Universidade de São Paulo
Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto
Departamento de Química
Programa de Pós-Graduação em Química

“Identificação e estudo de cocaína e benzoilecgonina, em meio alcoólico, empregando eletrodo de pasta de carbono”.

Bruno Ferreira

Dissertação apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Ciências, Área: **Química**

RIBEIRÃO PRETO -SP

2020

Universidade de São Paulo
Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto
Departamento de Química
Programa de Pós-Graduação em Química

“Identificação e estudo de cocaína e benzoilecgonina, em meio alcoólico, empregando eletrodo de pasta de carbono”.

Bruno Ferreira

Dissertação apresentada à Faculdade
de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da
Universidade de São Paulo, como parte das
exigências para a obtenção do título de Mestre em
Ciências, Área: **Química**

Versão Corrigida

Orientador: Marcelo Firmino de Oliveira

RIBEIRÃO PRETO -SP

2020

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Ferreira, Bruno

Identificação e estudo da cocaína e benzoilecgonina, em meio alcoólico, empregando eletrodo de pasta de carbono. Ribeirão Preto, 2020.

89 p. : il. ; 30 cm

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Química

Orientador: de Oliveira, Marcelo Firmino.

1. Cocaína base livre. 2. Benzoilecgonina. 3. Voltametria. 4. Química Forense 5. Bases de Schiff

Nome: FERREIRA, Bruno

Título: Identificação e estudo de cocaína e benzoilecgonina, em meio alcoólico,
empregando eletrodo de pasta de carbono

Dissertação apresentada à Faculdade de Filosofia,
Ciências e Letras de Ribeirão Preto da Universidade
de São Paulo, como parte das exigências para a
obtenção do título de Mestre em Ciências, Área:
Química

Aprovado em:

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr.:_____ Instituição:_____.

Julgamento:_____ Assinatura:_____

Prof. Dr.:_____ Instituição:_____

Julgamento:_____ Assinatura:_____

Prof. Dr.:_____ Instituição:_____

Julgamento:_____ Assinatura:_____

“When you’re curious, you find lots of interesting things to do”
(Walt Disney)

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a DEUS, por ter me dado tantas oportunidades e por ter me ajudado a seguir todos os caminhos que eu me propus a seguir.

Aos meus pais Anibal e Iara, minha irmã Marina, meus avós Nair e Valdemar por todo amor, paciência e apoio INCONDICIONAL em cada momento da minha vida.

À minha namorada, Amanda, por me apoiar, aconselhar e estender a mão em cada momento que foi necessário.

Ao meu orientador Marcelo Firmino de Oliveira pelas conversas, paciência, amizade e pelo mais importante, por ter aberto as portas da ciência para mim. Sou muito grato por tudo.

Aos Professores do Departamento e funcionários do departamento, em especial a Lamia ao Professor Luis Gustavo Dias, Professor Anderson Rodrigo Moares de Oliveira, Professor Paulo Olivi, Professor Luiz Alberto Beraldo Moares e a Professora Adalgisa Rodrigues de Andrade pelas conversas e pelo apoio dedicados nesses anos.

A todos meus colegas de laboratório, em especial a Fer, Leandro, Ju e Érica. Muito obrigado por me ajudarem nos momentos difíceis, por estarem presentes nos momentos felizes como em aniversários e nas festas juninas do laboratório, pelo apoio acadêmico e pessoal. Meu muito obrigado!

Ao Departamento de Química da Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto e a Universidade de São Paulo por toda minha formação acadêmica e por todas as oportunidades a mim concedidas.

A CAPES, CNPq e a Fapesp por todo apoio financeiro na realização desse trabalho.

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

RESUMO

FERREIRA, B.: **Identificação e estudo da cocaína e benzoilecgonina, em meio alcoólico, empregando eletrodo de pasta de carbono.** 2020, 89 p. Dissertação de Mestrado, Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto

As consequências decorrentes do consumo e a comercialização de drogas ilícitas, entre elas a cocaína, constituem um sério problema para as autoridades e para a sociedade como um todo.

A identificação da cocaína geralmente é realizada em laboratório, por métodos cromatográficos ou métodos espectroscópicos, porém técnicas eletroquímicas estão constantemente ganhando destaque recente por sua facilidade de utilização, rapidez, aplicações, reprodutibilidade e confiabilidade dos resultados.

Portanto, nesse trabalho foram desenvolvidos métodos voltamétricos para detecção de cocaína base livre (COC) utilizando metanol e etanol como solventes principais. A aplicação com metanol foi realizada em saliva artificial utilizando voltametria de onda quadrada e a aplicação para o etanol foi utilizando voltametria cíclica. Com linearidade do aumento de corrente relacionado a concentração foi possível obter uma curva analítica para cada método onde obteve-se limite de detecção (LoD) de 0,88 $\mu\text{g/mL}$ e limite de quantificação (LoQ) de 2,67 $\mu\text{g/mL}$ para o método desenvolvido para o metanol e LoD de 1,30 $\mu\text{g/mL}$ e LoQ 3,96 $\mu\text{g/mL}$ para o método desenvolvido por etanol.

Também foi realizado o monitoramento da cinética de COC em benzoilecgonina (BEC) utilizando cromatografia líquida de alta eficiência acoplado a detector de arranjo de diodos (HPLC-DAD). Com esses resultados, foi desenvolvido o método voltamétrico para detecção da BEC utilizando-se eletrodo de pasta de carbono modificado com complexos base de Schiff de vanádio ([VO(SALEN)]). Com os resultados obtidos foi possível estudar a linearidade da corrente em relação a concentração com ou sem o desconto da corrente do eletrólito suporte, sendo possível obter uma curva analítica onde obteve-se valores de LoD = 4,54 $\mu\text{g/mL}$ e LoQ = 13,77 $\mu\text{g/mL}$ relacionados ao não desconto da corrente do branco e LoD = 5,10 $\mu\text{g/mL}$ e LoQ = 16,27 $\mu\text{g/mL}$ relacionados ao desconto da corrente do branco. Por fim, foi realizado o desenvolvimento cromatográfico para a BEC e COC, empregando HPLC-DAD. Foram obtidas as curvas de analíticas com valores de LoD = 0,010 $\mu\text{g/mL}$ e LoQ = 0,030 $\mu\text{g/mL}$ para BEC e LoD = 0,043 $\mu\text{g/mL}$ e LoQ = 0,130 $\mu\text{g/mL}$ para a COC.

Palavras-chaves: Cocaína base livre, Benzoilecgonina, Voltametria, Química Forense

ABSTRACT

FERREIRA, B.: **Identification and study of cocaine and benzoylecgonine, in an alcoholic environment, using carbon paste electrode.** 2020, 89 p. Dissertação de Mestrado, Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto

The consequences of the consumption and commercialization of illicit drugs, including cocaine, constitute a serious problem for the authorities and for society as a whole.

The identification of cocaine is usually carried out in the laboratory, by chromatographic or spectroscopic methods, but electrochemical techniques are constantly gaining recent prominence due to its ease of use, speed, applications, reproducibility and reliability of the results.

Therefore, in this project voltammetric methods were developed for detecting freebase cocaine (COC) using methanol and ethanol as main solvents. The application with methanol was in artificial saliva using square wave voltammetry and the application for ethanol was using cyclic voltammetry. With linearity of the current increase related to the concentration, it was possible to obtain an analytical curve for each method where a detection limit (LoD) of 0.88 $\mu\text{g/mL}$ and a quantification limit (LoQ) of 2.67 $\mu\text{g/mL}$ were obtained for the method developed for the methanol and LoD of 1.30 $\mu\text{g/mL}$ and LoQ of 3.96 $\mu\text{g/mL}$ for the method developed by ethanol.

The study of the transformation of COC into benzoylecgonine (BEC) was also carried out using high performance liquid chromatography coupled to a diode array detector (HPLC-DAD). With these results, the voltammetric method for BEC detection was developed using a modified carbon paste electrode with vanadium Schiff base complexes ([VO (SALEN)]). With the results obtained from the development it was possible to relate the linearity of the current in relation to the concentration with and without discounting the current values from the supporting electrolyte, being possible to obtain a analytical curve where values of LoD = 4.54 $\mu\text{g/mL}$ and LoQ were obtained = 13.77 $\mu\text{g/mL}$ related to the non-discount of the white chain and LoD = 5.10 $\mu\text{g/mL}$ and LoQ = 16.27 $\mu\text{g/mL}$ related to the discount of the white chain. Finally, chromatographic development was performed for BEC and COC, using HPLC-DAD. The analytical curves were obtained with values of LoD = 0.010 $\mu\text{g/mL}$ and LoQ = 0.030 $\mu\text{g/mL}$ for BEC and LoD = 0.043 $\mu\text{g/mL}$ and LoQ = 0.130 $\mu\text{g/mL}$ for COC.

Palavras-chaves: Freebase cocaine, Benzoylecgonine, Voltammetry, Forensic Chemistry

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura molecular da cocaína base livre e do cloridrato de cocaína. Extraído de Oliveira, G. N. et al. (2018) [1].....	22
Figura 2. Esquema de transformação biológica da cocaína em seus principais metabolitos. Extraído de Pavlova. V et al. (2004) [17].....	23
Figura 3. Estrutura molecular da benzoilecgonina.	24
Figura 4. Representação esquemática de uma célula eletroquímica, onde “a”- contra-eletrodo, “b” - eletrodo de referência e “c” – eletrodo de trabalho [33].	27
Figura 5. Representação da voltametria cíclica. a) Representação da variação de potencial me relação ao tempo na voltametria cíclica. b) Voltamograma representando a corrente (I / A) em um eixo y e o potencial (E / V) no eixo x, mostrando o potencial de oxidação e de redução relacionando com a sua corrente.	28
Figura 6. a) Representação gráfica da voltametria de onda quadrada, em b) Potencial aplicado (E_{OQ}) em uma sequência de pulsos (τ) e em b) potencial aplicado em forma de escada em uma sequência de pulsos [39, 40].	29
Figura 7. Na figura a) representação da corrente direta e reversa e resultante em um sistema reversível e em b) representação da corrente direta, inversa e resultante para sistemas não reversíveis [39, 40].	30
Figura 8. Estrutura molecular do N,N'-etilenobis (salicilidenoiminato) oxovanadio (IV) ([VO(SALEN)]). Extraído de Raymundo-Pereira, Paulo A. et al. (2013) [51].....	33
Figura 9. a) Cromatograma da cocaína base livre na concentração de 20,0 $\mu\text{g/mL}$ e b) relação dos espectros de massas da amostra injetada e do espectro do banco de dados do software do equipamento.	45
Figura 10. Voltamogramas obtidos por VOQ utilizando pasta de carbono com 50% m/m de parafina representando o eletrólito suporte, a adição de 10 $\mu\text{g mL}$ de cocaína base livre e a adição de 40 μL metanol. A metodologia empregada para detecção do analito foi: $f=100\text{ Hz}$, $A=0,10\text{ V}$ e tempo de pré-concentração do analito a 60 s a 1 V.	46
Figura 11. Voltamogramas obtidos por VOQ utilizando eletrodo de pasta de carbono com 50% m/m de parafina mostrando a otimização da variação do pH do eletrólito suporte e da concentração do tampão presente no mesmo. As voltametrias foram obtidas a partir da solução de 10 $\mu\text{g mL}$ de cocaína base livre a $f=100\text{ Hz}$, $A=0,1\text{ V}$ e tempo de pré-concentração do analito a 60 segundos a 1 V.....	47

Figura 12. Voltamogramas obtidos por VOQ, utilizando eletrodo de pasta de carbono com 50% m/m de parafina onde ocorre a variação de a) amplitude (0,01 ; 0,05 e 0,10 V) ; b) variação de frequência (25 ; 50 ; 75 ; 100 e 150 Hz); c) variação do tempo de pré-concentração (0 ; 30 ; 60 ; 90 ; 120s); d) variação no potencial de pré-concentração (0,8 ; 0,9 ; 1,0 ; 1,1 e 1,2 V) As voltametrias foram obtidas a partir da solução de 10 µg mL de cocaína base livre.	48
Figura 13. Primeiro dia da execução da curva analítica do analito, onde a) representa a voltametria de onda quadrada utilizando eletrodo de pasta de carbono com 50% m/m de parafina variando-se a concentração de cocaína base livre a partir de uma solução contendo 2,4 mL de solução de eletrólito suporte em meio básico , onde f= 75 Hz, A= 0,1 V e tempo de pré-concentração = 30 s. Em b) é possível observar a representação gráfica da corrente obtida versus a concentração de cocaína.....	49
Figura 14. Segundo dia da execução da curva analítica do analito, onde a) representa a voltametria de onda quadrada utilizando eletrodo de pasta de carbono com 50% m/m de parafina variando-se a concentração de cocaína base livre a partir de uma solução contendo 2,4 mL de solução de eletrólito suporte em meio básico , onde f= 75 Hz, A= 0,1 V e tempo de pré-concentração = 30s. Em b) é possível observar a representação gráfica da corrente obtida versus a concentração de cocaína.....	49
Figura 15. Curvas analíticas obtidas em dias diferentes onde os quadrados pretos representam o primeiro dia, e as bolas vermelhas representam o segundo dia de análise.	50
Figura 16. Voltamogramas obtidos por VOQ de 10 µg/mL dos possíveis adulterantes responsáveis pela interferência de detecção da molécula de cocaína base livre. Todos os padrões foram utilizados metanol como solvente assim como o analito principal. As voltametrias foram realizadas com os mesmos parâmetros otimizados previamente para cocaína base livre, como mostrado na Tabela 6.	52
Figura 17. VOQ da detecção da cocaína base livre utilizando metanol como solvente. Em a) o voltamograma da saliva artificial pura e em b) o voltamograma da saliva artificial fortificada com 10 µg/mL de BEC.	54
Figura 18. Curva analítica da cocaína base livre (pontos verdes) com adição do ponto referente a 10 µg/mL (vermelho) da cocaína fortificada na saliva.	54
Figura 19. Voltamograma da cocaína base livre utilizando etanol como solvente (preto), eletrólito suporte(azul) e etanol grau HPLC (vermelho).....	55

Figura 20. Otimização do pH da solução do eletrólito suporte, no voltamograma azul está representado o eletrólito suporte pH=6 com adição de 7,93 µg/mL de COC. No voltamograma rosa, está representado a resposta voltamétrica do eletrólito suporte em pH =9,5 com adição de 7,93 µg/mL de COC. Os parâmetros voltamétricos utilizados para análise foram: faixa de potencial de 0,0 – 1,5 V, potencial de pré-concentração de 1,0 V, tempo de pré-concentração de 0 V e velocidade de varredura de potencial de 100 mV s ⁻¹ .	56
Figura 21. Voltametrias de otimização dos parâmetros para confecção da curva analítica. Em a) valores da otimização de faixa de potencial, b) velocidade de varredura (10 ; 30 ; 50 ; 70 e 100 mv s ⁻¹), c) potencial e pré-concentração (0,8 ; 0,9 ; 1,0 e 1,1 V) e d) tempo de pré-concentração (0 ; 30 ; 60 ; 90 ; 120 segundos)	57
Figura 22. Voltamograma com as concentrações de cocaína base livre e sua respectiva curva analítica.	58
Figura 23. Voltamogramas referentes aos interferentes e a cocaína. Em a) o voltamograma de 7,93 µg/mL de cafeína (cinza) e o voltamograma da mesma concentração de cafeína na presença de 7,93 µg/mL de cocaína (vermelho) e em b) o voltamograma de 7,93 µg/mL de paracetamol e o voltamograma da mesma concentração de paracetamol com 7,93 µg/mL de cocaína. Os parâmetros voltamétricos empregados foram os mesmos utilizados na curva analítica.	59
Figura 24. Voltametrias referentes a adição de padrão de cocaína em etanol de limpeza. No voltamograma preto, a voltametria cíclica do eletrólito suporte na presença apenas do etanol de limpeza, no voltamograma vermelho a adição de 10 µg/mL de cocaína utilizando etanol de limpeza como solvente, e em azul a adição de 15 µg/mL de cocaína utilizando etanol de limpeza como solvente. Os parâmetros voltamétricos empregados foram os mesmos utilizados na curva analítica.	60
Figura 25. Cromatogramas evidenciando a hidrólise da molécula de cocaína em função dos tempos de incubação. a) 50 µg/mL de padrão de cocaína com tempo de retenção de aproximadamente 5 minutos ; b) 50 µg/mL de padrão de benzoilecgonina com tempo de retenção de aproximadamente 3,2 minutos ; c) Estudo da hidrólise da cocaína base livre utilizando adição de padrão de cocaína base livre em meio básico por aquecimento a 37°C, por 1 hora ; d) Estudo da hidrólise da cocaína base livre utilizando adição de padrão de cocaína base livre em meio básico por aquecimento a 37°C, por 2 horas ; e) Estudo da hidrólise da cocaína base livre utilizando adição de padrão de cocaína base livre em meio básico por aquecimento a 37°C, por 4 horas	62

Figura 26. Cromatogramas da a) mistura de padrão 50 µg/mL de benzoilecgonina e de cocaína base livre, onde o pico do metabolito ocorre em $t_r=2,9$ minutos e da cocaína base livre em $t_r= 4,4$ minutos e b) pico da benzoilecgonina na concentração de 758 µg/mL após o processo de formação do metabolito em meio básico.....	63
Figura 27. VOQ de 0 horas (voltamograma azul), 4 horas (voltamograma preto) e 12 horas (Voltamograma vermelho). O método utilizado para detecção do analito foi o método otimizado para cocaína base livre utilizando metanol como solvente.	64
Figura 28. VOQ utilizando os valores voltamétricos otimizados da curva analítica. Em a) a VOQ do eletrólito suporte e b) VOQ da verificação da resposta da hidrólise da COC em BEC após incubação de 1 semana.....	65
Figura 29. VOQ utilizando os valores voltamétricos otimizados da curva analítica. Em a) a VOQ do padrão comercial da BEC b) VOQ do eletrólito suporte.....	66
Figura 30. Voltametria cíclica em a) de 10 µg/mL de BEC (vermelho) e de KCl sem a presença de BEC (preto) utilizando eletrodo de pasta de carbono com 30 % complexo tipo base de schiff de [Mn(SALEN)]. Em b) o voltamograma de 10 µg/mL de BEC (vermelho) e do eletrólito suporte NH_4ClO_4 (preto)) utilizando eletrodo de pasta de carbono com 30 % complexo tipo base de schiff de [Mn(SALEN)]. Os parametros voltamétricos foram: tempo de pré concentração 10 segundos, potencial de pré-concentração de 0,0 V, faixa de potencial de 0,0 – 1,2 V, velocidade de varredura de potencial de 50 mV s^{-1} ..	67
Figura 31. VC do eletrólito suporte (KCl – cinza escuro), 10 µg/mL de BEC (vermelho) e de metanol puro (azul). Os voltamogramas foram realizados utilizando pasta de carbono com adição de 30% de complexo tipo base de schiff de [VO(SALEN)]. Os parametros voltamétricos foram: tempo de pré concentração 10 segundos, potencial de pré-concentração de 0,0 V, faixa de potencial de -0,4 – 1,0 V, velocidade de varredura de potencial de 100 mV s^{-1}	68
Figura 32. Sugestão de esquematização do mecanismo de oxirredução acoplado ocorrendo na superfície do eletrodo entre a BEC e VO. Figura extraída e adaptada de Teixeira, Marcos. F. S et al em 2004.	69
Figura 33. VCs da comparação de corrente do eletrólito suporte (LiClO_4 - cinza escuro) e do metanol puro (vermelho). Os parametros voltamétricos foram: tempo de pré concentração 10 segundos, potencial de pré-concentração de 0,0 V, faixa de potencia -0,4 – 1,0 V, velocidade de varredura de potencial de 100 mV s^{-1}	69
Figura 34. Voltametria cíclica do eletrólito suporte (azul), 5 µg/mL de BEC (preto) e de 10 µg/mL de BEC (vermelho). Os parametros voltamétricos foram: tempo de pré	

concentração 10 segundos, potencial de pré-concentração de 0,0 V, faixa de potencial de -0,4 – 1,0 V, velocidade de varredura de potencial de 100 mV s⁻¹..... 70

Figura 35. Voltamogramas cíclicos da faixa de potencial aplicados para otimização do método. De -0,4 - 1,0 V (vermelho), -0,2 - 1,1V (azul) e -0,1 - 1,1 V (vinho). Os parametros voltamétricos foram: tempo de pré concentração 10 segundos, potencial de pré-concentração de 0,0 V, velocidade de varredura de potencial de 100 mV s⁻¹..... 71

Figura 36. Voltametrias cíclicas do eletrodo de pasta de carbono modificados com a composição de a)15% de [VO(SALEN)] executando a VC para o eletrólito suporte (cinza escuro) e na presença de 10 µg/mL de BEC (vermelho) em b) 30% de [VO(SALEN)] executando a VC para o eletrólito suporte (cinza escuro) e na presença de 10 µg/mL de BEC (vermelho) e em c) 45% de [VO(SALEN)] executando a VC para o eletrólito suporte (cinza escuro) e na presença de 10 µg/mL de BEC (vermelho). O eletrólito suporte utilizado foi o LiClO₄. Os parametros voltamétricos foram: tempo de pré concentração 10 segundos, potencial de pré-concentração de 0,0 V, faixa de potencial de -0,4 – 1,0 V, velocidade de varredura de potencial de 100 mV s⁻¹..... 72

Figura 37. Voltametria cíclicas das velocidades para otimização utilizando eletrodo de pasta de carbono modificado com 30% de [VO(SALEN)]. Em a) as velocidade utilizadas (70, 80, 100, 120, 150, 175, 200 e 250 mV.s⁻¹) para otimização em sistema aberto em b) as mesmas velocidades utilizadas pra otimização em sistema fechado e em c) a comparação dos resultados obtidos ambos os sistemas (azul – 10 µg/mL de BEC ; vermelho – eletrólito suporte em sistema fechado ; verde – 10 µg/mL de BEC em sistema aberto ; preto – eletrólito suporte em sistema fechado). As voltametrias foram realizadas em 0,1 mol. L⁻¹ de LiClO₄..... 74

Figura 38. Otimização do potencial de pré-concentração em sistema fechado. Os valores de potenciais aplicados (-1,0 ; -0,9 ; -0,8 ; -0,7 ; -0,6 ; -0,5 ; -0,4 ; -0,3 ; -0,2 ; -0,1 ; 0,0 ; 0,1 ; 0,2 ; 0,3 e 0,4 V) na presença do branco (vermelho) e em 10 µg/mL de BEC (preto). Os voltamogramas foram obtidos utilizando pasta de carbono modificado com 30% [VO(SALEN)] em 0,1 mol. L⁻¹ de LiClO₄..... 75

Figura 39. Otimização do tempo de pré-concentração em sistema fechado. Em a) os valores de corrente em relação aos tempos de pré-concentração (0 ; 10 ; 30 ; 60 ; 80 e 120 segundos) nas concentrações de 15 µg/mL (azul), 10 µg/mL (branco) , 5 µg/mL de BEC (cinza escuro) e do branco (verde). Em b) o valor de delta da corrente entre a corrente da BEC e a corrente do branco utilizando 10 µg/mL como parâmetro. Os voltamogramas

foram obtidos utilizando pasta de carbono modificado com 30% de [VO(SALEN)] em 0,1 mol. L⁻¹ de LiClO₄..... 76

Figura 40. Em a) curva analítica não descontando o valor da corrente do eletrólito suporte. Em b) curva analítica descontando a corrente do branco. Em c) a comparação entra as duas curvas analíticas. Os valores utilizados para confecção da curva analítica estão dispostos na **Tabela 13**. Os voltamogramas foram obtidos utilizando pasta de carbono modificado com 30% de [VO(SALEN)] em 0,1 mol. L⁻¹ de LiClO₄..... 77

Figura 41. Cromatograma do Screening da BEC e da COC. Os picos cromatográficos representam 12 µg/mL de cada analito. O pico da COC ocorre entre 8 e 8,55 minutos e da BEC ocorre entre 3,97 e 4,65 minutos. Os valores otimizados para detecção estão dispostos na **Tabela 15**. 79

Figura 42. Cromatograma com sua respectiva curva anlítica da COC.As concentrações foram 1,0 ; 2,0 ; 5,0 ; 10,0 ; 20,0 e 50 µg/mL. Os valores otimizados para confecção da curva de calibração estão dispostos na **Tabela 15**..... 79

Figura 43. Cromatograma com sua respectiva curva analítica da BEC. As concentrações foram 0,5 ; 1,0 ; 2,0 ; 5,0 ; 8,0 e 12,0 µg/mL. Os valores otimizados para confecção da curva analítica estão dispostos na **Tabela 15**..... 80

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Classificação das drogas em relação a sua classe e ao efeito clínico em seus usuários [9,10].	21
Tabela 2. Classificação das técnicas quanto ao seu potencial de discriminação de drogas segundo a SWGDRUG [29].	25
Tabela 3. Principais tipos de eletrodos utilizados na eletrocatalítica [37].	31
Tabela 4. Composição da saliva artificial.	41
Tabela 5. Valores utilizados na otimização da reposta voltamétrica da BEC.	43
Tabela 6. Representação dos parâmetros otimizados, valores utilizados e valor ótimo para análise de cocaína base livre por voltametria de onda quadrada.	48
Tabela 7. Parâmetros de validação obtidos a partir das curvas inter-dias realizadas	50
Tabela 8. Relação entre contaminante, potencial anódico (E_{pa}) observado, corrente observada no potencial da cocaína e relação em porcentagem entre a corrente do interferente e a corrente da cocaína.	53
Tabela 9. Tabela com os valores otimizados utilizados no desenvolvimento voltamétrico do da cocaína base livre utilizando etanol como solvente.	57
Tabela 10. Parâmetros de validação obtidos a para a curva analítica.	58
Tabela 11. Valores de área de BEC e de COC com seus respectivos tempos de hidrólise.	63
Tabela 12. Valores da diferença entre o máximo de corrente do pico anódico do branco com o valor de corrente do pico anódico máximo na presença do padrão de BEC.....	72
Tabela 13. Valores otimizados "sem descontar o branco" e "descontando o valor do branco" utilizados para confecção da curva de calibração.	76
Tabela 14. Parâmetros de validação obtidos a para a curva analítica da benzoilecgonina.	78
Tabela 15. Valores otimizados para confecção da curva analítica da BEC e da COC. .	78
Tabela 16. Valores de equação da reta, coeficiente de correção linear, LoQ e LoD.	80
Tabela 17. Comparação entre molécula, solvente utilizado, eletrodo de trabalho, método, LoD e LoQ, e variações e resultados relacionados a cromatografia. Também foram utilizados a fim de comparação, valores do trabalho anterior do grupo relacionados a cocaína base livre e o cloridrato de cocaína [59].	80

LISTA DE ABREVIATURAS

OMS – Organização mundial de saúde

UNODC – United Nations Office on Drugs and Crime

NSDUH – National Survey on Drug Use and Health

SWGDRUGS – Scientific Working Group for the Analysis of Seized Drugs

SNC – Sistema nervosa central

COC – Cocaína base livre

BEC – Benzoilecgonina

HPLC – Cromatografia líquida de alta eficiência

HPLC-DAD – Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à detector de arranjo de diodos

LC-MS – Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas

HPLC-UV – Cromatografia líquida acoplada a detector de ultravioleta

GC-MS – Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas

VC – Voltametria cíclica

VOQ – Voltametria de onda quadrada

i_{pa} – Corrente de pico anódico

i_{pc} – Corrente de pico catódico

r – Coeficiente de correlação linear

EQM – Eletrodos quimicamente modificados

LoD – Limite de detecção

LoQ – Limite de quantificação

E_{pa} – Potencial de pico anódico

E_{pc} – Potencial de pico catódico

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	20
1.1 Drogas Ilícitas	20
1.2 Classificação das drogas	20
1.3 Cocaína	21
1.4 A cocaína e seus metabolitos	22
1.5 Métodos analíticos utilizados na química forense	24
1.6 Conceitos básicos em métodos eletroquímicos	26
2. OBJETIVOS DO TRABALHO	35
2.1 Objetivos específicos	35
3. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL	36
3.1 Materiais e Reagentes	36
3.2 Técnicas e equipamentos	36
3.3 Metodologia	37
3.3.1 Purificação da cocaína apreendida e preparo da solução de cocaína base livre	37
3.3.2 Estudo da transformação <i>in vitro</i> da cocaína base livre em benzoilecgonina	37
3.3.3 Preparo da solução dos adulterantes	38
3.3.4 Condições Cromatográficas	38
3.3.4.1 Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (GC-MS)	38
3.3.4.2 Estudo da transformação <i>in vitro</i> da cocaína base livre em benzoilecgonina utilizando cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a detector de arranjo de diodos (HPLC-DAD)	38
3.3.4.3 Desenvolvimento e confecção de curva analítica da benzoilecgonina e cocaína base livre utilizando HPLC-DAD	39
3.3.5 Análises voltamétricas	39
3.3.5.1 Confecção da pasta de carbono sem modificação	39
3.3.5.2 Confecção da pasta de carbono com modificador [VO(SALEN)] e otimização das porcentagens de complexo e pó de carbono na pasta	40

3.3.5.3	Preparo das soluções de eletrólito suporte	40
3.3.5.4	Preparo da solução de saliva artificial e fortificação com cocaína base livre.....	41
3.3.5.5	Análises voltamétricas para detecção de cocaína base livre solubilizada em metanol, adulterantes e saliva artificial fortificada	41
3.3.5.6	Análises voltamétricas para detecção de cocaína base livre solubilizada em etanol, adulterantes e detecção em etanol de limpeza.....	42
3.3.5.7	Análises voltamétricas para detecção de benzoilecgonina	42
4	RESULTADOS:	44
4.1	Análise inicial da cocaína base livre purificada por GC-MS	44
4.2	Análise inicial em voltametria de onda quadrada pra detecção de cocaína base livre utilizando metanol como solvente	45
4.3	Otimização de parâmetros voltamétricos aplicado a detecção de cocaína base livre utilizando metanol como solvente	46
4.4	Construção da curva analítica para cocaína base livre utilizando metanol como solvente	49
4.5	Estudo dos adulterantes de cocaína base livre	51
4.6	<i>Screening</i> de detecção da cocaína base livre utilizando metanol como solvente em saliva artificial utilizando VOQ	53
4.7	<i>Screening</i> utilizando voltametria cíclica para detecção de cocaína base livre utilizando etanol como solvente e otimização dos parâmetros voltamétricos	55
4.8	Construção da curva analítica para detecção de cocaína base livre utilizando etanol como solvente.....	58
4.9	Estudo dos adulterantes de cocaína base livre	58
4.10	<i>Screening</i> de detecção da cocaína base livre utilizando etanol como solvente em etanol de limpeza utilizando VC	59
4.11	Hidrólise da cocaína base livre em metanol em meio alcalino e aquecimento	60
4.12	Formação da molécula de benzoilecgonina a partir de pó de cocaína purificado, água e meio básico	63
4.13	Análise voltamétrica inicial da molécula de benzoilecgonina utilizando eletrodo de pata de carbono com parafina.....	64

4.14 Análise voltamétrica inicial e otimização de benzoilecgonina utilizando eletrodo de pasta de carbono modificado com complexo tipo base de Schiff.....	66
4.15 Confecção da curva analítica com os parâmetros previamente otimizados para BEC utilizando eletrodo de pasta de carbono modificado com complexo tipo base de Schiff.....	77
4.16 Confecção de curva analítica da cocaína base livre e benzoilecgonina com a utilização de HPLC – DAD	78
4.17 Comparações entre os valores e resultados obtidos na detecção direta utilizando as voltametrias e cromatografia líquida abordando suas aplicações.....	80
5 Conclusão	84
6 Referências	85

1. INTRODUÇÃO

1.1 Drogas Ilícitas

A Organização Mundial da Saúde (OMS) define drogas ilícitas como “substâncias que tem sua produção, comercialização e uso proibidos por lei” [2]. Essas drogas estão sendo largamente utilizadas ao redor do mundo durante anos, e o impacto do uso desenfreado e abusivo dessas drogas tais como a *Cannabis Sativa*, Cocaína, Ecstasy e outras é reconhecido como um fator negativo para existência humana, causando grandes danos a seus usuários e a sociedade como um todo [3-5].

O órgão United Nations Office on Drugs and Crime (UNODC) reportou que cerca de um quarto da população total do planeta fizeram o uso de algum tipo de droga no ano de 2015, e aproximadamente 29,5 milhões de pessoas podem ser classificados como consumidores assíduos desses tipos de entorpecentes sendo o custo para o tratamento desses dependentes gira em torno de US \$200 a US \$250 bilhões de dólares[6]. Outro órgão importante que realiza pesquisas em torno da utilização de entorpecentes, o National Survey on Drug Use and Health (NSDUH), órgão ligado ao governo americano, reportou que no ano de 2016 cerca de 34 milhões de americanos com doze anos ou mais fizeram a utilização de cocaína [7]. No Brasil, a utilização dessas drogas também é largamente difundida, segundo as estatísticas de drogas apreendidas da Polícia Federal, órgão ligado ao Ministério da Justiça e Segurança Pública, nos anos entre 2018 e 2019 houve um aumento da apreensão de cocaína no território nacional de 1,9 toneladas para 7,3 toneladas, respectivamente [8].

1.2 Classificação das drogas

Essas substâncias psicoativas ou psicotrópicas que inicialmente atuam no sistema nervoso central (SNC) podem alterar o comportamento do usuário, podendo levar a alterações de humor, estado de consciência e percepção [9]. Essa classificação está associada aos seus efeitos toxicológicos no organismo humano, como os depressores, estimulantes e os alucinógenos como está representado na **Tabela 1** [9, 10].

Tabela 1. Classificação das drogas em relação a sua classe e ao efeito clínico em seus usuários [9,10].

Classe	Efeito Clínico	Drogas
Alucinógenos	Consciência e percepção distorcidas; alucinação	LSD; MDMA; NBOMe; Maconha
Depressores	Sonolência; descoordenação motora; raciocínio diminuído	Clonazepam; Fenobarbital; Etanol
Estimulantes	Redução de fadiga mental; aumento da atividade motora; esquizofrenia	Cocaína; Anfetaminas em geral; Caféina; Nicotina; Efedrina

Dentre as principais drogas ilícitas, a cocaína é uma das mais consumidas no mundo [11]. Seus efeitos provocam alto grau de estímulo sobre as vias de neurotransmissão, que podem afetar reguladores químicos como a dopamina, noradrenalina e a serotonina [10].

1.3 Cocaína

A cocaína (benzoilmetilecgonina ou éster do ácido benzoico), é uma base fraca com $pK_a = 8,6$ e massa molecular de 303,358 g/mol [1, 11]. Estruturalmente a cocaína é um composto bicíclico que possui dois grupamentos ésteres, um deles provenientes do ácido benzóico e outro um amino álcool, onde possui o núcleo tropânico [1]. Foi pioneiramente isolada e purificada pelo químico alemão Albert Niemann em 1859 e é o principal alcalóide derivado da planta *Erythroxylon coca*, conhecida popularmente como folha de coca [1, 12]. A molécula de cocaína pode ser encontrada em todas as partes da planta, mas as folhas apresentam maior concentração do composto (aproximadamente 2% por massa), sendo comumente cultivada na América do Sul em países como o Peru, Colômbia e Bolívia onde os índios que residiam nessas regiões a mais de mil anos mascavam a folha, com o intuito de obter força reduzindo a fadiga e a fome para realização dos trabalhos diários [12, 13].

No final do século 19, a cocaína era considerada como um medicamento seguro, podendo auxiliar em dores de cabeça, desordens digestivas, febre, sífilis e outras doenças [11]. Porém o uso abusivo da droga tornou-se um problema mundial, sendo sua produção, tráfico e distribuição intimamente ligados ao aumento da criminalidade [6].

Em sua forma purificada, o cloridrato de cocaína, é um sólido branco e cristalino, podendo ser inalado ou mesmo dissolvido em água para utilização por injeção nas veias [11, 13]. Outro modo de utilização da substância, é na forma de uma mistura da base livre da cocaína, utilizando bicarbonato de sódio, originando uma massa de aspecto marrom-amarelo conhecida popularmente como crack, podendo ser fumado por conta da volatilidade e vaporização quando submetido a aquecimento [14]. A **Figura 1** representa a cocaína na forma de base livre e também em sua forma de cloridrato de cocaína, sendo possível observar a diferença em suas estruturas, uma vez que o grupo cloreto está próximo do anel tropano na estrutura do cloridrato de cocaína [1].

Figura 1. Estrutura molecular da cocaína base livre e do cloridrato de cocaína. Extraído de Oliveira, G. N. *et al.* (2018) [1].

1.4 A cocaína e seus metabolitos

A administração da cocaína produz metabolitos, que são biossintetizados de forma espontânea ou pela ação de enzimas específicas chamadas esterases, localizadas principalmente no fígado e intestino, as quais são responsáveis pela catálise dos grupos ésteres da molécula [15, 16]. Apenas uma pequena quantidade de cocaína consumida, permanece inalterada em sua forma inicial e quase metade da dose administrada de cocaína é hidrolisada no fígado por uma enzima específica chamada carboxilesterase-1 (hCe1), formando a benzoilecgonina e a ecgonina metil éster como produtos, sendo a benzoilecgonina o principal metabolito da cocaína [15, 17].

Outro processo envolvendo a biossíntese de metabolitos menores, como norcocaína, *p*-hydroxycocaína, *m*-hydroxycocaína, *p*-hydroxybenzoilecgonina e a *m*-hydroxybenzoilecgonina é obtida através da desmetilação da molécula de cocaína, sendo que esse processo em específico não ocorre em mais do que 5 % da droga administrada [15, 16]. Outro possível metabolito é o cocaetileno, formado através da transesterificação

da molécula de cocaína e etanol, administrados de forma concomitante [1, 15]. Não menos importante, tem-se a androecgonina metil éster e posteriormente biossintetizada por hidrólise a anidroecgonina, sendo a primeira molécula citada o principal composto de identificação de usuários de crack, cuja a administração ocorre através do fumo da substância [1]. A **Figura 2**, esquematizada por V.Pavlova *et al.* no ano de 2004 resume as biotransformações da metabolização da cocaína em moléculas como a benzoilecgonina, ecgonina metil éster, norococaína, ecgonina entre outras [17].

Figura 2. Esquema de biotransformação da cocaína em seus principais metabolitos. Extraído de Pavlova. V *et al.* (2004) [17].

Especificamente, a clivagem do grupamento metil éster na molécula de cocaína leva a formação da benzoilecgonina, podendo esse processo ser realizado *in vitro* ou *in vivo* [15, 16, 18]. No sistema *in vitro*, a clivagem se inicia em soluções a pH = 7,4 a 37 °C, onde inicialmente a taxa de conversão é de aproximadamente 5% por hora, aumentando esse percentual com o aumento de pH, podendo chegar a 38 % por hora em torno de pH=10 [18, 19]. A benzoilecgonina é um dos principais e mais abundantes metabolitos da cocaína, apresentando grande importância para análises toxicológicas e para métodos analíticos de detecção da substância, uma vez que a molécula pode ser encontrada em diversas matrizes como: ossos, sangue, urina e saliva [16, 20-22]. Um dos

empecilhos na extração da benzoilecgonina nessas matrizes é seu alto poder hidrofílico, porém seu tempo de meia vida nessas matrizes é bem superior e pode chegar a ser seis vezes maior que seu composto predecessor [15-17, 22]. A **Figura 3** representa a molécula de benzoilecgonina (BEC) indicando todos seus grupos funcionais e ligações.

Figura 3. Estrutura molecular da benzoilecgonina.

1.5 Métodos analíticos utilizados na química forense

No âmbito forense, métodos cromatográficos e espectrofotométricos têm sido largamente empregados para quantificação e detecção de compostos biológicos e determinação de drogas ilícitas em diversas matrizes biológicas como: Micro-HPLC-UV, HPLC-DAD, LC-MS/MS e CG-MS [23-27].

A polícia científica, frequentemente utiliza as técnicas colorimétricas, cromatográficas e espectrométricas para identificação de drogas ilícitas, sendo a cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas considerada como uma das técnicas classe A para detecção de entorpecentes [28]. Essas técnicas são classificadas, de acordo com a Scientific Working Group for the Analysis of Seized Drugs (SWGDRUGS), em concordância com seu potencial de discriminação dessas drogas[28, 29]. A **Tabela 2**, mostra as categorias de classificação das técnicas, sendo a Categoria A as melhores técnicas para discriminações de entorpecentes e a Categoria C como as piores [29].

Tabela 2. Classificação das técnicas quanto ao seu potencial de discriminação de drogas segundo a SWGDRUG [29].

Categoria A	Categoria B	Categoria C
Infravermelho	Eletroforese Capilar	Testes colorimétricos
Espectrometria de Massas	Cromatografia Gasosa	Espectroscopia de Fluorescência
Ressonância Magnética Nuclear	Espectrometria de mobilidade de Íons	Imunoensaios
Espectroscopia Raman	Cromatografia de Íons	Propriedades Físicas e Físico-Químicas
	Cromatografia Líquida	Espectroscopia Ultravioleta-Visível
	Microcristalização	
	Marcadores Farmacológicos	
	Cromatografia de Camada Delgada	
	Apenas para <i>Cannabis</i> : Exame botânico morfológico	

A SWGDRUG recomenda que os laboratórios utilizem alguns padrões de análises para entorpecentes [29]. Quando se faz a utilização uma metodologia validada para técnica classificada como A, outra técnica de qualquer classe deve também ser empregada (A, B ou C). Impossibilitando-se de realizar uma técnica classificada como A, no mínimo três diferentes técnicas validadas devem ser utilizadas, ao menos duas delas sendo da classificação B [29].

Os métodos cromatográficos são os mais utilizados no âmbito forense apresentando uma alta especificidade, porém muitas vezes as análises cromatográficas podem se tornar custosas devido ao grande consumo de solventes, preparo de amostras

exaustivos, longas análises e alto investimento em treinamento de seus analistas [20, 21, 30].

Dessa forma, com o avanço do número de apreensões de drogas, necessita-se de técnicas mais rápidas, sem preparo longo de amostra, portáteis e com um alto grau de seletividade para entorpecentes, abrindo-se precedentes para as técnicas eletroquímicas [31, 32].

1.6 Conceitos básicos em métodos eletroquímicos

A eletroquímica é uma área importante da química, na qual é observado desde a transferência e fluxo de elétrons, até as mudanças químicas que ocorrem em um determinado sistema [33]. Os métodos eletroquímicos utilizam propriedades elétricas capazes de serem mensuradas tais como: potencial, corrente elétrica, resistência e quantidade de carga [34]. Utilizando-se uma célula eletroquímica, esses métodos consistem basicamente na aplicação de um potencial variável entre eletrodos em relação ao tempo [34, 35]. O resultado desse processo é uma reação eletroquímica do analito em um determinado potencial definido, gerando a corrente observada [34, 36]. Os principais escopos dessas técnicas eletroquímicas são: diagnosticar mecanismos de reações eletroquímicas, identificar espécies presentes na matriz e analisar de forma quantitativa determinado analito de interesse [34-36]. A relação de potencial controlado, corrente adquirida e concentração de analito em determinada matriz, pode ser observada utilizando alguma técnica voltamétrica [35, 36].

Basicamente, a voltametria correlaciona a medida de corrente obtida em uma determinada célula eletroquímica, com uma determinada concentração de analito, na qual sua velocidade de oxidação e redução está ligada a transferência de massa do analito até a superfície do eletrodo [34, 35, 37]. Essa técnica consiste no emprego de três eletrodos, o eletrodo de trabalho, o contra-eletrodo e o eletrodo de referência [34]. Na **Figura 4** é possível observar a disposição desses três eletrodos quanto a célula eletroquímica [34].

Figura 4. Representação esquemática de uma célula eletroquímica, onde “a”- contra-eletródo, “b” - eletródo de referência e “c” – eletródo de trabalho [33].

Na estrutura apresentada na **Figura 4**, o potencial é aplicado por um dispositivo eletrônico chamado de potenciostato [34]. Esse equipamento aplica um potencial entre o eletródo de trabalho e o eletródo de referência, dessa forma o potencial aplicado gera uma corrente que passa entre o eletródo de trabalho e o contra eletródo (ou eletródo auxiliar) [34, 36, 37]. O contra eletródo e o eletródo de referência não podem sofrer nenhum tipo de reação química ou física durante o processo de análise [34, 36, 37].

Entre essas técnicas voltamétricas utilizando o sistema tradicional como mostrado na **Figura 4**, as mais utilizadas são a voltametria cíclica, voltametria de onda quadrada e a de pulso diferencial [35, 36].

A técnica de voltametria cíclica (VC), consiste inicialmente na varredura do potencial de uma molécula em uma determinada direção e posteriormente no sentido inverso enquanto a corrente é mensurada [33, 35]. Dessa forma a resposta da corrente de uma molécula em relação a um eletródo em uma solução de eletrólito suporte é obtida em forma de onda triangular produzindo uma varredura no sentido direto (oxidação) seguida pela varredura reversa do potencial (redução) [33, 35, 37]. Na oxidação, o analito chega até a superfície do eletródo através de um fenômeno chamado de difusão e com o aumento do potencial aplicado, a oxidação se torna termodinamicamente favorável, obtendo-se o platô de corrente, chamada de corrente de pico anódico (i_{pa}) e a partir desse ponto, inicia-se a diminuição do fenômeno de difusão até a superfície do eletródo, resultando na queda da i_{pa} [33, 38]. A partir dessa queda de corrente, a varredura do potencial é revertida, obtendo-se correntes relacionadas a redução do analito [33, 38]. A varredura no sentido reverso chega a um platô no qual é referente a redução completa da espécie, e esse pico é chamado de corrente de pico catódico (i_{pc}) e a partir do i_{pc} , a varredura do potencial continua até o ponto inicial [33, 38]. A aplicação da técnica é vasta podendo ser empregada em estudos redox de mecanismos de reação, acompanhamento

de produtos de uma determinada reação química e na detecção de substâncias intermediárias [35, 37]. A voltametria cíclica também pode ser empregada em quantificação do analito, mas por conta de sua baixa sensibilidade em relação às técnicas pulsadas, não é muito empregada [35]. Na **Figura 5a**, é possível observar a variação de potencial em relação ao tempo em voltametria cíclica e a **Figura 5b**, representa um voltamograma, onde no eixo x o parâmetro representado é o potencial aplicado (E) e no eixo y o parâmetro representado é a corrente (I), que é a resposta da eletrooxidação ou eletrorredução do composto [33].

A técnica de voltametria de onda quadrada (VOQ), é uma técnica extremamente versátil inicialmente empregada por Ramley e Krause [39]. Essa técnica que é classificada

Figura 5. Representação da voltametria cíclica. a) Representação da variação de potencial me relação ao tempo na voltametria cíclica. b) Voltamograma representando a corrente (I / A) em um eixo y e o potencial (E / V) no eixo x, mostrando o potencial de oxidação e de redução relacionando com a sua corrente.

como uma técnica voltamétrica de pulso, sendo seu sistema de detecção é rápido e sensível [35, 39, 40]. Sendo uma técnica pulso, também se baseia em um sistema de ondas, porém não existe a necessidade de renovação da camada de difusão entre os ciclos [39, 40]. Na **Figura 6a** é possível observar o sinal referente a voltametria de onda quadrada, no qual basicamente é a junção de uma sequência de pulsos com um sinal em forma de escada, representados na **Figura 6b** e **Figura 6c**, respectivamente[39, 40].

Figura 6. a) Representação gráfica da voltametria de onda quadrada, em b) Potencial aplicado (E_{OQ}) em uma sequência de pulsos (τ) e em b) potencial aplicado em forma de escada em uma sequência de pulsos [39, 40].

Na **Figura 6a, 6b e 6c**, é possível observar que o período dos pulsos, ou seja, quantas vezes o pulso se repete em função do tempo representado pela letra grega “tau” (τ), são iguais [39, 40]. A variação de potencial de degrau (ΔE_S – figura 6c) e o potencial de pulso (ΔE_{OQ} – figura 6b) são somatórios no resultado referente ao sinal de VOQ ($\Delta E_S + \Delta E_{OQ}$ – figura 6a). Os pontos representados por 1 e 2 (figura 6a), representam as correntes geradas nesses potenciais, no qual, em um sistema reversível o ponto 1 representa o sinal anódico enquanto que o potencial no sentido inverso gera a corrente 2 [39, 40]. A diferença dessas correntes (Δi) é graficamente representada dando origem ao voltamograma e é diretamente proporcional a concentração do analito [39, 40]. A corrente mensurada na VOQ, é obtida no final de cada pulso e isso é realizado para diminuir a presença de corrente capacitiva do sistema [39, 40]. A **Figura 7a** representa um sistema reversível relacionando a corrente anódica (direta), corrente catódica (reversa) e a resultante (Δi) [39, 40]. Na **Figura 7b**, é representado as mesmas correntes direta, inversa e a resultante, porém, para sistemas não reversíveis [39, 40].

Figura 7. Na figura a) representação da corrente direta e reversa e resultante em um sistema reversível e em b) representação da corrente direta, inversa e resultante para sistemas não reversíveis [39, 40].

Em análises quantitativas, essa voltametria pode ser comparada a técnicas espectroscópicas e cromatográficas, e assim como a voltametria cíclica, pode fornecer informações relacionadas à cinética e mecanística do analito [35].

1.7 Os eletrodos e eletrodo à base de carbono

Um eletrodo é basicamente um condutor de elétrons no qual geralmente podem ser adquiridos comercialmente ou feitos em escala laboratorial, sendo esses fabricados de materiais diversos [33]. Os eletrodos mais comuns são descritos na **Tabela 3** [33, 34, 41].

Tabela 3. Principais tipos de eletrodos utilizados na eletrocatalítica [37].

Eletrodo de Trabalho	Eletrodo de referência	Contra eletrodo
Carbono	Ag/AgCl	Platina
Platina	Hg/Hg ₂ Cl ₂	Carbono
Ouro	Hg/HgSO ₄	Níquel
Prata	Hg/HgO	Ouro
Eletrodo de paládio	NHE	
Eletrodo de ferro		
Eletrodo de cobre		

Os eletrodos de carbono, especificamente os confeccionados com pasta, podem ser utilizados em diversas áreas de aplicação, fornecendo informações eletroanalíticas, sobre o processos redox do analito e também informações sobre os processos mecanísticos que ocorrem [42]. Esses eletrodos podem ser confeccionados utilizando pó de grafite policristalino e algum outro composto aglutinante, que apenas tem a função de dar forma a o eletrodo, como o Nujol e a parafina [42]. Geralmente, os eletrodos confeccionados de pasta de carbono possuem no mínimo 50 % de carbono em sua estrutura, onde o mesmo fornece uma via de condução e resistividade baixa para condução da corrente [42].

Existem algumas vantagens desse grupo de eletrodos quanto aos adquiridos comercialmente, como: renovação fácil de sua superfície e consequentemente a remoção mais rápida dos compostos, o pó do composto é eletroquimicamente reativo a outras moléculas analisadas, a área exposta do eletrodo contendo apenas a pasta é responsável pela capacitância do sistema e essa área é relativamente pequena, resultando em uma corrente de fundo baixa [42]. Nessa estrutura, o fator de difusão radial que é o quanto uma massa de um determinado composto consegue ser transportada até o eletrodo, ocorre de forma eficiente entre a substância analisada e a sua superfície, formando assim uma corrente faradáica, sendo gerada uma baixa contribuição de corrente capacitiva [42]. Apresentando também um baixo custo de fabricação, com a possibilidade de aplicação de

uma elevada gama de potencial, essa classe de eletrodos, são empregados principalmente em técnicas voltamétricas [35, 42].

1.8 Eletrodos quimicamente modificados (EQM) e as bases de Schiff

Eletrodos quimicamente modificados (EQM), sendo esses à base de carbono ou não, foram inicialmente discutidos por Royce W. Murray no final da década de 1970 [43]. Basicamente, esse processo corresponde a modificação da superfície do eletrodo original, utilizando moléculas eletroativas, possibilitando reações acopladas entre o analito ou substrato e esse “novo” eletrodo [43, 44]. A utilização desses modificadores fornece características diferentes quantos as interações intermoleculares que ocorrem na interface do eletrodo, na cinética relacionada a transferência de elétrons; no ganho em seletividade, possibilitando uma maior aplicação para análises simultâneas e na possibilidade em análises de traço, possibilitando um menor LoD e LoQ [43-45]. Esses eletrodos podem ser aplicados em diversas áreas de atuação, como em células a combustíveis; em eletrocatalise e em sensores eletroanalíticos aplicados a análise forense, esses, principalmente utilizando complexos tipo base de shift [44, 46].

Os complexos base de Schiff, basicamente são compostos orgânicos especificamente iminas derivadas da reação entre uma amina primaria e um composto carbonilado, sendo esses, ligados a um radical orgânico tipo arila (ou arilo) ou alquila sendo esses responsáveis pela estabilidade da base. De fórmula geral $R_1R_2C=N-R_3$, onde o grupo R_3 representa esses grupos arilo ou alquila e inicialmente foram sintetizadas pelo químico alemão Hugo Schiff podendo ter o papel de ligantes bis, tris, tetra ou mesmo polidentados possuindo diversas aplicações como, por exemplo, em biotecnologia, saúde e na química forense [47-50]. De forma geral, por serem estruturas estáveis, esses complexos podem armazenar um centro metálico como, por exemplo, o metal vanádio, urânio e cobalto [50]. Na literatura, é possível encontrar trabalhos com esses complexos para detecção de cocaína. Dentre esses os mais comuns são a base de urânio (íon uranila) utilizando eletrodo de platina, carbono vítreo e eletrodos impressos (carbono, ouro e platina) [46, 48].

O complexo de Bases de Schiff N,N'-etilenobis (salicilidenoiminato) oxovanádio (IV), conhecido como (VO[SALEN]), é bastante conhecido e estudado na literatura[51-53]. A abordagem eletroquímica do complexo, mostra um pico anódico no qual ocorre a oxidação do metal ($VO^{2+} \rightarrow VO^{3+}$) e um pico catódico onde ocorre a redução

do metal ($\text{VO}^{3+} \rightarrow \text{VO}^{2+}$) [51]. A aplicação desse tipo de complexo na utilização de sensores foi realizada para detecção de algumas moléculas, como: Amoxicilina, Dipirona e Ranitidina [51, 54, 55]. A **Figura 8** ilustra a estrutura molecular do $[\text{VO}(\text{SALEN})]$ sendo possível observar seus grupos funcionais.

Figura 8. Estrutura molecular do N,N'-etilenobis (salicilidenoiminato) oxovanádio (IV) ($[\text{VO}(\text{SALEN})]$). Extraído de Raymundo-Pereira, Paulo A. *et al.* (2013) [51].

Visando a análise toxicológica com a utilização desses complexos, não existem na literatura estudos para detecção dos metabolitos da cocaína, em especial a benzoilecgonina.

1.9 Métodos voltamétricos para análise de cocaína e seus metabolitos

O emprego de técnicas voltamétricas tem apresentado importantes trabalhos na literatura, no tocante ao desenvolvimento de análises no campo forense para identificação de drogas de abuso em geral [56]. O avanço constante da eletroquímica, tornou essas técnicas ferramentas modernas indispensáveis no campo forense, devido a sua simplicidade, portabilidade, baixo custo e rapidez em relação às outras técnicas de identificação e quantificação [32, 56]. Ao se tratar da molécula de cocaína é possível observar uma evolução dos sensores eletroquímicos aplicados à análise dessa droga e de seus interferentes, sendo que muitas metodologias vem sendo empregadas utilizando diferentes tipos de eletrodos de trabalho, como: carbono vítreo modificado com base de *Schiff* ($[\text{UO}_2(5\text{-MeOSalen})(\text{H}_2\text{O})] \cdot \text{H}_2\text{O}$), eletrodos impressos quimicamente modificados, eletrodo dopado com boro e utilizando também pasta de carbono sem modificação [30, 32, 46, 48, 56].

A utilização da voltametria cíclica e a voltametria de onda quadrada para análise de cocaína, pode ser obtida tanto para o cloridrato de cocaína, cocaína base livre e também para os seus metabolitos, como por exemplo a benzoilecgonina [17, 46, 57, 58]. Essas

análises eletroquímicas podem fornecer informações sobre essas moléculas, como elucidação de mecanismos reacionais, podendo ser empregadas em diversas matrizes, tais como particulados e amostras apreendidas [17, 32, 59].

Existe uma grande variedade de trabalhos em eletroquímica utilizando cloridrato de cocaína como analito principal, porém ainda existem poucos trabalhos na literatura abordando a cocaína base livre, uma vez que cocaína é pouco solúvel em meio aquoso devido a sua relativa polaridade, assim, torna-se necessária a utilização de solventes orgânicos, tais como o metanol, etanol ou acetonitrila [30, 46, 48, 56]. Outro ponto importante, no qual merece atenção, é que na forma cloridrato de cocaína (protonada) é necessário mais energia em forma de potencial para sua oxidação [30,46]. Uma forma de tangenciar esse problema, seria a utilização de eletrólito suporte em pH alcalino, onde o cloridrato de cocaína é transformado na sua forma molecular, onde é exigido um potencial menor para sua oxidação [30,46,58].

Similarmente, o número de trabalhos na literatura envolvendo a detecção dos metabolitos da cocaína por eletroquímica também é limitado, o que contrasta com sua importância, uma vez que são biomarcadores de relevância para confirmar a administração da droga [60]. Na literatura, foram encontrados alguns artigos que relacionam a transformação *in vitro* e *in vivo* da cocaína base livre em benzoilecgonina [18]. Esses artigos mostraram que a hidrólise da cocaína em benzoilecgonina *in vitro* ocorre a uma taxa de 38% em pH=10 a uma temperatura de 37°C [18, 61]. Apesar da limitação de trabalhos envolvendo a benzoilecgonina, houve produções realizadas por Pavlova, Komorsky-Lovric e colaboradores, sendo esses de extrema importância para o entendimento eletroquímico desses metabolitos [17, 57, 60]. A utilização de técnicas eletroquímicas para detecção direta da benzoilecgonina, inicialmente foi realizada por Komorsky-Lovric e colaboradores utilizando eletrodo gotejante de mercúrio, empregando eletrólito suporte em meio básico [57]. Em seguida, Pavlova e colaboradores publicaram um trabalho referente ao estudo do mecanismo de redução da benzoilecgonina utilizando também eletrodo gotejante de mercúrio, mostrando o processo eletroquímico da hidrólise da cocaína em benzoilecgonina [17]. Basicamente esse mecanismo mostrado no trabalho de Pavlova, Komorsky-Lovric e colaboradores a cocaína base livre é transformada em seu metabolito, a benzoilecgonina, com a hidrólise do grupo metil éster em pH entre 7 e 12 e em pH maior do que 12, a benzoilecgonina sofre novamente hidrólise do seu grupo benzil éster, havendo a formação da molécula de ecgonina.

2. OBJETIVOS DO TRABALHO

Este trabalho tem como objetivo a utilização de técnicas voltamétricas para detectar cocaína base livre em meio alcoólico (metanol e etanol) obtendo alguns parâmetros de validação para detecção do analito e aplicação em saliva artificial e etanol 70% (“etanol de limpeza”), respectivamente. Também tem como objetivo o estudo da transformação da cocaína em benzoilecgonina também foi realizado utilizando a técnica de HPLC-DAD. A detecção da benzoilecgonina e o desenvolvimento voltamétrico utilizando pasta de carbono modificada com base de Schiff a base de vanádio ([VO(SALEN)]) também foi realizado. Por último, foi realizado o desenvolvimento cromatográfico utilizando equipamento de HPLC-DAD para detecção de cocaína base livre e de benzoilecgonina.

2.1 Objetivos específicos

- Detectar cocaína base livre empregando metanol como solvente e desenvolver metodologia utilizando técnicas voltamétricas, utilizando como eletrólito suporte NH_4ClO_4 com K_2HPO_4 , bem como eletrodo de trabalho de pasta de carbono sem modificação em meio alcalino
- Aplicação do método desenvolvido na detecção de cocaína base livre utilizando metanol para *screening* de detecção da droga em saliva artificial.
- Detectar cocaína base livre empregando metanol como solvente e desenvolver metodologia utilizando técnicas voltamétricas, utilizando como eletrólito suporte KNO_3 , bem como eletrodo de trabalho de pasta de carbono sem modificação.
- Aplicação do método desenvolvido na cocaína base livre utilizando etanol como solvente para *screening* da detecção utilizando etanol de limpeza (etanol 70%).
- Realização do estudo da hidrólise em meio básico da cocaína base livre em seu metabolito, a benzoilecgonina utilizando HPLC-DAD.
- Detecção de benzoilecgonina por técnicas voltamétricas, utilizando eletrodo de pasta de carbono modificado com complexo base de Schiff de vanádio.
- Detecção e desenvolvimento de método na detecção de cocaína base livre e benzoilecgonina utilizando HPLC-DAD.

3. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

3.1 Materiais e Reagentes

A cocaína base livre foi disponibilizada pelo Laboratório de Análises Toxicológicas da Polícia Técnico-Científica de Ribeirão Preto – São Paulo, Brasil. Padrão de benzoilecgonina (1000 µg/mL - Sigma-Aldrich). Padrões de fenacetina (Sigma-Aldrich), procaína (Sigma-Aldrich), lidocaína (Sigma-Aldrich), levamisol (Sigma-Aldrich), paracetamol (Prati-donaduzzi) e cafeína (Sigma-Aldrich) para estudo de seletividade.

Perclorato de amônio, fosfato dipotássico, nitrato de potássio, perclorato de lítio e solução de hidróxido de sódio 1,0 M (grau P.A; Synth) para o preparo dos eletrólitos suporte. Pó de grafite (Fisher Scientific) e parafina (Isogama) para confecção do eletrodo de pasta de carbono.

Como solventes: metanol, acetonitrila e etanol todos graus HPLC, Honeywell, álcool etílico hidratado – 70 % (L.S. Chemicals) e água ultra pura (Milli-Q). Para as análises cromatográficas foram utilizados também ácido fórmico (Honeywell), trietilamina (Sigma-Aldrich) e ácido fosfórico (Sigma-Aldrich).

O complexo base de Schiff de vanádio ([VO(SALEN)] foi sintetizado e purificado pelo aluno de doutorado Lucas dos Santos Mello e gentilmente cedido pelo grupo do Professor Edward Ralph Dockal do Departamento de química da Universidade Federal de São Carlos (DQ/UFSCar).

3.2 Técnicas e equipamentos

- Cromatografia a gás acoplado à espectrometria de massas (GC-MS), modelo GCMS-QP2010 SE (Shimadzu) equipado com injetor *split/splitless*. O gás de arraste utilizado foi o gás hélio de pureza 5.0. A Coluna cromatográfica utilizada foi RTX5MS (30 m x 0,25 mm I.D. diâmetro interno = 0,25 µm, Restek Corporation - Shimadzu) e *liner* do tipo *splitless*.
- Cromatografia líquida de alta eficiência da Shimadzu (Quioto, Japão) composto por bombas LC-6AD, controladora SCL-10AVP e detector UV/VIS SPD-10AV em coluna C18 (Ascentis Express Fused Core C18) de mm 100 x 4,6 mm x 2,7 µm de

tamanho de partícula e coluna de guarda Ascentis Express C18 (3,0 mm x 4,6 mm e 2,7 µm de tamanho de partícula) da marca Supelco (Bellefonte. PA, EUA).

- Cromatografia líquida de alta eficiência da Thermo Scientific Dionex modelo ultimate 3000 HPLC SQ (Waltham, MA, USA) equipado com bomba quaternária LPG-3400SD, amostrador automático WPS-3000RS, compartimento para coluna TCC-3000SD, detector de arranjo de diodos 3000RS e coluna C8 (NST, 250 nm x 4,6 nm x 5µm de tamanho de partícula) da marca NanoScience Technologies .
- Potenciostato µAutolab® III (Echo Chimie, Utrecht, Holanda) acoplado a um microcomputador e software NOVA® (Metrohm Autolab B.V; Versão: 1.11.2) . Todas as análises voltamétricas foram realizadas com eletrodo de referência Ag/AgCl, KCl_(sat), contra eletrodo espiral de platina e célula eletroquímica de vidro, com volume definido em 10 mL com tampa para sistema de entrada de 3 eletrodos.

3.3 Metodologia

3.3.1 Purificação da cocaína apreendida e preparo da solução de cocaína base livre

A cocaína apreendida, foi purificada anteriormente no laboratório do Grupo de Eletroquímica, Eletroanalítica e Química Forense- USP (GEEQFor-USP), utilizando pré-tratamento do cloridrato de cocaína com bicarbonato de sódio [58]. A síntese da cocaína base livre, foi realizada pesando-se 19,0 mg do pó de cocaína com adição de metanol como solvente orgânico em balão de 25,0 mL, e posteriormente estocada em congelador. Após esse processo, o analito foi analisado por GC-MS à fim de verificar se no pó purificado de cocaína não havia nenhum outro aulterante.

3.3.2 Estudo da transformação *in vitro* da cocaína base livre em benzoilecgonina

O estudo da transformação da cocaína em benzoilecgonina foi realizado com base nos trabalhos de Warner Ann e Stewart D.J com seus respectivos colaboradores, no qual a mesma é obtida através do processo de hidrólise da cocaína em solução meio básico [18, 19]. Inicialmente, uma solução contendo 19,0 mg de pó de cocaína purificado em 25,0 mL de água (pH = 9,50) foi colocada em ultrassom por 1 hora, a 37 °C até total

dissolução do precipitado. Após esse processo, a solução foi estocada por 1 semana para total hidrólise da molécula e posteriormente detectada pela técnica de HPLC-DAD (equipamento: Shimadzu ; coluna: C18) . Outra forma de avaliar a formação de benzoilecgonina, foi realizada adicionando a cocaína base livre em metanol diretamente em eletrólito suporte, dessa forma, 50,0 μL da solução estoque do analito foi adicionado a 2,40 mL de eletrólito suporte em meio básico e condicionados em chapa de aquecimento a 37 °C de 1 a 4 horas. Em seguida, as amostras foram injetadas no HPLC-DAD (equipamento: Shimadzu ; coluna: C18) para corroborar com o processo de conversão.

3.3.3 Preparo da solução dos adulterantes

Foram preparadas soluções de 10 $\mu\text{g/mL}$ de cada adulterante utilizando metanol como solvente: lidocaína, cafeína, fenacetina, levamisol e procaína. Para o solvente etanol, foram preparados 10 $\mu\text{g/mL}$ de cafeína e paracetamol.

3.3.4 Condições Cromatográficas

3.3.4.1 Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (GC-MS)

Foi injetado o volume de 1,0 μL da solução de cocaína preparada de acordo com o item 3.3.1 na concentração de 20,0 $\mu\text{g/mL}$ no modo *splitless*. O gás de arraste utilizado na análise foi o hélio a um fluxo de 2,32 mL/min. A programação de temperatura foi iniciada a 150 °C por 1 min seguido por aquecimento a uma taxa de 20°C/min até 280°C, com isoterma de 4 min e posterior aumento a 10 °C/min até 300 °C, por 2 min. A temperatura do injetor foi 250 °C e a temperatura de interface 300 °C. O *solvent cut time* foi de 2,5 min e a fonte de ionização operado a 70 eV com ionização por elétrons (IE). Os espectros foram adquiridos em modo *full scan*.

3.3.4.2 Estudo da transformação *in vitro* da cocaína base livre em benzoilecgonina utilizando cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a detector de arranjo de diodos (HPLC-DAD)

Foi injetado o volume de 10,0 μL da solução de cocaína base livre e do padrão benzoilecgonina na concentração de 50,0 $\mu\text{mol. L}^{-1}$. A fase móvel foi constituída pelo

solvente A (15 % acetonitrila) e pelo solvente B (85 % água com adição de 0,1 % de ácido fórmico) operando em modo isocrático. A temperatura de operação da coluna foi de 30 °C e a vazão da fase móvel utilizada foi de 1 mL/min. A detecção foi realizada utilizando comprimento de onda de 235 nm e o tempo total de corrida foi de 8 min.

3.3.4.3 Desenvolvimento e confecção de curva analítica da benzoilecgonina e cocaína base livre utilizando HPLC-DAD

O desenvolvimento do método cromatográfico utilizando HPLC-DAD (equipamento: Thermo Scientific ; coluna: C8) foi realizado otimizando os seguintes parâmetros cromatográficos: fase móvel constituída água/solvente orgânico (acetonitrila ou metanol), na presença de ácido fosfórico 85 %, 0,1 % (v/v), o pH (3,5 e 5,0) através da correção com trietilamina, porcentagem de solvente orgânico (20 e 25 %), o fluxo (0,6 e 1,0 mL/min), o comprimento de onda (195, 203, 235 e 275) e a temperatura da coluna (25,35 e 45°C). O volume de injeção foi utilizado volume fixo de 25 µL. Para cocaína base livre (COC) , a curva de calibração foi confeccionada com 6 níveis de concentração (1,0 ; 2,0 ; 5,0 ; 10,0 ; 20,0 e 50 µg/mL) e para benzoilecgonina (BEC) a curva de calibração foi confeccionada com também 6 níveis de calibração (0,5 ; 1,0 ; 2,0 ; 5,0 ; 8,0 e 12,0 µg/mL).

3.3.5 Análises voltamétricas

3.3.5.1 Confecção da pasta de carbono sem modificação

O eletrodo de trabalho foi confeccionado com uma mistura de pó de grafite e parafina (50:50 m/m) em um cadinho de porcelana com agitação intermitente por 20 min para completa homogeneização da pasta. Após essa etapa, a pasta foi resfriada até temperatura ambiente e transferida para um pequeno pote de vidro. Para análise, a pasta foi introduzida comprimindo seu formato no eletrodo de trabalho, deixando-a compacta a fim de evitar-se imperfeições e espaçamento físico entre a pasta e o material condutor. Ao final de cada análise voltamétricas, o eletrodo foi renovado utilizando papel sulfite em movimentos circulares afim de retirar todo analito possível presente em sua superfície e também deixar a pasta mais homogênea possível para posterior análise.

3.3.5.2 Confeção da pasta de carbono com modificador [VO(SALEN)] e otimização das porcentagens de complexo e pó de carbono na pasta

A confecção da pasta de carbono com modificador tipo base de Schiff [VO(SALEN)] foi realizada com a homogeneização de uma determinada quantidade em massa de pó de carbono com o modificador ($x_1:x_2$ m/m – onde x_1 é a porcentagem de carbono e x_2 a porcentagem do modificador) com uma mínima quantidade de parafina, sob aquecimento. Foi realizada a otimização da composição de quantidade de complexo e de pó de carbono por pasta, a massa total para cada pasta foi de 500 mg para cada otimização, os valores em massa da otimização foram:

- 30 % [VO(SALEN)] com 70 % pó de carbono – 150 mg [VO(SALEN)] e 350 mg de pó de carbono
- 15% [VO(SALEN)] com 85 % pó de carbono – 75 mg [VO(SALEN)] e 425 mg de pó de carbono
- 45% [VO(SALEN)] com 55% pó de carbono – 225 mg [VO(SALEN)] e 275 mg de pó de carbono

A otimização dos parâmetros para detecção de benzoilecgonina foi realizada utilizando também o complexo de manganês ([Mn(SALEN)]). O modo de preparo desse complexo na pasta de carbono foi igual para o complexo de vanádio, com o preparo de 30 % de complexo de manganês e 70 % de pó de carbono.

3.3.5.3 Preparo das soluções de eletrólito suporte

A solução estoque de eletrólito suporte para utilização no desenvolvimento do método e aplicação para cocaína base livre solubilizada em metanol, foi preparada pesando 2,94 g de NH_4ClO_4 e 4,35 g de K_2HPO_4 em balão volumétrico de 250 mL completado com água destilada. O pH da solução foi ajustando adicionando solução de NaOH até $\text{pH} = 9,50$.

A solução estoque de eletrólito suporte para utilização no desenvolvimento do método e aplicação para cocaína base livre solubilizada em etanol, foi preparada dissolvendo 2,52 g de KNO_3 em balão volumétrico de 250 mL, completando com água destilada.

A solução estoque de eletrólito suporte de LiClO_4 , utilizado na detecção de benzoilecgonina, utilizando eletrodo quimicamente modificado com complexo base de Schiff [VO(SALEN)] foi realizada dissolvendo 2,65 g de LiClO_4 em balão volumétrico de 250 mL completando com água destilada. A solução estoque de KCl e NH_4ClO_4 foram preparadas dissolvendo 1,86 g e 2,93 g, respectivamente, a em balões separados de 250 mL e em seguida completados com água destilada.

3.3.5.4 Preparo da solução de saliva artificial e fortificação com cocaína base livre

O preparo da solução de saliva artificial foi realizado com os seguintes compostos, mostrados na **Tabela 4** [62]:

Tabela 4. Composição da saliva artificial.

Composto	Massa
Hidrogeno carbonato de sódio	4,2 g
Cloreto de sódio	0,5 g
Carbonato de potássio	0,2 g
Nitrito de sódio	30 mg

Os compostos foram dissolvidos inicialmente em 900 mL de água e o pH foi ajustado com ácido nítrico até $\text{pH} = 5$, em seguida, a solução foi transferida quantitativamente para balão volumétrico de 1000 mL.

A análise em VOQ foi realizada em uma amostra de saliva artificial fortificada com $10 \mu\text{g/mL}$ de COC. O eletrólito suporte para sua determinação foi o NH_4ClO_4 com K_2HPO_4 , o mesmo eletrólito empregado na detecção de cocaína base livre utilizando metanol como solvente.

3.3.5.5 Análises voltamétricas para detecção de cocaína base livre solubilizada em metanol, adulterantes e saliva artificial fortificada

As análises para detecção do analito, foram realizadas aplicando voltametria de onda quadrada, utilizando como eletrodo de trabalho pasta de carbono sem modificação conforme preparado no item 3.3.5.1. Inicialmente, foram realizadas voltametrias apenas

utilizando o eletrólito suporte, em seguida a análise foi realizada apenas utilizando o metanol e o eletrólito suporte e por último a análise foi realizada com a presença de cocaína base livre e eletrólito suporte. Após a detecção do analito, alguns parâmetros de análise foram variados para otimização, como: pH da solução de eletrólito suporte (pH = 8,00 pH = 9,50 e pH = 10,5), concentração do tampão (0,10 mol/L e 0,50 mol/L), amplitude (0,01 até 0,20 V), frequência (25 até 150 Hz), tempo de pré-concentração (0 até 120 s) e potencial de pré-concentração (0,8 – 1,2 V). Após essa etapa de otimização, uma curva analítica foi confeccionada para obtenção dos parâmetros analíticos. As análises dos adulterantes e da saliva artificial fortificada foram realizadas nas mesmas condições voltamétricas otimizadas da análise da cocaína base livre.

3.3.5.6 Análises voltamétricas para detecção de cocaína base livre solubilizada em etanol, adulterantes e detecção em etanol de limpeza

As análises para detecção da cocaína base livre solubilizadas com etanol, foram realizadas aplicando voltametria cíclica utilizando eletrodo de pasta de carbono sem modificação preparado anteriormente conforme item 3.3.5.1. Inicialmente, as voltametrias foram feitas apenas utilizando o eletrólito suporte, em seguida a análise foi realizada apenas utilizando o etanol e o eletrólito suporte e por último a análise foi realizada com a presença de cocaína base livre e eletrólito suporte. Após a detecção do analito, alguns parâmetros de análise foram variados para otimização, como: pH da solução de eletrólito suporte (pH = 6 e pH = 9,50), tempo de pré-concentração (0 até 120 s), potencial de pré-concentração (0,8 até 1,1 V), velocidade de varredura (0,010 ; 0,030 ; 0,050 ; 0,070 e 0,1 V/s). Após essa etapa de otimização, uma curva analítica foi confeccionada para obtenção dos parâmetros analíticos. A análise dos adulterantes e da cocaína dissolvida em etanol de limpeza foram realizadas nas mesmas condições voltamétricas otimizadas.

3.3.5.7 Análises voltamétricas para detecção de benzoilecgonina

As análises para detecção da benzoilecgonina foram inicialmente realizadas aplicando voltametria de onda quadrada com os mesmos parâmetros otimizados no item 3.3.5.5. Em seguida, as análises foram realizadas aplicando voltametria cíclica variando alguns parâmetros para detecção do analito. Na **Tabela 5** é possível verificar as variáveis que foram utilizadas.

Tabela 5. Valores utilizados na otimização da reposta voltamétrica da BEC.

Eletrodos utilizados	Eletrólito suporte utilizado
[MN(SALEN)]	0,1 mol/L KCl e NH_4ClO_4
[VO(SALEN)]	0,1 mol/L KCl e LiClO_4
Parâmetros otimizados para [VO(SALEN)]	
Porcentagem de complexo na pasta	15 % , 30% e 45%
Potencial aplicando	Sistema aberto – Sistema fechado
Faixa de potencial	-0,4V – 1,1V
Potenciais de pré - concentração	-1,0V – 0,4 V
Tempo de pré concentração	0 – 120 s
Velocidade de varredura	70 – 250 mV/s

Após essa etapa de otimização, uma curva analítica foi confeccionada para obtenção dos parâmetros analíticos.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO:

Os resultados foram obtidos inicialmente fazendo uma análise da cocaína base livre em metanol. Posteriormente, *in vitro* e meio básico, foi realizada a transformação do grupo éster da molécula de cocaína em um grupo carboxílico, havendo a formação da molécula de benzoilecgonina, esse processo foi realizado com um controle de tempo e temperatura utilizando HPLC-DAD, certificando a reação química. Após a resposta positiva da transformação, foi realizada a detecção da molécula de benzoilecgonina, por métodos eletroanalíticos.

Quando realizada a busca bibliográfica das análises voltamétricas da cocaína, no geral, encontrou-se uma elevada quantidade de trabalhos para cloridrato de cocaína e poucos trabalhos relacionados a cocaína base livre. Em relação à detecção da benzoilecgonina, como já citado anteriormente, existe uma quantidade limitada de estudos eletroquímicos envolvendo essa molécula, sendo que na literatura há apenas trabalhos envolvendo a utilização de eletrodo de mercúrio gotejante.

Alguns artigos de *review* publicados no ano de 2019 mostram a grande necessidade de detecção de metabolitos utilizando técnicas voltamétricas. Um desses artigos, realizado por *Poltorak* e colaboradores, cita a necessidade de detecção de metabolitos de cocaína em fluidos corporais [60].

4.1 Análise inicial da cocaína base livre purificada por GC-MS

A análise da cocaína dissolvida em meio alcoólico utilizando o metanol, foi realizada com o intuito de detectar possíveis interferentes que poderiam afetar a seletividade da cocaína, mesmo a essa sendo purificada. A **Figura 9** mostra o cromatograma da análise de cocaína base livre utilizando equipamento de GC-MS.

Figura 9. a) Cromatograma da cocaína base livre na concentração de 20,0 µg/mL e b) relação dos espectros de massas da amostra injetada e do espectro do banco de dados do software do equipamento.

O cromatograma da **Figura 9** apresenta o pico de detecção apenas da cocaína base livre, sem a presença de contaminantes. Dessa forma, as análises voltamétricas podem ser realizadas apenas com a presença de cocaína base livre.

4.2 Análise inicial em voltametria de onda quadrada pra detecção de cocaína base livre utilizando metanol como solvente

Após a etapa de triagem da cocaína base livre, as análises voltamétricas foram realizadas. A literatura mostra que em eletrodos de trabalho a base de carbono, a oxidação irreversível ocorre na amina terciária da estrutura da cocaína, oxidando-a numa imina, utilizando um próton e dois elétrons [60]. A **Figura 10** mostra o resultado das análises voltamétricas iniciais quanto à utilização apenas de eletrólito suporte, adição de metanol

e adição de cocaína base livre em metanol a solução de eletrólito suporte. É possível observar a resposta referente a reação de oxidação da cocaína, com a presença de um pico anódico em potencial aproximadamente de 1V.

Figura 10. Voltamogramas obtidos por VOQ utilizando pasta de carbono com 50% m/m de parafina representando o eletrólito suporte, a adição de 10 $\mu\text{g mL}$ de cocaína base livre e a adição de 40 μL metanol. A metodologia empregada para detecção do analito foi: $f = 100\text{ Hz}$, $A = 0,10\text{ V}$ e tempo de pré-concentração do analito a 60 s a 1 V.

4.3 Otimização de parâmetros voltamétricos aplicados a detecção de cocaína base livre utilizando metanol como solvente

Após a detecção da cocaína, foi realizada a otimização dos parâmetros utilizados. A **Figura 11** refere-se à otimização do pH e da concentração de tampão ótima, respectivamente. A **Figura 11 a)** mostra a otimização dos valores de pH da solução de eletrólito suporte e a **Figura 11 b)** mostra a otimização da concentração do tampão utilizado na solução. Os valores de pH utilizados foram alcalinos, uma vez que, posteriormente será explanado a hidrólise da cocaína, e esse fenômeno apenas acontece nessa faixa de pH. É possível notar que em $\text{pH} = 9,50$ o pico possui uma melhor resolução e uma corrente maior em relação aos outros valores de pH. Em relação a concentração do tampão adicionado ao eletrólito suporte, quanto maior a concentração do sal, mais fácil o transporte de carga e consequentemente o processo eletroquímico, resultando em um potencial de detecção menor.

Figura 11. Voltamogramas obtidos por VOQ utilizando eletrodo de pasta de carbono com 50% m/m de parafina mostrando a otimização da variação do pH do eletrólito suporte e da concentração do tampão presente no mesmo. As voltametrias foram obtidas a partir da solução de 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de cocaína base livre a $f=100\text{ Hz}$, $A=0,1\text{ V}$ e tempo de pré-concentração do analito a 60 segundos a 1 V.

Após a etapa de verificação do melhor pH para a análise, prosseguiu-se com a otimização do método em voltametria de onda quadrada para detecção da cocaína. Os parâmetros de otimização foram definidos como sendo a amplitude, frequência e o tempo de pré-concentração.

Na **Figura 12**, é possível observar a resposta eletroquímica com a variação desses parâmetros, sendo que na **Figura 12 a)** mostra a otimização da amplitude, sendo empregado valores de 0,01, 0,05, 0,10, 0,20 e 0,30 V. É possível notar que, o aumento da amplitude até 0,10 V leva a um aumento da corrente, onde o mesmo é considerado como ótimo, valores acima desse valor de amplitude, não apresentaram sinais eletroanalíticos satisfatórios, dessa forma são omitidos do voltamograma. A **Figura 12b)** mostrou a variação de frequência, sendo possível observar que o aumento da frequência resulta na diminuição do sinal e faz com que esse sinal se desloque para valores mais positivos de potencial. O valor escolhido para análise do analito foi de 75 Hz, uma vez que o pico está com uma resolução melhor e a corrente é também maior em relação as outras frequências. Da mesma maneira, a **Figura 12 c)** mostra a otimização do tempo de pré - concentração. É possível observar que quanto maior o tempo com que o analito fica disponível no eletrodo de trabalho, aumenta o sinal até valores de 30 segundos e após esse valor o sinal diminui drasticamente, levando até o valor a aproximadamente 0 de corrente em 120 segundos. O valor ótimo de otimização do tempo de pré-concentração da cocaína base livre, foi observado como 30 segundos. Na **Figura 12 d)** é possível observar a otimização dos potenciais de pré-concentração aplicados, uma vez que, o pico em 1,0 V é o pico com maior intensidade e também o pico que apresenta potencial menor. Esse valor de 1,0 V representa o valor inicial do pico anódico da oxidação da cocaína.

Figura 12. Voltamogramas obtidos por VOQ, utilizando eletrodo de pasta de carbono com 50% m/m de parafina onde ocorre a variação de a) amplitude (0,01 ; 0,05 e 0,10 V) ; b) variação de frequência (25 ; 50 ; 75 ; 100 e 150 Hz); c) variação do tempo de pré-concentração (0 ; 30 ; 60 ; 90 ; 120s); d) variação no potencial de pré-concentração (0,8 ; 0,9 ; 1,0 ; 1,1 e 1,2 V) As voltametrias foram obtidas a partir da solução de 10 $\mu\text{g mL}$ de cocaína base livre.

A **Tabela 6**, resume os valores otimizados obtidos nos voltamogramas da **Figura 12**, utilizado para detecção de cocaína base livre.

Tabela 6. Representação dos parâmetros otimizados, valores utilizados e valor ótimo para análise de cocaína base livre por voltametria de onda quadrada.

Parâmetros otimizados	Valores utilizados	Valor ótimo*
pH solução eletrólito suporte	8,0 ; 9,5 ; 10,5	9,5
Concentração do tampão (mol/L)	0,1 e 0,05	0,1
Amplitude (V)	0,01 ; 0,05 ; 0,10 ; 0,20 ; 0,30 ; 0,40 ; 0,50	0,1
Frequência (Hz)	25 ; 50 ; 75 ; 100 ; 150	75
Tempo de pré-concentração (s)	0 ; 30 ; 60 ; 90 ; 120	30
Potencial de pré-concentração (V)	0,8 ; 0,9 ; 1,0 ; 1,1 ; 1,2	1,0

* Melhor valor entre as variáveis estudadas - ** Valores acima de 0,1V não apresentaram sinal analítico

4.4 Construção da curva analítica para cocaína base livre utilizando metanol como solvente

Após a realização da otimização dos parâmetros para cocaína base livre, foi confeccionada duas curvas analíticas em dias diferentes utilizando adição do próprio padrão de cocaína utilizado nas análises. A **Figura 13**, construída no primeiro dia e a **Figura 14** construída no segundo dia, mostram as voltametrias de onda quadrada com a adição de padrão e suas respectivas curvas analíticas, evidenciando o aumento da concentração da cocaína, acarretando um aumento do pico anódico.

Figura 13. Primeiro dia da execução da curva analítica do analito, onde a) representa a voltametria de onda quadrada utilizando eletrodo de pasta de carbono com 50% m/m de parafina variando-se a concentração de cocaína base livre a partir de uma solução contendo 2,4 mL de solução de eletrólito suporte em meio básico, onde $f = 75$ Hz, $A = 0,1$ V e tempo de pré-concentração = 30 s. Em b) é possível observar a representação gráfica da corrente obtida versus a concentração de cocaína.

Figura 14. Segundo dia da execução da curva analítica do analito, onde a) representa a voltametria de onda quadrada utilizando eletrodo de pasta de carbono com 50% m/m de parafina variando-se a concentração de cocaína base livre a partir de uma solução contendo 2,4 mL de solução de eletrólito suporte em meio básico, onde $f = 75$ Hz, $A = 0,1$ V e tempo de pré-concentração = 30s. Em b) é possível observar a representação gráfica da corrente obtida *versus* a concentração de cocaína.

A **Tabela 7**, exemplifica a comparação dos resultados entre os dois dias de análises para cocaína base livre. Na tabela, é possível observar os valores de LoQ, LoD, equação da reta e coeficiente de correlação linear (r). Os valores apresentaram-se próximos para os dias de análises, principalmente relacionando-os com a sensibilidade.

Tabela 7. Parâmetros de validação obtidos a partir das curvas inter-dias realizadas

Parâmetros	Dia 1	Dia 2
Equação da reta	$y = 3,15 \times 10^{-7} x - 4 \times 10^{-7}$	$y = 2,92 \times 10^{-7} x - 2 \times 10^{-7}$
Coeficiente de correlação linear	0,9992	0,9977
LoD*($\mu\text{g/mL}$)	$0,88 \pm 0,05$	
LoQ** ($\mu\text{g/mL}$)	$2,67 \pm 0,14$	

*LoD= $3,3 \cdot \alpha / S$ onde α = desvio padrão do coeficiente linear da curva e S=sensibilidade, obtida através do coeficiente angular.

**LoQ= $10 \cdot \alpha / S$ onde α = desvio padrão do coeficiente linear da curva e S=sensibilidade, obtida através do coeficiente angular.

Na **Figura 15**, é possível observar as curvas analíticas dos dias diferentes plotadas de forma concomitante. O eixo x estão dispostos os valores de concentração ($\mu\text{g/mL}$) do analito e no eixo y os valores de corrente (μA) sendo possível observar a similaridade das curvas.

Figura 15. Curvas analíticas obtidas em dias diferentes onde os quadrados pretos representam o primeiro dia, e as bolinhas vermelhas representam o segundo dia de análise.

4.5 Estudo dos adulterantes de cocaína base livre utilizando metanol como solvente

Foram estudados os principais adulterantes comumente presentes em amostras apreendidas de cocaína utilizando a metodologia otimizada da cocaína base livre. A concentração da cocaína base livre e de cada contaminante foi de 10 µg/mL sendo essas análises realizadas inicialmente de forma independente. A **Figura 16 a)** mostra as voltametrias de onda quadrada para cada molécula, sendo possível observar os picos anódicos de cada adulterante. Com esses resultados é possível traçar uma relação entre essas correntes e potenciais dos mesmos com os obtidos pela voltametria de onda quadrada da cocaína base livre. A molécula de cafeína não apresenta pico de oxidação, não caracterizando a interferência. As moléculas de fenacetina, levamisol, lidocaína e procaína, apresentaram picos de oxidação próximos ao pico de anódico da molécula de cocaína, podendo ser potenciais interferentes na análise. A molécula de lidocaína, possui um pico anódico de baixa corrente em 1,20 V e uma banda em potencial de 0,93V, também de baixa corrente. Na **Figura 16 b) e c)** é possível observar os VOQs da mistura de 10 µg/mL de cocaína com 10 µg/mL de cafeína e a mistura de 10 µg/mL de lidocaína e 10 µg/mL de cocaína, respectivamente. Na **Figura 16 c)** é evidente que o pico de oxidação do levamisol (~0,93 V) é suprimida na presença da cocaína. Outro ponto importante, é o deslocamento do E_{pa} da cocaína de 1,08 V para 1,14 V, possivelmente levando em conta a presença do adulterante. A **Tabela 8** resume os valores observados de potenciais de pico anódico (E_{pa}) para cada molécula, as correntes anódicas obtidas (i_{pa}) dos contaminantes para o potencial 1,08 que corresponde ao potencial da cocaína base livre e a corrente do interferente sobre o analito ($i_{inter.} / i_{COC}$).

a)

Figura 16. Ema) Voltamogramas obtidos por VOQ de 10 $\mu g/mL$ dos possíveis adulterantes responsáveis pela interferência de detecção da molécula de cocaína base livre. Em b) voltamogramas de 10 $\mu g/mL$ de cafeína (cinza) e 10 $\mu g/mL$ de cafeína com adição de 10 $\mu g/mL$ de cocaína (vermelho) e em c) voltamogramas de 10 $\mu g/mL$ de lidocaína (cinza) e 10 $\mu g/mL$ de lidocaína com adição de 10 $\mu g/mL$ de cocaína (vermelho). As voltametrias foram realizadas com os mesmos parâmetros otimizados previamente para cocaína base livre, como mostrado na **Tabela 6**.

Tabela 8. Relação entre contaminante, potencial anódico (E_{pa}) observado, corrente observada no potencial da cocaína e relação em porcentagem entre a corrente do interferente e a corrente da cocaína.

Contaminante	E_{pa} / V	i / μA	(i inter. / i COC x 100 %)
Cocaína	1,08	2,33	100
Cafeína	0	0	0
Fenacetina	1,03	0,516	22,24
Levamisol	1,2	1,67	72,00
Lidocaína	1,2	0	0
Procaína	0,98	1,66	71,55

4.6 *Screening* de detecção da cocaína base livre utilizando metanol como solvente em saliva artificial utilizando VOQ

O *screening* da detecção de cocaína base livre em saliva artificial foi realizado utilizando os mesmos parâmetros voltamétricos otimizados utilizados na curva analítica para detecção de cocaína base livre dissolvida em metanol. Na **Figura 17** é possível observar os voltamogramas da detecção da cocaína em saliva artificial. A **Figura 17 a)** representa o voltamograma do eletrólito suporte, apenas com a saliva e na **Figura 17 b)** é possível verificar a detecção de 10 $\mu g/mL$ de cocaína fortificada na saliva artificial. No voltamograma da **Figura 17 b)** é possível observar um pico anódico no mesmo potencial da cocaína base livre utilizando padrão purificado.

Figura 17. VOQ da detecção da cocaína base livre utilizando metanol como solvente. Em a) o voltamograma da saliva artificial pura e em b) o voltamograma da saliva artificial fortificada com 10 $\mu\text{g/mL}$ de COC.

Na **Figura 18**, foi plotado o ponto da corrente de 10 $\mu\text{g/mL}$ de saliva fortificada com cocaína na curva analítica da cocaína. Como resultado foi uma concentração na curva analítica de 6,83 $\mu\text{g/mL}$ para uma corrente de 1,77 μA .

Figura 18. Curva analítica da cocaína base livre (pontos verdes) com adição do ponto referente a 10 $\mu\text{g/mL}$ (vermelho) da cocaína fortificada na saliva.

4.7 Screening utilizando voltametria cíclica para detecção de cocaína base livre utilizando etanol como solvente e otimização dos parâmetros voltamétricos

Após a etapa de detecção de cocaína base livre utilizando metanol como solvente, utilizou-se também o etanol para detecção, uma vez que esse solvente em comparação com o metanol é menos tóxico e mais barato para análises periciais em campo, por exemplo. Inicialmente, a **Figura 19** mostra o *screening* da cocaína base livre (voltamograma preto) comparando a resposta voltamétrica com etanol puro (voltamograma vermelho) e com o eletrólito suporte (voltamograma azul).

Figura 19. Voltamograma de 7,93 µg/mL de cocaína base livre utilizando etanol como solvente (preto), eletrólito suporte (azul) e etanol grau HPLC (vermelho).

O pico anódico é observado entre 1,10 V e 1,15 V, referente ao grupamento amina terciária que a molécula de cocaína tem em sua estrutura. A partir desse ponto, foi realizado o estudo de pH do eletrólito suporte para detecção da molécula. Na **Figura 20** é possível determinar o pH escolhido do eletrólito suporte, ao contrário da resposta voltamétrica da cocaína base livre utilizando metanol como solvente, o eletrólito suporte em meio básico suprime o sinal analítico da cocaína base livre. A melhor resposta para o pH do eletrólito suporte, é o pH *in natura* do eletrólito suporte.

Figura 20. Otimização do pH da solução do eletrólito suporte, no voltamograma azul está representado o eletrólito suporte pH=6 com adição de 7,93 $\mu\text{g/mL}$ de COC. No voltamograma rosa, está representado a resposta voltamétrica do eletrólito suporte em pH =9,5 com adição de 7,93 $\mu\text{g/mL}$ de COC. Os parâmetros voltamétricos utilizados para análise foram: faixa de potencial de 0,0 – 1,5 V, potencial de pré-concentração de 1,0 V, tempo de pré-concentração de 0 V e velocidade de varredura de potencial de 100 mV s^{-1} .

Após a verificação do melhor pH foi realizado a otimização dos parâmetros voltamétricos, na **Figura 21 a) ; b) ; c) e d)** é possível avaliar esses parâmetros com os valores otimizados para faixa de potencial, velocidade de varredura, potencial de pré-concentração e tempo de pré-concentração, respectivamente. Na **Figura 21 a)**, com a apresentação do voltamograma é possível avaliar a melhor faixa de potencial aplicado, que no caso das faixas aplicadas de potencial o valor otimizado foi de 0,4 V – 1,4 V, uma vez que, o sinal analítico para essa faixa potencial é maior e o pico de oxidação ocorre em potencial menor em relação aos outros sinais. A **Figura 21 b)** exemplifica a otimização das velocidades de varredura foram determinadas utilizando velocidades entre 10 e 100 mV/s , sendo 100 mV s^{-1} a velocidade otimizada para detecção da cocaína. O potencial de pré-concentração e o tempo de pré-concentração foram avaliados nos voltamogramas das **Figura 21 c) e d)**, respectivamente. Nesses voltamogramas, os valores otimizados para potencial de pré-concentração e tempo de pré-concentração foram 0,9V em 90 segundos. Os valores otimizados estão dispostos na **Tabela 9**.

Figura 21. Voltametrias de 7,93 $\mu g/mL$ de cocaína para otimização dos parâmetros para confecção da curva analítica. Em a) valores da otimização de faixa de potencial, b) velocidade de varredura (10 ; 30 ; 50 ; 70 e 100 mV/s), c) potencial e pré-concentração (0,8 ; 0,9 ; 1,0 e 1,1 V) e d) tempo de pré-concentração (0 ; 30 ; 60 ; 90 ; 120 segundos)

Tabela 9. Tabela com os valores otimizados utilizados no desenvolvimento voltamétrico do da cocaína base livre utilizando etanol como solvente.

Valores experimentais	
Eletrólito suporte	KNO_3
Faixa de potencial (V)	0,4 – 1,5
$pH_{\text{eletrólito suporte}}$	6
Tempo de pré – concentração (s)	90
Potencial de pré – concentração (V)	0,9
Velocidade de varredura potencial (mV/s)	100

4.8 Construção da curva analítica para detecção de cocaína base livre utilizando etanol como solvente

A partir dos resultados otimizados, foi realizada uma curva de calibração da cocaína com faixa de concentração de 1,58 – 7,93 $\mu\text{g/mL}$. O voltamograma com as concentrações e a curva analítica é apresentada na **Figura 22** e a **Tabela 10** é possível observar os valores dos parâmetros de validação obtidos na curva analítica.

Figura 22. Voltamograma com as concentrações de cocaína base livre e sua respectiva curva analítica.

Tabela 10. Parâmetros de validação obtidos a para a curva analítica.

Parâmetros	
Equação da reta	$y = 4,27 \times 10^{-8} x - 2,51 \times 10^{-7}$
Coefficiente de correlação linear	0,9885
LoD* ($\mu\text{g/mL}$)	1,30
LoQ** ($\mu\text{g/mL}$)	3,96

4.9 Estudo dos adulterantes de cocaína base livre utilizando etanol como solvente

Após a confecção da curva analítica, foi também realizada a adição de adulterantes para verificar a seletividade do método desenvolvido. Os adulterantes utilizados foram a cafeína e o paracetamol, dois dos mais abundantes adulterantes encontrados em amostras apreendidas. Na **Figura 23 a)** é possível observar o voltamograma da cafeína (7,93 $\mu\text{g/mL}$ – cinza) e o voltamograma da adição de cocaína

em concomitância de cafeína (7,93 $\mu\text{g/mL}$ de cocaína e 7,93 $\mu\text{g/mL}$ de cafeína – vermelho). Na **Figura 23 b)** é possível observar o voltamograma do paracetamol (7,93 $\mu\text{g/mL}$ – azul) e o voltamograma da adição da cocaína em concomitância de paracetamol (7,93 $\mu\text{g/mL}$ de cocaína e 7,93 $\mu\text{g/mL}$ de paracetamol – vermelho).

Figura 23. Voltamogramas referentes aos interferentes e a cocaína. Em a) o voltamograma de 7,93 $\mu\text{g/mL}$ de cafeína (cinza) e o voltamograma da mesma concentração de cafeína na presença de 7,93 $\mu\text{g/mL}$ de cocaína (vermelho) e em b) o voltamograma de 7,93 $\mu\text{g/mL}$ de paracetamol e o voltamograma da mesma concentração de paracetamol com 7,93 $\mu\text{g/mL}$ de cocaína. Os parâmetros voltamétricos empregados foram os mesmos utilizados na curva analítica.

4.10 *Screening* de detecção da cocaína base livre utilizando etanol como solvente em etanol de limpeza utilizando VC

A aplicação do método utilizando cocaína base livre utilizando etanol como solvente, foi realizada utilizando etanol de limpeza. O etanol de limpeza é utilizado geralmente para limpeza de superfícies, sendo menos tóxico e com o valor acessível. Esse tipo de solvente pode ser facilmente encontrado para compra, podendo facilitar a utilização em análises periciais. Na **Figura 24** é possível observar as voltametrias para detecção da cocaína base livre utilizando etanol de limpeza em diferentes concentrações (10 e 15 $\mu\text{g/mL}$, voltamogramas vermelho e azul, respectivamente) e também apenas com o etanol de limpeza com o voltamograma preto. É necessário salientar que o etanol de limpeza não é puro, sendo possível a presença de alguns interferentes, mas os voltamogramas não detectaram a oxidação em outros potenciais desses possíveis compostos.

Figura 24. Voltametrias referentes a adição de padrão de cocaína em etanol de limpeza. No voltamograma preto, a voltametria cíclica do eletrólito suporte na presença apenas do etanol de limpeza, no voltamograma vermelho a adição de 10 $\mu\text{g/mL}$ de cocaína utilizando etanol de limpeza como solvente, e em azul a adição de 15 $\mu\text{g/mL}$ de cocaína utilizando etanol de limpeza como solvente. Os parâmetros voltamétricos empregados foram os mesmos utilizados na curva analítica.

4.11 Hidrólise da cocaína base livre em metanol em meio alcalino e aquecimento

Como mencionado na introdução desse trabalho, a hidrólise *in vitro* da cocaína em seu metabolito ocorre a uma taxa de 38% em $\text{pH}=10$ a uma temperatura de 37°C [18, 19].

As **Figuras 25 a)** e **25 b)**, mostram os cromatogramas dos padrões de cocaína base livre e o padrão de benzoilecgonina em concentração de $50\ \mu\text{g/mL}$, respectivamente. Em seguida, nas **Figuras 25 c)**, **25 d)** e **25 e)**, é possível observar os cromatogramas da adição do padrão cocaína base livre utilizando metanol como solvente na concentração de $10\ \mu\text{g/mL}$ adicionados ao eletrólito suporte em meio básico por 1,2 e 4 horas de incubação a 37°C , respectivamente. Nesses cromatogramas, é notório o aumento de área de pico da benzoilecgonina em relação a diminuição de área de pico da cocaína base livre, evidenciando o processo de hidrólise que ocorre na molécula de cocaína. Por ser mais apolar do que a benzoilecgonina ($\log P_{\text{coca}} = 2,30 \times \log P_{\text{BEC}} = 1,70$), a cocaína base livre possui tempo de retenção maior do que o metabolito.

Figura 25. Cromatogramas evidenciando a hidrólise da molécula de cocaína em função dos tempos de incubação. a) 50 µg/mL de padrão de cocaína com tempo de retenção de aproximadamente 5 minutos ; b) 50 µg/mL de padrão de benzoilecgonina com tempo de retenção de aproximadamente 3,2 minutos ; c) Estudo da hidrólise da cocaína base livre utilizando adição de padrão de cocaína base livre em meio básico por aquecimento a 37°C, por 1 hora ; d) Estudo da hidrólise da cocaína base livre utilizando adição de padrão de cocaína base livre em meio básico por aquecimento a 37°C, por 2 horas ; e) Estudo da hidrólise da cocaína base livre utilizando adição de padrão de cocaína base livre em meio básico por aquecimento a 37°C, por 4 horas

A **Tabela 11** exemplifica os cromatogramas acima quanto as áreas de COC e de BEC com seus determinados tempos de incubação. Com esses resultados, é possível assegurar que a transformação da cocaína em seu metabolito *in vitro*, como mostra a literatura.

Tabela 11. Valores de área de BEC e de COC com seus respectivos tempos de hidrólise.

Tempo (horas)	Área BEC	Área COC
1	77.915	111.682
2	100.105	97.611
4	115.929	95.782

4.12 Formação da molécula de benzoilecgonina a partir de pó de cocaína purificado, água e meio básico

Após esses testes da hidrólise da cocaína base livre, mostrando-se positiva para formação da molécula do metabolito, realizou-se a formação da mesma com água e meio básico. A **Figura 26 a)** mostra o cromatogramas da mistura de padrões de benzoilecgonina no tempo de aproximadamente 2,9 minutos e cocaína base livre no tempo de retenção de aproximadamente 4,4 minutos, na **Figura 26 b)** é possível observar o cromatograma com o pico em aproximadamente 2,9 minutos referente a benzoilecgonina formada a partir do pó de cocaína em meio básico sem aquecimento e estocada a temperatura ambiente.

Figura 26. Cromatogramas da a) mistura de padrão 50 µg/mL de benzoilecgonina e de cocaína base livre, onde o pico do metabolito ocorre em $t_r=2,9$ minutos e da cocaína base livre em $t_r= 4,4$ minutos e b) pico da benzoilecgonina na concentração de 758 µg/mL após o processo de formação do metabolito em meio básico.

4.13 Análise voltamétrica inicial da molécula de benzoilecgonina utilizando eletrodo de pasta de carbono com parafina

Após a etapa de certificação da formação da benzoilecgonina em meio básico aquoso, foi realizada voltametria de onda quadrada utilizando os parâmetros otimizados para detecção de cocaína base livre utilizando metanol como solvente, para detecção de da BEC nos tempos de incubação de 4 horas e de 12 horas e também comparadas com a resposta de cocaína base livre, no tempo inicial (0 horas). Na **Figura 27** estão dispostos esses resultados de tempo de incubação onde em azul seria o tempo inicial, em preto referente às 4 horas de incubação e em vermelho as 12 horas. É possível observar que quando a cocaína sofre a hidrólise em benzoilecgonina o sinal voltamétrico é suprimido, provavelmente pela não detecção da benzoilecgonina em eletrodo de pasta de carbono simples sem modificação.

Figura 27. VOQ de 0 horas (voltamograma azul), 4 horas (voltamograma preto) e 12 horas (Voltamograma vermelho). O método utilizado para detecção do analito foi o método otimizado para cocaína base livre utilizando metanol como solvente.

Para validar a hipótese de que a benzoilecgonina não poderia ser detectada em eletrodo de pasta de carbono sem modificação, foi realizado a voltametria de onda quadrada utilizando os parâmetros otimizados na detecção de cocaína base livre utilizando metanol como solvente para a hidrólise de cocaína utilizando água e meio básico em 1 semana de incubação a temperatura ambiente. Na **Figura 28 a)** é possível verificar a VOQ do branco, e na **Figura 28 b)** a VOQ da detecção de benzoilecgonina

após esse período. Esses resultados novamente mostraram a resposta negativa para detecção do metabolito em pasta de carbono sem modificação.

Figura 28. VOQ utilizando os valores voltamétricos otimizados da curva analítica. Em a) a VOQ do eletrólito suporte e b) VOQ da verificação da resposta da hidrólise da COC em BEC após incubação de 1 semana.

Por fim, para comprovar de fato que BEC não é detectável em eletrodo de pasta de carbono sem modificação, foi adicionado padrão comercial da benzoilecgonina em sistema eletroquímico otimizado para cocaína base livre utilizando metanol como solvente. Na **Figura 29 a)** é apresentado o voltamograma do padrão apenas do eletrólito suporte, e na **Figura 29 b)** é apresentado o voltamograma do padrão de benzoilecgonina (10 $\mu\text{g/mL}$). Com a certificação de adição de padrão ao sistema eletroquímico, seria esperado devido a proximidade molecular da estrutura da droga e do metabolito, um pico anódico próximo a potencial de 1,1 V, porém pelo voltamograma, não é o que se é observado. Com esses experimentos, é possível afirmar que a molécula de benzoilecgonina não é detectável a sistema de pasta de carbono utilizado nesse trabalho.

Figura 29. VOQ utilizando os valores voltamétricos otimizados da curva analítica. Em a) a VOQ do padrão comercial da BEC b) VOQ do eletrólito suporte.

A partir desse momento, percebeu-se que não houve a detecção utilizando eletrodo de pasta de carbono não modificada então foram realizadas buscas de outras alternativas para detecção do metabolito, devido a sua importância para área forense como um todo, e a falta de trabalhos na literatura evidenciando a detecção da molécula por sistemas eletroquímicos. Essas buscas culminaram na aplicação de eletrodos modificados de complexos bases de Schiff.

4.14 Análise voltamétrica inicial e otimização de benzoilecgonina utilizando eletrodo de pasta de carbono modificado com complexo tipo base de Schiff

O processo de inicial para detecção da benzoilecgonina, foi realizado como mostra os voltamogramas da **Figura 30**, empregando 30% em massa na composição da pasta de carbono do complexo $[Mn(SALEN)]$ em dois eletrólitos suporte diferentes. Na **Figura 30 a)** está representado o voltamograma utilizando o KCl como eletrólito suporte e na **Figura 30 b)** o eletrólito suporte NH_4ClO_4 . Em ambos os voltamogramas, a cor cinza escura representa o eletrólito suporte e a cor vermelha a resposta voltamétrica do analito. Esses resultados mostram que para eletrodos modificados com $[Mn(SAELEN)]$ nesses

eletrólitos suporte, a resposta para detecção de BEC não é satisfatória, pois não existe resposta voltamétrica nesses sistemas.

Figura 30. Voltametria cíclica em a) de 10 $\mu\text{g/mL}$ de BEC (vermelho) e de KCl sem a presença de BEC (preto) utilizando eletrodo de pasta de carbono com 30 % complexo tipo base de schiff de $[\text{Mn}(\text{SALEN})]$. Em b) o voltamograma de 10 $\mu\text{g/mL}$ de BEC (vermelho) e do eletrólito suporte NH_4ClO_4 (preto) utilizando eletrodo de pasta de carbono com 30 % complexo tipo base de schiff de $[\text{Mn}(\text{SALEN})]$. Os parâmetros voltamétricos foram: tempo de pré concentração 10 segundos, potencial de pré-concentração de 0,0 V, faixa de potencial de 0,0 – 1,2 V, velocidade de varredura de potencial de 50 mV/s.

Em seguida, outro complexo foi testado, o $[\text{VO}(\text{SALEN})]$. Para esse complexo, inicialmente o eletrólito suporte KCl foi utilizado com a proporção de complexo de 30% em massa, na composição total da pasta de carbono. A característica principal observada desses complexos é que apresentam dois picos na presença do eletrólito suporte, o catódico ($\sim 0,23$ V) no qual é representada a redução do metal e o pico anódico ($\sim 0,66$ V), no qual representa a oxidação do metal havendo a troca de um único elétron ($\text{VO}^{2+}(\text{SALEN})/\text{VO}^{3+}(\text{SALEN})$). Para esse trabalho, o escopo principal foi a utilização do pico anódico, o pico de oxidação, para determinação da molécula de benzoilecgonina.

Na **Figura 31**, é possível observar esses dois picos, para o voltamograma do eletrólito suporte (KCl; voltamograma cinza escuro), na adição de padrão de BEC (10 $\mu\text{g/mL}$; voltamograma vermelho), onde é possível notar o aumento dos picos (catódicos e anódicos, 0,30 V e 0,70 V, respectivamente) e também na adição de metanol puro, no qual também é observado o aumento do sinal, evidenciando que esse sinal é consequência da oxidação acoplada do metal na adição desse solvente.

Figura 31. VC do eletrólito suporte (KCl – cinza escuro), 10 $\mu\text{g/mL}$ de BEC (vermelho) e de metanol puro (azul). Os voltamogramas foram realizados utilizando pasta de carbono com adição de 30% de complexo tipo base de schiff de $[\text{VO}(\text{SALEN})]$. Os parametros voltamétricos foram: tempo de pré concentração 10 segundos, potencial de pré-concentração de 0,0 V, faixa de potencial de -0,4 – 1,0 V, velocidade de varredura de potencial de 100 mV/s.

Após a tentativa de detecção da BEC, empregando pasta de carbono modificada com $[\text{VO}(\text{SALEN})]$ utilizando KCl como eletrólito suporte, foi realizada a tentativa de detecção utilizando o mesmo complexo com a mesma proporção em massa na composição da pasta, mas com eletrólito suporte diferente, utilizando o LiClO_4 .

A existência dos picos anódicos e catódicos na presença do LiClO_4 ocorrem em potenciais de $\sim 0,60$ V e $\sim 0,35$ V, respectivamente. A reação redox que ocorre, como mencionada anteriormente, é a troca de 1 elétron entre os estados redox ($\text{VO}^{2+}(\text{SALEN})/\text{VO}^{3+}(\text{SALEN})$). A sugestão de ocorrência desse fenômeno é que inicialmente com a aplicação do potencial de oxidação, a molécula de BEC é oxidada em uma reação de acoplamento com o complexo de vanádio que posteriormente ganha elétron nesse processo, que enquanto isso, o mesmo complexo também oxida, perdendo o elétron, saindo do estado de oxidação 2^+ para o 3^+ . Na **Figura 32** é possível observar esse processo que ocorre na superfície do eletrodo.

Figura 32. Sugestão de esquematização do mecanismo de oxirredução acoplado ocorrendo na superfície do eletrodo entre a BEC e VO. Figura extraída e adaptada de Teixeira, Marcos. F. S *et al* em 2004 [54].

Na **Figura 33**, o voltamograma mostra a resposta do metanol puro em relação a resposta voltamétrica do branco. Esses voltamogramas mostram que o metanol nesse eletrólito suporte não possui nenhuma interferência quanto ao sinal analítico, tanto catódico, quanto anódico.

Figura 33. VCs da comparação de corrente do eletrólito suporte (LiClO_4 - cinza escuro) e do metanol puro (vermelho). Os parâmetros voltamétricos foram: tempo de pré concentração 10 segundos, potencial de pré-concentração de 0,0 V, faixa de potencial de -0,4 – 1,0 V, velocidade de varredura de potencial de 100 mV/s.

Após a etapa de verificação do metanol, foi realizada a avaliação da detecção do metabolito. Na **Figura 34** é possível verificar os voltamogramas do branco

(voltamograma azul), de 5 $\mu\text{g/mL}$ de BEC (voltamograma cinza escuro) e de 10 $\mu\text{g/mL}$ de BEC (voltamograma vermelho). Esses resultados se mostraram promissores para o desenvolvimento desse método, uma vez que o aumento da concentração leva o aumento do pico anódico.

Figura 34. Voltametria cíclica do eletrólito suporte (azul), 5 $\mu\text{g/mL}$ de BEC (preto) e de 10 $\mu\text{g/mL}$ de BEC (vermelho). Os parâmetros voltamétricos foram: tempo de pré concentração 10 segundos, potencial de pré-concentração de 0,0 V, faixa de potencial de -0,4 – 1,0 V, velocidade de varredura de potencial de 100 mV/s.

O desenvolvimento da metodologia foi inicialmente realizado avaliando a faixa de potencial de trabalho do eletrodo modificado. Na **Figura 35 a), b) e c)** apresenta os potenciais aplicados, -0,4 – 1,0 V (voltamograma vermelho), -0,2 – 1,1 V (voltamograma azul) e -0,1 – 1,1 V (voltamograma vinho). Dessa forma é possível determinar qual foi a melhor faixa de trabalho para o desenvolvimento utilizando como parâmetro de escolha a resolução do pico anódico. A faixa de potencial de -0,4 e 1,0 V apresentou a melhor resolução perante as outras faixas aplicadas.

Figura 35. Voltamogramas cíclicos da faixa de potencial aplicados para otimização do método. De -0,4 - 1,0 V (vermelho), -0,2 - 1,1V (azul) e -0,1 - 1,1 V (vinho). Os parametros voltamétricos foram: tempo de pré concentração 10 segundos, potencial de pré-concentração de 0,0 V, velocidade de varredura de potencial de 100 mV/s.

Após a determinação da faixa de trabalho, foi determinado a quantidade de complexo em massa empregado na composição da pasta de carbono. Na **Figura 36 a), b) e c)**, os voltamogramas do branco e das adições de 10 $\mu\text{g/mL}$ de BEC estão dispostas para cada porcentagem de modificador, 15% (massa), 30% (massa) e 45% (massa). A **Tabela 12** mostra os valores da diferença entre o máximo de corrente do pico anódico do branco com o valor de corrente do pico máximo da adição de padrão.

Figura 36. Voltametrias cíclicas do eletrodo de pasta de carbono modificados com a composição de a) 15% de [VO(SALEN)] executando a VC para o eletrólito suporte (cinza escuro) e na presença de 10 $\mu\text{g/mL}$ de BEC (vermelho) em b) 30% de [VO(SALEN)] executando a VC para o eletrólito suporte (cinza escuro) e na presença de 10 $\mu\text{g/mL}$ de BEC (vermelho) e em c) 45% de [VO(SALEN)] executando a VC para o eletrólito suporte (cinza escuro) e na presença de 10 $\mu\text{g/mL}$ de BEC (vermelho). O eletrólito suporte utilizado foi o LiOCl_4 . Os parâmetros voltamétricos foram: tempo de pré concentração 10 segundos, potencial de pré-concentração de 0,0 V, faixa de potencial de -0,4 – 1,0 V, velocidade de varredura de potencial de 100 mV/s.

Tabela 12. Valores da diferença entre o máximo de corrente do pico anódico do branco com o valor de corrente do pico anódico máximo na presença do padrão de BEC.

% [VO(SALEN)]	$\Delta i (i_{pa} \text{ BEC} - i_{pa} \text{ branco}) / \mu\text{A}$
15	7,6
30	8,5
45	-16,2

Os resultados obtidos na adição de complexo adicionado a pasta de carbono mostram que o valor otimizado de adição de complexo é de 30% em massa de pó de grafite. É possível observar também nos resultados que a adição de mais do que 30% de [VO(SALEN)] a corrente do pico anódico e catódico do branco é muito superior do que quando é adicionado 10 $\mu\text{g/mL}$ de analito. Esse fenômeno é devido a maior quantidade de complexo existente oxidando e reduzindo, produzindo picos maiores.

Após essas otimizações de faixa de potencial e de quantidade em massa de complexo adicionados na pasta de carbono, foram realizadas as otimizações voltamétricas visando obter o melhor pico de oxidação. Para isso, como visto nos voltamogramas do branco, existe um pico anódico por volta de 0,6 V, e a partir da adição do padrão de BEC, existe a tendência do aumento da corrente como mostra a **Figura 37**. Porém, não existe nenhum trabalho na literatura mostrando o efeito da exclusão da corrente do branco para a realização da otimização dos parâmetros voltamétricos e para confecção da curva analítica[46, 48, 63]. A partir desse ponto, a otimização dos parâmetros analíticos levou em consideração a exclusão do branco para corrente de pico anódico e também o não desconto dessa corrente. Outro ponto, foi o estudo do sistema aberto de potencial, ou seja, sem aplicar potencial para detecção do analito. Na **Figura 37 a) e b)** é possível observar a resposta do pico anódico com o aumento de velocidade (70, 80, 100, 120, 150, 175, 200 e 250 mV/s) para sistema aberto e sistema fechado, respectivamente. Na **figura 37 c)** esses valores de corrente com a velocidade foram plotados concomitantemente a efeito de comparação. É possível notar que as correntes nas determinadas velocidades para sistema fechado são maiores em relação ao sistema aberto. Esse fenômeno mostra que o sistema eletroquímico é prioritariamente regido pela adsorção da molécula na superfície do eletrodo. Dessa forma, toda a otimização do desenvolvimento eletroquímico foi realizada para o sistema fechado.

Figura 37. Voltametria cíclicas das velocidades para otimização utilizando eletrodo de pasta de carbono modificado com 30 % de [VO(SALEN)]. Em a) as velocidade utilizadas (70, 80, 100, 120, 150, 175, 200 e 250 mV/s) para otimização em sistema aberto em b) as mesmas velocidades utilizadas pra otimização em sistema fechado e em c) a comparação dos resultados obtidos ambos os sistemas (azul – 10 μg/mL de BEC ; vermelho – eletrólito suporte em sistema fechado ; verde – 10 μg/mL de BEC em sistema aberto ; preto – eletrólito suporte em sistema fechado). As voltametrias foram realizadas em 0,1 mol/ L de LiClO₄.

Para a otimização dos parâmetros, a velocidade de 120 mV/s foi escolhida para confecção da curva, uma vez que a diferença entre o i_{pa} da BEC e i_{pa} do branco foi maior em relação as outras velocidades. Sem considerar a exclusão do branco, a velocidade de 150 mV/s foi escolhida.

Em seguida, foi otimizado o potencial de pré-concentração (-1,0 ; -0,9 ; -0,8 ; -0,7 ; -0,6 ; -0,5 ; -0,4 ; -0,3 ; -0,2 ; -0,1 ; 0,0 ; 0,1 ; 0,2 ; 0,3 e 0,4 V) e os resultados estão representados na **Figura 38**. Os resultados mostram que a variação de corrente anódica (i_{pa}) do sistema varia pouco com a mudança de aplicação de potencial, assim, o potencial escolhido foi de 0,0 V tanto para o método de desconto do branco, quanto para o método de não desconto do branco.

Figura 38. Otimização do potencial de pré-concentração em sistema fechado. Os valores de potenciais aplicados (-1,0 ; -0,9 ; -0,8 ; -0,7 ; -0,6 ; -0,5 ; -0,4 ; -0,3 ; -0,2 ; -0,1 ; 0,0 ; 0,1 ; 0,2 ; 0,3 e 0,4 V) na presença do branco (vermelho) e em 10 $\mu\text{g/mL}$ de BEC (preto). Os voltamogramas foram obtidos utilizando pasta de carbono modificado com 30% de [VO(SALEN)] em 0,1 mol/ L de LiClO_4 .

A otimização do tempo de pré-concentração foi determinada utilizando os tempos de: 0, 10, 30, 60, 80 e 120 segundos. Na **Figura 39 a)** está representado o voltamograma dos tempos de pré-concentração e também para uma melhor compreensão desses tempos, foi realizado a adição de padrão (5, 10 e 15 $\mu\text{g/mL}$) de BEC. É possível observar que sem desconsiderar o branco, em concentrações mais altas, após o tempo de 60 segundos, a corrente anódica apresenta um patamar ou pode decrescer, como ocorre em 15 $\mu\text{g/mL}$. No caso de concentrações menores, como em 5 $\mu\text{g/mL}$, é possível observar que a corrente anódica apresenta o mesmo patamar do eletrólito suporte. Na **Figura 39 b)** a concentração de 10 $\mu\text{g/mL}$ foi considerada como constante e o desconto do eletrólito suporte foi realizado ($i_{\text{pa}} \text{ BEC} - i_{\text{pa}} \text{ eletrólito}$) podendo ser observado que o tempo otimizado com o desconto do eletrólito foi de 80 segundos.

Figura 39. Otimização do tempo de pré-concentração em sistema fechado. Em a) os valores de corrente em relação aos tempos de pré-concentração (0 ; 10 ; 30 ; 60 ; 80 e 120 segundos) nas concentrações de 15 $\mu g/mL$ (azul), 10 $\mu g/mL$ (branco) , 5 $\mu g/mL$ de BEC (cinza escuro) e do branco (verde). Em b) o valor de delta da corrente entre a corrente da BEC e a corrente do branco utilizando 10 $\mu g/mL$ como parâmetro. Os voltamogramas foram obtidos utilizando pasta de carbono modificada com 30% de $[VO(SALEN)]$ em 0,1 mol/L de $LiClO_4$.

A **Tabela 13** exemplifica todos os valores otimizados para velocidade, potencial de pré-concentração e tempo de pré concentração para sistema fechado, com e sem o desconto do sinal do eletrólito suporte.

Tabela 13. Valores otimizados com e sem desconto do eletrólito suporte utilizados para confecção da curva analítica.

Sem descontar o sinal do eletrólito suporte	
Velocidade de varredura (mV/s)	150
Potencial de pré-concentração (V)	0,0
Tempo de pré – concentração (s)	80
Descontando o sinal do eletrólito suporte	
Velocidade de varredura (mV/s)	120
Potencial de pré-concentração (V)	0,0
Tempo de pré – concentração (s)	80

4.15 Confeção da curva analítica com os parâmetros previamente otimizados para BEC utilizando eletrodo de pasta de carbono modificado com complexo tipo base de Schiff

Após a etapa de otimização dos parâmetros do metabolito, foi confeccionada uma curva analítica de diferentes concentrações do analito com o intuito de se obter alguns parâmetros de validação como LoD, LoQ, coeficiente de correlação linear, e equação da reta. Na **figura 40 a), b e c)** estão representadas as curvas analíticas referente a otimização pré- executada, considerando a corrente do branco, subtraindo a corrente do branco e as duas curvas concomitantes, respectivamente. Na **Tabela 14** é possível observar os valores de equação da reta, coeficiente de correção linear, LoQ e LoD.

Figura 40. Em a) curva analítica não descontando o valor da corrente do eletrólito suporte. Em b) curva analítica descontando a corrente do branco. Em c) a comparação entre as duas curvas analíticas. Os valores utilizados para confecção da curva analítica estão dispostos na **Tabela 13**. Os voltamogramas foram obtidos utilizando pasta de carbono modificado com 30% de [VO(SALEN)] em 0,1 mol/L de LiClO_4

Tabela 14. Parâmetros de validação obtidos a para a curva analítica da benzoilecgonina.

Parâmetros	Não descontando eletrólito suporte	Descontando eletrólito suporte
Equação da reta	$y = 1,52 \times 10^{-6} x - 2,63 \times 10^{-6}$	$y = 1,51 \times 10^{-6} x - 4,71 \times 10^{-6}$
Coefficiente de correlação linear	0,9896	0,9861
LoD* (µg/mL)	5,10	4,54
LoQ** (µg/mL)	16,22	13,77

*LoD= $3,3 \cdot \alpha / S$ onde α = desvio padrão do coeficiente linear da curva e S =sensibilidade, obtida através do coeficiente angular.

**LoQ= $10 \cdot \alpha / S$ onde α = desvio padrão do coeficiente linear da curva e S =sensibilidade, obtida através do coeficiente angular.

4.16 Confeção de curva analítica da cocaína base livre e benzoilecgonina com a utilização de HPLC – DAD

Completando o desenvolvimento da metodologia testada para detecção de cocaína base livre e de seu metabolito a benzoilecgonina, foi realizado o desenvolvimento também do método cromatográfico. Na **Tabela 15** é possível observar os valores já otimizados para confeção da curva analítica.

Tabela 15. Valores otimizados para confeção da curva analítica da BEC e da COC.

Parâmetros otimizados	Resultados
Coluna	C8
Composição da fase móvel	Água: Acetonitrila (75:25)
Aditivos	0,1% ácido fosfórico e TEA pH = 3,5
Fluxo (mL/min)	1,0
Temperatura da coluna (°C)	25
Comprimento de onda (nm)	195
Volume de injeção (µL)	25

A **Figura 41** mostra o *screening* da resposta cromatográfica para o método otimizado. É possível verificar que apesar da estrutura molecular das duas moléculas serem próximas em relação aos grupos funcionais, a molécula de benzoilecgonina possui polaridade maior ($\log P_{BEC} = 1,70$) em relação a molécula de cocaína base livre ($\log P_{coc} = 2,30$) assim, como esperado, o metabolito apresentou tempo de retenção menor do que da cocaína.

Figura 41. Cromatograma do Screening da BEC e da COC. Os picos cromatográficos representam 12 $\mu\text{g/mL}$ de cada analito. O pico da COC ocorre entre 8 e 8,55 minutos e da BEC ocorre entre 3,97 e 4,65 minutos. Os valores otimizados para detecção estão dispostos na **Tabela 15**.

A partir dos resultados obtidos na otimização do método, foi confeccionada uma curva analítica para cada analito. Na **Figura 42** está disposto o cromatograma com a curva analítica da cocaína base livre e na **Figura 43** o cromatograma com a curva analítica da benzoilecgonina. Na **Tabela 16** é possível observar os valores de equação da reta, coeficiente de correção linear, LoQ e LoD.

Figura 42. Cromatograma com sua respectiva curva analítica da COC. As concentrações foram 1,0; 2,0; 5,0; 10,0; 20,0 e 50 $\mu\text{g/mL}$. Os valores otimizados para confecção da curva analítica estão dispostos na **Tabela 15**.

Figura 43. Cromatograma com sua respectiva curva analítica da BEC. As concentrações foram 0,5 ; 1,0 ; 2,0 ; 5,0 ; 8,0 e 12,0 µg/mL. Os valores otimizados para confecção da curva analítica estão dispostos na Tabela 15.

Tabela 16. Valores de equação da reta, coeficiente de correção linear, LoQ e LoD.

Parâmetros	BEC	COC
Equação da reta	$y = 1,86x - 0,2256$	$y = 0,97x - 0,3530$
Coeficiente de correlação linear	0,9993	0,9996
LoD*(µg/mL)	0,010	0,043
LoQ** (µg/mL)	0,030	0,130

*LoD= $3,3 \cdot \alpha / S$ onde α = desvio padrão do coeficiente linear da curva e S =sensibilidade, obtida através do coeficiente angular.

**LoQ= $10 \cdot \alpha / S$ onde α = desvio padrão do coeficiente linear da curva e S =sensibilidade, obtida através do coeficiente angular.

4.17 Comparações entre os valores e resultados obtidos na detecção direta utilizando as voltametrias e cromatografia líquida.

A Tabela 17 representa os resultados de LoD e LoQ obtidos para os métodos desenvolvidos neste trabalho, os resultados provenientes de trabalhos anteriores do grupo de pesquisa e com a da literatura, na qual as análises foram realizadas empregando-se pasta de carbono com ou sem modificação para análises de cocaína base livre. Enquanto as análises realizadas pelo grupo foram feitas utilizando cloridrato em acetonitrila, este utilizou-se de meios alcoólicos (metanol e etanol). A tabela ainda apresenta os limiares analíticos para as técnicas cromatográficas empregadas no trabalho.

Apesar da cromatografia líquida ter apresentado valores de LoD e LoQ inferiores aos métodos voltamétricos (ordem de ng/mL), esta última mostra-se vantajosa no que diz respeito à análise de amostras biológicas, como a saliva, uma vez que faz-se necessário a etapa de preparo de amostras antes da própria análise cromatográfica, muitas vezes de forma exaustiva. Uma limitação na utilização da saliva artificial apresentada nesse trabalho, é que nesse caso, a saliva artificial não possui a viscosidade da saliva biológica e também não foram utilizados as proteínas comuns contidas nesses fluídos. A presença de proteínas na saliva podem ser potenciais interferentes no sinal anódico da cocaína base livre.

Em relação ao preparo de amostras mencionado no parágrafo anterior, Os trabalhos buscados na literatura, como por exemplo, o trabalho de Fernandez e colaboradores emprega extração assistida por micro-ondas e extração líquido-líquido para obtenção de COC, BEC e outros compostos antes da análise cromatográfica propriamente dita [64]. Os valores de LoD e LoQ por ele obtidos estão de acordo com os métodos aqui desenvolvidos [64].

A análise da cocaína base livre também foi realizada em etanol como solvente, comprovando que sua detecção é possível mesmo em solventes menos tóxicos e de menor impacto ambiental. Além do mais, o custo é um fator decisivo. Assim, é importante mencionar que o etanol utilizado para aplicação neste trabalho foi o de limpeza de superfícies. Outra vantagem em relação a cromatografia líquida, portanto, se dá pela possibilidade de se utilizar solventes de pureza menor, uma vez que esses poderiam conter impurezas que afetariam a coluna cromatográfica, injetor e consequentemente a eficiência das análises.

Quanto aos métodos voltamétricos, os trabalhos envolvendo a determinação de cocaína base livre e cloridrato em metanol e acetonitrila, respectivamente, por VOQ, em comparação com o da cocaína base livre em etanol por VC, comprovam a viabilidade do uso de etanol. Deste comparativo observa-se também que meios alcoólicos favorecem os limiares analíticos e que, embora o etanol tenha apresentado valores de LoD e LoQ maiores do que para o metanol (**Tabela 17**), possui menor custo e oferece menor toxicidade ao analista.

A detecção direta do metabolito BEC descontando ou não descontando a corrente do eletrólito suporte, aplicando voltametria cíclica, a priori foi possível, apesar de os valores obtidos de LoD e LoQ serem altos para análises toxicológicas. Trabalhos na literatura com uso de HPLC-DAD para detecção e quantificação de BEC em urina

mostram que os resultados aqui obtidos são relativamente satisfatórios. Por exemplo, Fernandéz e colaboradores mostra em seus resultados que apenas 5 casos apresentaram concentrações de BEC inferiores ao LoD exposto neste trabalho [66]. Quanto ao LoQ, 9 foram os casos em que a concentração obtida foi menor do que a obtida [66]. Dessa forma, faz-se necessário buscar novos modificadores para detecção e quantificação deste produto de biotransformação da cocaína, à fim de melhorar ambos os limiares analíticos em amostras biológicas, mas visando a metodologia de detecção direta da BEC. Ressalta-se, entretanto, que a técnica empregando o eletrodo modificado com [VO(SALEN)] é relativamente inovadora e aplicando-se mais estudos sobre esse sistema, a mesma pode ter um grande potencial para aplicação em matrizes complexas como por exemplo, a urina.

Concluindo, comparando as análises voltamétricas apresentadas na **Tabela 17**, é possível verificar a flexibilidade para detecção de cocaína base livre, podendo essa ser detectada em amostra apreendida, na forma de “crack” e também em matrizes biológicas como saliva. Também é possível observar que a utilização de álcoois na solubilização das amostras de cocaína obteve-se valores menores de LoD e LoQ, sendo que a utilização de etanol em comparação a acetonitrila para detecção em amostras apreendidas uma alternativa quanto ao custo, uma vez que é possível empregar etanol de limpeza. A amostra de cloridrato de cocaína, apresentada como valores comparativos de LoQ e LoD maiores quando comparados com os apresentados nesse trabalho.

Tabela 17. Comparação entre molécula, solvente utilizado, eletrodo de trabalho, método, LoD e LoQ, e variações e resultados relacionados a cromatografia. Também foram utilizados a fim de comparação, valores do trabalho anterior do grupo relacionados a cocaína base livre e o cloridrato de cocaína [65].

Métodos voltamétricos					
Molécula	Solvente	Eletrodo de trabalho	Método	LoD / $\mu\text{g/mL}$	LoQ / $\mu\text{g/mL}$
COC base livre	Metanol	Pasta de carbono sem modificador	Voltametria de onda quadrada	0,88	2,67
COC Base livre	Etanol	Pasta de carbono sem modificador	Voltametria cíclica	1,30	3,96
BEC	Metanol	Pasta de carbono sem modificador	Voltametria de onda quadrada	-	-
BEC – sem descontar o branco	Metanol	Pasta de carbono com modificador [VO(SALEN)]	Voltametria cíclica	4,54	13,77
BEC – descontando o branco	Metanol	Pasta de carbono com modificador [VO(SALEN)]	Voltametria cíclica	5,10	16,22
COC base livre [65]	Acetonitrila	Pasta de carbono sem modificador	Voltametria de onda quadrada	2,96	9,88
Cloridrato de cocaína [65]	Água e H^+	Pasta de carbono sem modificador	Voltametria de onda quadrada	1,42	4,69
Método cromatográfico					
Molécula	Solvente	Coluna	Tipo de cromatografia	LoD / $\mu\text{g/mL}$	LoQ / $\mu\text{g/mL}$
BEC	Metanol	C8	Líquida	0,010	0,030
COC	Metanol	C8	Líquida	0,043	0,130

5 Conclusão

Com esses resultados obtidos neste trabalho, foi possível inicialmente concluir que o eletrodo de pasta de carbono, sendo o mesmo modificado ou não, pode ser confeccionado e empregado de forma simples e rápida em técnicas voltamétricas para cocaína e seu principal metabólito, a benzoilecgonina.

A detecção da cocaína base livre pode ser realizada tanto em saliva quanto em amostras apreendidas com o emprego do metanol e etanol, respectivamente. Essas detecções acompanhadas pelas determinadas curvas analíticas são importantes para aplicação da técnica no campo forense, mostrando sua versatilidade e adaptabilidade em diversas aplicações.

Como discutido anteriormente, ainda faltam métodos para detecção direta de metabolitos da cocaína, em especial a BEC, utilizando voltametrias. Com a utilização de complexos tipo Base de Schiff, foi possível fazer o estudo do metabólito quanto sua detecção e suas características perante ao complexo, utilizando fatores não abordados na literatura, como o desconto da corrente do eletrólito suporte.

As técnicas cromatográficas mostram valores de LoD e LoQ menores do que as técnicas voltamétricas para COC e para BEC, porém, essas técnicas ainda precisam de um pré-tratamento mais custoso em relação as técnicas voltamétricas.

6 Referências

1. Oliveira, N.G. and R.J. Dinis-Oliveira, *Drugs of abuse from a different toxicological perspective: an updated review of cocaine genotoxicity*. Archives of Toxicology, 2018. **92**(10): p. 2987-3006.
2. World Health Organization Available from: http://www.who.int/substance_abuse/terminology/who_lexicon/en/.
3. Mobaraki, F., et al., *Effects of MDMA (ecstasy) on apoptosis and heat shock protein (HSP70) expression in adult rat testis*. Toxicology Mechanisms and Methods, 2018. **28**(3): p. 219-229.
4. Castiglioni, S., et al., *Identification and measurement of illicit drugs and their metabolites in urban wastewater by liquid chromatography-tandem mass spectrometry*. Analytical Chemistry, 2006. **78**(24): p. 8421-8429.
5. Cone, E.J., *Legal, workplace, and treatment drug testing with alternate biological matrices on a global scale*. Forensic Science International, 2001. **121**(1-2): p. 7-15.
6. Crime, U.N.O.o.D.a., *World Drug Report 2018* 2018, United Nations Office on Drugs and Crime.
7. *National Survey on Drug Use and Health (NSDUH)*. 2016; Available from: <https://www.samhsa.gov/data/sites/default/files/NSDUH-FFR1-2016/NSDUH-FFR1-2016.pdf>.
8. Polícia Federal. Available from: <http://www.pf.gov.br/>.
9. Dinis-Oliveira, R.J., *Licit and Illicit Uses of Medicines*. Acta Medica Portuguesa, 2014. **27**(6): p. 755-766.
10. David E. Golan, A.H.T.J., Ehrin J. Armstrong, April W. Armstrong, *Principles of Pharmacology: The Pathophysiologic Basis of Drug Therapy*. Vol. 1. 2012.
11. Benowitz, N.L., *Clinical-Pharmacology and Toxicology of Cocaine (Vol 72, Pg 3, 1993)*. Pharmacology & Toxicology, 1993. **72**(6): p. 343-343.
12. Zentner, J.L., *Cocaine - Pharmacology, Effects, and Treatment of Abuse - Grabowski, J.* Journal of Psychoactive Drugs, 1985. **17**(2): p. 135-137.
13. Das, G., *Cocaine abuse in North America: a milestone in history*. J Clin Pharmacol, 1993. **33**(4): p. 296-310.
14. Cregler, L.L. and H. Mark, *Medical Complications of Cocaine Abuse*. New England Journal of Medicine, 1986. **315**(23): p. 1495-1500.

15. Goldstein, R.A., C. DesLauriers, and A.M. Burda, *Cocaine: History, Social Implications, and Toxicity - A Review*. *Dm Disease-a-Month*, 2009. **55**(1): p. 6-38.
16. Jatlow, P., *Cocaine - Analysis, Pharmacokinetics, and Metabolic Disposition*. *Yale Journal of Biology and Medicine*, 1988. **61**(2): p. 105-113.
17. Pavlova, V., et al., *Studying electrode mechanism and analytical determination of cocaine and its metabolites at the mercury electrode using square-wave voltammetry*. *Analytica Chimica Acta*, 2004. **512**(1): p. 49-56.
18. Warner, A. and A.B. Norman, *Mechanisms of cocaine hydrolysis and metabolism in vitro and in vivo: A clarification*. *Therapeutic Drug Monitoring*, 2000. **22**(3): p. 266-270.
19. Stewart, D.J., et al., *Hydrolysis of Cocaine in Human-Plasma by Cholinesterase*. *Life Sciences*, 1977. **20**(9): p. 1557-1564.
20. Graffeo, A.P., D.C.K. Lin, and R.L. Foltz, *Analysis of Benzoyllecgonine in Urine by High-Performance Liquid-Chromatography and Gas Chromatography Mass Spectrometry*. *Journal of Chromatography*, 1976. **126**(Nov3): p. 717-722.
21. Fernandez-Lopez, L., et al., *Development and validation of a gas chromatography-mass spectrometry method for opiates and cocaine in human bone*. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2019. **164**: p. 636-641.
22. Ellefsen, K.N., et al., *Cocaine and benzoyllecgonine oral fluid on-site screening and confirmation*. *Drug Testing and Analysis*, 2016. **8**(3-4): p. 296-303.
23. Mule, S.J. and G.A. Casella, *Confirmation and quantitation of cocaine, benzoyllecgonine, ecgonine methyl ester in human urine by GC/MS*. *J Anal Toxicol*, 1988. **12**(3): p. 153-5.
24. Fernandez, P., et al., *HPLC-DAD determination of opioids, cocaine and their metabolites in plasma*. *Forensic Science International*, 2006. **161**(1): p. 31-35.
25. Vinkovic, K., N. Galic, and M.G. Schmid, *Micro-HPLC-UV analysis of cocaine and its adulterants in illicit cocaine samples seized by Austrian police from 2012 to 2017*. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 2018. **41**(1): p. 6-13.
26. Lambert, W.E., J.F. VanBocxlaer, and A.P. DeLeenheer, *Potential of high-performance liquid chromatography with photodiode array detection in forensic toxicology*. *Journal of Chromatography B*, 1997. **689**(1): p. 45-53.

27. Atay, O. and F. Oztop, *Quantitative determination for cocaine HCl in synthetic binary mixtures by using spectrophotometric methods*. Analytical Letters, 1998. **31**(15): p. 2663-2678.
28. Bruni, A.T.V.J.A.D.O., M.F, *Fundamentos de Química Forense*. 2 ed, ed. 2. Vol. 1. 2019, Campinas: Millennium. 400.
29. DRUGS, S.W.G.F.T.A.O.S., *SCIENTIFIC WORKING GROUP FOR THE ANALYSIS OF SEIZED DRUGS (SWGDRUG) RECOMMENDATIONS*. 2016.
30. Abedul, M.T.F., et al., *Voltammetric Determination of Cocaine in Confiscated Samples*. Electroanalysis, 1991. **3**(4-5): p. 409-412.
31. Komorsky-Lovric, S., I. Galic, and R. Penovski, *Voltammetric determination of cocaine microparticles*. Electroanalysis, 1999. **11**(2): p. 120-123.
32. Rocha, D.P., et al., *Electrochemically Reduced Graphene Oxide for Forensic Electrochemistry: Detection of Cocaine and its Adulterants Paracetamol, Caffeine and Levamisole*. Electroanalysis, 2017. **29**(11): p. 2418-2422.
33. Elgrishi, N., et al., *A Practical Beginner's Guide to Cyclic Voltammetry*. Journal of Chemical Education, 2018. **95**(2): p. 197-206.
34. Skoog , D.A.W., D. M.; Holler, F. J.; Crouch, S. R. , *Fundamentos de química analítica*, ed. 2ªed. 2014.
35. Wang, J., *Analytical electrochemistry*, ed. 2ª. 2000, Ner Jersey: Wiley-VCH.
36. Bard, A.F., L. R., *Eletrochemical methods: fundamentals and applications*, ed. 2ªed. 2001, New York: Wiley.
37. A, B.A.M.C.B.O.M., *Eletrochemistry - Principles, Methods, and Applications*. 1994, Oxford.
38. Sandford, C., et al., *A synthetic chemist's guide to electroanalytical tools for studying reaction mechanisms*. Chemical Science, 2019. **10**(26): p. 6404-6422.
39. Douglas Skoog, D.W., James Holler, Stanely Crouch, *Fudamentos de química analítica 2*. 2014: Brasil. 1088.
40. Mirceski, V., et al., *Square-Wave Voltammetry: A Review on the Recent Progress*. Electroanalysis, 2013. **25**(11): p. 2411-2422.
41. Metrohm. [cited 2019 20/04/2019]; Available from: <https://www.metrohm.com>.
42. McCreery, R.L., *Advanced carbon electrode materials for molecular electrochemistry*. Chemical Reviews, 2008. **108**(7): p. 2646-2687.
43. Murray, R.W., *Chemically Modified Electrodes*. Accounts of Chemical Research, 1980. **13**(5): p. 135-141.

44. SOUSA, M.F.B., *Eletrodos Quimicamente Modificados Aplicados à Eletroanálise*. Química Nova, 1996. **20**: p. 5.
45. Pournara, A.D., et al., *Chemically modified electrodes with MOFs for the determination of inorganic and organic analytes via voltammetric techniques: a critical review*. Inorganic Chemistry Frontiers, 2019. **6**(12): p. 3440-3455.
46. de Oliveira, L.S., et al., *Voltammetric analysis of cocaine using platinum and glassy carbon electrodes chemically modified with Uranyl Schiff base films*. Microchemical Journal, 2013. **110**: p. 374-378.
47. Xu, Y., et al., *A novel and green cellulose-based Schiff base-Cu (II) complex and its excellent antibacterial activity*. Carbohydr Polym, 2020. **230**: p. 115671.
48. Ribeiro, M.F.M., et al., *Voltammetric Determination of Cocaine Using Carbon Screen Printed Electrodes Chemically Modified with Uranyl Schiff Base Films*. Electroanalysis, 2016. **28**(2): p. 320-326.
49. Chen, S.J., et al., *Lysosome-targeted iridium(iii) compounds with pyridine-triphenylamine Schiff base ligands: syntheses, antitumor applications and mechanisms*. Inorganic Chemistry Frontiers, 2020. **7**(1): p. 91-100.
50. Oiyee, N., et al., *Electrochemical Sensors Containing Schiff Bases and their Transition Metal Complexes to Detect Analytes of Forensic, Pharmaceutical and Environmental Interest. A Review*. Critical Reviews in Analytical Chemistry, 2019. **49**(6): p. 488-509.
51. Raymundo-Pereira, P.A., et al., *Electrochemical sensor for ranitidine determination based on carbon paste electrode modified with oxovanadium (IV) salen complex*. Materials Science & Engineering C-Materials for Biological Applications, 2013. **33**(7): p. 4081-4085.
52. Tozzo, E., et al., *X-ray Studies of some Tetradentate Schiff Base Oxovanadium(IV) Complexes*. Acta Crystallographica a-Foundation and Advances, 2005. **61**: p. C304-C304.
53. David, H.L., et al., *Thermal-Decomposition of Vanadyl Schiff-Base Compounds*. Thermochimica Acta, 1992. **202**: p. 45-50.
54. Teixeira, M.F.S., et al., *Voltammetric determination of dipyrone using a N,N '-ethylenebis(salicylideneaminato)oxovanadium(IV) modified carbon-paste electrode*. Journal of the Brazilian Chemical Society, 2004. **15**(6): p. 803-808.
55. Bergamini, M.F., et al., *Evaluation of different voltammetric techniques in the determination of amoxicillin using a carbon paste electrode modified with [N,N '-*

- ethylenebis(salicylideneaminato)] oxovanadium(IV)*. Journal of the Electrochemical Society, 2006. **153**(5): p. E94-E98.
56. Shaw, L. and L. Dennany, *Applications of electrochemical sensors: Forensic drug analysis*. Current Opinion in Electrochemistry, 2017. **3**(1): p. 23-28.
  57. Komorsky-Lovric, S., S. Gagic, and R. Penovski, *Voltammetric determination of benzoylecgonine*. Analytica Chimica Acta, 1999. **389**(1-3): p. 219-223.
  58. Oiyee, E.N., et al., *Voltammetric determination of cocaine in confiscated samples using a cobalt hexacyanoferrate film-modified electrode*. Forensic Science International, 2009. **192**(1-3): p. 94-97.
  59. Bernalte, E., C.M. Sanchez, and E.P. Gil, *Gold nanoparticles-modified screen-printed carbon electrodes for anodic stripping voltammetric determination of mercury in ambient water samples*. Sensors and Actuators B-Chemical, 2012. **161**(1): p. 669-674.
  60. Lukasz Poltorak, E.J.R.S., Marcel de Puit, *Electrochemical cocaine (bio)sensing. From solid electrodes to soft junctions*. Trends in Analytical Chemistry, 2019. **113**.
  61. Kim, K.Y. and L.M. Bornheim, *Determination of esterase-catalyzed cocaine metabolite formation by high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection*. Journal of Chromatographic Science, 1997. **35**(6): p. 287-290.
  62. Dronova, M., E. Smolianitski, and O. Lev, *Electrooxidation of New Synthetic Cannabinoids: Voltammetric Determination of Drugs in Seized Street Samples and Artificial Saliva*. Analytical Chemistry, 2016. **88**(8): p. 4487-4494.
  63. Shahrokhian, S. and M. Ghalkhani, *Voltammetric determination of methimazole using a carbon paste electrode modified with a Schiff base complex of cobalt*. Electroanalysis, 2008. **20**(10): p. 1061-1066.
  64. Fernandez, R., et al., *Comparison of two extraction procedures for determination of drugs of abuse in human saliva by high-performance liquid chromatography*. Journal of Applied Toxicology, 2008. **28**(8): p. 998-1003.
  65. OLIVA, P.H.B., et al., *Determination of Cocaine by Square Wave Voltammetry with Carbon Paste Electrodes*. Brazilian Journal of Forensic Sciences, Medical Law and Bioethics, 2019. **8**: p. 149 - 164.