

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO PIAUÍ

CENTRO DE CIÊNCIAS DA NATUREZA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

**DESENVOLVIMENTO E APLICAÇÃO DE
ELETRODOS DE GRAFITE DE PILHAS RECICLADAS
PARA DETECÇÃO DE CLONAZEPAM EM BEBIDAS
ALCOÓLICAS**

ELIEMY FERNANDES DE SOUSA BEZERRA

Orientador: Prof. Dr. Roberto Alves De Sousa Luz

Coorientador: Prof. Dr. Everson Thiago Santos Gerôncio Da Silva

**Teresina – PI
2023**

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO PIAUÍ

CENTRO DE CIÊNCIAS DA NATUREZA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

**DESENVOLVIMENTO E APLICAÇÃO DE
ELETRODOS DE GRAFITE DE PILHAS RECICLADAS
PARA DETECÇÃO DE CLONAZEPAM EM BEBIDAS
ALCOÓLICAS**

ELIEMY FERNANDES DE SOUSA BEZERRA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Estadual do Piauí, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Química – Área de concentração: Química.

Orientador: Prof. Dr. Roberto Alves de Sousa Luz

Coorientador: Prof. Dr. Everson Thiago Santos
Gerônimo Da Silva

Teresina – PI

2023

DESENVOLVIMENTO E APLICAÇÃO DE ELETRODOS DE GRAFITE DE PILHAS RECICLADAS PARA DETECÇÃO DE CLONAZEPAM EM BEBIDAS ALCOÓLICAS

ELIEMY FERNANDES DE SOUSA BEZERRA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Estadual do Piauí, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Química – Área de concentração: Química.

Aprovado em 31 de março de 2023.

Membros da Banca:

Prof. Dr. Roberto Alves de Sousa Luz
(Presidente da Banca – UESPI)

Prof. Dr. Vitor Alexandre Nunes de Carvalho
(Membro Titular – IFMA)

Prof(a). Dr(a). Rejane Maria Pereira da Silva
(Membro Titular – UESPI)

Prof. Dr. Reginaldo da Silva Santos
(Membro Suplente – UESPI)

*Dedico este trabalho aos meus pais, meus irmãos, meu esposo e filha, meus amigos pela força e companheirismo. Vocês são meu alicerce e força sempre.
Amo vocês!*

AGRADECIMENTOS

- ❖ Agradeço a Deus por todas as oportunidades e benções concedidas durante minha vida.
- ❖ Aos meus pais Marco Antonio e Lucia Fernandes, por todo esforço e incentivos diários, e aos meus irmãos.
- ❖ A minha querida professora Graça Ciríaco (em memória), por ter sido uma professora de um coração incrível, por ter sido minha maior motivadora a ingressar no mestrado, e crescer profissionalmente, todo meu carinho e respeito pela senhora, sempre levarei seus conselhos e palavras amigas no meu coração.
- ❖ Ao professor Francisco das Chagas (Chicão) por ter sido além de um orientador na graduação, um exímio motivador mesmo após a finalização da graduação, obrigada pelos conselhos, ajuda, e motivações fornecidas sempre professor, foram cruciais para finalização desse mestrado.
- ❖ Ao meu orientador, Dr. Roberto Alves de Sousa Luz, pelos ensinamentos, conhecimento compartilhado, apoio e compreensão durante minha pesquisa.
- ❖ Ao meu coorientador, Prof. Dr. Everson Thiago pela coorientação durante o desenvolvimento dessa pesquisa, apoio e conhecimento compartilhado.
- ❖ Ao Laboratório de Automontagem Supramolecular (LAS), pelo fornecimento de materiais e equipamentos que foram importantes para realização do meu trabalho.
- ❖ Aos meus amigos Krislany, Herbert, Weider, Bruna Rafaela, Dannusa, Marcos e Rafael, pela amizade, apoio e parceria oferecida em todos os momentos.
- ❖ Aos meus colegas de luta da pesquisa Angélica, Ana Paula, Aurileide, Jéssica, João Paulo, Caio, Ismagno, Germano e Lucas, por todos os conhecimentos compartilhados.
- ❖ Ao amigo Alexandre e sua esposa pela ajuda concedida para o desenvolvimento deste trabalho e pelas motivações diárias concedidas.

- ❖ Ao Departamento de Química e ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Estadual do Piauí pela oportunidade concedida.
- ❖ Ao Departamento de Química e ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal do Piauí, Campus Petrônio Portela, que possibilitaram a realização deste trabalho.
- ❖ Ao professor Edvan por toda motivação conciliada a um bom café concedido durante a jornada laboratorial.
- ❖ A todos que, direta ou indiretamente contribuíram para a execução dessa dissertação de mestrado.
- ❖ A FAPEPI pela bolsa concedida.

“O sucesso nasce do querer, da determinação e persistência em se chegar a um objetivo. Mesmo não atingindo o alvo, quem busca e vence obstáculos, no mínimo fará coisas admiráveis.”
(José de Alencar)

RESUMO

A detecção e quantificação de fármacos ansiolíticos e hipnóticos como o clonazepam (Rivotril®) é de grande interesse na área forense devido a sua utilização em bebidas alcoólicas para facilitar casos de abusos sexuais. De modo geral, torna-se necessário o desenvolvimento de métodos analíticos sensíveis e precisos para a detecção destes analitos, levando em conta que essas drogas são rapidamente metabolizadas e excretadas do corpo, e que as técnicas convencionais, como imunoensaios, espectrometrias de massa e espectroscopia de fluorescência, apresentam certa lentidão, são relativamente caras, consistem em procedimentos mais complexos de preparo de amostras, exigindo assim analistas altamente qualificados. Nesse contexto, o presente estudo descreve pela primeira vez a fabricação e avaliação eletroquímica de uma plataforma simples e altamente sensível para detecção de clonazepam (CZP), produzida a partir de eletrodos de carbono grafite (BGE) obtidos de pilhas AA (1,5V) descarregadas. Portanto, por meio da técnica de voltametria cíclica foi investigado o comportamento eletroquímico do CZP, os efeitos do pH e da velocidade varredura nas correntes e potenciais de pico. Verificou-se que o BGE apresenta elevada atividade eletrocatalítica frente a redução do CZP, com um pico catódico irreversível sendo observado em -0,57 V atribuído a redução do grupo nitro CZP (NO_2) a hidroxilamina (NHOH). Utilizando a técnica de voltametria de pulso diferencial, observou-se um aumento linear das correntes de redução em função da concentração de CZP na faixa de 6,6 a 78,4 $\mu\text{mol L}^{-1}$, com alta sensibilidade (0,19 $\mu\text{A } \mu\text{mol L}^{-1}$) e limite de detecção de 0,42 $\mu\text{mol L}^{-1}$. O sensor eletroquímico proposto foi então aplicado para detectar CZP em amostras reais de bebidas alcólicas, mostrando-se altamente seletivo para detecção da droga mesmo sendo aplicado em uma matriz complexa contendo uma série de outros compostos que poderiam ser detectados como interferentes. Portanto, este trabalho proporciona uma estratégia promissora para a fabricação de eletrodos reproduzíveis e de baixo custo para detecção de clonazepam em bebidas.

Palavras-chave: Clonazepam; Sensor eletroquímico; Eletrodo de grafite de pilha; Voltametria de pulso diferencial; Voltametria cíclica.

ABSTRACT

The detection and quantification of anxiolytic and hypnotic drugs such as clonazepam (Rivotril®) is of great interest in the forensic area due to its use in alcoholic beverages to facilitate sexual abuse cases. In general, the development of sensitive and accurate analytical methods for the detection of these analytes becomes necessary, taking into account that these drugs are rapidly metabolized and excreted from the body, and that conventional techniques such as immunoassays, mass spectrometry and fluorescence spectroscopy are slow, relatively expensive, consist of more complex sample preparation procedures, and thus require highly skilled analysts. In this context, the present study describes for the first time the fabrication and electrochemical evaluation of a simple and highly sensitive platform for clonazepam (CZP) detection, produced from carbon graphite electrodes (BGE) obtained from discharged AA batteries (1.5V). Therefore, by means of the cyclic voltammetry technique the electrochemical behavior of CZP, the effects of pH and sweep speed on currents and peak potentials were investigated. It was found that the BGE presents high electrocatalytic activity against the reduction of CZP, with an irreversible cathodic peak being observed at -0.57 V attributed to the reduction of the nitro group CZP (NO₂) to hydroxylamine (NHOH). Using the differential pulse voltammetry technique, a linear increase in reduction currents was observed as a function of CZP concentration in the range of 6.6 to 78.4 μmol L⁻¹, with high sensitivity (0.19 μA μmol L⁻¹) and detection limit of 0.42 μmol L⁻¹. The proposed electrochemical sensor was then applied to detect CZP in real samples of alcoholic beverages, proving to be highly selective for detection of the drug even when applied in a complex matrix containing a number of other compounds that could be detected as interferents. Therefore, this work provides a promising strategy for the fabrication of reproducible and low-cost electrodes for clonazepam detection in beverages.

Keywords: Clonazepam; Electrochemical sensor; Battery graphite electrode; Differential pulse voltammetry; Cyclic voltammetry.

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1. Representação da estrutura química de uma benzodiazepina (a) e estrutura básica dos benzodiazepínicos (b). Adaptada de 40.	20
Figura 2.2. Representação da estrutura química do CZP e os valores de seus pKas: $pK_{a1} = 1,5$; $pK_{a2} = 10,5$. $315,72 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$. Adaptada de ⁵⁶	21
Figura 2.3. Produtos de biotransformação do clonazepam e nitrazepam via nitrorredução ⁵⁹	22
Figura 2.4. Voltamograma cíclico para um processo redox de um sistema reversível da técnica de VC (A); Representação do sinal de excitação proveniente da técnica VC (B); Voltamograma cíclico para um processo redox de um sistema quase irreversível e irreversível (C). Adaptado de 68.	27
Figura 2.5. Representação esquemática de sinais de excitação para voltametria de pulso diferencial.	28
Figura 2.6. Tipos de eletrodos de carbono mais reportados na área eletroquímica. Fonte: De autoria própria.....	30
Figura 2.7. Seção transversal de uma pilha Zinco-carbono. Fonte: adaptada de ¹²⁵ .	32
Figura 3.1. Etapas de obtenção e limpeza do BGE. Fonte: Elaboração própria.	34
Figura 3.2. Célula eletroquímica utilizada com 3 eletrodos. Fonte: De autoria própria.	35
Figura 3.3. Esquema ilustrativo procedimento das análises voltamétricas. Fonte: De autoria própria.	36
Figura 4.1. Voltamogramas cíclicos para o BGE completamente isolado (—) e com a área de trabalho exposta (—) em solução $K_4[Fe(CN)_6]$ 1 mmol L^{-1} com KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ a 50 mVs^{-1}	40
Figura 4.2. (a) Voltamogramas cíclicos obtidos em diferentes velocidades de varredura ($5\text{-}100 \text{ mVs}^{-1}$). para o BGE em uma solução de $K_4[Fe(CN)_6]$ $1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ em KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$. (b) Fit linear das variações das correntes de pico anódica e catódica de versus a de raiz quadrada da velocidade de varredura ($V^{1/2}$).	41
Figura 4.3. Voltamogramas cíclicos registrados no BGE em $0,1 \text{ M PBS pH } 7,0$ a 50 mVs^{-1} (___) na ausência e (___) na presença de $45,9 \mu\text{M CZP}$ sobre a faixa de $0,45$ a $-0,80 \text{ V}$	43
Figura 4.4. Estrutura química de CZP mostrando os três diferentes grupos eletroativos $C=O$ (1), NO_2 (2) e $C=N$ (3). Adaptado de ⁴⁸	44
Figura 4.5. Voltamogramas cíclicos registrados na BGE em $0,1 \text{ M PBS pH } 7,0$ a 50 mVs^{-1} (___) na ausência e presença (___) de $45,9 \mu\text{M CZP}$ sobre a faixa de $0,45 \text{ V}$ a $-0,80$	45

Figura 4.6. Voltamogramas cíclicos no BGE em 0.1molL ⁻¹ PBS (pH 7.0) em diferentes velocidades de varreduras: 20, 50, 75,100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450 e 500mVs – 1.....	46
Figura 4.7. Ajuste linear entre a intensidade de corrente catódica para o processo C1 e a raiz quadrada da velocidade de varredura(V ^{1/2}).....	47
Figura 4.8. Ajuste linear entre a intensidade de corrente anódica para o processo A1 e a velocidade de varredura (V).	48
Figura 4.9. Ajuste linear entre a intensidade de corrente anódica para o processo C2 e a raiz quadrada da velocidade de varredura(V ^{1/2}).....	48
Figura 4.10. Ajuste linear entre o log da intensidade de corrente catódica para o processo C1 e o log da velocidade de varredura (V).....	49
Figura 4.11. Ajuste linear entre o log da intensidade de corrente anódica para o processo A1 (a), para o processo C2 (b) versus o log da velocidade de varredura.	50
Figura 4.12. Mecanismo de eletrorredução C1 e do par redox A1/C2 do CZP no BGE. Fonte: De autoria própria.....	51
Figura 4.13. Voltamogramas cíclicos registrados no BGE em 0,1 MolL ⁻¹ PBS pH 7.0 a 50 mVs ⁻¹ sobre duas faixas potenciais diferentes: -0,25 V a -0,80 V e -0,25 V a 0,45 V.....	52
Figura 4.14. (a) 80 ciclos voltamétricos consecutivos obtidos para BGE em PBS 0,1molL ⁻¹ (pH 7,0) na presença de 45,9 µM CZP a 50 mV s ⁻¹ ; (b) Diminuição da intensidade de corrente de pico para o processo C1 em função do número de varreduras.	53
Figura 4.15. Voltamogramas de pulso diferencial (VPDs) de 45,9 µM de CZP no BGE em PBS 0,1M em diferentes pHs (2,0-9,0).....	54
Figura 4.16. Dependência do potencial de pico de redução (Ep,C1) e da corrente de pico de redução (Ip, C1) de 45,9 µM de CZP no BGE em pHs (de 2,0 a 9,0) em solução tampão PBS 0.1molL ⁻¹	55
Figura 4.17. VPDs de diferentes concentrações de CZP (6,6-78. 4 µM) em PBS (pH = 7.0, 0.1 MolL ⁻¹) e (inset) regressão linear das correntes de pico de redução em função das concentrações de CZP.....	56
Figura 4.18. Marcas de cervejas analisadas a) marcas nacionais; b) marcas internacionais Fonte: Arquivo pessoal.....	59
Figura 4.19. Voltamogramas de pulso diferencial detecção de 45,9Um de CZP em amostras de cervejas.	59

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1. Valores de pKa e log P para compostos da classe do benzodiazepínicos ⁵⁴ ("Clarke's Analysis of Drugs and Poisons", 2023).	19
Tabela 4.1. Valores de coeficiente angular e área eletroativa equivalentes às curvas de correntes de pico anódica e catódica em função de $v^{1/2}$	42
Tabela 4.2. Diferentes técnicas de detecção relatadas ao longo da literatura para a detecção de drogas CZP.	57

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

BZPs – Benzodiazepínicos

CZP– Clonazepam

BGE –Battery Graphite Electrode

DFC – Drogas facilitadoras de crimes

DFSA – Drug-facilitated sexual assault (drogas facilitadoras de abuso sexual)

RP-HPLC* – Cromatografia líquida de alta eficiência em modo de fase reversa (do inglês “*Reverse-Phase High-Performance Liquid Chromatography*”)

HPLC-MS* – Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (do inglês “*High-Performance Liquid Chromatography–Mass Spectrometry*”)

VC – Voltametria Cíclica.

VPD – Voltametria de Pulso Diferencial.

LD – Limite de Detecção

LQ – Limite de quantificação

ECSA* – Área de Superfície Eletroquimicamente Ativa.

ECS – Eletrodo de Calomelano Saturado

GHB- Gama–hidroxibutírico

(GABA)-A- Ácido Gama-Aminobutírico

I_{pa}* – Intensidade de corrente de Pico Anódico

I_{pc}* – Intensidade de corrente de Pico Catódico

E_{pa}* – Potencial de Pico Anódico

E_{pc}*– Potencial de Pico Catódico

ΔE_p* – Diferença entre os potenciais de picos

PBS – Phosphate buffer solution (Solução tampão fosfato)

POC– Point-of-Care (Ponto de atendimento)

SNC – Sistema Nervoso Central

UNODC – United Nations Office on Drugs and Crime

Sumário

INTRODUÇÃO	13
1.1 Objetivos	16
1.1.1 Objetivo Geral	16
1.1.2 Objetivos Específicos	16
CAPÍTULO 2 - REFERENCIAL TEÓRICO	17
2.1 Drogas de abuso	17
2.2 Benzodiazepínicos	19
2.2.1 Clonazepam	20
2.3 Métodos analíticos no contexto forense	23
2.4 Fundamentação das técnicas eletroquímicas	24
2.4.1 Voltametria Cíclica e Voltametria de Pulso Diferencial	25
2.5 Eletrodos de carbono	28
2.5.1 Eletrodos de grafite de pilhas comerciais	31
CAPÍTULO 3 - METODOLOGIA EXPERIMENTAL	33
3.1 Materiais e Reagentes	33
3.2 Preparação e limpeza dos eletrodos	33
3.3 Estudos eletroquímicos	35
3.4 Parâmetros analíticos utilizados no método proposto	36
3.4.1 Sensibilidade e linearidade	36
3.4.2 Limite de Detecção (LD)	37
3.4.3 Limite de Quantificação (LQ)	38
3.4.4 Faixa de trabalho	38
3.4.5 Estabilidade	38
CAPÍTULO 4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO	40
4.1 Caracterização eletroquímica do eletrodo de grafite de pilha	40
4.1.1 Área de trabalho do eletrodo de carbono	40
4.1.2 Determinação da área eletroquimicamente ativa do BGE	41
4.2 Comportamento eletroquímico do CZP frente ao BGE	43
4.3 Estudo cinético	46
4.4 Interdependência e estabilidade do CZP no BGE	52

4.5 Efeito do pH.....	54
4.6 Estudos de Sensoriamento de Clonazepam	56
4.7 Detecção em amostras reais.....	58
CAPÍTULO 5 - CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	60
REFERÊNCIAS.....	61

Capítulo 1

INTRODUÇÃO

Desde a introdução na farmacêutica do cloridrato de clorato (Librium ®), a primeira droga da classe benzodiazepínico (BZPs) em 1960¹, uma elevada quantidade de compostos estruturalmente semelhantes foi desenvolvida. Atualmente, estima-se que mais de 1.000 benzodiazepínicos foram sintetizados, e esses compostos representam uma das classes mais prescritas de medicamentos no mundo^{2; 3; 4}. Benzodiazepínicos são compostos caracterizados pela presença de um anel de benzeno ligado a um anel de 7 membros contendo dois átomos de nitrogênio (1,4-diazepina)⁵, e são drogas farmacêuticas amplamente utilizadas como hipnóticos ansiolíticos, indutores do sono e no tratamento de distúrbios psiconeurológicos. No entanto, estudos recentes têm mostrado uma controvérsia crescente focada em seu uso medicinal⁶. Em meados dos anos 2000, relatos também destacaram o uso de benzodiazepínicos como drogas facilitadoras de crimes (DFC)^{7; 8; 9} ou “drug-facilitated sexual assault (DFSA)”^{10; 11}.

Na literatura é reportado que quando associado ao álcool, esses medicamentos têm suas propriedades sedativas potencializadas, causando ao indivíduo sintomas de sonolência, comprometimento psicomotor e um tipo de amnesia de curto prazo¹². O efeito máximo é atingido cerca de duas horas após a ingestão, mas no dia seguinte ainda pode se verificar alguns efeitos como sonolência, sensibilidade, confusão e ataxia¹³. De modo geral, essas drogas são rapidamente metabolizadas e eliminadas do corpo, o que dificulta a sua análise devido a sua baixa dosagem e biotransformação, reduzindo assim o número de casos relatados às autoridades, ou muitas vezes sendo relatados como crimes sem submissão química. No Brasil, essa prática é conhecida como o famoso golpe “Boa noite Cinderela”¹⁴.

Negrusz & Gaensslen¹⁵ fizeram um levantamento dos progressos da química analítica referente a padronização de protocolos e dispositivos de coleta de evidências para a investigação toxicológica do crime de estupro facilitado por drogas. Os autores relataram que a lista de drogas associadas à agressão sexual inclui drogas como

Flunitrazepam, Diazepam, Clonazepam, Oxazepam. Dentre elas, o Clonazepam (CZP), que é considerada uma potente benzodiazepina (cerca de 20 vezes mais potente que o Diazepam)¹⁶.

Como resultado da associação do clonazepam com crimes de abuso sexual facilitados por drogas, houve um aumento no desenvolvimento de métodos capazes de detectar essa droga em amostras de sangue, urina, saliva ou bebidas, ressaltando a importância da detecção no ponto de cuidado "*point-of-care-POC*". Consequentemente, o desenvolvimento de alternativas simples e de baixo custo para a detecção e quantificação de medicamentos sedativos tornou-se uma área de considerável importância a ser explorada.

Diferentes métodos analíticos são reportados para detecção deste tipo de droga, como a cromatografia líquida de alta eficiência no modo de fase reversa (RP-HPLC)^{17; 18; 19} e a cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa (HPLC-MS)^{20; 21; 22}, apesar de sua eficácia, essas técnicas possuem um custo elevado e uma certa morosidade, além da necessidade de analistas altamente qualificados para seu manuseio^{23; 24}. Dessa forma, faz-se necessário a utilização de técnicas mais sensíveis e precisas e, nesse contexto, a aplicação de sensores eletroquímicos torna-se uma alternativa favorável devido à sua sensibilidade e seletividade²⁵.

Para isso, métodos eletroquímicos aliados a diferentes tipos de eletrodos à base de carbono vêm sendo utilizados, tais como carbono vítreo, grafite pirolítico, pasta de carbono, nanotubos e grafeno, devido às suas interessantes propriedades como elevada estabilidade eletroquímica, condutividade, ampla janela de potencial, entre outros. No entanto, a maioria desses eletrodos são relativamente caros, limitando suas aplicações práticas. Uma fonte alternativa de carbono usado na produção de eletrodos são os bastões de grafite encontrados em pilhas AA ou AAA de 1,5V. Este material apresenta características atraentes como baixa corrente de fundo e alta área superficial da haste de grafite, além de ser um eletrodo com custo zero reaproveitado de pilhas descarregadas^{26; 27; 28}, podendo ser usado com vantagens na construção de eletrodos de trabalho para sistemas eletroquímicos.

Considerando que o CZP é metabolizado em duas etapas: a primeira etapa é a hidroxilação que forma o 7-aminoclonazepam, e a segunda etapa é a N-acetilação resultando no metabólito 7-acetamido-clonazepam, sendo estes excretados na urina²⁹, o desenvolvimento de um método de baixo custo, sensível e portátil para investigação forense rápida em campo de materiais suspeitos, bebidas e biofluidos de

potenciais vítimas de um crime facilitado pela intoxicação por CZP é de considerada importância e relevância.

Alguns trabalhos eletroquímicos para detecção de CZP foram relatados para superar essa lacuna. Os autores Habibi & Jahanbakhshi³⁰ propuseram um método eletroquímico para a determinação de clonazepam (CZP) baseado em um eletrodo de carbono vítreo modificado com nanopartículas de prata e nanotubos de carbono com paredes múltiplas (AgNPs/MWCNTs/GCE). O eletrodo foi aplicado na determinação voltamétrica de CZP em amostras de soro sanguíneo humano e amostras farmacêuticas. Já Reyhan e colaboradores³¹ propuseram um eletrodo de carbono-cerâmico mesoporoso para detecção de CZP em fluido biológico. Recentemente, os pesquisadores Sachdeva & Agrawal²⁹ relataram a detecção de CZP em amostras de sangue artificial através de um filme nanoestruturado de nanopartículas de ouro (AuNPs) depositadas eletroforicamente em um substrato de vidro revestido com óxido de índio-estanho (ITO). O filme nanoestruturado apresentou resposta voltamétrica linear à concentração de CZP na faixa de 1–9 μmolL^{-1} em amostras de sangue artificial. Lofti e coautores³² determinaram eletroquimicamente CZP em amostras séricas e farmacêuticas utilizando um eletrodo de carbono vítreo modificado com um nanocompósito sintetizado, que consistia em Fe_3O_4 , 3-aminopropiltrietoxissilano (APTES), cloreto cianúrico (CC), 2-mercaptoetanol e Pd ($\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{R-SH}/\text{Pd}$).

Com base nos trabalhos já relatados para o sensoriamento de CZP, a grande maioria, consiste em propor eletrodos com modificações de superfície utilizando nanopartículas de ouro³³, nanopartículas de prata^{30; 34}, nanotubos de carbono³⁵ com paredes múltiplas³⁰, dentre outros, ou ainda utilizando eletrodos com um maior custo como eletrodos de carbono cerâmico³¹, eletrodos serigrafados^{36; 37} ou eletrodos de ITO²⁹, fato que proporciona ao sensor um maior custo, e dificulta sua aplicação em larga escala. Importante ressaltar ainda que o foco da aplicação dos trabalhos têm sido a detecção em amostras de fluidos biológicos, porém poucos trabalhos têm focado na análise dessa droga *in loco* como forma de evitar o crime. Pautados nessa problemática, no presente trabalho, propõe-se pela primeira vez, o desenvolvimento de um sensor eletroquímico de baixo custo utilizando eletrodos de carbono grafite obtidos de pilhas AA 1,5V descarregadas para detecção de Clonazepam diretamente em amostras de bebidas.

1.1 Objetivos

1.1.1 Objetivo Geral

Desenvolver um sensor eletroquímico para detecção de clonazepam em bebidas alcoólicas utilizando eletrodos de grafite reaproveitados de pilhas (BGE) AA 1,5V descarregadas.

1.1.2 Objetivos Específicos

- Verificar o comportamento eletroquímico e morfológico do BGE;
- Investigar o comportamento eletroquímico do clonazepam no eletrodo BGE;
- Otimizar os parâmetros para a detecção de clonazepam (potencial aplicado, velocidade de varredura, pH, etc.) e construir uma curva analítica para o analito de interesse;
- Determinar a sensibilidade, estabilidade, reprodutibilidade e seletividade do BGE frente a determinação de clonazepam;
- Determinar os valores de limites de detecção (LD) e quantificação (LQ);
- Aplicar o eletrodo BGE como sensor eletroquímico na detecção de clonazepam em bebidas alcoólicas.

Capítulo 2

REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Drogas de abuso

O termo “droga”, no contexto medicinal, é definido como qualquer substância capaz de modificar a função dos organismos vivos, resultando em mudanças fisiológicas ou comportamentais³⁸. A Lei Nº 11.343, de 23 de agosto de 2006 conceitua drogas como substâncias capazes de causar dependência, assim especificados em lei, ou relacionados em listas atualizadas periodicamente pelo Poder Executivo da União³⁹. A regulamentação das substâncias de controle especial é realizada pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), através da portaria Nº 344, de 12 de maio de 1998⁴⁰. O documento classifica as substâncias em a) entorpecentes b) psicotrópicos e c) retinóides de uso sistêmico e imunossupressores.

As drogas psicotrópicas têm seu termo definido em regulamento como substâncias que são capazes de ocasionar dependência física ou psíquica, e são classificadas em categorias de listas "A3", "B1" e "B2". Substâncias psicotrópicas tais como o Clonazepam, Diazepam, Flunitrazepam e Ácido gama-hidroxibutírico (GHB) são listados na lista de categoria B1. O III Levantamento Nacional sobre o uso de drogas pela população brasileira (III LNUD)⁴¹, traz dados importantes que avaliam especificamente o uso de medicamentos não prescritos por profissionais da saúde, ou utilizados de forma diferente da prescrita.

As estimativas do III LNUD são apresentadas por tipo de medicamento (benzodiazepínicos, estimulantes anfetamínicos, sedativos barbitúricos e esteroides anabolizantes). Os resultados obtidos demonstraram que as classes de medicamentos mais consumidas de forma não prescrita ou consumidas de forma diferente da prescrita, foram a de benzodiazepínicos (3,9%), a de opiáceos (2,9%) e a classe dos anfetamínicos (1,4%). Os benzodiazepínicos foram relatados no levantamento como a classe que vêm sendo mais consumida sem prescrição médica.

Pesquisas relatam ainda que o uso indevido de medicamentos prescritos aumentou exponencialmente na última década⁴², e devido a sua disponibilidade

comercial, estes fármacos têm sido progressivamente reportados como forma facilitadora de crimes. Os crimes mais reportados são enquadrados como roubo, violência sexual, extorsão de dinheiro, e agressão quando cometidos enquanto a vítima está incapacitada como resultado do consumo de álcool ou droga⁴³.

O uso indevido de substâncias psicotrópicas com finalidade criminal conferem à estas drogas classificações como “drogas facilitadoras de crimes” (do inglês “drug facilitated crimes-DFC”)⁴⁴, “drogas facilitadoras de abuso sexual”(do inglês “drug-facilitated sexual assault-DFSA”)⁴⁵, ou ainda drogas de estupro consentido (do inglês “date rape drug”). No Brasil, não há uma classificação para esse tipo de droga, mas sim para a prática criminal, conhecida como “Golpe do boa noite Cinderela”⁴⁶.

O golpe consiste na utilização de drogas sedativas ou psicotrópicas, como meio de execução para conseguir roubar, ou ainda, cometer agressão sexual contra as vítimas, essas DFC são adicionadas geralmente em bebidas ou alimentos das vítimas, atuando no sistema nervoso central⁴⁷. Ao atuar no SNC, estas substâncias ocasionam efeitos colaterais que incluem uma diminuição dos efeitos motores e cognitivos, perda de memória recente, sonolência, fadiga e, em alguns casos, até parada cardíaca⁴⁸. Os BZPs possuem efeito sinérgico⁴⁹, ou seja, quando adicionadas às bebidas alcoólicas acabam tendo seus efeitos sedativos e alucinatórios potencializados, afetando a memória e/ou a consciência, reduzindo assim o número de casos notificados às autoridades, ou muitas vezes sendo relatados como crimes sem submissão química.

Os criminosos utilizam amplamente essas substâncias para cometer crimes devido a características intrínsecas de alguns desses fármacos, tais como a não alteração do sabor e o cheiro das bebidas alcoólicas, e sua rápida absorção quando comparado a outras drogas (~1-3 horas)³⁴. Tais características, aliadas a disponibilidade comercial, tornam os benzodiazepínicos dentre as DFC reportadas, como a classe de drogas depressoras mais vendidas no mundo, seja para uso indevido ou não. A drogas mais reportadas para essa finalidade criminal são: cetamina, dimenidrinato, escopolamina, ácido gamahidroxibutírico (GHB) e o grupo dos benzodiazepínicos⁴⁵ (clonazepam, flunitrazepam, diazepam, bromazepam e o midazolam)⁵⁰.

2.2 Benzodiazepínicos

Os benzodiazepínicos podem ser agrupados em três subclasses, os derivados da 1,4 benzodiazepina, derivados da 1,5 benzodiazepina e derivados da triazolo-1,4-benzodiazepina. Os benzodiazepínicos (BZPs) clássicos são aqueles compostos que possuem como característica predominante a presença de um núcleo benzênico ligado a um anel de sete membros contendo dois átomos de nitrogênio (1,4-diazepina). Esses compostos são genericamente classificados como depressores do sistema nervoso central⁵¹, por possuírem propriedades sedativas, hipnóticas e amnésicas⁵², devido a potencialização da atividade do ácido gama aminobutírico (GABA), um potente neurotransmissor inibitório⁵³.

Os BZPs atuam como moduladores alostéricos positivos no receptor do ácido gama-aminobutírico (GABA)-A. O receptor GABA-A é um canal iônico seletivo de íons Cl^- controlado por ligante. O aumento da entrada de íons negativos (Cl^-) promove uma hiperpolarização, diminuindo a ativação neuronal em diversas vias do sistema nervoso central, responsável pela sensação de relaxamento induzida pelos BZPs (GOMMERS; BAKKER, 2008). Estes fármacos são bases fracas, entretanto apresentam uma ampla faixa de pKa conforme mostra a Tabela 2.1.

Tabela 2.1. Valores de pKa e log P para compostos da classe do benzodiazepínicos⁵⁴ (“Clarke’s Analysis of Drugs and Poisons”, 2023).

BENZODIAZEPÍNICO	PKA	LOG P
Alprazolam	1,4 / 8,20	2,37
Bromazepam	2,9 / 11	2,54
Clobazam	4,07	2,55
Clonazepam	1,5 / 10,5	2,41
Diazepam	3,30	2,7
Estazolam	4,97	2,09
Flurazepam	1,9 / 8,2	2,3
Lorazepam	1,3 / 11,5	2,98
Medazepam	6,2	3,8
Midazolam	6,57	3,33

Fonte: “Clarke’s Analysis of Drugs and Poisons”, 2023

A estrutura química básica dos benzodiazepínicos consiste na presença de um anel aromático (A) fundido ao anel (B), como mostra a Figura 2.1. Em geral, o substituinte 5-aril (anel C) aumenta a potência dos compostos, podendo ser substituído por um anel de cinco membros fundido às posições 3 e 4 (Figura 2.1). Enquanto grupos receptores de elétrons nas posições 2' ou 4' do anel C e na posição 7 do anel A realçam a sua atividade, tal como o grupo nitro no clonazepam, sendo o responsável pelo aumento da potência anticonvulsivante do fármaco. 39.

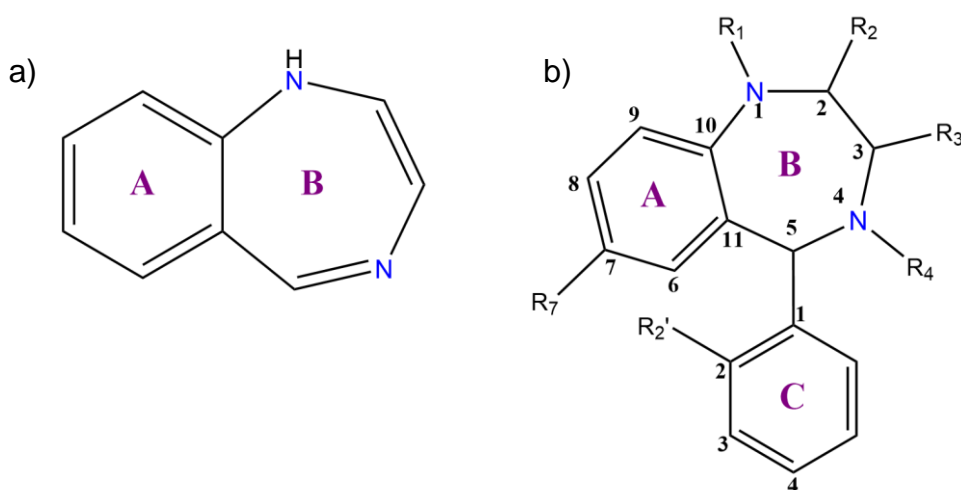


Figura 2.1. Representação da estrutura química de uma benzodiazepina (a) e estrutura básica dos benzodiazepínicos (b). Adaptada de 40.

2.2.1 Clonazepam

Clonazepam ou Klonopin, (5-(2-Clorofenil)-1,3-dihidro-7-nitro-2H-1,4-benzodiazepin-2-ona) (Figura 2.2), conhecido popularmente como Rivotril®, pertence à classe dos benzodiazepínicos. É um fármaco ansiolítico prescrito por psiquiatras para o tratamento de doenças de ordem psicológicas como crises epiléticas, espasmos infantis na síndrome de West, transtornos de ansiedade e distúrbios do pânico⁴⁷. O CZP é comercializado na forma de comprimidos contendo 0,5, 1,0 e 2 mg 11, e que ultimamente também se tornou reconhecido pelo seu uso criminal na área criminalística e forense como meio facilitador de agressões sexuais, e outras práticas criminais⁵⁵.

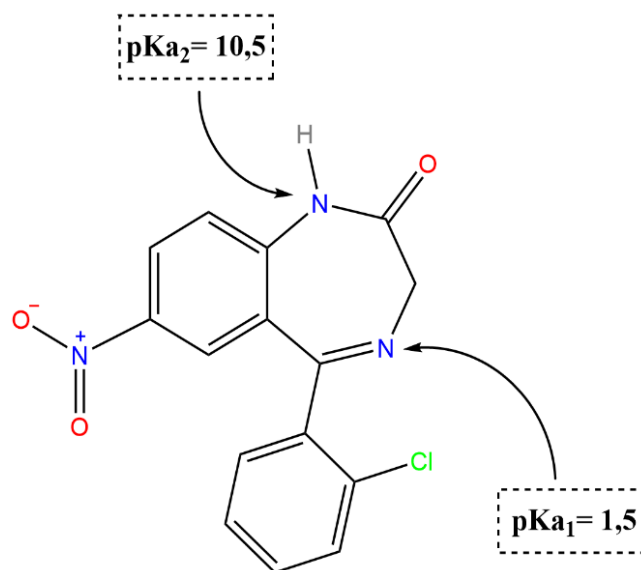


Figura 2.2. Representação da estrutura química do CZP e os valores de seus pKas: pKa₁ = 1,5; pKa₂ = 10,5. 315,72 g·mol⁻¹. Adaptada de⁵⁶.

Pesquisas relatam que a ingestão de elevado nível de concentração de benzodiazepínicos, como o clonazepam, em torno de 2 a 4 mg⁵⁷, com sua concentração plasmática máxima alcançada dentro de 1-2 h³⁴, são capazes de produzir acentuada sedação, sonolência e amnésia. Sob estes efeitos, as vítimas assumem um estado de incapacidade de defesa e inconsciência, tornando-se vulneráveis. Devido aos efeitos posteriores antagônicos do CZP no organismo humano, como já foi dito, o uso abusivo faz com que estas amostras sejam em sua maioria provenientes de vítimas dopadas envolvidas em roubos, acidentes e agressões sexuais.

Drogas ilícitas como o CZP são rotineiramente detectadas e quantificadas na área de toxicologia forense através de análises qualitativas e quantitativas de espécies biológicas, como urina, sangue, saliva, cabelo, hálito e suor⁵⁸. A urina é uma das matrizes biológicas mais utilizada para análise de drogas, o que pode ser relacionada à sua facilidade de coleta, além de ser uma matriz biológica universal de excreção de diferentes substâncias e seus metabólitos. Devido à biotransformação dos benzodiazepínicos possuir uma complexidade elevada, diversos estudos consistem em propor não apenas o sensoriamento de drogas, como também dos seus metabólitos. A principal via de metabolização desses fármacos consiste na oxidação (N-desalquilação e hidroxilação)⁵⁹, e alguns fármacos do grupo de benzodiazepínicos,

como o CZP e nitrazepam que são metabolizados por nitrorredução, conforme demonstrado na figura abaixo.

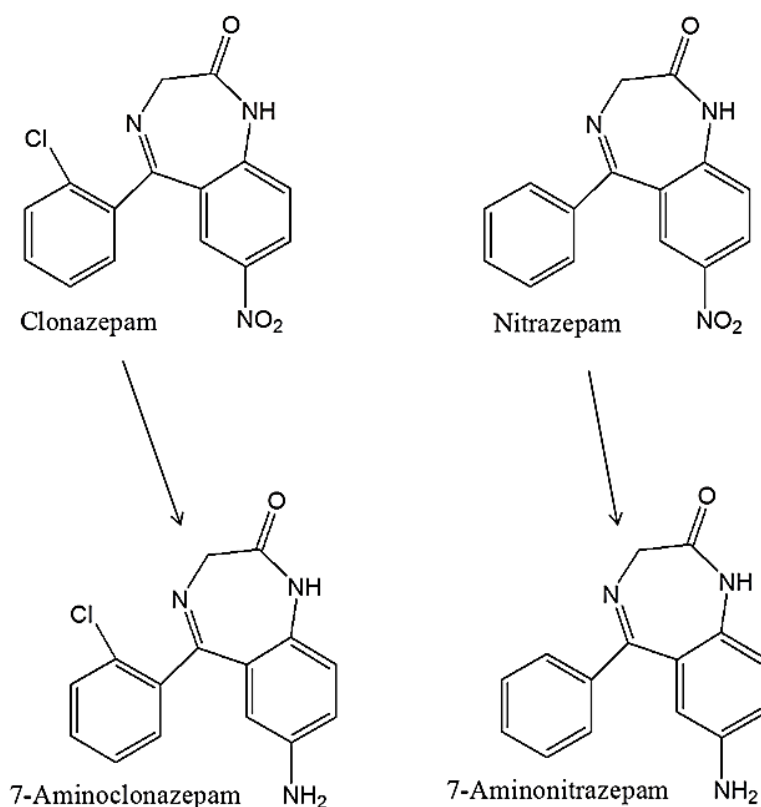


Figura 2.3. Produtos de biotransformação do clonazepam e nitrazepam via nitrorredução⁵⁹.

Devido à baixa dosagem necessária para provocar efeitos colaterais (0,5 a 2 mg), e sua extensa biotransformação, as concentrações de clonazepam e seus metabólitos em matrizes biológicas são relativamente baixos, o que dificulta sua determinação em amostras provenientes de situações criminais de roubo e/ou estupro⁶⁰. Uma alternativa para tal problemática, seriam propostas analíticas de detecção direta de CZP em bebidas. A análise em bebidas se deve a três fatores primordiais para a comprovação de práticas criminais como o golpe do “boa noite cinderela”, são elas: possibilidade de detecção na própria cena do crime, ou em tempo hábil; a ausência de metabólitos na matriz amostral, e possuir uma maior concentração do princípio ativo (clonazepam) do que seria feito em matrizes biológicas. Nesse contexto são relatados alguns métodos analíticos utilizados e recomendados atualmente na área criminalística.

2.3 Métodos analíticos no contexto forense

A UNODC (United Nations Office on Drugs and Crime), estabelece para cada classe de drogas um relatório com diretrizes sobre os métodos recomendados para a identificação e análise dessas drogas^{61; 62; 63; 64; 65; 66; 67}, incluindo testes de cores, testes de ânions, imunoensaios para triagem de drogas, e métodos quantitativos mais sofisticados, como espectrofotometria ultravioleta, cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (GC-MS), cromatografia líquida de alta eficiência e espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier.

Os diferentes métodos analíticos relatados pela UNODC para a detecção de substâncias psicotrópicas possuem, porém, seus pontos negativos, como por exemplo, testes colorimétricos são ensaios que podem oferecer resultados falso positivos, tendo caráter mais qualitativo⁶⁸. Ensaios como os imunológicos e cromatográficos, são utilizados em conjunto⁶⁹, ou seja, os fármacos existentes nas amostras são inicialmente pré-selecionados através do método imunológico, e posteriormente quantificados pelo método cromatográfico^{70; 71; 72; 73}.

As técnicas analíticas recomendadas pela UNODC possuem excelente sensibilidade, sendo algumas delas bastante citadas na literatura, como a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC, do inglês "*High Performance Liquid Chromatography*")⁷², cromatografia líquida de alta eficiência em modo de fase reversa (RP-HPLC, do inglês "*Reverse-Phase High-Performance Liquid Chromatography*")¹⁸, e cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (HPLC-MS, do inglês "*High-Performance Liquid Chromatography–Mass Spectrometry*")^{17; 22; 73}.

Porém, apesar de apresentarem boa sensibilidade e seletividade, as técnicas analíticas acima citadas possuem algumas desvantagens, tais como, a utilização de equipamentos com necessidade de mão de obra especializada para manuseio, como também de reagentes e amostras de alta pureza, com necessidade de haver um processo de extração prévio das amostras antes de serem injetadas no aparelho cromatógrafo. Essas desvantagens por sua vez, acabam tornando essas técnicas limitadas para aplicação forense, tendo em vista que desfavorecem uma detecção em tempo hábil, como necessário para comprovação dos crimes praticados contra as vítimas. Alguns autores^{74; 75} relatam ainda que, relativo ao mecanismo de eliminação do CZP do organismo, o tempo de meia-vida é em cerca de 30 a 40 horas, onde nesse

intervalo de tempo a vítima fica sob efeito da droga, com sintomas de amnésia por um tempo prolongado, dificultando assim a notificação dos casos por parte das vítimas.

Alguns indivíduos perdem completamente a consciência e não se lembram de nada sobre o ocorrido (“mind rape”), enquanto outros apresentam inconsciência intermitente, como se fosse flashbacks, o que impossibilita de descrever o delito e até o suposto agressor⁷⁶. Com um agravante que mesmo após a eliminação da DFC através da urina, a maioria dos metabólitos do fármaco clonazepam que são eliminados, são em cerca de 50 a 70%, e dessa taxa apenas 2% da forma inalterada do fármaco é detectável⁷⁷, todos esses fatores acabam ocasionando atraso na notificação do incidente e na coleta de evidências necessárias.

Devido a problemática de detecção, e os efeitos que essas substâncias provocam no SNC, afetando a memória e/ou consciência, o número de casos reportados para as autoridades competentes são bem menores, se comparado a um crime sem a submissão química. Mediante tal problemática, torna-se necessário e indispensável o desenvolvimento de métodos analíticos para determinação de DFCs em amostras de bebidas (alcoólicas e não-alcoólicas), visando facilitar o trabalho de peritos criminais, laboratórios forenses e instituições de pesquisa responsáveis pela coleta e divulgação de dados referentes ao uso indevido de drogas, tendo em vista que a real prevalência deste tipo de crime ainda é desconhecida^{76; 78; 79}.

Ressaltando a importância da detecção no local de atendimento, a proposta de realizar análises em amostras de bebidas dopadas, vêm sendo reportada aliado ao uso de técnicas eletroquímicas para detecção de drogas sedativas. Consequentemente, o desenvolvimento de alternativas simples e de baixo custo para a detecção e quantificação de drogas de abuso, com enfoque para detecção local, é uma área de considerável importância a ser explorada.

2.4 Fundamentação das técnicas eletroanalíticas

As técnicas eletroanalíticas compreendem um conjunto de ferramentas, ou métodos analíticos quantitativos pautados nas propriedades elétricas de uma solução de um analito, tais como corrente, quantidade de carga e potencial. Os métodos eletroanalíticos que dependem da medida da corrente em função do potencial aplicado, são chamados de métodos voltamétricos⁸⁰. As técnicas eletroanalíticas fornecem informações fundamentais sobre propriedades intrínsecas de compostos

orgânicos e inorgânicos, tais como propriedades eletroquímicas de oxidação/redução de diferentes compostos, estudos de mecanismos de transferência de carga e massa em superfícies de eletrodos, assim como também processos de adsorção em superfícies eletródicas⁸¹.

O emprego dessas técnicas, em geral, tem o intuito de identificar, quantificar e obter informações fundamentais sobre propriedades intrínsecas de substâncias orgânicas e inorgânicas. São particularmente adequadas para análise forense devido ao seu ótimo desempenho em matrizes complexas, tais como os benzodiazepínicos e seus produtos de biotransformação, portanto técnicas eletroquímicas são mais simples, altamente sensíveis e seletivas, além de serem mais viáveis financeiramente quando em comparação aos métodos cromatográficos e espectroscópicos^{82; 83; 84}, favorecendo assim a realização de análises *in situ*, e o desenvolvimento de dispositivos portáteis.

Desta forma, as técnicas eletroanalíticas surgem como uma alternativa promissora para a determinação de substâncias psicotrópicas, pois além de simples, de baixo custo, elas oferecem ainda a possibilidade de detecção de compostos de interesse forense diretamente na matriz, sem a necessidade^{80; 85}. Portanto, é de suma importância o desenvolvimento de um sistema eletroquímico simples, sensível e seletivo para a determinação de drogas facilitadoras de crime, tal como o clonazepam. Até então, poucos relatos da literatura estão voltados para a determinação eletroquímica de CZP especificamente em matrizes de bebidas, em sua maioria é reportado a detecção em matrizes biológicas.

Atualmente algumas abordagens da voltametria encontram-se em uso para fins analíticos com abordagem clínica^{86; 87}, forense^{88; 89; 90} e ambiental^{91; 92}. Dentre as técnicas voltamétricas mais aplicadas para tais fins eletroanalíticos destacam-se a voltametria cíclica (VC), a voltametria de pulso diferencial (VPD) e a voltametria de onda quadrada (VOQ). Para o foco deste trabalho serão discutidos princípios básicos da VC e VPD.

2.4.1 Voltametria Cíclica e Voltametria de Pulso Diferencial

A VC é considerada uma técnica de fácil aplicação e interpretação, sendo a mais utilizada para obter informações qualitativas sobre os processos eletroquímicos. A eficiência dessa técnica resulta de sua característica em fornecer informações sobre

a termodinâmica de processos redox, na detecção de intermediários de reação e acompanhamento de reações envolvendo produtos formados nos eletrodos 68.

Na VC, um potencial inicial ($E_{inicial}$) é selecionado e varrido linearmente (varredura direta) em função do tempo, a uma velocidade constante para potenciais mais negativos, até se alcançar um potencial final (E_{final}) desejado, gerando picos com intensidade de corrente proporcional à concentração do composto analisado. Após o potencial atingir o E_{final} , a direção de varredura é invertida em direção ao $E_{inicial}$, gerando uma resposta em forma de onda triangular⁸⁵ (Figura 2.4B). Os ciclos podem ser repetidos quantas vezes forem necessárias, obtendo-se como resposta a tal perturbação um gráfico de corrente vs. potencial, denominado voltamograma cíclico (Figura 2.4A). No caso de uma reação reversível, ou seja, uma reação que é suficientemente rápida para manter as concentrações de equilíbrio dos reagentes e produtos na superfície do eletrodo, os produtos que foram gerados no sentido de varredura direta são então reduzidos na varredura inversa, gerando assim um pico de catódico simétrico ao pico anódico.

De maneira geral, as técnicas voltamétricas baseiam-se em medidas de correntes elétricas que fluem através do sistema em função da aplicação de uma diferença de potencial elétrico, a qual tem energia suficiente para promover reações de oxidação e/ou redução (reações redox) das espécies químicas de interesse⁹³. Assim, a corrente gerada é diretamente proporcional à concentração de espécies eletroativas presentes nas amostras, e o potencial elétrico é relacionado com a identidade das espécies de interesse. A voltametria cíclica (VC) é a técnica mais empregada para aquisição de informações qualitativas sobre os processos eletroquímicos, principalmente de compostos com comportamento eletroquímico desconhecidos. A eficiência desta técnica resulta de sua característica rápida em fornecer informações sobre a termodinâmica de processos redox, da cinética de reações heterogêneas, de transferência de massa e carga, como também sobre reações químicas acopladas a processos adsortivos⁹⁴.

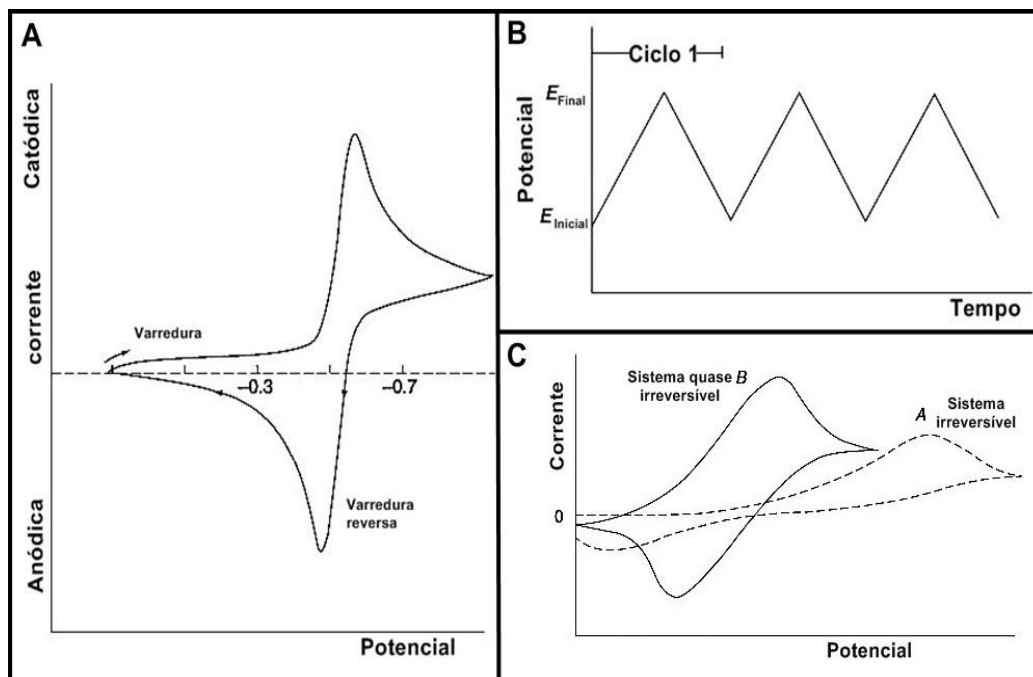


Figura 2.4. Voltamograma cíclico para um processo redox de um sistema reversível da técnica de VC (A); Representação do sinal de excitação proveniente da técnica VC (B); Voltamograma cíclico para um processo redox de um sistema quase irreversível e irreversível (C). Adaptado de 68.

Uma das principais limitações da polarografia/voltametria clássica em relação à sensibilidade é a chamada corrente capacitiva, que é uma das principais componentes da corrente de fundo, que constitui a corrente residual. Já a voltametria de pulso diferencial, para finalidades eletroanalíticas de quantificação, em geral, são mais reportadas na literatura, tendo em vista que técnicas pulsadas, são métodos mais sensíveis para detectar e quantificar o analito de interesse. Primordialmente, esse tipo de técnica surgiu como uma maneira de sincronizar os pulsos aplicados com o desprendimento das gotas no sistema de eletrodo gotejante de mercúrio, de tal maneira a diminuir a contribuição da corrente capacitiva. Assim, as técnicas de pulso baseiam-se na aplicação de degraus de potencial, fixos ou variáveis, para minimizar a aquisição da corrente capacitiva⁹⁵. Esta técnica tem maior sensibilidade que a de pulso normal, alcançando limites de detecção de 10^{-7} a 10^{-8} mol L⁻¹. Na voltametria de pulso diferencial, pulsos de amplitude fixos sobrepostos a uma rampa de potencial crescente são aplicados ao eletrodo de trabalho, conforme mostra a Figura 2.5. A medida em VPD é realizada desta maneira para minimizar a corrente capacitiva (corrente não faradaica), uma vez que a corrente é medida duas vezes, uma antes da aplicação do pulso (S1) e outra ao final do pulso (S2). Quando um pulso é aplicado, ocorre um acréscimo da contribuição da corrente capacitiva e faradaica, no entanto, a

corrente capacitiva decai exponencialmente enquanto a corrente faradaica decai linearmente (Figura 2.5).

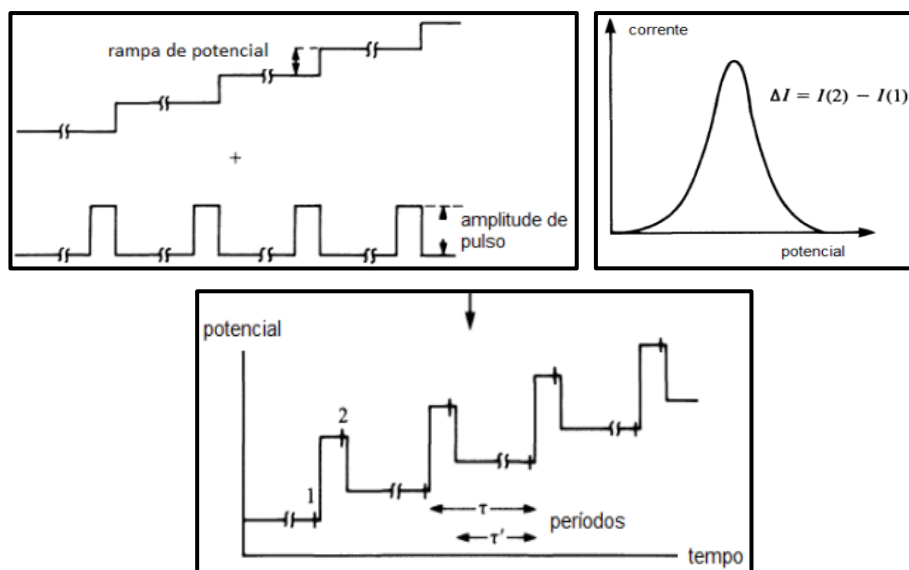


Figura 2.5. Representação esquemática de sinais de excitação para voltametria de pulso diferencial.

O voltamograma resultante consiste em picos de corrente de forma gaussiana, cuja área deste pico é diretamente proporcional à concentração do analito, de acordo com a seguinte equação⁶⁹:

$$i_p = \frac{nFAD^{1/2}C}{\pi t_m} \left(\frac{1-\sigma}{1+\sigma} \right) \quad (1)$$

onde, i_p é a corrente do pico (μA), n é o número de elétrons envolvido na reação redox, F é constante de Faraday (coulombs), A representa a área do eletrodo (cm^2), t_m = tempo entre o segunda e a primeira leitura de corrente (s), D é o coeficiente de difusão (cm^2s^{-1}), C é a concentração do analito ($mmol L^{-1}$), $\sigma = \exp(nF\Delta E / 2RT)$ e ΔE a amplitude do pulso.

2.5 Eletrodos de carbono

Em um sentido mais amplo, a eletroquímica é um fenômeno químico associado à separação de cargas na interface de um eletrodo⁹⁶. Em voltametria e polarografia, as reações redox que acontecem nos eletrodos são heterogêneas e ocorrem na região interfacial entre a solução e a superfície do eletrodo. Com o desenvolvimento dos métodos voltamétricos, aumenta-se progressivamente a diversidade de materiais de eletrodo de trabalho, cabendo ao analista/pesquisador ter conhecimento do que está

disponível no mercado de forma mais viável para a proposta do seu trabalho/pesquisa⁹⁷. Os procedimentos em eletroanálise dependem fortemente dos aspectos materiais, como propriedades químicas e físicas das superfícies do eletrodo, os efeitos do potencial aplicado, adsorção e revestimentos aplicados à superfície do eletrodo para melhorar a detecção.

Assim, é de suma importância a escolha do material de eletrodo de trabalho nos estudos eletroquímicos. Diversos materiais de eletrodos de trabalho podem ser encontrados comercialmente, mas convém destacar que o carbono e suas formas, são materiais eletródicos promissores amplamente utilizados em diferentes áreas^{35; 98; 99}. Ao pesquisar na literatura, no enfoque dos estudos eletroanalíticos e suas aplicações, entende-se que os eletrodos sólidos em geral, especialmente o de carbono, são mais fáceis e práticos quanto eletrodos como de mercúrio para a pesquisa eletroanalítica, por possuir facilidade para modificação de superfície quando necessário, não serem tóxicos, além de materiais à base de carbono geralmente possuir uma faixa de potenciais mais ampla do que os eletrodos de metal sólido^{96; 100}.

Os principais requisitos para um bom material de eletrodo são estabilidade a longo prazo, baixa corrente residual e ampla faixa de potencial⁹⁷. O carbono é um material de eletrodo útil, particularmente no que se refere a altas densidades de corrente, ampla faixa de potencial e estabilidade a longo prazo. Diferentes tipos de materiais de carbono têm sido relatados como eletrodos de trabalho em sistemas eletroquímicos conforme mostra a Figura 2.6. Dentre os eletrodos de trabalho com materiais carbonosos reportados na literatura se destacam os eletrodos de carbono vítreo^{101; 102; 103}, grafite de ponta de lápis^{104; 105; 106}, grafite pirolítico^{107; 108; 109}, eletrodo de diamante dopado com boro^{110; 111}, eletrodos de grafite serigrafados^{112; 113; 114}, e com crescente destaque nas pesquisas, os eletrodos de carbono proveniente de pilhas secas zinco-carbono^{115; 116; 117}.



Figura 2.6. Tipos de eletrodos de carbono mais reportados na área eletroquímica. Fonte: De autoria própria.

O carbono tem duas formas alotrópicas: grafite e diamante. Grafite, um dos alótropos de carbono, vem atraindo o interesse dos pesquisadores, devido às suas propriedades únicas, como sua alta mobilidade intrínseca dos portadores de carga ($10^6 \text{ cm}^2 \text{ V}^{-1} \text{ S}^{-1}$), condutividade elétrica (10^4 S/cm) e propriedades mecânicas superiores (módulo de elasticidade da ordem de 1 TPa), e potencial de produção a baixo custo¹⁰⁰. A formação do grafite pode ocorrer tanto de modo natural, na crosta terrestre e sendo utilizado na confecção de eletrodos de pilhas¹¹⁸, como também de forma artificial, produzidas a partir de precursores industriais como coque de petróleo, pixe e negro de fumo¹¹⁹.

Em suma o grafite natural é comercializado em três modos de estruturas diferentes, o grafite amorfo, flocos e veio. Grafite na forma estrutural veio é o tipo de grafite utilizado no formato de bastão nas pilhas secas (ou de Zn-carbono) ou em pilhas alcalinas. Trata-se do carbono puro, encontrado na natureza em formas laminares planas, ordenadas na forma hexagonal e romboédrica, sendo extremamente resistente à oxidação e a temperaturas elevadas, além de possuir vantagens como excelente condutividade elétrica, térmica e anisotropia^{119; 120}.

2.5.1 Eletrodos de grafite de pilhas comerciais

Segundo a Associação Brasileira da Indústria Elétrica e Eletrônica ¹²¹, no Brasil, são produzidas, anualmente, cerca de 800 milhões de pilhas comuns, das quais 80% são do tipo secas (zinco-carbono), 20% alcalinas e 17 milhões são baterias. No Brasil o consumo é de 5 pilhas por habitante/ano¹²¹. O surgimento das pilhas promoveu um avanço do ponto de vista tecnológico, entretanto sua produção em escala industrial e seu baixo custo levaram ao aumento do consumo, resultando na problemática sobre como descartá-las, ou reaproveitá-las. Atualmente para lidar com tal problemática, os cátodos de pilhas comuns 1,5 V descarregadas têm sido uma das fontes alternativas de grafite utilizadas para produção de eletrodos.

As hastes são constituídas por carbono grafite natural de alta pureza, e os bastões de grafite extraídos de resíduos de pilhas AA possuem medidas ideais (2 mm ou 3 mm de diâmetro) que se enquadram na fabricação de um bom eletrodo de trabalho²⁶. O material carbonoso possui potencial para ser utilizado no desenvolvimento de plataformas de sensoriamento eletroquímico, devido suas características vantajosas, como custo zero (reciclagem), facilidade de renovação da superfície do eletrodo, além de evitar o descarte inadequado e a poluição do meio ambiente por esses materiais¹¹⁹.

As pilhas de Zn-C conhecida como pilha seca (ou de Leclanché), é a mais comum das pilhas primárias, ou não recarregáveis¹²². Elas possuem um bastão de carbono grafite pulverizado, que atua como cátodo, imerso numa pasta eletrolítica de dióxido de manganês (MnO_2) com um eletrólito ácido (NH_4Cl e/ ZnCl_2), encerrado em

um invólucro de zinco (Zn) que serve de ânodo¹²³. Um separador poroso de plástico ou papelão evita o contato entre o ânodo e cátodo¹²⁴.

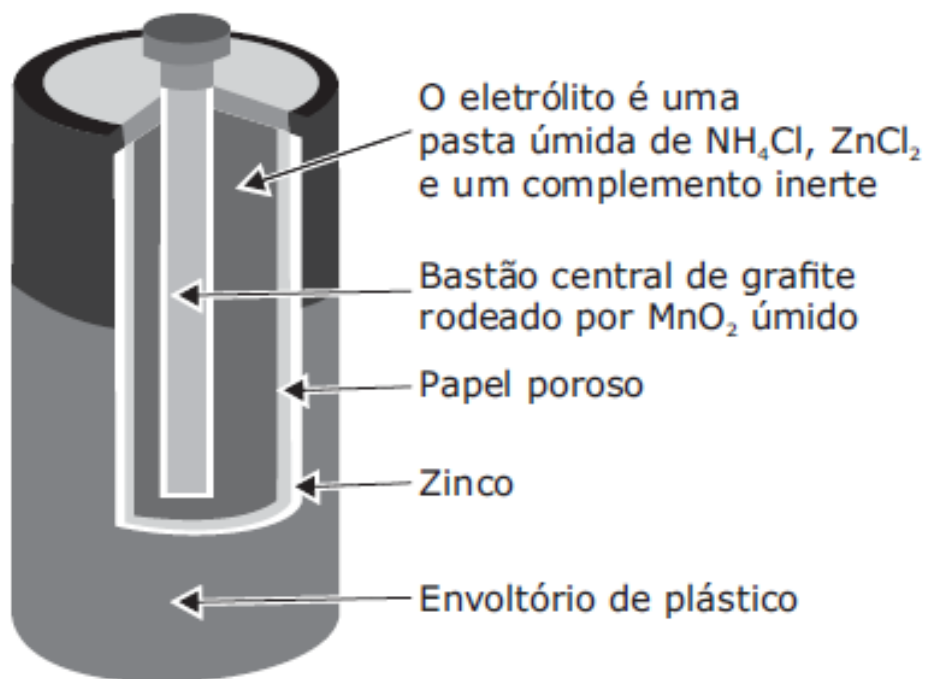


Figura 2.7. Seção transversal de uma pilha Zinco-carbono. Fonte: adaptada de¹²⁵.

As baterias de zinco-carbono são de uso único, não recarregáveis e descartadas imediatamente após o seu esgotamento¹²⁶. No entanto, estas baterias são 100% recicláveis. A bateria pode ser desmontada para o reaproveitamento de materiais como zinco, aço, manganês e haste de grafite, que podem ser reutilizados. A haste de grafite, que possui boa condutividade elétrica, pode ser utilizada como eletrodo em experimentos eletroquímicos e para o desenvolvimento de sensores eletroquímicos^{27; 28; 127}.

A confecção de eletrodos de baixo custo com materiais alternativos tais como os eletrodos provenientes de pilhas comuns descarregadas, possuem respostas equivalentes ou até superiores se comparados às respostas eletroquímicas obtidas com os eletrodos comerciais com um maior custo financeiro. Dessa forma, visando favorecer o sensoriamento eficaz e com um melhor custo-benefício, o presente trabalho propõe um eletrodo de trabalho com um baixo custo aliado à detecção direta de uma DFC (CZP) em bebidas alcoólicas.

Capítulo 3

METODOLOGIA EXPERIMENTAL

3.1 Materiais e Reagentes

Todos os produtos químicos utilizados no desenvolvimento deste trabalho possuíam grau analítico e foram utilizados sem purificação adicional. Os reagentes hidróxido de potássio (KOH), hexacianoferrato (III) de potássio ($K_3[Fe(CN)_6]$) pureza 98%, cloreto de potássio (KCl) pureza 99%, ácido clorídrico (HCl) pureza 37%, dihidrogeno fosfato de potássio (K_2HPO_4), monohidrogeno fosfato de potássio (KH_2PO_4) foram todos fornecidos pela Dinâmica (Brasil). A amostra farmacêutica de CZP em gotas (2,5 mg/mL, Roche Chemical and Pharmaceutical Products S.A, Brasil) foi adquirida em farmácias locais (Teresina, PI, Brasil). Todas as soluções foram preparadas utilizando água ultrapurificada pelo sistema Purelab Option-Q (ELGA Labwater) com resistência de 18,2 M Ω cm. As amostras de bebidas utilizadas (5 marcas nacionais e 5 internacionais), foram adquiridas em supermercados locais (Teresina, PI, Brasil), as análises em amostras reais foram feitas diretamente na bebida, sem necessidade de diluição em eletrólito suporte.

3.2 Preparação e limpeza dos eletrodos

O eletrodo de trabalho proveniente do bastão de grafite foi obtido a partir de pilhas secas AA (1,5 V) descarregadas. Inicialmente, os invólucros metálico, de plástico e de papel da pilha foram removidos (passos 1, 2 e 3) e, em seguida, foi retirada a tampa de aço do polo positivo, permitindo o acesso ao bastão de grafite. O bastão foi então removido cuidadosamente com auxílio de um alicate e os outros componentes contidos na bateria foram devidamente acondicionados conforme ilustrado no passo 4 da Figura 3.1. Na sequência, para a completa remoção da pasta de dióxido de manganês que estava aderida à superfície do bastão, ele foi submetido a um tratamento mecânico por abrasão em toda sua superfície com auxílio de uma

lixa d'água de granulação 400. Em seguida, o BGE foi levado ao banho ultrassônico com água ultrapura durante 10 minutos, e seco a temperatura ambiente.



Figura 3.1. Etapas de obtenção e limpeza do BGE. Fonte: Elaboração própria.

Posteriormente, depois de seco, visando delimitar a área de trabalho do eletrodo, toda a superfície cilíndrica foi isolada com esmalte (passo 7), e colocada para secar por cerca de uma hora em temperatura ambiente. Após a secagem, foram realizadas análises de voltametria cíclica para observar a eficácia do isolamento com o polímero hidrofóbico de baixo custo (esmalte de unhas incolor/base) e em seguida, foi realizado novamente um tratamento mecânico por abrasão com auxílio de uma lixa de granulação 1200 (passo 8) na área de interesse para análises, deixando como área de trabalho apenas a base circular do bastão (área geométrica de $0,105 \text{ cm}^2$). Todas as etapas de preparação do eletrodo até o isolamento da área lateral estão demonstradas na Figura 3.1.

3.3 Estudos eletroquímicos

As análises eletroquímicas foram realizadas utilizando um Potenciostato/Galvanostato Autolab PGSTAT 128N, em conjunto com uma célula eletroquímica convencional de três eletrodos com o BGE como eletrodo de trabalho, placa de platina como eletrodo auxiliar, e eletrodo de calomelano saturado (ECS) como referência conforme ilustrado na Figura 3.2. Os voltamogramas cíclicos (CVs) foram registrados em solução tampão fosfato $0,1 \text{ mMol}\cdot\text{L}^{-1}$ (PBS) e em solução de $1,0 \text{ mMol}\cdot\text{L}^{-1}$ $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ em $0,1 \text{ Mol}\cdot\text{L}^{-1}$ KCl. Para todas as análises, com exceção da construção da curva analítica, padronizou-se uma concentração de $45,9 \text{ }\mu\text{M}$ de CZP.

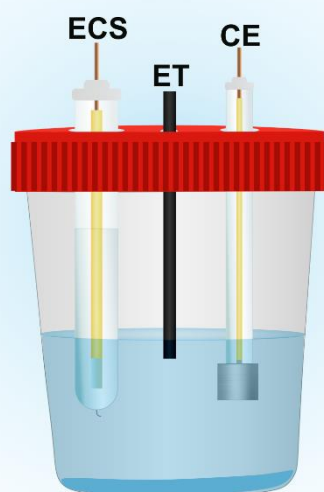


Figura 3.2. Célula eletroquímica utilizada com 3 eletrodos. Fonte: De autoria própria.

Para estudos de sensoriamento, foi investigada uma faixa potencial de -0,8 V a 0,45 V (vs. ECS), e para estudos de área eletroativa, a faixa potencial de -0,25 V a 0,6 V (vs. ECS) foi estudada. A voltametria de pulso diferencial foi realizada utilizando-se um potencial inicial de -0,3 V e um potencial final de -0,8 V para construção da curva analítica. Para o estudo de pH, foi selecionada a faixa potencial de -0,2 V a -0,9 V (vs. ECS), ambos utilizando um intervalo de potencial de 5 mV, intervalo de tempo 0,5 s, amplitude de modulação de 25 mV e tempo de modulação de 50 ms. Um esquema representativo do procedimento das análises voltamétricas utilizadas nesse trabalho é representado abaixo.

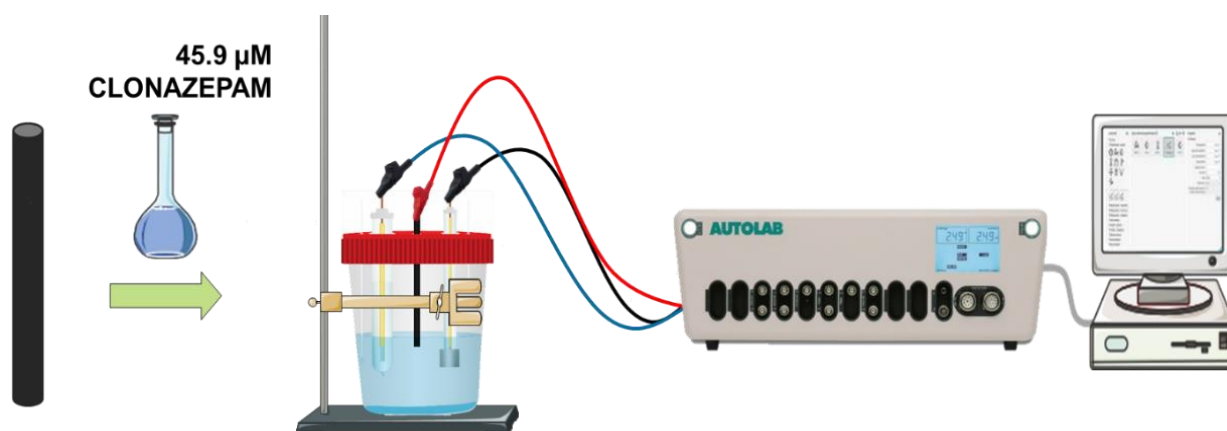


Figura 3.3. Esquema ilustrativo procedimento das análises voltamétricas. Fonte: De autoria própria.

3.4 Parâmetros analíticos utilizados no método proposto

De acordo com a Resolução RDC Nº 166¹²⁸, a validação dos métodos garante que por meio de estudos experimentais e testes analíticos, o método analítico proposto atenda as exigências analíticas, assegurando a confiabilidade dos resultados, e demonstrando que o método é adequado para a finalidade proposta. Para o presente trabalho, foram abordados os parâmetros analíticos de sensibilidade, linearidade, limite de detecção, limite de quantificação, faixa de trabalho e estabilidade.

3.4.1 Sensibilidade e linearidade

A sensibilidade de um método relaciona-se com a variação mínima que é necessária impor versus a concentração da substância medida, para se obter uma variação significativa do resultado da medição (sinal)¹²⁹. Um método será considerado

sensível se pequenas variações na concentração (x) originarem grandes alterações na resposta medida (y). Por outro lado, a linearidade de um método analítico é a sua capacidade em obter resultados que são diretamente proporcionais à concentração do analito, dentro de uma determinada faixa de concentração.

A sensibilidade e linearidade são parâmetros que podem ser obtidos a partir da equação da reta obtida em relação ao gráfico dos resultados experimentais em função da concentração do analito⁸⁰. A sensibilidade pode ser expressa pela inclinação da curva analítica (coeficiente angular) e a linearidade pelo coeficiente de correlação linear. A construção da curva analítica foi realizada mediante a técnica de voltametria de pulso diferencial, devido sua maior sensibilidade analítica frente às outras técnicas voltamétricas.

A análise consistiu em fazer adições padrões de 25µL de CZP em uma solução de tampão fosfato. A faixa linear proposta foi de 25µL-300µL, ou em termos de molaridade de 6,6µM-78,4µM. O coeficiente de correlação “r” permite uma estimativa do nível de confiabilidade da curva obtida, quanto mais próximo de 1,0, menor a dispersão do conjunto de pontos experimentais e menor a incerteza dos coeficientes de regressão estimados¹³⁰. A ANVISA recomenda um coeficiente de correlação igual ou superior a 0,99¹²⁸, porém o INMETRO determina um valor acima de 0,90¹³¹.

3.4.2 Limite de Detecção (LD)

O limite de detecção do método (LD) é definido como a concentração mínima que uma substância pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada. Esta figura de mérito pode ser obtida pelo método visual, pelo método da relação sinal/ruído e o pelo método baseado nos parâmetros da curva analítica¹³⁰. Para as análises voltamétricas realizadas neste trabalho, utilizou-se a determinação do LD por meio das informações obtidas pela curva analítica. Matematicamente, o limite de detecção pode ser calculado pela Equação 2¹²⁹:

$$LD = \frac{3 \times s}{b} \quad (2)$$

Onde **s** é o desvio padrão do sinal analítico (n = 10) (que pode ser o desvio padrão do branco, da regressão linear ou do coeficiente linear da curva analítica) e **b** o coeficiente angular da curva analítica, também denominado de slope¹²⁹.

3.4.3 Limite de Quantificação (LQ)

O Limite de Quantificação é a menor concentração do analito que pode ser determinada com níveis de precisão (proximidade dos vários resultados obtidos da mesma maneira) e exatidão (concordância entre o valor obtido com o valor verdadeiro) aceitáveis sob condições experimentais declaradas¹³⁰. Adotou-se o cálculo para o LQ a partir dos parâmetros da curva analítica, e este pode ser expresso pela Equação 3:

$$LQ = \frac{10 \times S}{b} \quad (3)$$

Onde **s** é o desvio padrão do sinal analítico (n = 10 medidas do branco) (que pode ser o desvio padrão do branco, da regressão linear ou do coeficiente linear da curva analítica) e **b** o coeficiente angular da curva analítica¹²⁹.

3.4.4 Faixa de trabalho

Todo experimento de determinação da faixa de trabalho é iniciado pela escolha de uma faixa preliminar. A faixa de trabalho deve conter a faixa de aplicação em que o experimento vai ser utilizado e de preferência, a concentração da amostra deve estar no centro dessa faixa¹³². A faixa de resposta linear trabalho de um procedimento analítico é o intervalo entre a menor concentração e a maior concentração do analito na amostra para o qual se pretende demonstrar que o procedimento analítico tem um nível aceitável de precisão, exatidão e linearidade. O fator limitante do limite inferior da faixa de concentração é o valor do LQ, enquanto que no limite superior, os fatores limitantes dependem do equipamento utilizado¹³⁰.

3.4.5 Estabilidade

A estabilidade consiste em demonstrar a variação da resposta em função dos números de medidas (ou ciclos) que são realizadas em sequência, com intuito de obter informações sobre a capacidade prática que o sensor apresenta de realizar sucessivas análises. A estabilidade eletroquímica do BGE foi avaliada por meio da

relação entre o número de ciclos voltamétricos e a variação das correntes faradaicas, após a ciclagem de 80 voltamogramas consecutivos na faixa de potencial de -0,2V a -0,8V a 50 mVs⁻¹ em solução PBS 0,1molL⁻¹ na presença de 45,9 µM CZP de clonazepam. Todos os experimentos foram realizados na temperatura de 25°C.

Capítulo 4

RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Caracterização eletroquímica do eletrodo de grafite de pilha

4.1.1 Área de trabalho do eletrodo de carbono

Para avaliar a eficácia do processo de isolamento da área lateral do eletrodo, na Figura 4.1 são apresentados os perfis voltamétricos do BGE completamente isolado com esmalte (—), e com a área da base exposta (—) em solução de $K_4[Fe(CN)_6]$ 1 mmol L^{-1} com KCl $0,1\text{ mol L}^{-1}$ a 50 mV s^{-1} . Para o eletrodo completamente isolado, nenhuma corrente faradaica foi observada, enquanto para o eletrodo com a área de trabalho exposta após polimento da área da base do eletrodo, é notável a presença dos processos redox referente ao par $Fe(CN)_6^{3-} / Fe(CN)_6^{4-}$, demonstrando que a estratégia utilizada aqui, além de simples, permite a obtenção de eletrodos de grafite de pilhas com uma área de trabalho bem delimitada.

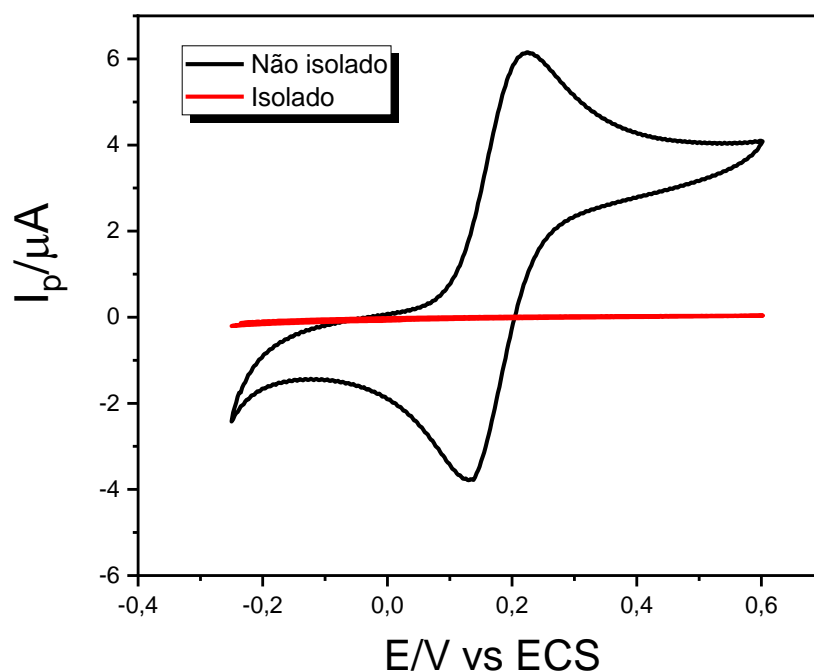


Figura 4.1. Voltamogramas cíclicos para o BGE completamente isolado (—) e com a área de trabalho exposta (—) em solução $K_4[Fe(CN)_6]$ 1 mmol L^{-1} com KCl $0,1\text{ mol L}^{-1}$ a 50 mV s^{-1} .

4.1.2 Determinação da área eletroativa do BGE

A área eletroativa de um eletrodo normalmente difere da sua área geométrica, geralmente a área geométrica é maior, tendo em vista que nem toda a superfície de um eletrodo é composta por áreas eletroativas responsáveis pela transferência eletrônica que ocorre na superfície do eletrodo. Para estimar a área efetiva dos eletrodos de grafite reciclados de pilhas, foram realizados estudos para investigar a resposta cíclica do BGE em solução de $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ de $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ em $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ KCl (Figura 4.2).

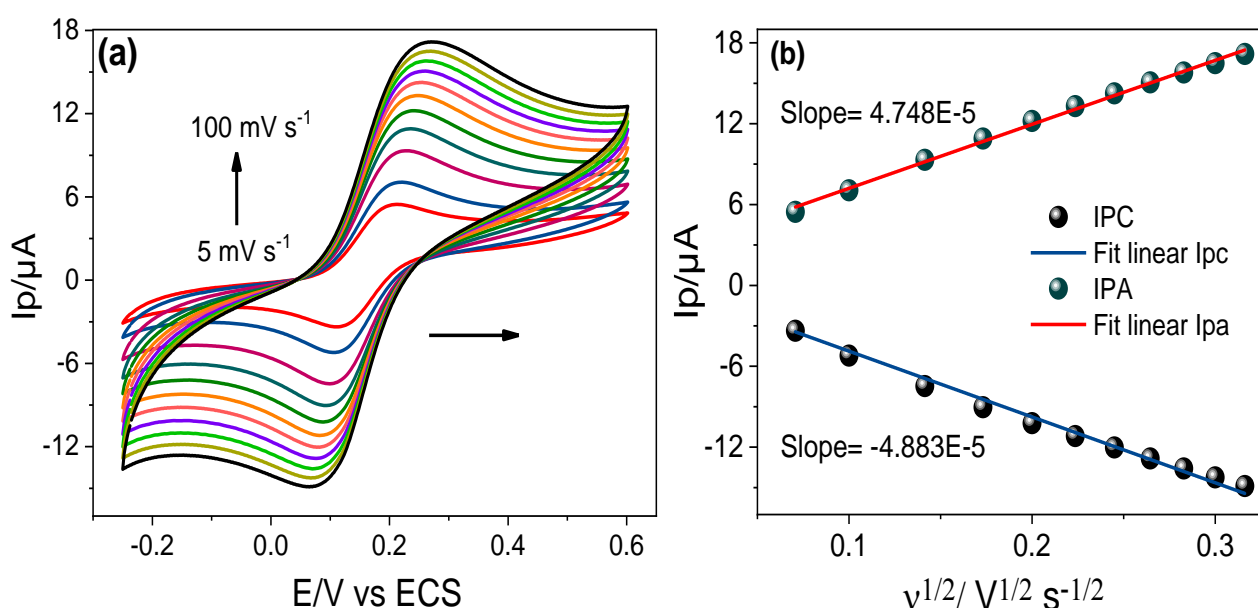


Figura 4.2. (a) Voltamogramas cíclicos obtidos em diferentes velocidades de varredura ($5\text{-}100 \text{ mV s}^{-1}$), para o BGE em uma solução de $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ $1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ em KCl 0.1 mol L^{-1} . (b) Fit linear das variações das correntes de pico anódica e catódica de versus a de raiz quadrada da velocidade de varredura ($v^{1/2}$).

Após os testes de incremento da velocidade de varredura, foram plotados os gráficos de corrente de pico em microampère (μA) em função da raiz quadrada da velocidade de varredura em Volts por segundo (V.s^{-1}) representados na Figura 4.2b para os eletrodos BGE. Os resultados demonstraram um comportamento linear entre a corrente de pico e a raiz quadrada da velocidade de varredura para ambos os processos anódico e catódico, o que indica que a transferência de massa das espécies eletroativas para a superfície do eletrodo é controlada por difusão¹³³. A área eletroquimicamente ativa do eletrodo foi então calculada a partir da inclinação resultante das retas da corrente de pico (I_p) *versus* raiz quadrada da velocidade de varredura ($v^{1/2}$) (Figura 4.2b) usando a equação de Randles-Sevcik¹³³.

$$I_p = (2.685 \times 10^5) n^{3/2} ACD^{1/2} \nu^{1/2} \quad (4)$$

Onde A representa a área superficial eletroativa do eletrodo, n é o número de elétrons envolvidos no processo de transferência de carga, C é a concentração da solução $K_4[Fe(CN)_6]$ e D é o coeficiente de difusão do analito. Os valores de n, D e C para $K_4[Fe(CN)_6]$ são 1 e $6,5 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$, $1 \times 10^{-6} \text{ mol cm}^{-3}$, respectivamente¹³⁴. Com base nesses valores e nos coeficientes angulares das retas I_p vs $\nu^{1/2}$ (Figura 4.2b), a área eletroativa do BGE foi então estimada em $0,070 \pm 0,001 \text{ cm}^2$, conforme apresentado na Tabela 4.1.

Tabela 4.1. Valores de coeficiente angular e área eletroativa equivalentes às curvas de correntes de pico anódica e catódica em função de $\nu^{1/2}$.

Curva	Coeficiente angular ($A \text{ V}^{-1/2} \text{ s}^{1/2}$)	Área eletroativa (cm^2)	Área eletroativa média (cm^2)
Corrente anódica	$4,748 \times 10^{-5}$	0,069	$0,070 \pm 0,001$
Corrente catódica	$-4,883 \times 10^{-5}$	0,071	

Com base na Tabela 4.1, verifica-se que a área eletroativa média do eletrodo BGE foi igual a $0,070 \pm 0,001 \text{ cm}^2$, menor que sua área geométrica ($0,105 \text{ cm}^2$), ou seja, cerca de 67% da área eletródica se encontra disponível para os processos de transferência eletrônica. Esse fato pode ser justificado devido a composição dos bastões de carbono. Os bastões de carbono presentes nas pilhas trazem em sua composição um pó carbonáceo condutivo e um corpo de argila sinterizada para homogeneizar o pó carbonáceo, além de ter poros em sua estrutura que são preenchidos com parafina durante o processo de produção¹³⁵. Tais modificadores possuem características isolantes, acarretando numa diminuição da área eletroquimicamente ativa. A área efetiva obtida para o eletrodo BGE foi maior do que para eletrodos de lápis fabricados em plataforma de papel conforme relatado por Dias e colaboradores¹³⁶, no qual obtiveram em seu estudo em torno de 58% de área efetiva para uma área geométrica de $0,13 \text{ cm}^2$. Já para um eletrodo de pasta de carbono quimicamente modificado com óxido de grafeno reduzido com cafeína¹³⁶, os autores obtiveram em torno de 56% de área eletroquimicamente ativa de um eletrodo com área geométrica $0,18 \text{ cm}^2$, demonstrando que o eletrodo aqui relatado, sem nenhuma modificação de superfície mostrou uma área eletroquimicamente ativa maior até que eletrodos modificados.

4.2 Comportamento eletroquímico do CZP frente ao BGE

A voltametria cíclica é geralmente a técnica mais utilizada para os estudos eletroquímicos iniciais de um composto ou superfície eletródica. A eficácia da técnica se reflete na capacidade de obter rapidamente informações sobre o comportamento redox dos analitos alvo em uma ampla faixa de potenciais, sobre a termodinâmica dos processos redox, reações químicas acopladas e/ou processos adsortivos. O comportamento eletroquímico de CZP no BGE foi investigado por meio da técnica de voltametria cíclica ao longo da faixa de potencial de 0,45 a -0,80 V em PBS 0,1 mol L⁻¹ (pH 7,0) a 50 mVs⁻¹. Inicialmente foi feita uma varredura no sentido catódico de modo a obter o voltamograma cíclico na faixa entre 0,45 e -0,8 V, como apresentado na Figura 4.3.

No intervalo de potencial estudado o voltamograma obtido apresenta dois picos na primeira varredura. Na primeira varredura, o pico C1 surgiu em torno de -0,6V à medida que o potencial aplicado foi diminuído, correspondendo assim a um pico catódico, referente a um primeiro processo de redução, no sentido inverso de varredura o processo A1 surgiu em torno de -0,08V à medida que o potencial aplicado foi aumentado, correspondendo assim a um pico anódico, referente a um processo de oxidação. Deste modo, para facilitar a identificação dos processos, estes foram identificados como C1 (primeiro processo catódico) e A1 (primeiro processo anódico).

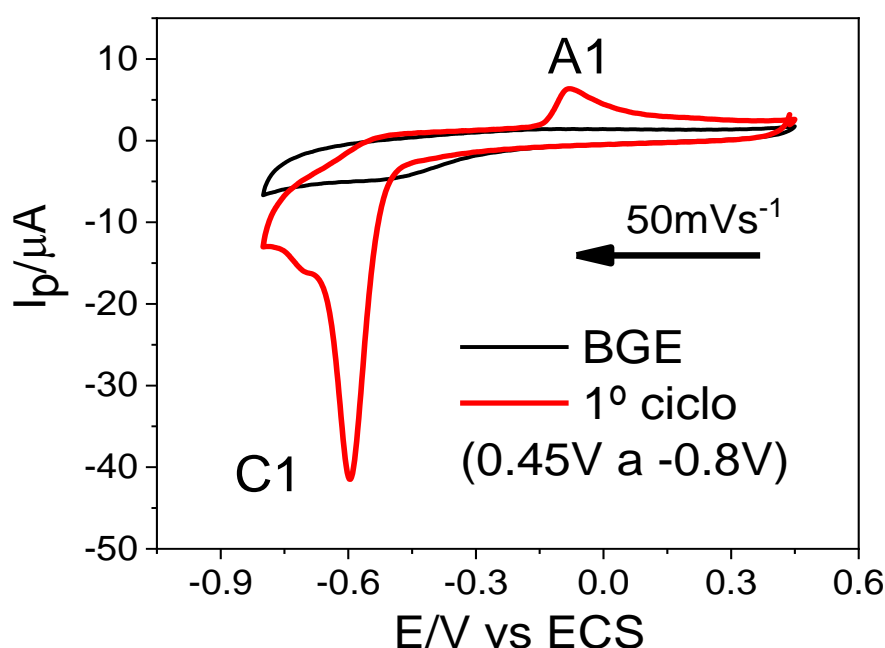
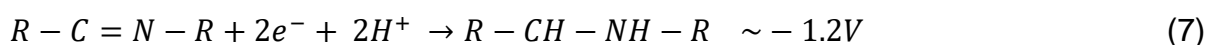
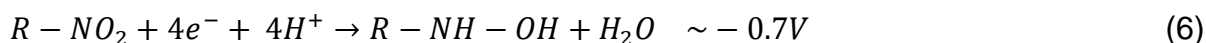
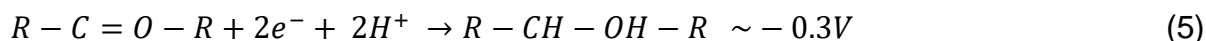


Figura 4.3. Voltamogramas cíclicos registrados no BGE em 0,1 M PBS pH 7.0 a 50 mVs⁻¹ (—) na ausência e (—) na presença de 45,9 μM CZP sobre a faixa de 0,45 a -0,80 V.

O processo catódico (C1) é referente a redução do grupo nitro (NO₂) a uma hidroxilamina (NHOH), previamente citado na literatura³⁴. No sentido inverso do potencial de varredura (-0,8 a 0,45 V), não foi observado um pico voltamétrico reverso, o que indica que o processo eletroquímico C1 de redução do sítio ativo NO₂ do CZP na superfície do eletrodo BGE apresenta um comportamento irreversível nas condições estudadas. Russo e colaboradores⁴⁸ utilizaram a técnica de voltametria de onda quadrada (VOQ) para identificar os processos reducionais para a molécula do CZP. Os pesquisadores correlacionaram cada pico de redução com seu respectivo grupo funcional eletroativo C=O (1), NO₂ (2) e C=N (3) respectivamente na faixa de potencial de 0 a -1,6V, conforme marcado na Figura 4.4, e demonstrados nas equações abaixo.



Assim de acordo com o deslocamento de potencial e o mecanismo de reação já relatado na literatura²⁹, sabe-se que o processo C1 é referente ao grupo NO₂ e não ao grupo eletroativo C=O. O presente estudo abrangeu a faixa de potencial de 0.45 a -0.8 V, no intuito de propor condições de detecção mais favoráveis termodinamicamente (menor energia necessária), por isso não foi demonstrado o processo reducional relativo ao grupo eletroativo C=N em torno de (-1.2V).

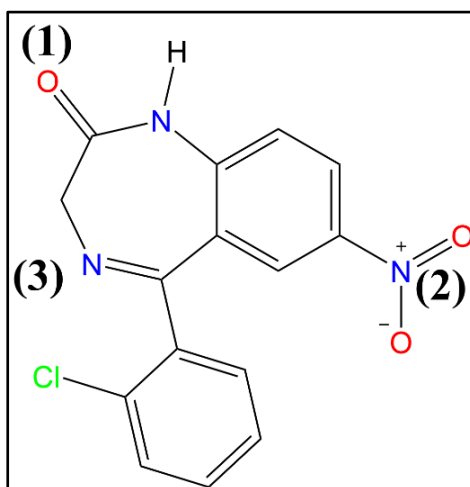


Figura 4.4. Estrutura química de CZP mostrando os três diferentes grupos eletroativos C=O (1), NO₂ (2) e C=N (3). Adaptado de⁴⁸.

O sinal analítico (A1) aparece no 1º ciclo (—) na varredura reversa (anódica). Na figura 4.3.3 é possível notar ainda que, ao iniciar a varredura no sentido catódico, o processo reducional referente ao grupo eletroativo citado pelos autores anteriormente não aparece, o que sugere uma possível dependência do processo reacional com uma etapa anterior. No segundo ciclo (—), aparece um segundo processo reducional (C2) após a oxidação A1, o que pode se inferir que o processo C2 mostrado na figura 4.5, é dependente de A1.

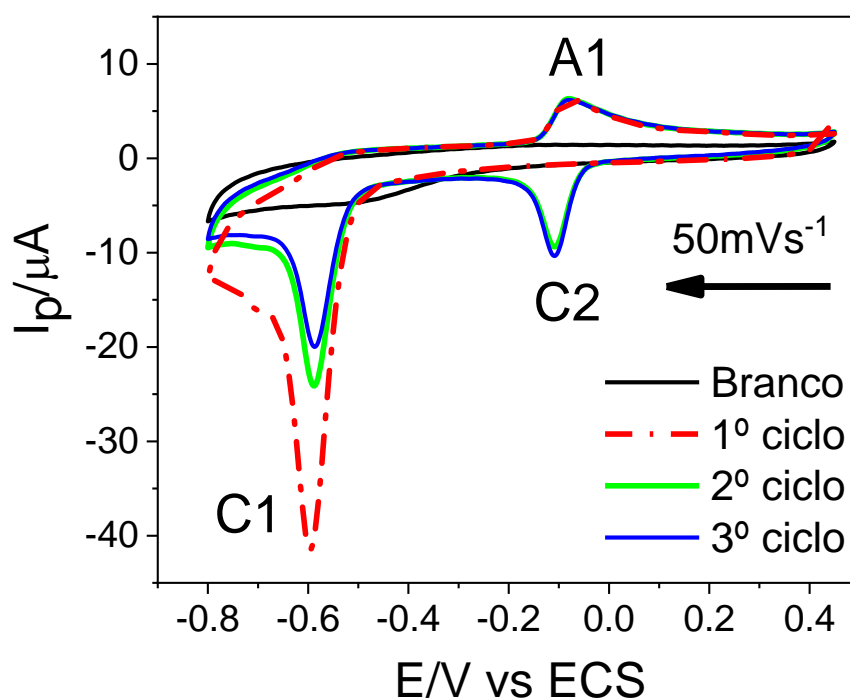


Figura 4.5. Voltamogramas cíclicos registrados na BGE em 0,1 M PBS pH 7.0 a 50 mVs^{-1} (—) na ausência e presença (—) de $45,9 \text{ } \mu\text{M}$ CZP sobre a faixa de 0,45 V a -0,80.

O pico anódico A1 é atribuído à oxidação do grupo NHOH a um grupo nitroso (NO), ao passo que o segundo pico de redução C2 é causado pela redução do grupo NO de volta à hidroxilamina, formando um par redox quase reversível NHOH/NO com $\Delta E_p = 0,02 \text{ V}$. Na ausência de CZP (—) não é observado nenhum processo redox. Este comportamento demonstra a alta atividade eletrocatalítica do BGE para redução e oxidação de CZP. Estudos de clonazepam usando diferentes eletrodos já foram relatados na literatura^{29; 34; 83; 137}, porém, como já mencionado, esta é a primeira vez que eletrodos de carbono grafite reciclados de pilhas comerciais são aplicados na detecção de moléculas de interesse forense, sem qualquer tratamento eletroquímico ou modificação prévia.

4.3 Estudo cinético

Para investigar a natureza do processo de transferência de elétrons, o comportamento eletroquímico de CZP frente ao eletrodo BGE foi avaliado em diferentes velocidades de varredura. Para isso, foram obtidos voltamogramas cíclicos para 45,9 μM de CZP em PBS (pH 7.0) variando a velocidade de varredura entre 20 e 500 mVs^{-1} . Os resultados demonstram que com o incremento da velocidade de varredura dá-se um aumento nas intensidades das correntes de pico anódicas (A1) e catódicas (C1 E C2), conforme pode ser observado na Figura 4.6.

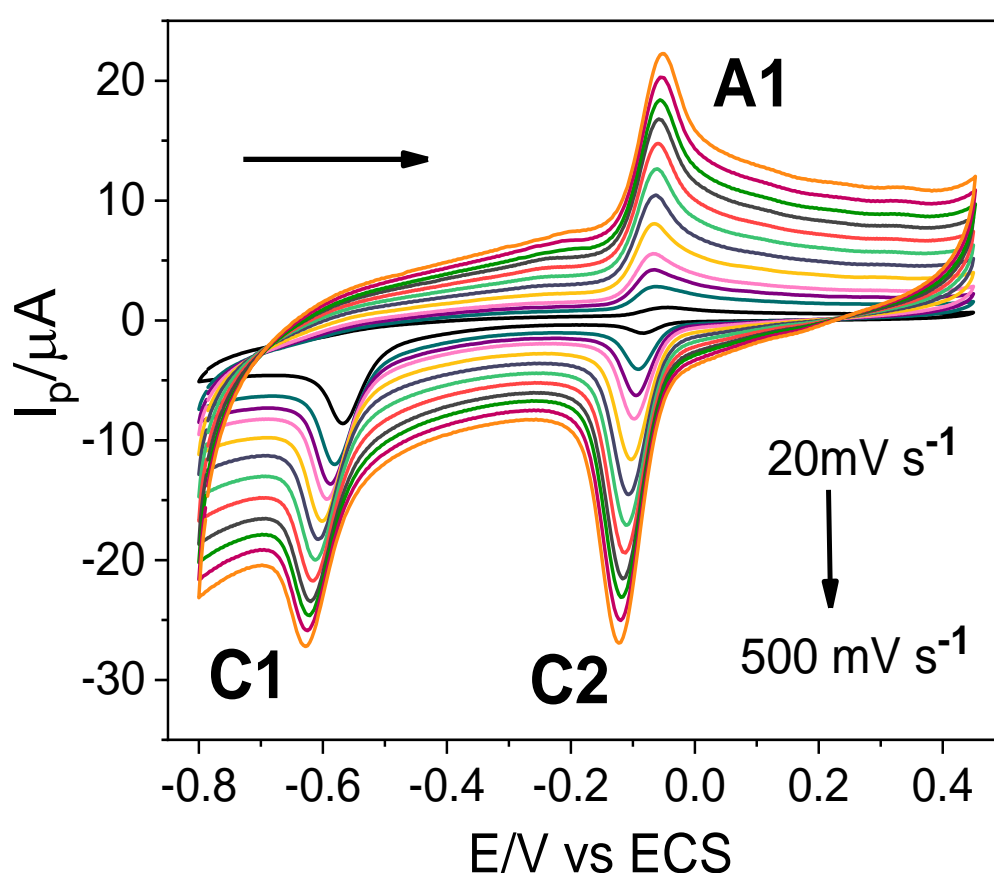


Figura 4.6. Voltamogramas cíclicos no BGE em 0.1 molL^{-1} PBS (pH 7.0) em diferentes velocidades de varreduras: 20, 50, 75, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450 e 500 mVs^{-1} .

É possível notar ainda que à medida que se aumenta a velocidade de varredura, os potenciais referentes ao processo C1 são levemente deslocados para potenciais mais negativos, tal característica aliada à ausência de um pico anódico reverso caracterizam o processo C1 como irreversível. Para investigar a natureza eletroquímica das etapas C1, A1 e C2, foram feitos ajustes de cada pico versus a vel-

ocidade cada pico versus a velocidade (V) (Figuras 4.8) e a raiz quadrada da velocidade de varredura ($V^{1/2}$), conforme mostra as Figuras 4.7, e 4.9.

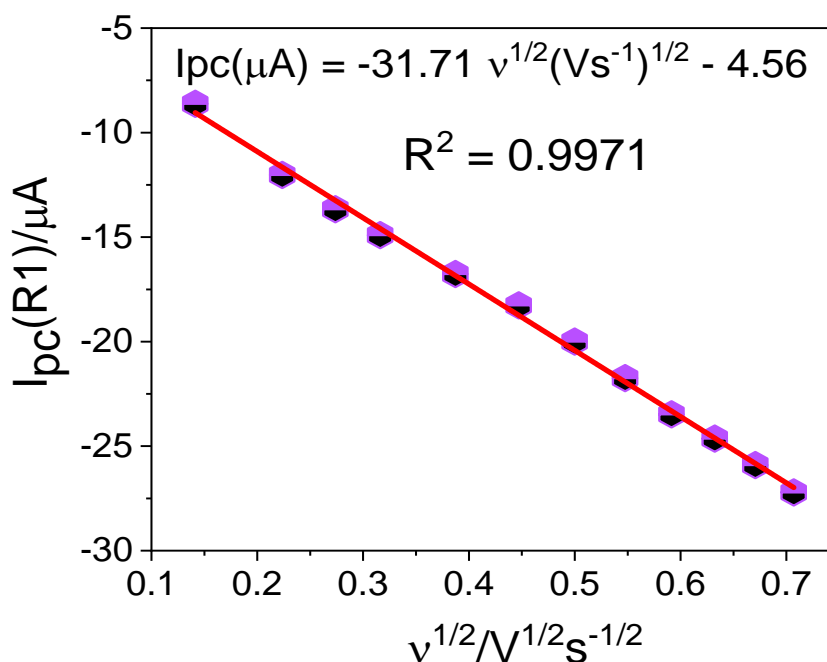


Figura 4.7. Ajuste linear entre a intensidade de corrente catódica para o processo C1 e a raiz quadrada da velocidade de varredura($V^{1/2}$).

Embora a redução de CZP entre -0,5 a -0,8 V seja uma reação irreversível, a linearidade da intensidade de corrente catódica em relação ao aumento da raiz quadrada da velocidade de varredura indica que o processo eletroquímico C1 para CZP é difusional, e não controlado pela transferência de carga através de moléculas de CZP adsorvidas na superfície do BGE. A correlação linear produz um valor de R^2 igual a 0,9968 confirmando assim que a presença de CZP é governada pela difusão livre das espécies na solução em direção à interface eletrodo/solução. Comportamento semelhante foi observado para sensores voltamétricos de CZP baseados em eletrodos de carbono vítreo modificados¹³⁸.

Para investigar a limitação eletroquímica dos processos referentes ao par redox A1/C2, foram feitos ajustes lineares entre as intensidades de correntes obtidas e a velocidade, no qual obteve-se as linearidades (Figura 4.8 e 4.9). Conforme exposto na Figura 4.8, a linearidade obtida pela relação i_{pa} vs. V indica que a cinética de transferência de carga das espécies NHOH do CZP até a superfície do BGE é limitada por adsorção⁸⁰.

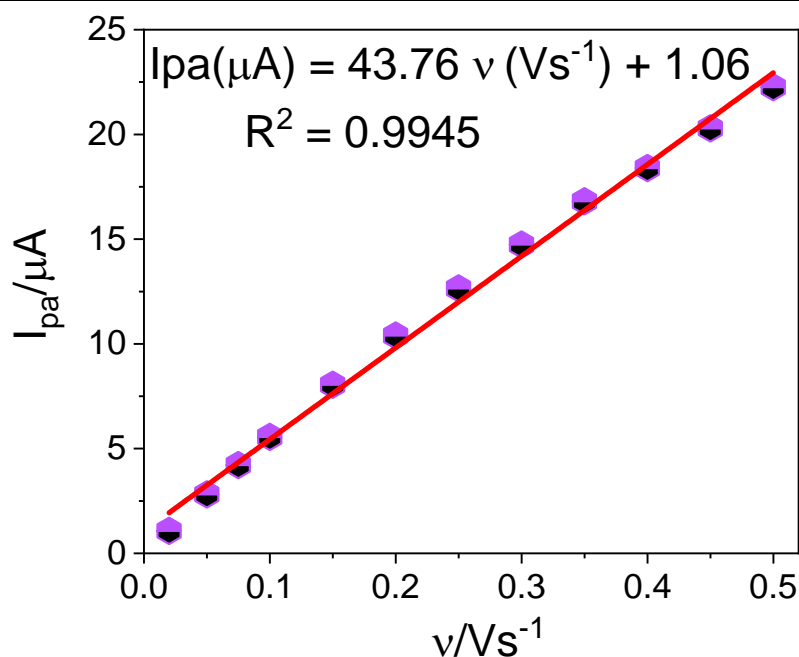


Figura 4.8. Ajuste linear entre a intensidade de corrente anódica para o processo A1 e a velocidade de varredura (V).

Para investigar a limitação do segundo processo catódico foi feito um ajuste linear, e se observou um maior coeficiente de correlação entre a intensidade de corrente catódica para C2 e a raiz quadrada da velocidade de varredura. A eletrorredução do C2 semelhante ao observado em C1, também é limitada por difusão (Figura 4.9).

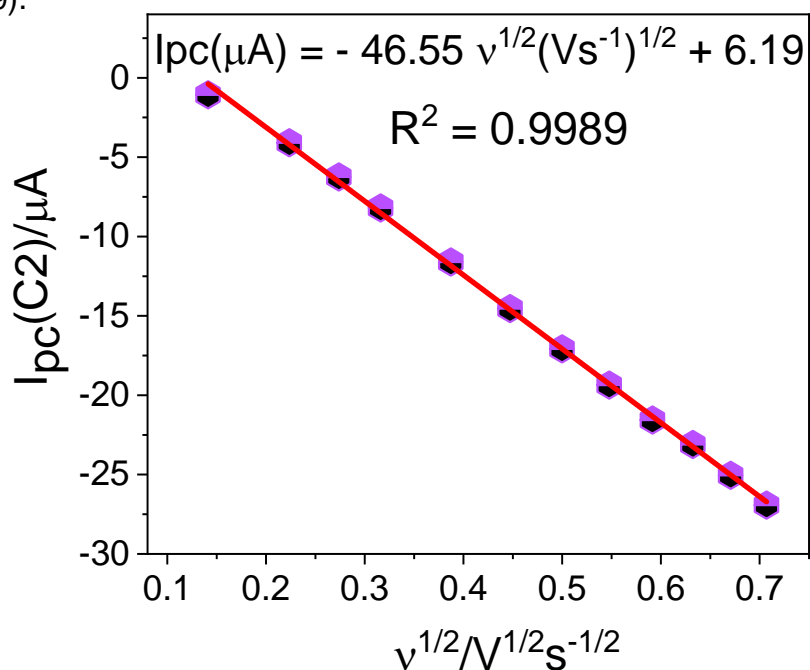


Figura 4.9. Ajuste linear entre a intensidade de corrente anódica para o processo C2 e a raiz quadrada da velocidade de varredura ($V^{1/2}$).

A teoria de Laviron¹³⁹ relata sobre a dependência de potenciais de pico em função do logaritmo (log) da velocidade de varredura em velocidades de varredura acima de 200 mV s^{-1} . Laviron cita que esta relação não pode ser observada em valores de velocidade relativamente baixos, enquanto para taxas de varredura acima de 200 mV s^{-1} , os potenciais de pico são proporcionais ao logaritmo da velocidade de varredura (log v).

Assim, foram plotados gráficos do logaritmo da velocidade de varredura (log v) versus o logaritmo da corrente de pico para os três processos reacionais com o intuito de observar a limitação dos processos eletroquímicos envolvidos no mecanismo de reação do CZP. Após o ajuste linear entre o log da intensidade corrente catódica C1 ($\log I_{pc1}$) versus o (log v) (Figura. 4.10), obteve-se a seguinte equação linear referente a redução do grupo nitro a uma hidroxilamina:

$$-\log I_{pc1}(\mu A) = 0,35 \log v (\text{mV s}^{-1}) + 0,48 \quad R^2 = 0,9951 \quad (8)$$

A inclinação no valor igual a 0,35 ($< 0,5$), demonstra que o processo de transferência de elétrons referente a redução de um grupo nitro em uma hidroxilamina do CZP é controlado por difusão.

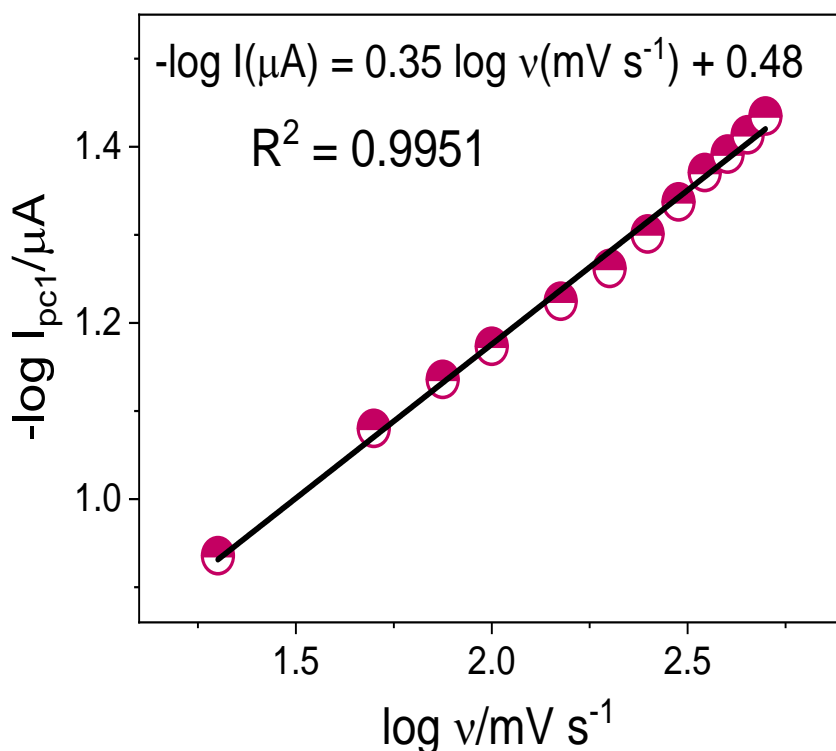


Figura 4.10. Ajuste linear entre o log da intensidade de corrente catódica para o processo C1 e o log da velocidade de varredura (V).

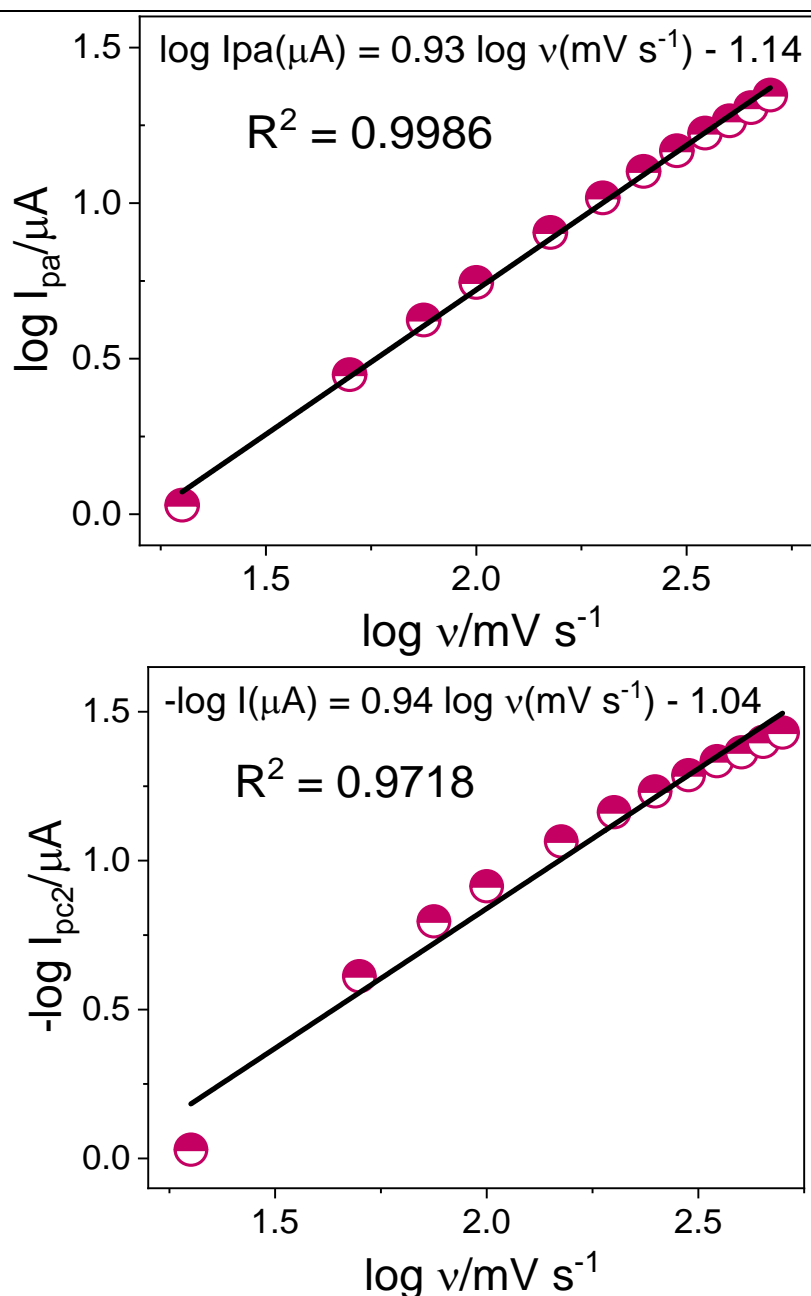


Figura 4.11. Ajuste linear entre o log da intensidade de corrente anódica para o processo A1 (a), para o processo C2 (b) versus o log da velocidade de varredura.

Para o processo A1, como é possível notar na equação da reta (Equação 9), o coeficiente angular é igual a 0.93, confirmando a natureza adsortiva do processo anódico A1 referente a oxidação do grupo hidroxilamina a um grupo nitroso.

$$\log I_{pa}(\mu A) = 0,93 \log v (mVs^{-1}) - 1,14 \quad R^2 = 0,9986 \quad (9)$$

Para confirmar a limitação referente ao processo C2 foi plotado um ajuste linear entre o log de I_{pc2} e log de V . A inclinação resultante, porém, sugere um processo

adsorativo, diferente do resultado obtido através da regressão linear entre I_{pc2} versus a raiz quadrada da velocidade de varredura (Figura 4.9). Após o ajuste linear entre o log da intensidade corrente catódica C2 ($\log I_{pc2}$) versus o ($\log v$) (Figura. 4.11b), obteve-se a seguinte equação linear referente a redução do grupo nitroso de volta a uma hidroxilamina:

$$-\log I_{pc2}(\mu A) = 0,94 \log v (mVs^{-1}) - 1,04 \quad R^2 = 0,9951 \quad (10)$$

A inclinação no valor igual a 0,94, demonstra que o processo de transferência de elétrons referente a redução de um grupo nitro em uma hidroxilamina do CZP é controlado pela adsorção das espécies na superfície do BGE. O resultado sugere que o processo tem natureza mista difusional e adsorativo.

De acordo com os resultados mencionados, um provável mecanismo de eletrorredução de CZP na superfície do BGE é apresentado na Figura 4.12. Esse mecanismo é semelhante ao já reportado na literatura para eletrorredução de CZP^{30; 140} (Figura 4.12).

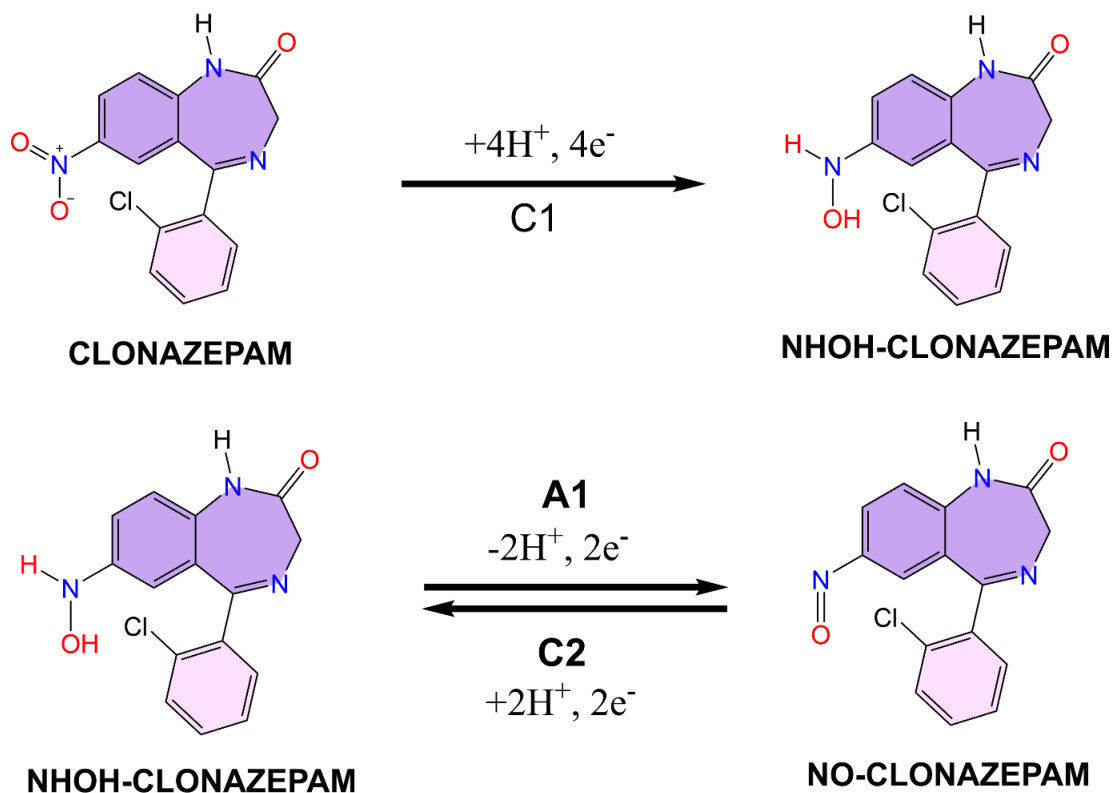


Figura 4.12. Mecanismo de eletrorredução C1 e do par redox A1/C2 do CZP no BGE. Fonte: De autoria própria.

4.4 Interdependência e estabilidade do CZP no BGE

Para investigar a interdependência entre o primeiro pico catódico (C1) e o par redox (A1/C2), foram realizadas varreduras em duas faixas potenciais diferentes: -0,80 a -0,25 V e -0,25 a 0,45 V a 50 mV s^{-1} (Figura 4.13). Quando voltamogramas foram obtidos na faixa de -0,80 a -0,25 V, a presença do pico de redução C1 pôde ser claramente observada. No entanto, quando os voltamogramas foram registrados na faixa de -0,25 a 0,45 V, os processos A1 e C2 não apareceram.

A ausência observada está diretamente relacionada à dependência do par redox A1/C2 com o processo eletroquímico C1. Assim, embora na faixa mais ampla (-0,35V a 0,45 V) os processos A1 e C2 sejam detectáveis em sobrepotenciais mais baixos ($E_{1/2} = -0,09 \text{ V}$) favorecendo a diminuição de energia e a probabilidade de interferência na superfície do BGE para eletrorredução de CZP, o primeiro processo catódico C1 foi selecionado para os estudos eletroquímicos seguintes, uma vez que pode ser diretamente relacionado à concentração de CZP no meio eletrolítico.

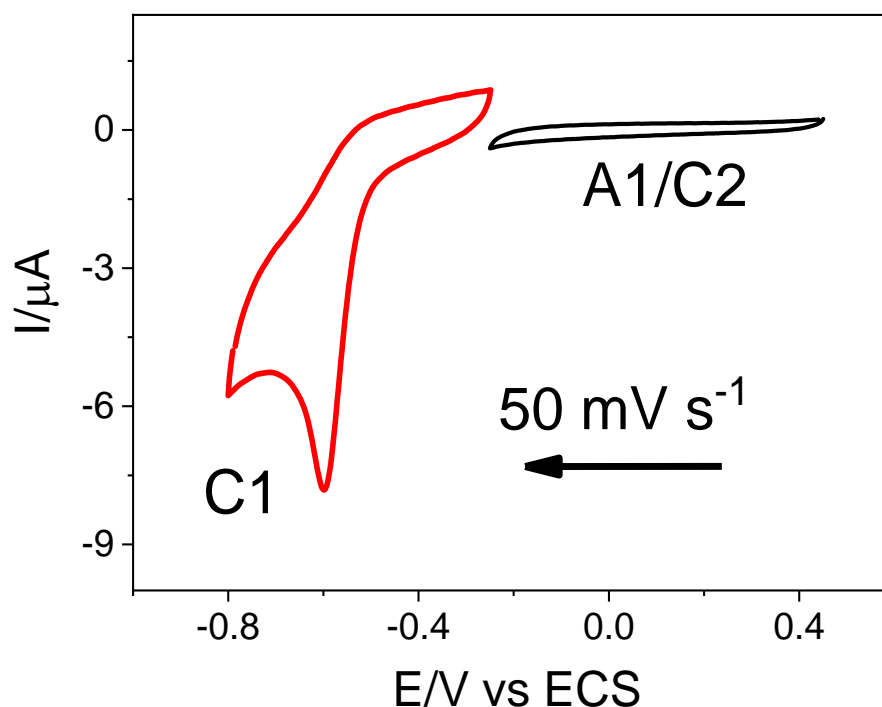


Figura 4.13. Voltamogramas cíclicos registrados no BGE em $0,1 \text{ MolL}^{-1}$ PBS pH 7.0 a 50 mVs^{-1} sobre duas faixas potenciais diferentes: -0,25 V a -0,80 V e -0,25 V a 0,45 V.

Para verificar a estabilidade eletroquímica do processo de redução C1, foram avaliados o potencial de pico e as correntes faradaicas do CZP no eletrodo BGE em função do número de ciclos (Figura 4.14a). Como evidenciado, o pico de redução do

CZP no BGE foi altamente estável mesmo após 80 ciclos voltamétricos, com queda de apenas 9,5% nas correntes faradaicas (Figura 4.14b) e sem deslocamento potencial. Vale ressaltar que para alguns eletrodos modificados com nanopartículas metálicas e nanotubos de carbono, o pico catódico referente ao processo reducional C1 do CZP, diminuiu significativamente até desaparecer após varreduras consecutivas, conforme relatado por HABIBI & JAHANBAKHSI³⁰.

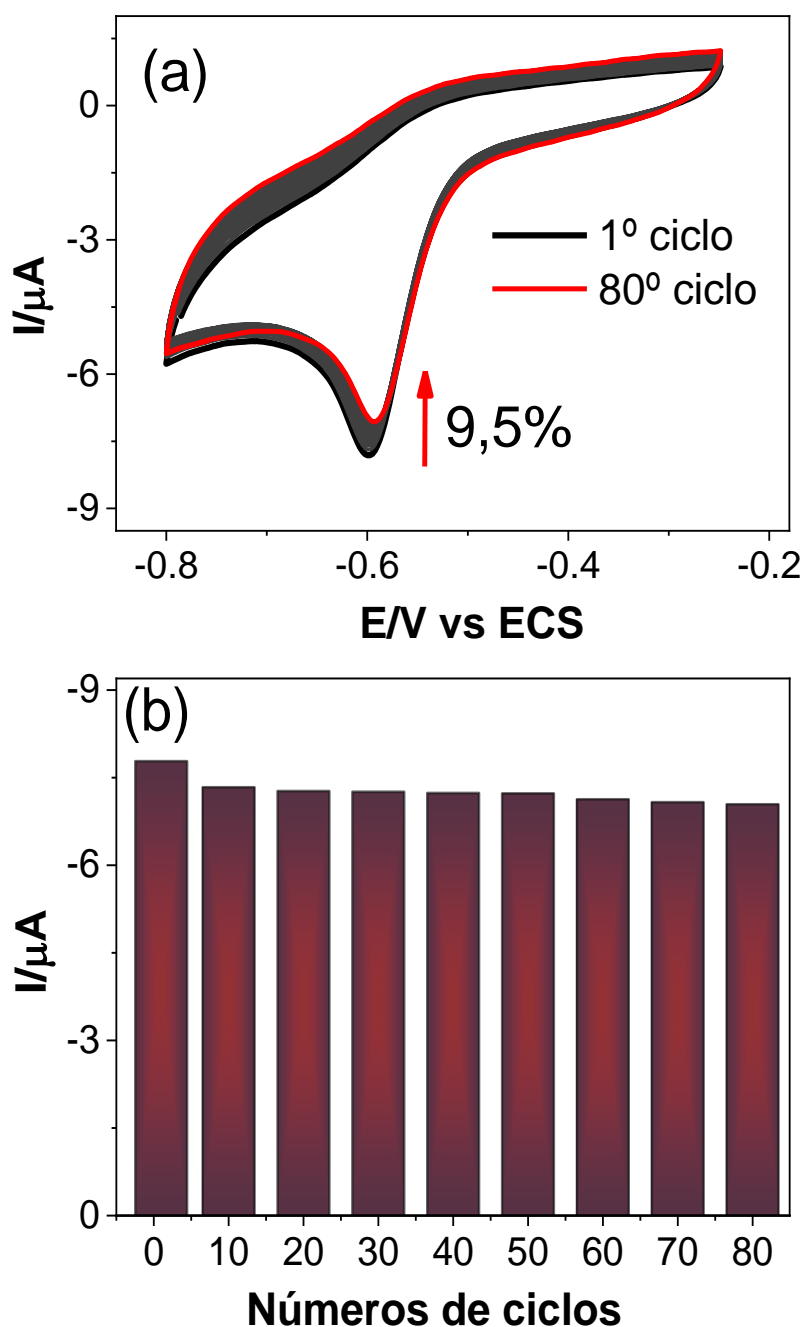


Figura 4.14. (a) 80 ciclos voltamétricos consecutivos obtidos para BGE em PBS $0,1\text{molL}^{-1}$ (pH 7,0) na presença de $45,9\text{ }\mu\text{M}$ CZP a 50 mV s^{-1} ; (b) Diminuição da intensidade de corrente de pico para o processo C1 em função do número de varreduras.

4.5 Efeito do pH

As bebidas comumente ingeridas na prática de crimes facilitados por drogas são carbonatadas e alcoólicas. Pesquisas mostram que as bebidas carbonatadas têm uma faixa de pH de 2-4^{141; 142}, enquanto as bebidas alcoólicas variam em acidez entre 3-8¹⁴³. Assim, neste estudo, o efeito do pH da solução sobre o processo de redução C1 do CZP na superfície do BGE foi investigado em tampão PBS 0.1 mol L⁻¹ em diferentes pHs na faixa de 2 a 9 (Figura 4.15). Como se observa na figura abaixo, o potencial de pico catódico C1 do CZP deslocou para valores mais negativos com o aumento do pH, o que indica que os prótons participam da redução eletroquímica do CZP (R-NO₂) para a CZP (R-NHOH). O gráfico de E_{pc} vs. pH entre pH 2 e 9 (Figura 4.16) obteve como resultado uma inclinação em torno de ~49 mV/pH, próximo ao valor esperado de acordo com a equação de Nernst para um processo de redução envolvendo um número igual de prótons e elétrons.

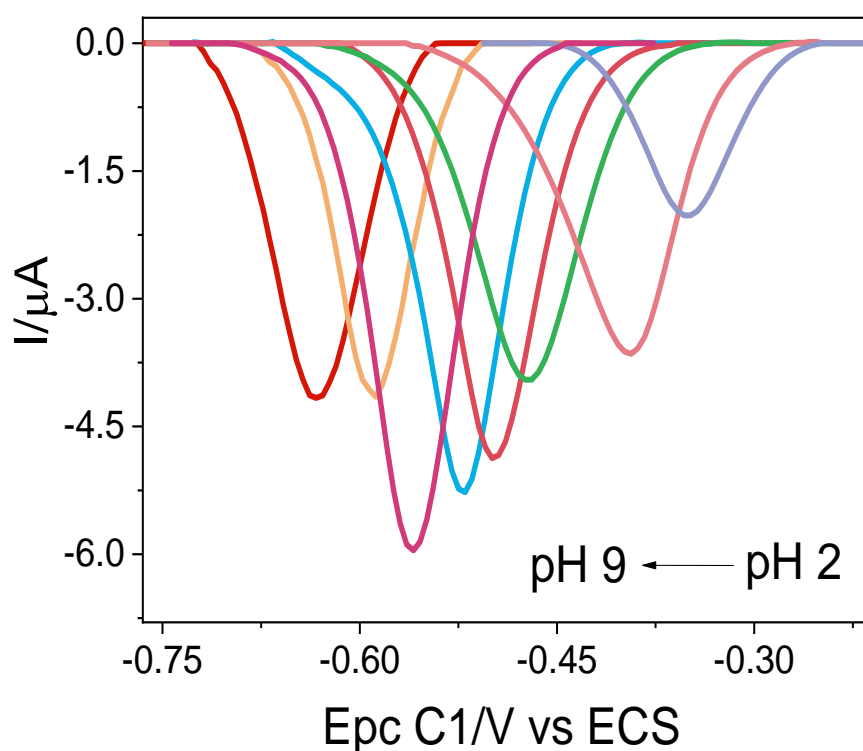


Figura 4.15. Voltamogramas de pulso diferencial (VPDs) de 45,9 μM de CZP no BGE em PBS 0,1M em diferentes pHs (2,0-9,0).

A Figura 4.16 apresenta a relação entre I_{pc} e pH e mostra que na faixa de pH de 5,00-9,00, corresponde a condições mais sensíveis para a detecção do CZP. Resultados semelhantes foram relatados para outros tipos de eletrodos^{32; 37}.

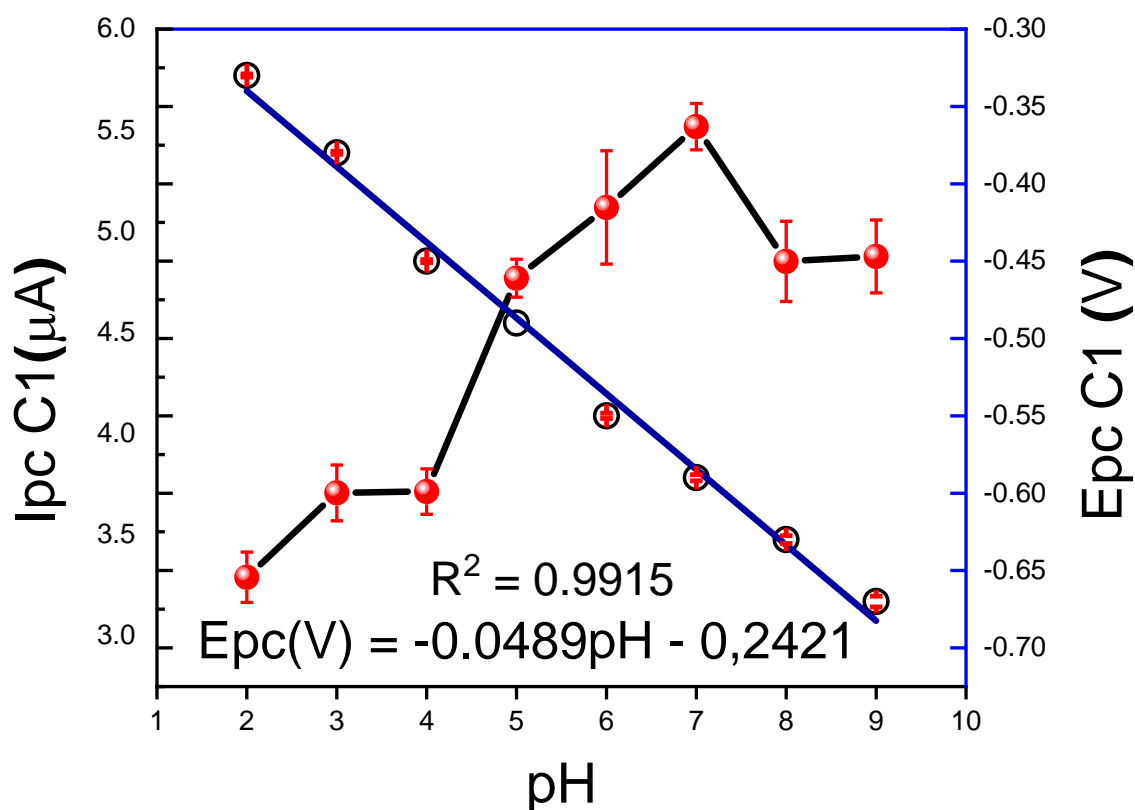


Figura 4.16. Dependência do potencial de pico de redução ($E_{p,C1}$) e da corrente de pico de redução ($I_p, C1$) de 45,9 μM de CZP no BGE em pHs (de 2,0 a 9,0) em solução tampão PBS 0,1 molL⁻¹.

Além disso, observou-se que em pH alcalino, devido ao baixo número de prótons disponíveis, a intensidade da corrente de pico diminui. O favorecimento da redução da CZP em pH baixo está de acordo com o mecanismo de redução eletroquímica dos compostos nitroaromáticos¹⁴⁴. O valor máximo para a corrente de pico apareceu em pH 7. Tendo em vista o foco deste trabalho em detectar CZP em matrizes complexas tais como bebidas alcoólicas, apesar de em pH's mais baixos necessitarem de uma menor energia para a eletrorredução, optou-se por realizar os estudos eletroquímicos com o eletrólito suporte em pH 7, uma vez que a obtenção de uma corrente de pico com maior incremento pode proporcionar melhores parâmetros analíticos, como alta sensibilidade (inclinação da curva analítica) e menor limite de detecção (maior detectabilidade). Desta forma, todas as determinações voltamétricas de CZP foram realizadas em 0,1 molL⁻¹ PBS pH 7 como eletrólito de suporte adequado.

4.6 Estudos de Sensoriamento de Clonazepam

A análise eletroquímica do CZP foi realizada utilizando-se a voltametria de pulso diferencial como método de detecção na faixa de potencial $-0,3$ a $-0,8$ V utilizando um step de potencial de 5 mV, amplitude de modulação de 25 mV e tempo de modulação de 50 ms. Todos os experimentos foram realizados em triplicata ($N = 3$) e os valores médios foram utilizados nos cálculos. Estudos prévios na literatura demonstram que a administração oral de 2 mg de clonazepam é suficiente para causar efeitos colaterais em vítimas de crimes facilitados por drogas (desinibição, sedação/hipnose, confusão mental, amnésia anterógrada)⁵⁷.

Como estávamos particularmente interessados em estudar concentrações criminalmente relevantes²³ mensurou-se que a dosagem mínima necessária para provocar os efeitos sedativos necessários para a prática de crimes seria em cerca de 2 mg de clonazepam em 250 mL de bebida (volume de copos/taças geralmente utilizadas em festas noturnas), resultando em uma concentração de 8 mg/mL ou 25,37 μM . Consequentemente, no presente estudo, uma faixa de concentração de CZP de 6,6-78,4 μM foi investigada (Figura 4.17).

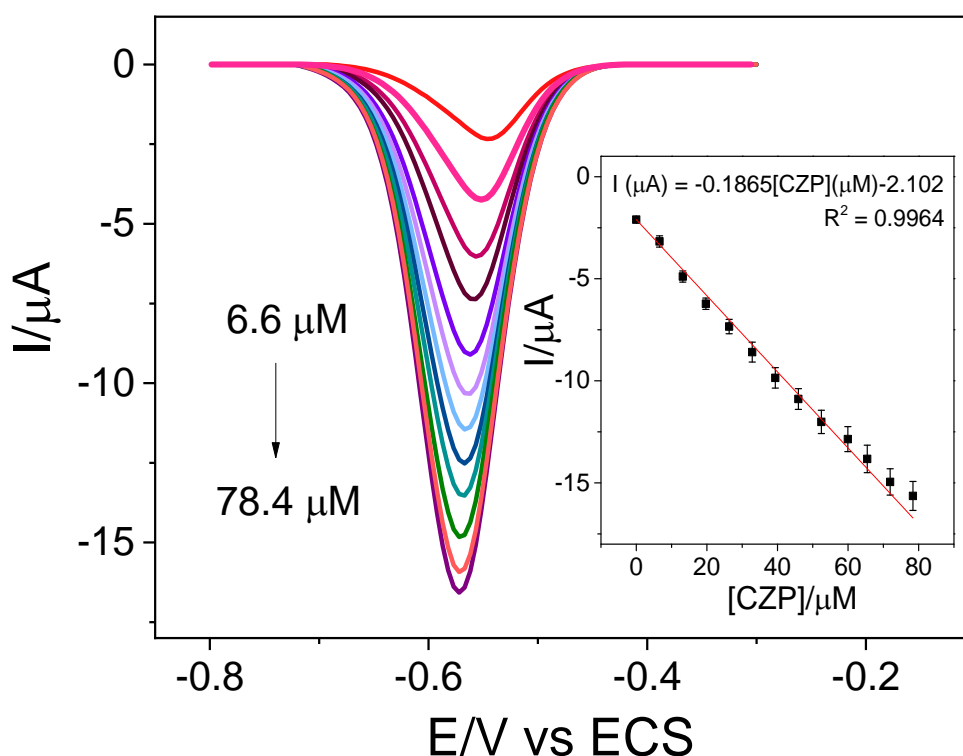


Figura 4.17. VPDs de diferentes concentrações de CZP (6,6-78,4 μM) em PBS (pH = 7,0, 0,1 molL^{-1}) e (inset) regressão linear das correntes de pico de redução em função das concentrações de CZP.

A curva analítica para a corrente de pico do VPD na redução da CZP vs sua concentração mostra uma resposta linear na faixa (6,6–78,4 μM) com uma equação de regressão de $I_{pc}(\mu\text{A}) = -0.1865 [\text{CZP}](\mu\text{M}) - 2,102$ ($R^2 = 0,9964$). Baseada na curva de calibração mostrada no *inset* da Fig. 4.17, o limite de detecção (LOD) e o limite de quantificação (LOQ) foram calculados como 0,42 μM e 1,40 μM respectivamente, de acordo com a definição de $\text{LOD} = 3 \text{ DP}/b$ e $\text{LOQ} = 10 \text{ DP}/b$ (SKOOG; WEST; HOLLER, 2020), em que o DP é o desvio padrão para 6 medições repetidas de amostra em branco e b é a inclinação da curva analítica (sensibilidade = $0,1865 \mu\text{A } \mu\text{M}^{-1}$). A Tabela 4.2 mostra uma comparação de LODs, LDRs (faixas dinâmicas lineares) e técnicas eletroquímicas empregadas para detecção de CZP usando eletrodos à base de carbono, entre outros relatados anteriormente com base em diferentes tipos de eletrodos modificados ou não modificados.

Tabela 4.2. Diferentes técnicas de detecção relatadas ao longo da literatura para a detecção de drogas CZP.

ELETRODO DE TRABALHO	FAIXA LINEAR(μM)	LOD (μM)	TÉCNICA	REFERÊNCIA
PVC/ácido fosfotúngstico	0.5–10	5.0	Potenciometria	83
PVC/tetrafenilborato	1–10	2.5	Potenciometria	83
PANI/GRO/GCE	32–175	14.7	VOQ	138
MWCNTs/ZnO-NPs/CPE	1.2–24	1.2	VPD	145
AgNPs/MWCNTs/GCE	0.05–2.5	0.006	VPD	30
SPCE	15–60	14.5	DPAdSV	140
SFs – IL/GCE	0.1–250	0.066	VPD	34
CuNPs/PSi/SPCE	0.05–7.6	0.015	VPD	37
AuNP/ITO	1–9	0.55	CV	29
CoOOH-rGO/SPCE	0–350	0.038	VPD	146
BGE	6.6–78,4	0.42	VPD	Este trabalho

Abreviaturas: PVC: cloreto de polivinila; PANI/GRO/GCE: polianilina/óxido de grafeno/eletrodo de carbono vítreo; VOQ: voltametria de onda quadrada; MWCNTs/ZnO-NPs/CPE: nanotubos de carbono de paredes múltiplas/nanopartículas de óxido de zinco/eletrodo de pasta de carbono; AgNPs/MWCNTs/GCE: nanopartículas de prata/nanotubos de carbono de paredes múltiplas/eletrodo de carbono vítreo; SPCE: eletrodo de carbono serigrafado; AdCSV: voltametria catódica de stripping adsorativo; SFs – IL/GCE: fibras de prata-líquido iônico/eletrodo de carbono vítreo; CuNPs/PSi/SPCE: nanopartículas de cobre/silício poroso/eletrodo de carbono serigrafado; AuNP/ITO: nanopartículas de ouro/óxido de estanho de índio.

Os resultados apresentados na Tabela 4.2 confirmam que o desempenho de detecção do eletrodo BGE foi comparável às estratégias de detecção eletroquímica de CZP relatadas anteriormente. No entanto, diferentemente dos estudos anteriores, neste trabalho demonstrou-se uma estratégia muito simples para detecção de CZP baseada em eletrodo de grafite reciclado de baterias comuns descarregadas. Até onde se sabe, esta é a primeira vez que um eletrodo de carbono reciclado de pilha é aplicado na detecção de moléculas de interesse forense, sem qualquer tratamento eletroquímico ou modificação prévia. De modo geral, os resultados apresentados demonstram o potencial do eletrodo proposto para aplicações práticas na área forense. Nesse sentido, foram realizados testes de detecção de CZP em amostras reais de bebidas alcoólicas para verificar a viabilidade de aplicação prática do BGE como eletrodo de trabalho para o desenvolvimento de um sensor eletroquímico.

4.7 Detecção em amostras reais

Uma vez verificada a atividade eletrocatalítica dos eletrodos BGE para a detecção de CZP em condições ideais utilizando tampão PBS, partiu-se para os testes em amostras reais de bebidas alcoólicas com o intuito de demonstrar a aplicação prática dos eletrodos como um sensor eletroquímico de interesse forense. Para isso, foram realizadas medidas de voltametria de pulso diferencial em 10 amostras de bebidas comerciais, sendo 5 cervejas nacionais e 5 internacionais conforme apresentado na Figura 4.18. Vale ressaltar que as amostras utilizadas para análises foram preparadas adicionando o fármaco Rivotril® diretamente nas bebidas (concentração final de CZP $45,9 \mu\text{molL}^{-1}$) sem nenhum pré-tratamento adicional.





Figura 4.18. Marcas de cervejas analisadas a) marcas nacionais; b) marcas internacionais Fonte: Arquivo pessoal.

Apesar das bebidas comerciais serem matrizes mais complexas, em todas as amostras testadas foi possível detectar o pico de redução C1 do Clonazepam (Figura 4.19), demonstrando a eficiência e versatilidade do eletrodo BGE em detectar o analito diretamente nas bebidas com mínima ou nenhuma interferência das outras espécies presentes no meio. Estes resultados evidenciam a potencialidade do eletrodo desenvolvido para construção de sensores eletroquímicos de interesse forense.

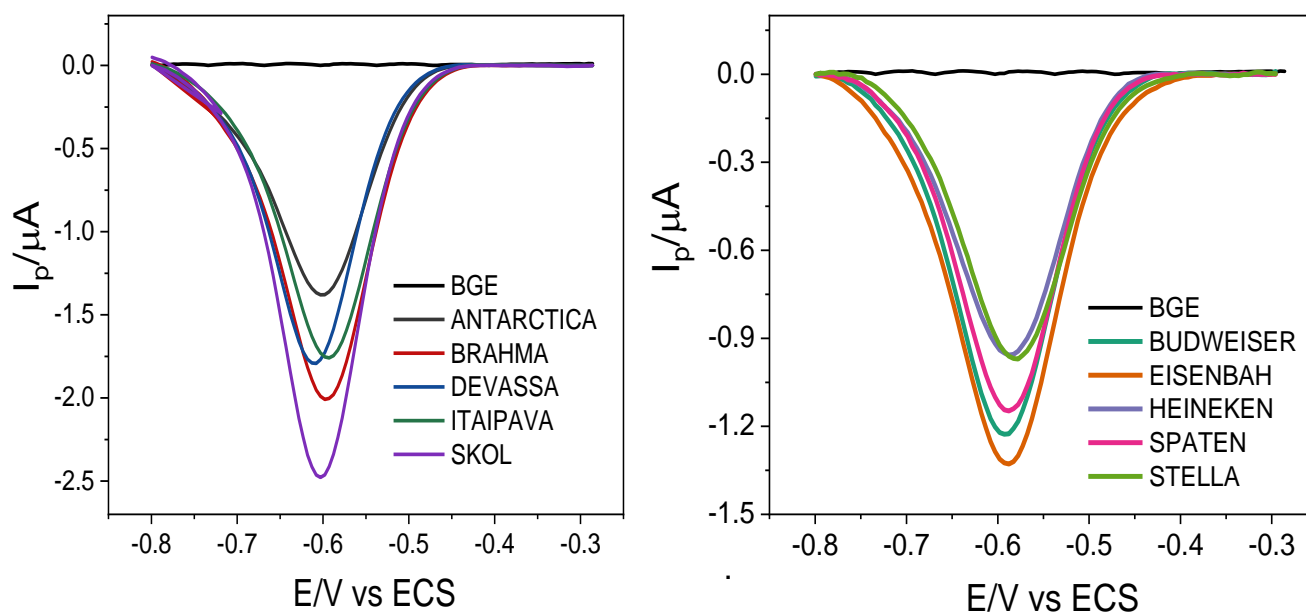


Figura 4.19. Voltamogramas de pulso diferencial detecção de 45,9Um de CZP em amostras de cervejas.

Capítulo 5

CONSIDERAÇÕES FINAIS

No presente trabalho, foi proposto uma nova alternativa para a determinação eletroanalítica do CZP utilizando hastes de carbono de grafite de baterias de 1,5V descarregadas como eletrodo de trabalho. A aplicabilidade da plataforma de detecção baseada em BGE foi avaliada utilizando-se a técnica VPD na detecção de diferentes concentrações de CZP em tampão PBS (pH=7.0), o que resultou em aumento linear das correntes de pico de redução de C1 em função da concentração de CZP na faixa de concentração (6,6 a 78. 4 μmolL^{-1}). Foi possível comprovar que a eletrorredução de CZP na superfície do eletrodo é controlada por difusão. A curva analítica obtida demonstrou um intervalo de trabalho entre 6.6 e 78,4 μmolL^{-1} com um bom coeficiente de correlação linear ($R^2= 0,9964$), e boa sensibilidade de 0,19 $\mu\text{A}/\mu\text{molL}^{-1}$. Além da alta sensibilidade, o eletrodo obteve um limite de detecção de 0,42 μmolL^{-1} , inferior à concentração mínima (25,4 μmolL^{-1}) utilizada para o acometimento de crimes, fato este que destaca o potencial do eletrodo desenvolvido para aplicação como sensores eletroquímicos de detecção em cenas de crime, ou em ponto de atendimento. O BGE se mostrou sensível na detecção da droga de abuso CZP mesmo frente às matrizes complexas analisadas, cervejas nacionais e internacionais. Além disso, é importante ressaltar que este trabalho oferece uma estratégia promissora, simples e de baixo custo para desenvolver uma plataforma reprodutível e sensível para a detecção e quantificação do clonazepam, sem a necessidade de pré-tratamento de amostras e da superfície do eletrodo.

REFERÊNCIAS

1. LO, R. Pharmacology of chlordiazepoxide (Librium). **Diseases of the nervous system**, v. 22, p. 7-15, 1961.
2. KAPCZINSKI, F. et al. USE AND MISUSE OF BENZODIAZEPINES IN BRAZIL: A REVIEW. **Substance Use & Misuse**, v. 36, n. 8, p. 1053-1069, 2001/1// 2001. Disponível em: < <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1081/JA-100104489> >.
3. MANDRIOLI, R.; MERCOLINI, L.; AUGUSTA RAGGI, M. Metabolism of Benzodiazepine and Non-Benzodiazepine Anxiolytic-Hypnotic Drugs: an Analytical Point of View. **Current Drug Metabolism**, v. 11, n. 9, p. 815-829, 2010/11// 2010. Disponível em: < <http://www.eurekaselect.com/openurl/content.php?genre=article&issn=1389-2002&volume=11&issue=9&spage=815> >.
4. ZAWILSKA, J. B.; WOJCIESZAK, J. An expanding world of new psychoactive substances—designer benzodiazepines. **NeuroToxicology**, v. 73, p. 8-16, 2019/7// 2019. Disponível em: < <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0161813X19300178> >.
5. STERNBACH, L. H. 1,4-Benzodiazepines. Chemistry and Some Aspects of the Structure-Activity Relationship. **Angewandte Chemie International Edition in English**, v. 10, n. 1, p. 34-43, 1971/1// 1971. Disponível em: < <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/anie.197100341> >.
6. HONEYCHURCH. Review of Electroanalytical-Based Approaches for the Determination of Benzodiazepines. **Biosensors**, v. 9, n. 4, p. 130-130, 2019/11// 2019. Disponível em: < <https://www.mdpi.com/2079-6374/9/4/130> >.
7. KINTZ, P. **Toxicological aspects of drug-facilitated crimes**. Elsevier, 2014. ISBN 0124169694.
8. MADEA, B.; MUßHOFF, F. Knock-Out Drugs. **Deutsches Ärzteblatt international**, v. 106, n. 20, p. 341-347, 2009/5// 2009. Disponível em: < <https://www.aerzteblatt.de/10.3238/arztebl.2009.0341> >.
9. XIANG, P.; SHEN, M.; DRUMMER, O. H. Review: Drug concentrations in hair and their relevance in drug facilitated crimes. **Journal of Forensic and Legal Medicine**, v. 36, p. 126-135, 2015/11// 2015. Disponível em: < <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1752928X15001766> >.
10. GARCÍA, M. G. et al. **Drug-facilitated sexual assault and other crimes: A systematic review by countries: Criminal social behaviors associated with drug use**. Journal of Forensic and Legal Medicine: Elsevier. 79: 102151-102151 p. 2021.

11. SCOTT-HAM, M.; BURTON, F. C. Toxicological findings in cases of alleged drug-facilitated sexual assault in the United Kingdom over a 3-year period. **Journal of Clinical Forensic Medicine**, v. 12, n. 4, p. 175-186, 2005/8// 2005. Disponível em: < <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1353113105000520> >.
12. HAES, T. M. et al. Álcool e sistema nervoso central. **Revista de Saúde Pública**, v. 43, n. 2, p. 153-163, 2010. ISSN 1518-8787.
13. D'ALOISE, P.; CHEN, H. Rapid determination of flunitrazepam in alcoholic beverages by desorption electrospray ionization-mass spectrometry. **Science & Justice**, v. 52, n. 1, p. 2-8, 2012. ISSN 1355-0306.
14. TAKITANE, J. et al. Aspectos médico-legais das substâncias utilizadas como facilitadoras de crime. **Saúde Ética & Justiça**, v. 22, n. 2, p. 66-71, 2017/12// 2017. Disponível em: < <https://www.revistas.usp.br/sej/article/view/145418> >.
15. NEGRUSZ, A.; GAENSSLEN, R. E. Analytical developments in toxicological investigation of drug-facilitated sexual assault. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 376, n. 8, p. 1192-1197, 2003/8// 2003. Disponível em: < <http://link.springer.com/10.1007/s00216-003-1896-z> >.
16. KROLL, D. S. et al. Benzodiazepines are Prescribed More Frequently to Patients Already at Risk for Benzodiazepine-Related Adverse Events in Primary Care. **Journal of General Internal Medicine**, v. 31, n. 9, p. 1027-1034, 2016/9// 2016. Disponível em: < <http://link.springer.com/10.1007/s11606-016-3740-0> >.
17. LE GUELLEC, C.; GAUDET, M. L.; BRETEAU, M. Improved selectivity for high-performance liquid chromatographic determination of clonazepam in plasma of epileptic patients. **Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications**, v. 719, n. 1-2, p. 227-233, 1998/11// 1998. Disponível em: < <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378434798003910> >.
18. KAKDE, R. B. et al. Stability-Indicating RP-HPLC Method for the Simultaneous Determination of Escitalopram Oxalate and Clonazepam. **Journal of Chromatographic Science**, v. 51, n. 6, p. 490-495, 2013/7// 2013. Disponível em: < <https://academic.oup.com/chromsci/article-lookup/doi/10.1093/chromsci/bms177> >.
19. SEVERINO, B. et al. Propafenone quantification in human plasma by high-performance liquid chromatography coupled with electrospray tandem mass spectrometry in a bioequivalence study. **Int. Journal of Clinical Pharmacology and Therapeutics**, v. 56, n. 06, p. 280-291, 2018/6// 2018. Disponível em: < https://www.dustri.com/article_response_page.html?artId=16779&doi=10.5414/CP203181&L=0 >.
20. ACIKKOL, M.; MERCAN, S.; KARADAYI, S. Simultaneous Determination of Benzodiazepines and Ketamine from Alcoholic and Nonalcoholic Beverages by GC-MS in Drug Facilitated Crimes. **Chromatographia**, v. 70, n. 7-8, p. 1295-

- 1298, 2009/10// 2009. Disponível em: < <http://link.springer.com/10.1365/s10337-009-1278-6> >.
21. HACKETT, J.; ELIAN, A. A. Extraction and analysis of clonazepam and 7-aminoclonazepam in whole blood using a dual internal standard methodology. **Forensic Science International**, v. 166, n. 2-3, p. 209-217, 2007/3// 2007. Disponível em: < <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0379073806003409> >.
22. PUJADAS, M. et al. A simple and reliable procedure for the determination of psychoactive drugs in oral fluid by gas chromatography–mass spectrometry. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 44, n. 2, p. 594-601, 2007/6// 2007. Disponível em: < <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0731708507001379> >.
23. CHÈZE, M.; VILLAIN, M.; PÉPIN, G. Determination of bromazepam, clonazepam and metabolites after a single intake in urine and hair by LC–MS/MS: Application to forensic cases of drug facilitated crimes. **Forensic Science International**, v. 145, n. 2-3, p. 123-130, 2004/10// 2004.
24. BARES, I. F.; PEHOURCQ, F.; JARRY, C. Development of a rapid RP–HPLC method for the determination of clonazepam in human plasma. **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis**, v. 36, n. 4, p. 865-869, 2004. ISSN 0731-7085.
25. SHAW, L.; DENNANY, L. Applications of electrochemical sensors: Forensic drug analysis. **Current Opinion in Electrochemistry**, v. 3, n. 1, p. 23-28, 2017. ISSN 2451-9103.
26. PALISOC, S.; VITTO, R. I. M.; NATIVIDAD, M. Determination of Heavy Metals in Herbal Food Supplements using Bismuth/Multi-walled Carbon Nanotubes/Nafion modified Graphite Electrodes sourced from Waste Batteries. **Scientific Reports** 2019 9:1, v. 9, n. 1, p. 1-13, 2019/12// 2019. ISSN 4159801954589x. Disponível em: < <https://www.nature.com/articles/s41598-019-54589-x> >.
27. PALISOC, S. T. et al. Electrochemical determination of tannic acid using graphite electrodes sourced from waste zinc-carbon batteries. **Sensing and Bio-Sensing Research**, v. 28, p. 100326-100326, 2020/6// 2020.
28. TASIĆ, Ž. Z. et al. Electrochemical determination of L-tryptophan in food samples on graphite electrode prepared from waste batteries. **Scientific Reports** 2022 12:1, v. 12, n. 1, p. 1-11, 2022/3// 2022. ISSN 0123456789. Disponível em: < <https://www.nature.com/articles/s41598-022-09472-7> >.
29. SACHDEVA, D.; SINGH, A.; AGRAWAL, V. V. Electrochemical Detection of Anti-anxiety Drug Clonazepam Using Electrophoretically Deposited Gold Nanoparticles. **Mapan - Journal of Metrology Society of India**, v. 36, n. 3, p. 639-649, 2021/9// 2021. Disponível em: < <https://link.springer.com/article/10.1007/s12647-021-00484-8> >.

30. HABIBI, B.; JAHANBAKHSHI, M. Silver nanoparticles/multi walled carbon nanotubes nanocomposite modified electrode: Voltammetric determination of clonazepam. **Electrochimica Acta**, v. 118, p. 10-17, 2014/2// 2014.
31. DEHGAN-REYHAN, S.; NAJAFI, M.; MADDAH, B. Preparation of Nanocomposite Modified Defective Mesoporous Carbon (DMC) Ceramic Electrode (DMCCE): Application to Electrochemical Determination of Clonazepam. **Sensor Letters**, v. 15, n. 12, p. 987-991, 2018/3// 2018.
32. LOTFI, S.; VEISI, H. Electrochemical determination of clonazepam drug based on glassy carbon electrode modified with Fe₃O₄/R-SH/Pd nanocomposite. **Materials Science and Engineering: C**, v. 103, p. 109754-109754, 2019/10// 2019.
33. SACHDEVA, D.; SINGH, A.; AGRAWAL, V. V. Electrochemical Detection of Anti-anxiety Drug Clonazepam Using Electrophoretically Deposited Gold Nanoparticles. **MAPAN**, v. 36, Disponível em: < <https://doi.org/10.1007/s12647-021-00484-8> >.
34. KHOSHROO, A. et al. Silver nanofibers/ionic liquid nanocomposite based electrochemical sensor for detection of clonazepam via electrochemically amplified detection. **Microchemical Journal**, v. 145, p. 1185-1190, 2019/3// 2019.
35. SALEH AHAMMAD, A. J.; LEE, J. J.; RAHMAN, M. A. Electrochemical sensors based on carbon nanotubes. **Sensors**, v. 9, n. 4, p. 2289-2319, 2009/4// 2009.
36. ALLAHNOURI, F. et al. Screen printed carbon electrode modified with a copper@porous silicon nanocomposite for voltammetric sensing of clonazepam. Disponível em: < <https://doi.org/10.1007/s00604-019-3784-z> >.
37. _____. Screen printed carbon electrode modified with a copper@porous silicon nanocomposite for voltammetric sensing of clonazepam. **Microchimica Acta**, v. 186, n. 10, p. 676-676, 2019/10// 2019. Disponível em: < <https://doi.org/10.1007/s00604-019-3784-z> >.
38. CEBRID, C. B. D. I. S. D. P. **Livreto informativo sobre Drogas Psicotrópicas**. São Paulo: CEBRID, 2010. Disponível em: < <https://www.cebrid.com.br/wp-content/uploads/2012/12/Livreto-Informativo-sobre-Drogas-Psicotrópicas.pdf> >.
39. BRASIL. Lei 11343, de 23 de Agosto de 2006. **24/08/2006**, 2006. Disponível em: < http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2004-2006/2006/lei/l11343.htm >.
40. _____. **Portaria n. 344, de 12 de maio de 1998**. Ministério da Saúde. 1961 1998.

41. BASTOS, F. I. P. M. et al. **III Levantamento Domiciliar Sobre o Uso de Drogas pela População Brasileira 2017**.
42. ZANFROGNINI, B.; PIGANI, L.; ZANARDI, C. Recent advances in the direct electrochemical detection of drugs of abuse. **Journal of Solid State Electrochemistry**, v. 24, n. 11-12, p. 2603-2616, 2020.
43. LEBEAU, M. A. Drug-facilitated sexual assault : a forensic handbook. San Diego: Academic Press. p. 1-37, 2001. ISSN 0124402615.
44. SHBAIR, M. K. S.; LHERMITTE, M. Drug-facilitated crimes: Definitions, prevalence, difficulties and recommendations. A review. **Annales Pharmaceutiques Francaises**, v. 68, n. 3, p. 136-147, 2010. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.pharma.2010.03.005> >.
45. ANDERSON, L. J.; FLYNN, A.; PILGRIM, J. L. A global epidemiological perspective on the toxicology of drug-facilitated sexual assault: A systematic review. **Journal of Forensic and Legal Medicine**, v. 47, p. 46-54, 2017/4// 2017.
46. BARRETO DA SILVA, A. **Determinação de Cetamina e Norcetamina em cabelo, como modelos de drogas básicas para a investigação toxicológica sobre o golpe "Boa noite Cinderela"**. Revista Brasileira de Ergonomia. 3: 80-91 p. 2016.
47. JACAUNA, J. S. P.; RODRIGUES JUNIOR, O. M. Cuidados farmacológicos na interação medicamentosa: clonazepam com álcool. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 15, p. e226101522771-e226101522771, 2021/11// 2021. Disponível em: < <https://rsdjournal.org/index.php/rsd/article/view/22771> >.
48. RUSSO, M. J. et al. A Simple Electrochemical Swab Assay for the Rapid Quantification of Clonazepam in Unprocessed Saliva Enabled by Lubricin Antifouling Coatings. **ChemElectroChem**, v. 7, n. 13, p. 2851-2858, 2020/7// 2020. Disponível em: < <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/celec.202000393> >.
49. CHAN, A. W. K. Effects of combined alcohol and benzodiazepine: A review. **Drug and Alcohol Dependence**, v. 13, n. 4, p. 315-341, 1984/7// 1984. Disponível em: < <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0376871684900012> >.
50. ADAMOWICZ, P.; KAŁA, M. Simultaneous screening for and determination of 128 date-rape drugs in urine by gas chromatography–electron ionization–mass spectrometry. **Forensic Science International**, v. 198, n. 1-3, p. 39-45, 2010/5// 2010.
51. GRALLERT, S. R. M.; TAVARES, L. C.; ARAÚJO, E. B. D. Radioligantes para neurorreceptores benzodiazepínicos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 39, n. 3, 2003/9// 2003. Disponível em: <

- http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-93322003000300004&lng=pt&nrm=iso&tling=pt >.
52. OGA, S.; CAMARGO, M. M. D. A.; BATISTUZZO, J. A. D. O. Fundamentos de toxicologia. 2008.
53. GRIFFIN, C. E. et al. Benzodiazepine Pharmacology and Central Nervous System–Mediated Effects. **Ochsner Journal**, v. 13, n. 2, p. 214-214, 2013/6// 2013. Disponível em: <
<http://www.ochsnerjournal.org/content/13/2/214.abstract> >.
54. PRESS, P. **Clarke's Analysis of Drugs and Poisons**. 4th. 2011. 2736 ISBN 9780853697114. Disponível em: <
<https://about.medicinescomplete.com/publication/clarkes-analysis-of-drugs-and-poisons/> >.
55. NEGRUSZ, A. et al. **Deposition of 7-Aminoclonazepam and Clonazepam in Hair Following a Single Dose of Klonopin** *. 2002
56. BENNETT, G. The merck index: An encyclopedia of chemicals, drugs and biologicals. **Journal of Hazardous Materials**, v. 30, n. 3, p. 373-373, 1992. ISSN 9780911910124.
57. HAMMETT-STABLER, C. A. Disposition of Toxic Drugs and Chemicals in Man, 5th ed. R.C. Baselt. Foster City, CA: Chemical Toxicology Institute, 1999, 900 pp., \$119.00. ISBN 0-9626523-3-4. **Clinical Chemistry**, v. 46, n. 6, p. 889-889, 2000/6// 2000.
58. DAGAR, M. et al. Emerging trends in point-of-care sensors for illicit drugs analysis. **Talanta**, v. 238, p. 123048-123048, 2022/2// 2022.
59. PANTALEÃO, L. D. N. Análise toxicológica de anfetaminas e benzodiazepínicos em amostras de cabelo por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas. São Paulo, 2014/1// 2014. Disponível em: <
<http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/9/9141/tde-02042014-104017/> >.
60. ELSOHL, M. A. et al. LC-(TOF) MS analysis of benzodiazepines in urine from alleged victims of drug-facilitated sexual assault. **Journal of Analytical Toxicology**, v. 31, n. 8, p. 505-514, 2007.
61. CRIME, U.-U. N. O. O. D. A. **MÉTODOS RECOMENDADOS PARA LA DETECCIÓN Y ENSAYO DE BARBITÚRICOS Y BENZODIAZEPINAS EN ESPECÍMENES BIOLÓGICOS** 2007.
62. _____. **Recommended methods for testing opium, morphine and heroin: manual for use by national drug testing laboratories**: UN. 29 1998.
63. _____. **Recommended Methods for the Identification and Analysis of Amphetamine, Methamphetamine and Their Ring-substituted Analogues**

- in Seized Materials: Manual for Use by National Drug Testing Laboratories:** United Nations Publications 2006.
64. _____. **Recommended methods for the identification and analysis of cocaine in seized materials:** United Nations Vienna, Austria 2012.
65. _____. **Recommended methods for the identification and analysis of piperazines in seized materials** 2013.
66. _____. **Recommended methods for the identification and analysis of synthetic cathinones in seized materials:** United Nations New York, USA 2015.
67. _____. **Recommended methods for the identification and analysis of fentanyl and its analogues in biological specimens:** UNODC 2017.
68. DELIBERTO, L. A. Eletrodos quimicamente modificados com Poli (benzil viologênio): comportamento eletroquímico de fármacos nitroderivados. 2013. Disponível em: < <https://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/59/59138/tde-16042013-095504/en.php> >.
69. SILVA, O. A. et al. Drug Use by Truck Drivers in Brazil. <http://dx.doi.org/10.1080/0968763021000057727>, v. 10, n. 2, p. 135-139, 2009/5// 2009. Disponível em: < <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/0968763021000057727> >.
70. DE ARAUJO, F. G. et al. Development and Validation of an Analytical Method for the Detection and Quantification of Bromazepam, Clonazepam and Diazepam by UPLC-MS/MS in Surface Water. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 103, n. 2, p. 362-366, 2019/8// 2019. Disponível em: < <https://link.springer.com/article/10.1007/s00128-019-02631-z> >.
71. FANG, S. et al. A preliminary gas chromatography-mass spectrometry-based metabolomics study of rats ingested diazepam or clonazepam. **Journal of Forensic Science and Medicine**, v. 6, n. 4, p. 117-117, 2020/10// 2020. Disponível em: < <https://www.jfsmonline.com/article.asp?issn=2349-5014> >.
72. FOUDAH, A. I. et al. Simultaneous Estimation of Escitalopram and Clonazepam in Tablet Dosage Forms Using HPLC-DAD Method and Optimization of Chromatographic Conditions by Box-Behnken Design. **Molecules**, v. 27, n. 13, p. 4209-4209, 2022. Disponível em: < <https://www.mdpi.com/1420-3049/27/13/4209/htm> >.
73. HONEYCHURCH, K. C.; HART, J. P. Electrochemical Detection of Benzodiazepines, Following Liquid Chromatography, for Applications in Pharmaceutical, Biomedical and Forensic Investigations. **Insciences J.**, v. 4, n. 1, p. 1-18, 2014/1// 2014.

74. LEBEAU, M. et al. Recommendations for toxicological investigations of drug-facilitated sexual assaults. **Journal of forensic sciences**, v. 44, n. 1, p. 14442J-14442J, 1999/1// 1999. Disponível em: < <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9987892/> >.
75. PÉPIN, G. [Analytical, toxicological and forensic aspects of drug-facilitated crimes: 10 years of experience]. **Annales pharmaceutiques francaises**, v. 68, n. 2, p. 61-75, 2010/3// 2010. Disponível em: < <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20434595/> >.
76. BAIRROS, A. V. D. **Desenvolvimento de métodos analíticos para a identificação de drogas facilitadoras de crime em amostras de urina**. São Paulo: Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da Universidade de São Paulo 2015.
77. PIRES, T. D. A. O.; PAIVA, M. J. M. D. The overuse of clonazepam: pharmacist's role in the conscientious use of the drug. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 16, p. e315101623880-e315101623880, 2021/12// 2021. Disponível em: < <https://rsdjournal.org/index.php/rsd/article/view/23880> >.
78. MARC, B. Current clinical aspects of drug-facilitated sexual assaults in sexually abused victims examined in a forensic emergency unit. **Therapeutic Drug Monitoring**, v. 30, n. 2, p. 218-224, 2008/4// 2008.
79. PAPADODIMA, S. A.; ATHANASELIS, S. A.; SPILIOPOULOU, C. Toxicological investigation of drug-facilitated sexual assaults. **International journal of clinical practice**, v. 61, n. 2, p. 259-264, 2007/2// 2007. Disponível em: < <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17263712/> >.
80. SKOOG, D. A.; WEST, D. M.; HOLLER, J. **Fundamentos de química analítica. Volume 2**. Reverté, 2020. ISBN 8429194533.
81. TICIANELLI, E. A.; GONZALEZ, E. R. Eletroquímica : princípios e aplicações. 1998. ISSN 9788531404245.
82. GUPTA, V. K. et al. Voltammetric techniques for the assay of pharmaceuticals—A review. **Analytical Biochemistry**, v. 408, n. 2, p. 179-196, 2011/1// 2011.
83. SALEM, A. A.; BARSOUM, B. N.; IZAKE, E. L. Potentiometric determination of diazepam, bromazepam and clonazepam using solid contact ion-selective electrodes. **Analytica Chimica Acta**, v. 498, n. 1-2, p. 79-91, 2003/11// 2003.
84. DOS SANTOS, M. M. C.; FAMILA, V.; GONÇALVES, M. L. S. Square-wave voltammetric techniques for determination of psychoactive 1,4-benzodiazepine drugs. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 374, n. 6, p. 1074-1081, 2002. Disponível em: < <https://link.springer.com/article/10.1007/s00216-002-1535-0> >.

85. PACHECO, W. F. et al. Voltametrias: Uma breve revisão sobre os conceitos. **Revista Virtual de Química**, v. 5, n. 4, p. 516-537, 2013.
86. RODRIGUES, R. M. **Desenvolvimento de metodologia voltamétrica para a quantificação de paracetamol, fenilefrina e clorfeniramina em preparações farmacêuticas antigripais, utilizando eletrodos com diferentes alótropos de carbono** 2019.
87. SILVA, W. **Desenvolvimento de métodos eletroanalíticos para a determinação de tibolona e metabólitos em saliva e 1-(3-clorofenil)piperazina (mCPP) em amostras apreendidas**: Universidade Federal de Uberlândia 2021.
88. ARRIEIRO, M. O. B. Desenvolvimento de um método de triagem simples e rápido para determinação da eutilona em amostras forenses. 2021/12// 2021. Disponível em: < <http://acervo.ufvjm.edu.br/jspui/handle/1/2849> >.
89. DE, I.; BORGES, O. Desenvolvimento de novos eletrodos à base de carbono para a determinação eletroquímica de diazepam. Disponível em: < <https://repositorio.ufsc.br/handle/123456789/228447> >.
90. TOIA, J. M.; SASSO, K. Desenvolvimento de métodos eletroanalíticos para detecção de drogas de abuso em química forense. Ribeirão Preto, 2020. Disponível em: < <https://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/59/59138/tde-29062020-142505/> >.
91. GOMES, J. S. Desenvolvimento de método eletroanalítico por voltametria de pulso diferencial para determinação de Flavan-3-ol em fitoterápicos. 2021. Disponível em: < <https://repositorio.ufu.br/handle/123456789/32918> >.
92. MENDONÇA, A. K.; ALEGRE, P. Voltametria de pulso diferencial como alternativa na fiscalização de metais pesados em extratos vegetais usados em solução oral digestiva. 2021. Disponível em: < <https://lume.ufrgs.br/handle/10183/234313> >.
93. DE SOUZA, P. H. M. **Estudos eletroquímicos de complexos de Cu (II) de antibióticos da classe das fluorquinolonas**. 2011. Universidade Federal de Minas Gerais
94. WANG, J. Analytical Electrochemistry, Third Edition. **Analytical Electrochemistry, Third Edition**, p. 1-250, 2006. ISSN 9780471678793. Disponível em: < <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/book/10.1002/0471790303> >.
95. ELGRISHI, N. et al. A Practical Beginner's Guide to Cyclic Voltammetry. **Journal of Chemical Education**, v. 95, n. 2, p. 197-206, 2018.
96. USLU, B.; OZKAN, S. A. Electroanalytical application of carbon based electrodes to the pharmaceuticals. **Analytical Letters**, v. 40, n. 5, p. 817-853,

2007. Disponível em: <
<https://www.tandfonline.com/action/journalInformation?journalCode=lanl20> >.
97. MCCREERY, R. L. Advanced carbon electrode materials for molecular electrochemistry. **Chemical Reviews**, v. 108, n. 7, p. 2646-2687, 2008/7// 2008.
98. RANA, A.; BAIG, N.; SALEH, T. A. Electrochemically pretreated carbon electrodes and their electroanalytical applications – A review. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 833, p. 313-332, 2019.
99. WISSLER, M. Graphite and carbon powders for electrochemical applications. **Journal of Power Sources**, v. 156, n. 2, p. 142-150, 2006.
100. KISSINGER, P.; HEINEMAN, W. R. **Laboratory Techniques in Electroanalytical Chemistry, revised and expanded**. 2018. Disponível em: <
https://books.google.com/books?hl=en&lr=&id=g6x-DwAAQBAJ&oi=fnd&pg=PT13&ots=vCqZJNC5_z&sig=2d_z7vU17gqm1HT_PZ9eNn4Qw24 >.
101. YE, W. et al. Electrochemical detection of trace heavy metal ions using a Ln-MOF modified glass carbon electrode. **Journal of Solid State Chemistry**, v. 281, p. 121032, 2020. ISSN 0022-4596.
102. ZHANG, Y. et al. Rapid electrochemical detection of ferulic acid based on a graphene modified glass carbon electrode. **Analytical Methods**, v. 5, n. 16, p. 3834-3839, 2013.
103. LI, T. et al. Electrochemical detection of ractopamine based on a molecularly imprinted poly-o-phenylenediamine/gold nanoparticle–ionic liquid–graphene film modified glass carbon electrode. **RSC advances**, v. 6, n. 71, p. 66949-66956, 2016.
104. ZHU, J. et al. Sensitive electrochemical detection of NADH and ethanol at low potential based on pyrocatechol violet electrodeposited on single walled carbon nanotubes-modified pencil graphite electrode. **Talanta**, v. 130, p. 96-102, 2014. ISSN 0039-9140.
105. SANTHIAGO, M.; KUBOTA, L. T. A new approach for paper-based analytical devices with electrochemical detection based on graphite pencil electrodes. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 177, p. 224-230, 2013. ISSN 0925-4005.
106. ATAIDE, V. N. et al. A Pencil Drawing Overview: From Graphite to Electrochemical Sensors/Biosensors Applications. **Journal of The Electrochemical Society**, v. 169, n. 4, p. 047524, 2022. ISSN 1945-7111.
107. SIMS, M. J. et al. Effects of thin-layer diffusion in the electrochemical detection of nicotine on basal plane pyrolytic graphite (BPPG) electrodes modified with layers of multi-walled carbon nanotubes (MWCNT-BPPG). **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 144, n. 1, p. 153-158, 2010. ISSN 0925-4005.

108. SHAHROKHIAN, S.; JOKAR, E.; GHALKHANI, M. Electrochemical determination of piroxicam on the surface of pyrolytic graphite electrode modified with a film of carbon nanoparticle-chitosan. **Microchimica Acta**, v. 170, p. 141-146, 2010. ISSN 0026-3672.
109. ŠLJUKIĆ, B.; BARON, R.; COMPTON, R. G. Electrochemical determination of oxalate at pyrolytic graphite electrodes. **Electroanalysis: An International Journal Devoted to Fundamental and Practical Aspects of Electroanalysis**, v. 19, n. 9, p. 918-922, 2007. ISSN 1040-0397.
110. KONDO, T. Recent electroanalytical applications of boron-doped diamond electrodes. **Current Opinion in Electrochemistry**, v. 32, p. 100891, 2022. ISSN 2451-9103.
111. SARAKHMAN, O.; ŠVORC, L. A review on recent advances in the applications of boron-doped diamond electrochemical sensors in food analysis. **Critical Reviews in Analytical Chemistry**, v. 52, n. 4, p. 791-813, 2022. ISSN 1040-8347.
112. GARCÍA-MIRANDA FERRARI, A. et al. Determination of the electrochemical area of screen-printed electrochemical sensing platforms. **Biosensors**, v. 8, n. 2, p. 53, 2018. ISSN 2079-6374.
113. HALLAM, P. M. et al. Graphite screen printed electrodes for the electrochemical sensing of chromium (VI). **Analyst**, v. 135, n. 8, p. 1947-1952, 2010.
114. LI, M. et al. Applications of screen-printed electrodes in current environmental analysis. **Current Opinion in Electrochemistry**, v. 3, n. 1, p. 137-143, 2017. ISSN 2451-9103.
115. PALISOC, S. T. et al. Electrochemical determination of tannic acid using graphite electrodes sourced from waste zinc-carbon batteries. **Sensing and Bio-Sensing Research**, v. 28, p. 100326, 2020. ISSN 2214-1804.
116. TASIĆ, Ž. Z. et al. Electrochemical determination of L-tryptophan in food samples on graphite electrode prepared from waste batteries. **Scientific Reports**, v. 12, n. 1, p. 5469, 2022. ISSN 2045-2322.
117. PALISOC, S.; VITTO, R. I. M.; NATIVIDAD, M. Determination of heavy metals in herbal food supplements using bismuth/multi-walled carbon nanotubes/nafion modified graphite electrodes sourced from waste batteries. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 18491, 2019. ISSN 2045-2322.
118. KIM, K. **Carbon: Electrochemical and Physicochemical Properties** | Wiley 1988.
119. KATO, M. F. H. Construção de eletrodos de grafite: aplicação em processos eletroquímicos ambientais. 2017. Disponível em: < <http://repositorio.ufgd.edu.br/jspui/handle/prefix/2862> >.

120. BAIO, J. A. F.; RAMOS, L. A.; CAVALHEIRO, E. T. G. Construção de eletrodo de grafite retirado de pilha comum: aplicações didáticas. **Química Nova**, v. 37, n. 6, p. 1078-1084, 2014. Disponível em: < <http://www.scielo.br/j/qn/a/hcjqPPGPZ5kjrSYsmG3YZx/?lang=pt> >.
121. ABINEE. **ABINEE – Associação Brasileira de Indústria Elétrica e Eletrônica** 2006.
122. VIEIRA, L. H. C. et al. AVALIAÇÃO DA QUALIDADE DE PILHAS ALCALINAS E ZINCO-CARBONO DE DIFERENTES PROCEDÊNCIAS. **Eclética Química**, v. 38, p. 9-24, 2013. Disponível em: < <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=42955126011> >.
123. DEHGHANI-SANIJ, A. R. et al. Study of energy storage systems and environmental challenges of batteries. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 104, p. 192-208, 2019/4// 2019.
124. BERNARDES, A. M.; ESPINOSA, D. C. R.; TENÓRIO, J. A. S. Recycling of batteries: a review of current processes and technologies. **Journal of Power Sources**, v. 130, n. 1-2, p. 291-298, 2004/5// 2004.
125. LEMBO, A. **Química. Realidade e Contexto - Volume Único**. 1ª edição. Ática, 2006. ISBN 8508075367.
126. BARTOLOZZI, M. The recovery of metals from spent alkaline-manganese batteries: a review of patent literature. **Resources, Conservation and Recycling**, v. 4, n. 3, p. 233-240, 1990/9// 1990.
127. NG, K. L. et al. Electrochemical preparation and characterization of a gold nanoparticles graphite electrode: Application to myricetin antioxidant analysis. **Analytical Sciences**, v. 31, n. 10, p. 1075-1081, 2015/10// 2015. Disponível em: < <https://link.springer.com/article/10.2116/analsci.31.1075> >.
128. 125 VALENTINI, S. R.; SOMMER, W. A.; MATIOLI, G. VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS. **Arquivos do Mudi**, v. 11, n. 2, p. 26-31, 2013/3// 2013. Disponível em: < <https://periodicos.uem.br/ojs/index.php/ArqMudi/article/view/19999> >.
129. RIBANI, M. et al. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, v. 27, n. 5, p. 771-780, 2004. Disponível em: < <http://www.scielo.br/j/qn/a/bq5SjVnnKptZkf8NnK6kqRc/?lang=pt> >.
130. ANVISA. **RESOLUÇÃO RDC Nº 166, DE 24 DE JULHO DE 2017** 2017.
131. INMETRO. **ORIENTAÇÃO SOBRE VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS**. 2016.
132. MURATT, D. T. **Desenvolvimento e validação de métodos voltamétricos sequenciais para a determinação de elementos em matrizes complexas** 2013.

133. BARD, A. J.; FAULKNER, L. R.; WHITE, H. S. **Electrochemical methods : fundamentals and applications**. 3. 2022. 1044-1044 ISBN 1119334063. Disponível em: < https://books.google.com/books/about/Electrochemical_Methods.html?hl=pt-BR&id=eZ6HDAEACAAJ >.
134. BAUR, J. E. Diffusion Coefficients. In: (Ed.). **Handbook of Electrochemistry**: Elsevier, 2007. p.829-848. ISBN 9780444519580.
135. KOSHIZAWA, K. S. I. **WO2012120825A1 - Carbon rod, method for producing same, and manganese dry battery - Google Patents** 2012.
136. MONTEIRO, M. D. S. Desenvolvimento de eletrodo modificado com óxido de grafeno reduzido para determinação de 17 α -etinilestradiol. 2021/2// 2021. Disponível em: < <http://ri.ufs.br/jspui/handle/riufs/14904> >.
137. SHAHROKHIAN, S.; BALOTF, H.; GHALKHANI, M. Nano composite coating based on cellulose nanofibers/carbon nanoparticles: application to voltammetric determination of clonazepam. **Journal of Solid State Electrochemistry**, v. 19, n. 1, p. 251-260, 2015. Disponível em: < <http://en> . >.
138. JAIN, R. et al. A polyaniline/graphene oxide nanocomposite as a voltammetric sensor for electroanalytical detection of clonazepam. **Analytical Methods**, v. 8, n. 15, p. 3034-3045, 2016. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1039/C6AY00424E> >.
139. LAVIRON, E. General expression of the linear potential sweep voltammogram in the case of diffusionless electrochemical systems. **Journal of Electroanalytical Chemistry and Interfacial Electrochemistry**, v. 101, n. 1, p. 19-28, 1979/7// 1979. Disponível em: < <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022072879800753> >.
140. HONEYCHURCH, K. C.; BROOKS, J.; HART, J. P. Development of a voltammetric assay, using screen-printed electrodes, for clonazepam and its application to beverage and serum samples. **Talanta**, v. 147, p. 510-515, 2016/1// 2016.
141. BIRKHED, D. Sugar Content, Acidity and Effect on Plaque pH of Fruit Juices, Fruit Drinks, Carbonated Beverages and Sport Drinks. **Caries Research**, v. 18, n. 2, p. 120-127, 1984.
142. KAPPES, S. M.; SCHMIDT, S. J.; LEE, S. Y. Relationship between Physical Properties and Sensory Attributes of Carbonated Beverages.
143. BARRETO DA SILVA, A. Acetaldehyde contents and quality characteristics of commercial alcoholic beverages. **Food Science and Biotechnology**, v. 28, n. 4, p. 1027-1036, 2019/8// 2019.

144. LACASSE, R. et al. The reduction mechanism of aromatic nitro compounds in aqueous medium Part 3. The reduction of 4-nitropyridine-N-oxide between $H_0 = -6$ and pH 9. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 359, n. 1-2, p. 223-239, 1993/11// 1993. Disponível em: < <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/002207289380411A> >.
145. RIZK, M. et al. Highly Sensitive Carbon Based Sensors Using Zinc Oxide Nanoparticles Immobilized Multiwalled Carbon Nanotubes for Simultaneous Determination of Desvenlafaxine Succinate and Clonazepam. **Journal of The Electrochemical Society**, v. 165, n. 7, p. H333-H341, 2018/5// 2018. Disponível em: < <https://iopscience.iop.org/article/10.1149/2.0551807jes> >.
146. GARIMA; SACHDEV, A.; MATAI, I. An electrochemical sensor based on cobalt oxyhydroxide nanoflakes/reduced graphene oxide nanocomposite for detection of illicit drug-clonazepam. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 919, p. 116537-116537, 2022/8// 2022.