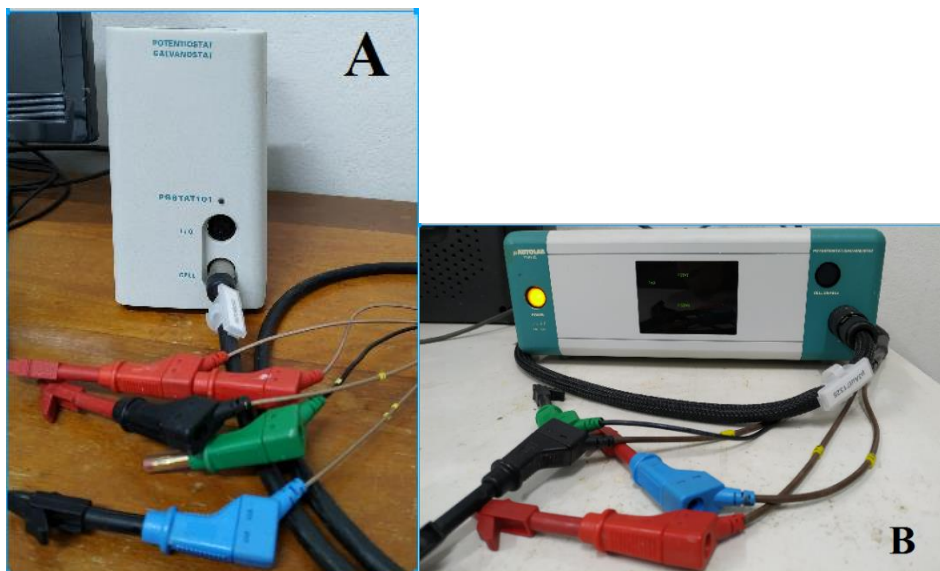
inclui: ausência de alimentação por um período de no mínimo 30 min antes da coleta; lavagem da boca apenas com água potável antes da coleta com bochechos leves (LUMIKARI, L. M. *et al.* 1995).

#### 4.2 Instrumentação

Para medidas e ajustes de pH das soluções foi utilizado um pHmetro modelo Microprocessor *pH/mV* meter 1pHB500. Para a calibração das pipetas e obtenção das massas dos comprimidos foi utilizada uma balança analítica com quatro casas decimais (FA2104N, Bioprecisa Eletronic Balance). Para a dissolução das amostras foi utilizado um Banho ultrassônico Ultra Cleaner 800 Unique.

Para execução das técnicas eletroquímicas foram utilizados dois modelos de potenciostatos/galvanostatos, um AutoLab modelo PGSTAT101 interfaceado a um microcomputador contendo o *software* NOVA 2.1. (Figura 11A) e um outro modelo  $\mu$ AutoLab TYPE III com interface do *software* GPES 4.9 (Figura 11B), ambos equipamentos da fabricante Metrohm. A alternativa de se utilizar os dois tipos de *softwares* foi pelo fato do NOVA 2.1 não possuir, ainda, o módulo de amperometria de múltiplos pulsos.

Figura 11 - A) Potenciostato AutoLab modelo PGSTAT101. B) Potenciostato  $\mu$ AutoLab TYPE III.



Fonte: Próprio autor.

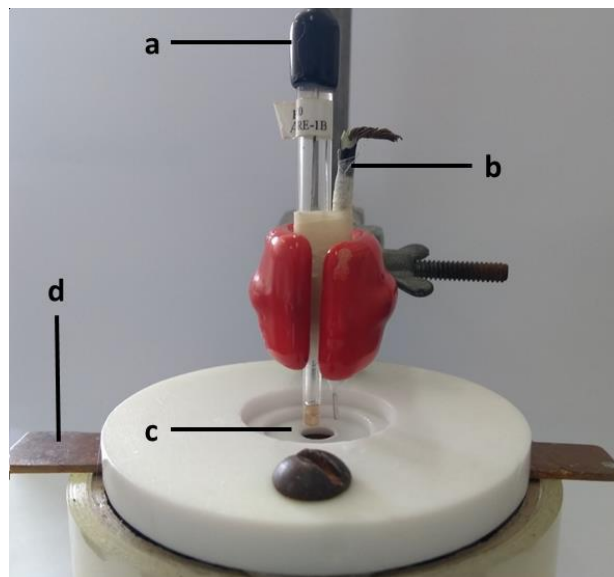
Foram utilizados dois tipos de células eletroquímicas, uma para estudos voltamétricos estacionários e outra para a análise por BIA-MPA, conforme mostra as Figuras 12 e 13, respectivamente. A capacidade de volume dessas células foram de no máximo 500  $\mu$ L e 100 mL, respectivamente.



Para as medidas eletroquímicas voltamétricas e amperométrica foram utilizados os mesmos três eletrodos:

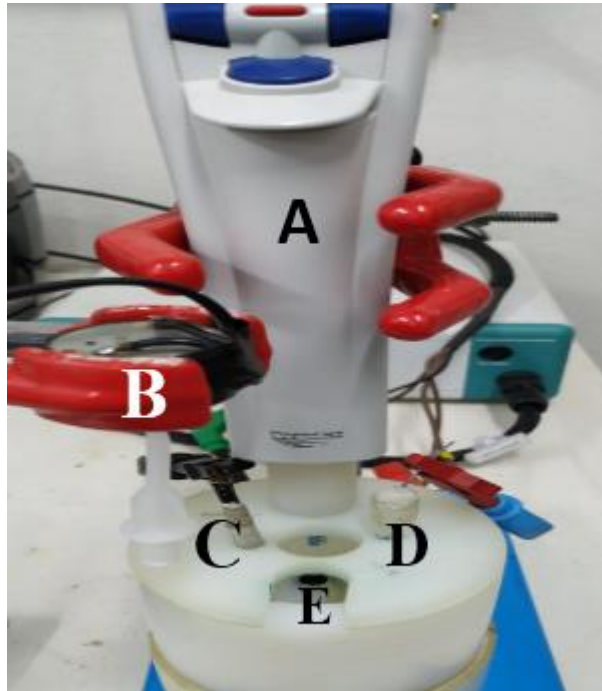
- ET: BDDE, de tamanho aproximado 1 cm x 1 cm, com a área eletroativa delimitada por um dispositivo de vedação (*O-ring*), sendo de 0,14 cm<sup>2</sup> a área geométrica.
- ER: Ag/AgCl/KCl<sub>saturado</sub> construído no próprio laboratório, de acordo com a metodologia descrita por PEDROTTI; ANGNES; GUTZ (1996).
- EA ou também chamado de contra-eletrodo: Fio de platina.

Figura 12 - Célula eletroquímica utilizada nas análises voltamétricas estacionárias. a) ER, b) EA, c) ET (BDDE) e d) placa de cobre para contato elétrico do ET.



Fonte: TEÓFILO, 2018.

Figura 13 - Célula eletroquímica utilizada nas análises amperométricas por BIA. A) Pipeta eletrônica semi-automática. B) Agitador mecânico. C) EA (Fio de platina). D) ER (Ag/AgCl). E) ET (BDDE).



Fonte: Próprio autor.

A célula BIA utilizada foi produzida no próprio laboratório, possuindo um volume interno de aproximadamente 100 mL e foi toda confeccionada em teflon, como mostra a Figura 13. Na tampa estão localizados quatro orifícios, um para acoplar a pipeta eletrônica (A), outro para o agitador mecânico da solução (B), outro para o EA (C) e o outro para o ER (D). E na parte inferior da célula há um orifício para acoplar o ET (E), o qual fica em contato com a placa de metal para condução da corrente. Esta configuração foi necessária para garantir que todas as injeções fossem realizadas na mesma posição vertical em relação ao DDB em configuração *Wall-Jet* para que houvesse o mínimo deslocamento horizontal.

#### 4.3 Detecção eletroquímica

Inicialmente foi feito o estudo do comportamento eletroquímico do MODA em função do pH aplicando a técnica de CV. Para o estudo foi utilizado TBR pH de 2 a 12 por CV, em uma faixa de potencial de -2,0 a +2,0 V a uma concentração de MODA 1,0 mmol L<sup>-1</sup>. Diante dos resultados obtidos nos diferentes pHs, foi definido a continuidade das análises em meio ácido. Por isso foi realizado o estudo em diferentes concentrações de ácido sulfúrico, em 0,10; 0,25 e 0,50 mol L<sup>-1</sup>.

O BDDE foi sempre condicionado em meio do eletrólito otimizado para detecção do MODA antes das análises usando 10 varreduras por CV de +1,3 a +1,9 V, com o intuito de estabilização da superfície do BDDE.

#### 4.4 Estudos dos parâmetros eletroquímicos do MODA por técnicas voltamétricas

O controle do transporte de massa do MODA no BDDE (comportamento adsorptivo ou difusional) foi avaliado por meio do estudo de velocidade de varredura entre 10 e 800 mV s<sup>-1</sup>. Neste estudo não houve aplicação do pré-tratamento do BDDE entre as medidas. Sabendo previamente pelos estudos anteriores (DOS SANTOS *et al.*, 2019) que o comportamento do transporte de massa é predominantemente por difusão do MODA no BDDE, o cálculo do número de elétrons foi avaliado para o único processo de oxidação irreversível desta molécula. O cálculo foi realizado utilizando uma expressão obtida por Krulic e Fatouros que permite encontrar o coeficiente de transferência de carga ( $\alpha$ ) através da SWV (FATOUROS, KRULIC, 1998; KRULIC, FATOUROS, 2011). Conforme mostra a Equação (1) a seguir.

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

Nesta equação, o parâmetro  $R$ , corresponde à constante dos gases (8,314 J K<sup>-1</sup> mol<sup>-1</sup>),  $T$  à temperatura (298,15 K),  $F$  é a constante de Faraday (96.485 C mol<sup>-1</sup>), e  $w_{1/2}$  corresponde à largura do pico à meia altura, para o voltamograma de onda quadrada. Logo, uma SWV foi feita com parâmetros específicos de 5 mV para incremento de potencial, 30 mV para amplitude e frequência de 25 Hz. E o valor da largura do pico a meia altura foi coletado e substituído na Equação (1).

Consequentemente, o gráfico de Tafel foi construído. Para isso, utilizou-se os pontos, na CV, em baixa velocidade (10 mV s<sup>-1</sup>) com comportamento linear entre  $\log I$  vs  $E$ . A equação da regressão linear obtida pela reta desse gráfico, foi equiparada à Equação (2), onde o  $b$  corresponde ao coeficiente angular da reta.

$$n = \frac{RTb}{\alpha F} \quad (2)$$

Nesta equação,  $n$  corresponde ao número de elétrons,  $R$  a constante dos gases,  $T$  a temperatura,  $b$  é o coeficiente angular da reta de Tafel,  $\alpha$  é o coeficiente de transferência de carga obtido pela Equação (1), e  $F$  a constante de Faraday.

#### 4.4.1 Otimização dos parâmetros da SWV e DPV

Os parâmetros (amplitude, frequência e incremento de potencial) envolvendo a detecção por SWV foram otimizados para se obter uma maior sensibilidade e seletividade na determinação do MODA. Cada um dos parâmetros da SWV foi otimizado utilizando-se o padrão do MODA a uma concentração de 10 mmol L<sup>-1</sup>. O processo de otimização foi realizado de modo que um parâmetro foi variado enquanto os outros dois foram mantidos constantes (otimização univariada).

Na investigação das condições ótimas de análise, o primeiro parâmetro otimizado foi o incremento de potencial (também denominado *step*). Nesta etapa os potenciais testados foram de 1; 2; 3; 4; 5; 6; 7; 8; 9 e 10 mV, sendo os valores de amplitude e frequência fixados em 20 mV e 25 Hz, respectivamente. Depois de otimizado o valor de incremento de potencial, este foi mantido fixo em 7 mV (valor otimizado) e a frequência em 25 Hz para que o parâmetro amplitude pudesse ser testado. Desse modo, os seguintes valores de potencial de pulso para amplitude foram testados: 10; 20; 30; 40; 50; 60; 70; 80; 90 e 100 mV. Por último, otimizou-se a frequência a ser utilizada no método sendo os valores testados variando de 10; 20; 30; 40; 50; 60; 70; 80; 90 e 100 Hz e os valores do incremento de potencial e amplitude fixados em 7 mV e 60 mV, respectivamente.

Semelhante ao descrito para técnica de SWV, a otimização da DPV foi realizada em função da melhor sensibilidade e seletividade para detecção do MODA, sendo todos parâmetros também otimizados de forma univariada. Na investigação dos melhores parâmetros, o primeiro a ser otimizado foi o potencial de incremento. Nesta etapa os potenciais testados foram de 1; 2; 3; 4; 5; 6; 7; 8; 9 e 10 mV, sendo os valores de amplitude, tempo de modulação e intervalo de tempo fixados em 20 mV, 10 mV e 0,2 segundos, respectivamente. Logo em seguida, otimizou-se a amplitude, onde os potenciais testados foram de 10; 20; 30; 40; 50; 60; 70; 80; 90 e 100 mV, fixando os valores dos outros parâmetros. O tempo de modulação foi testado variando de 10; 20; 30; 40 e 50 mV. E por último foi otimizado o intervalo de tempo variando de 0,1; 0,2; 0,3; 0,4 e 0,5 segundos.

#### 4.5 Otimização da técnica amperométrica

O sistema BIA-MPA foi otimizado também de forma univariada, avaliando os parâmetros dos sistemas de análise de injeção no BIA e detecção na MPA. Na MPA foram avaliados os potenciais a serem adotados para a detecção do MODA, para a limpeza eletroquímica e avaliou-se também a estabilidade com relação à contaminação da superfície do ET. Em relação ao sistema BIA os parâmetros investigados foram o volume e velocidade de injeção, como também o uso ou não da agitação constante da solução no interior da célula BIA. O parâmetro usado para a escolha da agitação constante do sistema foi o tempo de retorno do sinal eletroquímico (pico) para a linha de base, sendo comparado sem e com agitação da solução. O micromotor construído no próprio laboratório foi eletricamente conectado a uma fonte universal AC / DC.

O volume de injeção foi investigado em função do aumento de sinal numa faixa de 30 – 50  $\mu\text{L}$ , sendo o volume da micropipeta eletrônica utilizada de até 1000  $\mu\text{L}$  para realizar análises em triplicata. O volume de injeção foi analisado em volumes menores devido à quantidade reduzida do estoque de padrão do MODA.

A velocidade de injeção foi averiguada do nível 1 ao 10 (todos os níveis existentes neste modelo de micropipeta da marca *Eppendorf Multipette Stream*), os quais correspondem as velocidades de 16 a 156  $\mu\text{L s}^{-1}$  da micropipeta.

O parâmetro de estabilidade do ET foi avaliado variando injeções intercaladas de amostras de salivas dopadas com baixas e altas concentrações de MODA, para verificar se a superfície seria contaminada com a alta concentração.

#### 4.6 Avaliação dos parâmetros analíticos

A avaliação dos parâmetros analíticos do método proposto foi baseada nas disposições do capítulo IV da RDC nº 166/2017 da ANVISA.

##### 4.6.1 Análise de repetibilidade

Para avaliar a precisão do método foi realizado um estudo de repetibilidade intradia por meio de 10 análises consecutivas do padrão de MODA a 1,0  $\text{mmol L}^{-1}$  em todos os métodos analíticos investigados. O desvio padrão relativo (*DPR*) das análises foi calculado conforme a Equação (3) a seguir.

$$DPR = \frac{s \times 100}{\bar{x}} \quad (3)$$

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

#### 4.6.2 Estudo de linearidade do método

A faixa linear foi definida a partir das correntes de pico apresentadas nas análises de concentrações crescentes de MODA pelas técnicas eletroquímicas otimizadas. O  $LOD$  foi calculado de acordo com a Equação (4) (SKOOG, et al. 1979).

$$LOD = \frac{3 \times s_b}{m} \quad (4)$$

Em que  $s_b$  é o desvio padrão do branco e  $m$  o coeficiente angular da regressão obtida do estudo da faixa linear.

#### 4.6.3 Teste de adição e recuperação do MODA em amostras de saliva e formulação farmacêutica

Estudos de adição e recuperação do MODA em amostras de saliva humana não apresentaram resultados satisfatórios, para contornar este desfecho foram realizados estudos utilizando o método de adição padrão. Para esse estudo foram preparadas amostras de saliva contaminadas com concentrações conhecidas de 3,0; 5,0; 7,0; 9,0; 11,0 e 13,0  $\mu\text{mol L}^{-1}$  do padrão de MODA a partir de uma amostra previamente dopada com 0,6  $\mu\text{mol L}^{-1}$  do padrão de MODA, sendo injetadas da menor para a maior concentração em triplicata.

Para o estudo de adição e recuperação do MODA na formulação farmacêutica, foi realizada uma curva de calibração externa, para isso foram macerados 6 comprimidos utilizando grau e pistilo. O peso médio de cada comprimido foi de 252,00 mg, os quais a fabricante Libbs alega ter 100 mg do princípio ativo em cada comprimido. Portanto, do total da massa macerada, retirou-se 580 mg e reconstituiu em 60 mL metanol grau HPLC, o que *a priori* significa que tem aproximadamente 230 mg do princípio ativo em 60 mL de metanol. A massa molar do MODA é de 273,35  $\text{g mol}^{-1}$ , calculando a concentração molar, tem-se uma solução de 14 mmol  $\text{L}^{-1}$ . A partir desta solução foi realizada uma diluição de 1.000 vezes em eletrólito suporte  $\text{H}_2\text{SO}_4$  0,25 mol  $\text{L}^{-1}$ , com isso obteve-se uma solução de 14  $\mu\text{mol L}^{-1}$ . Com isso foram injetadas em triplicata primeiramente a solução do comprimido, em seguida a solução do padrão e por último uma solução contendo a mistura das duas soluções preparadas de MODA, para verificar a relação da concentração do comprimido de MODA com a concentração conhecida do padrão.

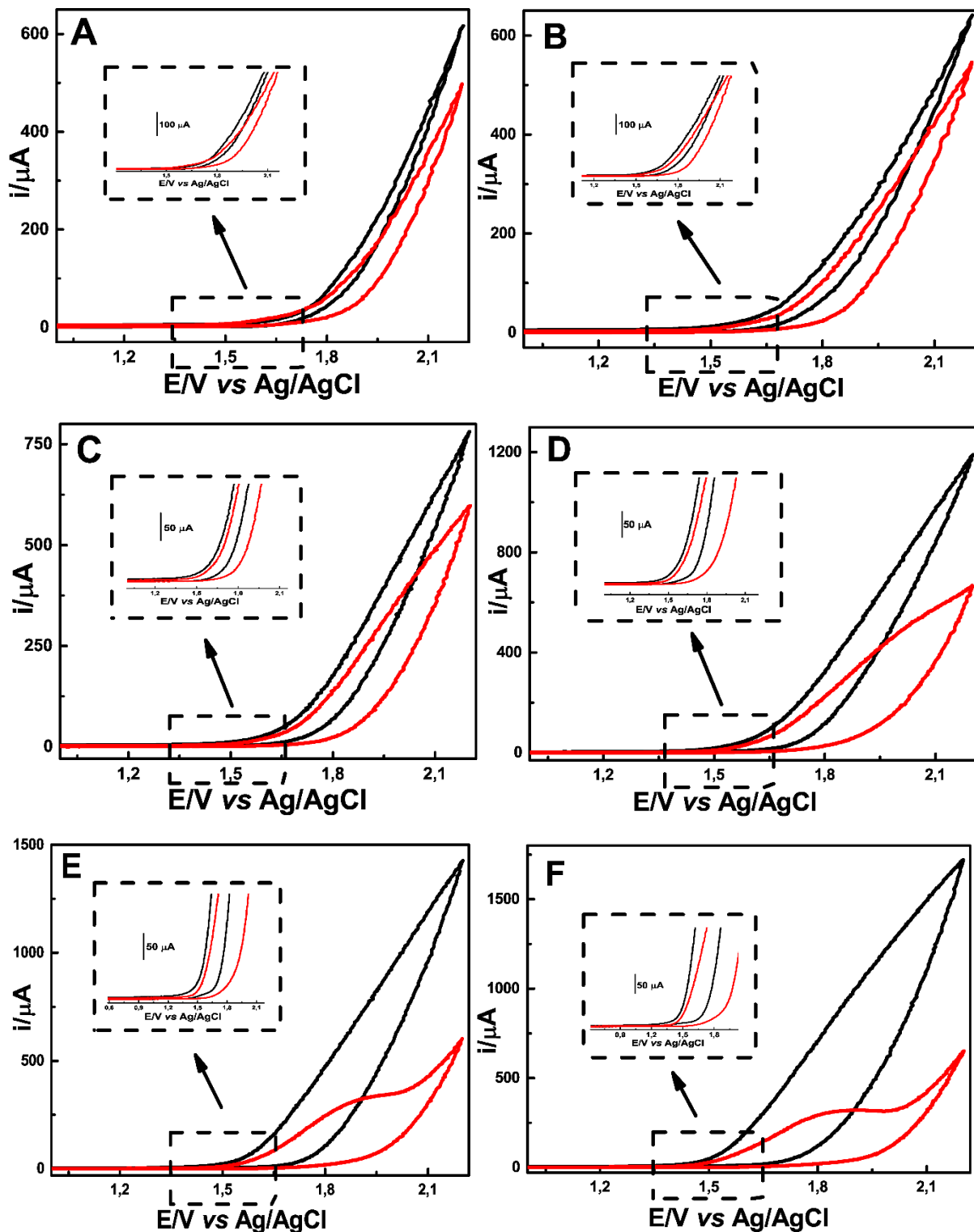
## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados e discussões deste trabalho serão apresentados em duas partes. A primeira será voltada para apresentação e discussão dos resultados que envolvem o comportamento eletroquímico do MODA pelo uso das técnicas voltamétricas (CV, SWV e DPV) e na segunda parte serão discutidos os parâmetros da técnica amperométrica (BIA-MPA) que foram otimizados e permitiram a determinação de concentrações suficientemente baixas do MODA em saliva humana e o doseamento simples e rápido deste do princípio ativo na amostra farmacêutica.

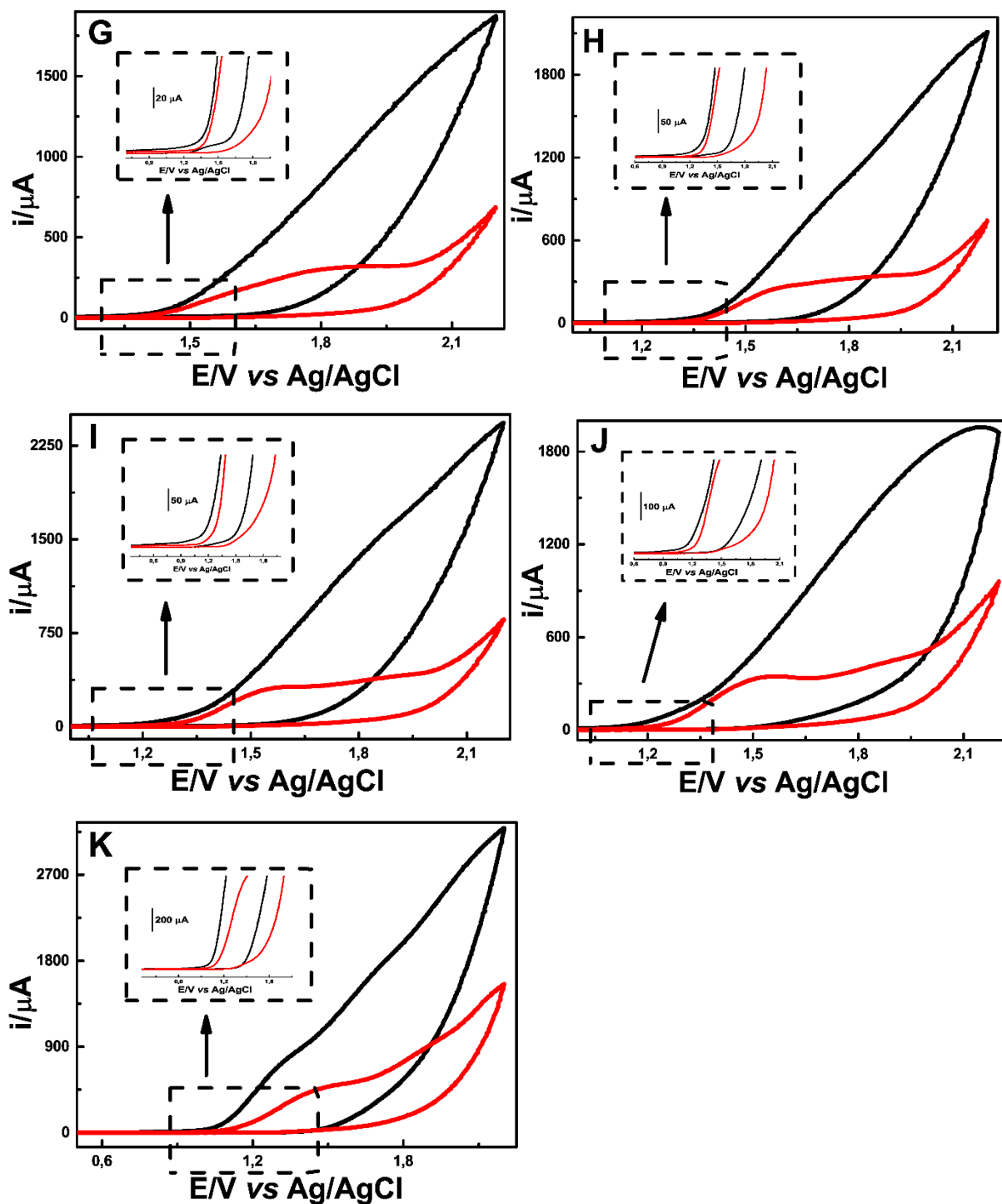
### 5.1 Comportamento eletroquímico do MODA

O comportamento eletroquímico do MODA foi previamente investigado por CV, pela qual foram otimizados o pH, o eletrólito suporte e o tratamento eletroquímico do BDDE. A otimização foi baseada na melhor condição de seletividade e sensibilidade para a detecção do MODA. Neste sentido a sensibilidade para detecção do MODA foi avaliada em função da maior corrente de pico anódica ( $I_{pa}$ ), visto que a seletividade analisada preferencialmente pelo menor potencial de pico anódico ( $E_{pa}$ ) do processo redox ou menor largura de pico a meia altura ( $W_{1/2}$ ) será otimizada melhor no sistema BIA-MPA no BDDE. Dessa forma, os parâmetros para detecção do MODA nas técnicas voltamétricas foram otimizados buscando a maior  $I_{pa}$ . O estudo de pH foi o primeiro a ser realizado usando TBR a  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ , mantendo a força iônica constante  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  pela adição de KCl. Neste estudo o pH foi avaliado na faixa de 2,0 a 12,0 separadamente como mostrado na Figura 14 organizada de A a K.

Figura 14 - Voltamogramas obtidos a partir da análise em CV de MODA  $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$  em TBR na escala de pH de 2,0 (A) a 12,0 (K).





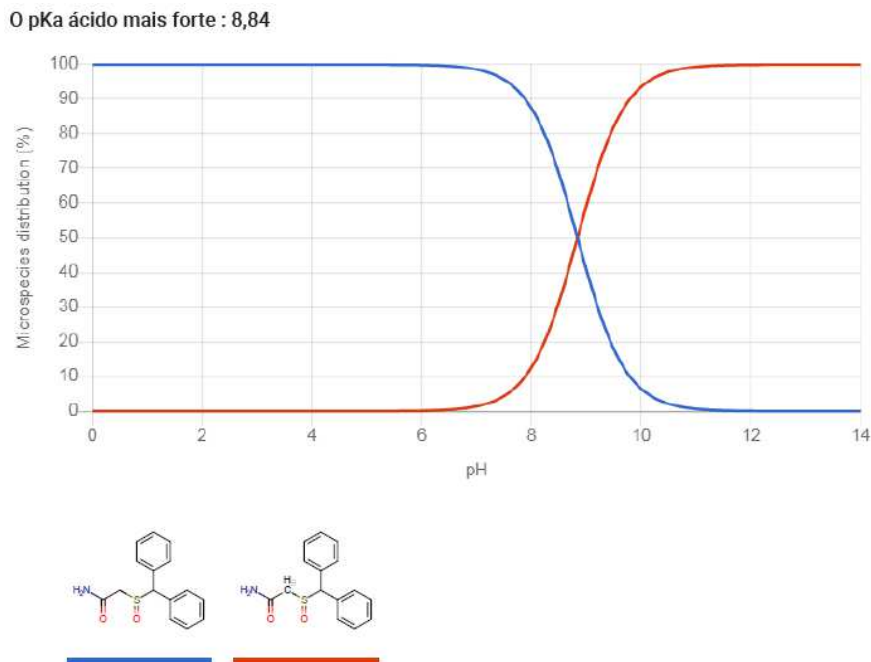


Como previamente reportado por estudos usando eletrodos de carbono vítreo (GCE) e eletrodos de nanotubos de carbono impresso (SPE-CNT) (DOS SANTOS *et al.*, 2019), o MODA somente apresentou um processo de oxidação irreversível em torno de +1,6 V (*vs* SCE) em pH menores que 6,0, sendo o seu potencial de pico anódico ( $E_{pa}$ ) independente do pH nessa faixa.

Por outro lado, pode observar em todos pHs estudados na Figura 14, nenhum processo eletroquímico pode ser evidenciado para o MODA no BDDE, nem mesmo a oxidação irreversível em altos valores de potencial (inserções da Figura 14). O fato de não ter sido observado nenhum processo de oxidação em pH menores que 6,0 no BDDE pode ser devido à menor sensibilidade do MODA neste ET em relação aos outros eletrodos de carbono reportados.

Vale ressaltar que, apesar de ter sido observado um pico de oxidação em pH maiores que 6,0 (Figura 14), não é possível afirmar que esse pico é devido a oxidação do MODA, uma vez que a corrente de fundo do eletrólito foi superior quando comparada com a presença do analito. Esse comportamento pode ser explicado devido alguma interação do metanol (que foi usado como solvente para preparar a solução estoque do analito) com a molécula em pHs acima de 6,0, gerando algum produto eletroativo na solução. Cabe ainda destacar que em todos VCs somente do eletrólito mostrados na Figura 14 há presença de metanol na mesma proporção quando adicionado o analito, ou seja, o pico de corrente anódica, teoricamente, não está relacionado à oxidação do metanol no BDDE. Na busca do melhor entendimento desse comportamento do MODA, a distribuição de pH da molécula foi avaliada pelo programa do site da *Chemicalize* (CHEMICALIZE, 2021), conforme mostra a Figura 15.

Figura 15 - Distribuição de pH da molécula de MODA.

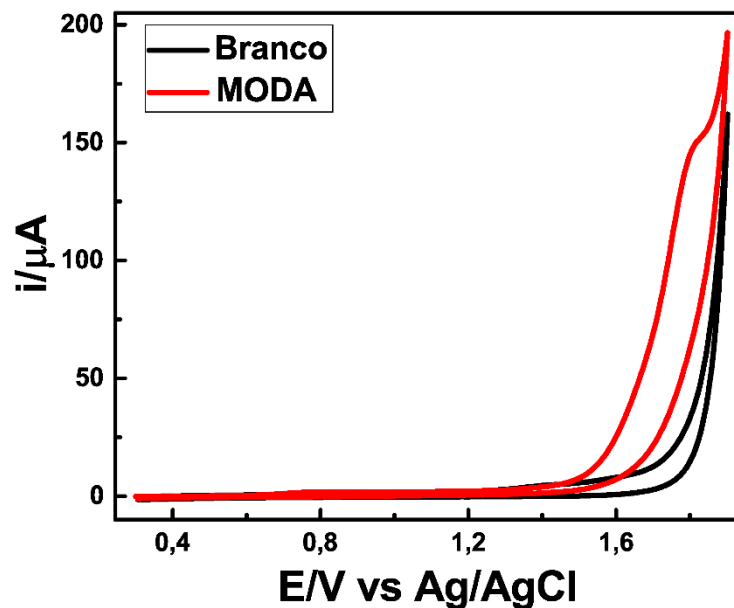


Fonte: CHEMICALIZE, 2021.

De acordo com o programa da *Chemicalize* (CHEMICALIZE, 2021), o valor do pKa do MODA é 8,84, cujo valor é associado ao hidrogênio mais ácido localizado no carbono

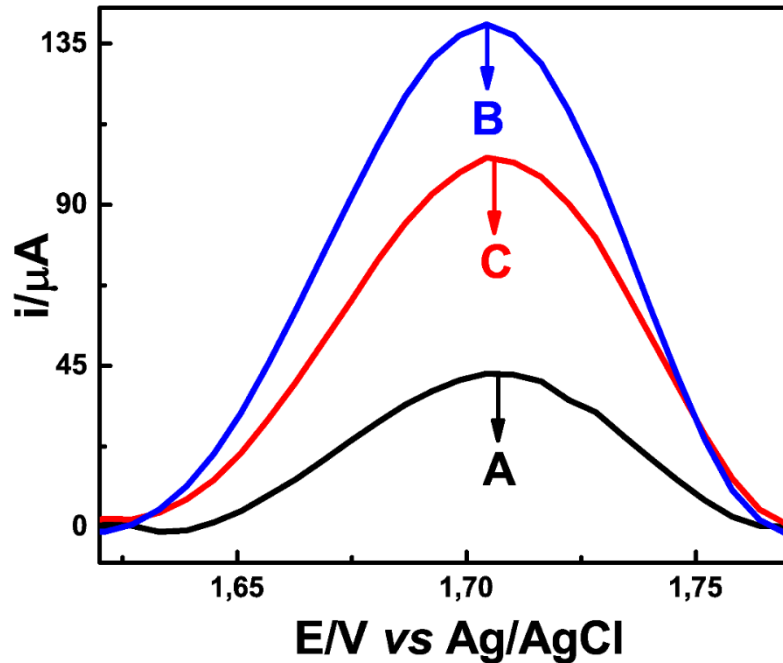
entre os grupos amida e sulfóxido desta molécula. Dessa forma, como mostra a Figura 15, acima de pH 6,0 a molécula do MODA começa a perder este próton mais ácido e poderia estar se envolvendo numa reação com metanol, gerando um eventual produto eletroativo. Todavia, a oxidação desse produto deveria também ter sido observada usando GCE e SPE-CNT, uma vez que o metanol também estava presente quando foi avaliado o comportamento eletroquímico do MODA em pH maiores que 6,0. Dessa forma, como não conseguimos confirmar esse comportamento entre o metanol e o MODA no BDDE, optou-se por realizar a investigação em meio mais ácido utilizando o ácido sulfúrico ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) como eletrólito suporte (Figura 16). Isso porque, há uma indicação de melhores resultados neste meio para detecção do MODA no GCE e SPE-CNT (DOS SANTOS *et al.*, 2019).

Figura 16 - VCs obtidos no BDDE em meio de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  0,25 mol  $\text{L}^{-1}$  (linha preta) e com adição de MODA a 1,0 mmol  $\text{L}^{-1}$  (linha vermelha). Velocidade de varredura 50  $\text{mV s}^{-1}$ .



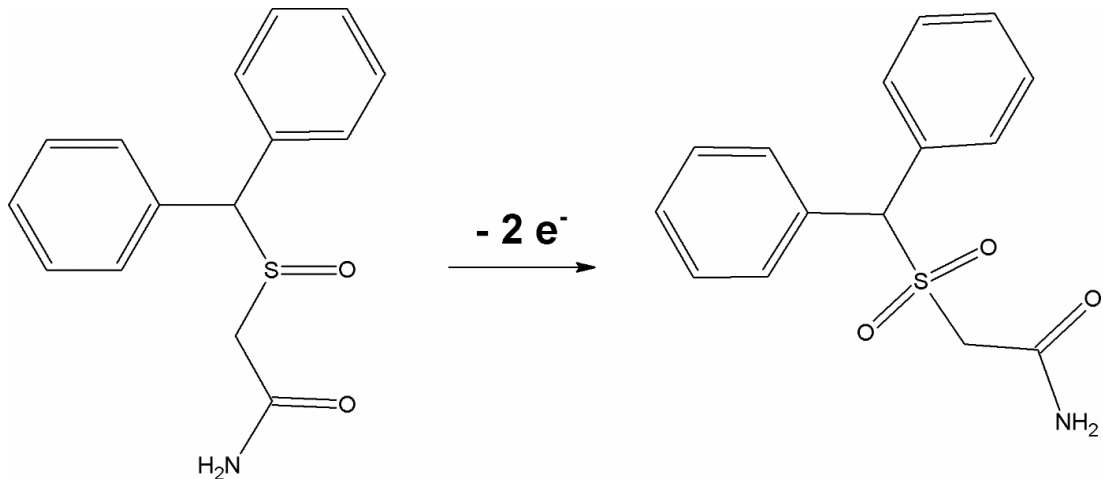
Diante dos VCs obtidos na Figura 16, observa-se de fato que em meio mais ácido o MODA apresenta um processo de oxidação irreversível em torno de 1,70 V no BDDE. Neste sentido, foram comparadas três concentrações do  $\text{H}_2\text{SO}_4$  para detecção do MODA (Figura 17), sendo a concentração 0,25 mol  $\text{L}^{-1}$  (representada pela letra B) a que apresentou melhor resposta de  $I_{pa}$  e, assim, foi a escolhida para estudos posteriores.

Figura 17 - Voltamogramas obtidos por DPV no BDDE em diferentes concentrações do  $\text{H}_2\text{SO}_4$  para detecção do MODA. Em A)  $\text{H}_2\text{SO}_4$   $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ , em B)  $\text{H}_2\text{SO}_4$   $0,25 \text{ mol L}^{-1}$  e em C)  $\text{H}_2\text{SO}_4$   $0,50 \text{ mol L}^{-1}$ . Os parâmetros de amplitude e de incremento de potencial foram de 90 e 6 mV, respectivamente.



Como também pode ser observado na Figura 17, o  $E_{pa}$  do MODA não apresentou deslocamento em função de maiores de concentração do ácido sulfúrico, corroborando com os resultados obtidos no GCE e SPE-CNT (DOS SANTOS *et al.*, 2019). Além disso, esse comportamento indica que este processo de oxidação do MODA no BDDE não tem a participação de prótons e a reação de oxidação pode ser sugerida da mesma forma como reportada anteriormente para molécula do MODA (DOS SANTOS *et al.*, 2019; CHATTERJIE, *et al.*, 2004). Essa sugestão para reação de oxidação do MODA é mostrado no Esquema 1.

Esquema 1 - Reação de oxidação da molécula original (I) para o MODA sulfonado (II).

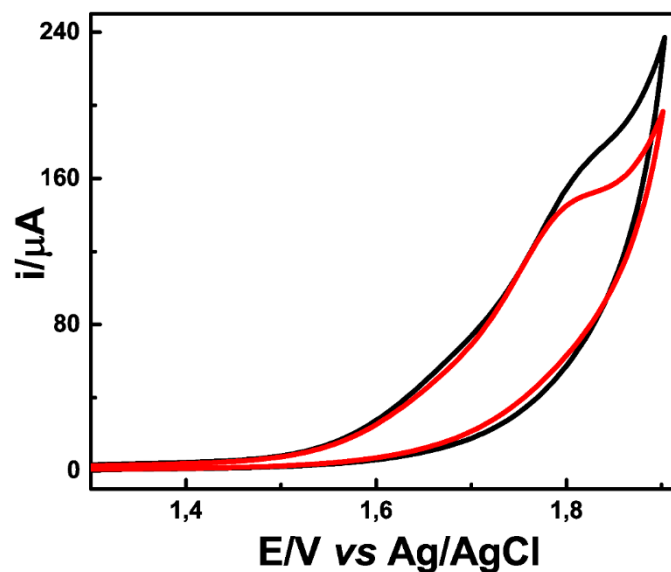


Fonte: Próprio autor

### 5.1.1 Avaliação do pré-tratamento da superfície do BDDE

O estudo do comportamento eletroquímico do MODA em função do pré-tratamento da superfície do BBDE também foi avaliado conforme mostra a Figura 18. Isso porque, como já relatado na literatura, a superfície do eletrodo do BDDE pode influenciar no perfil eletroquímico das espécies eletroativas, tanto na corrente como no potencial de pico dos processos redox (SALAZAR-BANDA *et al.*, 2010).

Figura 18 - VCs mostrando o comportamento do MODA a  $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$  em  $\text{H}_2\text{SO}_4$   $0,25 \text{ mol L}^{-1}$  após tratamento anódico (linha preta) e após tratamento catódico (linha vermelha) com o próprio eletrólito suporte.

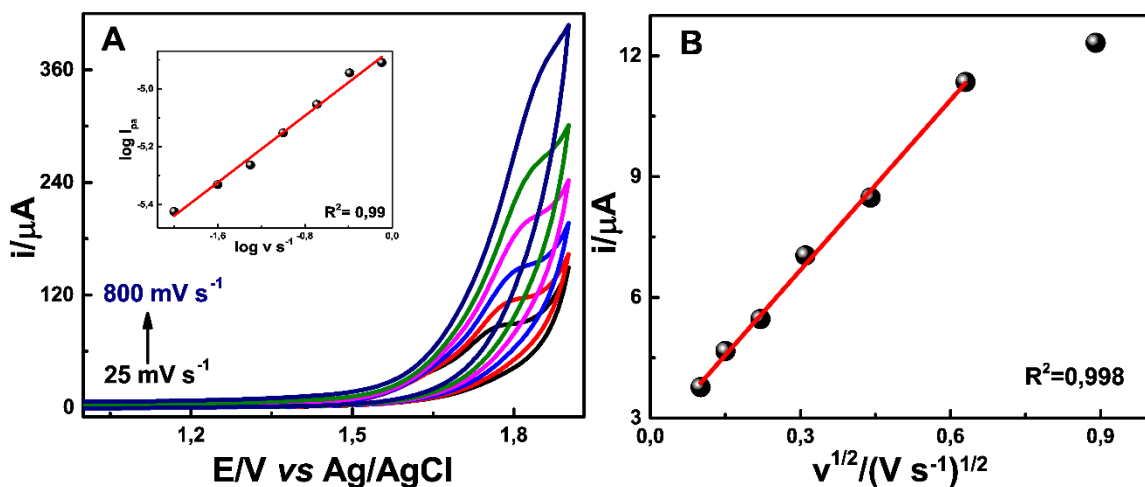


A Figura 18 demonstra os dois pré-tratamentos do BDDE (anódico e catódico), com relação às duas  $I_{pa}$  basicamente não apresentaram diferenças significativas no comportamento eletroquímico do MODA. No entanto, o tratamento catódico do BDDE foi escolhido na continuidade dos estudos do método proposto para detecção do MODA devido a uma melhor definição do pico de oxidação e por apresentar melhor estabilidade da resposta eletroquímica, fato que já foi comprovado para diversos outros analitos (Da Silva *et al.*, 2015; Tormin *et al.*, 2012. Cunha *et al.*, 2013. Pereira *et al.*, 2015). Cabe mencionar que, o mesmo eletrólito otimizado ( $H_2SO_4$  a  $0,25 \text{ mol L}^{-1}$ ) para detecção do MODA, também foi usado para realizar o pré-tratamento do BDDE. Esse procedimento torna a aplicação final do método proposto ainda mais simples, rápida e de menor custo para ser usado no controle de *doping* e de qualidade do MODA.

### 5.1.2 Estudo da velocidade de varredura

A investigação do processo de transferência de massa do MODA da solução até a superfície do BDDE foi realizada pelo estudo da velocidade de varredura ( $v$ ) usando a CV em  $H_2SO_4$  a  $0,25 \text{ mol L}^{-1}$ , conforme voltamogramas mostrados na Figura 19. O estudo de variação da velocidade de varredura foi realizado na presença de MODA  $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$  (+1,80 V), variando a velocidade de varredura de 25 a  $800 \text{ mV s}^{-1}$ .

Figura 19 - A) Estudo da velocidade de varredura do MODA  $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$  em  $H_2SO_4$   $0,25 \text{ mol L}^{-1}$  sobre o eletrodo de BDDE, mostrando os VCs de  $E_{pa}$  vs  $I_{pa}$  em diferentes velocidades de varredura; Na inserção em A, Regressão linear do log da corrente de pico em relação ao log da velocidade de varredura. B) Regressão linear das correntes de pico em relação à raiz da velocidade de varredura.



Na Figura 19A é possível observar um aumento da corrente de pico à medida que a velocidade de varredura aumenta. Além disso, na inserção da Figura 19A é mostrado a relação do  $\log I_{pa1}$  vs  $\log v$ , na qual é mostrado o comportamento linear desta relação com a Equação (5) com um coeficiente de regressão linear ( $R^2$ ) de 0,99.

$$\log i (A) = -4,86253(\pm 0,0153) + 0,28823 (\pm 0,01288) \cdot \log v(V s^{-1}) \quad (5)$$

O valor do coeficiente angular obtido da regressão linear foi de 0,28823, o qual é inferior ao valor teórico de 0,5, o que indica um processo de transferência de massa é controlado predominantemente por difusão (BRETT,1996).

A fim de corroborar com este resultado, foi plotado também o gráfico que relaciona  $I_{pa}$  vs  $v^{1/2}$  (Figura 19B). Nesse estudo, também é mostrado uma relação linear obtida para  $I_{pa}$  vs  $v^{1/2}$  com  $R^2=0,998$ , o que indica que de fato o MODA apresenta um comportamento difusional para superfície do BDDE.

Após a realização de todos parâmetros eletroquímicos do MODA no BDDE por CV, técnicas mais rápidas e sensíveis para detecção do analito foram avaliadas em modos estacionários usando a SWV ou DPV e hidrodinâmico por meio do sistema BIA-MPA.

## 5.2 Detecção do MODA em sistema estacionário por DPV e SWV

Os parâmetros otimizados de ambas as técnicas em modo estacionário pela DPV e SWV foram realizados conforme descrito na parte experimental, ressaltando que foram otimizados a partir da  $I_{pa}$  em função do  $E_{pa}$ , sendo os gráficos da otimização apresentados para cada voltametria nas Figuras 20 e 21, respectivamente. Os parâmetros avaliados e otimizados em cada técnica estão indicados nas respectivas figuras e mostrados na Tabela 6 para DPV e na 7 para SWV.

Figura 20 - Gráficos da otimização da DPV usando uma solução de MODA  $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$  em  $\text{H}_2\text{SO}_4$   $0,25 \text{ mol L}^{-1}$  sobre a superfície de BDDE: A) Otimização do incremento de Potencial; B) Otimização da Amplitude; C) Otimização do Tempo de Modulação e D) Otimização do Intervalo de Tempo.

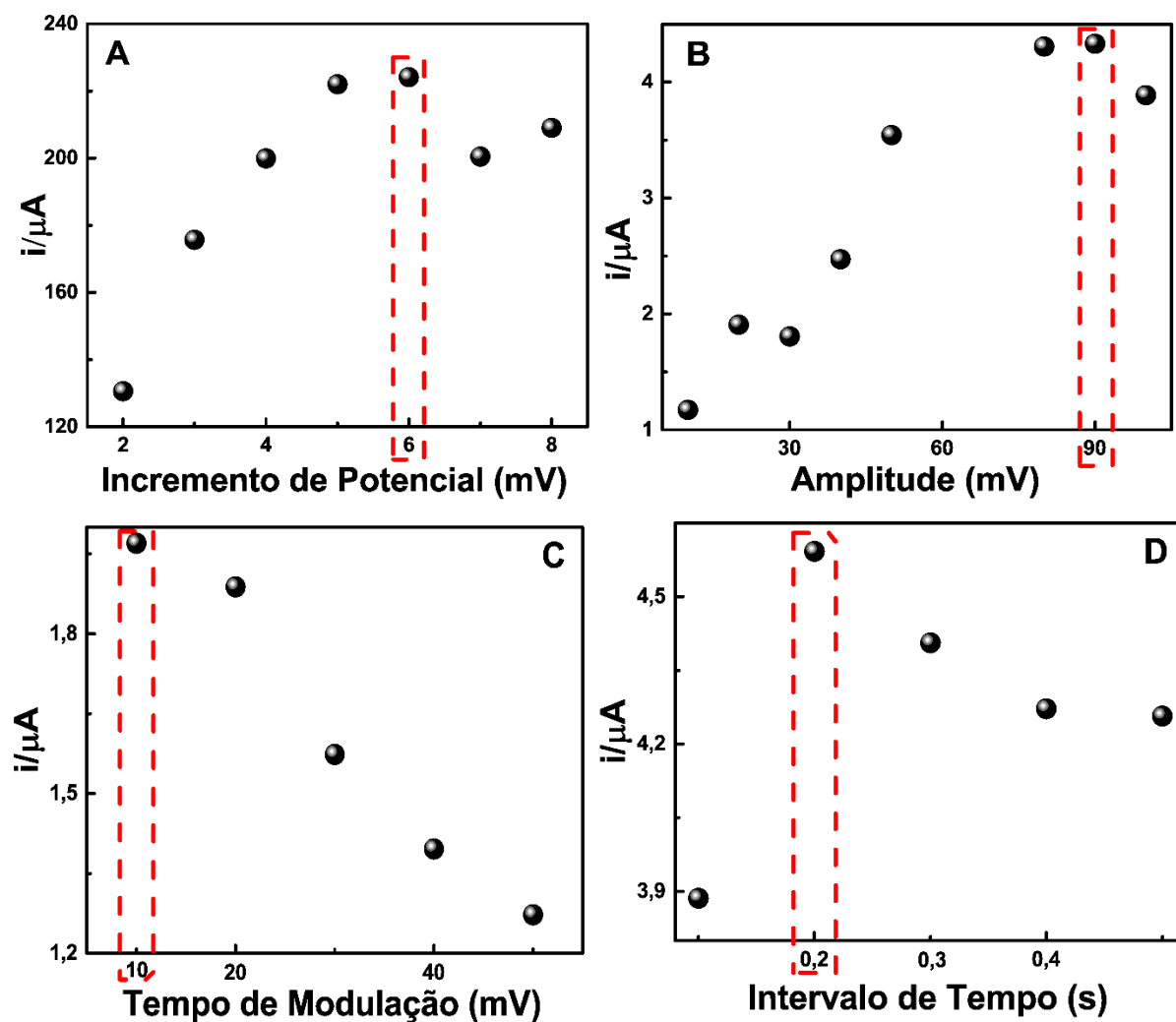


Tabela 6 - Parâmetros otimizados para a detecção de MODA por DPV.

Parâmetros Avaliados	Faixa Estudada	Resultados Otimizados
Incremento de Potencial	2 a 8 mV	6 mV
Amplitude	10 a 100 mV	90 mV
Tempo de Modulação	10 a 50 mV	10 mV
Intervalo de Tempo	0,1 a 0,5 s	0,2 s

Fonte: Próprio autor.



Figura 21 - Gráficos da otimização da SWV usando uma solução de MODA  $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$  em  $\text{H}_2\text{SO}_4$   $0,25 \text{ mol L}^{-1}$  sobre a superfície de BDDE: A) Otimização do incremento de Potencial; B) Otimização da Amplitude e C) Otimização da Frequência.

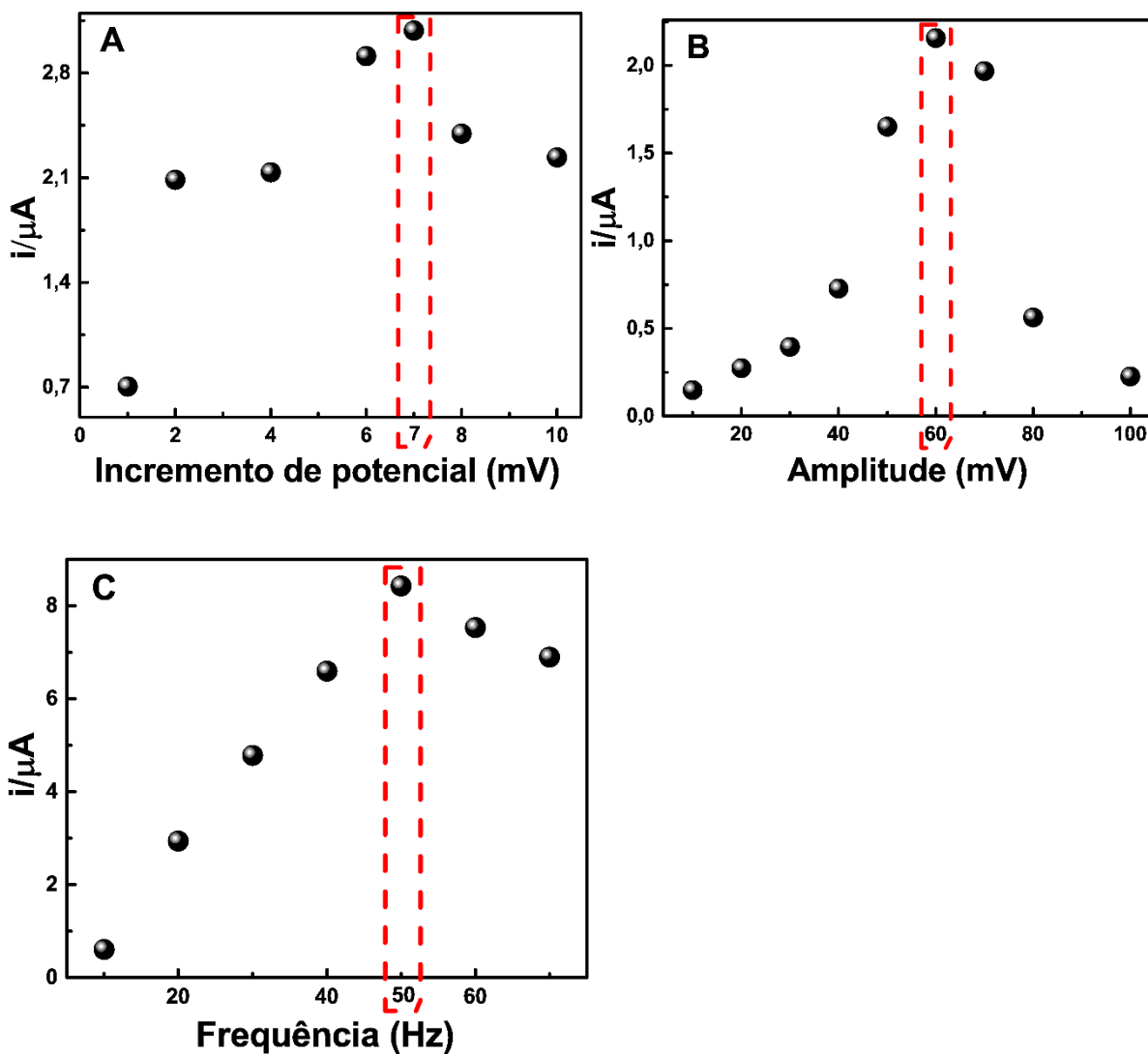


Tabela 7: Parâmetros otimizados para a detecção de MODA por SWV.

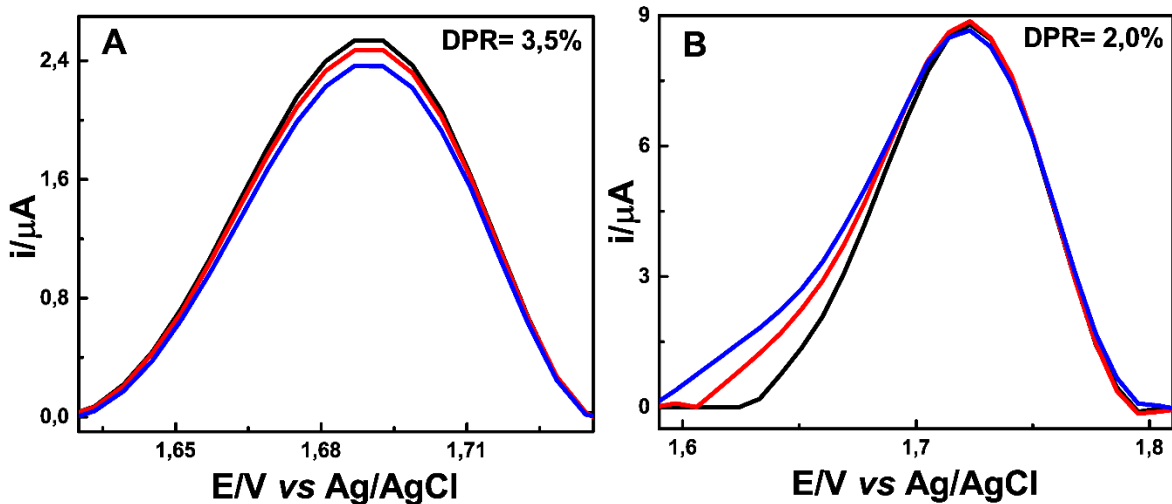
Parâmetros Avaliados	Faixa Analisada	Resultados Otimizados
Incremento de Potencial	1 a 10 mV	7 mV
Amplitude	10 a 100 mV	60 mV
Frequência	10 a 70 Hz	50 Hz

Fonte: Próprio autor.

### 5.2.1 Análise de repetibilidade

Após otimização de todos parâmetros de ambas as técnicas usadas em modo estacionário para detectar o MODA, foi realizado o estudo de repetibilidade para 4 análises consecutivas do padrão desta droga no BDDE pela DPV (Figuras 22A) e SWV (Figura 22B). Vale mencionar que, no estudo de repetibilidade realizou-se apenas uma lavagem rápida da célula eletroquímica com o próprio eletrólito entre as medidas voltamétricas.

Figura 22 - A) Estudo de repetibilidade do MODA em DPV e B) Estudo de repetibilidade do MODA em SWV. Ambas utilizando MODA  $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$  em  $\text{H}_2\text{SO}_4$   $0,25 \text{ mol L}^{-1}$  sobre a superfície de BDDE.



A Figura 22 mostra o estudo de repetibilidade considerado de baixa estabilidade de ambas as técnicas, visto que o  $\text{DPRs}$  teve o valor esperado somente até três análises consecutivas. A partir da terceira análise necessitou-se de realizar o tratamento da superfície do BDDE. Essa baixa estabilidade pode ser devido a adsorção do produto de oxidação do MODA no BDDE, provocando uma contaminação e/ou passivando na superfície deste sensor. Dessa forma, esse comportamento indica a necessidade da realização do pré-tratamento do BDDE a cada três amostras consecutivas.

### 5.2.2 Estudo da linearidade e cálculo de LOD e LOQ

Os estudos das faixas lineares de trabalho para determinação e quantificação do MODA pela DPV e SWV foram realizados avaliando uma faixa de concentração de  $1,0$  a  $110 \mu\text{mol L}^{-1}$  do padrão deste analito, conforme mostra as Figuras 23 e 24, respectivamente.

Figura 23 - Estudo de linearidade por DPV do MODA em  $\text{H}_2\text{SO}_4$   $0,25 \text{ mol L}^{-1}$  sobre o BDDE após tratamento catódico entre as análises. A) VCs obtidos de soluções de MODA em concentrações de  $1,0$  a  $110 \mu\text{mol L}^{-1}$ . B) Regressão linear da  $I_{pa}$  do MODA em função das concentrações.

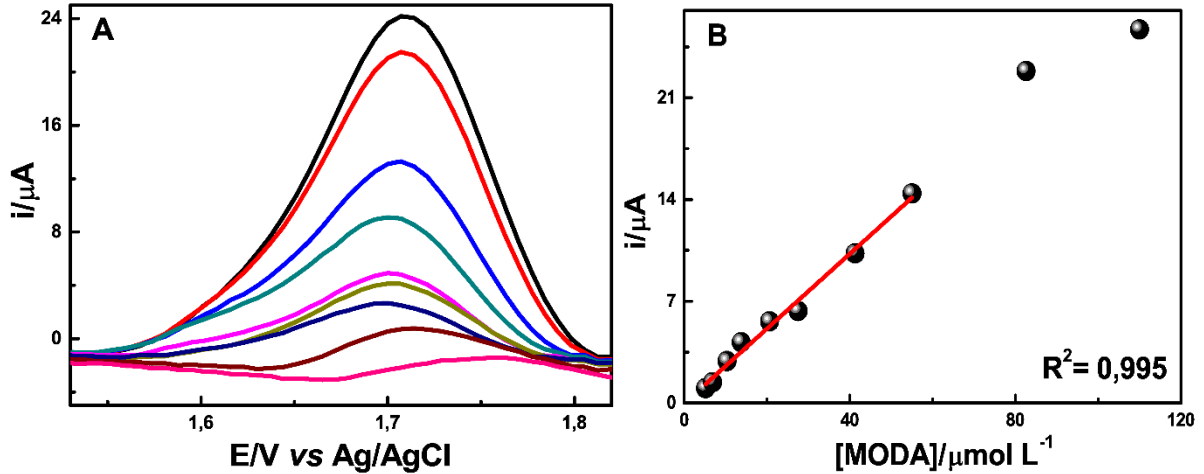
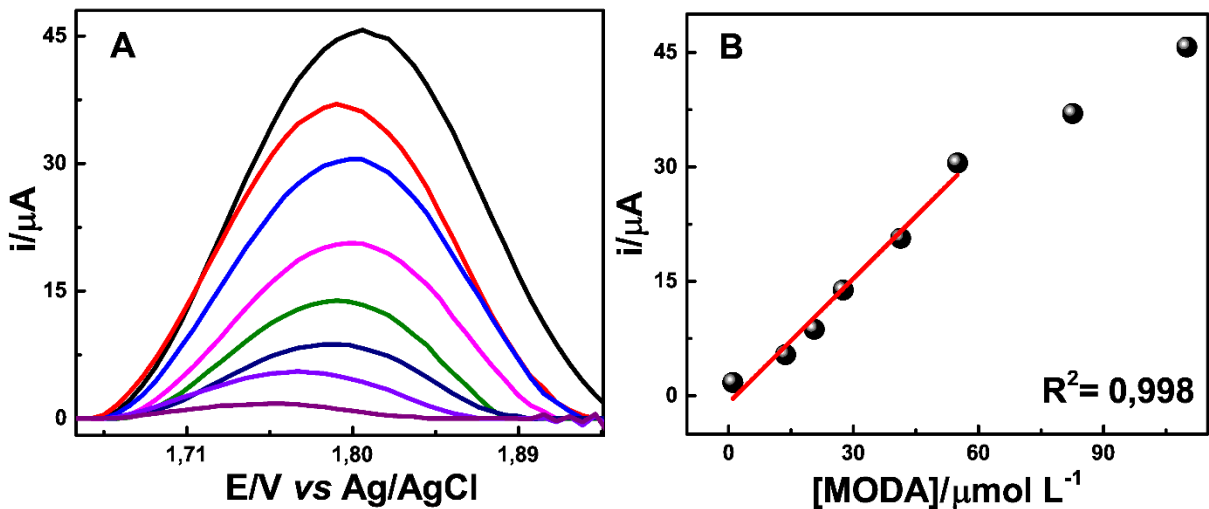


Figura 24 - Estudo de linearidade por SWV do MODA em  $\text{H}_2\text{SO}_4$   $0,25 \text{ mol L}^{-1}$  sobre o BDDE após tratamento catódico entre as análises. A) VCs obtidos de soluções de MODA em concentrações de  $1,0$  a  $110 \mu\text{mol L}^{-1}$ . B) Regressão linear da  $I_{pa}$  do MODA em função das concentrações.



A curva de calibração da DPV observada na Figura 24B foi elaborada com base na média calculada das correntes de pico obtida de cada análise em triplicata. A regressão linear obtida apresentou uma boa linearidade com coeficiente de correlação linear equivalente à unidade ( $R^2 = 0,99$ ) em uma faixa linear de  $7$  a  $83 \mu\text{mol L}^{-1}$ . A equação da regressão linear entre a  $I_{pa}$  e a concentração de MODA é dada pela Equação (6):

$$i(\mu\text{A}) = -2,699 \cdot 10^{-8} (\pm 2,952 \cdot 10^{-7}) + 0,257 (\pm 0,010) \cdot [\text{MODA}] (\mu\text{mol L}^{-1}) \quad (6)$$

Quanto à curva de calibração da SWV, observada na Figura 25B também foi elaborada com base na média calculada das correntes de pico obtida de cada análise em triplicata. A regressão linear obtida apresentou uma boa linearidade com coeficiente de correlação linear equivalente à unidade ( $R^2 = 0,99$ ) em uma faixa linear de 10 a 55  $\mu\text{mol L}^{-1}$ . A equação da regressão linear entre a *Ipa* e a concentração de MODA é dada pela Equação (7):

$$i(\mu\text{A}) = -9,365 \cdot 10^{-7} (\pm 1,242 \cdot 10^{-6}) + 0,544 (\pm 0,039) \cdot [\text{MODA}] (\mu\text{mol L}^{-1}) \quad (7)$$

Portanto, as técnicas mostraram uma faixa linear na região estudada, sendo de 7,0 a 83  $\mu\text{mol L}^{-1}$  para DPV e 10 a 55  $\mu\text{mol L}^{-1}$  para SWV. Embora os *LOD* calculados para as técnicas voltamétricas foram de 4,52  $\mu\text{mol L}^{-1}$  na DPV e 1,81  $\mu\text{mol L}^{-1}$  na SWV, os menores sinais mensuráveis foram de 7,0 e 10  $\mu\text{mol L}^{-1}$  para DPV e SWV, respectivamente.

A Tabela 8 mostra uma comparação de todos parâmetros analíticos obtidos pela DPV e SWV para detectar o MODA no BDDE.

Tabela 8 - Comparação de parâmetros analíticos entre DPV e SWV para detecção do MODA em triplicata (N=3)

<b>Técnica</b>	<b>Faixa linear <math>\mu\text{mol L}^{-1}</math></b>	<b>LOD <math>\mu\text{mol L}^{-1}</math></b>	<b>LOQ <math>\mu\text{mol L}^{-1}</math></b>	<b>Sensibilidade</b>	<b>DPR (%)</b>	<b>Número de amostras</b>
DPV	7 a 110	4,52	13,7	$0,257 \pm (0,010)$	3,5	3
SWV	10 a 110	1,81	5,48	$0,544 \pm (0,039)$	2,0	3

Fonte: Próprio autor.

Apesar dos estudos prévios evidenciarem que a concentração de MODA detectável na saliva autêntica é de 10  $\mu\text{mol L}^{-1}$  (ROSSI et al., 2008)), considerando o menor sinal mensurável (menor concentração da faixa linear obtida), as duas técnicas voltamétricas avaliadas no modo estacionário para detectar este analito seriam ineficazes para aplicação no controle de *doping*. Isso porque, a saliva precisa ser diluída no eletrólito suporte (pelo menos 10 vezes) para utilização do método proposto neste trabalho e, dessa forma, é necessária uma técnica mais sensível para detecção do MODA usando o BDDE. Como alternativa o presente trabalho avaliou o sistema BIA-MPA, cujos resultados são apresentados a seguir.

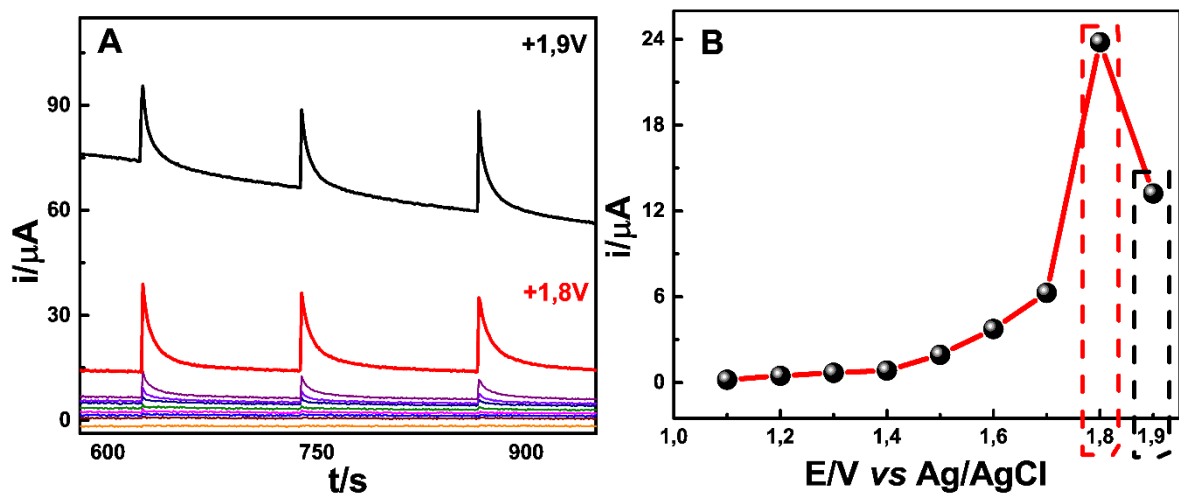
### 5.3 Detecção do MODA pelo sistema hidrodinâmico BIA-MPA

Os parâmetros para a detecção do MODA pelo sistema BIA-MPA foram todos otimizados buscando melhor sensibilidade e seletividade do método proposto. No que tange a sensibilidade, todos os parâmetros foram selecionados avaliando os maiores sinais de  $I_{pa}$  obtidas no pulso de potencial para oxidação ( $E_{det1}$ ) do MODA. A avaliação para aumentar seletividade da detecção do MODA foi realizada por meio da razão entre as  $I_{pa}$  obtidas no  $E_{det1}$  e no segundo pulso de potencial ( $E_{det2}$ ) para detecção deste analito. Os parâmetros analíticos foram todos otimizados em triplicata usando o  $H_2SO_4$   $0,25\text{ mol L}^{-1}$  como eletrólito suporte na célula BIA.

#### 5.3.1 Otimização do potencial e do tempo de aplicação no sistema BIA

A otimização dos  $E_{det1}$  e  $E_{det2}$  do MODA para utilização na MPA foi realizada por meio de um voltamograma hidrodinâmico, o qual foi avaliado e apresentado na Figura 25A. Cabe mencionar que os potenciais foram aplicados pela MPA aplicando diferentes valores de potenciais próximos ao  $E_{pa}$  do MODA no BDDE (+1,8 V vs Ag/AgCl), conforme observado anteriormente pela CV.

Figura 25 – A) Amperogramas obtidos pela injeção em triplicata de MODA  $10\text{ }\mu\text{mol L}^{-1}$  em  $H_2SO_4$   $0,25\text{ mol L}^{-1}$ , usando o sistema BIA-MPA sobre BDDE variando os pulsos de potenciais aplicados de +1,1 a +1,9 V. B) Média das  $I_{pa}$  em função dos  $E_{pa}$  obtidas dos amperogramas em A.

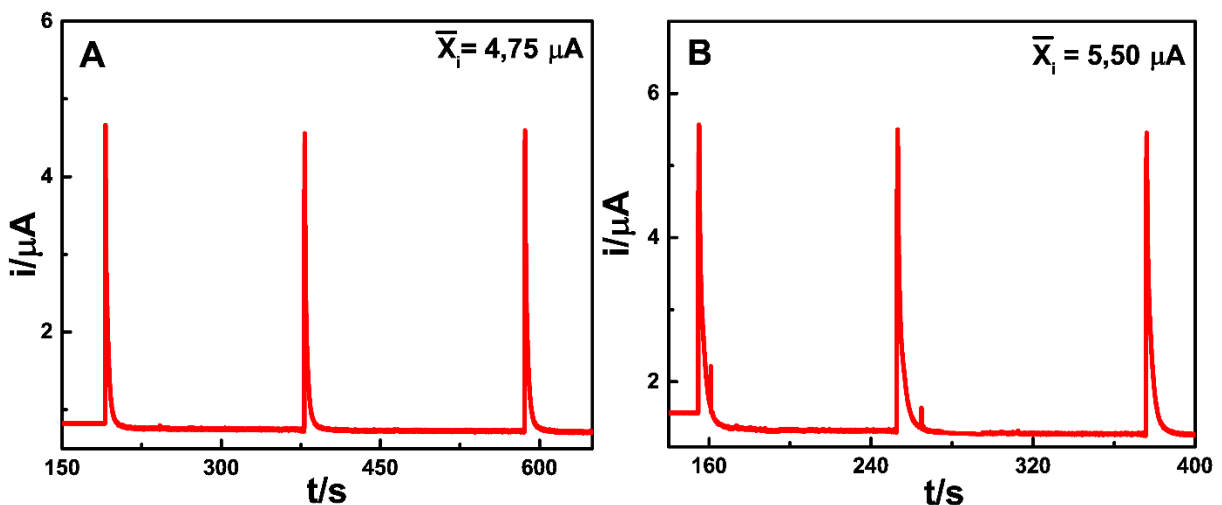


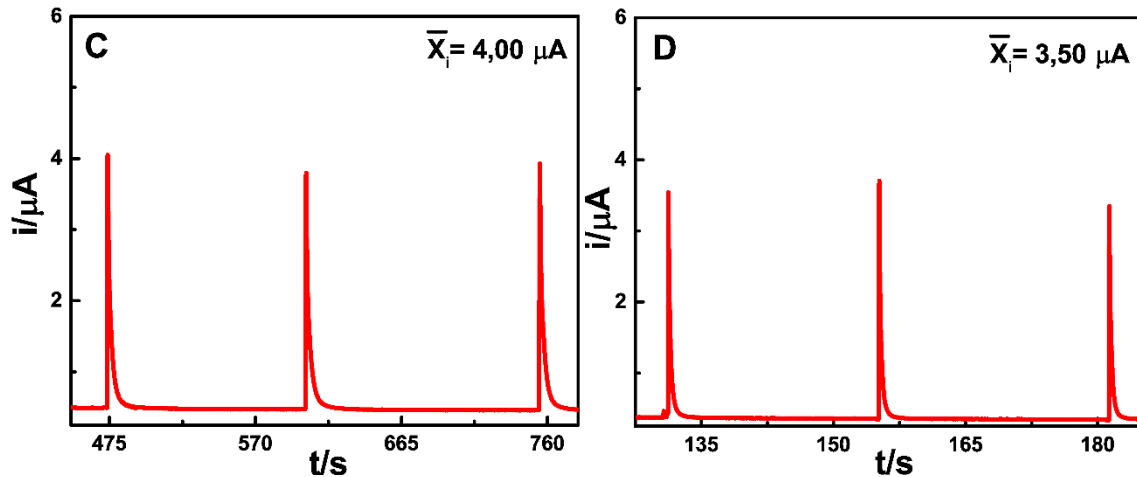
Como pode ser verificado na Figura 25B, o potencial em que começa ocorrer a oxidação do MODA na superfície do BDDE usando o sistema BIA foi em +1,5 V, atingindo a taxa máxima de oxidação em +1,8 V e em seguida um decaimento da corrente no +1,9 V. Esse

decaimento da corrente pode ter ocorrido devido à grande contribuição da corrente capacitiva (corrente de fundo), que é provocada neste potencial pela descarga do solvente (oxidação da água e/ou metanol) no BDDE. Dessa forma, o potencial de +1,8 V foi selecionado para ser o  $E_{det1}$  do MODA pelo sistema BIA-MPA. Esse sistema de detecção ainda contou com aplicação do potencial de +1,9 V, o qual foi escolhido para ser o  $E_{det2}$  do MODA, uma vez que, esse tem uma corrente considerável e pode também auxiliar na limpeza do BDDE.

Após otimização desses potenciais foi realizado o estudo do tempo de aplicação variando os tempos em 30, 50, 100 e 200 ms no  $E_{det1}$  (Figura 26), mantendo a aplicação do  $E_{det2}$ , no entanto não será mostrado durante os estudos de otimizações. Vale mencionar que, apesar desses dados serem normalmente apresentado com os dados da corrente média obtida em função da variável otimizada, optamos por apresentar os amperogramas das injeções em triplicata do MODA em cada condição devido ao baixo número de parâmetros avaliados. Esse procedimento também foi adotado para os demais estudos de otimização do sistema de detecção BIA-MPA. A justificativa da utilização de um número menor de variáveis para otimização dos parâmetros da técnica BIA-MPA foi devido à indisponibilidade de padrão do MODA para realizar mais estudos. Todavia, não houve um grande prejuízo nos dados otimizados, uma vez que pode ser verificado uma tendência para escolha dos melhores parâmetros.

Figura 26 - Amperogramas obtidos pela injeção em triplicata de MODA  $1,0 \mu\text{mol L}^{-1}$  em  $\text{H}_2\text{SO}_4$   $0,25 \text{ mol L}^{-1}$ , para avaliação do tempo de aplicação no potencial de +1,8V, mostrando a média das  $I_{pa}$  obtidas em cada tempo de aplicação. A) Tempo aplicado de 30 ms. B) Tempo aplicado de 50 ms. C) Tempo aplicado de 100 ms. D) Tempo aplicado de 200 ms.





Diante dos amperogramas obtidos na Figura 26, observa-se que o tempo que apresentou maior  $I_{pa}$  foi o de 50 ms (Figura 26B). Cabe mencionar que, apesar do decaimento da corrente capacitiva ser maior em maiores tempos de aplicação na MPA, há uma estabilização dessa corrente de fundo antes, durante e após a injeção do analito pelo sistema BIA, proporcionando muitas vezes uma maior diferença entre a corrente faradáica e capacitiva em tempos menores de aplicação. Todavia, em tempos muito curtos de aplicação, como em 30 ms, a corrente de fundo pode ainda ter uma grande contribuição, bem como o número de pontos gerados no amperograma pode causar uma instabilidade na aquisição de dados pelo *software*. Assim, esse comportamento do sistema de detecção BIA-MPA justifica o observado na Figura 27 para detecção do MODA no  $Edet_1$ .

### 5.3.2 Otimização do volume e velocidade de injeção e da agitação do sistema BIA-MPA

Com o intuito de obter as melhores condições para análise do MODA no sistema BIA-MPA, foi realizado o estudo de otimização do volume e da velocidade de injeção e também da agitação da solução no interior da célula. O volume de injeção foi variado em 30, 40 e 50  $\mu\text{L}$  e apresentado na Figura 27. A velocidade de injeção foi avaliada na ordem crescente dos níveis de velocidade da micropipeta eletrônica que variam de  $16 \mu\text{L s}^{-1}$  (nível 1) a  $156 \mu\text{L s}^{-1}$  (nível 10), sendo escolhida a velocidades de  $146 \mu\text{L s}^{-1}$  (nível 9), conforme apresentada na Figura 28.

Figura 27 - Amperogramas obtidos pela injeção em triplicata de MODA  $10 \mu\text{mol L}^{-1}$  em  $\text{H}_2\text{SO}_4$   $0,25 \text{ mol L}^{-1}$ , para avaliação do volume de injeção no potencial de  $+1,8\text{V}$ , mostrando a média das  $I_{pa}$  obtidas em cada volume. A) injeção de  $30 \mu\text{L}$ . B) injeção de  $40 \mu\text{L}$ . C) injeção de  $50 \mu\text{L}$ .

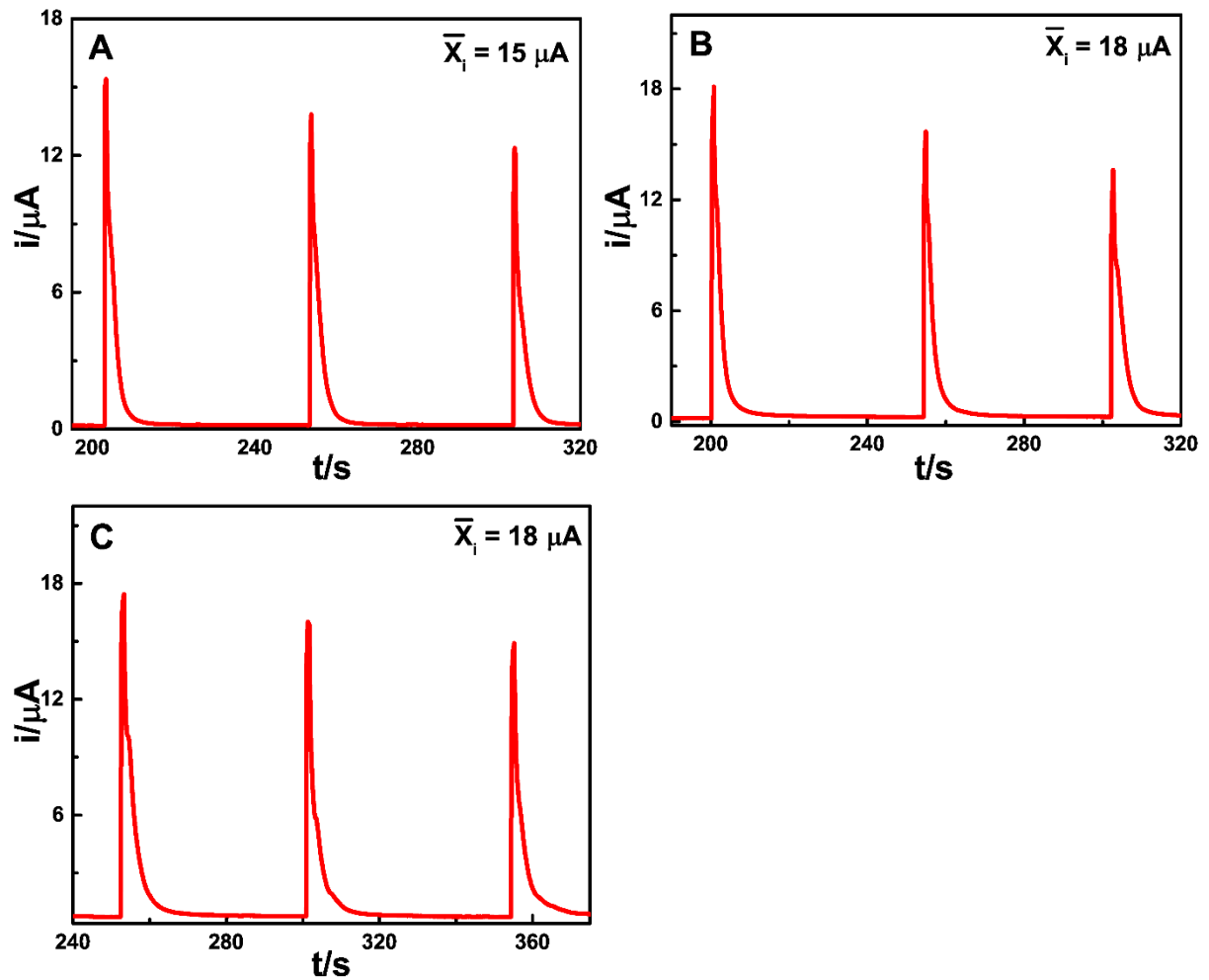
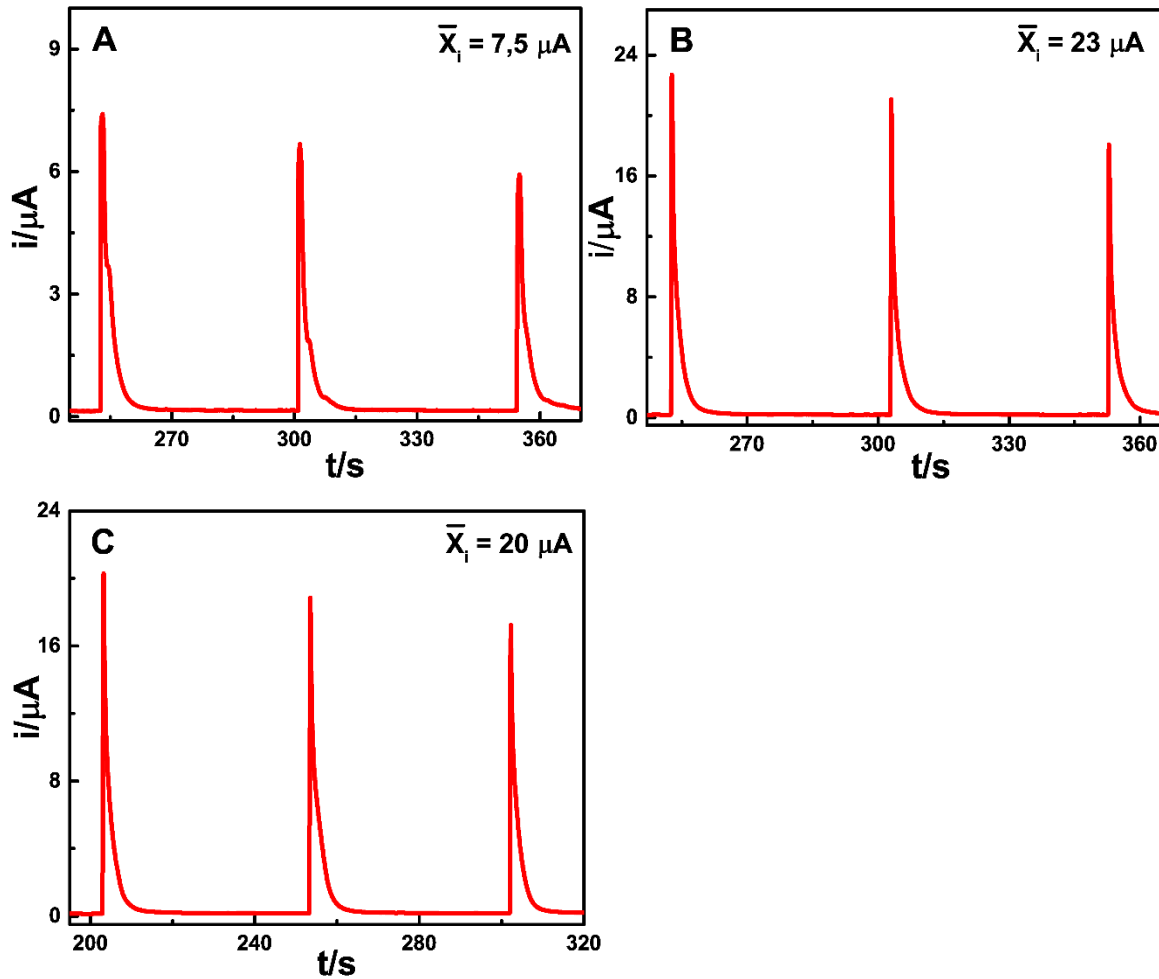




Figura 28 - Amperogramas obtidos pela injeção em triplicata de MODA  $10 \mu\text{mol L}^{-1}$  em  $\text{H}_2\text{SO}_4$   $0,25 \text{ mol L}^{-1}$ , para avaliação da velocidade de injeção no potencial de  $+1,8\text{V}$ , mostrando a média das  $I_{pa}$  obtidas em cada velocidade. A)  $16 \mu\text{L s}^{-1}$ . B)  $146 \mu\text{L s}^{-1}$ . C)  $156 \mu\text{L s}^{-1}$ .



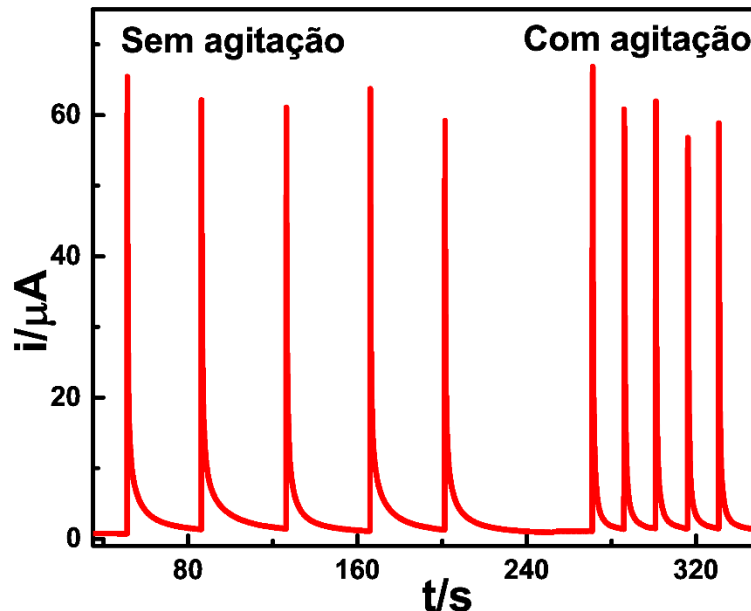
No que tange ao estudo de variação do volume injetado no sistema BIA, o efeito de dispersão da amostra é praticamente desprezível devido à solução ser injetada diretamente na superfície do detector, no caso do sensor de BDDE. Dessa forma, a otimização do volume em função da altura de pico de corrente pode ser obtida com baixos volumes de injeção. Isso pode ser visto na Figura 27, no qual o volume de injeção de  $40 \mu\text{L}$  de MODA já mostrou uma média de corrente de pico semelhante ao volume de  $50 \mu\text{L}$ . Sendo assim, o volume de injeção de  $40 \mu\text{L}$  foi o escolhido para obter um menor consumo de amostra nas análises de MODA pelo sistema BIA-MPA.

No que se refere a velocidade de injeção no sistema BIA acoplada à detecção eletroquímica, quanto maior a velocidade de injeção menor será a diminuição da camada de difusão de Nernst, conseqüentemente, maior será a corrente de pico obtida. Entretanto, velocidades muito elevadas podem remover o analito da superfície do sensor antes que os dados

de corrente sejam devidamente coletados, provocando uma diminuição da corrente de pico. Neste sentido, observando os amperogramas obtidos na Figura 28, nota-se que a velocidade intermediária entre as avaliadas (Figura 28B) foi a que apresentou maior média de  $I_{pa}$ . Dessa forma, a velocidade de  $146 \mu\text{L s}^{-1}$  foi a escolhida para ser usada na detecção do MODA pelo sistema BIA-MPA.

A agitação do sistema foi avaliada para avaliar a necessidade de remoção das espécies na superfície do ET após injeção no sistema BIA-MPA. A agitação na célula BIA foi realizada utilizando um pequeno motor inserido na solução. Como o motor foi fabricado de forma artesanal, não foi possível a mensuração da velocidade de agitação. Porém, o motor foi eletricamente conectado a uma fonte universal AC / DC que tem uma faixa de voltagem de 0 V a 9 V, a qual tem uma relação direta com aumento da velocidade de agitação, sendo quanto maior a voltagem mais intensa a agitação da solução. Dessa forma, estabeleceu a otimização entre o sistema sem e com agitação considerando a voltagem em torno de 5 V, que promovia o retorno do sinal analítico para a “linha de base” em menor tempo e sem a provocação de ruídos no sistema (Figura 29).

Figura 29 - Amperogramas obtidos pela injeção de 10 amostras de MODA  $100 \mu\text{mol L}^{-1}$  em  $\text{H}_2\text{SO}_4$   $0,25 \text{ mol L}^{-1}$ , para avaliação da agitação da solução no interior da célula BIA no potencial de +1,8V.



A Tabela 9 mostra todas as otimizações avaliadas no sistema BIA-MPA e os respectivos parâmetros escolhidos para detecção do MODA.

Tabela 9 - Parâmetros otimizados para a detecção de MODA pelo sistema BIA-MPA

<b>Parâmetros Avaliados</b>	<b>Faixa Analisada</b>	<b>Resultados Otimizados</b>
$E_{det_1}$	+1,1 a +1,9 V	+1,8 V
Tempo de aplicação	30 a 200 ms	50 ms
Volume de injeção	30 a 50 $\mu\text{L}$	40 $\mu\text{L}$
Velocidade de injeção	16 a 156 $\mu\text{L s}^{-1}$	146 $\mu\text{L s}^{-1}$
Agitação da solução	Com e Sem	Com agitação

Fonte: Próprio autor.

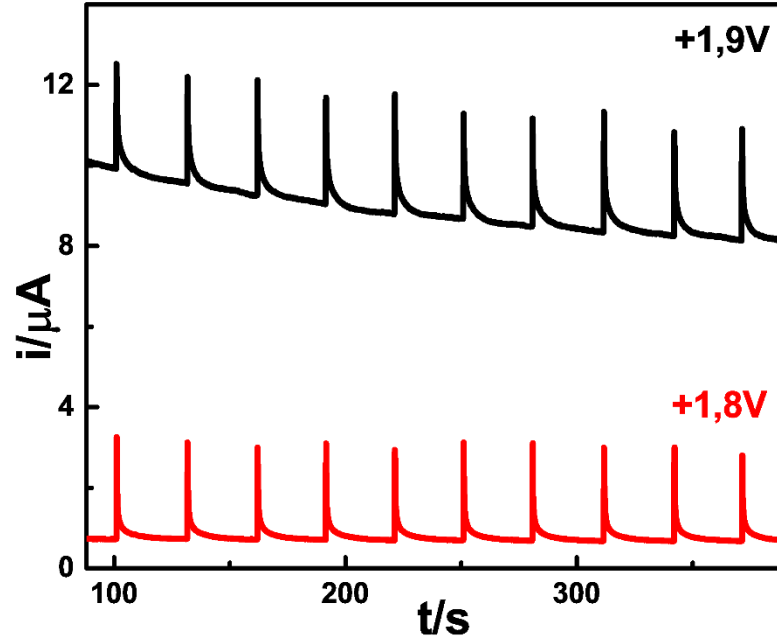
Em suma, a detecção do MODA pelo sistema BIA-MPA foi realizada com volume de injeção de 40  $\mu\text{L}$ , velocidade 146  $\mu\text{L s}^{-1}$ , com agitação da solução na célula BIA e com aplicação de dois pulsos de potenciais na MPA:

- (i) 1,8 V / 50 ms:  $E_{det_1}$  para obter a  $I_{pa_1}$  e realizar a determinação do MODA em amostras de saliva;
- (ii) 1,9 V / 50 ms:  $E_{det_2}$  para também oxidar o MODA, mas neste caso usar a razão entre  $I_{pa_1}/I_{pa_2}$  para confirmar a presença deste analito nas amostras.

### 5.3.3 Análise de repetibilidade

Em alguns estudos utilizando o sistema BIA-MPA, principalmente nos casos em que o analito estudado possui características adsorptivas no ET, faz-se necessário a aplicação de mais um pulso de potencial para a limpeza da superfície deste eletrodo. No entanto, como a molécula do MODA apresentou um transporte de massa controlado por difusão e seus produtos de oxidação não possuem características de processos adsorptivos no BDDE não foi necessário a aplicação de um potencial de limpeza para detecção do MODA pela técnica MPA. Isso pode ser observado pelo baixo e adequado  $DPR$  apresentado no estudo de repetibilidade sem aplicação de um pulso de potencial limpeza (Figura 30). O estudo de repetibilidade foi investigado e avaliado pelo valor do  $DPR$  das  $I_{pa}$  obtidas para 10 injeções consecutivas do MODA usando todas as condições otimizadas no método proposto.

Figura 30 - Amperogramas obtidos pela detecção por BIA-MPA de 10 injeções consecutivas de MODA a  $1,0 \mu\text{mol L}^{-1}$  em  $\text{H}_2\text{SO}_4$   $0,25 \text{ mol L}^{-1}$  monitorando os potenciais  $E_{det1}$  e  $E_{det2}$ . Volume de injeção de  $40 \mu\text{L}$ . Velocidade de injeção de  $146 \mu\text{Ls}^{-1}$ .



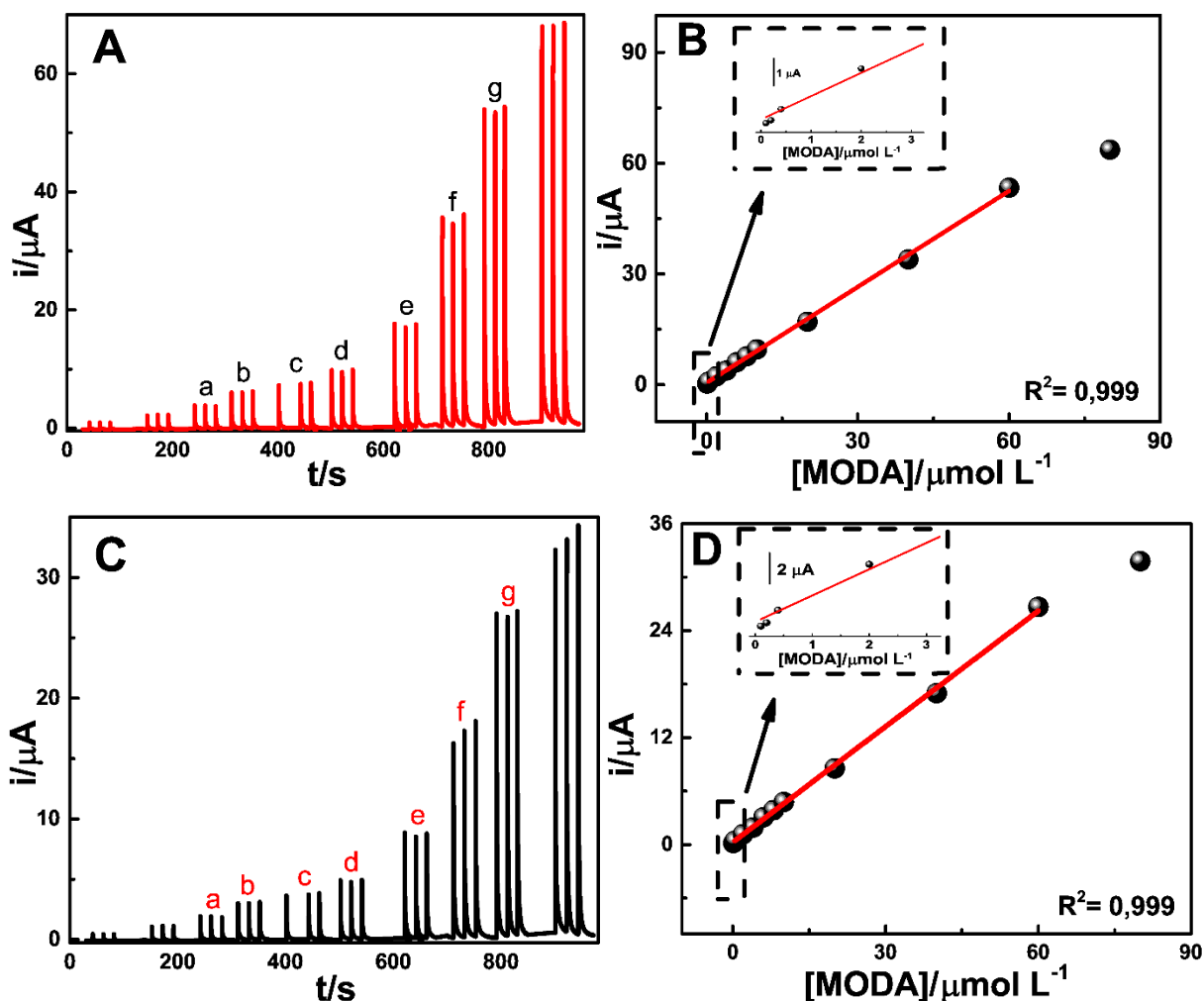
Segundo a RDC 166 de 2017 da ANVISA, o valor do *DPR* de, no mínimo 9 determinações de uma única concentração precisa ser menor que 5% para devida validação de uma metodologia. A Figura 30 mostra uma boa estabilidade da resposta eletroquímica do MODA no sistema de detecção BDDE-BIA-MPA com *DPRs* das  $I_{pa1}$  e  $I_{pa2}$  nos  $E_{det1}$  e  $E_{det2}$  de 2,5 e 3,1%, respectivamente. Deste modo, os baixos valores obtidos de *DPR* indicam que método proposto apresenta uma boa precisão para determinação do MODA.

Ainda com relação à Figura 30, observa-se que do tempo 100 ao 200 foram feitas 4 injeções, sendo o tempo médio das análises em torno de 25 segundos (tempo contado a partir da injeção até o total retorno à linha de base) para cada análise, o que proporciona cerca de 150 determinações por hora (det/h) de MODA. Essa alta frequência analítica obtida pelo método proposto é uma grande vantagem frente ao outro método eletroquímico reportado para detecção de MODA, o qual leva em média 30 minutos para realizar apenas uma análise em amostras de saliva (DOS SANTOS et al., 2019).

### 5.3.4 Estudo de linearidade e cálculo de LOD e LOQ

Definido os parâmetros analíticos do sistema BDDE-BIA-MPA, o estudo da faixa linear e os cálculos do *LOD* e *LOQ* para determinação do MODA foram realizados usando soluções do padrão de MODA nas concentrações de  $0,1 \mu\text{mol L}^{-1}$  a  $80 \mu\text{mol L}^{-1}$  diluídas em  $\text{H}_2\text{SO}_4 0,25 \text{ mol L}^{-1}$ . A Figura 32A e 32C mostra os biogramas obtidos nos *Edet*<sub>1</sub> e *Edet*<sub>2</sub> e as respectivas curvas analíticas com suas regressões lineares mostradas na Figura 31B e 31D, respectivamente.

Figura 31 – A e C: Biogramas obtidos pela injeção em triplicata de amostras de MODA de  $0,1 \mu\text{mol L}^{-1}$  a  $80 \mu\text{mol L}^{-1}$  em  $\text{H}_2\text{SO}_4 0,25 \text{ mol L}^{-1}$  em *Edet*<sub>1</sub> e *Edet*<sub>2</sub>, respectivamente. B e D: Curvas analíticas com regressões lineares dos respectivos biogramas de *Edet*<sub>1</sub> e *Edet*<sub>2</sub>, sendo a) 0,4; b) 2; c) 4; d) 6; e) 8; f) 40; g)  $60 \mu\text{mol L}^{-1}$  de MODA.



De acordo com a faixa de trabalho analisada, verificou-se que a menor concentração de MODA que apresentou sinal detectável foi a de  $0,1 \mu\text{mol L}^{-1}$ , o que é suficientemente baixo para determinação do MODA em saliva humana, que foi reportado como  $10 \mu\text{mol L}^{-1}$  (ROSSI *et al.*, 2008). As curvas de calibração observadas na Figura 31B e 31D foram elaboradas com

base na média calculada das correntes  $I_{pa1}$  e  $I_{pa2}$  obtidas de cada análise em triplicata representada na Figura 31A e 31C. As regressões lineares apresentaram boa linearidade ( $R^2=0,999$ ) para ambos os  $E_{pa}$  na faixa linear a partir da menor concentração de  $0,4 \mu\text{mol L}^{-1}$  e maior de  $60 \mu\text{mol L}^{-1}$ .

As equações das regressões lineares entre as  $I_{pa1}$  e  $I_{pa2}$  e a concentração de MODA nos  $E_{det1}$  e  $E_{det2}$  são dadas pelas Equações (8) e (9), respectivamente:

$$i(\mu\text{A}) = 5,157 \cdot 10^{-7} (\pm 3,560 \cdot 10^{-7}) + 0,866 (\pm 0,013) \cdot [\text{MODA}] (\mu\text{mol L}^{-1}) \quad (8)$$

$$i(\mu\text{A}) = 5,343 \cdot 10^{-7} (\pm 2,964 \cdot 10^{-7}) + 0,865 (\pm 0,011) \cdot [\text{MODA}] (\mu\text{mol L}^{-1}) \quad (9)$$

Com base nas regressões lineares obtidas pelas Equações (8) e (9) e os ruídos da linha de base dos Biagramas (Figura 31A e 31C), os  $LOD$  e  $LOQ$  foram estimados em  $0,10$  e  $0,33 \mu\text{mol L}^{-1}$  para  $E_{det1}$  e para  $E_{det2}$ . De acordo com os valores obtidos, o método proposto apresenta uma boa faixa linear de trabalho e baixos valores de  $LOD$  e  $LOQ$ , os quais são inferiores à concentração de MODA encontrada na saliva (ROSSI *et al.*, 2008). Vale destacar que, considerando que o método proposto sugere uma diluição da amostra de saliva no eletrólito suporte e considerando o menor sinal mensurável do MODA como primeiro ponto da curva analítica ( $0,4 \mu\text{mol L}^{-1}$ ), uma de diluição de até 25 vezes pode ser realizada para usar o método proposto.

Com intuito de relacionar os dois potenciais  $E_{det1}$  e  $E_{det2}$  na detecção do MODA, foi realizado o estudo da relação entre a média do sinal das  $I_{pa1}$  e  $I_{pa2}$  em cada potencial em função da concentração do MODA.

#### 5.4 Relação do sinal das correntes $I_{pa1}$ e $I_{pa2}$ dos potenciais $E_{det1}$ e $E_{det2}$

De acordo com os valores das médias das  $I_{pa1}$  e  $I_{pa2}$  nos  $E_{det1}$  e  $E_{det2}$  obtidas das injeções de solução padrão de MODA (Figura 31A e 31C) na faixa linear de trabalho ( $0,4$  a  $60 \mu\text{mol L}^{-1}$ ), foi realizado os cálculos para encontrar a razão entre as duas correntes no intuito de aumentar seletividade do método proposto para detecção deste analito. A Tabela 10 mostra os valores das médias e razão obtidas em cada pulso de potencial em função da concentração de MODA.

Tabela 10 – Dados do estudo da relação entre as médias das correntes  $I_{pa1}$  e  $I_{pa2}$  nos  $E_{det1}$  e  $E_{det2}$  em função da concentração de MODA.

Concentração de MODA ( $\mu\text{mol L}^{-1}$ )	$I_{pa1}$ ( $\mu\text{A}$ )	$I_{pa2}$ ( $\mu\text{A}$ )	$I_{pa1}/I_{pa2}$
0,4	0,85	0,42	2,02
2,0	2,35	1,15	2,04
4,0	3,85	1,90	2,02
6,0	6,15	3,10	1,98
8,0	7,75	3,90	1,99
10,0	9,60	4,80	2,00
20,0	17,10	8,45	2,02
40,0	34,00	16,70	2,03
60,0	53,40	26,20	2,03

Fonte: Próprio autor.

De acordo com os valores obtidos da razão entre as  $I_{pa1}$  e  $I_{pa2}$  é constante na faixa de concentração de 0,4 a 60  $\mu\text{mol L}^{-1}$ , com valor médio de 2,01 ( $\pm 0,02$ ) com  $N = 9$ .

Dessa forma, deu-se andamento no método proposto realizando os estudos de determinação do MODA em amostras de saliva.

### 5.5 Determinação do MODA em saliva humana

A coleta foi realizada através do dispositivo Salivette®, o qual configura uma coleta segura, não invasiva e higiênica. Para as análises das amostras em saliva, preparou-se o branco contendo a saliva diluída 25 vezes em eletrólito suporte ( $\text{H}_2\text{SO}_4$  0,25  $\text{mol L}^{-1}$ ) acrescido de 10% de metanol grau HPLC, uma vez que o padrão do MODA é dissolvido em 10% de metanol.

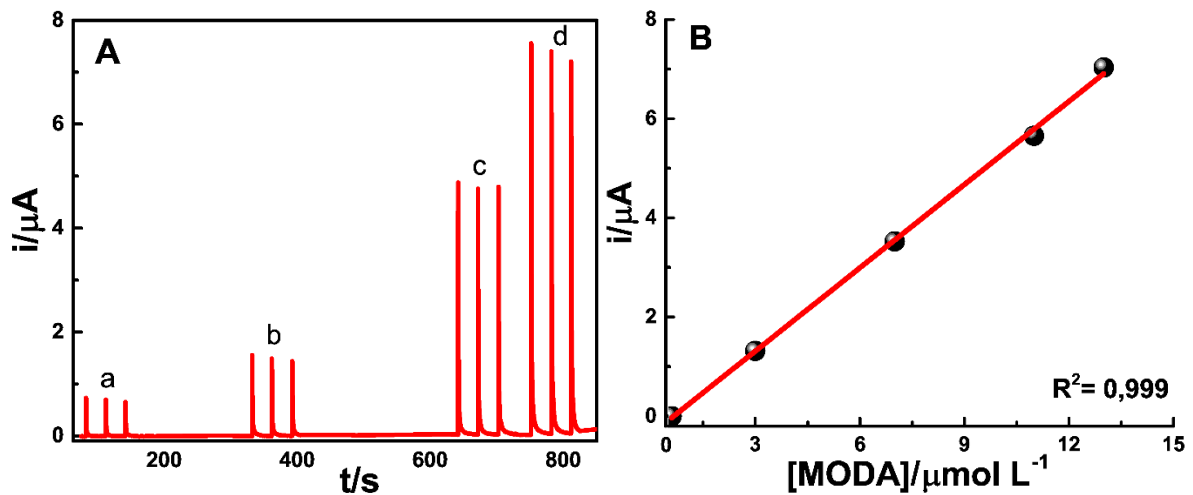
A justificativa para uma diluição de 25 vezes das amostras deve-se ao fato que o valor reportado de MODA na saliva é de 10  $\mu\text{mol L}^{-1}$  (ROSSI *et al.*, 2008) e o menor sinal mensurável da curva analítica de 0,4  $\mu\text{mol L}^{-1}$  (Figura 32), portanto, esse seria o fator de diluição máximo possível realizar a quantificação deste analito pelo método proposto. Cabe ainda destacar que, como no *doping* positivo o principal objetivo é a detecção do MODA e não a sua quantificação, de acordo com o sinal obtido para detecção do MODA no sistema BIA-MPA (Figura 31), observou-se que as amostras poderiam ser diluídas em até 50 vezes no eletrólito suporte, uma vez que esse fator de diluição leva a concentração de MODA na saliva

humana à  $0,20 \mu\text{mol L}^{-1}$ , cujo valor está acima do *LOD* teórico de  $0,10 \mu\text{mol L}^{-1}$ , bem como do menor sinal detectável obtido pelo método proposto. Assim, mesmo diluindo a saliva humana em até 50 vezes, o sistema BDDE-BIA-MPA é suficiente para detectar e confirmar o *doping* pelo consumo de MODA pelos atletas.

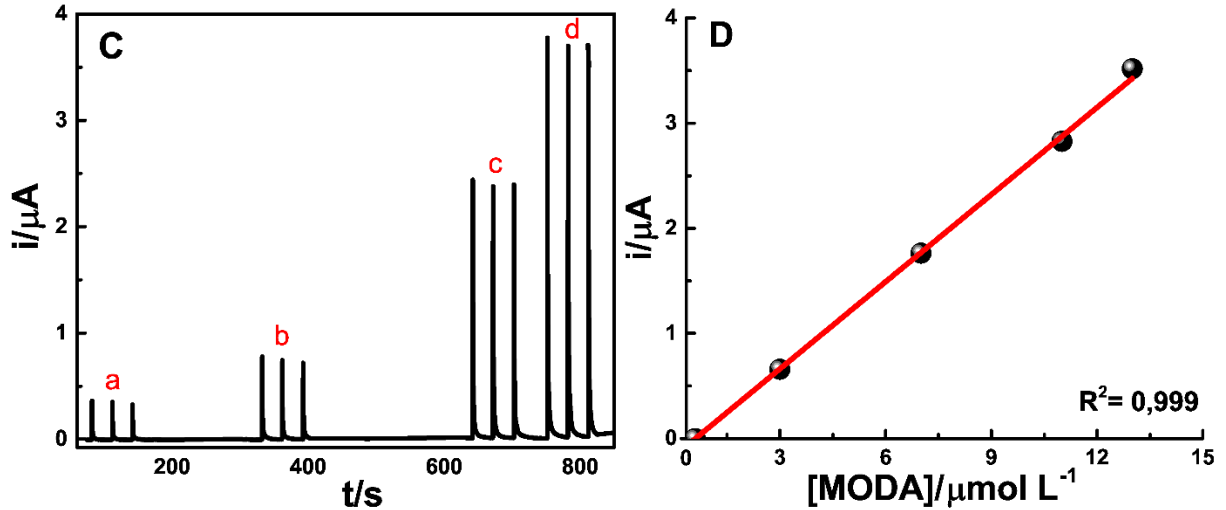
### 5.5.1 Estudo de adição padrão do MODA em amostras de saliva humana

Primeiramente optou-se por realizar o método de adição e recuperação por calibração externa, entretanto, o estudo não apresentou resultados satisfatórios devido aos efeitos de matriz nas amostras de saliva humana. Por este motivo foi avaliado o método de adição padrão para quantificação do MODA nessas amostras. Assim, adicionou-se concentrações conhecidas do padrão de MODA na mesma amostra de saliva e logo após serem preparadas foram injetadas em triplicatas no sistema BIA-MPA. Os amperogramas obtidos no *Edet*<sub>1</sub> e *Edet*<sub>2</sub> são mostrados na Figura 32A e 32C, com suas respectivas regressões na Figura 32B e 32D, respectivamente.

Figura 32 – A e C: Amperogramas do estudo da adição padrão em amostras de saliva obtidos das seguintes concentrações: a) 3; b) 7; c) 11; d)  $13 \mu\text{mol L}^{-1}$  de MODA em *Edet*<sub>1</sub> e *Edet*<sub>2</sub>, respectivamente. B e D: Respectivas regressões lineares obtidas a partir da curva analítica de adição padrão em *Edet*<sub>1</sub> e *Edet*<sub>2</sub>.







As regressões lineares obtidas na Figura 33B e 33D apresentaram boa linearidade com coeficientes de correlação linear equivalentes praticamente à unidade ( $R^2 = 0,999$ ). As respectivas equações das regressões lineares obtidas para  $Edet_1$  e  $Edet_2$  são dadas pelas Equações (10) e (11), respectivamente:

$$i(\mu A) = -3,336 \cdot 10^{-7} (\pm 8,912 \cdot 10^{-8}) + 0,553 (\pm 0,011) \cdot [MODA] (\mu mol L^{-1}) \quad (10)$$

$$i(\mu A) = -3,670 \cdot 10^{-7} (\pm 8,710 \cdot 10^{-8}) + 0,556 (\pm 0,010) \cdot [MODA] (\mu mol L^{-1}) \quad (11)$$

A partir da equação da reta do  $Edet_1$ , conforme descrita na Equação (10) realizou-se o cálculo de recuperação da adição padrão na amostra de saliva previamente contaminada com uma concentração de  $0,6 \mu mol L^{-1}$  de MODA. Ao igualar a Equação (10) à zero, estamos considerando o ponto onde houve a contaminação do padrão de MODA. Portanto, a Tabela 11 mostra a concentração adicionada de MODA nas amostras de saliva, como também o valor esperado e o detectado através dos cálculos da Equação (10), e com isso obteve as respectivas recuperações nas amostras, que resultaram em torno dos 100%. Esse resultado mostrou que, com o uso do método de adição padrão foi possível controlar o efeito de matriz previamente identificado para as amostras de saliva.

Tabela 11 - Estudo de adição padrão na amostra de saliva humana em triplicata no *Edet<sub>1</sub>*.

<b>Amostra</b>	<b>MODA adicionado (<math>\mu\text{mol L}^{-1}</math>)</b>	<b>Concentração Esperada (<math>\mu\text{mol L}^{-1}</math>)</b>	<b>Deteção de MODA (<math>\mu\text{mol L}^{-1}</math>)</b>	<b>Recuperação (%)</b>
Saliva humana contaminada com MODA	0,00	0,60	0,61( $\pm 0,07$ )	101,67
	5,00	5,60	5,62( $\pm 0,04$ )	100,35
	9,00	9,60	9,41( $\pm 0,05$ )	98,02

Fonte: Próprio autor.

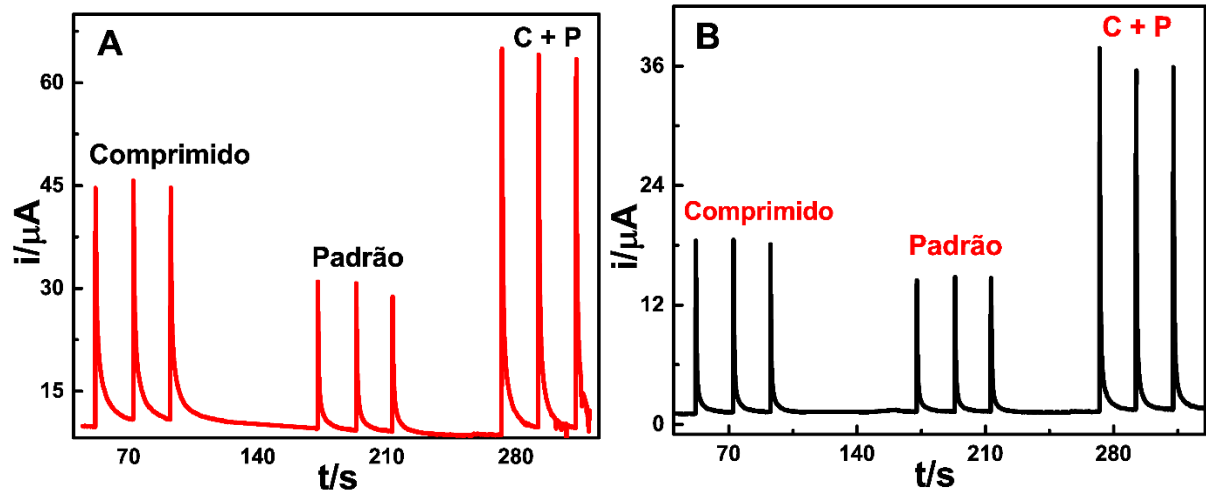
Sendo assim, a próxima etapa para validação da aplicação do método proposto seria o estudo dos interferentes encontrados na saliva humana. Este estudo de interferentes na saliva foi realizado considerando os dois componentes principais na saliva, os ácidos úrico e ascórbico, os quais são conhecidamente eletroativos em vários eletrodos de trabalho (DOS SANTOS *et al.*, 2019), bem como no BDDE (SOUZA *et al.*, 2021). Alguns estudos mostram que a concentração do ácido úrico encontrado na saliva é em torno de 200 a 300  $\mu\text{mol L}^{-1}$  (CASTAGNOLA *et al.*, 2002; NGAMCHUEA *et al.*, 2018) e a do ácido ascórbico é de aproximadamente 1,0  $\mu\text{mol L}^{-1}$  (NGAMCHUEA *et al.*, 2018). Como ambos mostraram sinais de oxidação tanto no potencial de *Edet<sub>1</sub>* quanto no *Edet<sub>2</sub>*, faz-se necessário um estudo de uma nova otimização dos potenciais na MPA para eliminar os sinais de corrente desses interferentes. Todavia, esses estudos ainda não foram realizados devido à indisponibilidade e dificuldade de aquisição do padrão analítico de MODA.

## 5.6 Determinação do Moda em amostras farmacêuticas

### 5.6.1 Adição e recuperação no comprimido de MODA

Os estudos de adição e recuperação do MODA em amostras de comprimido foi realizado como mostra a Figura 33. Neste estudo, primeiramente, foram injetados em triplicata as soluções da amostra de comprimido de concentração teórica de 14  $\mu\text{mol L}^{-1}$ , depois o padrão de MODA a 10  $\mu\text{mol L}^{-1}$  e por último a adição do padrão de MODA na amostra de comprimido, sendo monitorado os dois pulsos de potenciais de *Edet<sub>1</sub>* e *Edet<sub>2</sub>*.

Figura 33 - A) Amperogramas obtidos das soluções do comprimido de MODA a  $14 \mu\text{mol L}^{-1}$  (teórica), do padrão de MODA a  $10 \mu\text{mol L}^{-1}$  e das duas soluções juntas (C+P) em *Edet*<sub>1</sub>. B) Amperogramas obtidos das soluções do comprimido de MODA a  $14 \mu\text{mol L}^{-1}$ , do padrão de MODA a  $10 \mu\text{mol L}^{-1}$  e das duas soluções juntas (C+P) em *Edet*<sub>2</sub>.



A Tabela 12 mostra os resultados obtidos neste estudo de adição e recuperação, relacionando a média da  $I_{pa1}$  em função da concentração das soluções injetadas.

Tabela 12 - Dados obtidos do estudo de adição e recuperação relacionando a média das  $I_{pa1}$  com as concentrações do comprimido de MODA.

Amostra	MODA ( $\mu\text{mol L}^{-1}$ )	$I_{pa1}$ ( $\mu\text{A}$ )	Recuperação (%)
Comprimido	14	45,10	100
Padrão	10	31,00	100
C + P	24	75,30	101

Fonte: Próprio autor.

Conforme pode ser visto na Tabela 12, a recuperação do MODA nas amostras foi próxima de 100%, indicando ausência de efeito de matriz nas formulações farmacêuticas desse fármaco. O valor médio de recuperação nas amostras foi de 101% ( $\pm 0,05$ ), cujo valor é adequado para validação de um método analítico em amostras farmacêuticas (ANVISA, 2017). Dessa forma, o método proposto confirmou a concentração teórica da solução do comprimido podendo ser usado para realizar o doseamento do MODA em formulações farmacêuticas. Ressaltando que a concentração da solução preparada foi baseada na informação do rótulo do fabricante, cujo valor encontrado na amostra analisada foi de aproximadamente 100 mg de

MODA por comprimido, indicando um eficiente controle de qualidade da indústria farmacêutica que produziu esse medicamento.

Outro dado importante obtido do estudo de adição recuperação foi a razão da média das  $Ipa_1$  e  $Ipa_2$  nos pulsos de potencial  $Edet_1$  e  $Edet_2$  para as amostras de comprimido e padrão, conforme apresentado a seguir na Tabela 13.

Tabela 13 – Relação da média  $Ipa_1$  e  $Ipa_2$  nos pulsos de potencial  $Edet_1$  e  $Edet_2$ .

<b>Amostra</b>	<b><math>Ipa_1</math> (<math>\mu A</math>)</b>	<b><math>Ipa_2</math> (<math>\mu A</math>)</b>	<b><math>Ipa_1 / Ipa_2</math></b>
Comprimido	45,10	20,30	2,02
Padrão	31,00	15,90	1,95

De acordo com as razões das médias de  $Ipa_1$  e  $Ipa_2$  apresentadas na Tabela 13, verificou-se que os valores obtidos foram condizentes com as razões obtidas na curva de calibração do MODA, em que os dados estão demonstrados na Tabela 10 do item 5.4, indicando que para a determinação de MODA em amostras de comprimido pode-se utilizar dos valores de  $Ipa_1$  e  $Ipa_2$  e a razão entre elas.

Portanto, o estudo da razão entre as  $Ipa_1$  e  $Ipa_2$  melhora a seletividade do método proposto, uma vez que, valores destoantes dos encontrados poderá ser indícios da presença de possíveis contaminantes ou até mesmo de outros compostos na amostra analisada.

## 6 CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS

Diante dos resultados obtidos, o presente trabalho apresentou um método simples e rápido para a triagem e determinação do MODA em saliva humana e em amostras farmacêuticas usando o BDDE com detecção eletroquímica. A detecção do MODA no BDDE mostrou-se mais sensível no sistema hidrodinâmico BIA-MPA que no sistema estacionário usando a SWV. O sistema BDDE-BIA-MPA demonstrou também alta estabilidade da resposta eletroquímica do MODA com uma alta frequência analítica que pode atingir cerca de 150 determinações por hora deste analito, proporcionando uma grande vantagem para aplicação em análises de rotina. O método proposto apresentou um *LOD* ( $0,1 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) suficientemente baixo para detectar e quantificar o MODA em amostras de saliva humana e farmacêuticas, sendo estudos de adição e recuperação nessas amostras próximos de 100%. Além disso, o método eletroquímico proposto apresenta uma análise de baixo custo e ambientalmente mais amigável frente aos demais métodos reportados para determinação do MODA. Portanto, o método desenvolvido pode ser uma alternativa com grande potencial de aplicação, tanto no controle de *doping* do MODA como estratégia de triagem em amostras de saliva, quanto no controle de qualidade desse fármaco nas indústrias farmacêuticas.

Como perspectivas para uma aplicação final do método proposto, estudos para eliminar interferentes eletroativos em amostras de saliva humana ainda precisam ser avaliados, bem como a utilização de eletrodos ou células portáteis contendo o BDDE no sistema BIA-MPA.

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALÓE F.; ALVES R. C.; ARAÚJO J. F.; AZEVEDO A.; BACELAR A.; BEZERRA M.; BITTENCOURT L. R. A.; BUSTAMANTE G.; CARDOSO T. A. M. O.; ECKELI A. L.; FERNANDES R. M. F.; GOULART L.; PRADELLA-HALLINAN M.; HASAN R.; SANDER H. H.; PINTO JR. L. R.; LOPES M. C.; MINHOTO G. R.; MORAES W.; MOREIRA G. A.; PACHITO D.; PEDRAZOLLI M.; POYARES D.; PRADO L.; RIZZO G.; RODRIGUES R. N.; ROITMAN I.; SILVA A. B.; TAVARES S. M. A. Diretrizes Brasileiras para o Tratamento de Narcolepsia. **Rev. Bras. Psiquiatr.**, v. 32, n. 3, p. 305-314, 2010.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Tema 7.21 – Boas Práticas de Fabricação de Medicamentos. Julho, 2020.

BAIRU, S. G.; STEFAN, R. I.; VAN STADEN J. F. Polycrystalline Diamond-Based Electrochemical Sensors and Their Applications in Inorganic and Organic Analysis. **Critical Reviews In Analytical Chemistry**, v. 33, n. 2, p. 145-153, 2003.

BARD, A. J.; FAULKNER, L. R. Electrochemical Methods. **Jonhs Wiley & Sons**, Inc. New York, 1980.

BATTINO, M.; FERREIRO M. S.; GALLARDO, I.; NEWMAN, H. N.; BULLON, P. The antioxidant capacity of saliva. **Journal of clinical periodontology**, v. 29, n. 3, p. 189–194, 2002.

BRETT A. M. O.; BRETT, C. M. A. Electroquímica: Princípios, Métodos e Aplicações. ed. L. **Almedina**, Coimbra, 1996.

BRETT A. M. O.; BRETT C. M. A. Electroquímica: Princípios, Métodos e Aplicações. **New York: Oxford University Press**, 1993.

BURNAT, P.; ROBLES, F.; DO, B. High-performance liquid chromatographic determination of modafinil and its two metabolites in human plasma using solid-phase extraction. **J Chromatogr B Biomed Sci Appl**, v. 706, p. 295-304, 1998.

CALDWELL, J. A.; CALDWELL, J. L. “Modafinil’s effects on simulator performance and mood in pilots during 37h without sleep”. **Aviation, Space and Environmental Medicine**, v. 75, n. 9, p. 777-784, 2004.

CASTAGNOLA, M.; CABRAS, T.; DENOTTI, G.; FADDA M. B.; GAMBARINI, G. A.; LUPI, I.; MANCA, I.; ONNIS, G.; PIRAS, V.; SORO, V.; TAMBARO, S.; MESSANA,

I. Circadian Rhythms of Histatin 1, Histatin 3, Histatin 5, Statherin and Uric Acid in Whole Human Saliva Secretion. **Biological Rhythm Research**, v. 33, p. 213-222, 2002.

CGMP. Current Good Manufacturing Practice. FDA, 2020. Disponível em: <<https://www.fda.gov/drugs/pharmaceutical-quality-resources/current-good-manufacturing-practice-cgmp-regulations>>. Acesso em 30 de outubro de 2020.

CHATTERJEE, A. Cosmetic neurology: The controversy over enhancing movement, mentation, and mood. **Neurology**, v. 63, p. 968-974, 2004.

CHEMICALIZE. Modafinil. Disponível em: <<https://chemicalize.com/app/calculation/modafinil>>. Acesso em 30 de junho de 2021.

CHERLAND, E.; FITZPATRICK, R. - Psychotic Side effects of Psychostimulants: a 5-year Review. **Can J Psychiatry**, v. 44, p. 811-3, 1999.

CONDESSA, M. B. A política atual para a regulação de medicamentos no Brasil. **Cenarium Pharm**, v. 2, p. 1-34, 2005.

CUNHA R. R.; TORMIN T. F.; RICHTER E. M.; MUÑOZ R. A. A. Determinação rápida de hidroquinona usando análise por injeção em batelada (BIA) com detecção amperométrica. **Quim. Nova**, v. 36, n. 5, p. 663-668, 2013.

DA SILVA, R. A. B.; GIMENES, D. T.; TORMIN, T. F.; MUÑOZ, R. A. A.; RICHTER, E. M. Batch injection analysis with amperometric detection: application for simultaneous analysis using a single working electrode. **Analytical Methods**, v. 3, p. 2804-2808, 2011.

DAWES, C. Circadianrhythms in theflow rate and composition of unstimulated andstimulatedhuman submandibular saliva. **J Physiol**, v. 244, p. 535-548, 1975.

DE ROSE, E. *Doping* in athletes: an update. **Clinics in Sports Medicine**, Maryland, v. 27, n° 1, p. 107-130, jan. 2008.

DE SOUZA, D.; CODOGNOTO, L.; MALAGUTTI, A. R.; TOLEDO, R. A.; PEDROSA, V. A.; OLIVEIRA, R. T. S.; MAZO, L. H.; AVACA, L. A.; MACHADO, S. A. S. Square wave voltammetry. Second part: Applications. **Química Nova**, v. 27, p. 790-797, 2004.

DIETZ P.; SOYKA M.; FRANKE A. G. Pharmacological Neuroenhancement in the Field of Economics. **Frente. Psychol**, v. 7, p. 520, 2016.

DODDS, M. W.; JONSON, D. A.; YEH, C. K. Health benefits of saliva: a review. **J Dent.**, v. 33, p. 223-233, 2005.

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

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

DOS SANTOS W. T. P.; GIMENES D. T.; RICHTER E. M.; ANGNES L. Flow Injection Analysis With Multiple Pulse Amperometric Detection: Potentialities and Applications. **Química Nova**, v. 34, p. 1753-1761, 2011.

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

DOS SANTOS, W. T. P.; GIMENES, D. T.; DE ALMEIDA, E. G. N.; EIRAS, S. D.; ALBUQUERQUE, Y. D. T.; RICHTER, E. M. Simple Flow Injection Amperometric System for Simultaneous Determination of Dipyrone and Paracetamol in Pharmaceutical Formulations. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 20, p. 1249-1255, 2009.

DUKE UNIVERSITY, Student Conduct: “Academic Dishonesty: Cheating [...] It includes, but is not limited to [...]: the unauthorized use of prescription medication to enhance academic performance.” Disponível em: <<https://studentaffairs.duke.edu/conduct/z-policies/academic-dishonesty>>. Acesso em 15 de março de 2021.

EMA. European Medicines Agency. European Medicines Agency recommends restricting the use of modafinil. Julho, 2010.

FFL. *Légion étrangère* (Legião Estrangeira Francesa) é um ramo do serviço militar do Exército Francês criado em 1831.

FIOCRUZ. Fundação Oswaldo Cruz. Instituto de Tecnologia em Fármacos – Farmanguinhos. Gestão de riscos à qualidade: manual prático para uso de ferramenta FMEA em processos farmacêuticos. Rio de Janeiro, 2019.



FREITAS, J. M.; OLIVEIRA, T. D.; GIMENES, D. T.; MUÑOZ, R. A. A.; RICHTER, E. M. Simultaneous determination of three species with a single-injection step using batch injection analysis with multiple pulse amperometric detection. **Talanta**, v. 146, p. 670-675, 2015.

FUJISHIMA, A.; RAO, T. N. New directions in structuring and electrochemical applications of boron-doped diamond thin films. **Diamond And Related Materials**, n. 10, p. 1799-1803, 2001.

GALSTER, H. pH Measurements. **Ed. VCH**, Weiheim, 1991.

GORMAN, S. H. Determination of the d- and l-enantiomers of modafinil in human plasma utilizing liquid-liquid extraction and high-performance liquid chromatography. **J Chromatogr B Biomed Sci Appl**, v. 730, p. 1-7, 1999.

GUO, Q. H.; HUANG, J. S.; CHEN, P. Q.; LIU, Y.; HOU, H. Q.; YOU, T. Y. Simultaneous determination of catechol and hydroquinone using electrospun carbon nanofibers modified electrode. **Sensors and Actuators B-Chemical**, v. 163, p. 179-185, 2012.

HARVANOVÁ M.; GONDOVÁ T. New enantioselective LC method development and validation for the assay of modafinil. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 138, p. 267-271, 2017.

KELLEY, A. M.; WEBB, C. M.; ATHY, J. R.; LEY, S.; GAYDOS, S. Cognition enhancement by modafinil: a meta-analysis. **Aviation, Space, and Environmental Medicine**. USA, v. 83, n.7, p. 685-690, jul.2012.

KUDLOW P. A.; NAYLOR K. T.; XIE B.; MCINTYRE R. S. Cognitive enhancement in Canadian medical students. **J Psychoactive Drugs**. Sep-Oct, v. 45, p. 360-5, 2013.

LAVIE, L. Obstructive sleep apnoea syndrome - An oxidative stress disorder. **Sleep Medicine Reviews**, v. 7, p. 35-51, 2003.

MEDINA, M. L.; MERINO, L. A.; GORODNER, J. O. Utilidad de la saliva como fluido diagnóstico. **Bol Inst Patol Reg.**, p. 78-88, 2004.

MOACHON, G.; MATINIER, D. Simultaneous determination of modafinil and its acid metabolite by high-performance liquid chromatography in human plasma. **J Chromatogr B Biomed Appl**, v. 654, p. 91-6, 1994.

MOORE, S.; CALDER, K. A. C.; MILLER, N. J.; RICE-EVANS, C. A. Antioxidant Activity of Saliva and Periodontal Disease. **Free Radical Research**, v. 21, n. 6, p. 417–425, 1994.

MOURA S. A. B.; MEDEIROS A. M. C.; COSTA F. R. H.; MORAES P. H.; OLIVEIRA FILHO SA. Valor diagnóstico da saliva em doenças orais e sistêmicas: uma revisão de literatura. **Pesqui Bras Odontopediatr Clin Integr**, v. 7, p. 187-194, 2007.

MUSSAVIRA, S.; DHARMALINGAM, M.; SUKUMARAN, B. O. Salivary glucose and antioxidant defense markers in type II diabetes mellitus. **Turkish Journal of Medical Sciences**, v. 45, n. 1, p. 141–147, 2015.

NGAMCHUEA, K.; BATCHELOR-MCAULEY, C.; COMPTON, R. G. Understanding electroanalytical measurements in authentic human saliva leading to the detection of salivary uric acid. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 262, p. 404-410, 2018.

O'DEA J. J.; OSTERYOUNG, J.; OSTERYOUNG, R.A. Theory of square wave voltammetry for kinetic systems. **Analytical chemistry**, v. 53, n. 4, p. 695-701, 1981.

PARK, JIN-KYUNG. Governing Doped Bodies: The World *Anti-Doping* Agency and the Global Culture of Surveillance, v. 5. 2005.

PEREIRA P. F.; MARRA M. C.; LIMA A. B.; DOS SANTOS W. T. P.; MUÑOZ R. A. A.; RICHTER E. M. Fast and simultaneous determination of nimesulide and paracetamol by batch injection analysis with amperometric detection on bare boron-doped diamond electrode. **Diamond and Related Materials**, v. 39, p. 41-46, 2013.

PEREIRA, P. F.; MARRA, M. C.; LIMA, A. B.; DOS SANTOS, W. T. P.; MUÑOZ, R. A. A.; RICHTER, E. M. Fast and simultaneous determination of nimesulide and paracetamol by batch injection analysis with amperometric detection on bare boron-doped diamond electrode. **Diamond and Related Materials**, v. 39, p. 41-46, 2013.

PEREIRA, H. M. G.; PADILHA, M. C.; BENTO, R. M. A.; CUNHA, T. P.; LASCAS N. A. G.; AQUINO NETO, F. R. Analytical and logistical improvements in *doping*-control analysis at the 2007 Pan-American games. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 27, n. 8, p. 648-656, 2008.

PLESKOV, Y. V. Electrochemistry of Diamond: A Review. **Russian Journal Of Electrochemistry**, v. 38, n. 12, p. 1275-1291, 2002.

PLESKOV, Y. V. Synthetic diamond, a new electrode material for electroanalysis. **Journal Of Analytical Chemistry**, v. 55, n. 11, p. 1165-1171, 2000

QU W. M.; HUANG Z. L.; XU X. H.; MATSUMOTO N.; URADE Y. Dopaminergic D1 and D2 receptors are essential for the arousal effect of modafinil. **Journal Neuroscience**, v. 28, p. 8462-9, 2008.

QUINTINO, M. S. M; ANGNES, L., Batch injection analysis: An almost unexplored powerful tool. **Electroanalysis**, v. 16, p. 513-523, 2004.

QUINTINO M. D. M.; CORBO D.; BERTOTTI M.; ANGNES L. Amperometric determination of acetylsalicylic acid in drugs by batch injection analysis at a copper electrode in alkaline solutions. **Talanta**, v. 58, p. 943-949, 2002.

QUINTINO M. S. M.; ARAKI K.; TOMA H. E.; ANGNES L. Batch injection analysis utilizing modified electrodes with tetra-ruthenated porphyrin films for acetaminophen quantification. **Electroanalysis**, v. 14, p. 1629-1634, 2002.

QUINTINO M. S. M.; ANGNES L. Fast BIA-amperometric determination of isoniazid in tablets. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 42, p. 400-404, 2006.

RANI, V.; DEEP, G.; SINGH, R. K.; PALLE, K.; YADAV, U. C. S. Oxidative stress and metabolic disorders: Pathogenesis and therapeutic strategies. **Life Sciences**, v. 148, p. 183–193, 2016.

RAO, T. N.; FUJISHIMA, A. Recent Advances In Electrochemistry Of Diamond. **Diamond And Related Materials**, n. 9, p. 384-389, 2000.

RCM PHARMA. «EMA atualiza indicações de fármacos contendo modafinil». Acesso em 2 de junho de 2021.

RDC N° 63, DE 27 DE SETEMBRO DE 2007. Atualização do Anexo I, Listas de Substâncias Entorpecentes, Psicotrópicas, Precursoras e Outras sob Controle Especial, da Portaria SVS/MS nº 344, de 12 de maio de 1998, republicada no Diário Oficial da União de 1º de fevereiro de 1999. Inclusão do Modafinil na Lista “A3”.

RDC N° 319, DE 12 DE NOVEMBRO DE 2019. Dispõe sobre a fase de implementação do Sistema Nacional de Controle de Medicamentos.

REPANTIS D.; SCHLATTMANN P.; LAISNEY O.; HEUSER I. Modafinil and methylphenidate for neuroenhancement in healthy individuals: A systematic review. **Pharmacol. Res**, v. 62 p. 187-206, 2010.

RIBEIRO, G. A. C.; DA ROCHA, C. Q.; VELOSO, W. B.; FERNANDES, R. N.; DA SILVA, I. S.; TANAKA, A. A. Determination of the catechin contents of bioactive plant extracts using disposable screen-printed carbon electrodes in a batch injection analysis (BIA) system. **Microchemical Journal**, v. 146, p. 1249-1254, 2019.

RKI (ROBERT-KOCH INSTITUT). *Kolibri - Studie zum Konsum Leistungsbeeinflussender Mittel em Alltag und Freizeit - Ergebnisbericht* . Berlin: RKI, 2011.

ROBERTSON, J. P.; HELLRIEGEL, E. T. Clinical Pharmacokinetic Profile of Modafinil. **Clin. Pharmacokinet**, v. 42, p. 123–137, 2003.

SCHAWARTZ JR. Modafinil in the treatment of excessive sleepiness. **Drug Des Devel Ther**, v. 2, p. 71-85, 2009.

SILVA R. A. G.; SILVA L. A. J.; MUÑOZ R. A. A.; RICHTER E. M.; OLIVEIRA A. C. Fast and direct determination of mancozeb through batch injection analysis with amperometric detection on boron-doped diamond electrodes. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 733, p. 85- 90, 2014.

SHETTY S. R. Salivary ascorbic acid levels in betel quid chewers: A biochemical study. **Câncer J do Sul da Ásia**, v. 2, p. 142-144, 2013.

SLAVKIN, H. C. El futuro del diagnóstico molecular em La cavidad oral. **JADA**, v. 2, p. 65-70, 1999.

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

SOUZA G. A.; DOS SANTOS W. T. R. Identificação e determinação de novas substâncias psicoativas em amostras de selos por técnicas voltamétricas usando eletrodo de diamante dopado com boro. 2018.

SOUZA, K. A. O.; NUNES, A. M. F.; PIMENTEL, D. T.; VERLY, R. V.; GIL, E. S.; MALAGUTTI, A. R.; DOS SANTOS, W. T. P. Altered electrochemistry of amiloride drug on boron-doped diamond electrode: Rapid and selective detection in urine by square-wave

cathodic stripping voltammetry for application in doping control. **Electrochimica Acta**, v. 373, 2021.

STEFANO J. S.; LIMA A. P. D.; MONTES R. H. O.; RICHTER E. M.; MUÑOZ R. A. A. Fast determination of naproxen in pharmaceutical formulations by batch injection analysis with pulsed amperometric detection. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 23, p. 1834-1838, 2012.

STIX, G. O cérebro turbinado: uma pílula no café da manhã melhorará a concentração e a memória – e fará isso sem causar problemas a longo prazo para a saúde? **Scientific American Brasil**, São Paulo, n. 90, p. 36-45, nov. 2009.

SUFFREDINI, H. B.; PEDROSA, V. A.; CODOGNOTO, L.; MACHADO, S. A. S.; ROCHA, R. C.; AVACA, L. A. Enhanced electrochemical response of boron-doped diamond electrodes brought on by a cathodic surface pre-treatment. 2. **Electrochimica Acta**, v. 49, p. 4021-4026, 2004.

THOMSON. Health Care Inc.; **Physicians' Desk Reference** 62 ed., Montvale, NJ 2008, p. 98

TORMIN, T. F.; GIMENES, D. T.; RICHTER, E. M.; MUÑOZ, R. A. A. Fast and direct determination of butylated hydroxyanisole in biodiesel by batch injection analysis with amperometric detection. **Talanta**, v. 85, p. 1274-1278, 2011.

TROJANOWICZ, M. Recent developments in electrochemical flow detections-A review Part I. Flow analysis and capillary electrophoresis. **Analytica Chimica Acta**, v. 653, p. 36-58, 2009.

TROJANOWICZ, M.; KOZMINSKI, P.; DIAS, H.; BRETT, C. M. A., Batch-injection stripping voltammetry (tube-less flow-injection analysis) of trace metals with on-line sample pretreatment. **Talanta**, v. 68, p. 394-400, 2005.

TSENG Y. L.; URALETS V.; LIN C. T.; KUO F. H. Detection of modafinil in human urine by gas chromatography-mass spectrometry. **J Pharm Biomed Anal**, v. 39, p. 1042-5, 2005.

TULLY T.; BOURTCHOULADZE R.; SCOTT R.; TALLMAN J. Nature Reviews: Drug Discovery, v. 2, No. 4, p. 267-277, abril 2003.

USOC COMITÊ OLÍMPICO DOS ESTADOS UNIDOS. Representa o EUA nos eventos e assuntos relacionados ao Movimento Olímpico.

USP Modafinil. Interim Revision Announcement Official: The United States Pharmacopeial Convention, September, 2011.

VOLKOW N.D.; FOWLER J.S.; LOGAN J.; ALEXOFF D.; ZHU W.; TELANG F. Effects of modafinil on dopamine and dopamine transporters in the male human brain: clinical implications. **JAMA**, v. 301, p. 1148-1154, 2009.

WADA (WORLD ANTI-*DOPING* AGENCY). Disponível em: <[https://www.wada-ama.org/sites/default/files/resources/files/WADA\\_Prohibited\\_List\\_2004\\_EN.pdf](https://www.wada-ama.org/sites/default/files/resources/files/WADA_Prohibited_List_2004_EN.pdf)>. Acesso em 05 de Maio de 2021.

WADA WORLD ANTI *DOPING* AGENCY Prohibited list 2010. 1 jan. 2010. Disponível em: <[http://www.wada-ama.org/Documents/World\\_Anti-Doping\\_Program/WADP-Prohibited-list/WADA\\_Prohibited\\_List\\_2010\\_EN.pdf](http://www.wada-ama.org/Documents/World_Anti-Doping_Program/WADP-Prohibited-list/WADA_Prohibited_List_2010_EN.pdf)>. Acesso em 10 de abril de 2021.

WADA WORLD ANTI *DOPING* AGENCY. Technical documents. nov. 2009. Disponível em: <<http://www.wada-ama.org/en/Science-Medicine/Anti-Doping-Laboratories/Technical Documents>>. Acesso em 2 de abril 2021.

WADA. WORLD ANTI *DOPING* AGENCY. Technical documents. mar. 2004. Disponível em: <[https://www.wadaama.org/sites/default/files/resources/files/WADA\\_Prohibited\\_List\\_2004\\_EN.pdf](https://www.wadaama.org/sites/default/files/resources/files/WADA_Prohibited_List_2004_EN.pdf)>. Acesso em 10 de maio 2021.

WANG, J.; TAHA, Z. Batch Injection Analysis. **Anal. Chem.**, v.63, p.1053-1056, 1991.

WANG, J. Batch Injection - from FIA to BIA. **Microchem. J.**, v.45, p.219, 1992.

WONG Y. N.; SIMCOE D.; HARTMAN L. N.; LAUGHTON W. B.; KING S. P.; MCCORMICK G. C.; GREBOW P. E. A double-blind, placebo-controlled, ascending-dose evaluation of the pharmacokinetics and tolerability of modafinil tablets in healthy male volunteers. **J Clin Pharmacol**, v. 39, p. 30-40, 1999.

WRAIR Walter Reed Army Institute of Research. Instituto de Pesquisa do Exército Walter Reed (Maryland), 1998.

YOUNUS, M.; ARIF, Md. F.; RICHARDS, M. P.; KUMAR, D. B. Determination of Venlafaxine and Modafinil in Individual Tablet Dosage Forms using Single RP-HPLC Method. **Tropical Journal of Pharmaceutical Research**, v. 12, p. 239-245, 2013.

ZOSKI, C. G. Handbook of Electrochemistry. Las Cruces, New Mexico, USA: **Elsevier**, 2007.