

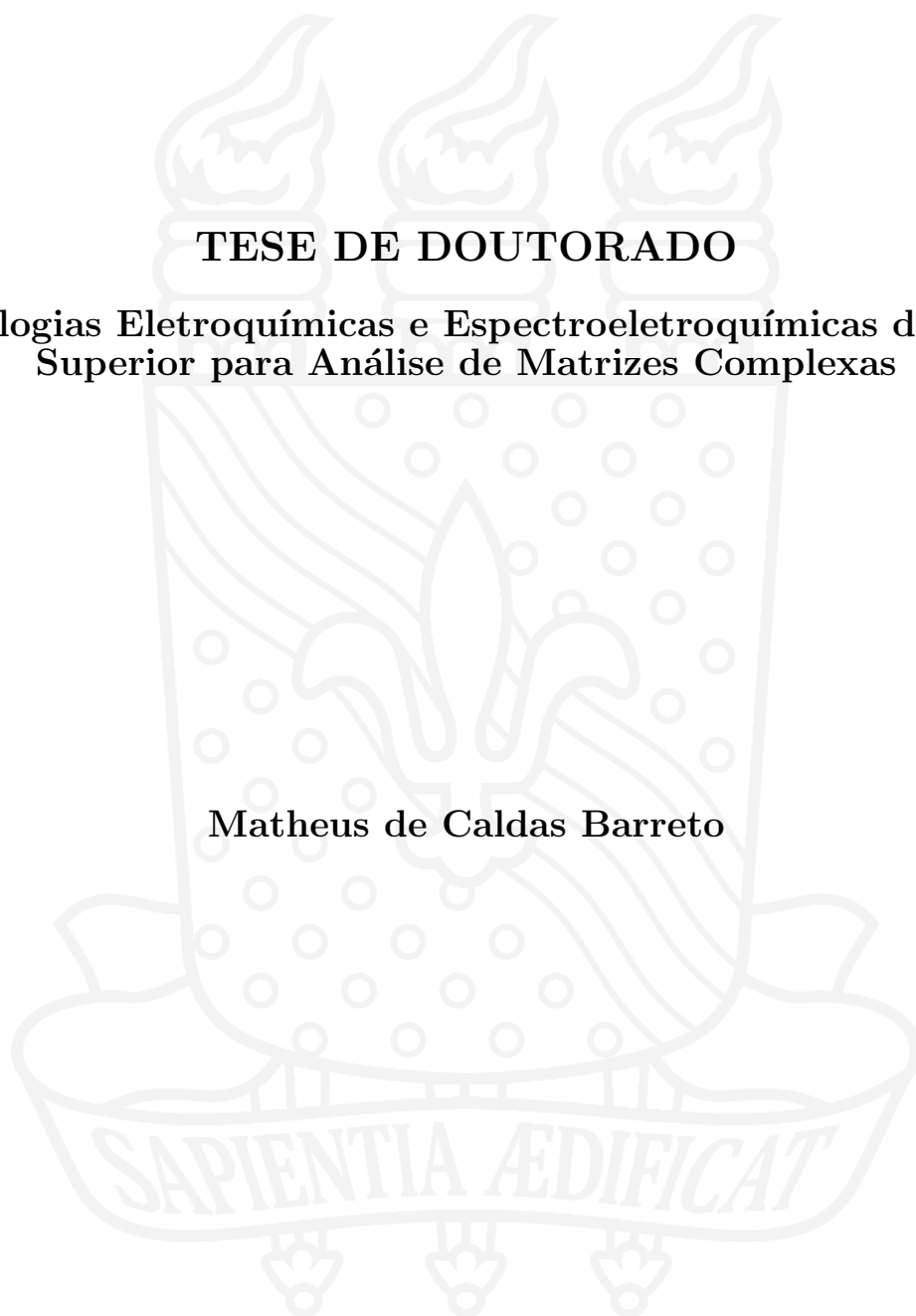


UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DA NATUREZA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

TESE DE DOUTORADO

Metodologias Eletroquímicas e Espectroeletroquímicas de Ordem
Superior para Análise de Matrizes Complexas

Matheus de Caldas Barreto



João Pessoa - PB - Brasil
Outubro/2025



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DA NATUREZA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

TESE DE DOUTORADO

Metodologias Eletroquímicas e Espectroeletroquímicas de Ordem Superior para Análise de Matrizes Complexas

Matheus de Caldas Barreto*

Tese apresentada como requisito para obtenção do título de Doutor em Ciências (Área de concentração: Química Analítica) pela Universidade Federal da Paraíba.

Orientador(a): Wallace Duarte Fragoso

*Bolsista CNPq e CAPES/PrInt

João Pessoa - PB - Brasil
Outubro/2025

Catálogo na publicação
Seção de Catalogação e Classificação

B273m Barreto, Matheus de Caldas.
Metodologias eletroquímicas e espectroeletroquímicas
de ordem superior para análise de matrizes complexas /
Matheus de Caldas Barreto. - João Pessoa, 2025.
110 f. : il.

Orientação: Wallace Duarte Fragoso.
Tese (Doutorado) - UFPB/CCEN.

1. Química analítica. 2. PARAFAC - Parallel Factor
Analysis. 3. Eletroquímica. 4. Espectroeletroquímica.
5. EIE multivias. 6. Voltametria 3D. I. Fragoso,
Wallace Duarte. II. Título.

UFPB/BC

CDU 543(043)

Tese submetida ao corpo docente do Programa de Pós-Graduação em Química do Departamento de Química do Centro de Ciências Exatas e da Natureza da Universidade Federal da Paraíba como parte dos requisitos para a obtenção de grau de Doutor em Ciências (Área de concentração: Química Analítica).

Aprovada pela banca examinadora:

Prof. Dr. Wallace Duarte Fragoso
Departamento de Química da UFPB
(Orientador)

Prof. Dr. Sherlan Guimarães Lemos
Departamento de Química da UFPB
(Coorientador)

Prof. Dr. Jose Gonzalez-Rodriguez
School of Natural Sciences da University of Lincoln
(2º Orientador)

Prof. Dr. Marcelo Martins Sena
Departamento de Química da UFMG
(Membro Titular Externo)

Prof. Dr. Iranaldo Santos da Silva
Departamento de Tecnologia Química da UFMA
(Membro Titular Externo)

Prof. Dr. Marco Flores Ferrão
Instituto de Química da UFRGS
(Membro Titular Externo)

Prof. Dr. José Germano Veras Neto
Departamento de Química da UEPB
(Membro Titular Interno)

*Dedico essa tese a família e
amigos que me acompanharam
e suportaram por todos esses
anos.*

Agradecimentos

Seria impossível citar todas as pessoas e instituições que me foram importantes nessa jornada, mas seria um crime não falar das seguintes:

Agradeço primeiramente às minhas mães Edna Elba de Caldas Barreto e Edna Telma Braga de Caldas, por todo o amor e carinho que puseram em minha criação, e também ao meu pai Saulo Barreto. Agradeço especialmente aos meus irmãos Saulo Barreto Filho e Thiago Barreto, minha irmã Sarah Sophia Oliveira e ao resto da minha família pelo seu suporte e por todos os momentos que compartilhamos.

Às minhas queridas amigas Andressa Aziz, Caitlin Grundy e Nada Mohammed Ali, pela amizade e suporte em momentos bons e maus. Cada uma de vocês foi essencial nessa jornada.

Aos amigos e colegas de laboratório Levi Gomes, Kelvin Araújo, Alcides Siqueira, Larissa Pereira, Finn Eaglestone-Blundell, Cholasit Kaewwichit, Jess York, Daisy Gray, Caitlin MacNeill, entre muitos outros, por sua amizade e colaboração ao longo dos anos.

Um agradecimento especial ao Prof. Wallace Fragoso por acreditar em mim e me guiar desde o início da minha vida acadêmica. Sem ele, eu não seria a pessoa que sou hoje e por isso fico eternamente grato.

Aos meus coorientadores Sherlan Lemos e Jose Gonzalez-Rodriguez, cuja orientação e suporte contínuo permitiram que este trabalho se tornasse o que é. Fico imensamente grato por sua confiança em mim.

Aos professores e colegas da Universidade Federal da Paraíba e da University of Lincoln por terem me recebido e me tratado tão bem.

Às instituições de fomento pela oportunidade e financiamento, tanto no Brasil quanto no exterior, mais especificamente ao CNPq, à CAPES, à FINEP e à FAPESQ.

A todos aqueles que contribuíram para a realização deste trabalho e a conclusão desta tese, eu deixo os meus sinceros agradecimentos e lhes desejo uma vida cheia de realizações.

Sumário

Dedicatória	i
Agradecimentos	ii
Lista de figuras	vi
Lista de tabelas	viii
Lista de abreviações	ix
Notação matemática	xi
Resumo	xii
Abstract	xiii
1 Introdução	1
2 Objetivos	3
2.1 Objetivo geral	3
2.2 Objetivos específicos	3
3 Fundamentação teórica	4
4 Determinação de dopamina e epinefrina por espectroeletroquímica de fluorescência	10
4.1 Introdução	10
4.2 Materiais e métodos	12
4.2.1 Prototipagem da cela espectroeletroquímica	13
4.2.2 Desenvolvimento do interfaceador	13
4.2.3 Arranjo experimental	14
4.2.4 Reagentes e soluções	15
4.2.5 Equipamento e aquisição de dados	16
4.2.6 Processamento de dados	17
4.3 Resultados e discussão	17
4.3.1 Desenvolvimento e construção da cela espectroeletroquímica	17
4.3.2 Desenvolvimento e construção do interfaceador	22
4.3.3 Dados obtidos	23
4.3.4 Pré-processamento de dados	23
4.3.5 Modelos de segunda-ordem	25

4.3.6	Modelos de terceira-ordem	27
4.3.7	Considerações adicionais sobre o arranjo e suas limitações . .	31
4.4	Conclusões	31
5	Determinação de paracetamol por espectroscopia de impedância eletroquímica multivaria	33
5.1	Introdução	33
5.2	Materiais e métodos	35
5.2.1	Reagentes e soluções	35
5.2.2	Equipamento e aquisição de dados	37
5.2.3	Processamento de dados	38
5.3	Resultados e discussão	38
5.3.1	Dados obtidos	38
5.3.2	Modelos PLS e CPLS de primeira-ordem	42
5.3.3	Modelos PARAFAC e MCR	44
5.3.4	Modelos N-PLS/RBL	47
5.3.5	Notas sobre o uso de urina sintética	52
5.4	Conclusões e perspectivas	53
6	Determinação de canabinoides sintéticos por voltametria 3D	55
6.1	Introdução	55
6.2	Metodologia	57
6.2.1	Descrição do sistema	57
6.2.2	Reagentes e soluções	59
6.2.3	Equipamento utilizado	59
6.2.4	Preparo de amostras	60
6.2.5	Análise por CG-MS	61
6.2.6	Escolha da técnica analítica	61
6.2.7	Medição de dados voltamétricos	63
6.2.8	Tratamento de dados	63
6.3	Resultados e Discussão	64
6.3.1	Dados obtidos	64
6.3.2	Análise de dados	65
6.3.3	Observações na expansão do modelo	71
6.4	Conclusões e perspectivas	71
7	Considerações finais	73
	Referências	74
	Apêndice A - Script do interfaceador	87

Apêndice B - Projeto do adaptador para fibra ótica/SPE	89
Apêndice C - Composição das misturas herbais	92
Apêndice D - Projeto da célula eletroquímica	94

Lista de Figuras

1	Representação gráfica da deconvolução de um tensor realizada por PARAFAC.	6
2	Representação gráfica da deconvolução de um tensor desdobrado realizada por MCR/ALS.	8
3	Estruturas químicas da dopamina e epinefrina.	12
4	Esquematização dos diferentes <i>pinouts</i> para I/O digital.	14
5	Esquematização do arranjo experimental para medições espectroeletróquímicas de fluorescência.	15
6	Adaptador de encaixe para fibra ótica.	18
7	Comparação da cela com suporte de o-ring baseada na RPROB e o nova.	19
8	Esquematização dos diferentes encaixes de fibra ótica.	20
9	Protótipo v44.0 da cela com suporte para fibra ótica e SPEs. . . .	20
10	Corte lateral da cela espectroeletróquímica em uso, mostrando o suporte, o eletrodo, a sonda, o adaptador SMA e uma representação da amostra.	21
11	Esquematização do adaptador angular para suporte da fibra ótica e o arranjo para medições espectroeletróquímicas de fluorescência. .	21
12	Esquematização do circuito do interfaceador digital.	22
13	Fluxograma mostrando o funcionamento do interfaceador.	23
14	Esquematização da estrutura de dados de uma amostra e exemplos de cortes $\lambda_{\text{Emi}} \times \text{tempo}$, $\lambda_{\text{Emi}} \times \text{potencial}$ e $\text{potencial} \times \text{tempo}$ da medição fluorimétrica combinada com amperometria para uma mistura de dopamina e epinefrina.	24
15	Comparação dos perfis espectroeletróquímicos deconvoluidos para conjuntos de dados obtidos de soluções de dopamina e misturas de dopamina e epinefrina.	25
16	Perfis instrumentais deconvoluidos para os conjuntos de dados de segunda-ordem obtidos de cortes $\lambda_{\text{Emi}} \times \text{tempo}$ e $\text{tempo} \times \text{potencial}$. .	27
17	Perfis deconvoluidos dos conjuntos de misturas de dopamina e epinefrina.	28
18	Resultado do produto dos perfis puros de dopamina e epinefrina. . .	29
19	Gráficos de Nyquist da MEIS de uma amostra de paracetamol a 1,75 μM	39
20	Diagramas de Bode 3D mostrando o comportamento da mudança de diferentes partes em MEIS com o aumento de concentração de paracetamol.	40

21	Perfis de frequência normalizados pela média do componente real do EIS e o deslocamento de fase para paracetamol e ácido úrico a 300 mV.	42
22	Concentrações nominais contra preditas de paracetamol através de modelos PLS e CPLS com as frações reais, imaginárias, vetores complexos e deslocamento de fase.	43
23	Exemplo de pré-tratamento usando AsLSSR em uma matriz MEIS de deslocamento de fase.	44
24	Perfis deconvoluídos por PARAFAC e MCR com restrições de não-negatividade das MEIS pré tratadas obtidas de misturas paracetamol/ácido úrico em urina.	45
25	Resultado da otimização por MCR-bands com o uso de restrições de não-negatividade.	46
26	Resultados de previsão para os conjuntos de dados de calibração e validação usando as matrizes reais e de deslocamento de fase por meio de N-PLS/RBL.	48
27	Perfis de desvio padrão para o conjunto de calibração. Real, Imaginário, módulo e deslocamento de fase.	51
28	Exemplo de correção de linha de base de matrizes imaginárias MEIS usando AsLSSR	52
29	Estruturas moleculares dos canabinoides sintéticos detectados. . . .	58
30	Suporte proprietário desenvolvido para cela eletroanalítica.	60
31	Voltamogramas multivaria obtidos com o uso dos métodos preliminares A, B, C, D e E respectivamente para a mistura herbal CB34. . .	62
32	Exemplos de matrizes obtidas por DPV 3D para o conjunto de dados da cannabis sintética.	64
33	Centros comuns às duas classes de canabinoides listadas.	65
34	Comparação da DPV 3D de uma amostra com mudanças de tempo de pulso, mostrando os dados brutos e pré-tratados por meio de AsLSSR e icoshift.	66
35	Perfis instrumentais deconvoluídos dos tensores com dados voltamétricos de SCs.	67
36	Projeção usando os dois escores do modo A da deconvolução dos voltamogramas 3D por PARAFAC obtidos pelo método A' e B', com e sem pré-tratamento.	69

Lista de Tabelas

1	Composição do conjunto de amostras de calibração para o sistema dopamina/epinefrina	16
2	Composição do conjunto de amostras de teste para o sistema dopamina/epinefrina	16
3	Resultados da calibração de dopamina com modelos de segunda e terceira ordem.	30
4	Resultados da calibração de epinefrina com modelos de segunda e terceira ordem.	31
5	Concentrações de componentes nas amostras analíticas após diluição (1:400) dos conjuntos de validação A (VA) e B (VB), assim como qual amostra de urina foi usada para cada um.	37
6	Valores de RMSE e R^2 da previsão de paracetamol para os conjuntos de calibração e validação obtida com os modelos baseados em PLS de primeira ordem centrando na média.	43
7	Resultados para os modelos de calibração N-PLS/RBL com diferentes combinações de matrizes, especificando também qual combinação de número de variáveis do modelo e faixa de frequência obteve os melhores resultados. Os tipos de matriz são representados pelas letras R (real), I (imaginário), A (absoluta) e P (deslocamento de fase).	47
8	Resultados de previsão das amostras de validação para um modelo N-PLS/RBL construído com 3 componentes PLS e 1 RBL. As amostras de urina estão indicadas por U, as amostras do primeiro conjunto de validação (com adição de urina real) por VA e as do segundo conjunto de validação (com adição de urina real e níveis mais elevados de ácido ascórbico) por VB.	49
9	Composição da urina sintética produzida em laboratório. Adaptado de Laube et al.	53
10	Especificações dos métodos preliminares baseados em DPV.	61
11	Especificações dos métodos preliminares baseados em SWV.	62
12	Especificações dos métodos baseados em DPV ajustados para a medição das drogas de abuso em acetonitrila.	63
13	Valores de mérito para a deconvolução por PARAFAC das DPV 3D de canabinoides sintéticos com mudanças de amplitude e tempo de pulso.	68
14	Tabela de erros para o modelo de classificação usando o conjunto de dados DPV 3D não pré-tratado com alterações de tempo de pulso e PARAFAC.	70
S1	Composição das misturas herbais contendo canabinoides sintéticos.	92

Lista de abreviações

μTAS Micro Total Analysis System

ABS Acrilonitrila Butadieno Estireno

AC Alternating Current

ALS Alternating Least Squares

AsLSSR Asymetrical Least Squares Spline Regression

CAS Chemical Abstract Service

CORCONDIA Core Consistency Diagnostic

DC Direct Current

DTLD Direct Trilinear Decomposition

E_{ac} Amplitude do potencial alternado

E_{dc} Potencial contínuo

EEM Excitation-Emission Matrix

EIS Electrochemical Impedance Spectroscopy

FDM Fused Deposition Modeling

HID Human Interface Device

I/O Input/Output

ICOSHIFT Interval Correlation Optimized Shifting

LoD Limit of Detection

LoQ Limit of Quantification

MCR Multivariate Curve Resolution

MEIS Multiway Electrochemical Impedance Spectroscopy

MSC Multiplicative Scatter Correction

N-PLS N-way Partial Least Squares

NaN Not a Number

NMR Nuclear Magnetic Resonance

PARAFAC Parallel Factor Analysis

PARASIAS PARAFAC Applied to Shift Invariant Amplitude Spectra

PLA Ácido Polilático

PLS Partial Least Squares

PTW Parametric Time Warping

RBL Residual Bilinearization

REP Relative Error of Prediction

RMSE Root Mean Square Error

RMSEC Root Mean Square Error of Calibration

RMSEP Root Mean Square Error of Prediction

RTL Residual Trilinearization

SMA SubMiniature version A

SNV Standard Normal Variate

SPE Screen Printed Electrode

TTL Transistor-Transistor Logic

U-PLS Unfolded Partial Least Squares

Notação Matemática

Nesse trabalho serão usadas as seguintes notações:

- Elementos de objetos serão representados com a letra do objeto minúscula, em itálico e com a posição subscrita (Ex: Elemento a_{ij} , localizado na linha i e coluna j da matriz **A**).
- Matrizes serão representados por letras maiúsculas em negrito (Ex: Matriz **A**).
- Tensores de três ou mais dimensões serão representados por letras maiúsculas em itálico e sublinhadas (Ex: Tensor X).
- Um “t minúsculo sobrescrito será utilizado para indicar que uma matriz foi transposta. Por exemplo:

$$X = \begin{bmatrix} 1 & 2 \\ 3 & 4 \end{bmatrix} \quad X^t = \begin{bmatrix} 1 & 3 \\ 2 & 4 \end{bmatrix}$$

- Ao expressar valores médios, uma barra acima do elemento será usada. A posição dessa barra também pode implicar coisas diferentes. Por exemplo:
 - $\bar{x}_i$ indica o elemento i da matriz de médias $\bar{X}$.
 - $\overline{x_i}$ indica a média de todos os valores de x_i .

Resumo

O efeito de interferentes é um problema importante na Química Analítica. Algumas abordagens para lidar com esse problema são métodos de separação, desenvolvimento de sensores seletivos, entre outros. Há também maneiras de separar matematicamente o sinal do analito, com esse sendo adquirido em múltiplas vias, extraindo informações relevantes e ganhando robustez aos interferentes através de propriedades matemáticas. Esses são os métodos de ordem superior ou multivias. Nesse trabalho, três métodos baseados em técnicas eletroquímicas e espectroeletroquímicas foram empregados para obtenção de sinais de ordem superior e usadas no estudo de sistemas distintos. O primeiro é um método espectroeletroquímico, combinando amperometria e fluorescência. Uma cela proprietária e um sistema de interfaceamento também foram desenvolvidos para o experimento. Misturas de dopamina/epinefrina foram usadas para avaliar o método. Foram adquiridos dados em três vias (emissão-tempo-potencial) e os modelos de terceira ordem forneceram previsões com erros relativos de predição (REP) de 1 a 2%, em comparação com os de segunda ordem que apresentaram REP de 9 a 40%, evidenciando as vantagens de uma expansão na dimensionalidade dos dados para além da segunda-ordem. O segundo método foi a expansão de espectroscopia de impedância eletroquímica para segunda ordem ao variar o potencial contínuo. Esse método foi aplicado à quantificação de paracetamol em urina, na presença de ácido úrico e ascórbico como interferentes. Usando a combinação da fração real da impedância com o deslocamento de fase do sinal, foi possível determinar o paracetamol na faixa de 0,5 a 3,0 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ com um erro quadrático médio de predição (RMSEP) de 0,38 $\mu\text{mol.L}^{-1}$. Por fim, o terceiro método consistiu na aplicação de técnicas voltamétricas 3D, criando modelos para identificação de canabinoides sintéticos em amostras reais ($n=48$). Esses modelos, permitiram a identificação de drogas baseadas em indol-3-oato de 8-quinolina, indazol-3-amida e amostras negativas, com modelos criados usando voltamogramas de pulso diferencial com mudanças de tempo de pulso, obtendo precisão de 98.3%.

Palavras-chave: *PARAFAC, análise de dados multivias, espectroeletroquímica, EIE multivias, voltametria 3D.*

Abstract

The effect of interferences is an important problem in Analytical Chemistry. Some approaches to deal with this problem are usually separation methods, development of selective sensors, among others. There are also ways to mathematically separate the analyte signal, with it being acquired in multiple instrumental ways, extracting relevant information and gaining robustness to the interferences through mathematical properties. These are called multiway or higher-order methods. In this work, three methods based in electrochemical and spectroelectrochemical techniques were used to obtain multiway signals, applying them in the study of different systems. The first is a spectroelectrochemical method, combining chronoamperometry and fluorescence. A proprietary cell and an interfacing system were developed for the experiment, with dopamine/epinephrine mixtures being used to test the methodology. Data was acquired in three ways (emission-time-potential) and the third-order models provided predictions with relative errors of prediction (REPs) of 1 to 2%, compared to the second-order models, presenting REPs of 9 to 40%, highlighting the advantages of expanding data dimensionality beyond second-order. The second method was the expansion of electrochemical impedance spectroscopy to a second order technique by varying the direct current potential. This method was applied to the quantification of paracetamol in urine, in the presence of added uric and ascorbic acid as interferents. Using the combination of the real part of the impedance with the phase shift of the signal, it was possible to determine paracetamol in the range of 0.5 to 3.0 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ with a root mean squared error of prediction (RMSEP) of 0.38 $\mu\text{mol.L}^{-1}$. Finally, the third method consisted of the application of multiway voltammetric techniques, creating models for the identification of synthetic cannabinoids in street samples ($n=48$). The best performance was attained by models created with differential pulse voltammetry with gradual changes in pulse times, allowing the identification of drugs based on 8-quinoline indole-3-oate, indazole-3-amide and negative samples, with a 98.3% accuracy.

Keywords: *PARAFAC, multiway data analysis, spectroelectrochemistry, multiway EIS, 3D voltammetry.*

1 Introdução

Um dos principais desafios para o desenvolvimento de novos métodos analíticos é garantir robustez à presença de diferentes interferentes nas matrizes analisadas. Isso se torna especialmente problemático em matrizes complexas, como as matrizes biológicas, ambientais e alimentícias, para dar alguns exemplos.

Nesse contexto, a utilização de metodologias robustas à presença de interferentes, sejam eles conhecidos ou não, é importante por permitir a redução, ou até mesmo a eliminação, de etapas de pré-tratamento das amostras. O desenvolvimento de sensores altamente seletivos é uma maneira de fazer isso, mas em alguns casos, isso simplesmente não é trivial ou mesmo viável. Com baixa seletividade, o sinal analítico não pode ser atribuído apenas ao analito, compreendendo também contribuições significativas dos interferentes. Além de etapas de pré-tratamento, uma das maneiras comuns de lidar com a presença de interferentes na amostra é basicamente a separação física desses do analito através de técnicas de separação como cromatografia e eletroforese, sendo essas as mais prolíficas na literatura. Com os interferentes separados, o problema de sobreposição de sinais se resolve, mas apesar de comuns, muitas vezes essas técnicas podem envolver o uso de reagentes e solventes caros, ou processos demorados, aumentando os custos recorrentes e impacto ambiental do seu uso rotineiro.

Há, no entanto, maneiras de separar matematicamente tais contribuições, extraindo informações relevantes do sinal analítico misto, adquirindo robustez aos interferentes através de propriedades matemáticas em vez de físicas, em alguns casos podendo obter os sinais puros, no que já foi chamado de “cromatografia virtual” [1, 2].

Os chamados dados de ordem superior possuem certas características que os tornam especialmente relevantes nesse contexto, com aplicações tanto baseadas na construção de modelos de calibração quanto nas análises qualitativas desses dados com aplicações em identificação de origem, controle de qualidade, análises de propriedades específicas, entre outros [1, 2]. Em especial, o uso de métodos de deconvolução podem permitir a recuperação de perfis de componentes puros, o que pode ser de enorme interesse, permitindo um entendimento mais aprofundado sobre os diferentes sistemas sendo estudados [3, 4].

Técnicas eletroquímicas em específico podem fornecer uma gama de diferentes formas de geração de dados de ordem superior, sendo essa uma área em constante desenvolvimento. Esses dados podem ser obtidos de forma direta, ou seja, através da medição de propriedades ou processos ocorrendo entre a amostra e o eletrodo [5, 6]. A obtenção de dados também pode ser feita de maneira indireta, quando as técnicas eletroquímicas em si podem ser usadas para causar mudanças na amostra que, por sua vez, podem ser medidas de outra forma. Esse tipo de medição indireta pode se dar ao combinar as técnicas eletroquímicas com outros tipos, como técnicas

espectroscópicas, permitindo acompanhar as mudanças na superfície do eletrodo e na solução em si ao longo do tempo [7, 8].

Devido às características citadas acima, a combinação do uso das técnicas instrumentais propostas com métodos de deconvolução de ordem superior pode ser uma poderosa ferramenta tanto para detecção quanto para análise de perfis instrumentais de analitos de interesse em matrizes complexas, como é o caso de sistemas biológicos por exemplo, potencialmente levando a aplicações clínicas, forenses e ambientais.

Nesse trabalho são estudadas três diferentes abordagens utilizando técnicas eletroquímicas para geração de dados de ordem superior, com aplicações distintas. Um estudo usando espectroeletroquímica de fluorescência molecular e amperometria para deconvolução de misturas de compostos com perfis altamente colineares, uma avaliação da aplicabilidade de espectros de impedância eletroquímica multi- via com uma aplicação na determinação de fármacos em matrizes biológicas e, por fim, o uso de voltametria 3D comparando diferentes técnicas para a identificação de drogas de abuso, sendo aplicado em um conjunto de amostras reais.

2 Objetivos

2.1 Objetivo geral

- Explorar multilinearidade e vantagem de segunda e terceira ordem para propor novas metodologias analíticas usando técnicas eletroquímicas e espectroeletroquímicas de ordem superior, solucionando problemas analíticos em matrizes complexas.

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar arranjos experimentais que viabilizem a obtenção reprodutível de dados espectroeletroquímicos, com o desenvolvimento de ferramentas para sua viabilização, caso necessário.
- Avaliar o uso da espectroeletroquímica de fluorescência molecular em um problema analítico complexo: A determinação simultânea de dopamina e epinefrina.
- Avaliar o uso de espectroscopia de impedância multivía para geração de dados de ordem superior e aplicá-la na determinação de paracetamol em urina.
- Avaliar o uso de voltametria tridimensional para a detecção e classificação de canabinoides sintéticos em amostras reais.

3 Fundamentação teórica

Quando se trata de robustez à presença de interferentes, uma característica relevante dos dados multivaria é a chamada vantagem de segunda ordem, que permite a análise de um determinado analito sem a necessidade de projetar seu experimento para considerar cada interferente possível [1, 2]. Essa vantagem está presente em métodos com conjuntos de dados de pelo menos três vias. Há também um argumento a ser feito para o uso de conjuntos de dados de quatro ou mais vias. Embora a existência de uma “vantagem de terceira ordem” não seja um consenso, há trabalhos que relatam um aumento na seletividade em testes comparativos, juntamente com uma maior resiliência contra ruído experimental e a fatores altamente correlacionados dentro do tensor [9–11].

Existem diferentes maneiras de gerar esses dados, uma ainda relativamente pouco explorada no contexto de análise de dados de ordem superior é a combinação de técnicas eletroquímicas com espectroscópicas. Na literatura existem exemplos desse tipo de técnica ser capaz de gerar dados multilineares [7].

Ainda assim, a grande maioria das aplicações se baseia no uso de absorção UV-Vis [8, 12] com grande foco em estudos de caracterização [13]. Apesar de naturalmente possuir características multilineares, o uso de medidas de fluorescência molecular no contexto de medidas espectroeletroquímicas é relativamente incomum em análises quantitativas, sendo mais comum aplicações em caracterização de eletrodos e acompanhamento de processos em superfícies [14]. A espectroscopia de fluorescência molecular pode potencialmente ajudar a resolver um dos principais problemas das medições espectroeletroquímicas, que é a baixa sensibilidade devido às mudanças na concentração dos compostos na superfície do eletrodo serem muito pequenas [15]. Dito isso, o desenvolvimento de células de medição também pode ser complexo devido à limitação de materiais disponíveis, uma vez que a maior sensibilidade da técnica também implica em uma maior sensibilidade para detectar interferentes presentes no aparato de medição, com maiores sinais de fundo.

Outra maneira de gerar dados de segunda ordem, agora usando apenas técnicas eletroquímicas, é a realização de mudanças graduais em certos parâmetros instrumentais de técnicas voltamétricas, como a coleta de vários voltamogramas de pulso diferencial em diferentes amplitudes e tempos de pulso, ou voltamogramas de onda quadrada em diferentes frequências [5, 6, 16]. Esta abordagem se enquadra no que é conhecido como voltametria tridimensional, ou voltametria 3D, e tem sido capaz de obter vantagem de segunda ordem, permitindo determinações em casos com considerável sobreposição de sinal e requerendo pré-tratamento mínimo da amostra.

Uma outra possibilidade interessante para a geração de dados eletroquímicos multidirecionais é pela obtenção de espectros de impedância eletroquímica em

diferentes potenciais aplicados. Essa é uma abordagem interessante ainda pouco explorada no contexto de análise de ordem superior [17], mas sua capacidade de criar modelos de calibração e classificação já foi avaliada com métodos de primeira ordem [18–21]. Portanto, explorar essa técnica e aprender sobre as propriedades dos dados gerados pode levar ao desenvolvimento de métodos com potencial para análise de sistemas complexos.

A espectroscopia de impedância eletroquímica (EIS, do inglês *Electrochemical Impedance Spectroscopy*) aplica para cada medição uma tensão alternada com amplitude fixa, variando sua frequência em uma faixa definida, tipicamente entre 10 mHz e 1 MHz, com a corrente resultante sendo usada para gerar um vetor de valores complexos de impedância. Esses dados podem ser usados de diferentes maneiras: sem modificação com algoritmos compatíveis, apenas a parte real, apenas a parte imaginária, o módulo ou o ângulo de fase. A alteração do potencial pode, portanto, fornecer outra via instrumental, permitindo a geração de uma matriz de valores complexos de impedância para cada amostra.

Existem diversos métodos que podem ser usados para analisar dados multivaria, os mais comuns sendo aqueles baseados em Análise de Fatores Paralelos [3] (PARAFAC, do inglês *Parallel Factor Analysis*), Resolução de Curvas Multivariadas com Mínimos Quadrados Alternados (MCR-ALS, do inglês *Multivariate Curve Resolution by Alternating Least Squares*) [4], bem como outros baseados em Mínimos Quadrados Parciais Desdobrados (U-PLS, do inglês *Unfolded Partial Least Squares*) [22] e multivaria (N-PLS, do inglês *N-way Partial Least Squares*) [23], cada um com suas próprias propriedades.

Um modelo PARAFAC é baseado na deconvolução de um tensor de dados multilinear, que por sua vez é descrito por um arranjo de n matrizes (no caso de PARAFAC de n vias), cada uma representando um plano do espaço $\mathbb{R}^n$. Por exemplo, em um tensor composto de dados espectrocinéticos, o tensor tridimensional de dados será deconvoluido nas matrizes **A**, **B** e **C**, com a matriz **A** carregando os perfis de intensidade de sinal das amostras, a matriz **B** terá os perfis espectrais normalizados e a matriz **C** os perfis cinéticos para cada componente. Se os dados forem bem modelados, esses perfis podem ser obtidos para cada componente puro. A obtenção desses perfis independentes garante enorme versatilidade no uso do método, uma vez que permite ao analista tratar os resultados como se cada componente de interesse estivesse puro. Essa característica permite várias abordagens diferentes para a análise de dados deconvoluídos. A matriz de intensidades pode ser utilizada tanto para calibração pseudo-univariada, permitindo análises quantitativas, quanto de maneira semiquantitativa. As matrizes de perfil instrumental podem ser usadas para identificar componentes, mas também podem ajudar a esclarecer processos específicos dessas técnicas instrumentais [24].

O PARAFAC em sua versão mais simples basicamente opera sob a presunção de que o banco de dados tratado tem características multilineares, ou seja, pode ser deconvolvido pela combinação de n matrizes distintas como visto nas equações (1) e (2) para um PARAFAC trilinear, com essa sendo a característica definitiva do modelo, onde $\underline{X}$ representa o tensor original, $\mathbf{A}$, $\mathbf{B}$ e $\mathbf{C}$ são as matrizes de cada modo, F o número de fatores, $\underline{E}$ o tensor de resíduos, e $|\otimes|$ o produto de Khatri-Rao entre as matrizes. Uma representação do funcionamento de um modelo PARAFAC de três vias pode ser visto na Fig. 1.

$$\underline{X} = \mathbf{A}(\mathbf{C}|\otimes|\mathbf{B})^t + \underline{E} \quad (1)$$

$$x_{i,j,k} = \sum_{f=1}^F a_{i,f} b_{j,f} c_{k,f} + e_{i,j,k} \quad (2)$$

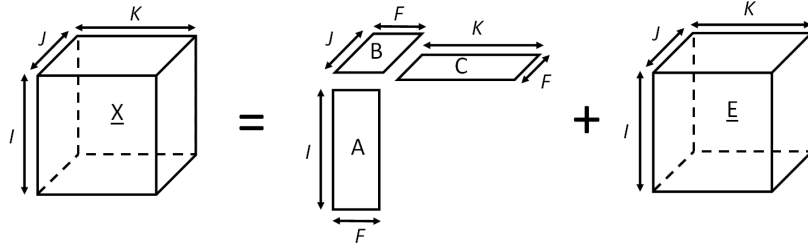


Figura 1: Representação gráfica da deconvolução de um tensor realizada por PARAFAC.

Como dito anteriormente, modelos PARAFAC não se aplicam apenas a dados de segunda ordem, também pode ser estendido para tensores de n -vias com propriedades multilineares. Por exemplo, com um tensor tridimensional de dados sendo obtido para cada amostra e o tensor do conjunto sendo organizado em diferentes níveis, o PARAFAC será um modelo quadrilinear construído a partir desses dados de terceira ordem. Sendo assim, o tensor seria modelado pela Eq. (3). Essa expansão para dados de terceira ordem se dá naturalmente, com as propriedades e vantagens esperadas de um modelo PARAFAC de 3 vias se aplicando da mesma forma, havendo também estudos apontando que estes têm o potencial de serem mais robustos a fatores correlacionados e a ruído [11, 25].

$$x_{i,j,k,l} = \sum_{f=1}^F a_{i,f} b_{j,f} c_{k,f} d_{l,f} + e_{i,j,k,l} \quad (3)$$

Outra vantagem do PARAFAC é que sua solução é essencialmente única quando o tensor de dados é multilinear, quando isso é feito sem exceder o número de fatores

e na ausência de colinearidade entre os componentes. A colinearidade entre fatores em um único modo pode causar a formação de platôs em vez de um mínimo global, resultando em uma perda parcial de singularidade e criação de resultados degenerados da solução PARAFAC [3, 26, 27].

Algumas das abordagens propostas para a coleta de dados também podem levar a deslocamentos de perfil no tensor, com bandas sendo deslocadas ou mesmo mudando ligeiramente de forma, o que levaria a uma quebra na multilinearidade, tornando o conjunto de dados incompatível com o PARAFAC. Existem, no entanto, alternativas, seja o uso de métodos de pré-tratamento de correção de deslocamento nos dados ou o uso de outros métodos, como o PARAFAC2 [28, 29], que pode lidar com tais deslocamentos e mudanças por ser um método menos restrito, exigindo apenas que o produto da matriz de componentes seja o mesmo para cada corte do tensor. Outro possível método baseado no PARAFAC é o PARAFAC Aplicado ao Espectro de Amplitude Invariante a Deslocamento (PARASIAS, do inglês *PARAFAC Applied to Shift Invariant Amplitude Spectra*) [30], que mostrou bons resultados para esses casos, também permitindo restrições de não negatividade no modo de deslocamento, embora seu desempenho seja reduzido para maiores números de componentes.

Metodologias usando MCR-ALS também podem fornecer uma boa alternativa para a deconvolução de dados. Como o PARAFAC, MCR-ALS também fornece perfis deconvoluidos dos componentes puros, no entanto, ele o faz através de um princípio diferente. O MCR pode deconvoluir um tensor desdobrado através de um modelo bilinear em duas matrizes, uma com perfis constantes e outra com perfis aumentados na direção do desdobramento. Essa característica permite a modelagem de tensores com deficiências de trilinearidade em um dos modos, sendo mais flexível que o PARAFAC [2, 31]. Por outro lado, ao contrário do PARAFAC, métodos baseados em MCR não têm uma solução única, resultando no que é chamado de ambiguidade de resultado. Nesse contexto, ambiguidade consiste no fato de múltiplos conjuntos de produtos de matrizes serem capazes de gerar os mesmos resultados, sendo essas combinações não-únicas. Existem métodos capazes de estimar a extensão dessa ambiguidade, como o MCR-bands [32], que permite até comparar diferentes configurações no algoritmo de deconvolução para sua otimização. Devido a essa característica de modelos MCR, o uso de restrições é um dos aspectos fundamentais de sua aplicação a um conjunto de dados, pois estes podem reduzir a ambiguidade e direcionar a deconvolução para resultados com sentido físico. Pode-se até dizer que o uso efetivo do MCR envolve o uso adequado de restrições. Existem muitas restrições desenvolvidas, incluindo as de não-negatividade, unimodalidade e multilinearidade [33, 34].

A deconvolução por MCR-ALS pode ser visualizada da maneira descrita na Fig. 2 e na Eq. (4), com uma matriz $\mathbf{S}$ com perfis constantes para todas as amostras e uma matriz $\mathbf{C}$ com perfis aumentados na direção do desdobramento.

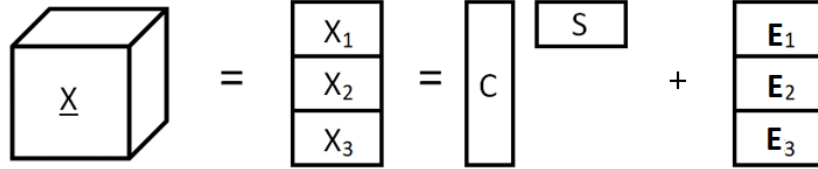


Figura 2: Representação gráfica da deconvolução de um tensor desdobrado realizada por MCR/ALS.

$$x_{i,j} = \sum_{f=1}^F c_{i,f} s_{j,f} + e_{i,j} \quad (4)$$

Como pode-se perceber pela Eq. (4), o MCR pode ser visto estruturalmente e ser usado como uma técnica de 1ª ordem. No entanto, vale a pena mencionar que ao utilizar o desdobramento de um tensor de dados no sentido de uma das vias instrumentais e o deconvoluindo por MCR-ALS, esse modelo poderá obter vantagem de segunda ordem [35]. Em situações ideais, tanto modelos PARAFAC quanto MCR podem ser usados de maneira intercambiável e com aplicações similares, uma vez que ambos obtêm perfis puros para cada componente da amostra. No entanto, na prática eles podem possuir “performances” diferentes, variando de caso a caso.

Técnicas baseadas em PLS, como Mínimos Quadrados Parciais Desdobrados (U-PLS) [22] ou mínimos quadrados parciais multivias (N-PLS) [23] com Bilinearização Residual (RBL) [36], são outra possibilidade para a construção de modelos de calibração. Embora não possam recuperar tanta informação qualitativa do tensor de dados quando comparadas aos métodos baseados em PARAFAC e MCR/ALS, elas podem produzir modelos de calibração robustos.

Modelos U-PLS e N-PLS operam de maneira diferente, sendo o U-PLS um método de segunda ordem baseado no PLS tradicional. Primeiro, cada matriz padrão com dimensões $K \times J$ é desdobrada em um vetor $KJ \times 1$. Uma matriz de calibração $\mathbf{X}_{\text{Cal}}$ é então construída, reunindo esses vetores para todos os padrões I de forma que $\mathbf{X}$ é uma matriz $KJ \times I$. Assim, uma calibração PLS convencional é realizada com a matriz $\mathbf{X}$. O N-PLS ou PLS Multilinear, por outro lado, é uma extensão do modelo PLS para aceitar dados multivias diretamente, com uma decomposição multilinear.

Esses modelos baseados em PLS para dados de ordem superior estão entre os mais versáteis para a construção de modelos de calibração de dados de ordem

superior entre os citados nesta tese, uma vez que a parte relevante do tensor relacionada a variável dependente não precisa ter posto unitário, o que pode permitir aos modelos lidar com certos tipos de efeito de matriz e propriedades de analitos com posto intrinsecamente não-unitário [23]. No entanto, essa maior robustez a desvios na multilinearidade por si só não implica em melhor performance em todos os casos. Um bom exemplo mostrando esse aspecto pode ser visto em um trabalho publicado por Anzardi *et al.*, no qual U-PLS/RBL e U-PLS/RTL foram comparados com MCR/ALS para a determinação de dez tipos diferentes de quinolonas em tecido animal usando cromatografia líquida e fluorescência com dados de segunda e terceira ordem (tempo-emissão e tempo-excitação-emissão) [37]. Nesse trabalho os bancos de dados foram tratados usando as técnicas propostas, mas definir qual é a mais adequada não é algo necessariamente trivial e deve ser feito caso a caso.

4 Determinação de dopamina e epinefrina por espectroeletroquímica de fluorescência

4.1 Introdução

Na análise multivariada, modelos com dados de segunda ordem, correspondendo a uma matriz de dados por amostra, ganharam atenção devido a sua maior robustez à presença de interferentes não modelados. Isso é conhecido como vantagem de segunda ordem [1, 38]. Como foi citado anteriormente, diferentes métodos podem ser usados com dados de segunda ordem e apresentam essa vantagem, como o PARAFAC e o MCR-ALS. É possível obter dados de ordens ainda mais altas, no entanto a existência de vantagens intrínsecas no uso de dados de terceira ordem (ou maior) ainda é objeto de discussões em andamento, sem um consenso estabelecido na comunidade científica [38]. Alguns autores sugerem quais podem ser as vantagens em fazê-lo, mesmo que não sejam intrínsecas ao aumento da dimensionalidade especificamente. Duas propriedades se destacam: robustez à presença de componentes com perfis semelhantes, o que poderia criar resultados degenerados em métodos de segunda ordem, e robustez ao ruído instrumental devido à maior quantidade de informação devido ao maior número de vias [10, 11, 25, 35].

Embora possa-se argumentar que simplesmente aumentar a ordem em alguns casos pode não necessariamente trazer muitas informações novas para o sistema, vale a pena dizer que uma maior quantidade de informação por si só pode aumentar consideravelmente a robustez do modelo à presença de ruído, pois sua influência tende a ser diminuída [11].

Apesar das diversas vantagens existentes no uso de dados e técnicas multivias, um dos aspectos que podem ser desafiadores no campo da análise desses dados é sua geração, especialmente para ordens mais elevadas. Enquanto algumas técnicas instrumentais são inerentemente aptas a gerar esse tipo de dados, como no caso da espectroscopia de fluorescência 3D, outras metodologias podem ser baseadas no uso de técnicas hífenadas, ou seja, combinando duas ou mais técnicas analíticas para geração de dados. Uma combinação interessante é a medição de dados espectroeletroquímicos, usando técnicas eletroquímicas para alterar a composição de uma amostra localmente enquanto essa mudança é medida com o uso de uma técnica espectroscópica.

Embora seja prolífico em análise qualitativa para caracterização de eletrodos, o uso de técnicas espectroeletroquímicas em um contexto de calibração de ordem superior ainda é algo relativamente pouco explorado. Existem exemplos na literatura desse tipo de técnica capaz de gerar dados multilineares, [37] o que torna seu uso com o PARAFAC algo natural. Ainda assim, a maioria das aplicações é baseada no uso de absorção UV-Vis [12, 13, 39], com alguns estudos aplicando

também espectroscopia no infravermelho [40, 41], com um forte foco em estudos de caracterização [13].

A associação entre técnicas espectroscópicas e eletroquímicas tem o potencial de gerar dados multivias de diversas formas [7, 8, 12, 13, 39], mas a espectrofluorimetria 3D, em especial, tem um potencial enorme para essa aplicação, pois é naturalmente uma técnica de segunda ordem. Usando medições voltamétricas para adicionar uma via, ou medidas amperométricas em diferentes potenciais podendo adicionar duas outras, tem-se um número considerável de combinações capazes de gerar esses dados.

Apesar de suas características naturalmente multilineares, medições espectro-eletroquímicas baseadas em espectrofluorimetria molecular são majoritariamente aplicadas na caracterização de eletrodos e monitoramento de processos em superfícies, com seu uso em calibração de ordem superior sendo raro [14]. Entre outros aspectos, a espectroscopia de fluorescência tem potencial para aplicações interessantes, tanto devido à sua maior sensibilidade, quando comparado a medições UV-Vis, quanto à sua seletividade.

Por si só, a construção do aparato de medição também pode se mostrar desafiadora [15], com considerações precisando serem feitas para escolha de materiais, a praticidade da prototipagem, o potencial de problemas mecânicos na implementação, para não falar das dificuldades de combinar equipamentos diferentes, de fabricantes diferentes para usos para os quais esses não foram projetados para abranger.

Para avaliar a metodologia proposta, um sistema modelo conhecido foi escolhido, nesse caso amostras contendo misturas de dopamina (CAS 62-31-7) e epinefrina (CAS 51-43-4), cujas estruturas moleculares são mostradas na Fig. 3. A dopamina e a epinefrina são catecolaminas que atuam como neurotransmissores e hormônios em vários sistemas biológicos. Elas são naturalmente presentes no corpo humano e também são importantes para os sistemas cardiovascular e nervoso central. Do ponto de vista analítico, esse é um sistema especialmente interessante para avaliar essa metodologia, pois ambos os analitos possuem perfis tanto espectrais como voltamétricos consideravelmente similares, o que dificulta consideravelmente a sua análise com métodos de primeira ordem e sensores não especializados.

Sistemas medindo a fluorescência de misturas de catecolaminas similares são conhecidos na literatura por serem de difícil deconvolução [42]. Esse mesmo sistema foi estudado por Garoz-Ruiz *et al.* através de espectrovoltamogramas de absorção cíclicos para geração de dados [8].

Neste estudo, uma combinação de amperometria em diferentes potenciais e espectroscopia de fluorescência foi sugerida para a geração de tensores de terceira ordem: espectros de emissão obtidos em diferentes tempos durante medições amperométricas realizadas em diferentes potenciais, levando a dados de três vias por

amostra [43] com o sinal mapeado num espaço abrangendo as variáveis comprimento de onda de emissão, tempo e potencial, ou seja $\lambda_{\text{Emi}} \times \text{tempo} \times \text{potencial}$. Como estudo de caso, a determinação simultânea de dopamina e epinefrina foi realizada usando modelos PARAFAC de segunda e terceira-ordem para modelar os dados obtidos com esta configuração experimental, e os modelos foram comparados para identificar vantagens adicionais no uso da estrutura de dados mais complexa.

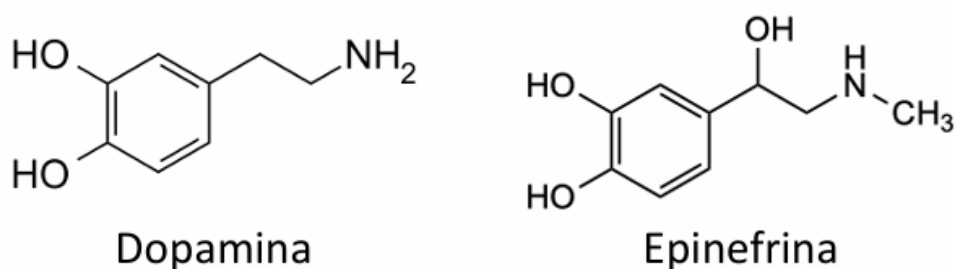


Figura 3: Estruturas químicas da dopamina e epinefrina.

4.2 Materiais e métodos

Nesse trabalho, foi explorada a geração de dados espectroeletroquímicos multi-*via* com a utilização de um potenciostato Autolab PGSTAT101 da *Metrohm* e um espectrofluorímetro *Cary Eclipse* da *Agilent Technologies* com o suporte de fibra ótica *dip probe* associado ao adaptador interno necessário.

Para a obtenção dos dados espectroeletroquímicos ser possível, foi necessário o desenvolvimento de um arranjo experimental que permitisse o uso conjunto do espectrofluorímetro e do potenciostato para que esse arranjo possa realizar as seguintes funções:

- Suportar o eletrodo impresso (SPE, do inglês *Screen Printed Electrode*), tendo uma abertura superior permitindo a passagem de luz.
- Suportar a fibra ótica de forma que sua posição seja estável e reprodutível.
- Possuir um encaixe na superfície do eletrodo resistente a vazamentos, de maneira que a gota seja estável no tempo.
- Possuir espaço para os contatos eletrônicos.
- Possuir estrutura que permita a troca de amostras sem afetar consideravelmente a reprodutibilidade.

- Permitir a inicialização das medições voltamétricas e espectroscópicas de maneira conjunta.

Para realizar as medidas, um espectrofluorímetro e um potenciostato foram utilizados em paralelo, sincronizados por uma interface desenvolvida em nosso laboratório. Uma cela espectroeletroquímica também foi projetada para receber um SPE e uma sonda de fibra óptica. Maiores detalhes sobre a integração entre os instrumentos utilizados no arranjo experimental serão fornecidos nas seções a seguir.

4.2.1 Prototipagem da cela espectroeletroquímica

No contexto desse trabalho, foi necessária a criação de uma cela espectroeletroquímica que apresentasse os requerimentos citados anteriormente. A prototipagem dessa cela precisava ser feita de forma que o protótipo pudesse ser facilmente modificado em um processo iterativo, mantendo baixos custos de construção. Para esse fim, uma impressora 3D de deposição fundida Ender 3 v2 foi utilizada. O uso de impressão 3D permite uma prototipagem mais rápida e maior flexibilidade no design das peças necessárias. No entanto, as peças produzidas também possuem em média menor precisão de fabricação comparados a peças usinadas, assim como uma maior probabilidade de possuir defeitos de produção. Para os protótipos foram utilizados filamentos de ácido polilático (PLA) e acrilonitrila butadieno estireno (ABS) como materiais de confecção.

Para criação de projeto dos protótipos e modelagem 3D foi utilizado o *software* Fusion 360 da Autodesk® e para corte do modelo e criação dos *gcodes* foi utilizado o Automaker® Cura.

4.2.2 Desenvolvimento do interfaceador

Para aumentar a reprodutibilidade dos dados medidos, é interessante remover o fator humano para iniciar as medições. Uma maneira de obter um gatilho digital para o início das medições no espectrofluorímetro é através do uso da porta de Entrada/Saída digital (I/O) do potenciostato, como mostrado no manual técnico de interfaceamento fornecido pela Metrohm [44].

Diferentes potenciostatos da Metrohm podem possuir portas de interfaceamento digital de 15 e 25 pinos, como mostrado na Fig. 4, se comunicando usando diferentes protocolos. No caso deste trabalho, foi utilizado lógica transistor-transistor (TTL, do inglês *Transistor-Transistor Logic*), com lógica +5V, o qual foi usado para determinar o estado de cada pino individualmente.

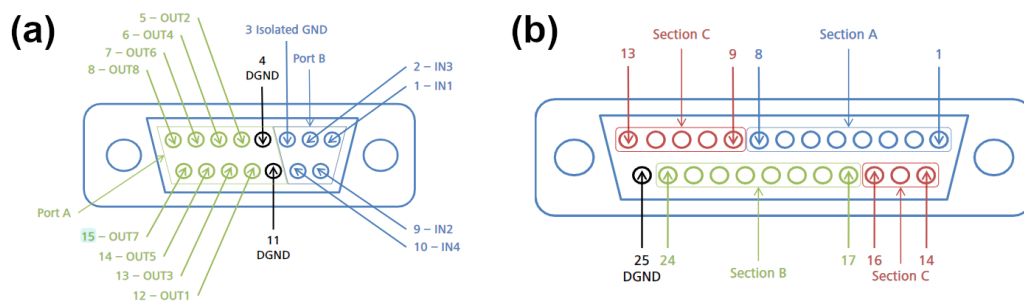


Figura 4: Esquematização dos *pinouts* de I/O digital para o PGSTAT 101, 204, M101 e M204 (a) e para o PGSTAT series 7,8 e μ Autolab II/III (b). Fonte: Adaptado de Nova External Devices Tutorial, Metrohm [44]

Dentro do software Nova¹, é possível a qualquer momento da medição mudar o estado de cada um dos pinos de saída ou simplesmente mandar pulsos de 5 V com uma duração definida.

Para fazer uso dessa funcionalidade, foi necessário construir um interfaceador capaz de ler esses sinais e usá-los para iniciar a medição espectrofluorimétrica no outro equipamento.

Foi decidido para essa aplicação o uso de um Arduino MicroPro com seu controlador *AVR ATMEGA32U4*, em especial devido à sua operação nativa como um dispositivo de interface humana (HID, do inglês *Human Interface Device*) [45], permitindo facilmente o uso de bibliotecas que o façam ser identificado como um dispositivo periférico através de uma conexão USB.

O arduino pode ler o estado dos diferentes pinos, no entanto, para proteção do potenciostato, o isolamento elétrico de ambos os circuitos (o arduino e o potenciostato) foi feito através do uso de optoacopladores PC817.

4.2.3 Arranjo experimental

Por fim, após o desenvolvimento do interfaceador e do suporte para a cela espectroeletroquímica, o arranjo experimental utilizado e a sequência de conexões se deu da seguinte forma:

- Potenciostato ligado por cabo USB no computador, no interfaceador por uma porta DB15 e no eletrodo por um cabo CAC para SPEs.

¹Software responsável pelo controle de instrumentos da Autolab, nesse caso o potenciostato PGSTAT101.

4 DETERMINAÇÃO DE DOPAMINA E EPINEFRINA POR ESPECTROELETROQUÍMICA DE FLUORESCÊNCIA

- Espectrofluorímetro ligado no computador por cabo USB e com a fibra ótica ligada no adaptador.
- Interfaceador ligado por conexão USB no computador e no potenciostato por uma porta DB15.

Uma esquematização do arranjo experimental pode ser vista na Fig. 5.

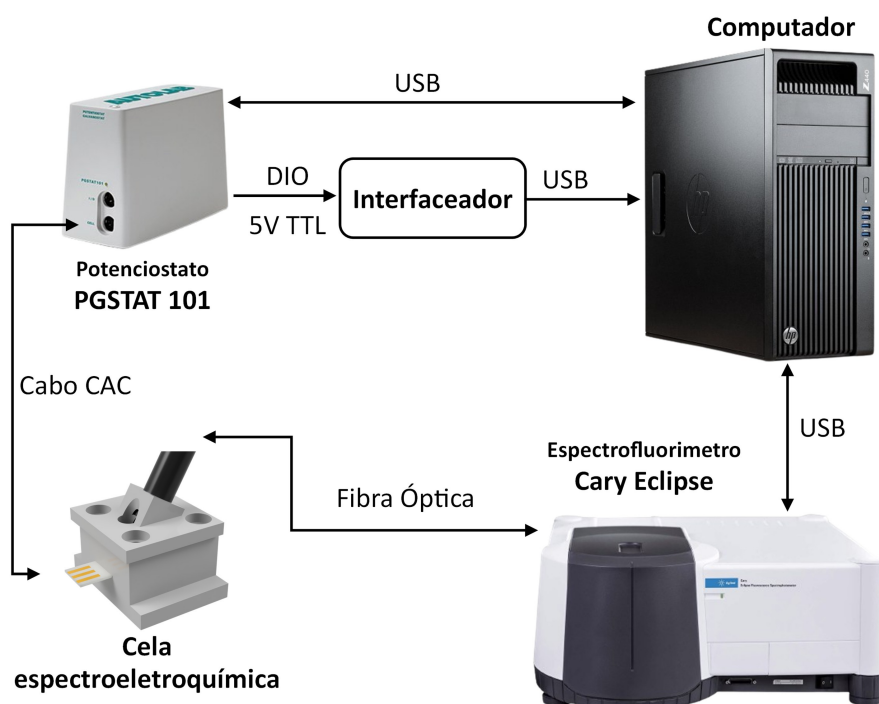


Figura 5: Esquematização do arranjo experimental para medições espectroeletróquímicas de fluorescência.

O interfaceador consegue lidar tanto com ter os dois equipamentos no mesmo computador, quanto tê-los em computadores diferentes com o uso da chave CMD.

Para ativação do interfaceador, todos os métodos eletroquímicos usados foram programados para emitir um pulso de +5 V com duração de 4000 μ s no pino *OUT 1* no início da medição do primeiro ponto, como mostrado na Fig. 4(a). Dessa forma, a medição fluorimétrica começará sincronizada com a eletroquímica.

4.2.4 Reagentes e soluções

Padrões de dopamina e epinefrina foram obtidos da Sigma Aldrich. Dois conjuntos de soluções, um para a calibração, contendo um conjunto de oito misturas

4 DETERMINAÇÃO DE DOPAMINA E EPINEFRINA POR ESPECTROELETROQUÍMICA DE FLUORESCÊNCIA

de ambos os analitos seguindo um planejamento ortogonal, e um conjunto de 4 misturas para validação e comparação, foram preparados segundo às concentrações encontradas nas Tabs. 1 e 2, respectivamente. Todas as soluções foram diluídas em um tampão fosfato $0,1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$, pH 7,0.

Tabela 1: Composição do conjunto de amostras de calibração para o sistema dopamina/epinefrina

Amostra	Dopamina (ppm)	Epinefrina (ppm)
C1	2,0	14,0
C2	2,0	18,0
C3	6,0	2,0
C4	6,0	6,0
C5	18,0	6,0
C6	18,0	18,0
C7	14,0	18,0
C8	14,0	6,0

Tabela 2: Composição do conjunto de amostras de teste para o sistema dopamina/epinefrina

Amostra	Dopamina (ppm)	Epinefrina (ppm)
T1	2,0	17,0
T2	3,0	5,2
T3	16,5	16,5
T4	14,0	4,4

4.2.5 Equipamento e aquisição de dados

Nesse estudo foram utilizados o espectrofluorímetro Cary Eclipse da *Agilent Technologies* com suporte a fibra óptica com *dip probe*, o potenciostato Autolab PGSTAT 101 da Metrohm, SPEs DRP110 da DropSens, e os equipamentos proprietários desenvolvidos durante o projeto. Mais especificamente, o interfaceador DIO/USB, a cela espectroeletroquímica com um suporte para fibra óptica e SPE v44.0 e o adaptador angular v3.0.

Existem diversos fatores a serem considerados ao determinar os parâmetros da medição, com esses tendo consequências na estrutura e natureza matemática das matrizes geradas. Diferentes técnicas eletroquímicas podem ser usadas para

gerar a mudança na matriz medida, com este trabalho usando medidas cronoamperométricas, executadas em diferentes potenciais para gerar dados de 2ª e 3ª ordem.

Apesar do início das medições poder ser sincronizado com o interfaceador descrito na seção 4.2.2, a duração, e portanto o final das medições, ainda precisa ser determinada manualmente em cada equipamento. Para tal, é interessante medir separadamente os tempos de medição individuais de cada técnica e ajustá-los de acordo. Com os equipamentos disponíveis, as estimativas de tempo fornecidas pelo Nova são consideravelmente mais precisas, portanto ao determinar o tempo de medição do espectrofotômetro, esse foi utilizado para realizar o ajuste fino do tempo de medição da técnica eletroquímica. Para ensaios preliminares, as medições espectroscópicas continuaram sendo feitas repetidamente em excesso do tempo de medição da técnica eletroquímica, com os espectros excedentes sendo posteriormente descartados.

O espectrofluorímetro foi ajustado para excitação a 280 nm, com a emissão sendo medida de 297 a 400 nm com passos de 1 nm em loop, usando fendas de excitação e emissão ajustadas em 10 e 5 nm de *bandpass*, respectivamente. Três medições dessas foram realizadas usando cronoamperogramas em uma faixa de potenciais ao redor do pico de oxidação, sendo esses +0,1 V, +0,3 V e +0,5 V, cada um com duração de 400 segundos. A solução na superfície do eletrodo foi renovada entre mudanças de potencial.

4.2.6 Processamento de dados

Com as medições realizadas, o conjunto de dados foi centrado na média e deconvoluido com o uso de PARAFAC na interface gráfica MVC3 para Matlab [46]. Modelos de segunda-ordem (com o uso de apenas um dos potenciais e apenas um dos comprimentos de onda) foram construídos usando a interface MVC2 [47] quando PARAFAC foi usado e a Toolbox MCR-ALS [4] com MCR-Bands [32] para modelos MCR. Uma amostra de teste por vez foi adicionada ao conjunto de calibração e deconvoluída individualmente com o uso de restrições de ortogonalidade no modo A, para gerar modelos de segunda e terceira-ordem.

4.3 Resultados e discussão

4.3.1 Desenvolvimento e construção da cela espectroeletroquímica

O design da cela foi inspirado na cela espectroeletroquímica para espectroscopia de reflectância RPROB da *DropSens*. O RPROB *DropSens* não é compatível

com a fibra ótica (Ref. 7910043100), que possui uma rosqueagem SMA² de 1/4", originalmente destinada ao encaixe das sondas mergulháveis. A primeira proposta foi produzir um adaptador para encaixar a fibra ótica no RPROB *DropSens*, como mostrado na Fig. 6. No entanto, esse "design" se mostrou excessivamente frágil, especialmente devido ao pouco espaço entre a fibra e as paredes do suporte, permitindo apenas o uso de uma única camada de material depositado no adaptador. Dessa forma, esse adaptador geralmente quebrava com apenas dois ou três usos.

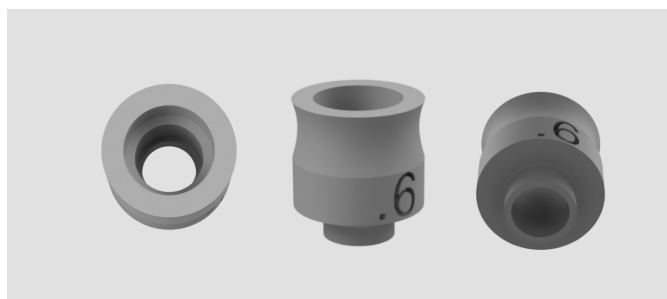


Figura 6: Adaptador de encaixe para fibra ótica (v.6).

Uma alternativa para evitar esses problemas foi a criação de um suporte de cela completo com funcionalidade similar ajustado para receber a fibra ótica da *Agilent*. Isso também permitiu maior flexibilidade no ajuste de outros parâmetros que possam afetar a medida e o uso da cela.

Um dos parâmetros a serem definidos na nova cela é o ângulo de incidência do feixe de luz com a superfície do eletrodo. Com um ângulo de 0°, como na cela da RPROB, a fibra precisa ser removida e recolocada para a adição de amostra, o que também pode ter consequências na repetibilidade dentro de um conjunto de experimentos. Aumentar o ângulo de incidência permite a criação de um espaço para substituição de amostra.

No entanto, um aumento no ângulo de incidência também leva a um menor fluxo fotônico e a necessidade de uma maior área na superfície do eletrodo, podendo chegar a ser maior que o espaço disponível dentro do *o-ring* de vedação. Para o suporte final, foi decidido que um ângulo de incidência de 30° seria um meio termo apropriado, permitindo uma entrada superior para adição de amostras enquanto mantém a luz incidente em uma área ainda relativamente pequena.

Um dos grandes desafios para a produção da célula eletroquímica foi o desenvolvimento de um mecanismo de encaixe de eletrodo e fibra que fosse robusto e resistente a vazamentos, o que era um problema comum até na célula comercial RPROB da DropSens.

²Do inglês *SubMiniature version A*, um padrão de rosqueagem comumente usado na instalação de fibras óticas.

A vedação na superfície do eletrodo era feita por um *o-ring* pressionado contra a mesma. Esse *o-ring* era mantido na parte superior da estrutura em uma vala e tensionado em seu diâmetro interno por um prolongamento do canal pelo qual a luz incidente vinda da fibra ótica passa. Durante a operação, o *o-ring* era pressionado contra a superfície do eletrodo por quatro pares de ímãs de neodímio, fixando-o no lugar.

Após vários “designs” iterativos, foi decidido que esse prolongamento fosse removido e o *o-ring* fosse pressionado em seu diâmetro externo pela própria vala (com essa sendo estreitada). Dessa forma, o *o-ring* é sustentado por tensão compressiva na peça superior e pressionado contra o eletrodo usando quatro parafusos M3 hexagonais, permitindo uma maior pressão na aplicação, mas ainda de fácil remoção. Uma ilustração comparativa dos dois designs pode ser vista na Fig. 7.

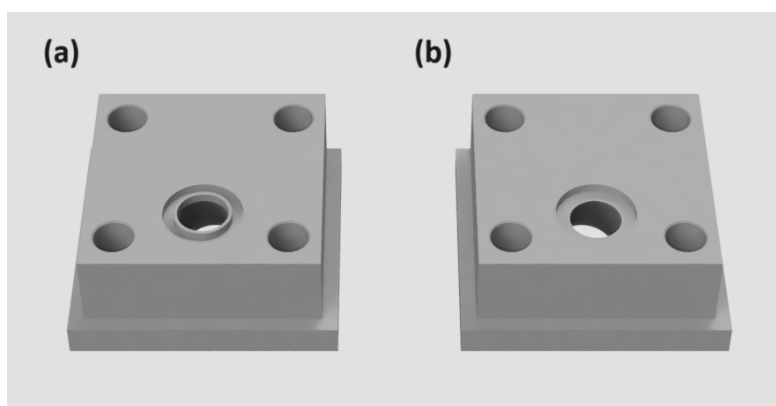


Figura 7: Comparação da cela com o suporte de o-ring inspirada pelo RPROB (v.42) (a) e a novo (v.44) (b).

Esse novo formato praticamente eliminou a ocorrência de vazamentos, que eram relativamente comuns tanto na célula comercial quanto nas réplicas impressas, causando esvaziamento da gota por capilaridade.

A fibra ótica também precisa de um mecanismo de encaixe próprio para mantê-la no lugar, mas ainda permitindo sua remoção e reinserção de maneira reprodutível.

Os primeiros protótipos continham o que era basicamente a peça adaptadora mencionada anteriormente, mas construída de maneira embutida na cela, evitando o uso de partes frágeis como o encaixe usado anteriormente. Esse “design” no entanto ainda se desgastava relativamente rápido com múltiplas inserções. Ele também era menos replicável entre diferentes impressões, com o mesmo modelo podendo resultar em um bom encaixe ou não de maneira aparentemente aleatória.

Em um estágio mais avançado do “design”, foi possível obter um adaptador metálico SMA com diâmetro externo liso de 9,5 mm. Isso permitiu a construção

de um encaixe de pressão para o adaptador metálico, podendo até ser colado se necessário, que por sua vez rosquearia a fibra de maneira replicável. Esse “design” está ilustrado na Fig. 8.

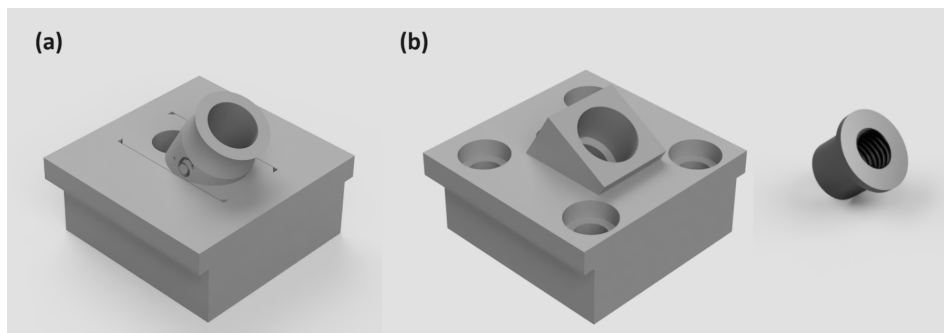


Figura 8: Esquematização dos encaixes de fibra ótica. (a) auto rosqueável (v.32), (b) suporte metálico com conexão SMA (v.44)

A versão mais avançada do protótipo pode ser vista na Fig. 9 e seu projeto pode ser encontrado em detalhes no Apêndice B. A esquematização de um corte dessa cela em uso se encontra na Fig. 10.

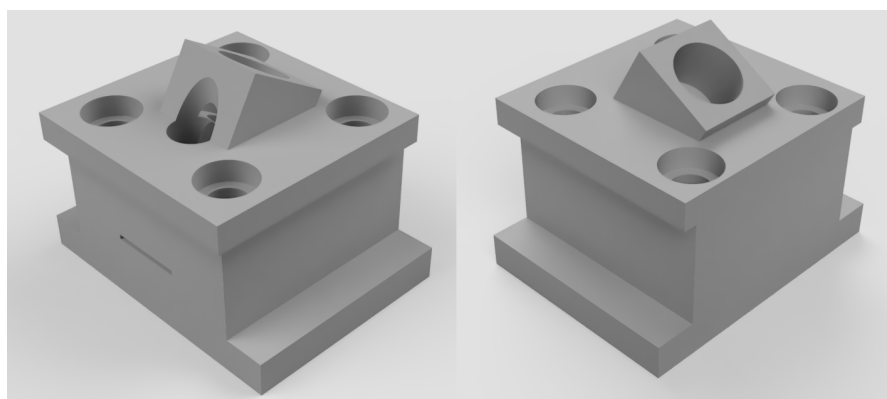


Figura 9: Protótipo v44.0 da cela com suporte para fibra ótica e SPEs.

É interessante que a montagem da cela seja feita de forma que o eletrodo se encontre perpendicular ao sentido da gravidade, ajudando a evitar escoamentos e a distorção da gota para qualquer sentido. Sabendo que o braço de suporte de fibra ótica se encontra a 12° de inclinação comparado a superfície e a fibra tem que se encontrar com a cela com o mesmo ângulo de 30° projetado para a incidência do feixe, foi projetado o adaptador angular mostrado na Fig. 11 (a) para garantir uma montagem que minimize o declive do eletrodo. O seu projeto detalhado também se encontra no Apêndice B.

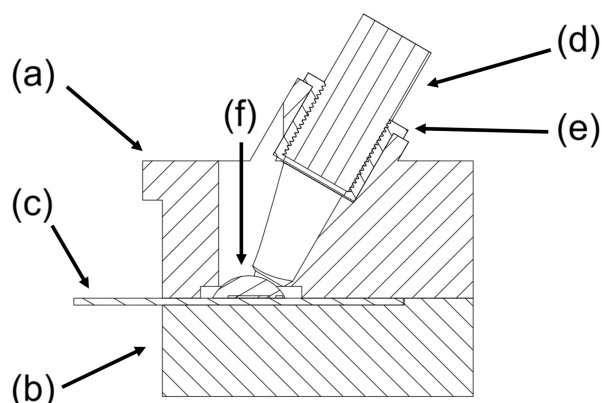


Figura 10: Corte lateral da cela espectroeletroquímica em uso, mostrando (a,b) ambas as partes do suporte, (c) o eletrodo, (d) a sonda com as fibras ópticas, (e) o adaptador SMA e (f) uma representação da amostra.

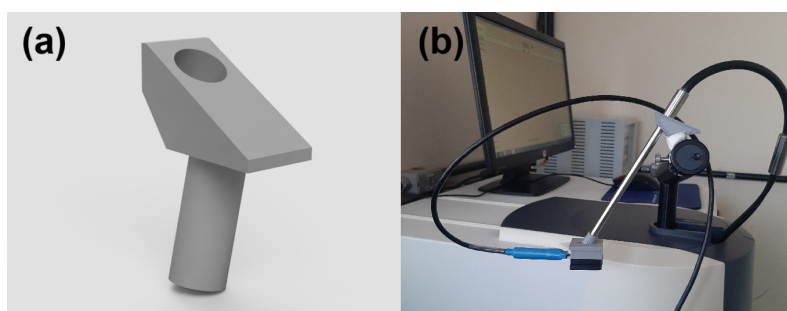


Figura 11: Esquematização do adaptador angular para suporte da fibra óptica (a) e o arranjo para medições espectroeletroquímicas de fluorescência (b).

Um exemplo da montagem do arranjo pode ser vista na Fig. 11 (b), ilustrando o uso da cela e do adaptador angular.

4.3.2 Desenvolvimento e construção do interfaceador

Diferentes potenciostatos conseguem lidar com diferentes correntes máximas através de seus pinos de I/O digital. No caso do Autolab PGSTAT101, esse limite é de 200 mA, portanto é necessário limitar a corrente máxima passando pelo pino para evitar danos. O circuito utilizado para o interfaceador se dá então da forma mostrada na Fig. 12, com resistores de 4,7 k Ω e os pinos 1 e 2 do conector DB15 sendo ligados aos optoacopladores. Experimentalmente, a corrente passando pelo LED do optoacoplador medida com um multímetro Exbom MD-180L foi por volta de 850 μ A com a aplicação de 5 V, portanto dentro da faixa de segurança.

Dois interruptores também foram adicionados (CMD e JMP) para propiciar diferentes funcionalidades. Todos os resistores *pullup*³ de 20 kΩ mostrados na Fig. 12 estão explícitos, mas na placa real, os resistores *pullup* internos do arduino foram utilizados através do modo de operação *INPUT_PULLUP*.

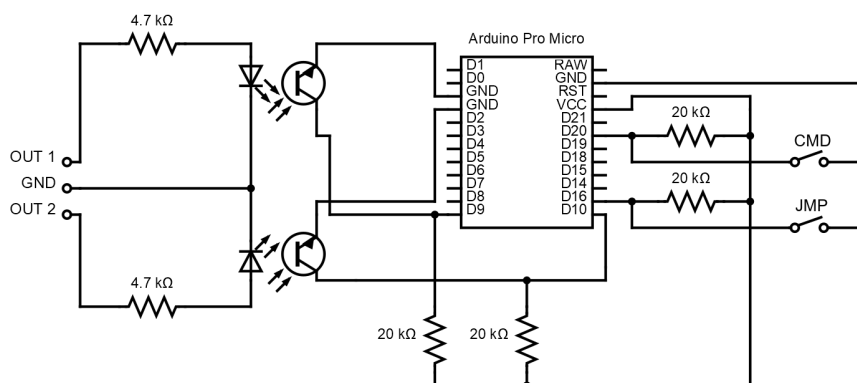


Figura 12: Esquematização do circuito do interfaceador digital.

Para que o arduino pudesse interagir com o computador contendo o software do espectrofluorímetro, a biblioteca *Keyboard.h* foi utilizada, simulando um teclado conectado.

Os dois interruptores utilizados determinam o comportamento do interfaceador. O interruptor CMD tem duas posições: ENT, no qual quando o pulso é recebido e o interfaceador envia apenas o comando “Enter” e T+E, que envia também um “Alt+TAB” antes do “Enter”. O interruptor JMP por outro lado determina se o programa irá reiniciar ou não após receber o sinal do potenciostato, com a posição

³Resistores *pullup* são resistores adicionados para elevar o potencial de uma parte do circuito quando este estiver desconectado, evitando assim os chamados “pinos flutuantes”, nos quais o potencial medido se torna altamente sensível à interferência, com esse valor flutuando de maneira imprevisível.

HLD segurando o programa e RST permitindo que ele reinicie. Um fluxograma do seu funcionamento se encontra na Fig. 13 e o script em *C++* para sua programação pode ser encontrado no Apêndice A.

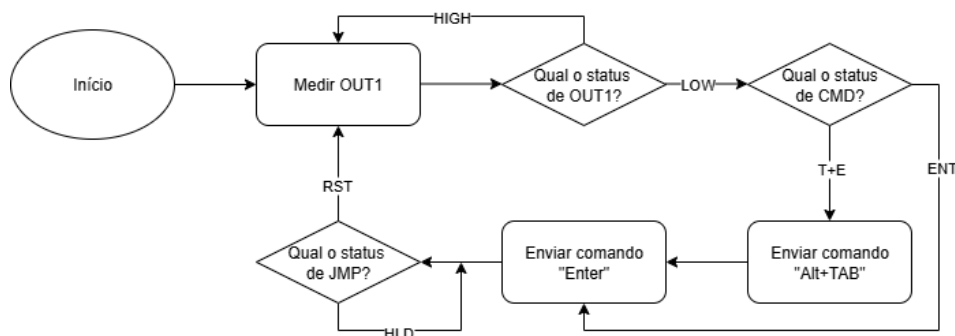


Figura 13: Fluxograma mostrando o funcionamento do interfaceador.

4.3.3 Dados obtidos

As amostras de ambos os conjuntos foram obtidas e organizadas em um tensor tetradimensional no Matlab. Um exemplo de representação dos dados medidos pode ser visto na Fig. 14. Com cada amostra resultando em um objeto tridimensional, a Fig. 14 mostra uma esquematização dos cortes em diferentes direções e as matrizes resultantes desses cortes, sendo essas do tipo $\lambda_{\text{Emi}} \times \text{tempo}$, $\lambda_{\text{Emi}} \times \text{potencial}$ e $\text{potencial} \times \text{tempo}$.

Dois aspectos importantes da medição precisam ser mencionados, com o primeiro sendo a quantidade considerável de sinal de fundo, ainda maior do que a quantidade de sinal proveniente das amostras analisadas. O segundo é o ruído instrumental predominante em todos os espectros. Ambos são consequência tanto dos materiais utilizados quanto das condições de medição, com comprimentos ópticos curtos que exigem configurações mais sensíveis.

4.3.4 Pré-processamento de dados

Devido à alta intensidade do sinal de fundo, em alguns casos a identificação visual de mudanças no tempo pode até se tornar difícil sem tratamento prévio dos dados. Uma das possibilidades, testada em estudos preliminares, foi o uso da subtração de branco para compensar a presença do sinal de fundo. No entanto, embora essa abordagem se mostre promissora em pequenos grupos, com o tempo o eletrodo e, consequentemente, esse branco sofre algumas alterações que dificultam o uso de um único branco consistente para o tensor. Uma alternativa que se mostrou mais eficaz foi centrar o tensor de dados na média. Essa abordagem

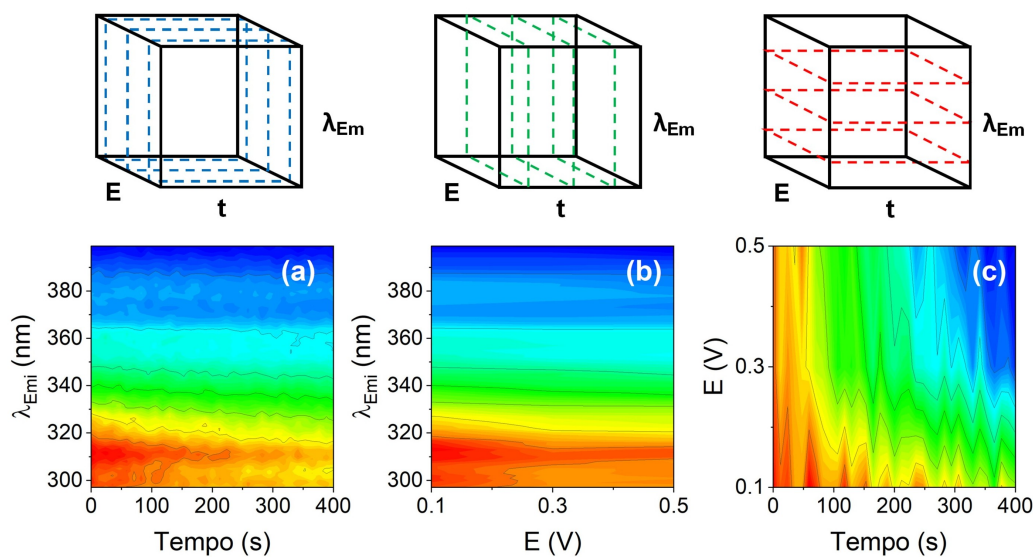


Figura 14: Esquematização da estrutura de dados de uma amostra e exemplos de cortes (a) $\lambda_{Emi} \times$ tempo a 0.3 V, (b) $\lambda_{Emi} \times$ potencial em 165 s e (c) potencial $\times$ tempo a 320 nm da medição fluorimétrica combinada com amperometria para uma mistura de dopamina e epinefrina (amostra C6).

permitiu mitigar os efeitos negativos da alta intensidade do sinal de fundo nos modelos PARAFAC.

Por exemplo, uma comparação de perfis instrumentais deconvoluidos com e sem centrar os dados na média pode ser vista na Fig. 15. Mesmo em sistemas mais simples, deconvoluidos o sinal de um único composto misturado com o sinal de fundo, centrar os dados na média permitiu a recuperação dos perfis puros usando um único fator, enquanto sem ele, dois fatores foram necessários para separar o sinal de fundo, ainda com uma leve distorção. Para o conjunto de dados contendo as misturas, centrar na média foi essencial para separar as contribuições individuais dos analitos, como mostrado na Fig. 15 (b,c).

A Fig. 15(a) mostra os perfis deconvoluidos a partir de um conjunto de dados contendo apenas dopamina entre 0 a 50 ppm, sendo deconvoluidos em diferentes condições: em um fator sem centrar na média (F1/1); em dois fatores sem centrar na média (F1/2 e F2/2), o que consegue recuperar um perfil de dopamina no segundo fator apesar de ser levemente distorcido; e em um fator centrando os dados na média, recuperando os perfis esperados para a dopamina.

Para o conjunto de dados com as misturas, os perfis obtidos em dois fatores sem centrar os dados na média são mostrados na Fig. 15(b) e os centrados na média na Fig. 15(c). Enquanto a Fig. 15(b) mostra o resultado para a deconvolução em dois

4 DETERMINAÇÃO DE DOPAMINA E EPINEFRINA POR ESPECTROELETROQUÍMICA DE FLUORESCÊNCIA

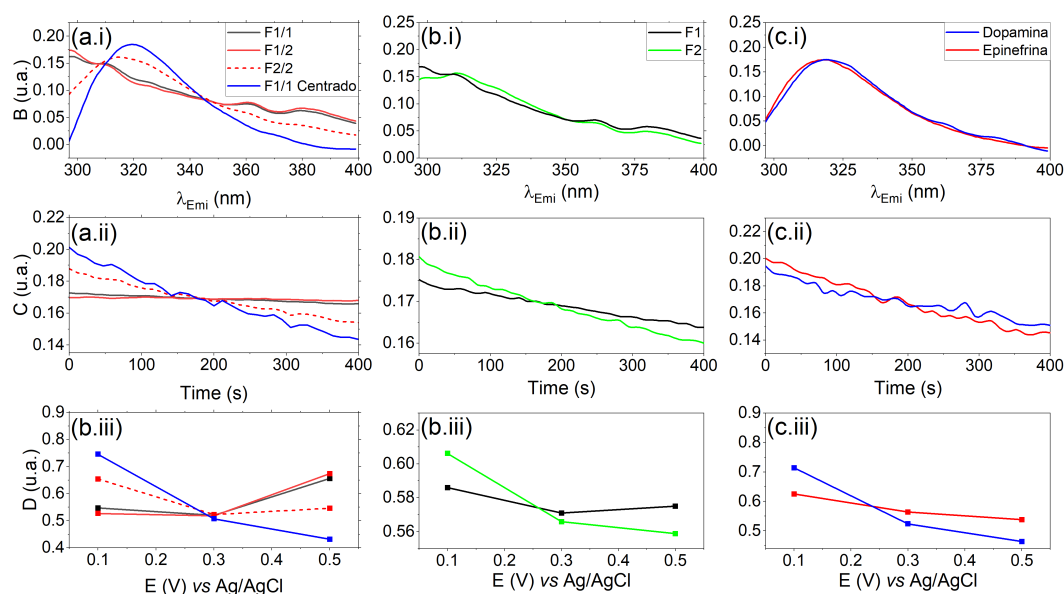


Figura 15: Comparação dos perfis espectroeletroquímicos deconvoluidos para conjuntos de dados obtidos de soluções de dopamina (a) e misturas de dopamina e epinefrina (b,c). Os gráficos em (a) mostram diferentes deconvoluções de um conjunto contendo apenas dopamina: em um fator (F1/1), em dois (F1/2 e F2/2), e em um fator com dados centrados na média. (b) mostra a deconvolução do conjunto de dados das misturas em dois fatores sem centrar e (c) centrando na média.

fatores com as mesmas restrições, fatores adicionais ou mudanças nas restrições não conseguiram recuperar os perfis instrumentais e de concentração, com os perfis relacionados ao sinal de fundo dominando as saídas do modelo, misturando-se com os perfis do analito.

Assim, o uso de dados centrados na média permitiu a criação de modelos que consistentemente recuperavam os perfis puros de seus componentes, com esse procedimento sendo usado em todos os outros modelos construídos nesse trabalho.

4.3.5 Modelos de segunda-ordem

Banco de dados de segunda ordem $\lambda_{\text{Emi}} \times \text{tempo}$

Para comparar o desempenho da deconvolução e avaliar as vantagens e desvantagens de medir uma forma instrumental adicional, versões reduzidas do conjunto de dados de terceira ordem foram usadas para modelos de segunda ordem. Um conjunto de dados tempo $\times \lambda_{\text{Emi}}$ a 0,3 V foi separado para análise pelo PARAFAC. Conjuntos de dados em potenciais fixos terão que lidar com perfis espectrais muito

semelhantes para dopamina e epinefrina, levando a uma possível deficiência de posto⁴ nessa via instrumental (λ_{Emi}).

Este modelo de segunda ordem obteve baixo desempenho quantitativo para ambos os analitos e praticamente não mostrou diferenças em seus perfis temporais, o que pode ser visto na Fig. 16 (a, ii), embora ele pareça recuperar os perfis instrumentais de dopamina e epinefrina, como visto na Fig. 16 (a,i). Isso é consistente com uma perda parcial de unicidade da solução PARAFAC. Como consequência, o erro relativo de predições (REP) para o modelo foi de 15,8% e 24,6% para dopamina e epinefrina, respectivamente. As tabelas 3 e 4 apresentam resultados de validação adicionais para este e os modelos subsequentes. Modelos construídos com outros cortes de potenciais (0,1 V e 0,5 V) não apresentaram melhoras significativas na sua “performance” analítica.

Estudos anteriores sugerem que, para sistemas com sobreposição espectral considerável entre componentes, o uso de MCR-ALS pode ajudar a deconvoluir os perfis de um conjunto de dados de segunda ordem ao desdobrar o tensor na direção com os perfis sobrepostos [48–50]. No entanto, neste caso específico, a deconvolução não permitiu a recuperação dos perfis instrumentais nem das concentrações de referência. Ao se avaliar a ambiguidade rotacional [51] da solução através de MCR-bands [32], ficou claro que a solução obtida para este conjunto de dados apresentava uma grande extensão desta. Deconvoluindo o conjunto de dados em dois componentes com restrições de não-negatividade, a diferença entre os valores f máximo e mínimo, um parâmetro que reflete a contribuição relativa do sinal de um determinado componente para todo o sinal, atingiu 0,877 e 0,879 para os componentes um e dois, respectivamente. Para três componentes, o resultado não convergiu após 500 iterações com uma diferença nos valores f máximo e mínimo de 0,9096, 0,8997 e 0,9127 para cada componente.

Banco de dados de segunda ordem tempo $\times$ potencial

Outra alternativa para construir um modelo de segunda ordem é o corte de tempo contra potencial. Nesse caso, a baixa relação sinal-ruído no sentido do tempo é o maior problema a ser abordado na modelagem. Isso pode ser visto no perfil temporal apresentado na Fig. 16 (b,i), que é bastante ruidoso para ambos os analitos, ao ponto que esses são de difícil distinção. O perfil de potencial na Fig. 16 (b,ii) mostra que, para ambos os analitos, o sinal cai com o potencial, o que é esperado, pois em um potencial mais alto, o consumo também é maior, limitado pela transferência de massa da solução para a superfície do eletrodo. Mas

⁴Nesse contexto, a matriz deconvoluída em um dos modos tem menos colunas linearmente independentes do que suas dimensões permitiriam, com uma ou mais colunas podendo ser descritas como uma combinação linear das outras.

uma diferença no quanto cada analito é afetado pelo aumento potencial também é visível, com o sinal advindo da dopamina sendo mais afetado que o da epinefrina.

O desempenho quantitativo deste modelo supera a do corte $\lambda_{\text{Emi}} \times \text{tempo}$, com REPs de 9,4% e 11,0% (tabelas 3 e 4) para dopamina e epinefrina, respectivamente. Mesmo assim, os erros de previsão ainda são significativos.

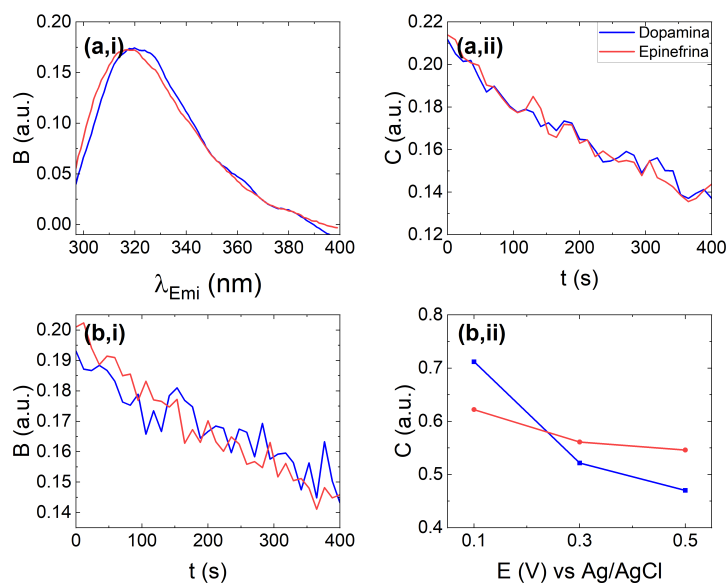


Figura 16: Perfis instrumentais deconvoluidos para os conjuntos de dados de segunda-ordem obtidos de cortes (a) $\lambda_{\text{Emi}} \times \text{tempo}$ e (b) $\text{tempo} \times \text{potencial}$.

4.3.6 Modelos de terceira-ordem

Para os conjuntos de calibração e validação, um modelo de terceira ordem por amostra de validação foi feito com o uso de dois componentes e restrições de ortogonalidade no modo A. Os perfis deconvoluidos podem ser encontrados na Fig. 17.

Neste exemplo, apesar das semelhanças espectrais consideráveis, perfis distintos de tempo e potencial para dopamina e epinefrina puderam ser obtidos, mostrando uma oxidação mais rápida da epinefrina ao longo do tempo, mas sendo menos afetada pela mudança no potencial quando comparada com a dopamina. Essa diferença na cinética, juntamente com a forma como os dados foram coletados, permitiu que o modelo PARAFAC distinguísse e separasse suas contribuições individuais para o sinal geral, obtendo perfis mais consistentes e legíveis do que seus

4 DETERMINAÇÃO DE DOPAMINA E EPINEFRINA POR ESPECTROELETROQUÍMICA DE FLUORESCÊNCIA

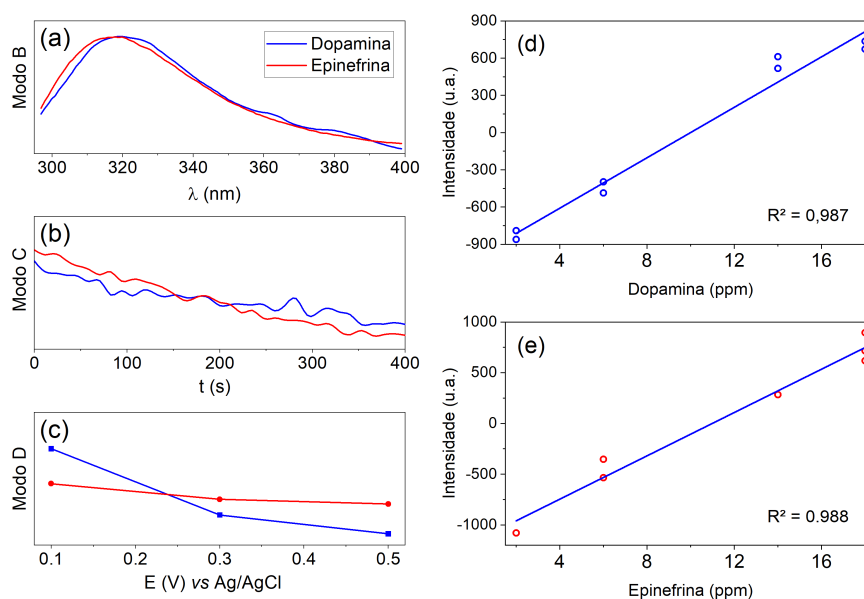


Figura 17: Perfis deconvoluídos dos conjuntos de misturas de dopamina e epinefrina. (a) perfis espectrais, (b) perfis cinéticos, (c) perfis de potencial, (d) curva de calibração para dopamina, (e) curva de calibração para epinefrina.

equivalentes de segunda ordem. Em comparação com os modelos em comprimentos de onda fixos, os perfis temporais dos dois componentes que antes pareciam ser muito mais semelhantes entre si, agora com a redução considerável do ruído no perfil deconvoluído permite obter uma melhor visualização das diferenças individuais entre os analitos.

Essa maior robustez é consistente com as descobertas anteriores que estudaram dados de terceira ordem, com uma das principais razões atribuídas sendo o efeito de que a maior quantidade de dados redundantes na matriz poderia ser capaz de mitigar os efeitos de um fundo ruidoso na deconvolução [11].

Com esses perfis, pode-se recuperar os sinais puros de cada componente, como mostrado na Fig. 18. Na Fig. 18 tem-se o resultados dos produtos dos perfis nos modos B e C (i), B e D (ii) e C e D (iii) para dopamina (a) e epinefrina (b).

Os resultados dos modelos de calibração pseudo-univariados são descritos nas tabelas 3 e 4 para análise quantitativa. Como mostrado, os modelos de calibração de terceira ordem obtiveram desempenho analítico consideravelmente melhorado, obtendo RMSEPs de 0,13 e 0,16 ppm para dopamina e epinefrina, respectivamente, sendo fundamental a adição de uma via instrumental nessa diferença. Isso repre-

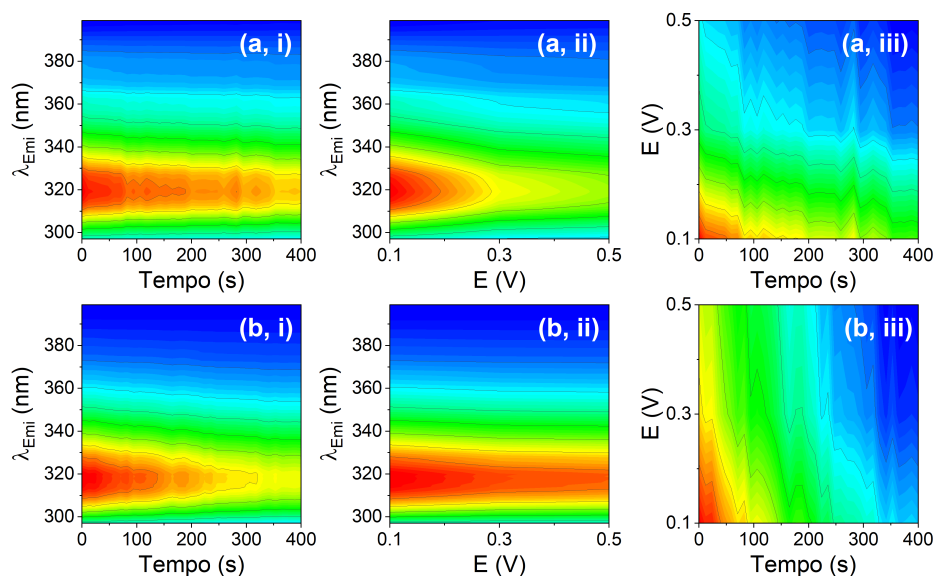


Figura 18: Resultado do produto dos perfis puros de (a) dopamina e (b) epinefrina, para os perfis B e C (i), B e D (ii) e C e D (iii).

sentou uma redução do valor RMSEP por um fator de 10 quando comparado aos modelos de segunda ordem de melhor desempenho, mais especificamente aqueles com dados obtidos em um comprimento de onda fixo.

Também pode-se perceber uma melhora nos valores médios dos limites de detecção (LoDs) obtidos. Comparando os LoDs para a modelagem dos diferentes conjuntos de dados, temos uma média de 47 e 48 μM para dopamina e epinefrina (respectivamente) no conjunto de segunda-ordem $\lambda \times t$, 30 e 18 μM para o conjunto $t \times E$ e 18 e 13 μM para o de terceira-ordem. Apesar de a melhora não ser tão drástica quanto a dos valores de RMSE, ela é presente. Esses valores também ilustram as vantagens de se utilizar uma técnica como a espectrofluorimetria molecular em comparação com absorção UV-Vis, obtendo LoDs consideravelmente menores que os reportados por Garoz-Ruiz *et al.* nesse mesmo sistema, mas com o uso de absorção molecular UV-Vis em um sistema mais instrumentalmente complexo (121 e 216 μM para dopamina e epinefrina respectivamente).

Vale ressaltar também que para todos os modelos o uso de restrições de ortogonalidade no conjunto também se mostrou importante para a separação, direcionando o algoritmo para o mínimo global e resultados com significado físico, melhorando a estabilidade no resultado da deconvolução para todos os modelos.

Em geral, modelos de segunda ordem com dados obtidos em um potencial fixo não conseguiram desconvoluir adequadamente os dados, fornecendo um de-

Tabela 3: Resultados da calibração de dopamina com modelos de segunda e terceira ordem.

Amostra	Ref.	Concentração (ppm)		
		2 ^a ord. ($\lambda \times t$)*	Predito 2 ^a ord. ($t \times E$)**	3 ^a ord.
T1	2,0	1,1	2,5	2,2
T2	3,0	6,2	1,9	3,0
T3	16,5	16,6	17,8	16,6
T4	14,0	17,8	11,6	14,1
RMSEP		2,53	1,5	0,13
REP		15,8%	9,4%	0,8%

* Para um potencial de +0.3 V.

** Para um λ_{Emi} de 320 nm.

sempenho analítico consideravelmente menor considerando aspectos qualitativos e quantitativos. Os perfis instrumentais esperados para dopamina e epinefrina não puderam ser recuperados e os valores de mérito foram consideravelmente piores do que os obtidos por modelos de terceira ordem. Enquanto os modelos de segunda ordem em um comprimento de onda de emissão fixo conseguiram deconvoluir os perfis esperados, os efeitos do ruído instrumental foram consideravelmente mais acentuados do que nos modelos de terceira ordem, aumentando os erros de previsão em comparação.

Tabela 4: Resultados da calibração de epinefrina com modelos de segunda e terceira ordem.

Amostra	Ref.	Concentração (ppm)		
		2 ^a ord. ($\lambda \times t$)*	Predito 2 ^a ord. ($t \times E$)**	3 ^a ord.
T1	17,0	18,5	16,3	16,8
T2	5,2	0,2	6,2	5,1
T3	16,5	18,1	16,0	16,7
T4	4,4	10	7,7	4,4
RMSEP		3,94	1,77	0,16
REP		24,6%	11,0%	1,0%

* Para um potencial de +0.3 V.

** Para um λ_{Emi} de 320 nm.

4.3.7 Considerações adicionais sobre o arranjo e suas limitações

Alguns aspectos da aplicação dessa técnica apresentam desvantagens intrínsecas. O pequeno volume de amostra usado, embora geralmente seja positivo, também resulta em um caminho óptico curto, o que é uma limitação importante quando se trata de estudos quantitativos, [15] ao mesmo tempo em que requer o ajuste do espectrofluorímetro para configurações mais sensíveis. Consequentemente, a medição também estará muito mais sujeita à interferência do espalhamento de luz e fluorescência dos materiais utilizados.

O protótipo desenvolvido com o ângulo de incidência de 30° permitiu fácil acesso e uma maneira simples de adicionar e remover amostras analíticas na célula, melhorando a usabilidade. No entanto, limitações de material em sua construção podem restringir seu uso consideravelmente, especialmente com analitos com fluorescência fraca.

A produção deste protótipo (ou seu revestimento) com mais materiais absorventes, não fluorescentes tanto na célula eletroquímica quanto nos eletrodos seriografados pode ajudar a mitigar esses fatores, mas para este estudo os materiais disponíveis tanto para eletrodos quanto para suportes apresentaram algumas dessas limitações dependendo da região espectral que está sendo medida.

4.4 Conclusões

A técnica proposta foi capaz de separar os sinais fluorimétricos da dopamina e epinefrina com o uso de medições espectroeletroquímicas de fluorescência associada

à amperometria. A expansão do método para terceira ordem se mostrou essencial para uma boa resolução de dados, assim como um pré-tratamento centrando o conjunto de dados na média.

No entanto, o potencial da técnica no seu estado atual ainda possui limitações de sensibilidade, em grande parte devido aos materiais disponíveis para prototipagem, mas de qualquer forma já se mostrou capaz de resolver problemas analíticos de difícil resolução. Apesar da aplicação nesta tese ter sido num contexto de calibração, um dos potenciais que essa técnica pode fornecer é para análise qualitativa de eletrodos e outros sistemas, que apesar de já ser uma aplicação mais comum para medidas espectroeletroquímicas, pode se tornar mais efetiva devido a obtenção de perfis de componentes puros.

Esses resultados ajudam a corroborar que, apesar das dificuldades associadas à aquisição de dados de maior dimensionalidade, essa estratégia pode auxiliar no tratamento de sistemas desafiadores com o PARAFAC, recuperando informação tanto quantitativa quanto qualitativa. Sendo especialmente relevante nos casos em que existem colinearidades significativas. Sendo assim, esta metodologia pode se tornar uma ferramenta útil para extrair informações e separar as contribuições individuais de componentes com perfis semelhantes.

5 Determinação de paracetamol por espectroscopia de impedância eletroquímica multivia

5.1 Introdução

Espectroscopia de impedância eletroquímica (EIS, do inglês *Electrochemical Impedance Spectroscopy*) é uma técnica comumente utilizada na análise de sistemas e eletrodos, consistindo na medição de espectros de impedância ao aplicar uma tensão alternada ao redor de um potencial fixo (E_{dc}) em diferentes frequências [52]. Considerando a diferença de respostas com a mudança de E_{dc} , é possível gerar uma matriz de dados com diferentes EIS em diferentes E_{dc} , obtendo assim uma matriz de duas vias por amostra, chamada nesse trabalho de matriz do Espectro de Impedância Eletroquímica Multivias (MEIS, do inglês *Multiway Electrochemical Impedance Spectra*). Dessa forma, é possível a criação de um conjunto de dados de ordem superior com o potencial de possuir vantagem de segunda-ordem. As propriedades desse tipo de objeto gerado pela técnica proposta serão avaliadas nas seções a seguir, assim como a avaliação de sua aplicação na resolução de um sistema biológico.

Os dados obtidos com a uma medição MEIS podem ser expressados de diferentes formas, cada uma possuindo diferentes características, vantagens e desvantagens. Todas elas sendo organizadas em uma matriz na qual uma das vias será a frequência do potencial alternado e a outra será o E_{dc} .

Cada ponto em um espectro de impedância pode ser descrito como um número complexo, contendo uma parte real e outra imaginária ($a + bi$). Este também pode ser descrito como um vetor em coordenadas polares, usando o módulo do vetor formado pelas partes real e imaginária e o ângulo do deslocamento de fase. Sendo assim, essas partes reais, imaginárias, absolutas e de deslocamento de fase podem ser separadas, com cada espectro sendo constituído de um vetor delas, com os vetores de cada EIS podendo ser concatenados em uma matriz. Existe ainda a possibilidade de concatenar as matrizes com diferentes partes da informação medida no sentido do potencial ou da frequência, fornecendo informação adicional aos modelos de calibração. Nesses casos, algum tipo de escalamento se torna necessário, para evitar que apenas uma parte da matriz seja relevante, seja esse um escalamento proporcional pela multiplicação de uma constante ou uma centralização na média das matrizes. A seguir estão algumas dessas formas.

MEIS real

A impedância sendo medida em cada ponto possui um componente real e um imaginário. Uma matriz MEIS real basicamente utiliza apenas esse componente para expressar os resultados. Sendo relacionada à resistência do sistema.

MEIS imaginária

Esse tipo de matriz utiliza apenas a parte imaginária da impedância, sendo relacionada à reactância do sistema e efeitos capacitivos e indutivos.

MEIS complexa

A matriz complexa armazena um número complexo contendo tanto a parte real quanto a imaginária da impedância em cada ponto. O tratamento desse tipo de matriz pode possuir algumas dificuldades de implementação, com sua deconvolução não sendo trivial. Existem exemplos na literatura de métodos de primeira ordem tratando de vetores complexos de impedância [18], mas não para segunda ordem.

MEIS absoluta

O módulo de cada número complexo é usado em cada espaço da matriz.

Matriz de deslocamento de fase

A matriz de deslocamento de fase vai expressar os resultados como o deslocamento de fase entre a diferença de potencial alternada e a corrente alternada.

Alguns parâmetros diferentes podem ser utilizados para determinar qual desses tipos de matriz é o mais adequado a ser utilizado. Nesse trabalho, o foco será em reprodutibilidade, especialmente entre medições feitas em dias diferentes, na capacidade de fornecer aos modelos matemáticos informação para discernir entre os sinais advindos dos analitos e interferentes e na trilinearidade do tensor gerado.

Devido às características citadas acima, o uso das técnicas instrumentais propostas com métodos de deconvolução de ordem superior pode ser uma combinação poderosa tanto para detecção quanto para avaliação de compostos em matrizes complexas, como sistemas biológicos, tornando-as adequadas no contexto de obtenção de dados de matrizes obtidas *in vivo* e *in vitro* para avaliação da atividade biológica, farmacológica e toxicológica de produtos farmacêuticos, usando tratamentos de amostras mais simples e rápidos.

Adicionalmente, uma forma de obter métodos menos trabalhosos e demorados é através da simplificação e miniaturização do processo analítico. Nesse contexto, o uso de técnicas analíticas resilientes e robustas à presença de interferentes conhecidos e desconhecidos é decisivo, devido às suas menores exigências para o processamento de amostras. Combinar esse fato com medições rápidas e de baixo custo (quando comparado às alternativas existentes) pode permitir maiores reduções de custos operacionais, bem como aumentos na eficiência de recursos e altos rendimentos analíticos.

Um sistema modelo interessante para testar esse uso é o do paracetamol na presença de ácido úrico e ácido ascórbico. O paracetamol (acetaminofeno) é um

analgésico e antipirético comum. Sendo uma das principais alternativas ao ácido acetilsalicílico, o paracetamol é um dos medicamentos terapêuticos mais utilizados no mundo, sendo também um dos principais poluentes emergentes em águas residuais [53, 54]. Além disso, o consumo excessivo de paracetamol também é uma causa comum de envenenamento acidental [55, 56], sendo a determinação dos níveis atuais de paracetamol em um determinado paciente uma métrica relevante para o tratamento. Os ácidos úrico e ascórbico são conhecidos interferentes para medidas em amostras de urina, possuindo uma alta sobreposição de sinal com o paracetamol em técnicas voltamétricas [57–59]. Embora os métodos de primeira ordem possam construir modelos de calibração, incluindo interferentes conhecidos, os sistemas com esse tipo de alta sobreposição de sinal podem representar um desafio significativo para sua criação e seu desempenho.

Além disso, a presença de interferentes desconhecidos na mistura pode causar vieses na previsão, o que é esperado em uma matriz complexa e variada como a urina. Adicionalmente, os espectros de impedância eletroquímica do ácido úrico e paracetamol também pode ter perfis de frequência normalizados muito semelhantes, tornando sua análise por meio de EIS de primeira ordem especialmente difícil. No entanto, ao alterar os valores de E_{dc} , sua intensidade geral muda, o que o torna um bom candidato para medições multivia.

Estudos anteriores sobre a determinação de paracetamol, seja aplicado a comprimidos ou sistemas biológicos similares, trataram dessa falta de seletividade usando eletrodos especializados [60–62] ou por determinação indireta [63], com medidas EIS sendo usadas principalmente na caracterização de eletrodos. Há também exemplos de técnicas voltamétricas de segunda ordem usadas na determinação de paracetamol, como o uso de voltametria de pulso diferencial (DPV, do inglês *Differential Pulse Voltammetry*) multivia com PARAFAC [64] e o uso de técnicas cronoamperométricas multivia com MCR/ALS [57].

Neste trabalho foi proposto o uso de matrizes de espectros de impedância eletroquímica multivias (MEIS) e métodos de segunda ordem para estimar as concentrações de paracetamol adicionadas a amostras de urina. A matriz multivia, neste caso, sendo formada pela concatenação de várias medidas EIS em diferentes potenciais, criando um mapeamento de impedância em um espaço frequência $\times E_{dc}$ de uma determinada amostra. Para o processamento de dados, alguns modelos diferentes foram testados, incluindo PARAFAC, MCR/ALS e N-PLS/RBL.

5.2 Materiais e métodos

5.2.1 Reagentes e soluções

Todas as amostras foram preparadas com água deionizada (15 M Ω .cm). Para o preparo do tampão, se utilizou fosfato de potássio dibásico, ácido cítrico e hidróxido

de sódio da Fisher Chemical. Paracetamol, ácido úrico e ácido ascórbico foram adquiridos da Sigma Aldrich. O tampão fosfato cítrico foi preparado em pH 3,5 e concentração de $0,1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$, usando uma solução de hidróxido de sódio para ajuste de pH.

A ideia por trás desse tipo de proposta é a simplificação de métodos analíticos, com o uso das propriedades matemáticas dos dados obtidos para melhorar a performance dos modelos de calibração. Portanto, idealmente o preparo de amostra consistirá apenas na homogeneização da amostra bruta, seguida de diluição em um tampão.

As amostras de calibração foram preparadas usando soluções estoque de cada reagente diluído no tampão. As amostras de validação foram preparadas de forma semelhante, mas com a adição de urina real em um volume equivalente a uma diluição de 1:400 em um balão volumétrico de 5 mL. As amostras de urina foram obtidas de um único voluntário, homem, saudável, 27 anos de idade. No caso de uma aplicação real, a diluição adequada para cada amostra dependerá dos sinais obtidos, mas para esse estudo, todas foram feitas na diluição descrita, sendo essa constante independente da amostra por razões de uniformidade. Em aplicações reais esse valor pode ser ajustado para manter as medidas na faixa linear.

Para este trabalho, três conjuntos de dados foram preparados. O primeiro é um conjunto de dados de calibração com cinco concentrações de paracetamol variando de 0,5 a 3,0 μM de paracetamol com e sem a presença de ácido úrico na concentração de 6,75 μM . Os outros dois serão usados como conjuntos de dados de validação, sendo esses feitos com amostras de urina real para avaliar a robustez do modelo aos efeitos da matriz e à presença de interferentes desconhecidos. O segundo conjunto de dados (conjunto de dados de validação A) foi criado usando um planejamento fatorial parcial com três níveis para três componentes, mais especificamente, paracetamol, ácido úrico e ácido ascórbico em faixas de concentração nominais presentes em urina humana [65, 66], adicionados a urina real em solução. O terceiro conjunto de dados (conjunto de dados de validação B) é semelhante ao segundo, mas com níveis consideravelmente mais altos de ácido ascórbico, consistentes com uma overdose de vitamina C. As concentrações para o segundo e terceiro conjuntos de dados podem ser encontradas na Tab. 5. Em ambos os conjuntos de dados de validação, foram utilizadas 3 amostras de urina, todas testadas com tiras de teste de urina One Step 12AC, indicando valores nominais para todos os parâmetros avaliados (leucócitos, nitritos, urobilinogênio, glicose, gravidade específica, sangue, cetonas, bilirrubina, proteína, microalbumina e creatinina) nas amostras de urina medidas e um pH de aproximadamente 6. A urina usada foi coletada no dia de cada medição, sendo assim medições em dias diferentes usaram amostras de urina diferentes, com essas também sendo indicadas na Tab. 5 como urinas “1”, “2” e “3”. Também é importante ressaltar que as concentrações de

5 DETERMINAÇÃO DE PARACETAMOL POR ESPECTROSCOPIA DE IMPEDÂNCIA ELETROQUÍMICA MULTIVIA

ácido úrico mostradas na Tab. 5 representam os valores adicionados ao ácido úrico já naturalmente presente nas amostras reais de urina, portanto as concentrações finais serão mais altas.

Tabela 5: Concentrações de componentes nas amostras analíticas após diluição (1:400) dos conjuntos de validação A (VA) e B (VB), assim como qual amostra de urina foi usada para cada um.

Amostra	Concentração (μM)			Urina
	Paracetamol	Ácido úrico*	Ácido ascórbico	
VA1	1,7	1,5	1,4	2
VA2	1,7	0,0	0,3	1
VA3	0,8	0,0	2,5	1
VA4	0,8	3,0	1,4	2
VA5	2,7	1,5	2,5	2
VA6	1,7	3,0	2,5	2
VA7	2,7	3,0	0,3	2
VA8	2,7	0,0	1,4	1
VA9	0,8	1,5	0,3	2
VB1	1,7	1,5	15,4	3
VB2	1,7	0,0	2,5	3
VB3	0,8	0,0	28,3	3
VB4	0,8	3,0	15,4	3
VB5	2,7	1,5	28,3	3
VB6	1,7	3,0	28,3	3
VB7	2,7	3,0	2,5	3
VB8	2,7	0,0	15,4	3
VB9	0,8	1,5	2,5	3

* Valor adicionado ao ácido úrico naturalmente presente na urina.

5.2.2 Equipamento e aquisição de dados

As medições MEIS foram realizadas usando um potenciostato portátil Palm-Sens 4c com eletrodos impressos de uso único (SPEs) DropSens DRP-110. As soluções foram todas preparadas usando uma balança Sartorius BP221S e micropipetas VWR e Eppendorf calibradas. Todas as medições de pH foram realizadas usando o pHmetro pH210 fabricado pela Hanna Instruments.

Usando uma micropipeta, 50 μL de uma determinada amostra são depositados no SPE DRP-110. Em seguida, são medidas uma série de EIS para cada amostra, sendo aplicadas 15 frequências de 1 kHz a 0,1 Hz (3,5 por década), amplitude de

0,01 V e diferentes valores de E_{dc} , indo de 150 a 450 mV em passos de 25 mV, cobrindo assim as regiões onde a impedância medida é consideravelmente afetada pela presença dos analitos.

5.2.3 Processamento de dados

Com as medições MEIS, existem várias maneiras diferentes de representar os dados obtidos. Os valores de impedância obtidos são de natureza complexa, portanto, essas matrizes também podem ser divididas em suas partes reais e imaginárias, ou também usar seus ângulos de deslocamento de fase e módulo em diferentes matrizes. Quando necessário, foi realizada correção de linha de base com o uso de regressão spline assimétrica por mínimos quadrados (AsLSSR, do inglês *Asymmetric Least Squares Splines Regression*) [5, 67].

Para avaliar modelos de primeira ordem, um método PLS para números complexos (CPLS) foi utilizado, podendo usar como entrada vetores de números complexos [18], nesse caso com os vetores contendo as EIS obtidas a 325 mV, o potencial cujo espectro de impedância é o mais afetado pela presença de paracetamol.

Como entrada para o modelo de calibração, as matrizes também podem ser redimensionadas e combinadas, com cada combinação carregando diferentes partes do total de informações contidas no conjunto de dados. Essa combinação, no entanto, pode ser inadequada para modelos bilineares/trilineares, como MCR/ALS e PARAFAC, uma vez que a nova matriz concatenada não necessariamente será adequadamente representada modelo matemático. No entanto, esse tipo de fusão de dados ocorre de forma relativamente natural em métodos baseados em PLS, uma vez que eles não são necessariamente limitados por tais restrições e podem operar bem com a presença de múltiplos modos com quebra de trilinearidade [23]. O uso da bilinearização residual, quando aplicável, também pode conceder ao modelo vantagem de segunda ordem [23, 36]. Nesses casos, foi realizada uma análise combinatória levando a 15 combinações diferentes de matrizes, cada uma sendo testada com N-PLS/RBL para a criação de modelos de calibração.

Todos os dados obtidos foram processados no MATLAB R2023b, utilizando a *N-way toolbox* [68] e a interface MVC2 [47].

5.3 Resultados e discussão

5.3.1 Dados obtidos

Todas as amostras foram medidas de acordo com a metodologia proposta acima. Para cada medição cobrindo toda a faixa espectral proposta na seção 2.3, um algoritmo foi executado medindo treze espectros de impedância em diferentes potenciais, com duração total de 14 minutos.

5 DETERMINAÇÃO DE PARACETAMOL POR ESPECTROSCOPIA DE IMPEDÂNCIA ELETROQUÍMICA MULTIVIA

Cada um dos quatro tipos de matriz citados aqui mostra um comportamento diferente com concentrações variáveis. As matrizes reais mostram um aumento na impedância nas regiões de baixa frequência, com uma banda indicando aumento da parte real da impedância se formando em diferentes potenciais dependentes do analito, como visto nas Figs. 19 e 20 (a). As matrizes imaginárias e absolutas, por outro lado, apresentam uma diminuição da impedância em certas faixas de potencial com o aumento da concentração. Essa diferença pode ser vista nos gráficos de Nyquist⁵ mostrados nas Figs. 19 e nos gráficos de Bode⁶ 3D na Fig. 20(b).

Representações 3D das diferentes partes de uma MEIS e seu comportamento com a mudança de concentração pode ser vistas na Fig. 20.

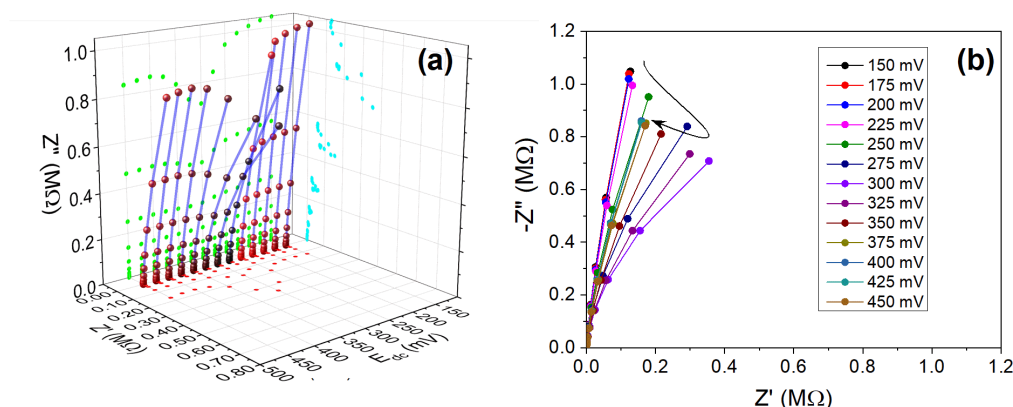


Figura 19: Gráficos de Nyquist da MEIS obtida de uma amostra de paracetamol a 1,75 μ M. Mostrando uma representação (a) 3D e (b) tradicional.

Para a matriz de deslocamento de fase, sem a presença de paracetamol, todos os espectros individuais seguem o mesmo perfil, com a corrente saindo de um estado em fase com o potencial alternado em altas frequências para um estado fora de fase (se aproximando de 90°) em frequências moderadas e baixas, como mostrado na Fig. 20(c,i). Em soluções nas quais as concentrações do analito são apreciáveis, quando o potencial aplicado se aproxima de seu potencial redox, o ângulo de fase diminui em frequências baixas, com essa diminuição sendo correlacionada com a concentração, como visto nas Figs. 20(c,ii) a (c,iv).

⁵Tipo de gráfico frequentemente utilizado na análise de um EIS, mostrando a parte real da impedância no eixo x e a imaginária no y , ilustrando a resposta do sistema ao longo das diferentes frequências.

⁶Outro tipo de gráfico usado na análise de EIS, mostrando a impedância e o ângulo de fase em função da frequência. No caso da representação 3D, apenas umas dessas é mostrada por vez.

5 DETERMINAÇÃO DE PARACETAMOL POR ESPECTROSCOPIA DE IMPEDÂNCIA ELETROQUÍMICA MULTIVIA

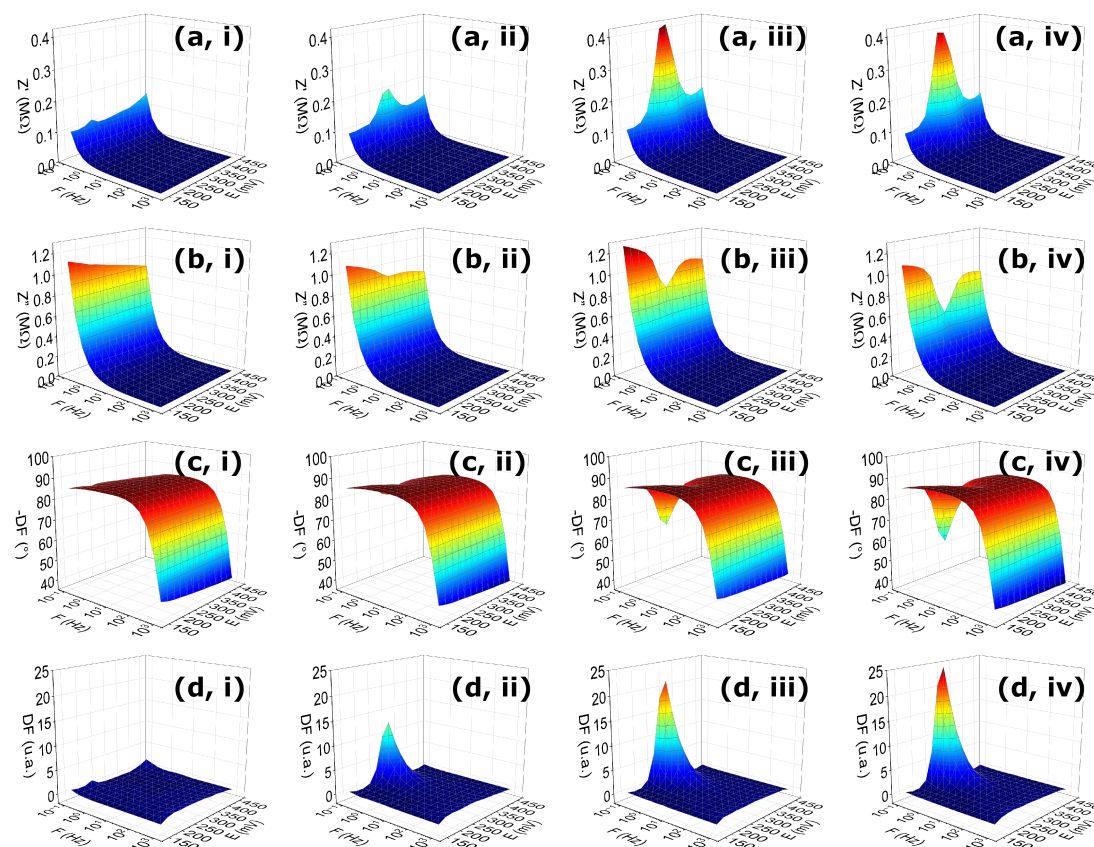


Figura 20: Diagramas de Bod 3D mostrando o comportamento da mudança das diferentes partes em MEIS com o aumento de concentração de paracetamol. Mostrando a parte (a) real, (b) imaginária, (c) deslocamento de fase e (d) deslocamento de fase pré-tratado para concentrações de 0,5, 1,13, 1,75 e 2,38 μM (i, ii, iii, iv).

Esse comportamento dos espectros de impedância se deve à natureza do processo de transferência de carga ao redor do potencial de oxidação. Nos casos sem a presença do analito e em potenciais abaixo do potencial de oxidação, a impedância é influenciada pelo comportamento puramente capacitivo do sistema, especificamente pela dupla camada eletroquímica que se forma na superfície do eletrodo. A dupla camada age como um capacitor, e nessas frequências, o sistema tem tempo para responder às mudanças no sinal aplicado. Com o aumento de concentração, a diminuição do ângulo de fase ao redor do potencial redox indica que processos controlados por difusão (como o transporte de massa do analito até a superfície do eletrodo) começam a desempenhar um papel mais significativo, o que indica a ocorrência de um processo redox. Então, a impedância se torna mais complexa e a corrente já não é totalmente capacitiva (90°) ou resistiva (0°), mas uma mistura de comportamentos, refletindo que o sistema é dominado por uma combinação de resistência, capacitância e difusão. Dessa forma, a transferência eletrônica começa a ser relevante, resultando em uma queda na colaboração da parte imaginária⁷ (que também domina a parte absoluta) da impedância e um aumento na contribuição da parte real (resistiva). Em potenciais mais altos, a impedância volta a aumentar com a diminuição da transferência eletrônica devido ao aumento da camada de depleção e a limitação de transferência de massa, de tal maneira que um comportamento capacitivo se torna cada vez mais dominante novamente.

Para que esses dados possam ser avaliados pelos modelos propostos, é necessário que os sinais medidos possuam um comportamento aproximadamente linear. Nesse caso, uma quantidade considerável de diluição foi necessária para a medição adequada do MEIS dentro da faixa linear. Com o aumento das concentrações de analitos e interferentes, após um certo ponto, as matrizes começam a mostrar comportamento não linear, com os valores de impedância imaginários começando a entrar em colapso e a forma das curvas de deslocamento de fase mostrando distorções quando seus valores nas frequências mais baixas atingem abaixo de 50° . Quando o processo difusivo é o dominante, o ângulo limite é 45 graus, portanto ao se aproximar desse valor, os perfis de deslocamento de fase no sentido do potencial mudam de forma e se “achata”. Durante os testes, esse foi o caso de amostras cujo deslocamento de fase em frequências mais baixas se aproximaram desse valor, afetando consideravelmente os modelos criados a partir delas.

Tanto o paracetamol quanto o ácido úrico tiveram um efeito considerável no sinal medido. O ácido ascórbico, por outro lado, não apresentou sinal distinto do ácido úrico na região medida com as concentrações do conjunto de validação A. O aumento das concentrações de ácido ascórbico tem um efeito perceptível nos modelos de previsão, mas com essa mesma característica.

⁷A reactância capacitiva tem sinal negativo, essa queda no gráfico implica valores mais próximos de zero, menos capacitivos.

Como descrito na introdução, os perfis normalizados de frequência do ácido úrico e do paracetamol são consideravelmente similares, como pode ser visto na Fig. 21, porém seus perfis na via do potencial são distintos. Apesar da alta sobreposição, o ácido úrico afeta mais a região ao redor de 275 mV, enquanto o efeito no sinal relacionado ao paracetamol está ao redor de 300 mV.

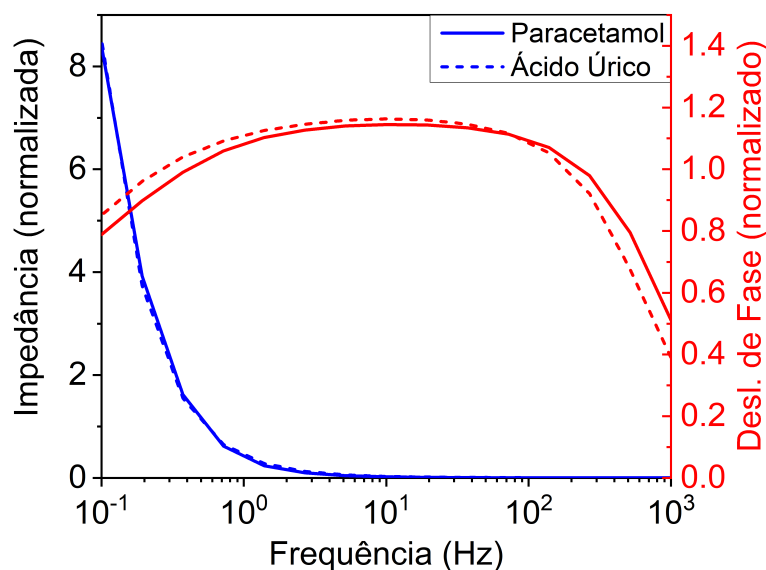


Figura 21: Perfis de frequência normalizados pela média do componente real do EIS e o deslocamento de fase para paracetamol e ácido úrico a 300 mV.

5.3.2 Modelos PLS e CPLS de primeira-ordem

Cortes das MEIS em 325 mV foram utilizados para avaliar a “performance” de modelos de primeira ordem nesse conjunto de dados. Os modelos de calibração foram construídos usando PLS e CPLS, testando tanto as partes reais, quanto imaginárias, os vetores complexos e os de deslocamento de fase, com e sem centrar os dados na média. Todos os modelos utilizaram o número de componentes determinado por validação cruzada *leave-one-out* ao minimizar o erro de previsão. Especificamente, duas, quatro, quatro e duas variáveis latentes para os modelos real, imaginário, complexo e de deslocamento de fase, respectivamente.

No geral, os modelos utilizando números complexos produziram melhores resultados, como indicado na Tab. 6. Para os dados centrados na média, a performance preditiva dos modelos complexos e de deslocamento de fase se mostrou superior comparada aos modelos com as partes reais ou imaginárias. No entanto, como

pode ser visto na Tab. 6 e na Fig. 22, todos os modelos apresentaram dificuldade em prever o conjunto de validação, contendo vieses de predição sistemáticos, com algumas amostras sendo preditas consideravelmente fora da curva.

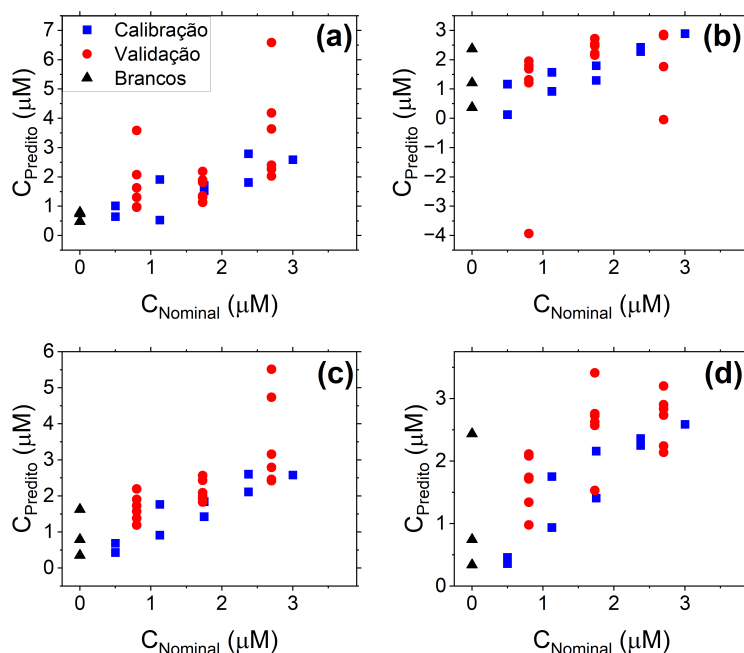


Figura 22: Concentrações nominais contra preditas de paracetamol através de modelos PLS e CPLS com as frações (a) reais, (b) imaginárias, (c) vetores complexos e (d) deslocamento de fase.

Tabela 6: Valores de RMSE e R^2 da previsão de paracetamol para os conjuntos de calibração e validação obtida com os modelos baseados em PLS de primeira ordem centrando na média.

Parâmetro	Real	Imaginário	Complexo	Desl. de fase
RMSEC (μM)	1,41	1,03	0,95	0,96
RMSEP (μM)	5,62	6,66	4,73	4,39
R^2_C	0,68	0,83	0,85	0,85
R^2_V	0,26	0,13	0,59	0,48

5.3.3 Modelos PARAFAC e MCR

Testes preliminares com amostras preparadas em laboratório indicaram que, em alguns casos, o PARAFAC poderia separar a contribuição de sinal do paracetamol, do ácido úrico e do eletrodo em matrizes reais usando 3 a 4 componentes. No entanto, a reprodutibilidade das amostras se mostrou um problema, com uma diferença considerável entre os escores das réplicas, especialmente em dias diferentes. Uma das formas de mitigar esse problema foi por meio de uma correção interna dos escores das amostras com paracetamol pelos escores do fator relacionado ao sinal do eletrodo, os normalizando por esse valor. Dessa forma, os desvios entre pontos com a mesma concentração foram reduzidos, mas se mantiveram consideráveis. Usando matrizes de deslocamento de fase, a capacidade de deconvolução dos modelos PARAFAC se mostrou insuficiente, sendo incapazes de modelar adequadamente os vales na superfície das matrizes de deslocamento de fase, causados pelo aumento dos níveis de paracetamol e ácido úrico, ilustrados na Fig. 20(c). Nessa abordagem, PARAFAC2 tendeu a fornecer melhores resultados devido à sua modelagem menos restrita.

No entanto, uma maneira diferente de abordar esse tipo de matriz de dados se mostrou mais eficiente. Ao subtrair cada amostra de uma obtida de um branco, os vales nas matrizes de deslocamento de fase tornam-se picos, com a contribuição do eletrodo/tampão não precisando ser modelada através do PARAFAC, que agora precisa de um componente a menos. Resultados semelhantes, mas mais consistentes, também podem ser obtidos por um algoritmo de correção de linha de base baseado em regressão spline assimétrica por mínimos quadrados (AsLSSR) [5, 67], o aplicando às matrizes de deslocamento de fase sem o sinal negativo linha por linha. Dessa forma, pode-se obter dados pré-tratados como mostrado na Fig. 23.

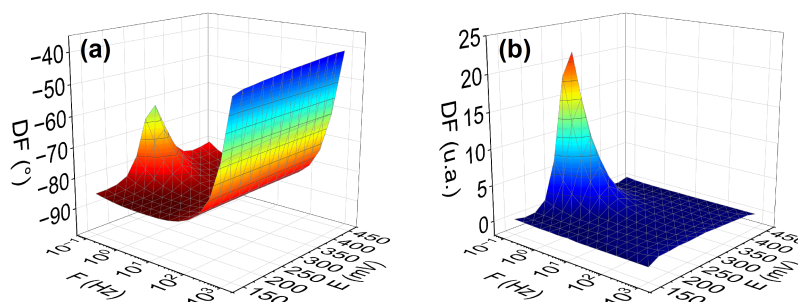


Figura 23: Exemplo de pré-tratamento usando AsLSSR em uma matriz MEIS de deslocamento de fase. (a) Matriz de deslocamento de fase, (b) matriz de deslocamento de fase pré-tratada por AsLSSR.

Embora essa abordagem tenha resultado na melhor replicabilidade entre amostras feitas em laboratório no mesmo conjunto de dados (usando dois componentes e restrições não negativas), os resultados obtidos tenderam a ser instáveis, com perfis mudando consideravelmente ao adicionar ou remover amostras. Todas as abordagens mencionadas tinham essa característica, embora as matrizes com correção de linha de base mostram esse efeito em menor grau. Os perfis instrumentais obtidos foram, em geral, consistentes com os valores esperados para os componentes puros e o modelo trilinear obteve uma consistência de núcleo⁸ (CORCONDIA, do inglês *Core Consistency Diagnostic*) de 73,69%. Os perfis obtidos podem ser vistos na Fig. 24(b,c). No entanto, o modelo PARAFAC teve dificuldades em modelar as amostras de validação, com a presença de urina, mostrando desvios positivos consideráveis presentes nos escores de intensidade obtidos para os conjuntos de dados de validação, como visto na Fig. 24(a).

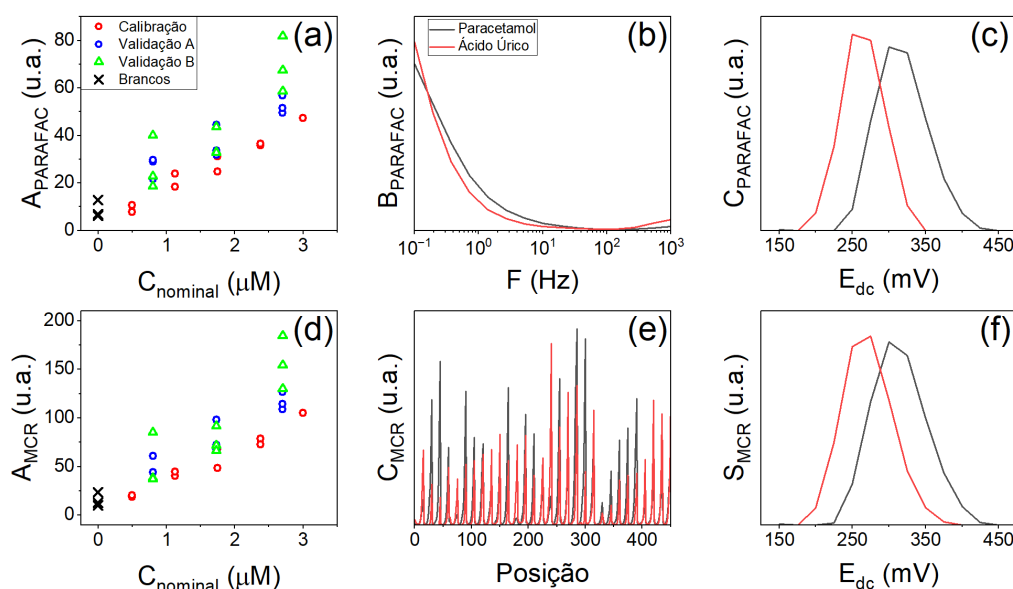


Figura 24: Perfis deconvolvidos por PARAFAC (a, b, c) e MCR (d, e, f) com restrições de não-negatividade das MEIS pré tratadas obtidas de misturas paracetamol/ácido úrico em urina.

Uma das possíveis explicações para esse comportamento pode estar ligada à semelhança entre os perfis de frequência do paracetamol e do ácido úrico, na medida

⁸Teste que estima a extensão de variância do modelo representando variância trilinear dos dados originais, sendo calculada através da comparação com um modelo Tucker3. Valores acima de 90 representam alta trilinearidade, ao redor de 50 indicando desvios da trilinearidade e abaixo disso desvios consideráveis.

em que eles podem ser semelhantes o suficiente para que seus perfis normalizados sejam aproximadamente colineares, o que pode levar a uma perda parcial de unicidade na solução de PARAFAC e a um resultado degenerado instável [26, 27]. Essa característica pode não ser necessariamente intrínseca ao MEIS quando aplicada a outros compostos, mas neste caso específico parece ser.

Modelos MCR/ALS também foram construídos de maneira semelhante, desdobrando o tensor tridimensional na direção da frequência. Resultados sem restrições obtiveram perfis irregulares na direção desdobrada, incluindo o aparecimento de perfis espelhados. Isso era de se esperar, considerando os resultados irrestritos do PARAFAC, especialmente devido à ambiguidade inerente a modelos MCR/ALS. No entanto, como nos modelos PARAFAC, os efeitos podem ser mitigados usando restrições de mínimos quadrados não negativos rápidos (fnrls, do inglês *fast non-negative least squares*) no modelo. Com o uso dessas restrições de não negatividade, os modelos MCR/ALS produziram resultados mais consistentes e semelhantes aos obtidos com o PARAFAC, como visto na Fig. 24(c,d,e).

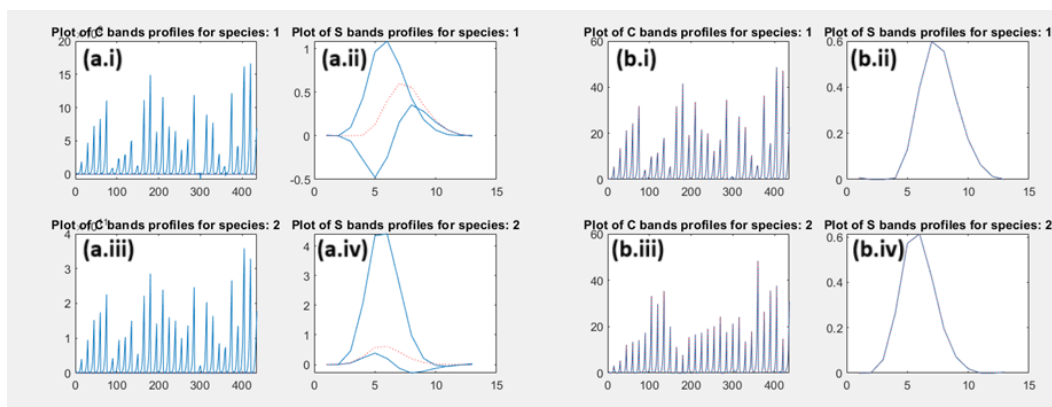


Figura 25: Resultado da otimização por MCR-bands com (b) e sem (a) o uso de restrições de não-negatividade, mostrando os perfis das matrizes **C** (i e iii) e **S** (ii e iv) para os componentes 1 (i e ii) e 2 (iii e iv). A linha tracejada indica a curva inicial e as contínuas os valores com contribuição máxima e mínima.

Uma análise do modelo deconvolvido através de MCR-bands [32] confirma uma redução considerável na ambiguidade rotacional usando restrições não negativas em ambos os modos, com os perfis das bandas em **S** e **C** se tornando consideravelmente mais estreitos e atingindo o que é basicamente uma solução única, como visto na Fig. 25. A diferença entre os valores f máximo e mínimo para os modelos não restritos, refletindo a contribuição relativa do sinal de um determinado componente para todo o sinal, atingiu $3,48 \times 10^8$ e $5,54 \times 10^9$ para os componentes um e dois, respectivamente. Essa alta diferença indica considerável ambiguidade.

Com a adição de restrições de não-negatividade, a diferença caiu para 0, indicando ausência de ambiguidade rotacional com o estimador utilizado.

Dito isto, como no modelo PARAFAC, o desempenho preditivo do modelo MCR nos conjuntos de validação ainda é falho, com um claro viés presente nos resultados da validação, o que pode indicar uma separação de sinal inadequada, mesmo com a ambiguidade reduzida.

5.3.4 Modelos N-PLS/RBL

Para os modelos N-PLS/RBL, 15 combinações diferentes de matrizes foram avaliadas para definir as escolhas ideais para o tipo de matriz, número de componentes e região espectral a serem usados no modelo de calibração. Para cada tipo de matriz, um ou mais tensores de dados foram concatenados na direção E_{dc} , com vários modelos sendo construídos usando diferentes números de componentes PLS e RBL, assim como diferentes faixas de frequência. A Tabela 7 contém os resultados desses testes, mostrando os valores ideais para cada tipo de matriz e marcando o modelo que produziu as melhores métricas com um asterisco.

Tabela 7: Resultados para os modelos de calibração N-PLS/RBL com diferentes combinações de matrizes, especificando também qual combinação de número de variáveis do modelo e faixa de frequência obteve os melhores resultados. Os tipos de matriz são representados pelas letras R (real), I (imaginário), A (absoluta) e P (deslocamento de fase).

N	Tipo de Matrix	Var. PLS	Var. RBL	Frequência (Hz)	RMSEP (μ M)	R ²
1	R	3	0	0,1-1000	0,69	0,73
2	I	2	0	0,1-1000	1,12	0,64
3	A	2	0	0,1-1000	1,13	0,63
4	P	3	0	0,1-518	0,59	0,93
5	RI	4	1	0,1-1000	0,78	0,70
6	RA	4	1	0,2-1000	0,78	0,68
7*	RP	3	1	0,37-139	0,38	0,95
8	IA	3	0	0,1-1000	1,20	0,74
9	IP	5	1	0,37-139	0,68	0,89
10	AP	4	0	0,37-139	0,55	0,94
11	RIA	4	1	0,1-1000	0,80	0,73
12	RIP	4	0	0,37-139	0,57	0,94
13	RAP	4	0	0,37-139	0,56	0,94
14	IAP	4	0	0,37-139	0,58	0,93

Continua na próxima página.

Tabela 7: ...(continuado da página anterior)

N	Tipo de Matrix	Var. PLS	Var. RBL	Frequência (Hz)	RMSEP (μM)	R ²
15	RIAP	4	0	0,37-139	0,58	0,93

*Melhor resultado

Como visto na Tab. 7, apenas os modelos que usaram as matrizes de deslocamento de fase obtiveram valores de R² maiores que 0,90, com matrizes concatenadas adicionadas melhorando ou diminuindo ligeiramente o desempenho. Outro resultado notável deste teste é o aprimoramento de modelos contendo a matriz de deslocamento de fase ao remover linhas com dados medidos em altas frequências, que são menos dependentes da composição da amostra e mais suscetíveis a variações no próprio eletrodo e condutividade da solução. A remoção de um a dois vetores na faixa de frequência mais baixa também levou a melhorias no desempenho. Nas diferentes combinações testadas, a que apresentou o melhor desempenho preditivo foi a combinação da parte real dos espectros de impedância com a matriz de deslocamento de fase (multiplicada por 10⁴ por razões de escala). O modelo utilizou três variáveis latentes para o modelo PLS e uma para a bilinearização residual. Os resultados da previsão e os valores de mérito para os modelos podem ser encontrados na Fig. 26 e Tab. 8.

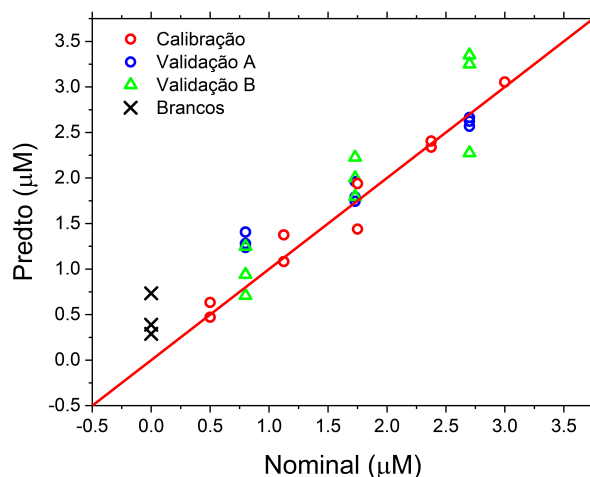


Figura 26: Resultados de previsão para os conjuntos de dados de calibração e validação usando as matrizes reais e de deslocamento de fase por meio de N-PLS/RBL.

Tabela 8: Resultados de previsão das amostras de validação para um modelo N-PLS/RBL construído com 3 componentes PLS e 1 RBL. As amostras de urina estão indicadas por U, as amostras do primeiro conjunto de validação (com adição de urina real) por VA e as do segundo conjunto de validação (com adição de urina real e níveis mais elevados de ácido ascórbico) por VB.

Amostra	C (μM)		SD (μM)	Resíduos		LoD _{min} (μM)	LoD _{max} (μM)
	Nom.	Pred.		s/RBL	c/RBL		
U1	0,00	0,73	0,0844	5,41E03	1,36E03	0,11	0,38
U2	0,00	0,39	0,1266	8,94E03	3,78E03	0,21	0,44
U3	0,00	0,29	0,1113	6,22E03	1,11E03	0,10	0,38
VA1	1,73	1,79	0,0793	6,00E03	2,57E03	0,23	0,45
VA2	1,73	1,96	0,0855	9,51E03	3,18E03	0,43	0,63
VA3	0,80	1,28	0,0728	7,81E03	2,45E03	0,27	0,48
VA4	0,80	1,41	0,0810	7,96E03	2,63E03	0,29	0,50
VA5	2,70	2,62	0,1067	9,15E03	2,89E03	0,39	0,59
VA6	1,73	1,74	0,0690	6,71E03	2,11E03	0,21	0,44
VA7	2,70	2,66	0,1216	7,89E03	2,97E03	0,36	0,56
VA8	2,70	2,57	0,1228	1,09E04	3,49E03	0,60	0,81
VA9	0,80	1,24	0,0815	5,80E03	2,76E03	0,24	0,46
VB1	1,73	2,23	0,0839	7,47E03	2,50E03	0,26	0,47
VB2	1,73	1,80	0,1438	7,19E03	3,90E03	0,44	0,64
VB3	0,80	0,94	0,0753	6,47E03	1,49E03	0,14	0,40
VB4	0,80	1,25	0,1837	5,82E03	2,07E03	0,15	0,40
VB5	2,70	3,25	0,1470	1,09E04	3,71E03	0,54	0,75
VB6	1,73	2,00	0,0937	6,21E03	3,48E03	0,28	0,49
VB7	2,70	3,35	0,2523	1,70E04	7,95E03	2,11	2,56
VB8	2,70	2,28	0,1397	1,61E04	6,72E03	1,80	2,20
VB9	0,80	0,71	0,7219	1,62E04	6,79E03	2,81	3,39

Como essa abordagem cria um modelo N-PLS/RBL por amostra, cada amostra terá seu próprio intervalo de Limites de Detecção (LoD, do inglês Limit of Detection), calculado usando as *leverages* extrapoladas mais baixas e mais altas até o ponto de concentração zero do analito [69]. Nesse caso, uma amostra será considerada positiva se estiver acima do intervalo máximo de LoD. Devido a essa particularidade, pode não ser razoável definir um valor global para LoDs com essa abordagem, uma vez que o nível de interferência no sinal varia para cada amostra. Ao avaliar os valores na Tab. 8, as amostras de validação VB7, VB8 e VB9 parecem ser discrepantes quando se trata de valores de LoD, com esses valores sendo consideravelmente mais altos do que o resto, todos aparecendo acima de 2 μM .

Eles também tinham resíduos de modelo consideravelmente maiores, até maiores do que o dobro dos outros. O restante das amostras apresentou valores máximos de LoD mais consistentes, na faixa de $0,51 \pm 0,26 \mu\text{M}$ (95% de confiança), o que equivale a $206 \pm 104 \mu\text{M}$ de paracetamol na urina não diluída, considerando uma diluição de 1:400.

A partir dos resultados mostrados na Fig. 26, também é possível ver um comportamento diferente para ambos os conjuntos de validação. O conjunto de validação A parece ter resultados consistentes, independentemente dos níveis de interferentes dentro da faixa experimental proposta, mas com um desvio notável da curva de previsão, com suas amostras seguindo uma inclinação distintamente diferente, o que é consistente com um efeito de matriz nessas amostras. O conjunto de validação B, por outro lado, não parece ter essa diferença de inclinação, mas também tem resultados menos consistentes, com menor precisão entre as amostras de mesma concentração de paracetamol. Se essa diferença entre os conjuntos é causada pelas diferentes urinas ou apenas o efeito dos níveis consideravelmente mais altos de ácido ascórbico ainda não foi determinado.

Uma das possíveis razões para uma diferença tão acentuada entre os modelos construídos com a matriz de deslocamento de fase e aqueles sem ela pode ser avaliada usando um mapa de desvios padrões das matrizes usadas na construção do modelo de calibração, conforme mostrado na Fig. 27.

Como visto na Fig. 27(d), as matrizes de deslocamento de fase ainda têm uma quantidade considerável de variação em faixas de frequência mais altas em comparação com as outras, mostrando perfis mais dependentes de E_{dc} e uma pequena banda próxima a 1 kHz (aparentemente não dependente de E_{dc}). No sentido do potencial, a variação também é limitada principalmente a um intervalo correlacionado aos analitos de interesse. As matrizes reais têm um comportamento semelhante, mas mais limitado às faixas de frequência mais baixas. As matrizes imaginárias e absolutas, no entanto, mostram um perfil de variação mais espalhado em E_{dc} , o que pode ser um indicativo de que uma parte considerável do sinal nessas matrizes é independente dos analitos de interesse, com uma linha de base variável de amostra para amostra. Essa característica pode ser uma possível razão para o baixo desempenho desses tipos de matrizes na construção de modelos de calibração. De maneira semelhante, essa também pode ser a razão da ligeira melhoria de desempenho em modelos com as matrizes de deslocamento de fase ao remover partes da faixa de alta frequência, que contém a banda de variância não-dependentes de E_{dc} .

A mudança de linha de base, no entanto, pode não ser completamente responsável pelo baixo desempenho de matrizes imaginárias e absolutas neste caso. A correção de linha de base com regressão spline assimétrica de mínimos quadrados (AsLSSR) [5, 67] em cada linha individual das matrizes imaginárias conseguiu

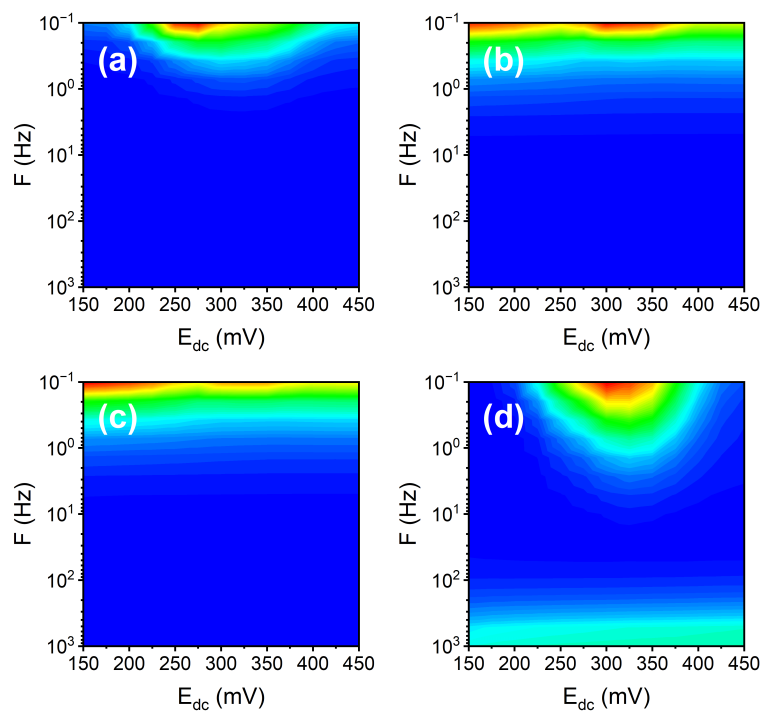


Figura 27: Perfis de desvio padrão para o conjunto de calibração. (a) Real, (b) Imaginário, (c) módulo e (d) deslocamento de fase.

corrigir a mudança da linha de base, como visto na Fig. 28, e ajudou a obter matrizes mais consistentes. No entanto, o desempenho de previsão dos conjuntos de dados de validação em modelos construídos com essas matrizes continuou inferior.

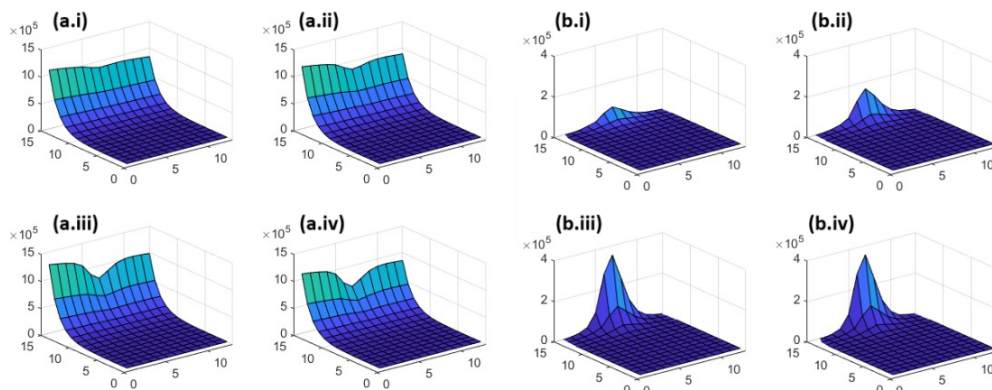


Figura 28: Exemplo de correção de linha de base de matrizes imaginárias MEIS usando AsLSSR. (a) matrizes imaginárias não pré-tratadas, (b) matrizes imaginárias pré-tratadas.

5.3.5 Notas sobre o uso de urina sintética

Na tentativa de replicar o efeito de matriz percebido observado nos resultados de predição do conjunto de validação A, foram realizadas medidas utilizando diluente de urina Sigmatrix e urina sintética laboratorial, como a preparada por Laube et al. [70]. Embora os modelos em ambos os casos tenham se comportado de maneiras consideravelmente diferentes, nenhum deles conseguiu replicar um efeito de matriz semelhante à urina real.

O uso do diluente de urina Sigmatrix levou a uma considerável mudança nos perfis experimentais obtidos, incluindo uma considerável redução e deslocamento do sinal do ácido úrico. O paracetamol também foi afetado, mesmo que não na mesma escala. Uma das possíveis razões para esse comportamento é a presença de azida sódica como conservante, que é um forte redutor e poderia levar a esses resultados. De qualquer forma, seu uso foi considerado inadequado para essa aplicação específica.

O uso da urina sintética produzida em laboratório de acordo com a composição descrita na Tab. 9 não levou ao tipo de sinal percebido nem às alterações percebidas quando comparado às amostras reais, sendo indistinguível de um branco feito apenas com a solução tampão, o que aponta para a possibilidade de outros componentes menores na urina, não contabilizados na urina sintética, causarem o efeito de matriz percebido.

A urina é uma matriz complexa, com sua composição específica variando consideravelmente mesmo para indivíduos saudáveis. Para técnicas eletroquímicas, tentar obter uma matriz sintética com comportamento semelhante pode ser desafiador e sua aplicação não é trivial.

Tabela 9: Composição da urina sintética produzida em laboratório. Adaptado de Laube et al.

Componente	Concentração (g/L)
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	1,10
NaCl	2,93
Na_2SO_4	2,25
KH_2PO_4	1,40
KCl	1,60
NH_4Cl	1,00
Uréia	25,00
Creatinina	1,10

5.4 Conclusões e perspectivas

A criação de modelos de segunda ordem usando MEIS e a detecção e quantificação de paracetamol em amostras de urina usando essa metodologia foram bem-sucedidas, com esse sistema-modelo específico também permitindo avaliar suas características, vantagens e desvantagens.

Das diferentes formas em que os dados de impedância estavam disponíveis, as matrizes de deslocamento de fase obtiveram o melhor desempenho para análise de segunda ordem, mostrando melhor replicabilidade entre as amostras e resultando em melhores modelos de calibração. Os modelos de calibração N-PLS/RBL também puderam ser aprimorados pela concatenação da parte real das matrizes de espectros de impedância multivaria com as de deslocamento de fase, reduzindo o desvio médio e melhorando o fator de correlação entre os valores de concentração previstos e nominais, fornecendo um R^2 de 0,95 e um RMSEP de 0,38 μM .

Embora tanto o PARAFAC quanto o MCR/ALS com restrições não negativas tenham conseguido obter perfis instrumentais deconvoluídos consistentes usando matrizes de deslocamento de fase após a correção da linha de base por AsLSSR, o baixo desempenho de seus modelos de calibração pode indicar má separação de sinal usando esses métodos. Uma das possíveis razões para isso é a quase-colinearidade dos perfis de frequência de paracetamol e ácido úrico na região medida, afetando a unicidade do resultado (no caso do PARAFAC) e a ambiguidade rotacional (nos modelos MCR/ALS). Embora a aplicação de restrições não negativas no modelo MCR/ALS tenha levado a uma redução drástica na ambiguidade rotacional, ele ainda apresenta um desempenho de previsão consideravelmente menor quando comparado com os modelos N-PLS/RBL.

Uma das principais desvantagens da metodologia proposta é a necessidade de diluição considerável para manter as medições na faixa linear. No entanto, isso também aponta que, em matrizes mais simples, permitindo menores quantidades

de diluição, o uso de MEIS com métodos de segunda-ordem pode potencialmente atingir limites relativamente baixos de detecção, mesmo na presença de sinais sobrepostos.

6 Determinação de canabinoides sintéticos por voltametria 3D

6.1 Introdução

O contínuo desenvolvimento de drogas sintéticas tem se mostrado uma fonte constante de desafios analíticos. Estando esses compostos muitas vezes presentes em diversos tipos de matrizes diferentes e sendo comumente vendidas misturadas com compostos que podem a priori nem serem conhecidos pelas autoridades, o desenvolvimento métodos de detecção desses compostos utilizando de técnicas robustas a interferentes desconhecidos se torna especialmente relevante.

Entre essas, um grupo de substâncias que ganhou destaque é a dos canabinoides sintéticos (SCs, do inglês *Synthetic Cannabinoids*), compostos criados para estimular os receptores canabinoidais endógenos responsáveis por mediar os efeitos farmacológicos do tetrahydrocannabinol (THC) [71]. Apesar de seu uso original ser voltado à pesquisa de receptores farmacológicos, esse grupo de compostos acabou sendo produzido e usado como drogas de abuso, sendo inclusive comercializados legalmente na Europa e nos Estados Unidos até seu controle e proibição a partir dos anos 2010 [72]. Apesar de estimularem os mesmos receptores que o THC, a afinidade destes é consideravelmente maior pelos canabinoides sintéticos, podendo levar a efeitos mais intensos e podendo causar reações psicológicas, neurológicas, cardiovasculares, pulmonares e renais adversas, podendo resultar em danos à saúde do usuário ou até mesmo morte [73–76]. Esses efeitos adversos também podem ser mais comuns devido à maneira com a qual essas drogas são preparadas, com as misturas herbais sendo borrifadas, com os componentes ativos ou misturadas com um pó que os contém, podendo resultar em uma baixa uniformidade de concentração [77], aumentando o risco de overdoses acidentais [71].

A criação contínua de novos SCs é outro ponto relevante a esse tipo de aplicação [78, 79], com a modificação de compostos existentes por meio da adição ou substituição de grupos funcionais sendo uma abordagem comumente empregada [80, 81]. Portanto, métodos analíticos capazes de se adaptar a essas rápidas mudanças e identificar classes de SCs para fins de triagem são altamente relevantes [82].

Comumente, a detecção desses compostos se dá a partir de técnicas cromatográficas em um laboratório especializado, com métodos utilizando tanto cromatografia em fase gasosa [83–85] quanto em fase líquida [86–88]. Mas, muitas vezes é de interesse policial a possibilidade de medições preliminares no campo. No quesito portabilidade, técnicas eletroquímicas se mostram especialmente aptas, com potenciostatos relativamente robustos, eletrodos e soluções de eletrólitos podendo ser carregados em pequenas maletas.

No contexto de técnicas eletroquímicas, uma das maneiras mais comuns de se obter tais métodos é o uso de eletrodos especializados, altamente seletivos aqueles compostos em específico, como é o caso de eletrodos usando polímeros com

impressão molecular (MIPs, do inglês *Molecularly Imprinted Polymers*) [89–91], biossensores eletroquímicos [92, 93], entre outros [94, 95]. Apesar das claras vantagens que esses eletrodos podem trazer, seu uso pode ser limitado por razões puramente industriais e logísticas. Como toda nova tecnologia, existem dificuldades ao iniciar seu uso e produção. Por exemplo, por seu uso não ser adotado no momento, a sua manufatura muitas vezes não possui escala o bastante para um processo industrial mais avançado e replicável. Mas por não possuir essa característica, o produto também se torna mais caro e de mais difícil implementação, não sendo um processo necessariamente trivial.

Por outro lado, essa não é a única maneira de se obter seletividade em um método analítico. Como foi citado anteriormente, a utilização de técnicas de ordem superior tem o potencial de fornecer essa seletividade no resultado a partir de propriedades matemáticas das técnicas instrumentais utilizadas. Com uma seleção e otimização de técnicas adequadas, é teoricamente possível obter uma boa performance mesmo com o uso de eletrodos não especializados, comercialmente disponíveis, facilitando assim sua implementação.

A detecção voltamétrica de SCs usando eletrodos comerciais como método de triagem foi proposta anteriormente. Por exemplo, Dronova et al. demonstraram a detecção eficaz de SCs à base de indol e indazol em amostras de rua [96]. No entanto, algumas limitações devem ser consideradas. Em alguns casos, diferentes SCs podem sofrer reações colaterais eletroquímicas durante a medição, afetando o voltamograma obtido, como observado por Ameen et al. em misturas contendo STS-135 e BB-22 [97]. Outro fator que potencialmente limita essas aplicações é a variabilidade inerente à fabricação desses produtos, podendo levar à presença de interferentes desconhecidos [77], que podem afetar adversamente os sinais medidos. Nesses casos, pode ser necessária uma abordagem analítica mais seletiva, com as técnicas quimiométricas de ordem superior tendo o potencial de aumentar a seletividade em um sinal misto. A incorporação da quimiometria na análise forense está se tornando cada vez mais comum [98–100], especialmente com métodos de primeira ordem, com aplicações desse tipo se tornando mais difundidas e aceitáveis no meio.

Uma abordagem para gerar dados multivaria com técnicas eletroquímicas é o uso de voltametria tridimensional. A voltametria tridimensional em termos simples e práticos refere-se à associação de técnicas eletroquímicas independentes e dependentes do tempo, nas quais a terceira via corresponde à intensidade do sinal elétrico registrado. No final dos anos 2000, o escopo da voltametria 3D foi ampliado por meio de sua associação com modelagem de dados de segunda ordem [101]. A maneira mais comum para se aplicar essa técnica envolve a obtenção de voltamogramas sequenciais enquanto se altera gradualmente certos parâmetros instrumentais entre as medições. Ao empilhar cada voltamograma, uma matriz de

dados por amostra é gerada, na qual o potencial varia em uma via e o parâmetro alterado na outra. Várias abordagens para gerar tais dados são descritas na literatura, incluindo voltametria de pulso diferencial (DPV) mudando a amplitude [5, 6, 16] e tempo de pulso [6], bem como voltametria de onda quadrada (SWV) em diferentes frequências [5]. Essas técnicas demonstraram alcançar a vantagem de segunda ordem, permitindo a determinação mesmo em situações que envolvem sobreposição considerável de sinal e componentes de amostra inesperados, exigindo um pré-tratamento mínimo da amostra.

Essas características tornam essas técnicas e métodos adequados para a triagem de SCs em amostras de rua usando eletrodos não especializados disponíveis comercialmente. Essa adequação surge especialmente de sua capacidade combinada de separar e analisar os sinais de componentes específicos dentro de matrizes complexas, obter perfis identificáveis para cada componente e realizar essas tarefas usando métodos que podem ser rápidos e portáteis.

Nesse capítulo, será avaliado o uso de técnicas voltamétricas 3D e análise de dados de ordem superior para identificação de canabinoides sintéticos em matrizes herbais. Mais especificamente, amostras contendo SCs com centros de indazol-3-carboxamida e indol-3-oato de 8-quinolina foram analisadas, incluindo 5F-AKB48, AKB48, AB-CHMINACA, 5F-PB-22 e BB-22. As amostras utilizadas nesse estudo foram todas obtidas em apreensões no condado de Lincolnshire, Reino Unido por autoridades policiais, sendo essas referenciadas aqui pelo nome anonimizado de suas marcas comerciais. A composição dessas amostras foi determinada com o uso de CG-MS rápido, com a identificação sendo feita através de uma comparação dos picos da espectrometria de massas com uma biblioteca NIST (2008) usando o adendo SWGDRUG (abril de 2015) [102]. Suas concentrações em específico são mais difíceis de determinar devido a alta variabilidade entre amostras e a heterogeneidade das mesmas, com concentrações entre pacotes da mesma marca podendo ter diferenças de mais de 50% na concentração total. Todo o procedimento experimental foi conduzido no *Joseph Banks Laboratories*, localizado na *University of Lincoln*.

6.2 Metodologia

6.2.1 Descrição do sistema

Todas as amostras são compostas de misturas herbais, se encontrando em pacotes selados a vácuo, da maneira que seriam disponibilizadas para o público geral. Pelo produto final ser baseado em uma mistura de SCs com um produto natural e diferentes aditivos, essas misturas podem variar consideravelmente entre marcas, mas de maneira geral elas são comumente feitas com folhas de *Althaea officinalis* Linnaeus, também conhecida como malva-branca, malvaíscio ou *marsh mallow*,

misturadas com diversas outras a depender do *blend* utilizado. No total, foram analisados 48 pacotes de 35 diferentes marcas comerciais de SCs.

Para esse estudo, o foco será dado na detecção de duas classes de canabinoides: baseados em indazol e em indoloato de quinolina; cobrindo assim todos os SCs detectados nas amostras obtidas. Os SCs detectados por CG-MS foram o 5F-AKB48, AKB48, AB-FUBINACA e AB-CHMINACA entre as baseadas em indazole e 5F-PB-22, BB-22 entre as baseadas em indoloato de quinolina [103, 104], com suas estruturas moleculares sendo indicadas na Fig. 29. A diferença do AKB48 para o 5F-AKB48 é a substituição do átomo de flúor nessa estrutura por um hidrogênio.

Considerando que as amostras são misturas herbais, existem diversos componentes que podem agir como interferentes nas medições. Além de ser uma matriz complexa por si só, se tratando de matéria vegetal, não é incomum a adição de aromatizantes e flavorizantes específicos por cada fabricante, que podem agir como interferentes [77]. Outros compostos usados na fabricação desses produtos que também foram detectados incluem a 8-hidroxiquinolina e polietilenoglicol.

A lista com todas as marcas e amostras utilizadas, assim como os compostos detectados por análise usando *fast* GC/MS pode ser encontrada no Apêndice C.

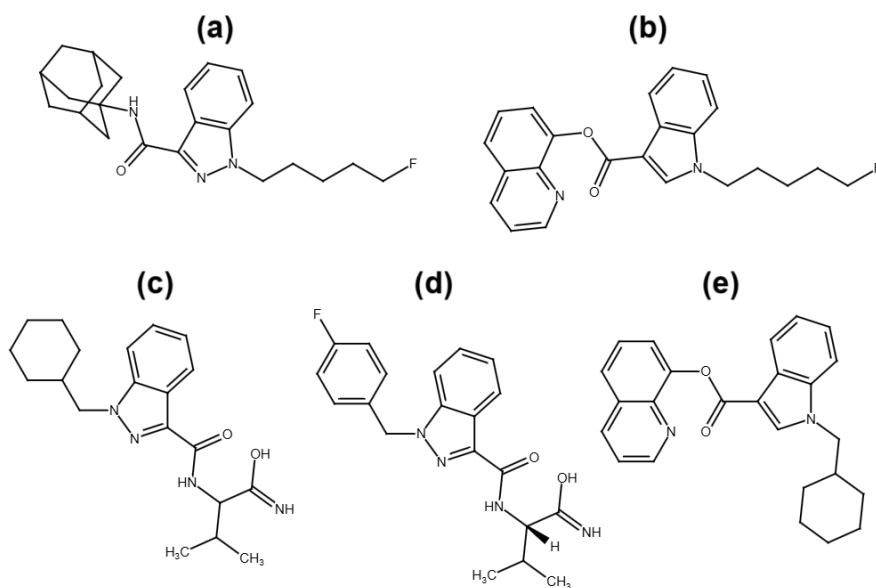


Figura 29: Estruturas moleculares da (a) 5F-AKB48, (b) 5F-PB-22, (c) AB-CHMINACA, (d) AB-FUBINACA, e (e) BB-22.

As amostras disponíveis variaram em composição, contendo misturas e SCs individuais. Notavelmente, entre os SCs mencionados acima, AB-FUBINACA nunca apareceu como o único SC de sua classe em nenhuma amostra. BB-22 por

outro lado nunca apareceu como o único SC isolado. Devido a essa ausência, amostras feitas em laboratório contendo apenas BB-22 foram preparadas tanto para analisar seu perfil voltamétrico (avaliando sua semelhança com outros SCs dentro da mesma classe), como para testar o desempenho do modelo de detecção para este SC específico. Essas amostras foram produzidas pulverizando BB-22 dissolvido em acetonitrila em folhas de marshmallow picadas, usando 59,9 mg de BB-22 por grama de marshmallow. As folhas foram colocadas em um vidro de relógio, pulverizadas, deixadas secar e depois armazenadas. No entanto, as amostras feitas em laboratório exibiram sinais consideravelmente mais baixos em comparação com as amostras de rua, e o processo de fabricação resultou em perdas consideráveis, como evidenciado pela quantidade de resíduo remanescente no vidro de relógio após a remoção da amostra. Essas foram testadas como amostras de menor concentração e marcadas como um grupo distinto nos resultados, não sendo contadas nos cálculos das métricas de performance para evitar vieses nesses.

6.2.2 Reagentes e soluções

Neste estudo, foram utilizados acetonitrila de grau HPLC (CAS 75-05-8) da Fisher Chemical, tetrafluoroborato de tetrabutilamônio (CAS 429-42-5) e pó de polimento de alumina de 0,05 μm da Sigma-Aldrich (MO, EUA). Amostras de *marshmallow* foram obtidas da Health Embassy LTD (Cheltenham, Reino Unido).

6.2.3 Equipamento utilizado

Para a cela eletroquímica foram utilizados um eletrodo de carbono vítreo como eletrodo de trabalho, um fio de platina como contra-eletrodo e um eletrodo Ag/AgCl preenchido com uma solução de KCl como referência. A solução a ser medida foi colocada em um frasco de vidro, com os eletrodos sendo colocados em um suporte proprietário impresso em resina fotossensível (*Elegoo 4K water-washable space grey*), em uma impressora 3D Elegoo Saturn 2. O arranjo experimental em específico foi feito tendo em mente facilitar sua adaptação para um sistema portátil. Uma foto da cela eletroanalítica pode ser vista na Fig. 30. As especificações desse suporte podem ser encontrados no Apêndice D.

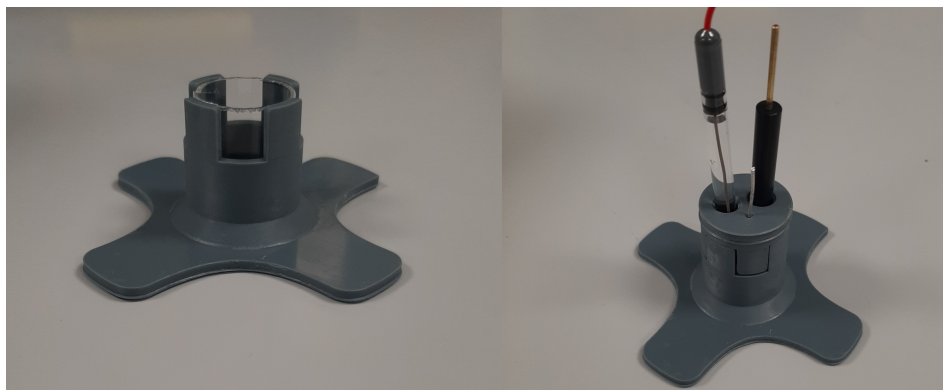


Figura 30: Suporte proprietário desenvolvido para cela eletroanalítica.

Uma balança analítica Sartorius Entris com quatro casas decimais foi usada para pesar amostras e reagentes, e um tanque de limpeza ultrassônica GT Sonic operando a 40 kHz foi usado para extração de amostras. A análise eletroquímica foi feita utilizando um potenciostato tipo Metrohm Autolab PGSTAT302N com o programa Nova 2.1 (Utrecht, Holanda). A análise de GC-MS foi feita usando um cromatógrafo gasoso Perkin Elmer Clarus 680 e um espectrômetro de massas Clarus SQ 8 C (CT, EUA).

6.2.4 Preparo de amostras

Das marcas comerciais de cannabis sintética disponíveis para análise, todas tiveram ao menos uma amostra sendo processada, com certas marcas tendo múltiplas amostras sendo coletadas, sempre de diferentes pacotes e, se possível, de diferentes apreensões.

Uma vez abertas, as amostras passaram por um processo de extração, com 0,06 g de amostra sendo extraída com o uso de 5 mL de acetonitrila em um frasco de vidro fechado, sendo então sonicada por 10 minutos em um tanque de limpeza ultrassom.

Desse extrato, 4 mL são transferidos para um balão volumétrico de 5 mL junto de 500 μL de uma solução 1 mol.L^{-1} de tetrabutilamônio tetrafluoroborato (CAS 429-42-5), sendo posteriormente avolumado. Assim, a amostra analítica conterá o extrato herbal em acetonitrila com 0,1 mol.L^{-1} de TBATFB.

Para gerar amostras negativas a ambos os analitos, folhas de *Althaea officinalis* L. obtidas comercialmente foram utilizadas, gerando brancos com uma matriz similar. No total, nove dessas amostras de malva branca foram medidas, assim como três medições contendo apenas a acetonitrila e o TBATFB.

6.2.5 Análise por CG-MS

A análise de CG-MS foi realizada em extratos metanólicos, usando 100 mg de amostra, 1 mL de MeOH, vórtice por 120 segundos e filtrado com membrana de 0,45 μm . O cromatógrafo usou uma coluna SLB-5MS (Supelco) usando hélio a 0,5 mL $\cdot$ min $^{-1}$ como transportador com uma razão de 100:1. O injetor foi ajustado para 280 °C com injeções de 0,5 μL . O forno foi programado de 100 °C a 270°C a 50 °C $\cdot$ min $^{-1}$, mantido por 6,93 minutos e depois aumentado para 275 °C a 5 °C $\cdot$ min $^{-1}$. A espectrometria de massas foi realizada com uma linha de transferência a 280 °C, a fonte EI+ a 200 °C, energia eletrônica a 70 eV, faixa de massa a 40-500 m/z, ciclos de varredura de 0,5 s e CDI a 0,01 s. Todas as medições foram realizadas na University of Lincoln. Os resultados foram processados com o software Perkin Elmer TurboMass (2014) usando o banco de dados NIST 2008 com o adendo SWGDRUG (abril de 2015).

6.2.6 Escolha da técnica analítica

Para uma análise preliminar de qual método de voltametria 3D seria mais adequado à análise, assim como delimitar a região a ser medida, 5 diferentes métodos foram testados (sendo referenciados aqui como método A ao método E), dois deles baseados em DPV e três deles baseados em SWV.

O método A se baseia em na mudança linear da amplitude do pulso em uma DPV, com dez curvas sendo medidas em diferentes valores. O método B, por sua vez, usa diferentes valores na duração do pulso para gerar a segunda via. As especificações dos métodos A e B se encontram em mais detalhes na Tab. 10.

Tabela 10: Especificações dos métodos preliminares baseados em DPV.

Propriedade	Método A	Método B
Potencial (V)	0,0-1,9	0,0-1,9
Passo (V)	0,01	0,01
Amplitude do pulso (mV)	10-200	50
Duração do pulso (ms)	20	10-40
Intervalo (ms)	200	200

Os métodos C, D e E, por sua vez, se baseiam no uso de SWV, com o método C variando a amplitude da onda quadrada para gerar a segunda via e os métodos D e E variando a frequência da onda quadrada em dois alcances diferentes. As especificações dos métodos C, D e E se encontram em mais detalhes na Tab. 11.

Tabela 11: Especificações dos métodos preliminares baseados em SWV.

Propriedade	Método C	Método D	Método E
Potencial (V)	0,0-1,9	0,0-1,9	0,0-1,9
Passo (V)	0,01	0,01	0,01
Amplitude da onda (mV)	10-50	20	20
Frequência (Hz)	10	10-100	1-10

Para essa avaliação preliminar, determinando qual dessas pode trazer maiores vantagens para a análise, três amostras foram selecionadas do conjunto, uma contendo apenas 5F-AKB48, uma contendo apenas 5F-PB-22 e uma contendo ambas. Mais especificamente, CB28, CB32 e CB34 (respectivamente). Os voltamogramas obtidos podem ser vistos na Fig. 31.

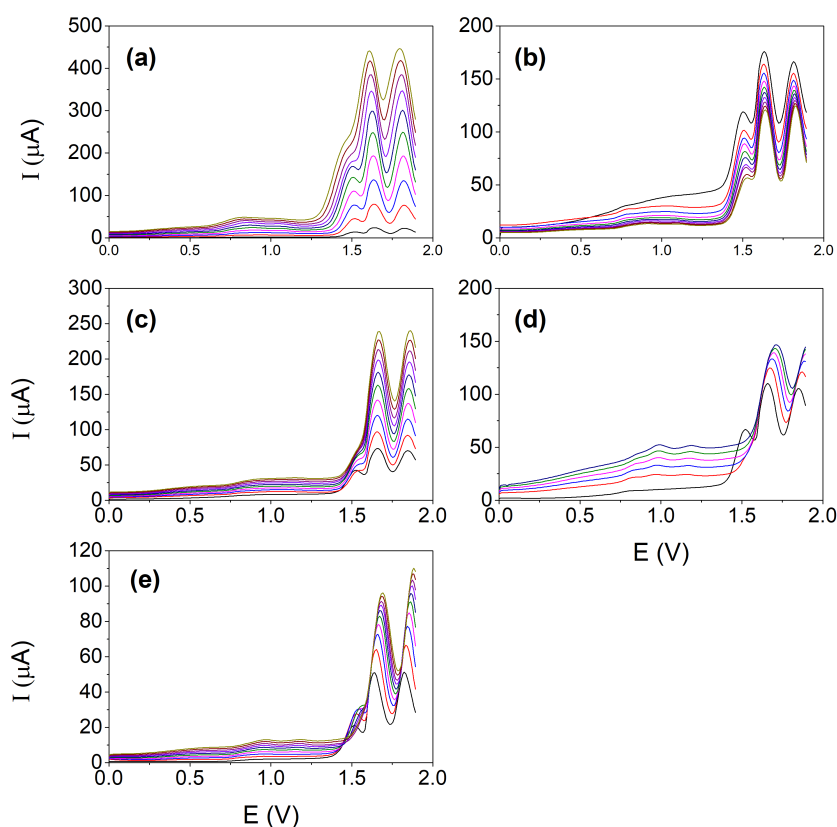


Figura 31: Voltamogramas multivía obtidos com o uso dos métodos preliminares A, B, C, D e E respectivamente para a mistura herbal CB34.

Como visto na Fig. 31, a mudança em valores do tempo de pulso da DPV mostraram efeitos proporcionalmente diferentes para os picos da 5F-AKB48 (próximo a 1,8 V) e a 5F-PB-22 (próximo a 1,6 V), indicando a existência de um perfil diferente nessa via. Sendo assim, esse fator pode ser especialmente relevante para a deconvolução dos sinais em suas contribuições puras.

Devido a essas colocações, os métodos A e B foram escolhidos e modificados, sendo adotados portanto apenas métodos baseados em DPV. A região de potencial escolhida também foi encurtada, a amplitude de pulso máxima do método A foi reduzida e o intervalo de pulso máximo do método B foi aumentado, resultando nas duas metodologias mostradas na tabela 12, A' e B'.

Tabela 12: Especificações dos métodos baseados em DPV ajustados para a medição das drogas de abuso em acetonitrila.

Propriedade	Método A'	Método B'
Potencial (V)	0,5-1,9	0,5-1,9
Passo (V)	0,01	0,01
Amplitude do pulso (mV)	10-100	50
Duração do pulso (ms)	20	10-100
Intervalo (ms)	200	200

6.2.7 Medição de dados voltamétricos

O extrato vegetal processado de cada amostra foi transferido para a cela eletroquímica para aquisição dos voltamogramas. Todas as amostras foram medidas usando os métodos A' e B', gerando uma matriz por amostra por método. O eletrodo de trabalho foi lavado com acetonitrila e polido com pó de polimento de alumina 0,05 μm e lavado com água deionizada entre as medições.

6.2.8 Tratamento de dados

Pré-tratamento

Um dos objetivos desse trabalho é avaliar o efeito de pré-tratamento nos modelos de triagem. Diferentes opções foram avaliadas, com a escolhida sendo o uso de correção de linha de base seguida por alinhamento de pico. Com os dados sendo reorganizados em uma única matriz desdobrada, cada medição DPV passa por uma correção de linha de base usando AsLSSR [67], com a ordem de diferenças igual a 3, λ de 10^{-6} e p igual a 0,001. Após a correção de linha de base, os picos são alinhados com icoshift [105], usando o voltamograma médio como referência e dez intervalos. Após esse pré-tratamento, a matriz é redobrada no tensor de dados original, podendo então ser analisada.

Deconvolução por PARAFAC

O tensor de dados obtido pode ser deconvolvido por PARAFAC em duas vias instrumentais e uma de amostras, com as instrumentais sendo usadas para identificação dos compostos e a via amostral. Sendo um parâmetro ligado à intensidade de sinal (e portanto concentração), sendo usada para a classificação de amostras. Para definir o número ótimo de componentes uma estratégia baseada em CORCONDIA foi utilizada [106].

6.3 Resultados e Discussão

6.3.1 Dados obtidos

Todas as amostras foram medidas utilizando as duas metodologias e os bancos de dados foram preparados a partir delas com e sem pré-tratamento. Enquanto uma fração considerável das amostras mostrou picos bem definidos, muitas possuíam a presença de perfis únicos e até bandas não relacionadas com os analitos listados anteriormente, o que, dado a complexidade da matriz, não era inesperado. Alguns exemplos das matrizes de dados obtidas podem ser vistos na Fig. 32.

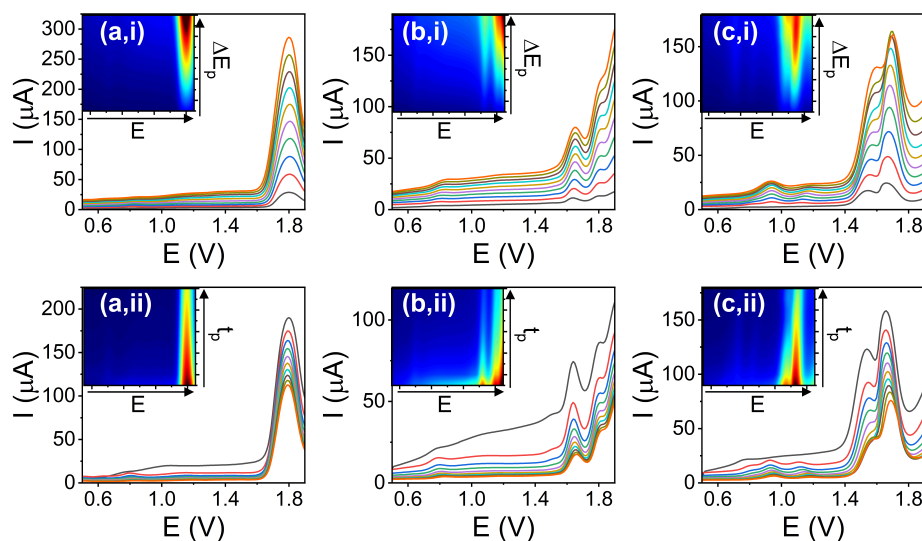


Figura 32: Exemplos de matrizes obtidas por DPV 3D para o conjunto de dados da cannabis sintética com variação de amplitude do pulso (i) e tempo de pulso (ii). As amostras nessa figura são: (a) CB21, (b) CB26 e (c) CB23.

Como visto na Fig. 32 (c, i), DPVs com variações de amplitude de pulso eram propensas a deslocamento de pico, embora tais mudanças fossem sutis em amostras individuais. Além disso, algumas amostras, como a “CB23” mostrada na Fig. 32

(c, i), exibiram um perfil de sinal distintamente diferente nos valores superiores da amplitude do pulso, com correntes de pico atingindo um valor máximo e constante, o que pode resultar em uma quebra na estrutura trilinear esperada do tensor de dados.

Como mencionado anteriormente, SCs semelhantes tendem a exibir sinais semelhantes [96, 97], o que pode permitir detectar e classificar grupos de SC com grupos eletroativos semelhantes. Com base em suas estruturas moleculares e estudos anteriores, infere-se que esses picos correspondem à oxidação de três porções diferentes: indazoles em torno de 1,80V, indóis em torno de 1,55V e quinolinas em torno de 1,64V. Neste trabalho, cada SC individual analisado contém a porção indazol ou as porções indol e quinolina, como um indoloato de quinolina. As diferentes estruturas centrais presentes nas SCs identificadas podem ser vistas na Fig. 33

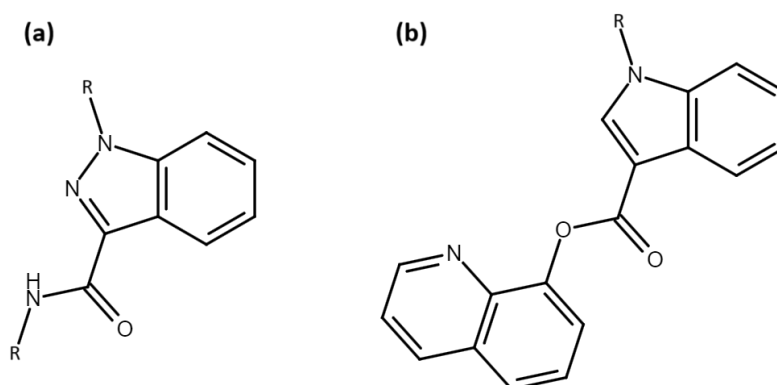


Figura 33: Centros comuns às duas classes de canabinoides listadas. (a) Indazol-3-amida, similar à APINACA; (b) Indol-3-oato de 8-quinolina, similar a PB-22.

Um exemplo dos resultados do pré-tratamento de dados pode ser visto na Fig. 34. Dessa forma, tem-se para análise quatro bancos de dados: DPV com mudança de tempo de pulso com e sem pré-tratamento e DPV com mudanças de amplitude de pulso com e sem pré-tratamento.

6.3.2 Análise de dados

Modelos PARAFAC

Os dados obtidos das voltametrias foram organizados em quatro tensores tridimensionais, sendo posteriormente cortados na região de 1,5 a 1,9 V, onde perfis relevantes para a análise de SCs foram encontrados. Em todos os casos, o tensor

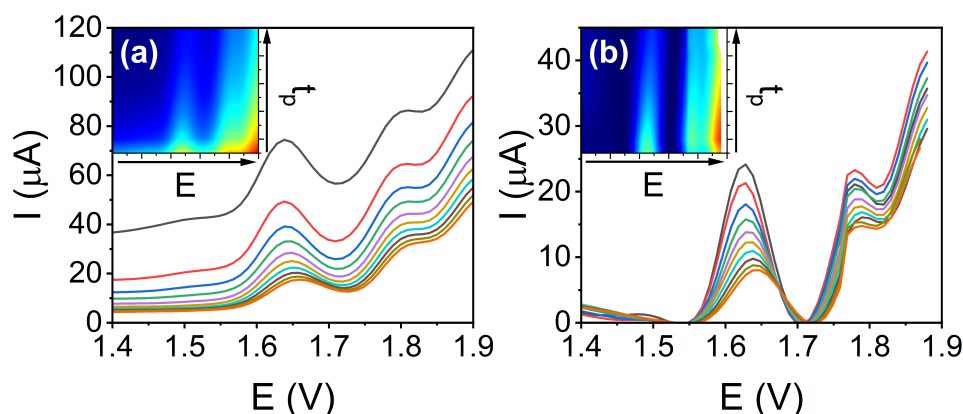


Figura 34: Comparação da DPV 3D de uma amostra com mudanças de tempo de pulso, mostrando (a) os dados brutos e (b) pré-tratados por meio de AsLSSR e icoshift. Os valores de tempo de pulso (t_p) das curvas mostradas vão de 10 a 100 ms com incrementos de 10 ms.

foi deconvolvido em dois fatores usando restrições de não-negatividade nos três modos, com valores de CORCONDIA caindo abruptamente para abaixo de 50 com três ou mais componentes. Os perfis instrumentais deconvolvidos usando o método A' e B' podem ser vistos na Fig. 35.

A análise dos perfis voltamétricos na matriz **B** permitiu a identificação dos fatores associados a cada grupo de SCs. Essa identificação foi corroborada pela comparação da matriz **A** do PARAFAC com os dados de referência do CG-MS. O fator 1 (F1) parece estar associado a SCs à base de indazol-3-carboxamida, com picos de oxidação em torno de 1,82 V, correspondendo à presença de 5F-AKB48, AKB48 e AB-CHMINACA.

O fator 2 (F2) parece estar associado a SCs que são baseados em indoloato de quinolina, caracterizados por um pico de oxidação proeminente em torno de 1,64 V (atribuível à oxidação do grupo quinolina) [97] e um pico menor em torno de 1,54 V (correspondendo à oxidação do grupo indol, que se encontra 280 mV a menos que o pico de oxidação do indazol [96, 97]); ambos os picos estão ligados à presença de 5F-PB-22 e BB-22. Embora o segundo pico seja visível nos dados medidos, os modelos PARAFAC derivados de DPVs com variações em amplitude de pulso tendem a não incluí-lo nos perfis deconvolvidos, enquanto aqueles gerados pela variação do tempo de pulso o incluem. Um artefato menor também surgiu em torno de 1,85 V nos perfis pré-tratados deconvolvidos, o que não era evidente nos dados não processados.

Isso é consistente com o comportamento relatado por Dronova et al., em que SCs que compartilham esses grupos funcionais exibem perfis voltamétricos seme-

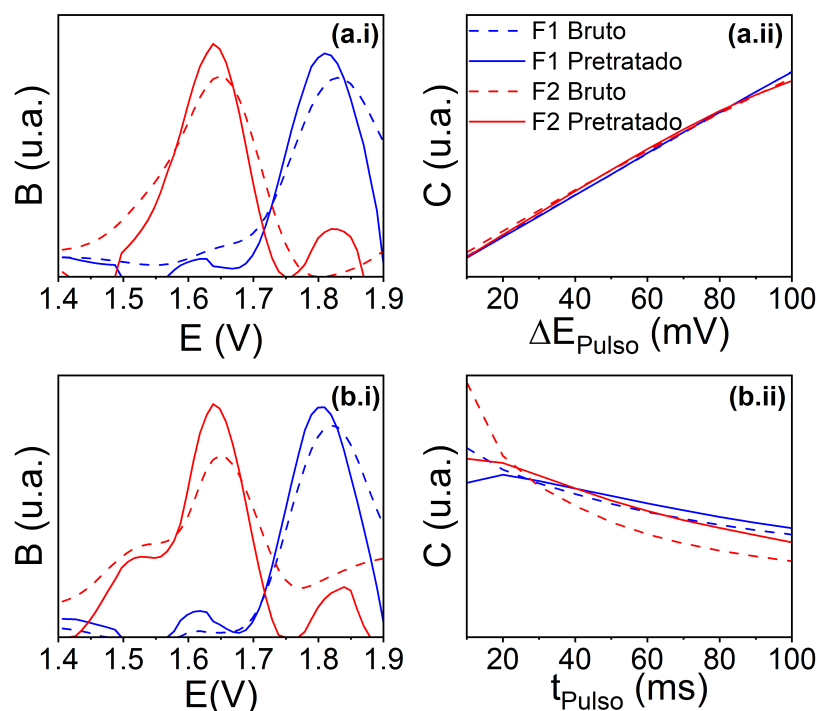


Figura 35: Perfis instrumentais deconvolvidos dos tensores com dados voltamétricos de SCs com variações de amplitude de pulso (a) e tempo de pulso (b), com e sem pré-tratamento.

lhantes [96], permitindo que o modelo identifique classes de moléculas em vez de moléculas individuais.

No que diz respeito à via do modo C, os perfis deconvolvidos na Fig. 35 (a.ii) mostram que, embora as variações na amplitude do pulso afetem consideravelmente os voltamogramas, elas afetam de forma semelhante os dois grupos de SCs (pelo menos dentro da faixa de amplitude medida). Este efeito uniforme pode comprometer a unicidade da solução do PARAFAC, potencialmente levando a resultados degenerados [3]. Em contraste, os conjuntos de dados obtidos variando o tempo de pulso mostram perfis de tempo de pulso distintos para ambos os fatores, como visto na Fig. 35 (b.ii), indicando diferentes sensibilidades às mudanças no tempo de pulso entre os grupos SC.

Esse comportamento pode estar relacionado às diferentes maneiras que a DPV responde a mudanças na amplitude e no tempo de pulso. Aumentar a amplitude aumenta o sobrepotencial e, conseqüentemente, a corrente; no entanto, esse aumento depende não apenas da mudança de amplitude, mas também da difusão do

analito em direção ao eletrodo. Os coeficientes de difusão dos SCs medidos podem ser considerados suficientemente semelhantes, devido ao seu tamanho e propriedades físicas comparáveis, dificultando a distinção das variações de intensidade do sinal em função da amplitude. Em contraste, as mudanças no tempo de pulso afetam o sinal, através de seu efeito na extensão das reações na superfície do eletrodo. Essa característica pode explicar os distintos perfis de tempo de pulso observados para cada fator. Se diferentes SCs com os mesmos centros eletroativos exibirem cinética suficientemente semelhante, eles podem ser agrupados, o que é consistente com os resultados da modelagem que vinculam o perfil de cada fator a um centro eletroativo específico ou a uma combinação deles.

Os efeitos desses comportamentos também se refletem nas figuras de mérito de cada modelo. Conjuntos de dados com variações de tempo de pulso produziram consistentemente valores CORCONDIA mais altos, com o conjunto de dados pré-tratados atingindo o valor mais alto. Os valores de mérito para os quatro modelos PARAFAC podem ser vistos na Tabela 13.

Tabela 13: Valores de mérito para a deconvolução por PARAFAC das DPV 3D de canabinoides sintéticos com mudanças de amplitude e tempo de pulso.

	DPV 3D (Amplitude)		DPV 3D (Tempo)	
	Bruto	Pré-tratado	Bruto	Pré-tratado
Iterações	51	18	29	23
s_{fit}	$1,1 \times 10^{-5}$	$9,2 \times 10^{-6}$	$1,0 \times 10^{-5}$	$7,6 \times 10^{-6}$
CORCONDIA	58,6	37,8	74,0	85,6
Var. Explicada	97,7%	93,0%	96,5%	92,6%

Usando o modo A do PARAFAC, que representa os coeficientes de intensidade através das amostras para cada fator, pode-se plotar um fator contra o outro para ver a distribuição das diferentes amostras. Adicionalmente, usando a distribuição de brancos como referência, foram traçadas linhas delimitando a região em cada direção a partir da qual cada amostra é estatisticamente diferente de um branco naquela dada direção ($\mu + st_{.95}$ unicaudal). O resultado desses gráficos pode ser visto na Fig. 36, com as amostras sendo indicadas de acordo com sua composição.

A aplicação dessa metodologia aos dados deconvoluídos permitiu avaliar a eficácia de cada abordagem. As DPVs 3D baseadas em variação de tempo de pulso pré-tratadas produziram os melhores resultados se considerar a correta classificação das amostras feitas em laboratório, com baixos escores de F2, com apenas 2 das 69 medições classificadas incorretamente, ambas sendo amostras de rua: um falso positivo (uma amostra de CB30) e um falso-negativo (uma amostra de CB16) para F2; embora ambos fossem verdadeiros positivos para F1, como visto na Fig.

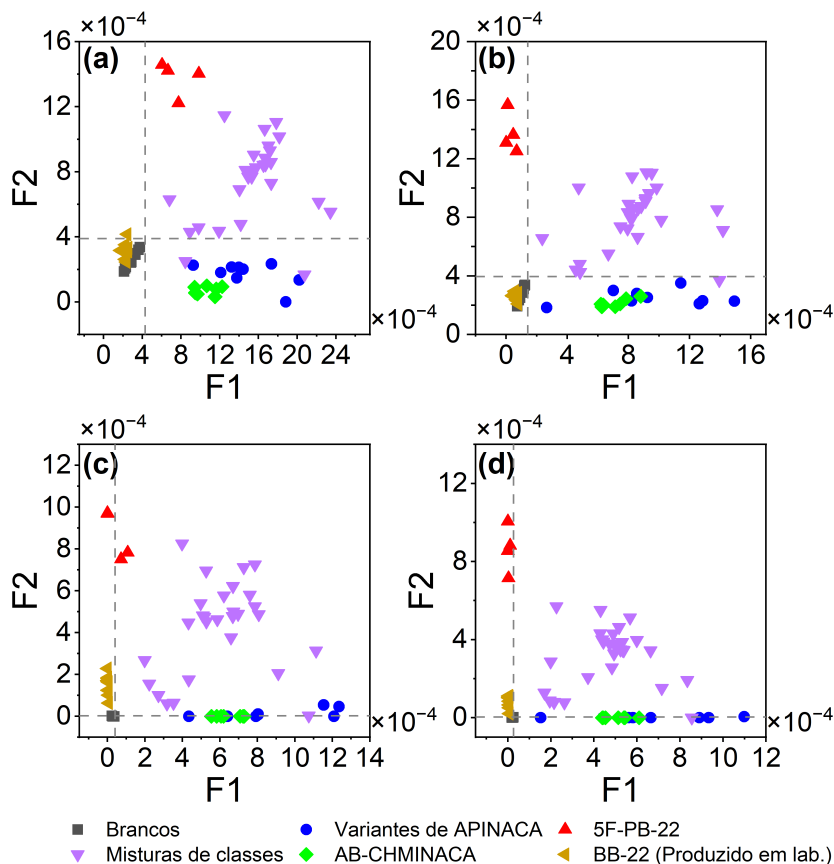


Figura 36: Projeção usando os dois escores do modo A da deconvolução dos voltamogramas 3D por PARAFAC obtidos pelo (a,c) método A' e (b,d) B', (c,d) com e (a,b) sem pré-tratamento.

36 (d). Considerando apenas amostras de rua, os melhores resultados foram obtidos com as DPVs 3D com mudança de tempo de pulso sem pré-tratamento, com apenas um falso-negativo para F2 (uma amostra de CB16) como visto na Fig. 36 (b).

Apesar de o pré-tratamento aparentemente melhorar a sensibilidade da metodologia a amostras com sinais mais baixos de F2 (como no caso das amostras feitas em laboratório), o seu efeito na distribuição dos escores das amostras negativas, cujos desvios foram reduzidos drasticamente, levou a uma subestimação da linha de decisão adequada com a metodologia escolhida, resultando no falso-positivo adicional.

Os modelos baseados em mudanças de amplitude produziram resultados insatisfatórios, sendo imprecisos no sentido de F1. Este resultado é consistente com os

mostrados na Fig. 36 e Tab.13, indicando que o modelo construído usando DPVs com mudanças de tempo de pulso recuperou com mais precisão os perfis esperados enquanto alcançava métricas de desempenho superiores.

Os resultados do modelo de classificação usando o conjunto de dados com variações de tempo de pulso sem pré-tratamento pode ser encontrada na Tabela 14, considerando apenas amostras de rua e brancos para evitar vieses, excluindo assim amostras feitas em laboratório. O modelo mostrou uma precisão de classificação de 98,3% para o conjunto de dados medido.

Tabela 14: Tabela de erros para o modelo de classificação usando o conjunto de dados DPV 3D não pré-tratado com alterações de tempo de pulso e PARAFAC.

Resultado	Fator 1	Fator 2
Verdadeiro Positivo	44 (73,3%)	31 (51,7%)
Verdadeiro Negativo	16 (26,7%)	28 (46,7%)
Falso Positivo	0 (0,0%)	0 (0,0%)
Falso Negativo	0 (0,0%)	1 (1,7%)
Total de Verdadeiros	60 (100%)	59 (98,3%)
Total de Falsos	0 (0,0%)	1 (1,7%)

Além da maior robustez à presença de interferentes, uma das vantagens desse tipo de projeção com PARAFAC é que cada eixo está (idealmente) relacionado com um único composto ou grupo de compostos. Isso permite que a presença de cada um desses possa ser avaliada independentemente, mesmo sem a utilização de concentrações de referência, uma vez que o coeficiente de sinal estaria correlacionado com esse valor e pode ser diferenciada de amostras negativas baseado nesse valor. Um outro aspecto é que isso evita o aumento desnecessário de complexidade envolvido na criação de modelos de classificação para cada subgrupo, ou mesmo a criação incidental de modelos enviesados a um subgrupo específico, o que poderia resultar em amostras positivas para ambos os analitos independentemente sendo identificadas como fora do grupo. Apesar de a metodologia descrita anteriormente necessitar de uma medição mais longa, a interpretação dos dados deconvoluídos é mais simples e os perfis puros dos canabinoides são recuperados. Adicionalmente, uma análise posterior revelou que a resolução do tempo de pulso poderia ser reduzida pela metade, mantendo o desempenho preditivo; Especificamente, com os tempos de pulso mudando de 10 para 90 ms em etapas de 20 ms. Considerando isso e medindo apenas a região que foi utilizada, mais 100 mV no início, o tempo de medição pode ser reduzido de 329 s para 86 s, uma redução de 74%.

6.3.3 Observações na expansão do modelo

Embora a metodologia proposta tenha obtido sucesso como um projeto piloto para triagem de SCs, a adição futura de uma gama mais ampla de SCs pode ajudar a avaliar sua robustez e aplicabilidade. Devido à vantagem de segunda ordem, os modelos PARAFAC tendem a ser naturalmente expansíveis, desde que os requisitos para isso permaneçam válidos. Mais especificamente: se o conjunto de dados permanecer trilinear, um número apropriado de fatores é usado e as condições de unicidade são obedecidas (com a condição de Kruskal generalizada sendo comumente usada) [107, 108]. Dessa forma, parâmetros como o CORCONDIA e a comparação dos perfis instrumentais obtidos e amostras já conhecidas permitem avaliar a validade do modelo com a expansão.

Embora se espere que a contribuição do sinal de diferentes SCs com os mesmos centros eletroativos seja modelada pelos fatores já mencionados, diferentes SCs podem exigir um aumento no número de fatores para modelá-los separadamente. Um caso especialmente interessante que infelizmente este trabalho não pôde cobrir com as amostras disponíveis é a medição de SCs com o grupo indol, porém sem a quinolina. Espera-se que essa adição quebre a colinearidade no sentido das amostras de ambos os picos em F2, provavelmente levando à separação das contribuições de ambas as porções em dois fatores diferentes. Mesmo reações como as descritas por Ameen *et al* [97] seriam capazes de quebrar essa colinearidade, com a modelagem permitindo a identificação dos centros eletroativos separadamente. No entanto, embora esses comentários sejam baseados em observações anteriores de diferentes autores [96] e nas propriedades de decomposições trilineares e PARAFAC [3, 109, 110], a hipótese levantada deve ser avaliada experimentalmente para ser confirmada ou negada.

6.4 Conclusões e perspectivas

O desenvolvimento de uma metodologia de segunda-ordem para triagem e detecção de 5F-AKB48, AKB48, AB-CHMINACA, 5F-PB-22 e BB-22 em amostras herbais de rua usando voltametria de pulso diferencial tridimensional com variações de tempo de pulso e PARAFAC foi bem-sucedido. Essa abordagem classificou corretamente mais de 95% das amostras de rua testadas, enquanto os modelos baseados em variações de amplitude de pulso se mostraram inadequados. O modelo detectou a presença das moléculas-alvo com base em dois fatores distintos: um correspondendo a SCs baseadas em indazoles (F1) e outro aos SCs baseadas em indoloato de quinolina (F2). As SCs representadas por F1 foram classificadas corretamente em 100% dos casos, e as representadas por F2 foram classificadas corretamente em 98,3% dos casos, com um falso negativo para F2 (1,7%).

Em um contexto no qual novos canabinóides sintéticos são continuamente desenvolvidos, geralmente como pequenas variações em moléculas estabelecidas, a detecção de grupos moleculares pode melhorar a aplicação prática da metodologia de triagem. Associada à vantagem de segunda ordem do método, aumentando a robustez contra a presença de componentes inesperados, a detecção de compostos semelhantes com perfis voltamétricos tridimensionais compatíveis pode potencialmente ser feita rapidamente em campo, sendo posteriormente confirmada por cromatografia em um laboratório. Os requisitos da metodologia experimental provêm um estudo piloto que pode levar ao desenvolvimento futuro de um protocolo de medição com alta usabilidade por forças policiais, especialmente se a aplicação de eletrodos de uso único e a classificação automatizada pelo modelo puderem ser realizadas. Associar isso ao baixo custo e requisitos de energia de potenciostatos portáteis seria uma maneira prática de realizar a triagem de campo de canabinóides sintéticos em amostras herbais. Para aplicações mais amplas, recomenda-se expandir os conjuntos de dados para incluir uma gama mais ampla de moléculas, dentro e fora desses grupos, para avaliar ainda mais a robustez e a aplicabilidade.

O trabalho e os resultados dessa seção foram publicados na *Microchemical Journal* na edição de Outubro de 2025 [111], com os dados brutos sendo abertamente disponíveis em um repositório Mendeley Data [112].

7 Considerações finais

Grande parte da inovação na área de dados de ordem superior se encontra no desenvolvimento de métodos para obtenção e processamento desses dados. A combinação de diferentes sensores, uso de técnicas hífenadas, assim como o avanço tecnológico melhorando técnicas existentes tem o potencial de permitir o desenvolvimento de métodos capazes de obter mais e mais informação a partir de amostras. Claro, cada uma dessas possuindo suas próprias idiossincrasias, com estudos das estruturas de dados obtidas sendo necessários para determinar suas propriedades e decidir como extrair informação quimicamente relevante das mesmas.

Nesse trabalho, as três abordagens propostas obtiveram resultados interessantes, seja permitindo a deconvolução de sinais em sistemas com compostos altamente correlacionados no caso da primeira, explorando as propriedades e mostrando o potencial do uso de impedância multivias em análises quantitativas na segunda, e explorando diferentes estratégias para o uso de voltametria 3D em aplicações forenses na terceira, mas também permitiram entender melhor suas propriedades e as limitações de suas aplicações.

Em conclusão, esse estudo permitiu tanto a exploração de novas metodologias para obtenção e tratamento de dados de ordem superior a partir de técnicas eletroquímicas e espectroeletroquímicas, quanto aprofundar o entendimento de diferentes aspectos práticos do uso dessas, explorando tanto dados de segunda e terceira-ordem, avaliando a aplicabilidade desse tipo de técnica em matrizes complexas e incluindo o desenvolvimento de aplicações práticas dessas em contextos clínicos e forenses, oferecendo também perspectivas de expansão futura de aspectos desse trabalho.

Referências

- [1] A. C. Olivieri e G. M. Escandar, “Chapter 1 - Calibration Scenarios,” em *Practical Three-Way Calibration*, A. C. Olivieri e G. M. Escandar, ed., Boston: Elsevier, 2014, pp. 1–9, ISBN: 978-0-12-410408-2. DOI: 10.1016/B978-0-12-410408-2.00001-6
- [2] A. C. Olivieri e G. M. Escandar, “Chapter 2 - Data Properties,” em *Practical Three-Way Calibration*, Elsevier, 2014, pp. 11–26. DOI: 10.1016/B978-0-12-410408-2.00002-8
- [3] R. Bro, “PARAFAC. Tutorial and applications,” *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, v. 38, pp. 149–171, 1997, ISSN: 0169-7439. DOI: 10.1016/S0169-7439(97)00032-4
- [4] R. Tauler, “Multivariate curve resolution applied to second order data,” *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, v. 30, pp. 133–146, 1995, ISSN: 0169-7439. DOI: 10.1016/0169-7439(95)00047-X
- [5] A. R. Jalalvand, H. C. Goicoechea e D. N. Rutledge, “Applications and challenges of multi-way calibration in electrochemical analysis,” *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, v. 87, pp. 32–48, 2017, ISSN: 0165-9936. DOI: 10.1016/j.trac.2016.11.002
- [6] A. R. Jalalvand, “Four-dimensional voltammetry: An efficient strategy for simultaneous determination of ascorbic acid and uric acid in the presence of dopamine as uncalibrated interference,” *Sensing and Bio-Sensing Research*, v. 28, p. 100330, 2020. DOI: 10.1016/j.sbsr.2020.100330
- [7] A. Herrero, S. Zamponi, R. Marassi, P. Conti, M. Ortiz e L. Sarabia, “Determination of the capability of detection of a hyphenated method: application to spectroelectrochemistry,” *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, v. 61, pp. 63–74, 2002, ISSN: 0169-7439. DOI: 10.1016/S0169-7439(01)00174-5
- [8] J. Garoz-Ruiz, C. Guillen-Posteguillo, A. Colina e A. Heras, “Application of spectroelectroanalysis for the quantitative determination of mixtures of compounds with highly overlapping signals,” *Talanta*, v. 195, pp. 815–821, 2019, ISSN: 0039-9140. DOI: 10.1016/j.talanta.2018.12.002
- [9] H. Wu, Y. Li e R. Yu, “Recent developments of chemical multiway calibration methodologies with second-order or higher-order advantages,” *Journal of Chemometrics*, v. 28, pp. 476–489, 2013, ISSN: 1099-128X. DOI: 10.1002/cem.2570

- [10] M. D. Carabajal, J. A. Arancibia e G. M. Escandar, “Excitation-emission fluorescence-kinetic data obtained by Fenton degradation. Determination of heavy-polycyclic aromatic hydrocarbons by four-way parallel factor analysis,” *Talanta*, v. 165, pp. 52–63, 2017. DOI: 10.1016/j.talanta.2016.12.030
- [11] X.-H. Zhang, X.-D. Qing e H.-L. Wu, “Discussion on the superiority of third-order advantage: Analytical application for four-way data in complex system,” *Microchemical Journal*, v. 145, pp. 1078–1085, 2019, ISSN: 0026-265X. DOI: 10.1016/j.microc.2018.12.037
- [12] Y. Zhai, Z. Zhu, S. Zhou, C. Zhu e S. Dong, “Recent advances in spectro-electrochemistry,” *Nanoscale*, v. 10, pp. 3089–3111, 2018, ISSN: 2040-3372. DOI: 10.1039/c7nr07803j
- [13] J. Garoz-Ruiz, J. V. Perales-Rondon, A. Heras e A. Colina, “Spectroelectrochemical Sensing: Current Trends and Challenges,” *Electroanalysis*, v. 31, pp. 1254–1278, 2019, ISSN: 1521-4109. DOI: 10.1002/elan.201900075
- [14] D. Bizzotto, “In situ spectroelectrochemical fluorescence microscopy for studying electrodes modified by molecular adsorbates,” *Current Opinion in Electrochemistry*, v. 7, pp. 161–171, 2018, ISSN: 2451-9103. DOI: 10.1016/j.coelec.2017.11.019
- [15] L. León e J. Mozo, “Designing spectroelectrochemical cells: A review,” *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, v. 102, pp. 147–169, 2018, ISSN: 0165-9936. DOI: 10.1016/j.trac.2018.02.002
- [16] M. Kooshki, H. Abdollahi, S. Bozorgzadeh e B. Haghighi, “Second-order data obtained from differential pulse voltammetry: Determination of tryptophan at a gold nanoparticles decorated multiwalled carbon nanotube modified glassy carbon electrode,” *Electrochimica Acta*, v. 56, pp. 8618–8624, 2011, ISSN: 0013-4686. DOI: 10.1016/j.electacta.2011.07.049
- [17] P. Aberg, “Electronic Biopsis—Applications and Data Analysis,” tese de dout., Karolinska Instituteten, Stockholm, Suécia, 2002.
- [18] D. R. Rodrigues, A. C. Olivieri, W. D. Fragoso e S. G. Lemos, “Complex numbers-partial least-squares applied to the treatment of electrochemical impedance spectroscopy data,” *Analytica Chimica Acta*, v. 1080, pp. 1–11, 2019, ISSN: 0003-2670. DOI: 10.1016/j.aca.2019.07.047
- [19] M. Cortina-Puig, X. Muñoz-Berbel, M. del Valle, F. J. Muñoz e M. A. Alonso-Lomillo, “Characterization of an ion-selective polypyrrole coating and application to the joint determination of potassium, sodium and ammonium by electrochemical impedance spectroscopy and partial least squares

- method,” *Analytica Chimica Acta*, v. 597, pp. 231–237, 2007, ISSN: 0003-2670. DOI: 10.1016/j.aca.2007.07.005
- [20] R. Masot et al., “Design of a low-cost non-destructive system for punctual measurements of salt levels in food products using impedance spectroscopy,” *Sensors and Actuators A: Physical*, v. 158, pp. 217–223, 2010, ISSN: 0924-4247. DOI: 10.1016/j.sna.2010.01.010
- [21] E. Serrano-Pallicer, M. Muñoz-Albero, C. Pérez-Fuster, R. M. Peris e N. Laguarda-Miró, “Early Detection of Freeze Damage in Navelate Oranges with Electrochemical Impedance Spectroscopy,” *Sensors*, v. 18, p. 4503, 2018, ISSN: 1424-8220. DOI: 10.3390/s18124503
- [22] J. Öhman, P. Geladi e S. Wold, “Residual bilinearization. Part 1: Theory and algorithms,” *Journal of Chemometrics*, v. 4, pp. 79–90, 1990, ISSN: 0886-9383. DOI: 10.1002/cem.1180040109
- [23] R. Bro, “Multiway calibration. Multilinear PLS,” *Journal of Chemometrics*, v. 10, pp. 47–61, 1996, ISSN: 0886-9383. DOI: 10.1002/(SICI)1099-128X(199601)10:1<47::AID-CEM400>3.0.CO;2-C
- [24] C. D. Silva, P. G. Corradini, L. H. Mascaro, S. Lemos e E. C. Pereira, “Using a multiway chemometric tool in the evaluation of methanol electro-oxidation mechanism,” *Journal of Electroanalytical Chemistry*, v. 855, p. 113598, 2019. DOI: 10.1016/j.jelechem.2019.113598
- [25] A. Osorio, C. Toledo-Neira e M. A. Bravo, “Critical evaluation of third-order advantage with highly overlapped spectral signals. Determination of fluoroquinolones in fish-farming waters by fluorescence spectroscopy coupled to multivariate calibration,” *Talanta*, v. 204, pp. 438–445, 2019. DOI: 10.1016/j.talanta.2019.06.048
- [26] J. B. Kruskal, R. A. Harshman e M. E. Lundy, “How 3-MFA data can cause degenerate PARAFAC solutions, among other relationships,” em *Multiway Data Analysis*. NLD: North-Holland Publishing Co., Amsterdã, Holanda, 1989, pp. 115–122, ISBN: 0444874100.
- [27] R. Harshman, “Foundations of the PARAFAC procedure: Models and conditions for an “explanatory” multi-model factor analysis,” *UCLA Working Papers in Phonetics*, v. 16, pp. 1–84, 1970.
- [28] H. A. L. Kiers, J. M. F. ten Berge e R. Bro, “PARAFAC2 — Part I. A direct fitting algorithm for the PARAFAC2 model,” *Journal of Chemometrics*, v. 13, pp. 275–294, 1999. DOI: 10.1002/(sici)1099-128x(199905/08)13:3/4<275::aid-cem543>3.0.co;2-b

- [29] R. Bro, C. A. Andersson e H. A. L. Kiers, “PARAFAC2 — Part II. Modeling chromatographic data with retention time shifts,” *Journal of Chemometrics*, v. 13, pp. 295–309, 1999, ISSN: 1099-128X. DOI: 10.1002/(sici)1099-128x(199905/08)13:3/4<295::aid-cem547>3.0.co;2-y
- [30] H. Yu, R. Bro e N. B. Gallagher, “PARASIAS: A new method for analyzing higher-order tensors with shifting profiles,” *Analytica Chimica Acta*, v. 1238, p. 339 848, 2023. DOI: 10.1016/j.aca.2022.339848
- [31] I. Santana, M. Breitzkreitz e L. Pinto, “Multivariate Curve Resolution Alternating Least Squares applied to Chromatographic Data: From the Basics to the Recent Advances,” *Brazilian Journal of Analytical Chemistry*, v. 8, pp. 22–44, 2021. DOI: 10.30744/brjac.2179-3425.rv-30-2021
- [32] J. Jaumot e R. Tauler, “MCR-BANDS: A user friendly MATLAB program for the evaluation of rotation ambiguities in Multivariate Curve Resolution,” *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, v. 103, pp. 96–107, 2010. DOI: 10.1016/j.chemolab.2010.05.020
- [33] R. Tauler, “Multivariate curve resolution of multiway data using the multilinearity constraint,” *Journal of Chemometrics*, v. 35, e3279, 2020. DOI: 10.1002/cem.3279
- [34] M. D. Carabajal, J. A. Arancibia e G. M. Escandar, “Multivariate curve resolution strategy for non-quadrilinear type 4 third-order/four way liquid chromatography–excitation-emission fluorescence matrix data,” *Talanta*, v. 189, pp. 509–516, 2018. DOI: 10.1016/j.talanta.2018.07.017
- [35] G. M. Escandar, A. C. Olivieri, N. K. M. Faber, H. C. Goicoechea, A. M. de la Peña e R. J. Poppi, “Second- and third-order multivariate calibration: data, algorithms and applications,” *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, v. 26, pp. 752–765, 2007. DOI: 10.1016/j.trac.2007.04.006
- [36] A. C. Olivieri, “On a versatile second-order multivariate calibration method based on partial least-squares and residual bilinearization: Second-order advantage and precision properties,” *Journal of Chemometrics*, v. 19, pp. 253–265, 2005, ISSN: 0886-9383. DOI: 10.1002/cem.927
- [37] M. B. Anzardi, J. A. Arancibia e A. C. Olivieri, “Using chemometric tools to investigate the quality of three- and four-way liquid chromatographic data obtained with two different fluorescence detectors and applied to the determination of quinolone antibiotics in animal tissues,” *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, v. 199, p. 103 972, 2020. DOI: 10.1016/j.chemolab.2020.103972

- [38] A. C. Olivieri, “Analytical Advantages of Multivariate Data Processing. One, Two, Three, Infinity?” *Analytical Chemistry*, v. 80, pp. 5713–5720, 2008, ISSN: 0003-2700. DOI: 10.1021/ac800692c
- [39] N. González-Diéguez, A. Colina, J. López-Palacios e A. Heras, “Spectroelectrochemistry at Screen-Printed Electrodes: Determination of Dopamine,” *Analytical Chemistry*, v. 84, pp. 9146–9153, 2012, ISSN: 0003-2700. DOI: 10.1021/ac3018444
- [40] M. Pfaffeneder-Kmen, I. F. Casas, A. Naghilou, G. Trettenhahn e W. Kautek, “A Multivariate Curve Resolution evaluation of an in-situ ATR-FTIR spectroscopy investigation of the electrochemical reduction of graphene oxide,” *Electrochimica Acta*, v. 255, pp. 160–167, 2017, ISSN: 0013-4686. DOI: 10.1016/j.electacta.2017.09.124
- [41] C. D. Silva, P. G. Corradini, L. H. Mascaro, S. Lemos e E. C. Pereira, “Using a multiway chemometric tool in the evaluation of methanol electro-oxidation mechanism,” *Journal of Electroanalytical Chemistry*, v. 855, p. 113 598, 2019, ISSN: 1572-6657. DOI: 10.1016/j.jelechem.2019.113598
- [42] R. P. Nikolajsen, A. M. Hansen e R. Bro, “Attempt to separate the fluorescence spectra of adrenaline and noradrenaline using chemometrics,” *Luminescence*, v. 16, pp. 91–101, 2001, ISSN: 1522-7243. DOI: 10.1002/bio.637
- [43] A. C. Olivieri e G. M. Escandar, “Chapter 11 - Third-order/Four-way Calibration and Beyond,” em *Practical Three-Way Calibration*, Elsevier, 2014, pp. 217–232. DOI: 10.1016/b978-0-12-410408-2.00011-9
- [44] Metrohm, “NOVA External Devices Tutorial,” v1.11.0, 2014.
- [45] Atmel Corporation, “ATMEGA16U4/ATMEGA32U4 Datasheet - 8-bit AVR® Microcontroller with 16/32K Bytes of ISP Flash and USB Controller,” 2016. endereço: https://ww1.microchip.com/downloads/en/devicedoc/atmel-7766-8-bit-avr-atmega16u4-32u4_datasheet.pdf
- [46] A. C. Olivieri, H.-L. Wu e R.-Q. Yu, “MVC3: A MATLAB graphical interface toolbox for third-order multivariate calibration,” *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, v. 116, pp. 9–16, 2012, ISSN: 0169-7439. DOI: 10.1016/j.chemolab.2012.03.018
- [47] A. C. Olivieri, H.-L. Wu e R.-Q. Yu, “MVC2: A MATLAB graphical interface toolbox for second-order multivariate calibration,” *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, v. 96, pp. 246–251, 2009. DOI: 10.1016/j.chemolab.2009.02.005

- [48] M. J. Culzoni et al., “Second-order advantage from kinetic-spectroscopic data matrices in the presence of extreme spectral overlapping. A multivariate curve resolution-Alternating least-squares approach,” *Analytica Chimica Acta*, v. 614, pp. 46–57, 2008, ISSN: 0003-2670. DOI: 10.1016/j.aca.2008.03.013
- [49] F. A. Chiappini, L. Pinto, M. R. Alcaraz, N. Omidikia, H. C. Goicoechea e A. C. Olivieri, “Multivariate curve resolution-alternating least-squares and second-order advantage in first-order calibration. A systematic characterisation for three-component analytical systems,” *Analytica Chimica Acta*, v. 1328, p. 343 159, 2024, ISSN: 0003-2670. DOI: 10.1016/j.aca.2024.343159
- [50] I. G. B. de Lima Cruz, J. S. da Silva e S. G. Lemos, “Simultaneous determination of triclosan, 2, 4-dichlorophenol and 4-chlorocatechol in water by three-dimensional voltammetry and multiway calibration,” *Microchemical Journal*, v. 214, p. 114 001, 2025, ISSN: 0026-265X. DOI: 10.1016/j.microc.2025.114001
- [51] A. C. Olivieri, “A down-to-earth analyst view of rotational ambiguity in second-order calibration with multivariate curve resolution - a tutorial,” *Analytica Chimica Acta*, v. 1156, p. 338 206, 2021, ISSN: 1873-4324. DOI: 10.1016/j.aca.2021.338206
- [52] H. S. Magar, R. Y. A. Hassan e A. Mulchandani, “Electrochemical Impedance Spectroscopy (EIS): Principles, Construction, and Biosensing Applications,” *Sensors*, v. 21, p. 6578, 2021, ISSN: 1424-8220. DOI: 10.3390/s21196578
- [53] IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans e International Agency for Research on Cancer, *Pharmaceutical drugs*. IARC, 1990, p. 415, ISBN: 9283212509.
- [54] F. Pirvu, C. I. Covaliu-Mierlă e G. A. Catrina, “Removal of Acetaminophen Drug from Wastewater by Fe₃O₄ and ZSM-5 Materials,” *Nanomaterials*, v. 13, p. 1745, 2023, ISSN: 2079-4991. DOI: 10.3390/nano13111745
- [55] G. UB e N. A. Tadvi, “Paracetamol Toxicity: A Review,” *Journal of Contemporary Medicine and Dentistry*, v. 2, pp. 12–15, 2014, ISSN: 2347-4513. DOI: 10.18049/jcmad/232
- [56] T. I. S. Agnihotri, “Paracetamol Toxicity - An Overview,” *Emergency Medicine: Open Access*, v. 03, 2013, ISSN: 2165-7548. DOI: 10.4172/2165-7548.1000158

- [57] S. G. Lemos e J. Gonzalez-Rodriguez, “Three-dimensional voltammetry: Use of chronoamperometric E-t-i data to achieve second-order advantage,” *Analytica Chimica Acta*, v. 1132, pp. 36–46, 2020. DOI: 10.1016/j.aca.2020.07.062
- [58] K. Shang, S. Wang, S. Chen e X. Wang, “Sensitivity Detection of Uric Acid and Creatinine in Human Urine Based on Nanoporous Gold,” *Biosensors*, v. 12, p. 588, 2022, ISSN: 2079-6374. DOI: 10.3390/bios12080588
- [59] B. Patella et al., “Electrochemical detection of dopamine with negligible interference from ascorbic and uric acid by means of reduced graphene oxide and metals-NPs based electrodes,” *Analytica Chimica Acta*, v. 1187, p. 339 124, 2021, ISSN: 0003-2670. DOI: 10.1016/j.aca.2021.339124
- [60] B. Avinash et al., “Nano CuO: Electrochemical sensor for the determination of paracetamol and d-glucose,” *Journal of Physics and Chemistry of Solids*, v. 134, pp. 193–200, 2019, ISSN: 0022-3697. DOI: 10.1016/j.jpics.2019.06.012
- [61] N. F. Atta, A. Galal, F. M. Abu-Attia e S. M. Azab, “Simultaneous determination of paracetamol and neurotransmitters in biological fluids using a carbon paste sensor modified with gold nanoparticles,” *Journal of Materials Chemistry*, v. 21, p. 13 015, 2011, ISSN: 0959-9428. DOI: 10.1039/c1jm11795e
- [62] H. E. Ouafy, T. E. Ouafy, M. Oubenali, M. Mbarki e M. Echajia, “Evaluation Of Carbon Paste Electrode Modified With Heavy Metals For The Analysis Of Paracetamol By Voltammetry And Impedance Spectroscopy,” *Methods and Objects of Chemical Analysis*, v. 15, pp. 93–99, 2020, ISSN: 2413-6166. DOI: 10.17721/moca.2020.93-99
- [63] W. Boumya, M. Achak, M. Bakasse e M. E. Mhammedi, “Indirect determination of dopamine and paracetamol by electrochemical impedance spectroscopy using azo coupling reaction with oxidized 2,4-dinitrophenylhydrazine (DNPH): Application in commercial tablets,” *Journal of Science: Advanced Materials and Devices*, v. 5, pp. 218–223, 2020, ISSN: 2468-2179. DOI: 10.1016/j.jsamd.2020.04.003
- [64] K. Z. Farahani et al., “Potentiality of PARAFAC approaches for simultaneous determination of N-acetylcysteine and acetaminophen based on the second-order data obtained from differential pulse voltammetry,” *Talanta*, v. 192, pp. 439–447, 2019, ISSN: 0039-9140. DOI: 10.1016/j.talanta.2018.08.092

- [65] N. Chauhan, A. Kumar e C. S. Pundir, “Construction of an Uricase Nanoparticles Modified Au Electrode for Amperometric Determination of Uric Acid,” *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 174, pp. 1683–1694, 2014, ISSN: 1559-0291. DOI: 10.1007/s12010-014-1097-6
- [66] D. F. Putnam e McDonnell Douglas Astronautics Company - Western Division, “Composition and concentrative properties of human urine,” NASA, Washington D.C., Estados Unidos, 1971, pp. 39–40.
- [67] P. H. C. Eilers, “Parametric Time Warping,” *Analytical Chemistry*, v. 76, pp. 404–411, 2004, ISSN: 0003-2700. DOI: 10.1021/ac034800e
- [68] C. A. Andersson e R. Bro, “The N-way Toolbox for MATLAB,” *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, v. 52, pp. 1–4, 2000. DOI: 10.1016/S0169-7439(00)00071-X
- [69] F. Allegrini e A. C. Olivieri, “IUPAC-Consistent Approach to the Limit of Detection in Partial Least-Squares Calibration,” *Analytical Chemistry*, v. 86, pp. 7858–7866, 2014, ISSN: 0003-2700. DOI: 10.1021/ac501786u
- [70] N. Laube, B. Mohr e A. Hesse, “Laser-probe-based investigation of the evolution of particle size distributions of calcium oxalate particles formed in artificial urines,” *Journal of Crystal Growth*, v. 233, pp. 367–374, 2001.
- [71] Advisory Council on the Misuse of Drugs, *ACMD Synthetic cannabinoid receptor agonists (SCRA) report*, 2020.
- [72] E. U. D. Agency, “Synthetic cannabinoids in Europe,” rel. técn., 2017. endereço: https://www.euda.europa.eu/publications/pods/synthetic-cannabinoids_en
- [73] C. M. White, “The Pharmacologic and Clinical Effects of Illicit Synthetic Cannabinoids,” *The Journal of Clinical Pharmacology*, v. 57, pp. 297–304, 2016, ISSN: 1552-4604. DOI: 10.1002/jcph.827
- [74] J. Alexandre, H. Carmo, F. Carvalho e J. P. Silva, “Synthetic cannabinoids and their impact on neurodevelopmental processes,” *Addiction Biology*, v. 25, e12824, 2020, ISSN: 1369-1600. DOI: 10.1111/adb.12824
- [75] I. Canazza et al., “Effect of the novel synthetic cannabinoids AKB48 and 5F-AKB48 on “tetrad”, sensorimotor, neurological and neurochemical responses in mice. In vitro and in vivo pharmacological studies,” *Psychopharmacology*, v. 233, pp. 3685–3709, 2016, ISSN: 1432-2072. DOI: 10.1007/s00213-016-4402-y

- [76] K. Duke, H. Gleeson, S. MacGregor e B. Thom, “The risk matrix: Drug-related deaths in prisons in England and Wales, 2015-2020,” *Journal of Community Psychology*, v. 52, pp. 1056–1077, 2023, ISSN: 1520-6629. DOI: 10.1002/jcop.22989
- [77] B. Moosmann, V. Angerer e V. Auwärter, “Inhomogeneities in herbal mixtures: a serious risk for consumers,” *Forensic Toxicology*, v. 33, pp. 54–60, 2015, ISSN: 1860-8973. DOI: 10.1007/s11419-014-0247-4
- [78] S. D. Banister et al., “Pharmacology of Indole and Indazole Synthetic Cannabinoid Designer Drugs AB-FUBINACA, ADB-FUBINACA, AB-PINACA, ADB-PINACA, 5F-AB-PINACA, 5F-ADB-PINACA, ADBICA, and 5F-ADBICA,” *ACS Chemical Neuroscience*, v. 6, pp. 1546–1559, 2015, ISSN: 1948-7193. DOI: 10.1021/acscchemneuro.5b00112
- [79] A. Shafi, A. J. Berry, H. Sumnall, D. M. Wood e D. K. Tracy, “New psychoactive substances: a review and updates,” *Therapeutic Advances in Psychopharmacology*, v. 10, 2020, ISSN: 2045-1261. DOI: 10.1177/2045125320967197
- [80] S. D. Banister et al., “Effects of Bioisosteric Fluorine in Synthetic Cannabinoid Designer Drugs JWH-018, AM-2201, UR-144, XLR-11, PB-22, 5F-PB-22, APICA, and STS-135,” *ACS Chemical Neuroscience*, v. 6, pp. 1445–1458, 2015, ISSN: 1948-7193. DOI: 10.1021/acscchemneuro.5b00107
- [81] N. Uchiyama, S. Matsuda, D. Wakana, R. Kikura-Hanajiri e Y. Goda, “New cannabimimetic indazole derivatives, N-(1-amino-3-methyl-1-oxobutan-2-yl)-1-pentyl-1H-indazole-3-carboxamide (AB-PINACA) and N-(1-amino-3-methyl-1-oxobutan-2-yl)-1-(4-fluorobenzyl)-1H-indazole-3-carboxamide (AB-FUBINACA) identified as designer drugs in illegal products,” em *Forensic Toxicology*, vol. 31, 2013, pp. 93–100. DOI: 10.1007/s11419-012-0171-4
- [82] A. Namera, M. Kawamura, A. Nakamoto, T. Saito e M. Nagao, “Comprehensive review of the detection methods for synthetic cannabinoids and cathinones,” *Forensic Toxicology*, v. 33, pp. 175–194, 2015, ISSN: 1860-8973. DOI: 10.1007/s11419-015-0270-0
- [83] L. Bijlsma et al., “Mass spectrometric identification and structural analysis of the third-generation synthetic cannabinoids on the UK market since the 2013 legislative ban,” *Forensic Toxicology*, v. 35, pp. 376–388, 2017, ISSN: 1860-8973. DOI: 10.1007/s11419-017-0368-7

- [84] N. Langer, R. Lindigkeit, H. M. Schiebel, U. Papke, L. Ernst e T. Beuerle, "Identification and quantification of synthetic cannabinoids in "spice-like" herbal mixtures: Update of the German situation for the spring of 2016," *Forensic Science International*, v. 269, pp. 31–41, 2016, ISSN: 1872-6283. DOI: 10.1016/j.forsciint.2016.10.023
- [85] H. Choi et al., "Simultaneous analysis of synthetic cannabinoids in the materials seized during drug trafficking using GC-MS," *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, v. 405, pp. 3937–3944, 2013, ISSN: 1618-2650. DOI: 10.1007/s00216-012-6560-z
- [86] L. A. Ciolino, "Quantitation of Synthetic Cannabinoids in Plant Materials Using High Performance Liquid Chromatography with UV Detection (Validated Method)," *Journal of Forensic Sciences*, v. 60, pp. 1171–1181, 2015, ISSN: 1556-4029. DOI: 10.1111/1556-4029.12795
- [87] G. Merola et al., "Analysis of synthetic cannabinoids in herbal blends by means of nano-liquid chromatography," *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 71, pp. 45–53, 2012, ISSN: 0731-7085. DOI: 10.1016/j.jpba.2012.08.008
- [88] W. C. Rodrigues, P. Catbagan, S. Rana, G. Wang e C. Moore, "Detection of synthetic cannabinoids in oral fluid using ELISA and LC-MS-MS," *Journal of Analytical Toxicology*, v. 37, pp. 526–533, 2013, ISSN: 0146-4760. DOI: 10.1093/jat/bkt067
- [89] D. Merli, E. Lio, S. Protti, R. Coccia, A. Profumo e G. Alberti, "Molecularly Imprinted Polymer-based voltammetric sensor for amino acids/indazole derivatives synthetic cannabinoids detection," *Analytica Chimica Acta*, v. 1288, 2024, ISSN: 1873-4324. DOI: 10.1016/j.aca.2023.342151
- [90] S. Akgönüllü, D. Battal, M. S. Yalcin, H. Yavuz e A. Denizli, "Rapid and sensitive detection of synthetic cannabinoids JWH-018, JWH-073 and their metabolites using molecularly imprinted polymer-coated QCM nanosensor in artificial saliva," *Microchemical Journal*, v. 153, p. 104454, 2020, ISSN: 0026-265X. DOI: 10.1016/j.microc.2019.104454
- [91] D. Battal, S. Akgönüllü, M. S. Yalcin, H. Yavuz e A. Denizli, "Molecularly imprinted polymer based quartz crystal microbalance sensor system for sensitive and label-free detection of synthetic cannabinoids in urine," *Biosensors and Bioelectronics*, v. 111, pp. 10–17, 2018, ISSN: 0956-5663. DOI: 10.1016/j.bios.2018.03.055
- [92] T. Y. Sengel et al., "A Functional Platform for the Detection of JWH-073 as a Model for Synthetic Cannabinoids," *ChemElectroChem*, v. 5, pp. 1253–1258, 2018, ISSN: 2196-0216. DOI: 10.1002/ce1c.201800015

- [93] C. Durmus et al., “Catechol-Attached Polypeptide with Functional Groups as Electrochemical Sensing Platform for Synthetic Cannabinoids,” *ACS Applied Polymer Materials*, v. 2, pp. 172–177, 2020, ISSN: 2637-6105. DOI: 10.1021/acsapm.9b00730
- [94] D. S. Araújo et al., “Electrochemistry of 5F-MDMB-PICA synthetic cannabinoid using a boron-doped diamond electrode with short anodic-cathodic pretreatment: A simple screening method for application in forensic analysis,” *Electrochimica Acta*, v. 454, p. 142 356, 2023, ISSN: 0013-4686. DOI: 10.1016/j.electacta.2023.142356
- [95] S. Ren, J. Zeng, Z. Zheng e H. Shi, “Perspective and application of modified electrode material technology in electrochemical voltammetric sensors for analysis and detection of illicit drugs,” *Sensors and Actuators A: Physical*, v. 329, p. 112 821, 2021, ISSN: 0924-4247. DOI: 10.1016/j.sna.2021.112821
- [96] M. Dronova, E. Smolianitski e O. Lev, “Electrooxidation of New Synthetic Cannabinoids: Voltammetric Determination of Drugs in Seized Street Samples and Artificial Saliva,” *Analytical Chemistry*, v. 88, pp. 4487–4494, 2016, ISSN: 1520-6882. DOI: 10.1021/acs.analchem.6b00368
- [97] A. Ameen, K. Brown e L. Dennany, “Can synthetic cannabinoids be reliably screened with electrochemistry? An assessment of the ability to screen for synthetic cannabinoids STS-135 and BB-22 within a single sample matrix,” *Journal of Electroanalytical Chemistry*, v. 909, p. 116 141, 2022, ISSN: 1572-6657. DOI: 10.1016/j.jelechem.2022.116141
- [98] R. Kumar e V. Sharma, “Chemometrics in forensic science,” *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, v. 105, pp. 191–201, 2018, ISSN: 1879-3142. DOI: 10.1016/j.trac.2018.05.010
- [99] C. S. Silva, A. Braz e M. F. Pimentel, “Vibrational spectroscopy and chemometrics in forensic chemistry: Critical review, current trends and challenges,” *Journal of the Brazilian Chemical Society*, v. 30, pp. 2259–2290, 2019, ISSN: 1678-4790. DOI: 10.21577/0103-5053.20190140
- [100] C. D. Lima, L. C. Arantes, L. L. Machado, T. R. Paixão e W. T. dos Santos, “Synthetic Cathinones’ Comprehensive Screening and Classification by Voltammetric and Chemometric Analyses: A Powerful Method for On-Site Forensic Applications,” *Analytical Chemistry*, v. 96, pp. 17 746–17 753, 2024, ISSN: 1520-6882. DOI: 10.1021/acs.analchem.4c04059

- [101] T. Galeano-Díaz, A. Guiberteau-Cabanillas, A. Espinosa-Mansilla e M. López-Soto, “Adsorptive stripping square wave voltammetry (Ad-SSWV) accomplished with second-order multivariate calibration,” *Analytica Chimica Acta*, v. 618, pp. 131–139, 2008, ISSN: 0003-2670. DOI: 10.1016/j.aca.2008.04.058
- [102] Scientific Working Group for the Analysis of Seized Drugs, *SWGDRUG Mass Spectral Library – swgdrug.org*, abr. de 2015. endereço: <https://www.swgdrug.org/ms.htm>
- [103] US Department of Justice - Drug Enforcement Administration, “AKB48 (APINACA) and 5F-AKB48 (5F-APINACA),” Fevereiro, 2020.
- [104] US Department of Justice - Drug Enforcement Administration, “PB-22 and 5F-PB-22,” Março, 2020.
- [105] F. Savorani, G. Tomasi e S. Engelsen, “icoshift: A versatile tool for the rapid alignment of 1D NMR spectra,” *Journal of Magnetic Resonance*, v. 202, pp. 190–202, 2010, ISSN: 1090-7807. DOI: 10.1016/j.jmr.2009.11.012
- [106] R. Bro e H. A. L. Kiers, “A new efficient method for determining the number of components in PARAFAC models,” *Journal of Chemometrics*, v. 17, pp. 274–286, 2003, ISSN: 0886-9383. DOI: 10.1002/cem.801
- [107] A. Stegeman e N. D. Sidiropoulos, “On Kruskal’s uniqueness condition for the CANDECOMP/PARAFAC decomposition,” *Linear Algebra and its Applications*, v. 420, pp. 540–552, 2007. DOI: 10.1016/j.laa.2006.08.010
- [108] N. D. Sidiropoulos e R. Bro, “On the uniqueness of multilinear decomposition of N-way arrays,” *Journal of Chemometrics*, v. 14, pp. 229–239, 2000. DOI: 10.1002/1099-128X(200005/06)14:3<229::AID-CEM587>3.0.CO;2-N
- [109] M. Ortiz, L. Sarabia, M. Sánchez, A. Herrero, S. Sanllorente e C. Reguera, “Usefulness of PARAFAC for the Quantification, Identification, and Description of Analytical Data,” em *Data Handling in Science and Technology v. 29, Fundamentals and Analytical Applications of Multiway Calibration*, A. M. Peña, H. C. Goicoechea, G. M. Escandar e A. C. Olivieri, ed. Elsevier, 2015, pp. 37–81, ISBN: 9780444635273. DOI: 10.1016/B978-0-444-63527-3.00002-3
- [110] K. S. Booksh e B. R. Kowalski, “Theory of analytical chemistry,” *Analytical Chemistry*, v. 66, 782A–791A, 1994, ISSN: 0003-2700. DOI: 10.1021/ac00087a001

- [111] M. C. Barreto, J. Gonzalez-Rodriguez, S. G. Lemos e W. D. Fragoso, “Screening of synthetic cannabinoids in herbal samples through three-dimensional voltammetry and PARAFAC,” *Microchemical Journal*, v. 217, p. 115 121, 2025, ISSN: 0026-265X. DOI: 10.1016/j.microc.2025.115121
- [112] M. C. Barreto, J. Gonzalez-Rodriguez, S. G. Lemos e W. D. Fragoso, *3D Differencial pulse voltammograms of herbal extracts containing synthetic cannabinoids*, 2025. DOI: 10.17632/htkfy553hs.1

Apêndice A - Script do Interfaceador

```
/*
   Interfacing board. It keeps waiting until it receives
   ↪ 5V pulses in pins 9 and 10
   and uses them to initiate a series of keyboard
   ↪ commands.
*/

#define INPUT1 10
#define INPUT2 9
#define JMP 16
#define CMD 20
#include "Keyboard.h"

void setup() {
  // Make pin 9 and 10 inputs and turns on the pull-up
  ↪ resistors so they go high
  //unless connected to ground:
  pinMode(INPUT1, INPUT_PULLUP);
  pinMode(INPUT2, INPUT_PULLUP);
  pinMode(JMP, INPUT_PULLUP);
  pinMode(CMD, INPUT_PULLUP);
  Keyboard.begin(); // Starts the keyboard
}

void loop() {
  while (digitalRead(INPUT1) == HIGH) {}

  if(digitalRead(CMD) == LOW){ //Change tabs if specified
    Keyboard.press(KEY_LEFT_ALT);
    Keyboard.press(KEY_TAB);
    delay(100);
    Keyboard.releaseAll();
    delay(200);
  }

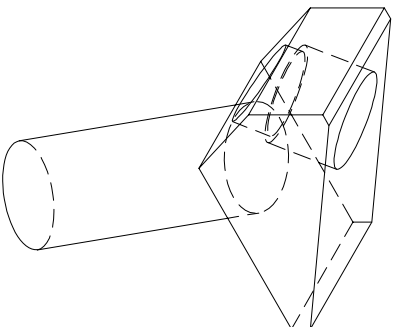
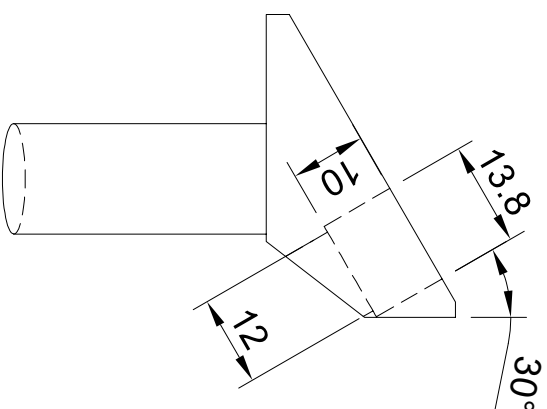
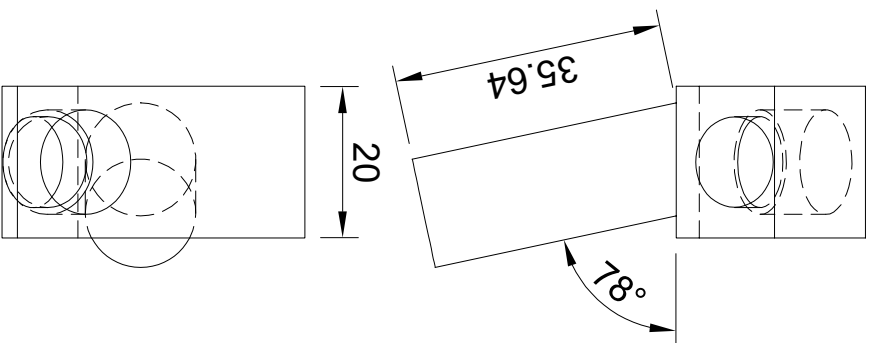
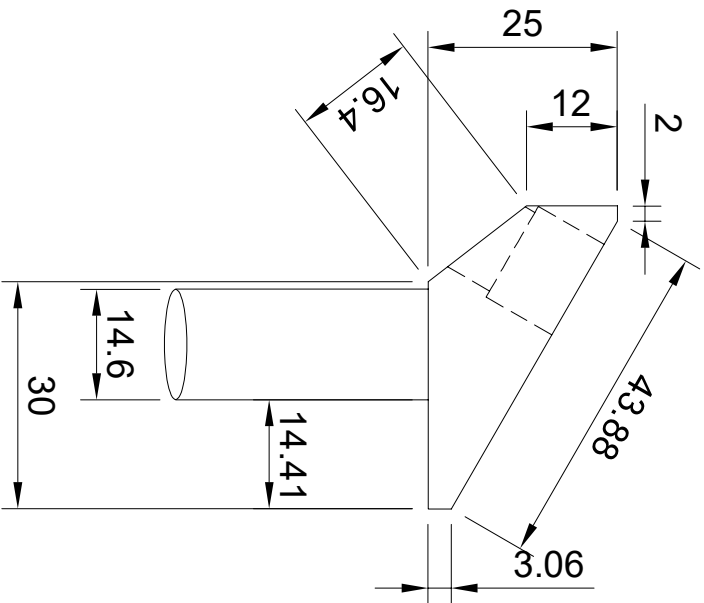
  //Command
  Keyboard.press(KEY_KP_ENTER);
```

```
    delay(100);  
    Keyboard.releaseAll();  
    delay(1000);  
  
while(digitalRead(JMP) == LOW) {} //Hold the loop if  
    ↪ specified  
  
}
```

Apêndice B - Projeto do Adaptador para Fibra Ótica/SPE

Página deixada em branco intencionalmente.

O projeto se encontra na próximas páginas em escala 1:1 considerando impressão em folhas A4, expressando as dimensões em milímetros.



Dept.	GEAQA	Technical reference	N/A	Created by	Mathheus Barreto	Approved by	N/A
		Document type	Projeto			Document status	N/A
		Title	Suporte para fibra óptica Protótipo Escala 1:1				DWG No.
			2/2				
Rev.	3.0	Date of issue	21/Set/2023	Sheet	1/1		

Apêndice C - Composição das misturas herbais

A seguir se encontra uma tabela com as amostras de misturas herbais disponíveis para análise no Joseph Banks Labs, assim como compostos identificados através de uma análise utilizando *fast* GC/MS.

Tabela S1: Composição das misturas herbais contendo canabinoides sintéticos.

Marca anonimizada	5F-AKB48	5F-PB-22	BB-22	AKB48	AB-CHMINACA	AB-FUBINACA	8-Hidroxiquinolina	Poliétileno glicol
CB01	✓	✓	×	×	×	✓	×	×
CB02	✓	×	×	✓	×	×	×	×
CB03	×	✓	×	✓	×	×	×	×
CB04	✓	✓	×	×	×	×	×	×
CB05	✓	×	×	×	×	×	×	×
CB06	✓	✓	×	×	×	×	✓	×
CB07	✓	×	✓	×	×	×	✓	×
CB08	✓	✓	✓	×	×	×	×	×
CB09	✓	✓	×	×	×	×	✓	×
CB10	✓	✓	×	×	×	×	✓	×
CB11	✓	×	×	×	×	×	×	×
CB12	×	✓	×	✓	×	×	×	×
CB13	✓	✓	×	×	×	×	✓	×
CB14	✓	✓	×	×	×	×	✓	×
CB15	✓	✓	×	×	×	×	×	×
CB16	✓	✓	×	×	×	×	✓	×
CB17	✓	✓	×	×	×	×	✓	×
CB18	✓	✓	×	×	×	×	✓	×
CB19	✓	×	✓	×	×	×	✓	×
CB20	✓	✓	×	×	×	×	×	×
CB21	✓	×	×	×	×	×	×	×
CB22	✓	✓	×	×	×	×	✓	×
CB23	×	✓	✓	×	×	×	✓	×
CB24	✓	✓	×	×	×	×	✓	×

Continua na próxima página.

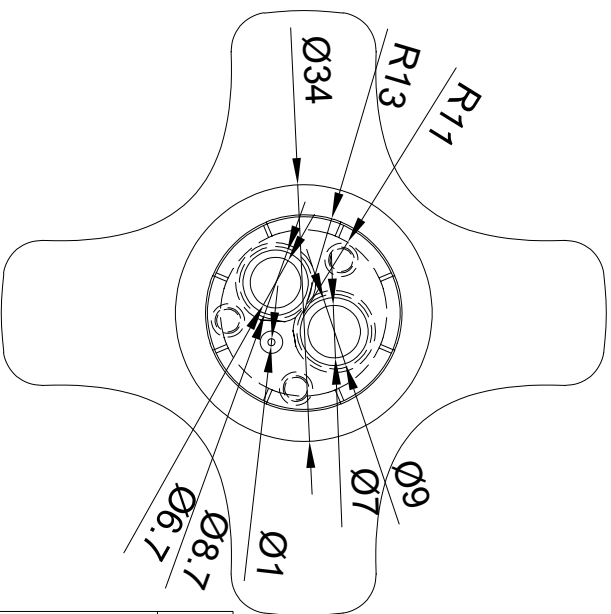
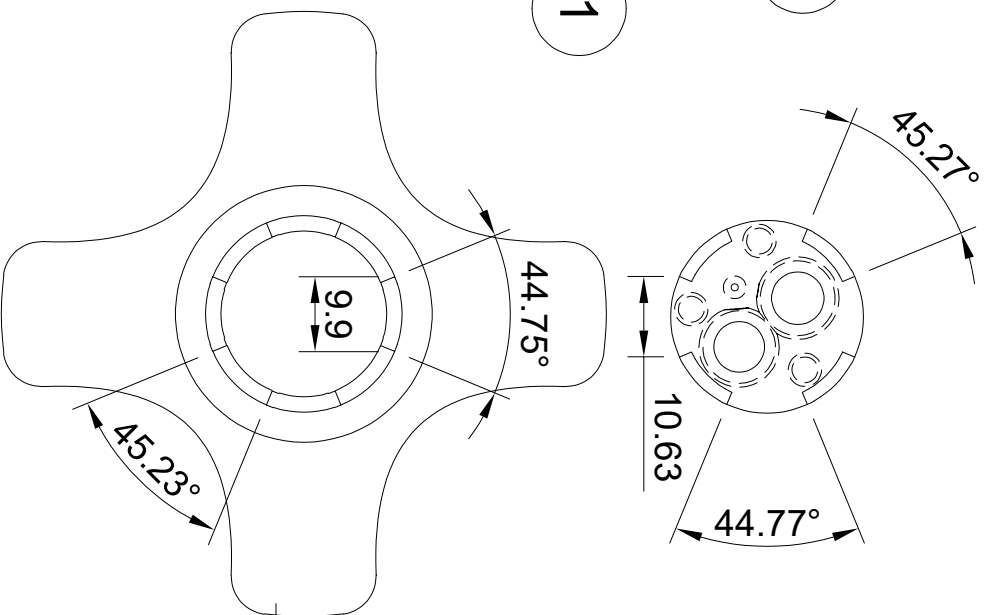
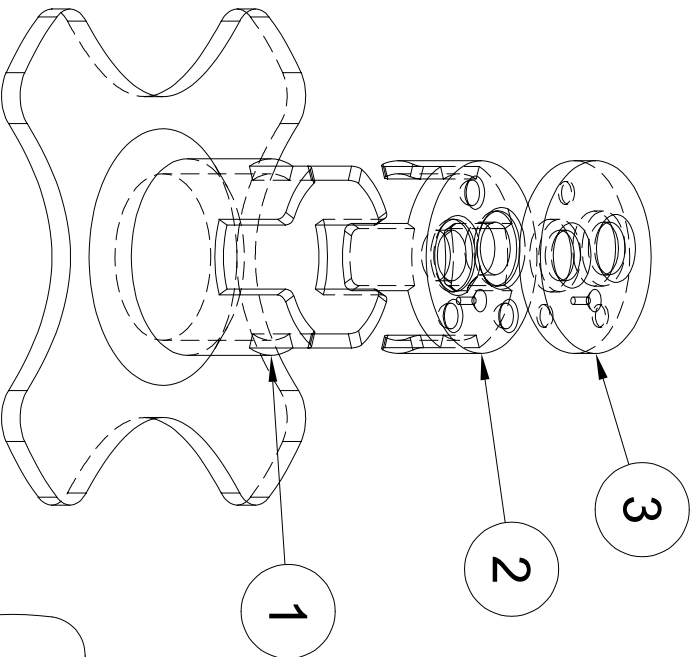
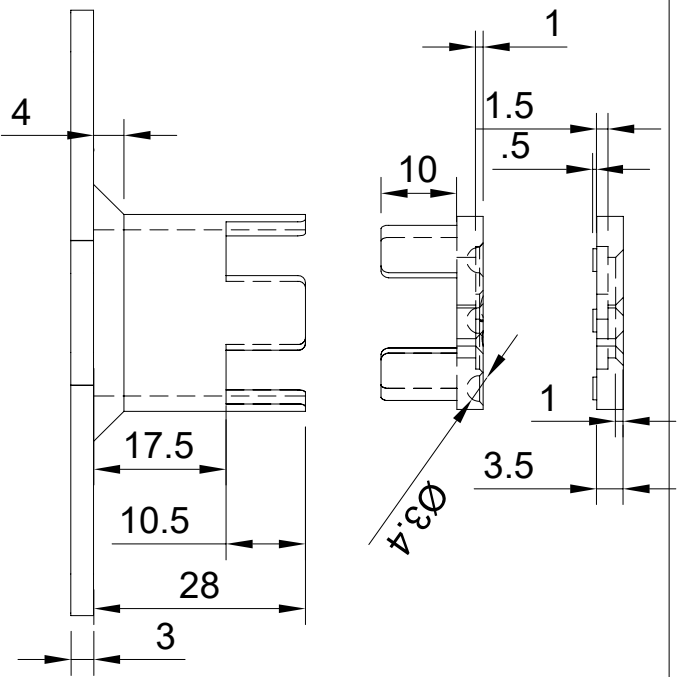
Tabela S1: ...(continuado da página anterior)

Marca anonimizada	5F-AKB48	5F-PB-22	BB-22	AKB48	AB-CHMINACA	AB-FUBINACA	8-Hidroxiquinolina	Poliétileno glicol
CB25	✓	✓	×	×	×	×	×	✓
CB26	×	✓	×	✓	×	✓	×	×
CB27	×	✓	×	✓	×	✓	✓	✓
CB28	✓	×	×	×	×	×	×	×
CB29	×	✓	×	✓	×	✓	×	✓
CB30	✓	×	×	×	×	×	×	×
CB31	✓	✓	×	×	×	×	✓	×
CB32	×	✓	×	×	×	×	✓	×
CB33	×	×	×	×	✓	×	×	×
CB34	✓	✓	×	×	×	×	✓	×
CB35	✓	✓	×	×	×	×	✓	×
CB36	×	✓	×	✓	×	×	×	×

Apêndice D - Projeto da célula eletroquímica

Página deixada em branco intencionalmente.

O projeto se encontra na próxima página em escala 1:1 considerando impressão em folhas A4, expressando as dimensões em milímetros.



Dept.	N/A	Technical reference	N/A	Created by	Mathheus Barreto 29/07/2024	Approved by	N/A
Document type	Esquete	Title	Suporte para célula voltamétrica Protótipo Escala 1:1	Document status	N/A	DWG No.	1/1
Rev.	3.5	Date of issue	11/07/2024	Sheet	1/1		