



**UNIVERSIDAD DE BURGOS**

---

---

**Departamento de Química  
Área de Química Analítica**

*Trabajo Fin de Grado*

***DETERMINACIÓN ANALÍTICA DE  
COCAÍNA***

*Autora:* María José García Guerra

*Tutora:* M. Asunción Alonso Lomillo

**23 de Junio de 2014**



**AUTORIZACIÓN DE PRESENTACIÓN DEL TRABAJO FIN DE GRADO**

**CURSO: 2013/14**

Dña. M. Asunción Alonso Lomillo, directora del trabajo fin de grado de Dña. María José García Guerra, que lleva por título “Determinación analítica de cocaína”

Autoriza

No autoriza

A defender públicamente el trabajo mencionado.

Burgos, 23 de Junio de 2014

Dña. M. Asunción Alonso Lomillo

(1). Para la presentación del Trabajo Fin de Grado el alumno/a ha de haber superado 222 créditos ECTS.

D. .... Jefe del Negociado o Administrador de la Secretaría de Alumnos, certifica que el alumno/a arriba mencionado tiene superado 222 créditos correspondientes al Grado Química.

Burgos,.....

Fdo.:.....



## ÍNDICE

---

1. - Summary.....	3
2. - State of the art.....	4
2.1. – Cocaine .....	4
2.2. - Analytical determinations.....	4
2.2.1. - Electrochemical methods.....	5
3. - Objective.....	5
4. - Experimental.....	5
4.1. - Reagents.....	5
4.2. - Apparatus.....	6
4.3.- Screen-printed sensors manufacturing.....	6
5.- Análisis y discusión de resultados .....	8
5.1.- Determinación voltamperométrica de cocaína utilizando electrodos serigrafados de carbono .....	8
5.1.1.- Validación del método.....	10
5.2.- Determinación voltamperométrica de cocaína utilizando electrodos serigrafados de carbono modificados con mediadores redox .....	13
5.3.- Determinación voltamperométrica de cocaína utilizando electrodos serigrafados de carbono modificados con nanotubos de carbono.....	16
5.3.1.- Validación del método.....	17
6.- Conclusiones.....	20
7. - Referencias .....	21



## **1. - SUMMARY**

Drug abuse is a worldwide problem that claims thousands of lives each year; causing the devastation of families and the suffering of thousands of people. Around half of these deaths are caused by fatal overdoses in young victims [1].

Cocaine is one of the most widely used illegal drugs that acts as a local anaesthetic and stimulates the brain causing euphoria, which leads to its addiction [2]. In the worst case, this addiction can lead to cardiac arrest or seizures followed by respiratory arrest and death. It must be taking into account that the effects of cocaine street samples are not only induced by the drug itself but also by the adulterants that they contain. Furthermore, these adverse effects are increased due to the combination of cocaine with other drugs or alcohol [3].

The determination of the concentration of cocaine has been checked through analytical techniques such as gas chromatography [4-6], HPLC [7-9] or even capillary electrophoresis [10]. These analyses, requested in fields such as forensic science or criminology, have been applied to biological samples as well as to the evaluation of the purity of street samples.

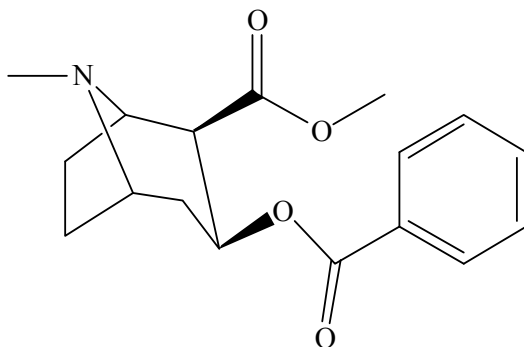
Electrochemical techniques have been also used in the determination of this drug. However, interferences from substances with a redox potential close to the cocaine one would make more difficult this analysis. This complication has been sometimes solved by the modification of the working electrode with polymers [11-13], Schiff bases [14, 15], or biomolecules [16-32], which provide selectivity to the electrochemical system.

This work describes a new methodology for the determination of the purity of cocaine street samples, based on the use of redox modified screen-printed carbon electrodes (SPCEs), nanomaterials modified SPCEs and voltammetric techniques.

## 2. - STATE OF THE ART

### 2.1. – COCAINE

Cocaine, the main alkaloid extracted from *Erythroxylum coca* plant (Fig. 2.1), consists on a central nervous system stimulant substance, leading to increased alertness and euphoria. These effects stem from the ability of cocaine to block synaptic dopamine reuptake. Thus, this compound causes pharmacodependence [14].



**Figure 2.1.** - *Chemical structure of cocaine.*

In the early twentieth century, it was used as a component of tonics and beverages. Today, however, it is almost exclusively associated with its misuse, which poses great health risks and can even lead to death. Actually, it consists on an illegal substance in most part of the world, making part of the main constituent of police apprehensions, followed by hemp and synthetic drugs, resulting in an increased amount of scientific efforts to analyze this compound quickly and in a simple way [14, 15, 33].

### 2.2. - ANALYTICAL DETERMINATIONS

The determination of cocaine and its metabolites has been performed in different complex matrixes by gas chromatography [4-6], HPLC [7-9] or even capillary electrophoresis [10].

The simplicity of the electrochemical techniques, their low cost and their relative short time of performance, have provided a great advantage in the use of these robust devices in several fields compared to the rest of transducers and even, to chromatographic techniques [34].

Electrochemical techniques have evolved in the last few years in aspects related not only with the specificity of the sensors, thanks to bioelements such as enzymes or biological receptors, but also with the miniaturization of the electrodes. Screen-printed technology has been shown as an attractive method for mass production of sensors at low cost. The technology has the advantages of design flexibility, process automation, good reproducibility, a wide choice of materials and reduced expense. These sensors recognize the chemical information present in the sample and transform it into an easily processable signal [35].



### 2.2.1. - Electrochemical methods

The structure of cocaine contains several functional groups that can suffer redox reactions. These reactions can be divided into two electrochemical procedures:

- Reactions based on the oxidation of the tertiary amine [34, 36-38]. This irreversible signal has been registered around + 1.0 V using carbon paste [34, 36, 37] and glassy carbon electrodes [36-38], in buffer solutions at pH values higher than 6.5. Additionally, working electrodes have been modified with Uranyl Schiff base films [14, 39] and hexacyanoferrate films [33] in an attempt to lower the oxidation potential, avoiding interferences from complex matrices (Table 2.1).
- Reactions based on the reduction of the ester groups, registered between – 1.0 and – 1.5 V in buffer solutions at pH values higher than 7, using mercury electrodes [40, 41].

**Table 2.1.** - *Voltammetric determination of cocaine using modified electrodes.*

Electrode	Modification	Peak potential (mV)	Calibration range ( $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ )	Limit of detection ( $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ )	Reference
Platinum	Uranyl Schiff base	100	0.54 - 9.10	0.15	[14]
Carbon	Uranyl Schiff base	620	0.1- 1.3	-	[39]
Platinum	Cobalt hexacyanoferrate	780	240-1500	140	[33]

Electrochemical techniques, such as cyclic voltammetry [14, 34, 39], square-wave voltammetry [41], differential pulse voltammetry [38] and chronoamperometry [36, 37], have been used in these electrochemical procedures.

## 3. - OBJECTIVE

The main goal of this research activity is the development of sensitive and selective sensors, based on the screen-printed methodology, for the electrochemical detection and quantification of cocaine in synthetic samples and complex matrices, such as confiscated cocaine street samples.

## 4. - EXPERIMENTAL

### 4.1. - REAGENTS

SPCEs produced by the Electroanalysis Research Group in the University of Burgos have been used [42].

All solutions were prepared with water purified with a Milli-Q device, which provided a resistivity of 18.2 M $\Omega$  cm.

Stock standard solutions of cocaine (kindly donated by UCB Pharma S.A.) were prepared by dissolving the adequate amount in water.

50 mM phosphate buffer and 100 mM KCl (Merck, Darmstadt, Germany) solutions were used as supporting electrolyte. 1 M NaOH (J.T. Baker, Deventer, The Netherlands) and 98 % H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (Panreac, Barcelona, Spain) solutions were used to adjust the pH values.

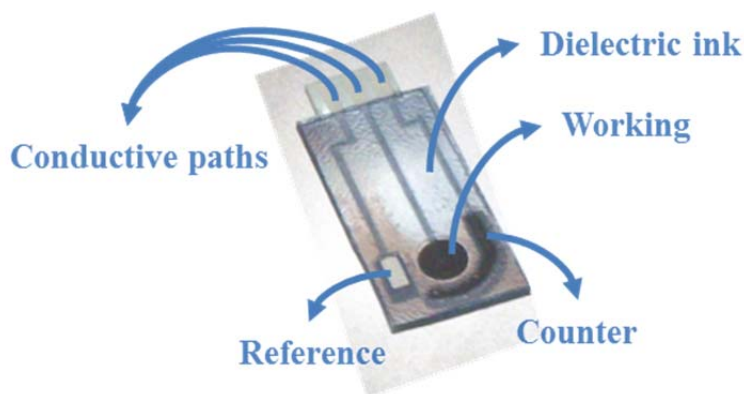
#### 4.2. - APPARATUS

Electrochemical measurements were made by an Autolab electrochemical system with GPES software (Eco Chemie, Utrecht, The Netherlands). Differential pulse voltammograms were recorded from - 0.4 V (initial potential) to + 1.5 V vs Ag/AgCl SPE (final potential), using a step potential of 100.5 mV and a modulation amplitude of 250.5 mV.

The pH of the solutions was measured with a Crison Model 2002 (Barcelona, Spain) pHmeter.

#### 4.3.- SCREEN-PRINTED SENSORS MANUFACTURING

Screen-printed configurations of three electrodes (working, Ag/AgCl reference and counter electrode) were fabricated by sequential layer deposition onto polyester films (Fig. 4.1).



**Figure 4.1.-** Screen-printed electrodes configuration.

Table 4.1 summarises the different fabrication steps for each configuration, including the kind of ink that has been used and the most relevant cured parameters (temperature and time).

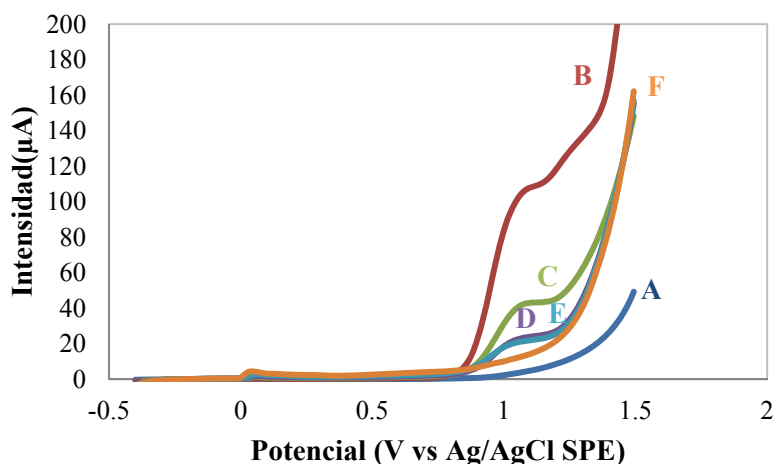
**Table 4.1.** - Composition of the different screen-printed electrodes used.

	<b>Type I</b>	<b>Type II</b>	<b>Type III</b>	<b>Type IV</b>	<b>Type V</b>
<b>Conductive paths</b>	Ag	Ag	C	C	C
T <sub>cured</sub> (°C)	120	120	60	60	60
t <sub>cured</sub> (min)	20	20	30	30	30
<b>Reference electrode</b>	Ag/AgCl	Ag/AgCl	Ag/AgCl	Ag/AgCl	Ag/AgCl
T <sub>cured</sub> (°C)	120	120	120	120	120
t <sub>cured</sub> (min)	20	20	20	20	20
<b>Counter electrode</b>	C	C	C	C	C
T <sub>cured</sub> (°C)	60	60	60	60	60
t <sub>cured</sub> (min)	30	30	30	30	30
<b>Working electrode</b>	C	C + tetrathiafulvalene	C + ferrocyanide	C + Prussian Blue	C + ferrocenemethanol
T <sub>cured</sub> (°C)	60	60	60	60	60
t <sub>cured</sub> (min)	30	30	30	30	30
<b>Dielectric material</b>	242-SB	D2071120D1	D2071120D1	D2071120D1	D2071120D1
T <sub>cured</sub> (°C)	120	80	80	80	80
t <sub>cured</sub> (min)	60	30	30	30	30

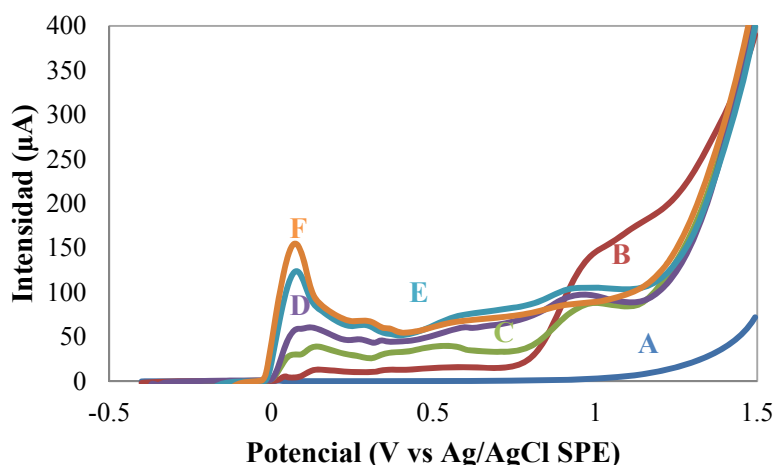
## 5.- ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

### 5.1.- DETERMINACIÓN VOLTAMPEROMÉTRICA DE COCAÍNA UTILIZANDO ELECTRODOS SERIGRAFIADOS DE CARBONO

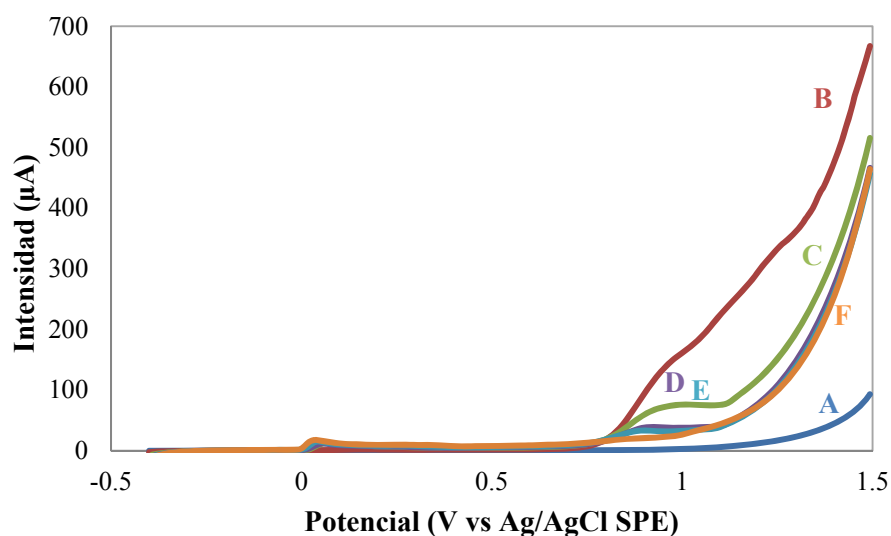
El comportamiento electroquímico de este compuesto en electrodos serigrafados de carbono (Tipo 1, tabla 4.1) se analizó mediante voltamperometría diferencial de impulsos, en electrolito de soporte a diferentes valores de pH. Se registraron voltamperogramas de disoluciones de cocaína en el rango de concentración de  $10^{-8}$  M a  $10^{-2}$  M en 100  $\mu$ L de electrolito de soporte de pH 7, 8 y 9, entre  $-0.4$  y  $+1.5$  V vs Ag/AgCl SPE (Fig. 5.1, 5.2 y 5.3). Puede observarse que el único pico de oxidación que se registra aparece aproximadamente a  $+1.0$  V vs Ag/AgCl SPE.



**Figura 5.1.-** Voltamperogramas diferenciales de impulsos registrados en tampón fosfato pH 7 con KCl 100 mM (A), y en disoluciones de cocaína de concentración  $10^{-2}$  M (B),  $10^{-3}$  M (C),  $10^{-4}$  M (D),  $10^{-5}$  M (E) y  $10^{-6}$  M (F) en tampón fosfato pH 7 con KCl 100 mM, utilizando electrodos serigrafados de carbono.

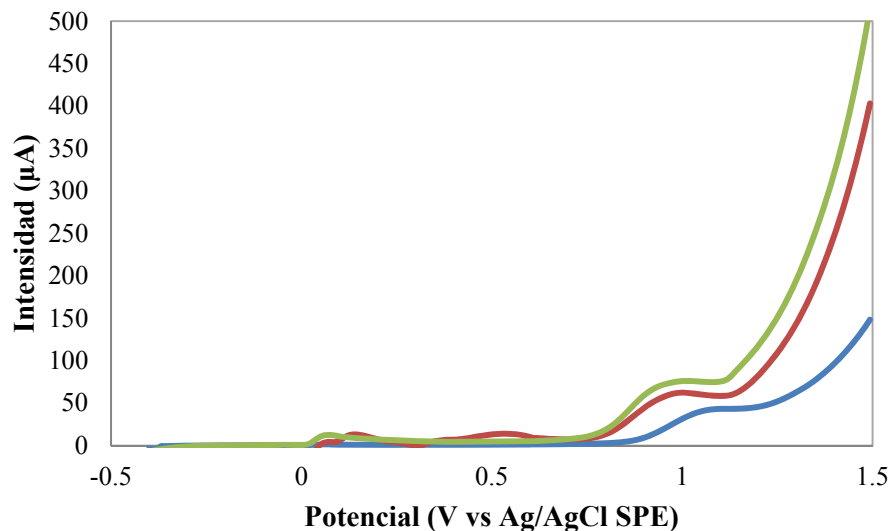


**Figura 5.2.-** Voltamperogramas diferenciales de impulsos registrados en tampón fosfato pH 8 con KCl 100 mM (A), y en disoluciones de cocaína de concentración  $10^{-2}$  M (B),  $10^{-3}$  M (C),  $10^{-4}$  M (D),  $10^{-5}$  M (E) y  $10^{-6}$  M (F) en tampón fosfato pH 8 con KCl 100 mM, utilizando electrodos serigrafados de carbono.



**Figura 5.3.-** Voltamperogramas diferenciales de impulsos registrados en tampón fosfato pH 9 con KCl 100 mM (A), y en disoluciones de cocaína de concentración  $10^{-2}M$  (B),  $10^{-3}M$  (C),  $10^{-4}M$  (D),  $10^{-5}M$  (E) y  $10^{-6}M$  (F) en tampón fosfato pH 9 con KCl 100 mM, utilizando electrodos serigrafados de carbono.

Si se comparan los voltamperogramas registrados a diferentes valores de pH para una misma concentración de cocaína, se observa una señal de oxidación más intensa en el caso de pH 9, por lo que fue el pH seleccionado como óptimo para la determinación voltamperométrica de cocaína (Fig. 5.4).



**Figura 5.4.-** Voltamperogramas diferenciales de impulsos registrados en una disolución de cocaína  $10^{-3}M$  en tampón fosfato pH 7 con KCl 100 mM (línea azul), pH 8 (línea roja) y pH 9 (línea verde), utilizando electrodos serigrafados de carbono.

### 5.1.1.- Validación del método

La validación de un método analítico se define como el proceso basado en estudios sistemáticos de laboratorio, mediante el cual se pone de manifiesto que dicho método posee unas características de funcionamiento adecuadas para la aplicación que se le quiere dar. Dichas características de funcionamiento se determinan a través de la precisión, la capacidad de detección, la exactitud, el intervalo dinámico, la sensibilidad, la selectividad y la robustez, los llamados parámetros de calidad. La precisión, la capacidad de detección y la exactitud se consideran parámetros primarios ya que su impacto sobre la calidad de un método analítico es mayor [43].

#### 5.1.1.1.- Precisión del método

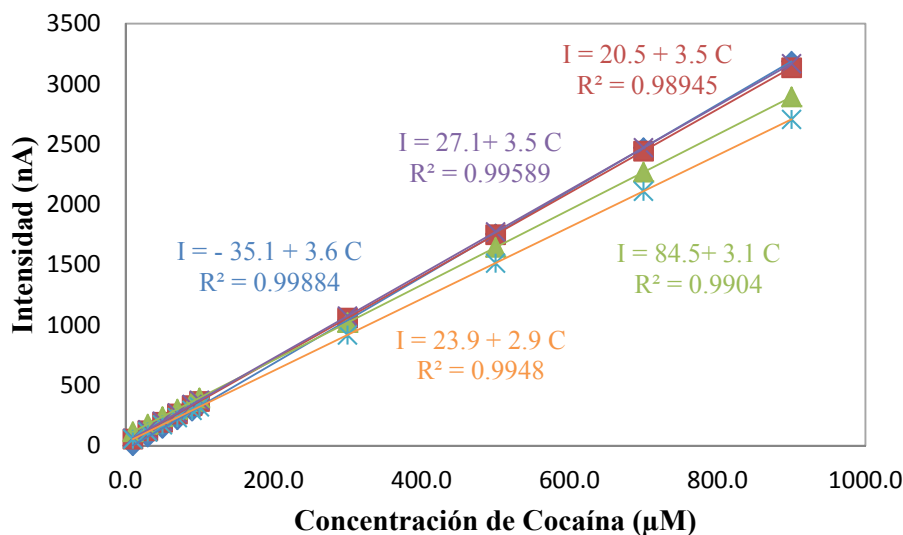
La precisión es el grado de concordancia entre los resultados de ensayos independientes obtenidos en unas condiciones bien definidas. Así pues, evalúa la dispersión de los resultados que se obtienen al realizar réplicas de medidas sobre una misma muestra. Se expresa estadísticamente a través de la desviación estándar, bien en términos absolutos bien en términos relativos. En general, la desviación estándar aumenta con la concentración mientras que la desviación estándar relativa (RDS) disminuye, es decir, se estabiliza a concentraciones elevadas [43]. Por esta razón, este parámetro se evaluará en todo el rango de concentración en el que se construirán las diferentes curvas de calibrado, lo que conlleva el análisis de las pendientes de las mismas.

Además, es recomendable distinguir entre unas condiciones de mínima variación de los factores de influencia y unas condiciones de máxima variación de los mismos sobre la precisión, lo que se conoce como condiciones de repetibilidad y de reproducibilidad. Las condiciones de reproducibilidad son aquellas en las que las medidas se realizan aplicando el mismo método a un mismo material, con reactivos, equipos, condiciones ambientales y operadores distintos se habla de condiciones de reproducibilidad. Cuando las medidas se obtienen con el mismo método, sobre las mismas muestras, pero con los mismos reactivos, equipos, condiciones ambientales y operador, y en un intervalo corto de tiempo, generalmente una sesión de trabajo, se habla de condiciones de repetibilidad [43].

Para estimar la precisión del procedimiento electroquímico en la determinación de cocaína se realizaron varias curvas de calibración, mediante voltamperometría diferencial de impulsos entre  $-0.4$  y  $+1.5$  V vs Ag/AgCl SPE, en  $100 \mu\text{L}$  de disoluciones de cocaína de concentración entre  $10$  y  $900 \mu\text{M}$  en electrolito de soporte del pH 9, utilizando distintos electrodos serigrafados de carbono para el análisis de la reproducibilidad, y un mismo electrodo serigrafado de carbono en el caso de la repetibilidad.

Los parámetros de calibrado y la desviación típica, fueron óptimamente evaluados. Con el objetivo de detectar la existencia de puntos anómalos, se utilizó el programa PROGRESS [44], que evalúa el intervalo lineal y la presencia de datos anómalos mediante una regresión en mínima mediana de cuadrados (LMS) y una vez eliminados estos del conjunto de calibración, construye nuevamente con los restantes puntos una recta de calibración mediante una regresión en mínimos cuadrados ordinarios (OLS). Esta regresión OLS proporciona una correcta valoración de la pendiente (sensibilidad) y del término independiente del calibrado, siendo ambos importantes para juzgar la calidad del calibrado y a partir de ésta, la del método analítico.

En la figura 5.5 se muestran los puntos experimentales y las rectas de calibración construidas a partir de ellos, una vez eliminados los puntos anómalos, en los diferentes calibrados realizados para estimar la reproducibilidad del método. A su vez, la tabla 5.1 recoge los parámetros de calibración obtenidos con los distintos métodos de regresión utilizados para la estimación de este parámetro.



**Figura 5.5.-** Puntos experimentales y rectas de calibrado, construidas una vez eliminados los puntos anómalos, utilizadas en la estimación de la reproducibilidad del método.

La reproducibilidad de los SPCEs en el rango de concentración de 10.0 a 900.0 µM, en términos de desviación estándar relativa (RDS) asociada a las pendientes de las rectas de calibración construidas, fue de 7.8 % (n = 5).

Análogamente, se construyeron diferentes rectas de calibración, una vez eliminados los puntos anómalos, utilizando el mismo electrodo serigrafiado de carbono. Se observó como la pendiente de dichas rectas disminuía con el número de calibrados realizados con un mismo electrodo, lo que se atribuye a la contaminación progresiva de la superficie del electrodo de trabajo con los productos de oxidación. Teniendo en cuenta el carácter desechable de los electrodos serigrafiados, este parámetro no se considera de especial relevancia en la validación del procedimiento.

#### 5.1.1.2.- Capacidad de detección del método

Se define la capacidad de detección como la concentración o la cantidad de analito derivada de la medida más pequeña y que puede detectarse con una certeza razonable mediante un determinado procedimiento analítico. Es muy habitual analizar componentes de muestras a niveles bajos de concentración, por lo que debe discriminarse entre muestras en las que se detecta analito y muestras en las que no se detecta. Además, una vez detectado el analito, se ha de fijar un límite a partir del cual poder estimar cuantitativamente y de forma fiable su concentración [43].

**Tabla 5.1.-** Parámetros de calibración, obtenidos con distintos métodos de regresión, para estimar la reproducibilidad del método

	Regresión OLS	Regresión LMS	Regresión OLS sin anómalos
Nº de datos	10	10	9
Término independiente ( $\mu\text{A}$ )	-0.02314	0.02793	-0.03509
Pendiente ( $\mu\text{A } \mu\text{M}^{-1}$ )	0.00368	0.0035	0.00358
Desviación estándar residual	0.12759	0.07032	0.04266
Coefficiente de determinación ( $R^2$ )	0.98953	0.97492	0.99884
Nº de datos	10	10	8
Término independiente ( $\mu\text{A}$ )	0.10838	0.03358	0.02048
Pendiente ( $\mu\text{A } \mu\text{M}^{-1}$ )	0.00272	0.00355	0.00346
Desviación estándar residual	0.19169	0.07414	0.06539
Coefficiente de determinación ( $R^2$ )	0.95824	0.96858	0.98945
Nº de datos	10	10	8
Término independiente ( $\mu\text{A}$ )	0.07022	0.07173	0.08463
Pendiente ( $\mu\text{A } \mu\text{M}^{-1}$ )	0.00334	0.00305	0.00312
Desviación estándar residual	0.09625	0.08517	0.07726
Coefficiente de determinación ( $R^2$ )	0.99275	0.96501	0.9904
Nº de datos	10	10	8
Término independiente ( $\mu\text{A}$ )	0.11837	0.0444	0.02709
Pendiente ( $\mu\text{A } \mu\text{M}^{-1}$ )	0.00364	0.0036	0.00349
Desviación estándar residual	0.31028	0.10634	0.08453
Coefficiente de determinación ( $R^2$ )	0.9401	0.92765	0.99589
Nº de datos	10	10	9
Término independiente ( $\mu\text{A}$ )	0.01244	0.00737	0.02392
Pendiente ( $\mu\text{A } \mu\text{M}^{-1}$ )	0.00289	0.00296	0.00298
Desviación estándar residual	0.13602	0.0798	0.07522
Coefficiente de determinación ( $R^2$ )	0.98091	0.9738	0.9948

A menor ruido y mayor sensibilidad del método, mayor será también la capacidad de discriminación entre el blanco y las muestras o patrones a baja concentración. Dado que todas las medidas experimentales están siempre sujetas a errores, será necesario recurrir siempre a criterios estadísticos y de probabilidad. Al determinar la presencia o la ausencia de analito en una muestra se han de evitar dos tipos de errores [43]:

- ✓ Los falsos positivos ( $\alpha$ ), denominados errores de tipo  $\alpha$ , que consisten en dictaminar la presencia de analito cuando en realidad la muestra no lo contiene.
- ✓ Los falsos negativos ( $\beta$ ), denominados errores de tipo  $\beta$ , en los que se determina que no hay analito cuando en realidad la muestra lo contiene.

Este procedimiento analítico fue también caracterizado mediante su capacidad de detección, teniendo en cuenta  $\alpha$  y  $\beta$  [45, 46]. En el cálculo de este índice de calidad también se precisaron regresiones validadas entre la concentración y la señal analítica, construidas en



el rango de 10.0 a 900.0  $\mu\text{M}$  [47]. El valor mínimo de concentración detectable fue  $100.2 \pm 1.0 \mu\text{M}$  ( $\alpha = \beta = 0.05$ ;  $n = 3$ ).

#### 5.1.1.3.- Exactitud del método

La IUPAC define la exactitud como el grado de concordancia entre el resultado de una medida y el valor real del mensurando. En una nota asociada a esta definición se añade que es un concepto cualitativo utilizado para describir el error asociado a un resultado y para ello hace falta un parámetro que permita medir cuantitativamente la exactitud. Este parámetro es el error, que se define como la diferencia entre el resultado de la medida y el valor real del mensurando. Estas definiciones son más bien estadísticas, donde aparece el valor verdadero o real como últimas referencias. Desde el punto de vista metrológico se habla más bien de trazabilidad, sustituyendo estos valores que no son conocidos por los valores de referencia de patrones y materiales de referencia certificados [43].

La exactitud de un método analítico se puede demostrar de diversas formas, pero no todas poseen la misma categoría metrológica ni se pueden aplicar con la misma facilidad. Las más utilizadas son el empleo de materiales de referencia certificados, la comparación con un método de referencia, el análisis de muestras adicionadas y el análisis de muestras manufacturadas con un contenido de analito conocido, como es este caso [43].

De este modo, los electrodos serigrafados de carbono se emplearon finalmente para analizar la pureza de una muestra de cocaína confiscada por la policía.

Una alícuota de la muestra confiscada de cocaína (5 mg) se disolvió en 2 mL de electrolito de soporte pH 9. 68  $\mu\text{L}$  de esta disolución se diluyeron a un volumen final de 5 mL de electrolito de soporte pH 9. En la figura 5.6 se muestra el voltamperograma de esta disolución, registrado utilizando un electrodo serigrafado de carbono. Se observa un pico de oxidación mal definido, que no se corresponde con el de los patrones analizados, lo que se atribuye a la presencia de otros compuestos en la muestra cuyos picos de oxidación se solapan con el de la cocaína, impidiendo su cuantificación.

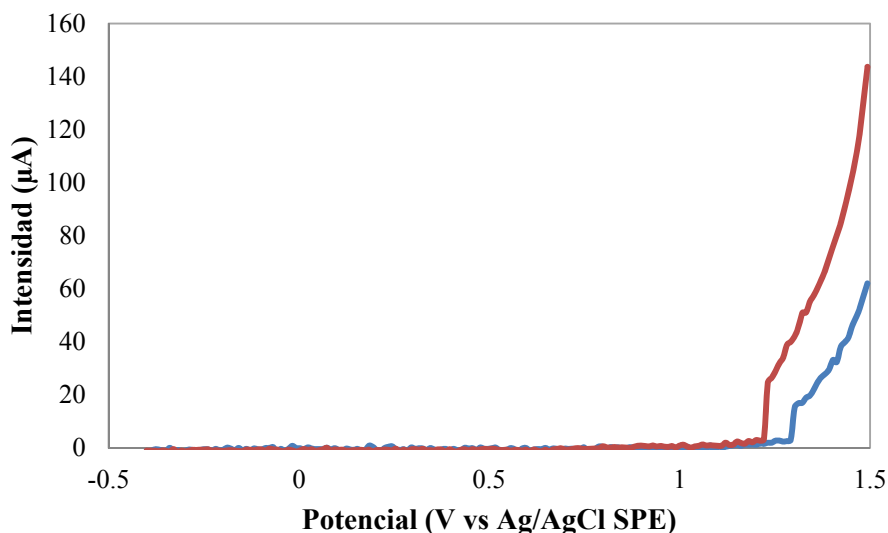
Por lo tanto, puede concluirse que si bien el método propuesto podría utilizarse satisfactoriamente en el análisis de muestras sintéticas de cocaína, en el caso de muestras más complejas debe utilizarse un procedimiento alternativo.

Con el objetivo de encontrar un procedimiento electroquímico en el que el pico de oxidación de cocaína se registre a potenciales más reducidos, evitando el solapamiento con otros compuestos interferentes, se propuso la utilización de electrodos serigrafados de carbono modificados con mediadores redox.

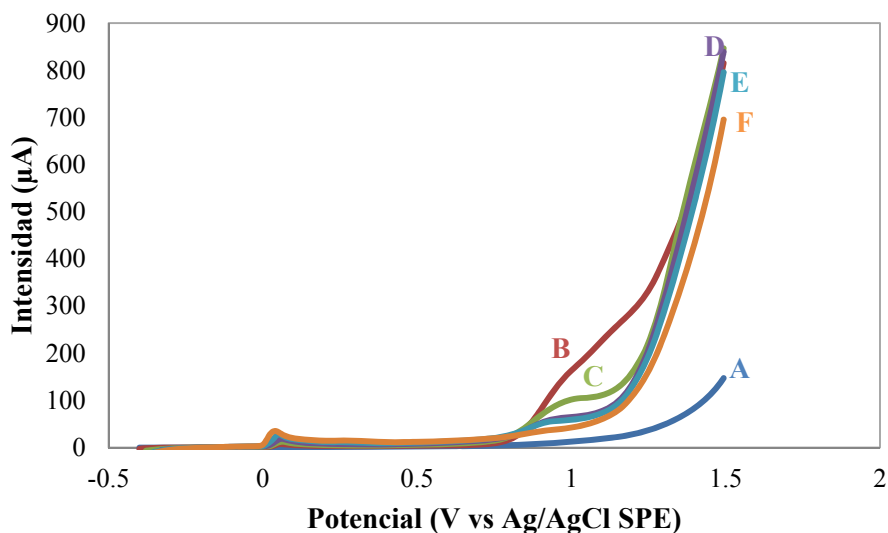
## 5.2.- DETERMINACIÓN VOLTAMPEROMÉTRICA DE COCAÍNA UTILIZANDO ELECTRODOS SERIGRAFIADOS DE CARBONO MODIFICADOS CON MEDIADORES REDOX

Con el objetivo de estudiar el comportamiento electroquímico de cocaína en electrodos serigrafados de carbono modificados con tetrafulvaleno (TTF) (Tipo 2, tabla 4.1), se registraron voltamperogramas de disoluciones de cocaína en el rango de concentración de  $10^{-6}$  M a  $10^{-2}$  M en 100  $\mu\text{L}$  de electrolito de soporte de pH 9, entre  $-0.4$  y  $+$

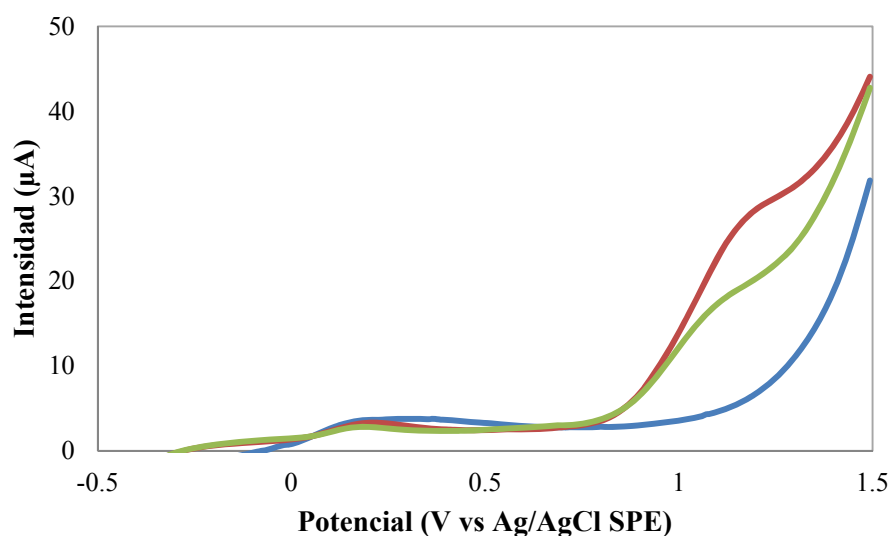
1.5 V vs Ag/AgCl SPE (Fig. 5.7). Puede observarse que el pico de oxidación sigue registrándose a aproximadamente + 1.0 V vs Ag/AgCl SPE, por lo que se probaron otros electrodos modificados: electrodos serigrafados de carbono con ferrocianuro potásico (Tipo 3, tabla 4.1) (Fig. 5.8), con Prussian Blue (Tipo 4, tabla 4.1) (Fig. 5.9) y con ferrocenometanol (Tipo 5, tabla 4.1) (Fig. 5.10).



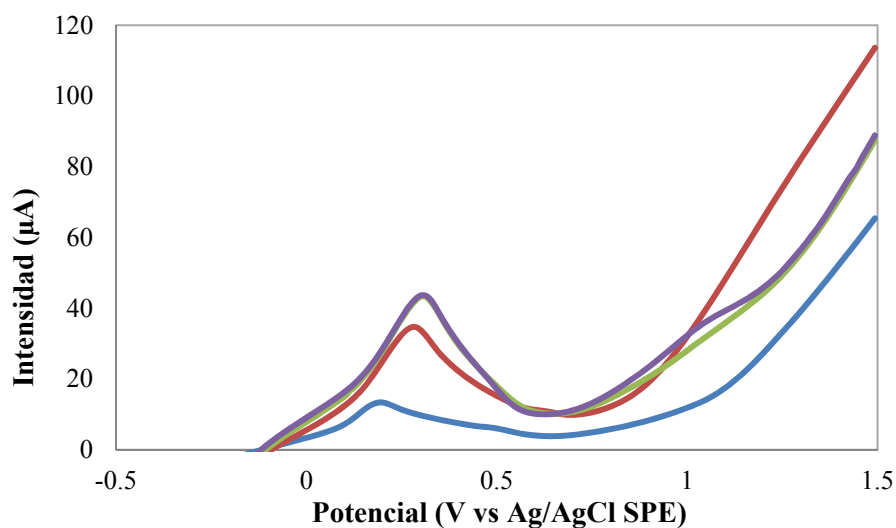
**Figura 5.6.-** Voltamperograma diferencial de impulsos registrado en tampón fosfato pH 9 con 100 mM de KCl (línea azul) y en la disolución de cocaína confiscada por la Policía (línea roja), utilizando un electrodo serigrafado de carbono.



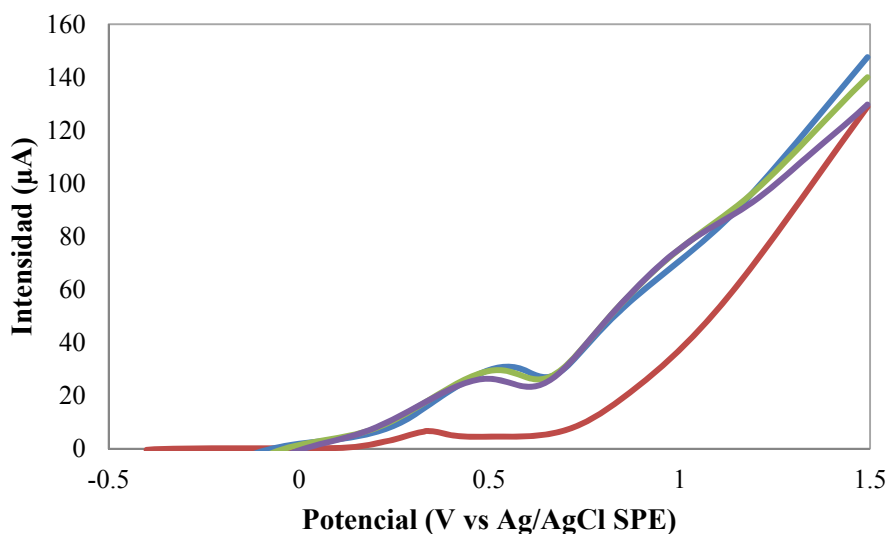
**Figura 5.7.-** Voltamperogramas diferenciales de impulsos registrados en tampón fosfato pH 9 con KCl 100 mM (A) y en disoluciones de cocaína de concentración  $10^{-2}M$  (B),  $10^{-3}M$  (C),  $10^{-4}M$  (D),  $10^{-5}M$  (E) y  $10^{-6}M$  (F) en tampón fosfato pH 9 con KCl 100 mM, utilizando electrodos serigrafados de carbono modificados con TTF.



**Figura 5.8.-** Voltamperogramas diferenciales de impulsos registrados en tampón fosfato pH 9 con KCl 100 mM (línea azul) y en disoluciones de cocaína de concentración  $10^{-2}M$  (línea roja),  $10^{-3} M$  (línea verde) en tampón fosfato pH 9 con KCl 10 mM utilizando un electrodo serigrafiados de carbono modificados con ferrocianuro.



**Figura 5.9.-** Voltamperogramas diferenciales de impulsos registrados en tampón fosfato pH 9 con KCl 100 mM (línea azul) y en disoluciones de cocaína de concentración  $10^{-2}M$  (línea roja),  $10^{-3} M$  (línea verde) y  $10^{-4}M$  (línea morada) en tampón fosfato pH 9 con KCl 10 mM utilizando electrodos serigrafiados de carbono modificados con Prussian Blue.



**Figura 5.10.-** Voltamperogramas diferenciales de impulsos registrados en tampón fosfato pH 9 con KCl 100mM (línea azul) y en disoluciones de cocaína de concentración  $10^{-2}M$  (línea roja),  $10^{-3} M$  (línea verde) y  $10^{-4}M$  (línea morada) en tampón fosfato pH 9 con KCl 10 mM utilizando electrodos serigrafados de carbono modificados con ferrocenometanol.

En el caso de los electrodos modificados con ferrocianuro, se observa una señal debida a la oxidación de la cocaína nuevamente a + 1.0 V vs Ag/AgCl SPE, mientras que los modificados con Prussian Blue y ferrocenometanol se registra una nueva señal de oxidación a potenciales próximos a de + 0.5 V vs Ag/AgCl SPE, pero desafortunadamente no siguen la tendencia observada en los electrodos descritos previamente de aumentar con la concentración.

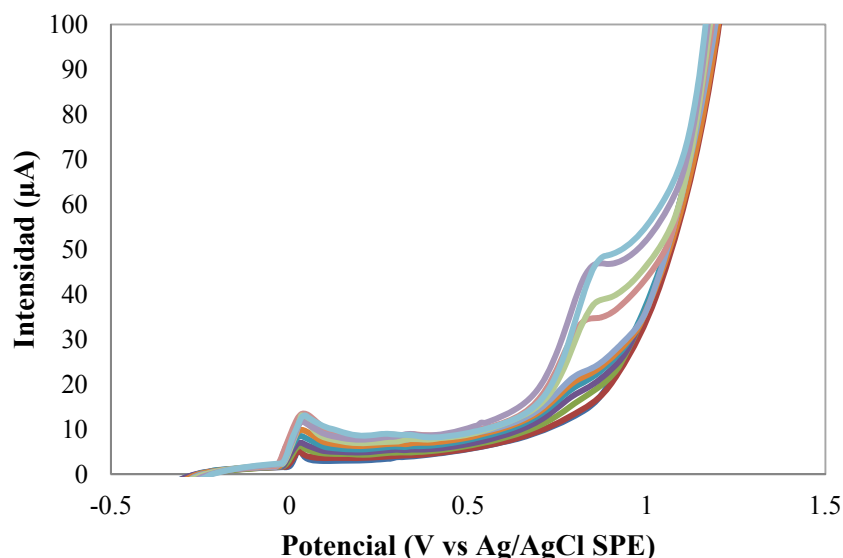
Se abordó por tanto un nuevo tipo de modificación de los electrodos con nanomateriales, nanotubos de carbono (MWCNTs), ya que se caracterizan por incrementar la superficie activa del electrodo de trabajo y mejorar tanto la transferencia electrónica entre el electrodo y el compuesto estudiado, como la reversibilidad del proceso [48].

### 5.3.- DETERMINACIÓN VOLTAMPEROMÉTRICA DE COCAÍNA UTILIZANDO ELECTRODOS SERIGRAFIADOS DE CARBONO MODIFICADOS CON NANOTUBOS DE CARBONO

Los electrodos serigrafados de carbono tipo 1, descritos en la tabla 4.1., se modificaron con MWCNTs (MWCNTs-SPEs), para lo que se depositaron 5  $\mu\text{L}$  de una suspensión de MWCNTs en dimetilformamida sobre el electrodo de trabajo y se dejó a temperatura ambiente durante 12 horas para permitir la completa evaporación del disolvente.

En la figura 5.11 se muestran los voltamperogramas diferenciales de impulsos de disoluciones de cocaína en un rango de concentración de 10 a 900  $\mu\text{M}$  registrados en 100  $\mu\text{L}$  de electrolito de soporte del pH 9, entre - 0.4 y + 1.5 V vs Ag/AgCl SPE. Puede observarse el ligero desplazamiento del pico de oxidación característico de cocaína a potenciales inferiores a + 1.0 V vs Ag/AgCl SPE y la tendencia de la intensidad a aumentar linealmente

con la concentración, por lo que se utilizó esta señal para caracterizar electroquímicamente esta droga de abuso.



**Figura 5.11.-** Voltamperogramas diferenciales de impulsos registrados en tampón fosfato pH 9 con KCl 100 mM (—) y en disoluciones de cocaína de concentración 10  $\mu\text{M}$  (—), 30  $\mu\text{M}$  (—), 50  $\mu\text{M}$  (—), 70  $\mu\text{M}$  (—), 90  $\mu\text{M}$  (—), 100  $\mu\text{M}$  (—), 300  $\mu\text{M}$  (—), 700  $\mu\text{M}$  (—) y 900  $\mu\text{M}$  (—) utilizando MWCNTs-SPCEs.

### 5.3.1.- Validación del método

#### 5.3.1.1.- Precisión del método

Para estimar la reproducibilidad del procedimiento se realizaron varias curvas de calibración mediante una voltamperometría diferencial de impulso de disoluciones de cocaína en el rango de concentración de 10 a 900  $\mu\text{M}$  en 100  $\mu\text{L}$  de electrolito de soporte del pH 9, entre  $-0.4$  a 1.5 V vs Ag/AgCl SPE utilizando cada vez distintos MWCNTs-SPCEs.

En la figura 5.12 se muestran los puntos experimentales y las rectas de calibración construidas a partir de ellos, una vez eliminados los puntos anómalos, en los diferentes calibrados realizados con distintos MWCNTs-SPCEs.

A su vez, la tabla 5.2 recoge los parámetros de calibración obtenidos con los distintos métodos de regresión utilizados para la estimación de la reproducibilidad.

La reproducibilidad de los MWCNTs en el rango de concentración de 10  $\mu\text{M}$  a 900  $\mu\text{M}$ , en términos de desviación estándar relativa (RDS) asociada a las pendientes de las rectas de calibración construidas, fue de 2.6 % para  $n = 3$ .

Análogamente, se construyeron diferentes rectas de calibración, una vez eliminados los puntos anómalos, utilizando el mismo electrodo serigrafado de carbono. Se observó como la pendiente de dichas rectas disminuye nuevamente con el número de calibrados realizados con un mismo electrodo, lo que como se ha mencionado anteriormente se atribuye

a la contaminación progresiva de la superficie del electrodo de trabajo con los productos de oxidación. Teniendo en cuenta el carácter desechable de los electrodos serigrafados, este parámetro no se considera de especial relevancia en la validación del procedimiento.

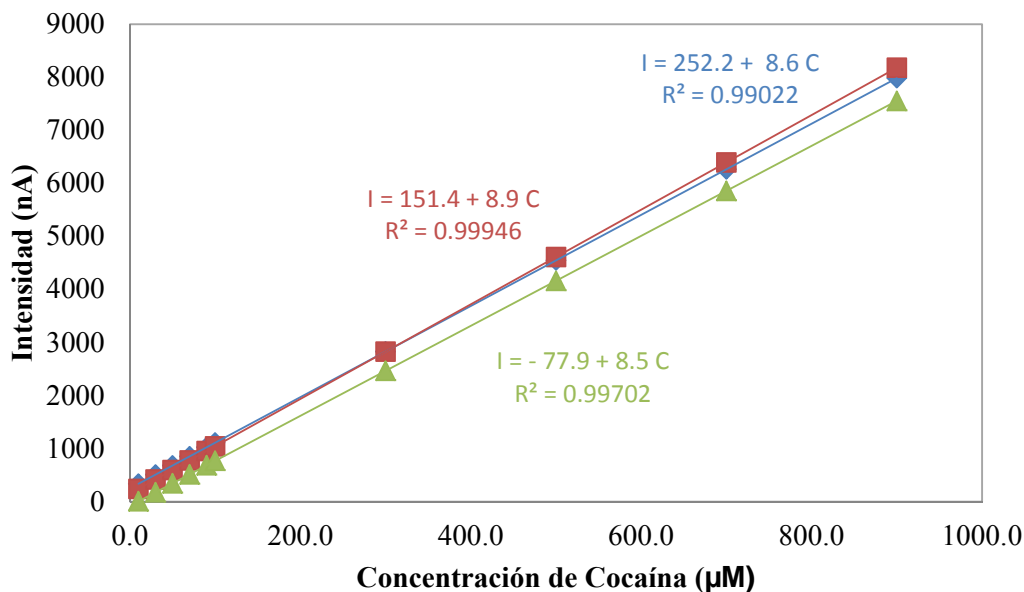


Figura 5.12.- Rectas de calibrado para el cálculo de la reproducibilidad del método.

Tabla 5.2.- Parámetros de calibración, obtenidos con distintos métodos de regresión, para estimar la reproducibilidad del método.

	Regresión OLS	Regresión LMS	Regresión OLS sin anómalos
Nº de datos	10	10	8
Término independiente ( $\mu A$ )	0.37582	0.10645	0.25219
Pendiente ( $\mu A \mu M^{-1}$ )	0.00917	0.00849	0.00859
Desviación estándar residual	0.66962	0.35141	0.29217
Coefficiente de determinación ( $R^2$ )	0.95524	0.93523	0.99022
Nº de datos	10	10	10
Término independiente ( $\mu A$ )	0.5093	0.18091	0.15138
Pendiente ( $\mu A \mu M^{-1}$ )	0.00959	0.0089	0.00892
Desviación estándar residual	0.89698	0.08659	0.08036
Coefficiente de determinación ( $R^2$ )	0.92861	0.99708	0.99946
Nº de datos	10	10	9
Término independiente ( $\mu A$ )	0.03063	0.02099	-0.07785
Pendiente ( $\mu A \mu M^{-1}$ )	0.00764	0.00836	0.00848
Desviación estándar residual	0.31718	0.15038	0.12096
Coefficiente de determinación ( $R^2$ )	0.98509	0.95857	0.99702

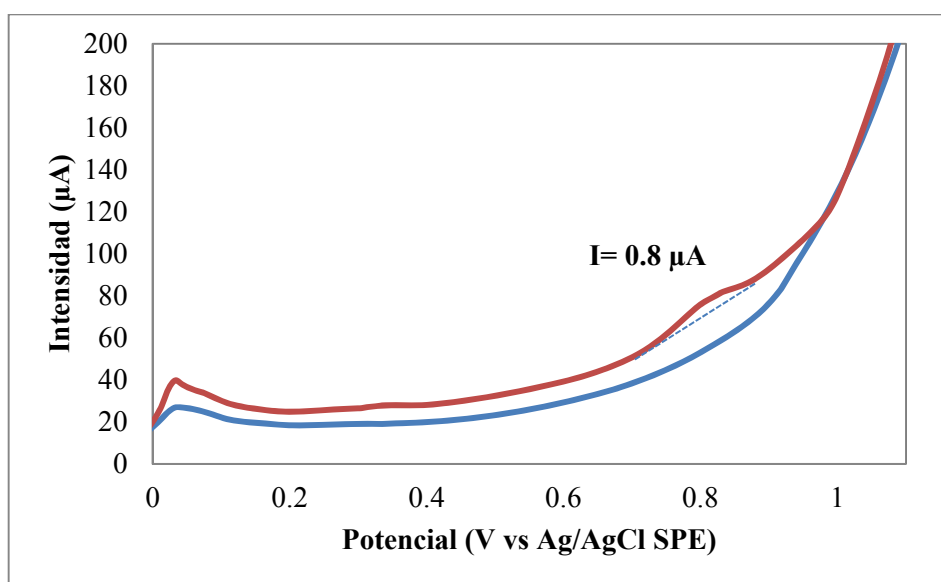
### 5.3.1.2.- Capacidad de detección del método

Este procedimiento analítico fue también caracterizado mediante su capacidad de detección, teniendo en cuenta  $\alpha$  y  $\beta$  [45, 46]. En el cálculo de este índice de calidad también se precisaron regresiones validadas entre la concentración y la señal analítica, construidas en el rango de 10.0 a 900.0  $\mu\text{M}$  [47].

El valor mínimo de concentración detectable fue  $49.7 \pm 3.4 \mu\text{M}$  ( $\alpha = \beta = 0.05$ ;  $n = 3$ ).

### 5.3.1.3.- Exactitud del método

Los electrodos serigrafiados de carbono se emplearon finalmente para analizar la pureza de una muestra de cocaína confiscada por la policía. Una alícuota de la muestra confiscada de cocaína (5 mg) se disolvió en 2 mL de electrolito de soporte pH 9. 68  $\mu\text{L}$  de esta disolución se diluyeron a un volumen final de 5 mL de electrolito de soporte pH 9. En la figura 5.13 se muestra el voltamperograma de esta disolución, registrado utilizando un MWCNTs-SPCEs.



**Figura 5.13.-** Voltamperograma diferencial de impulsos registrado en tampón fosfato pH 9 con KCl 100 mM (línea azul) y en la disolución de cocaína confiscada por la policía (línea roja), utilizando un electrodo MWCNTs-SPCE.

La intensidad de oxidación registrada a + 0.8 V vs Ag/AgCl SPE, 0.8  $\mu\text{A}$ , se utilizó para calcular la pureza de la muestra de cocaína.

Dicha señal de oxidación está relacionada con la concentración de cocaína en la muestra de cocaína confiscada, por lo que interpolando este valor en las curvas de calibración anteriormente obtenidas se obtiene el valor de concentración deseado. La tabla 5.3 muestra los buenos resultados obtenidos con este procedimiento en términos de RSD y de intervalo de confianza para la media, lo que confirma su exactitud.

**Tabla 4.3.- RSD e intervalo de confianza para la media de los valores de cocaína obtenidos en la muestra confiscada por la policía, utilizando MWCNTs-SPCEs.**

Pureza de la muestra de cocaína confiscada (%), calculada con método de referencia	Pureza de la muestra de cocaína confiscada (%), calculada con el procedimiento propuesto	RSD (%)	Intervalo de confianza al 95% para la media
76.7	75.7 72.8 75.7	2.2	74.7 ± 1.9

## 6.- CONCLUSIONES

Con los datos recogidos en este trabajo se puede concluir que:

- El empleo de sensores contruidos a partir de electodos serigrafiados de carbono supone una técnica sencilla, reproducible y económica para la detección voltamperométrica de cocaína.
- El análisis de cocaína mediante voltamperometría diferencial de impulsos está muy influenciado por variables experimentales como el pH del electrolito de soporte.
- El pH óptimo para el análisis voltamperométrico de cocaína en el intervalo de potenciales entre  $-0.4$  y  $+1.5$  V vs Ag/AgCl SPE es de 9.
- El potencial al que aparece el pico de oxidación de la cocaína se reduce a  $+0.8$  V vs Ag/AgCl SPE utilizando electodos serigrafiados de carbono modificados con MWCNTs.
- Los sensores modificados con MWCNTs han demostrado su viabilidad para realizar análisis cuantitativos de cocaína en muestras confiscadas.
- La reproducibilidad asociada a las pendientes de las curvas de calibración, construidas en el intervalo de concentración de 10 a 900  $\mu$ M utilizando electodos serigrafiados de carbono modificados con MWCNTs, en términos de RSD es de 2.6 % (n = 3).
- La capacidad de detección obtenida para cocaína en las condiciones óptimas de las variables experimentales es de 49.7  $\mu$ M ( $\alpha = \beta = 0.05$ , n = 3), cuando se utilizan electodos serigrafiados de carbono modificados con MWCNTs.
- El método voltamperométrico propuesto para la determinación de cocaína basado en la utilización de MWCNTs-SPCEs, presenta mejor capacidad de detección que los sensores de platino modificados con hexacianoferrato de cobalto previamente descritos en la bibliografía [33], pero no llega al límite descrito para los sensores de platino modificados con bases de Schiff [14]. Sin embargo, teniendo en cuenta el carácter desechable de los dispositivos desarrollados en este trabajo, se presentan como una atractiva alternativa para su uso en análisis rutinarios *in situ*.



## **7. - REFERENCIAS**

- [1] UNODC, Vienna, 2012.
- [2] S. Komorsky-Lovric, I. Galic, R. Penovski, Voltammetric determination of cocaine microparticles, *Electroanalysis*, 11 (1999) 120.
- [3] N.D. Volkow, Cocaine: Abuse and Addiction, National Institute on Drug Abuse (2010).
- [4] L. Institóris, A.R. Tóth, A. Molnár, Z. Árok, É. Kereszty, T. Varga, The frequency of alcohol, illicit and licit drug consumption in the general driving population in South-East Hungary, *Forensic Sci. Int.*, 224 (2013) 37.
- [5] E.J. Magalhães, C.C. Nascentes, L.S.A. Pereira, M.L.O. Guedes, R.A. Lordeiro, L.M.L.A. Auler, R. Augusti, M.E.L.R. de Queiroz, Evaluation of the composition of street cocaine seized in two regions of Brazil, *Sci. Justice*, 53 (2013) 425.
- [6] I. Evrard, S. Legleye, A. Cadet-Taïrou, Composition, purity and perceived quality of street cocaine in France, *Int. J. Drug Policy*, 21 (2010) 399.
- [7] M.K. Bjørk, K.W. Simonsen, D.W. Andersen, P.W. Dalsgaard, S.R. Siguroardóttir, K. Linnet, B.S. Rasmussen, Quantification of 31 illicit and medicinal drugs and metabolites in whole blood by fully automated solid-phase extraction and ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *Anal. Bioanal. Chem*, 405 (2013) 2607.
- [8] M. Sergi, S. Napoletano, C. Montesano, R. Iofrida, R. Curini, D. Compagnone, Pressurized-liquid extraction for determination of illicit drugs in hair by LC-MS-MS, *Anal. Bioanal. Chem*, 405 (2013) 725.
- [9] I. Zancanaro, R.P. Limberger, P.O. Bohel, M.K. dos Santos, R.B. De Boni, F. Pechansky, E.D. Caldas, Prescription and illicit psychoactive drugs in oral fluid-LC-MS/MS method development and analysis of samples from Brazilian drivers, *Forensic Sci. Int.*, 223 (2012) 208.
- [10] J.P. Pascali, F. Bortolotti, F. Tagliaro, Recent advances in the application of CE to forensic sciences, an update over years 2009-2011, *Electrophoresis*, 33 (2012) 117.
- [11] E.M. Elnemma, M.A. Hamada, S.S.M. Hassan, Liquid and poly (vinyl chloride) matrix membrane electrodes for the selective determination of cocaine in illicit powders, *Talanta*, 39 (1992) 1329.
- [12] K. Watanabe, K. Okada, H. Oda, K. Furuno, Y. Gomita, T. Katsu, New cocaine-selective membrane electrode, *Anal. Chim. Acta*, 316 (1995) 371.
- [13] E.N. Oiye, N.B.d. Figueiredo, J.F.d. Andrade, H.M. Tristao, M.F.d. Oliveira, Voltammetric determination of cocaine in confiscated samples using a cobalt hexacyanoferrate film-modified electrode, *Forensic Sci. Int.*, 192 (2009) 94.
- [14] L.S. de Oliveira, M.A. Balbino, M.M.T. de Menezes, E.R. Dockal, M.F. de Oliveira, Voltammetric analysis of cocaine using platinum and glassy carbon electrodes chemically modified with Uranyl Schiff base films, *Microchemical Journal*, 110 (2013) 374.

- [15] L.S. de Oliveira, A.P.S. Poles, M.A. Balbino, M.M.T. de Menezes, J.F. de Andrade, E.R. Dockal, H.M. Tristao, M.F. de Oliveira, Voltammetric determination of cocaine in confiscated samples using a carbon paste electrode modified with different [UO<sub>2</sub>(X-MeOSalen)(H<sub>2</sub>O)]·H<sub>2</sub>O complexes, *Sensors (Switzerland)*, 13 (2013) 7668.
- [16] L. Asturias-Arribas, M.A. Alonso-Lomillo, O. Dominguez-Renedo, M.J. Arcos-Martinez, CYP450 biosensors based on screen-printed carbon electrodes for the determination of cocaine, *Anal Chim Acta*, 685 (2011) 15.
- [17] L. Asturias-Arribas, M.A. Alonso-Lomillo, O. Domínguez-Renedo, M.J. Arcos-Martínez, Electrochemical determination of cocaine using screen-printed cytochrome P450 2B4 based biosensors, *Talanta*, 105 (2013) 131.
- [18] B.R. Baker, R.Y. Lai, M.S. Wood, E.H. Doctor, A.J. Heeger, K.W. Plaxco, An electronic, aptamer-based small-molecule sensor for the rapid, label-free detection of cocaine in adulterated samples and biological fluids, *J. Am. Chem. Soc.*, 128 (2006) 3138.
- [19] R. Freeman, Y. Li, R. Tel-Vered, E. Sharon, J. Elbaz, I. Willner, Self-assembly of supramolecular aptamer structures for optical or electrochemical sensing, *Analyst*, 134 (2009) 653.
- [20] E. Golub, G. Pelosof, R. Freeman, H. Zhang, I. Willner, Electrochemical, Photoelectrochemical, and Surface Plasmon Resonance Detection of Cocaine Using Supramolecular Aptamer Complexes and Metallic or Semiconductor Nanoparticles, *Analytical Chemistry*, 81 (2009) 9291.
- [21] M. Hua, P. Li, L. Li, L. Huang, X. Zhao, Y. Feng, Y. Yang, Quantum dots as immobilized substrate for electrochemical detection of cocaine based on conformational switching of aptamer, *J. Electroanal. Chem.*, 662 (2011) 306.
- [22] M. Hua, M. Tao, P. Wang, Y. Zhang, Z. Wu, Y. Chang, Y. Yang, Label-free electrochemical cocaine aptasensor based on a target-inducing aptamer switching conformation, *Anal. Sci.*, 26 (2010) 1265.
- [23] J.S. Swensen, Y. Xiao, B.S. Ferguson, A.A. Lubin, R.Y. Lai, A.J. Heeger, K.W. Plaxco, H.T. Soh, Continuous, real-time monitoring of cocaine in undiluted blood serum via a microfluidic, electrochemical aptamer-based sensor, *J. Am. Chem. Soc.*, 131 (2009) 4262.
- [24] Y. Wen, H. Pei, Y. Wan, Y. Su, Q. Huang, S. Song, C. Fan, DNA nanostructure-decorated surfaces for enhanced aptamer-target binding and electrochemical cocaine sensors, *Anal. Chem.*, 83 (2011) 7418.
- [25] D.W. Zhang, C.J. Sun, F.T. Zhang, L. Xu, Y.L. Zhou, X.X. Zhang, An electrochemical aptasensor based on enzyme linked aptamer assay, *Biosens. Bioelectron.*, 31 (2012) 363.
- [26] A.A. Suleiman, Y.H. Xu, An amperometric immunosensor for cocaine, *Electroanalysis*, 10 (1998) 240.
- [27] X. Zuo, Y. Xiao, K.W. Plaxco, High specificity, electrochemical sandwich assays based on single aptamer sequences and suitable for the direct detection of small-molecule targets in blood and other complex matrices, *J. Am. Chem. Soc.*, 131 (2009) 6944.

- [28] Y. Du, C. Chen, J. Yin, B. Li, M. Zhou, S. Dong, E. Wang, Solid-state probe based electrochemical aptasensor for cocaine: A potentially convenient, sensitive, repeatable, and integrated sensing platform for drugs, *Anal. Chem.*, 82 (2010) 1556.
- [29] J.L. He, Y.F. Yang, G.L. Shen, R.Q. Yu, Electrochemical aptameric sensor based on the Klenow fragment polymerase reaction for cocaine detection, *Biosens. Bioelectron.*, 26 (2011) 4222.
- [30] R.J. White, N. Phares, A.A. Lubin, Y. Xiao, K.W. Plaxco, Optimization of electrochemical aptamer-based sensors via optimization of probe packing density and surface chemistry, *Langmuir*, 24 (2008) 10513.
- [31] R.J. White, K.W. Plaxco, Engineering new aptamer geometries for electrochemical aptamer-based sensors, *Proc. SPIE - Int. Soc. Opt. Eng.*, 7321 (2009).
- [32] H. Zhang, B. Jiang, Y. Xiang, Y. Zhang, Y. Chai, R. Yuan, Aptamer/quantum dot-based simultaneous electrochemical detection of multiple small molecules, *Anal. Chim. Acta*, 688 (2011) 99.
- [33] E.N. Oiyé, N.B. de Figueiredo, J.F. de Andrade, H.M. Tristão, M.F. de Oliveira, Voltammetric determination of cocaine in confiscated samples using a cobalt hexacyanoferrate film-modified electrode, *Forensic Science International*, 192 (2009) 94.
- [34] M.T.F. Abedul, J.R.B. Rodríguez, A.C. García, P.T. Blanco, Voltammetric determination of cocaine in confiscated samples, *Electroanal*, 3 (1991) 409.
- [35] M. Tudorache, C. Bala, Biosensors based on screen-printing technology, and their applications in environmental and food analysis, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 388 (2007) 565.
- [36] M.T. Fernández-Abedul, A. Costa-García, Flow injection analysis with amperometric detection of cocaine in confiscated samples, *Analytica Chimica Acta*, 328 (1996) 67.
- [37] R.S. Schwartz, K.O. David, Liquid chromatography of opium alkaloids, heroin, cocaine, and related compounds using electrochemical detection, *Analytical Chemistry*, 57 (1985) 1362.
- [38] J.M.P.J. Garrido, M.P.M. Marques, A.M.S. Silva, T.R.A. MacEdo, A.M. Oliveira-Brett, F. Borges, Spectroscopic and electrochemical studies of cocaine-opioid interactions, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 388 (2007) 1799.
- [39] L.S. de Oliveira, A.P.S. Poles, M.A. Balbino, M.M.T. de Menezes, J.F. de Andrade, E.R. Dockal, H.M. Tristão, M.F. de Oliveira, Voltammetric determination of cocaine in confiscated samples using a carbon paste electrode modified with different [UO<sub>2</sub> (X-MeOSalen)(H<sub>2</sub>O)]·H<sub>2</sub>O complexes, *Sensors (Switzerland)*, 13 (2013) 7668.
- [40] R. Kalvoda, Absorptive accumulation in stripping voltammetry, *Analytica Chimica Acta*, 138 (1982) 11.
- [41] V. Pavlova, V. Mirceski, S. Komorsky-Lovric, S. Petrovska-Jovanovic, B. Mitrevski, Studying electrode mechanism and analytical determination of cocaine and its

metabolites at the mercury electrode using square-wave voltammetry, *Analytica Chimica Acta*, 512 (2004) 49.

[42] M.A. Alonso-Lomillo, O. Dominguez-Renedo, L. del Torno-de Roman, M.J. Arcos-Martinez, Horseradish peroxidase-screen printed biosensors for determination of Ochratoxin A, *Anal Chim Acta*, 688 (2010) 49.

[43] Á. Ríos Castro, M.C. Moreno Bondi, B.M. Simonet Suau, *Técnicas espectroscópicas en química analítica*, Síntesis, Madrid, 2012.

[44] P.J. Rousseeuw, A.M. Leroy, *Robust Regression and Outlier Detection*. (1989) Wiley. New York.

[45] J. Inczédy, T. Lengyel, A.M. Ure, A. Gelencsér, A. Hulanicki, *Compendium of Analytical Nomenclature*, 3rd ed, Port City Press Inc, Baltimore, 2000.

[46] ISO11843, *Capability of detection (Part I 1997 and Part II 2000)* Genève.

[47] R. Cela, M. Blanco, *Avances en quimiometría práctica*, Universidade, Servicio de Publicaciones e Intercambio Científico, Santiago de Compostela, 1994.

[48] M. Trojanowicz, Analytical applications of carbon nanotubes: a review, *TrAC, Trends Anal. Chem.*, 25 (2006) 480.

