



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

“Estudo eletroanalítico e cromatográfico para a análise de LSD em química forense.”

Érica Naomi Oiye

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

RIBEIRÃO PRETO -SP

2015

ÉRICA NAOMI OIYE

Estudo eletroanalítico e cromatográfico para a análise de LSD em química forense.

VERSÃO DEFINITIVA

Dissertação apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área: Química

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Firmino de Oliveira

Ribeirão Preto

2015

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

FICHA CATALOGRÁFICA

Oiye, Érica Naomi

Estudo eletroanalítico e cromatográfico para a análise de LSD em química forense.

Ribeirão Preto, 2015.

114 p. : il. ; 30cm

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

Orientador: de Oliveira, Marcelo Firmino.

1. LSD. 2. Química Forense. 3. Voltametria Cíclica. 4. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência.

Nome: Oiye, Érica Naomi

Título: Estudo eletroanalítico e cromatográfico para a análise de LSD em química forense.

Dissertação apresentada à Faculdade de Filosofia,
Ciências e Letras de Ribeirão Preto da Universidade de
São Paulo para a obtenção do título de Mestre em
Ciências.

Aprovada em: 27 de Novembro de 2015.

Banca Examinadora

Prof. Dr. Marcelo Firmino de Oliveira Instituição: Universidade de São Paulo

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. Leonardo Luiz Okumura Instituição: Universidade Federal de Viçosa

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. Bruno Spinosa de Martinis Instituição: Universidade de São Paulo

Julgamento: _____ Assinatura: _____

AGRADECIMENTOS

À minha família por me apoiar em cada decisão, a quem eu nunca saberei expressar minha gratidão por ter os pais e a irmã que tenho, e aos meus tios com quem sempre pude contar como meus segundos pais.

Ao Akira por sempre estar junto, me ouvir, me ajudar, por toda a paciência em cada dia difícil que tive, por compartilhar cada conquista obtida, me dar forças a cada vez que estava cansada e por acreditar tanto em mim.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Marcelo Firmino de Oliveira (Marcelex), que muitas vezes assume um papel de conselheiro: pela confiança, pela honra de poder trabalhar junto, por cada aprendizado e que desde 2007 me apoia em tudo. Sem dúvida, a padwan aqui ainda tem muito a aprender com este mestre jedi.

Ao Prof. Dr. Zeki Naal cujos conselhos foram valiosos, por todo o tempo que me deu atenção e me auxiliou enquanto o Marcelo esteve fora do Brasil, pelo exemplo de professor que é, e por ter participado da minha banca de qualificação.

À Prof^a. Dr^a. Aline Bruni, que acompanha toda a minha trajetória desde a graduação, por estar sempre disposta a ajudar e pelas valiosas contribuições dadas no meu exame de qualificação.

Ao Prof. Dr. Jesus Antônio Velho por todas as conversas que tivemos e por ser este exemplo de profissional a ser seguido.

Ao Prof. Dr. Luiz A. Beraldo de Moraes (Beto) por estar sempre disposto a ajudar e compartilhar seu conhecimento.

À banca de defesa, Prof. Dr. Leonardo L. Okumura e Prof. Dr. Bruno S. de Martinis pelas críticas construtivas dadas a este trabalho na etapa final deste mestrado.

Aos grandes profissionais que o Departamento de Química tem - Mércia, Valdir e Eduardo – com quem sempre pude contar e cuja dedicação de cada um ao trabalho me faz admira-los.

À Polícia Científica de Ribeirão Preto, especialmente ao Ipólito pelo trabalho em equipe e constante troca de informações, além por sempre me receber tão bem no laboratório.

Às professoras Dulce e Fátima por terem me acolhido e me ensinado mais sobre eletroanalítica na Universidade do Minho. Às pessoas que me receberam tão bem durante meus 40 dias e fizeram a diferença em cada um desses dias pela ótima companhia: professor Carlos, Rui, Carlos e especialmente à minha querida amiga Ângela.

À Opencadd Advanced Technology, pelo aprendizado, por ter dado a chance de ter convivido com tantos profissionais que mudaram a minha visão e ter proporcionado as grandes amizades que tenho comigo até hoje.

À Nova Analítica, pela experiência como estágio, o que me deu a chance de me conhecer melhor e ter as grandes amigas e profissionais que independente da distância, estão sempre comigo.

Ao IPT (Instituto de Pesquisas Tecnológicas): sem dúvida, o aprendizado no LRM me tornou uma profissional mais criteriosa, com conhecimentos que levarei comigo sempre. Toda a experiência que tive foi essencial para este mestrado e sem esquecer-se dos amigos feitos e da chefia: lembro-me de todas as reuniões que tivemos como lições que tirei para trabalhar cada vez melhor.

À equipe (e não apenas grupo) do laboratório – GEEQFor - por todas as discussões científicas, pelo companheirismo em todos os dias, pela ajuda e pela amizade. E é claro, especialmente ao grande Zanatto por toda a ajuda imediata e ao Prof. Dr. José Fernando de Andrade, que sempre esteve disposto a ouvir e aconselhar pacientemente.

Aos meus amigos de graduação da 43ª turma de Química por terem me acompanhado desde o meu primeiro ano, em que pude conhecer ótimas pessoas que sempre admirarei.

Aos meus amigos da Fundação Getúlio Vargas e à Kíria: amigos que sempre estão juntos, mesmo com a correria do dia a dia de cada um.

As pessoas especiais com quem morei durante a minha graduação e pós graduação, cuja convivência nesses períodos é inesquecível.

Aos meus amigos e segunda família do colégio Etapa, por esses mais de 10 anos de amizade, essenciais para tornar a profissional e pessoa que sou hoje. Às minhas irmãs que encontrei lá, digo que o apoio constante de vocês é uma das minhas motivações.

*“Look for the girl with the sun in her eyes
And she's gone
Lucy in the **S**ky with **D**iamonds..”*

(The Beatles)

RESUMO

OIYE, E. N. Estudo eletroanalítico e cromatográfico para a análise de LSD em química forense. 2015. 114 f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

O LSD, abreviação para a dietilamida do ácido lisérgico, é um alucinógeno que comumente é consumido na forma de selos e suas apreensões são constantes no cenário policial brasileiro e mundial. No momento da apreensão, nos laboratórios forenses tem-se um processo de análises químicas para a confirmação desta droga. As metodologias analíticas precisam ser sensíveis, específicas e fornecer resultados confiáveis, o que o processo de validação – através de protocolos normatizados - pode garantir.

Neste trabalho, propõem-se procedimentos experimentais para a determinação de LSD em amostras apreendidas através de técnicas de Voltametria Cíclica e Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) com detecções de arranjo de diodo e eletroquímica. Essas análises permitem ampliar as restritas metodologias encontradas na literatura.

Esses procedimentos tiveram o perclorato de amônio em metanol com presença de água como eletrólito de suporte para a detecção voltamétrica, e com base nesses resultados, obteve-se informações para a detecção eletroquímica dentro do sistema cromatográfico. Esta mesma composição de fase móvel também permite a detecção por arranjo de diodo neste sistema.

Nos três sistemas estudados, obteve os limites de quantificação de $1,64 \cdot 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$, $6,67 \cdot 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ e $3,29 \cdot 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ para as técnicas de Voltametria Cíclica, CLAE com detecção eletroquímica e detecção de arranjo de diodo, respectivamente. Tais valores mostram que as metodologias tem capacidade de analisar baixas concentrações de LSD. Além da validação dos três métodos propostos, fez-se a análise de três amostras apreendidas, das quais uma continha LSD e outras duas não. Deste modo, a partir da combinação dos mesmos componentes de fase móvel, é possível obter dois procedimentos cromatográficos baseados em diferentes tipos de detecção, enquanto que a determinação voltamétrica habilita outro tipo de análise aliando a portabilidade e rapidez da quantificação.

Ao fim de todo o processo de validação envolvido, obtêm-se três metodologias que permitem a quantificação de LSD, com a confiabilidade garantida para serem aplicadas em análises de rotina de um laboratório forense.

Palavras - chave: LSD, Química Forense, Voltametria, Cromatografia Líquida de Alta Eficiência.

ABSTRACT

OIYE, E. N. “Electroanalytical and chromatographic studies for determination of LSD in forensic chemistry”. 2015. 114 f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

LSD – abbreviation for Lysergic Acid Diethylamide - is a hallucinogenic drug commonly consumed in blotters form. Inside the police scenario, its apprehension is constant in national and global scale.

Once the drug is apprehended, forensic laboratories must follow a procedure with chemical analysis aiming a confirmatory result. The analytical methodologies applied for this purposes must be sensitive, specific and provide reliable results, and all these characteristics can be afforded with a validation process behind these procedures.

In the present study, three new methodologies for the determination of LSD in seized samples are presented, based on Cyclic Voltammetry technique and High Performance Liquid Chromatography (HPLC) with diode array detection and electrochemical detection. These analyses increase the number of methodologies found in literature for the same purpose.

All the experimental procedures included ammonium perchlorate in methanol with the presence of water composing the supporting electrolyte solution for voltammetric measurements. From the electrochemical information observed, it could be applied for electrochemical detection in a chromatographic system. This same composition as mobile phase enables a signal for diode array detection.

In all the three systems, the values for limit of quantification were $1.64 \cdot 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$, $6.67 \cdot 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ and $3.29 \cdot 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$, for voltammetric determination, HPLC with electrochemical detector and diode array detector, respectively. These results prove the methodologies can quantify low concentration of LSD in seized samples. Indeed, after all validation process, three real blotter samples were analyzed, which one of them contained LSD. In this way, from the same components in mobile phase, it is possible to gather two different procedures based on distinct detection principle, whilst the voltammetric determination might be seen as a variety for drug analysis, with portability and quickness as some characteristics for its quantification.

Finally, after all validation process applied, there are three methodologies for quantification of LSD in seized samples, with confidence ensured for appliance in the routine of a forensic laboratory.

Keywords: LSD, Forensic Chemistry, Voltammetry, High Performance Liquid Chromatography

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 01: Amostra de LSD na forma de selo, apreendida pela Polícia Civil do Estado de São Paulo	21
Figura 02: Gráfico referente à proporção entre as formas de consumo de LSD encontradas.....	21
Figura 03: Estruturas moleculares do ácido lisérgico e do LSD-25 (dietilamida do ácido lisérgico).	22
Figura 04: Isômeros do LSD e suas respectivas configurações.....	23
Figura 05: Reação entre a função orgânica indol e o Reagente de Ehrlich (adaptado da referência ^[38]).....	28
Figura 06: Reação entre a função orgânica amina e o reagente FBK.	29
Figura 07: a) Sistema montado para a célula eletroquímica contendo os 3 eletrodos; b) Voltamograma obtido como resposta e a determinação do valor de corrente de pico através da extrapolação da linha em um sistema de hexacianoferrato de Potássio a $3,0 \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ em $\text{KCl } 0,1 \text{ mol L}^{-1}$	30
Figura 08: Processo de oxidação eletroquímica do ácido lisérgico e derivados.	32
Figura 09: Representação de um cromatograma com indicações de alguns parâmetros cromatográficos. (adaptado da referência)	35
Figura 10: Coloração final ao reagir $200 \mu\text{L}$ do LSD $1,64 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ com $200 \mu\text{L}$ reagentes colorimétricos em suas composições originais.	57
Figura 11: Espectro de massas obtidos para análise de a) acetonitrila e b) Solução padrão de LSD em acetonitrila a concentração de $1,18 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$	60
Figura 12: Espectros de massa obtidos para a) Amostra 1 e b) Solução de branco de amostra, que é o solvente utilizado na extração de selos.	61
Figura 13: Espectros de massa das amostras 2 e 3, representados por a) e b), respectivamente.	62
Figura 14: Voltamogramas obtidos em resposta à adição de LSD e à adição de quantidade equivalente de acetonitrila com eletrodo de trabalho de Platina e velocidade de varredura 10 mV s^{-1}	63

Figura 15: a) Voltamogramas obtidos em resposta às sucessivas adições de LSD b) adição de quantidade equivalente de acetonitrila. Eletrodo de trabalho de grafite e velocidade de varredura 10 mV s^{-1} 64

Figura 16: a) Voltamogramas obtidos em resposta às sucessivas adições de LSD b) adição de quantidade equivalente de acetonitrila. Eletrodo de trabalho de carbono vítreo e velocidade de varredura 10 mV s^{-1} 64

Figura 17 : Voltamogramas comparativos sobre o efeito da concentração de NH_4ClO_4 em adições de solução de padrão de LSD em acetonitrila, eletrodo de carbono vítreo e velocidade de varredura 10 mV s^{-1} 66

Figura 18: Voltamogramas de LSD a $6,238 \cdot 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ diluído em acetonitrila em um sistema de NH_4ClO_4 $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ em metanol e água, nas proporções de 85:15 v/v e 95:5 v/v, eletrodo de carbono vítreo e velocidade de varredura 10 mV s^{-1} 67

Figura 19: Voltamogramas comparando o sinal de $80 \mu\text{L}$ de LSD a $50 \mu\text{g g}^{-1}$ ao ser diluído em diferentes solventes; meio na proporção de 95:5 v/v de NH_4ClO_4 $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ em metanol e água; eletrodo de carbono vítreo e velocidade de varredura de 10 mV s^{-1} 68

Figura 20: Voltamogramas referentes às sucessivas adições de LSD diluído em solução de branco de amostra, em sistema de 95:5 v/v de NH_4ClO_4 $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ em metanol e água. Eletrodo de trabalho de carbono vítreo e velocidade de varredura 10 mV s^{-1} 69

Figura 21: Curva analítica obtida a partir dos valores de corrente de pico dos voltamogramas (e os respectivos desvios padrões para cada medida) para adições de LSD diluído em solução de branco de amostra. 69

Figura 22: Voltamogramas referentes às variações de velocidades de varreduras na presença de LSD em concentração de $9,50 \cdot 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ diluído em metanol:água 1:1 (v/v) utilizando-se NH_4ClO_4 $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ em metanol:água 95:5 (v/v). 71

Figura 23: Estudo sobre os resultados de corrente de pico ao se variar a velocidade de varredura com concentração de LSD utilizada em $9,819 \cdot 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ para as medidas em Voltametria Cíclica com eletrodo de carbono vítreo: a) Relação entre a corrente de pico e a raiz da velocidade de varredura, em $(\text{mV s}^{-1})^{1/2}$; b) Variação do potencial de pico (E_p) com a velocidade de varredura; c) Variação da razão corrente de pico/raiz da velocidade de varredura com a velocidade de varredura; d) Variação da razão entre as correntes de pico anódica e catódica com a velocidade de varredura (em mV s^{-1}). 73

Figura 24: Comparação de voltamogramas para o teste de seletividade; eletrodo de carbono vítreo e velocidade de varredura de 10 mV s^{-1} 76

Figura 25: Cromatogramas do LSD em detector eletroquímico a 800 mV: a) fase móvel acetato de amônio e metanol e acetonitrila (75:25) – 1:1 v/v - pH 5,07 com coluna C18; fluxo 0,7 mL min⁻¹ e injeção 50 µL. b) fase móvel acetato de amônio e trietilamina pH 7,38 e água 70:30 e coluna Gold Amino; fluxo 0,7 mL min⁻¹ e injeção 50 µL. c) fase móvel acetato de amônio e metanol e acetonitrila (75:25) – 1:1 v/v - pH 5,07 com coluna C18; fluxo 0,7 mL min⁻¹ e injeção 50 µL. 79

Figura 26: Cromatogramas com as detecções em arranjo de diodo e eletroquímico com injeção de 20 µL de LSD 4,86 10⁻⁵ mol L⁻¹ dissolvido na solução de branco, variou-se a proporção da fase móvel entre NH₄ClO₄:acetonitrila:água (amostrador a 10 °C; coluna Gold Amino a 30 °C; vazão 0,55 mL min⁻¹). 81

Figura 27: Comparação de cromatogramas obtidos para detecções por arranjo de diodo (λ 310 nm) e eletroquímico (1250 mV) para o LSD 20 µg g⁻¹ diluído em acetonitrila e solvente de branco de extração. Injeção de 20 µL, fase móvel NH₄ClO₄ em metanol:acetonitrila:água na proporção 81:4:15 v/v. 84

Figura 28: Espectros obtidos na faixa do UV VIS para a) acetonitrila; b) solução de branco de amostra; c) solução de padrão de LSD 1µg g⁻¹ diluída em solução de branco de amostra. 87

Figura 29: a) Cromatogramas das concentrações de LSD para a determinação da curva analítica. b) Curva analítica obtida ao se utilizar de CLAE com detecção de arranjo de diodos a λ = 310 nm, fase móvel NH₄ClO₄:acetonitrila:água em 94:1:5 (v/v/v) a 0,60 mL min⁻¹; injeção 20 µL; Desvios padrão de cada medida estão reportados no gráfico. 88

Figura 30: a) Cromatogramas das concentrações de LSD para a determinação da curva analítica. Curva analítica obtida ao se utilizar de CLAE com detecção eletroquímica a 1250 mV, fase móvel NH₄ClO₄:acetonitrila:água em 81:4:15 (v/v/v) a 0,55 mL min⁻¹; injeção 20 µL; Desvios padrão de cada medida estão reportados no gráfico. 90

Figura 31: Teste de seletividade para LSD para CLAE utilizando-se o LSD 25 µg g⁻¹ em solvente a solução de extração de selo sem o analito e a em outro caso, a mistura de metanol e água. a) resultado para detecção por arranjo de diodo em comprimento de onda 310 nm, fase móvel 94:1:5 (NH₄ClO₄ em metanol:acetonitrila:água); b) resultado para detecção eletroquímica em 1250 mV, fase móvel 81:4:5 (NH₄ClO₄ em metanol:acetonitrila:água). 94

Figura 32: Espectros de massa correspondentes à soluções recém preparadas de LSD 10 µg g⁻¹ em diferentes solventes: a) solução de extração de amostra (metanol e água); b) acetonitrila. 96

Figura 33: Espectros de massa correspondentes à soluções de LSD 10 µg g⁻¹ preparadas 10 dias antes e armazenadas em temperatura ambiente dentro de frascos

âmbar, em diferentes solventes: a) solução de extração de amostra (metanol e água);b) acetonitrila. 97

Figura 34 : Análise dos selos apreendidos sob suspeita de conterem LSD. a) resultado para detecção por arranjo de diodo em comprimento de onda 310 nm, fase móvel 94:1:5 (NH₄ClO₄ em metanol:acetonitrila:água); b) resultado para detecção eletroquímica em 1250 mV, fase móvel 81:4:5 (NH₄ClO₄ em metanol:acetonitrila:água). 98

Figura 35: Voltamogramas obtidos para as amostras de selos fornecidas pela Polícia Civil; eletrodo de carbono vítreo; 10 mV s⁻¹. 99

Figura 36: Espectros correspondentes à varredura nos comprimentos de onda do UV VIS para as três amostras, realizadas pelo detector de arranjo de diodo. 100

LISTA DE TABELAS

Tabela 01: Categorias das técnicas analíticas seguindo a especificidade, de acordo com a SWGDRUG.....	26
Tabela 02: Comparação dos valores de Limites de Detecção (LD) obtidos entre detectores comerciais para CLAE.	35
Tabela 03: Parâmetros de validação que são mais comumente avaliados em um método analítico em desenvolvimento.	40
Tabela 04: Fatores variados no Teste de Youden para a análise cromatográfica utilizando-se a detecção eletroquímica.	53
Tabela 05: Fatores variados no Teste de Youden para a análise cromatográfica utilizando-se a detecção por arranjo de diodo.....	53
Tabela 06: Resultados obtidos ao modificar o reagente de Ehrlich.....	58
Tabela 07: Resultados obtidos ao modificar o reagente de Froehde.	58
Tabela 08: Resultados obtidos ao modificar o reagente FBK.	59
Tabela 09: Resumo sobre as características observadas para os mecanismos de reação a serem elucidados a partir de um voltamograma cíclico.	72
Tabela 10: Comparativo entre as metodologias atual e da literatura.....	75
Tabela 11: Valores dos parâmetros analíticos para a validação de metodologia para a Voltametria Cíclica utilizando-se eletrodo de carbono vítreo.	77
Tabela 12: Comparação dos parâmetros cromatográficos para as duas detecções em duas composições de fase móvel distintas para LSD a $5.77 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ e volume de injeção 20 μL	82
Tabela 13: Valores de tempo de retenção e áreas obtidas para cada experimento planejado pelo Teste de Youden para uma concentração de LSD de 20 $\mu\text{g g}^{-1}$	92
Tabela 14: Valores obtidos para o efeito de cada variável, de acordo com o cálculo proposto pelo Teste de Youden.	92
Tabela 15: Valores das figuras de mérito para validação das metodologias desenvolvidas para Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com as detecções por arranjo de diodo (DAD) e eletroquímica (ECD).....	95
Tabela 16: Comparativo entre as três técnicas utilizadas no presente estudo.	101

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

°C	Grau Celsius
α	Fator de separação em cromatografia
σ	Desvio padrão
A	Amperes
A_{sinal}	Área do sinal cromatográfico
a	área do eletrodo
ACN	Acetonitrila
Ác.	Ácido
AOAC	<i>Association of Official Analytical Chemists</i>
A_s	Fator de assimetria do pico cromatográfico
c	concentração (mol L^{-1})
D	coeficiente de difusão
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CG	Cromatografia Gasosa
DAD	Detector de Arranjo de Diodo
DMF	Dimetilformamida
DPR	Desvio Padrão Relativo
ECD	Detecção Eletroquímica
Exp.	Experimento
E_p	Potencial de pico
F	Faraday
FBK	Fast Black K Salt
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
INMETRO	Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia

i_p	Corrente de pico
ISO	International Standard Organization
k	Fator de retenção
L	Litro
LD	Limite de Detecção
LQ	Limite de Quantificação
LSD	Dietilamida do Ácido Lisérgico
m	Massa
<i>nor</i> -LSD	<i>N</i> -demetil-LSD
N	Número de pratos cromatográficos
n	número de elétrons
O-H-LSD	2-oxo-3-hidroxi-LSD
p-DMAB	para dimetilaminobenzaldeído
R	Constante dos gases
R_s	Resolução cromatográfica
r	Limite de repetitividade
S	Sensibilidade
s	Variância
SNC	Sistema Nervoso Central
Spj	Desvio padrão de precisão intermediária
SWGDRUG	<i>Scientific Working Group for the Analysis of Seized Drugs</i>
Tf	Fator de alargamento do pico cromatográfico
t_r	Tempo de retenção do pico cromatográfico
V	Volts
v	volume
W	Largura do pico cromatográfico

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	20
1.1 LSD.....	20
1.1.1 Aspectos históricos do LSD	21
1.1.2 Dados Químicos	22
1.1.3 Dados farmacológicos	23
1.2 Técnicas instrumentais no contexto forense.....	24
1.3 Spot test	27
1.3.1 Spot test em LSD.....	27
1.4 Voltametria Cíclica.....	29
1.4.1 Análise de LSD por Voltametria Cíclica.....	31
1.5 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência	32
1.5.1 Detectores para sistemas de CLAE	33
1.5.2 Parâmetros cromatográficos	35
1.5.3 Análise de LSD por técnicas cromatográficas.....	37
1.6 Validação	39
2. OBJETIVOS.....	41
3. PARTE EXPERIMENTAL	42
3.1 Extração de amostras	42
3.2 Spot test	43
3.3 Espectrometria de Massas	45
3.4 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)	46
3.4.1 Soluções.....	46
3.4.2 Instrumentação	47
3.5 Voltametria Cíclica.....	49
3.5.1 Soluções.....	49
3.5.2 Instrumentação	49
3.6 Figuras de mérito para validação.....	50
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	56
4.1 Spot test	57
4.2 Perfil das amostras extraídas	60
4.3 Voltametria Cíclica.....	63
4.3.1 Análise de resultados.....	63
4.3.2 Parâmetros de validação em Voltametria Cíclica.....	76
4.4 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)	78
4.4.1 Análise de resultados.....	78
4.4.2 Detecção por arranjo de diodos	86

4.4.3. Detecção eletroquímica	89
4.4.4 Validação de metodologia CLAE com DAD e ECD	91
4.5 Estudo complementar sobre o efeito da solução de extração	95
4.6 Análises de amostras por CLAE e Voltametria Cíclica	98
4.7 Comparativo entre as técnicas utilizadas.....	100
5. CONCLUSÕES	102
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	103

1. INTRODUÇÃO

1.1. LSD

Desde 2008 observa-se um aumento no número de pessoas, em escala mundial, que já utilizaram algum tipo de droga ilícita. Dentre essas drogas, destacam-se as novas drogas psicoativas e aquelas já conhecidas, como é o caso da dietilamida do ácido lisérgico (LSD), que é uma substância alucinógena, cujo consumo é verificado nos dados do II Levantamento Domiciliar sobre o Uso de Drogas Psicotrópicas no Brasil. ^[1-3]

Segundo este relatório, aproximadamente 552.000 pessoas já fizeram uso de substâncias alucinógenas dentro de uma faixa etária entre 12 e 65 anos. Dentro de um perfil de universitários, em 27 capitais brasileiras apontam esse número é de 7,6% ^[3,4].

Em um panorama mundial, essa mesma classe de substância – denominada como “droga classe A” junto a diversas drogas sintéticas - se mostrou mais presente no consumo da população inglesa urbana que em áreas rurais: a relação entre as porcentagens sobre o uso é de 3,2% versus 1,8% ^[2].

Analisando-se o cenário da ação da polícia, de acordo com o Relatório Brasileiro Sobre Drogas de 2010, no período de 2001 a 2007, foram apreendidas 134.719 amostras de LSD, sendo 100.766 somente no ano de 2003 ^[5]. Ainda, relata-se que o LSD e o MDMA são as drogas de maior comercialização via internet, sendo este modo de acesso considerado crescente nos últimos 3 anos. ^[6]

O LSD, também conhecido como LSD-25, ácido, doce, microponto, entre outros, é comumente encontrado na forma de selo, também conhecido como *blotters*, além de soluções aquosas ou alcoólicas, comprimidos, cápsulas e na maneira mais rara, cristal (Figura 1).

Na sua forma mais comum de selo (correspondente a 74,1% dos casos), apresenta grande variedade de imagens e logotipos estampados em sua face, caracterizando a “marca” da droga entre os usuários (Figura 2) ^[7]. Outra variável quanto ao LSD vendido ilegalmente está na sua composição, podendo existir grande variação no que diz respeito à quantidade de

princípio ativo (contêm cerca de 20-150 µg de dietilamida do ácido lisérgico por dose, em *blotters*).



Figura 01: Amostra de LSD na forma de selo, apreendida pela Polícia Civil do Estado de São Paulo.

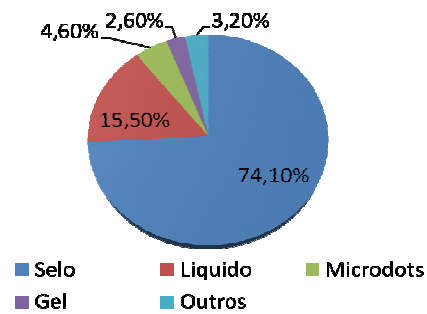


Figura 02: Gráfico referente à proporção entre as formas de consumo de LSD encontradas. ^[8]

O LSD e o ácido lisérgico atualmente encontram-se na lista de substâncias proscritas no Brasil, de acordo com a Portaria nº 344/1998 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa), estendendo tal restrição para seus isômeros. ^[9]

1.1.1. Aspectos históricos do LSD

O LSD foi sintetizado pela primeira vez em 1938 pelo químico suíço Albert Hofmann, da indústria farmacêutica Sandoz®, onde trabalhava estudando e manipulando o ácido lisérgico (Figura 3), no qual ele realizou várias alterações produzindo diversos derivados. A

vigésima quinta alteração produzida na molécula do ácido lisérgico deu origem à dietilamida do ácido lisérgico, abreviado como LSD-25 (Figura 3). Durante as etapas finais da síntese, Hofmann teve de interromper seu trabalho por sentir sensações estranhas, as quais descreveu como inquietude, tontura, imaginação extremamente estimulada e alucinações ^[10]. Ele imaginou que os efeitos que sentira estavam relacionados à substância em que trabalhava naquela dia, tendo possivelmente absorvido a droga através de contato entre a solução e seus dedos, o que o levou a realizar dias depois, um cuidadoso experimento em si próprio, vindo a descobrir definitivamente as propriedades psicotrópicas do LSD-25 ^[10].

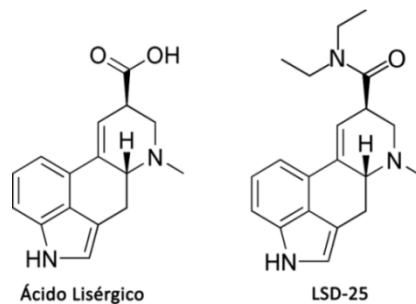


Figura 03: Estruturas moleculares do ácido lisérgico e do LSD-25 (dietilamida do ácido lisérgico).

A popularização do LSD se deu na década de 60 pelo seu uso recreacional e se disseminou rapidamente, levando a um alto consumo desta substância o que atraiu a atenção das autoridades, que rapidamente tomaram medidas para proibi-la. Ao final da década de 60, o LSD-25 foi proibido nos Estados Unidos, e em 1971 no mundo todo ^[11,12].

Há estudos quanto a seu emprego terapêutico, em que tem-se relatados seus efeitos analgésicos e seu emprego no tratamento de alcoolismo e de outras substâncias de abuso, bem como no tratamento de transtornos obsessivos compulsivos ^[13-21].

1.1.2 Dados Químicos

O LSD é uma substância semissintética derivada do ácido lisérgico. Sua molécula consiste de um sistema indol com um anel tetracíclico em sua estrutura ($C_{20}H_{25}ON_3$ / 9,10-

didehidro-N,N-dietil-6-metilergolina-8 β -carboxamida) (Figura 4). Os carbonos 5 e 8 são assimétricos, desta forma, existem quatro isômeros conhecidos: (+)- e (-)- LSD, (+)- e (-)- *iso*-LSD (Figura 4). Dentre os isômeros conhecidos, apenas o (+)-LSD apresenta propriedades psicoativas e reporta-se que a proporção entre o LSD e o *iso*-LSD formados se dá em 90% do primeiro e 10% do segundo ^[25-27].

Sua síntese é realizada em três etapas, sendo a primeira de clivagens de amidas derivadas do alcalóide do ergot, usando hidrazina anidra ^[15]. O LSD cristaliza a partir do benzeno dando origem a um cristal prismático, solúvel em água e com ponto de fusão de 83 °C. Sua massa molar é de 323,42 g mol⁻¹ ^[24].

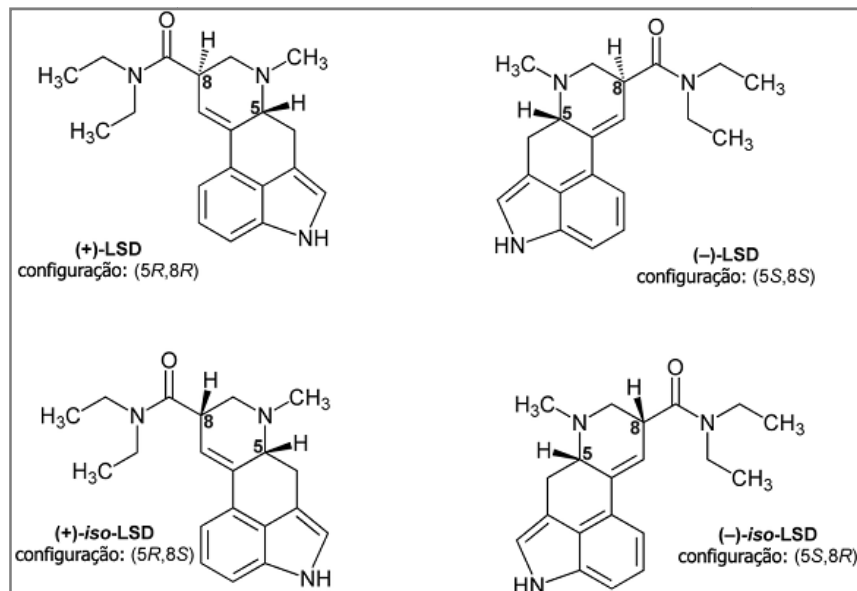


Figura 04: Isômeros do LSD e suas respectivas configurações.

1.1.3 Dados farmacológicos

A forma usual de uso do LSD se dá pela via oral, sendo facilmente absorvido. A absorção total ocorre após uma hora de ingestão e a concentração plasmática atinge seu máximo em 3 horas. Sua distribuição pelo organismo é alta e atinge facilmente o sistema

nervoso central (SNC) e a placenta. Os efeitos duram de 6 a 12 horas, conforme a dose ingerida e apresenta tempo de meia-vida de aproximadamente 3,5 horas ^[23].

O LSD é metabolizado no fígado pelas enzimas do complexo P450, responsáveis pela catálise das reações de oxidação, hidroxilação, demetilação e conjugação ^[27], dando origem a seus principais metabólitos, o 2-oxo-3-hidroxi-LSD (O-H-LSD) e *N*-demetil-LSD (*nor*-LSD). Estes metabólitos são encontrados geralmente em amostras de urina, em quantidades muito maiores em relação ao LSD (o qual se verifica que apenas 1% da quantidade consumida se mantém inalterado na urina ^[29]) e muito rapidamente, por serem muito polares e não serem reabsorvidos ao passarem pelos túbulos coletores nos néfrons ^[27].

Uma dose de LSD moderada (75-150 µg por via oral) altera significativamente o estado de consciência. Entre os efeitos da droga são citados: euforia, aumentos de criatividade e sociabilidade, melhoria nas percepções sensoriais, alucinações, dilatação das pupilas, aumento na salivação e produção de muco, mudança na percepção do tempo, mudança rápida de humor, pequeno aumento na temperatura corporal e no ritmo cardíaco, ansiedade, tensão muscular, transpiração intensiva, náusea, tontura, confusão, insônia, paranoia, medo, pânico, *flashbacks*, *bad trips*, entre outros ^[30].

Alucinógenos são geralmente considerados como moléculas fisiologicamente seguras cujos principais efeitos se dão na consciência, não produzem dependência ou vício. Não há evidências de que possam causar danos a qualquer órgão do corpo humano, nem mesmo o potente LSD. Não há qualquer relato de morte relacionada diretamente à toxicidade do LSD. Os alucinógenos não causam alterações que apresentam risco de vida nas funções cardiovasculares, renais ou hepáticas, pois têm pouca ou nenhuma afinidade pelos receptores biológicos e alvos que mediam as funções vegetativas vitais ^[31].

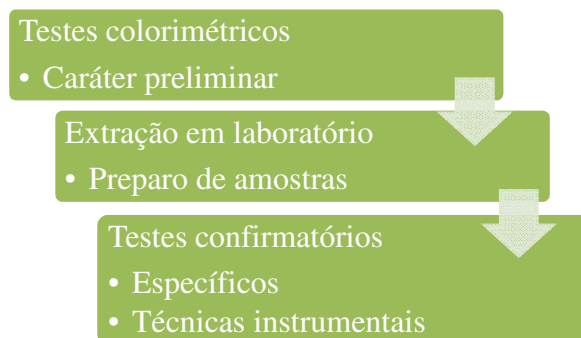
1.2 Técnicas instrumentais no contexto forense

Esta situação envolvendo os índices de apreensões de drogas em conjunto à sua crescente utilização, apresenta um desafio para autoridades policiais e aos laboratórios

forenses em termos técnicos e científicos para a análise e identificação dessas substâncias. [1,32,33]

A identificação de determinada substância apreendida passa primeiramente por um teste presuntivo – geralmente colorimétrico – que indica se determinada droga provavelmente está presente ou não. A partir desta informação prossegue-se com um teste confirmatório, realizado majoritariamente em laboratórios, com uma etapa precursora essencial, que é a extração e preparo de amostras.

Essas análises envolvem técnicas instrumentais, cujas metodologias são recomendadas pela literatura e a escolha daquela para ser aplicada depende da disponibilidade de equipamentos de cada laboratório. A partir desses resultados, pode-se ter uma análise qualitativa e quantitativa da substância. O Esquema 01 ilustra resumidamente este fluxograma de testes sobre a droga apreendida. [32]



Esquema 1: Fluxograma de análise de drogas apreendidas em um laboratório forense.

De acordo com a Scientific Working Group for the Analysis of Seized Drugs (SWGDRUGS), técnicas analíticas aplicadas à drogas podem ser classificadas em três categorias, conforme a Tabela 01 mostra. Esta divisão teve como base o potencial de discriminar a substância, sendo a Categoria A contendo as técnicas com maior capacidade discriminatórias e a C, com as piores de especificidade. [33]

Tabela 01: Categorias das técnicas analíticas seguindo a especificidade, de acordo com a SWGDRUG.

Categoria A	Categoria B	Categoria C
Espectroscopia de Infravermelho	Eletroforese Capilar	Testes colorimétricos
Espectrometria de Massas	Cromatografia Gasosa	Espectroscopia de Fluorescência
Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN)	Espectrometria de Mobilidade de Íons	Imunoensaios
Espectroscopia Raman	Cromatografia Líquida	Ponto de Fusão
Difração de Raio-X	Testes microcristalinos	Espectroscopia de UV – VIS
	Cromatografia em Camada Delgada	

Ao se utilizar de uma metodologia validada com uma técnica A, pelo menos uma análise com qualquer categoria deve ser incorporada para um resultado final. Alternativamente, na impossibilidade de se empregar a técnica de categoria A, vale-se de pelo menos 3 procedimentos validados com quaisquer outras técnicas, sendo necessário o uso de no mínimo 2 metodologias com a categoria B. ^[33]

A importância de análises quantitativas dentro de um contexto forense de um modo geral está ligada na dedução de uma pessoa ser usuária ou traficante em determinada apreensão ^[32,34]. Assim, o alto grau de pureza de uma determinada substância ilegal pode ser um item a embasar uma sentença jurídica. Na esfera penal, a implicância de tal informação reside na tipificação de um crime e nas penas consequentes em diversos países.

1.3. *Spot test*

Uma triagem inicial de drogas é realizada em sua maioria por testes preliminares: os *spot tests*. Porém, é um método não realístico em termos de diferenciação entre todos os quase 6000 compostos orgânicos considerados como “droga”. Desta forma, com uma especificidade detectada não satisfatória, esses testes baseados em mudanças de cor tornam-se identificações pré-eliminatórias ^[35].

Dentro do fluxograma no Esquema 01 apresentado, os *spot tests* consistem na primeira análise realizada ao apreender uma substância, e se tipificam como uma técnica da Categoria C. Pela sua praticidade e custo de aquisição mais acessível, a realização desses testes colorimétricos ainda é muito comum na rotina forense.

Para tais testes, define-se como cor final, como a coloração que prevalece por 1 a 2 minutos após que a presença de cores intermediárias tenham desaparecido. Essas, por sua vez são oriundas da adição de outros reagentes à droga ^[36].

1.3.1. *Spot test em LSD*

Dentre os reagentes de *spot tests* para o LSD, destacam-se neste presente trabalho o Froehde e Ehrlich, sendo este o mais comumente utilizado nos testes de rotina.

Deve-se atentar que resultados positivos junto a esses testes são apenas indicadores da possibilidade de presença de LSD. Todos os alcaloides do tipo ergot - que em sua maioria são produtos farmacêuticos e não estão sob controle nacional ou internacional – dão resultados similares a este teste. Além disso, componentes de uma grande variedade de matrizes que incorporam o LSD podem resultar em resultados falso positivo ou falso negativo. Desta forma, torna-se mandatória que analistas comprovem essas implicações através do uso de técnicas analíticas complementares, tais como a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) ou a Cromatografia Gasosa (GC), ambas podendo ou não estar acopladas à Espectrometria de Massas (MS) ^[37].

O LSD tem sua detecção por coloração através da utilização do reagente de Ehrlich junto à função orgânica indol presente em sua estrutura molecular e ao final desta reação, verifica-se uma coloração roxa a azul escura. [38]

A reação entre o para-dimetilaminobenzaldeído (p-DMAB) presente no Reagente de Ehrlich ocorre na presença de um meio acidificado e envolve duas moléculas de LSD no total, conforme a Figura 05 ilustra. O meio reacional consiste em uma solução com pH próximo de 1,00 para que a mudança de cor para a coloração violeta ocorra. [39]

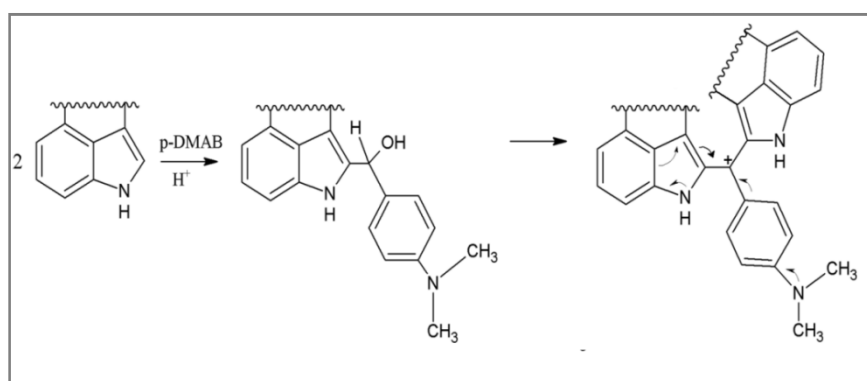


Figura 5: Reação entre a função orgânica indol e o Reagente de Ehrlich (adaptado da referência [39]).

Acerca do Reagente de Froehde, há uma complexação entre o molibdato à compostos aromáticos em um meio ácido. Supostamente a interação junto à função orgânica indólica presente na molécula do LSD é responsável pela mudança de cor observada. [40]

Constata-se desta maneira, que há uma grande variedade de compostos que reagem com o reagente de Froehde, sendo este teste inclusive utilizado na detecção de heroína. Há na literatura, estudos em que verifica-se a mudança de cor deste complexo em diferentes valores de pH. [40,41]

Recentemente, a literatura retratou o uso do sal Fast Black K (FBK) como um reagente colorimétrico para metanfetaminas. Tal substância reage com aminas primárias e secundárias, alterando a cor final da solução, conforme ilustra a Figura 06 com a reação correspondente. No primeiro caso, resulta na coloração alaranjada e no segundo, a cor violeta. [42]

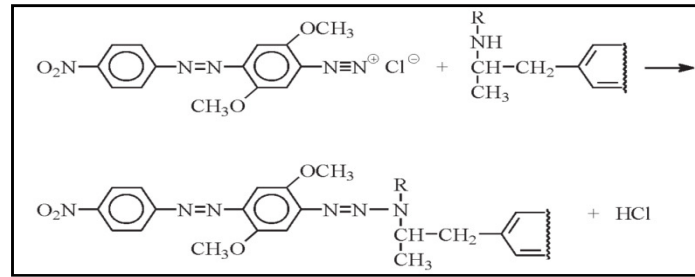


Figura 6: Reação entre a função orgânica amina e o reagente FBK. ^[42]

Não há registros sobre a formação de um produto que altere a coloração da solução originado de uma reação entre o FBK e a função indol. O uso deste reagente como *spot test* com o LSD ainda não foi reportado até a presente data, sendo um motivo para que testes fossem realizados sobre esta possibilidade.

1.4. Voltametria Cíclica

A Voltametria Cíclica consiste em uma técnica eletroquímica que monitora a corrente elétrica como resposta de uma variação linear de potencial elétrico. A informação obtida, um voltamograma, fornece informações sobre os processos de oxidação e redução, a ocorrência de processos de adsorção às superfícies e de mecanismos de transferência de elétrons em superfícies modificadas de eletrodos. A resposta voltamétrica se dá em um determinado potencial (denominado potencial de pico), através de uma corrente de pico correspondente ao processo redox do analito. Esta corrente é uma medida que é proporcional à concentração de analito, o que permite a sua quantificação. O conhecimento sobre o potencial em que ocorre um processo de oxidação ou redução é uma informação qualitativa, o que torna a técnica de Voltametria Cíclica como uma das primeiras análises a serem realizadas para obter informações prévias. ^[43-45]

O sistema que constitui uma célula eletroquímica é formado pela solução de eletrólito de suporte, e 3 eletrodos: trabalho, auxiliar e referência. Resumidamente, tem-se que o potencial do primeiro eletrodo varia linearmente com o tempo em relação ao de referência. Este, por sua vez, tem um potencial constante durante todo o experimento. A corrente flui

entre o eletrodo de trabalho e o eletrodo auxiliar que é comumente encontrado na forma de uma espiral de platina.

No eletrodo podem-se ter dois processos ocorrendo: faradáicos e não faradáicos. No primeiro caso, na interface eletrodo-solução há a transferência de carga responsável por processos de redução ou oxidação e governa-se a Lei de Faraday. No segundo caso, não há esta transferência – como em processos de adsorção por exemplo – na camada eletródica. [43,44] A corrente faradáica corresponde ao sinal de interesse em uma medida voltamétrica, sendo esta, a correspondente à reação redox do analito.

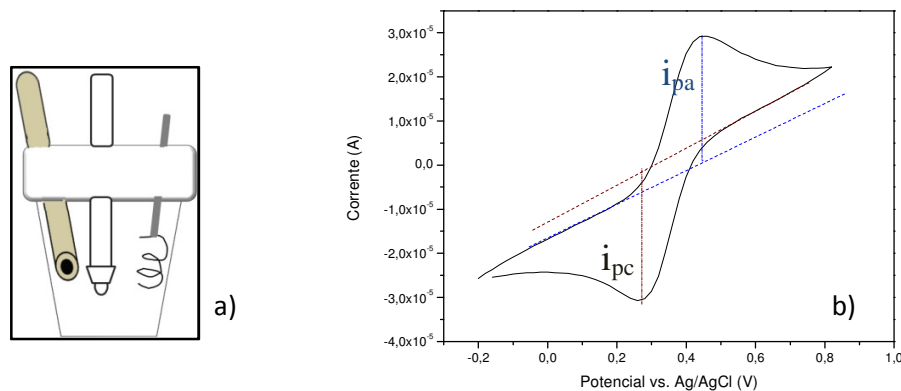


Figura 07: a) Sistema montado para a célula eletroquímica contendo os 3 eletrodos; b) Voltamograma obtido como resposta e a determinação do valor de corrente de pico através da extrapolação da linha em um sistema de Hexacianoferrato de Potássio a $3,0 \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ em $\text{KCl } 0,1 \text{ mol L}^{-1}$.

Por fim, obtém-se como resposta o voltmograma, representada na Figura 07b, em que podem ser observadas respostas anódicas (em função da oxidação do analito) e catódicas (quando em função da redução) nas formas de ondas. [45] A medida de corrente de pico se dá a extrapolar a linha base antes do pico redox no voltmograma. Mede-se então a diferença entre o valor de corrente do pico e na linha base, conforme a figura ilustra.

Tem-se como conhecimento que a corrente é uma medida quantitativa de quão rápida a espécie A está sendo conduzida à superfície do eletrodo; esta velocidade é dada por uma relação envolvendo x , que é a distância em centímetros da superfície do eletrodo. Para um eletrodo planar, pode-se mostrar que a corrente é dada pela expressão.

$$i = nFAD_A \left(\frac{\partial C_A}{\partial x} \right)$$

Em que i é a corrente em ampères, n é o número de mols de elétrons por mol de analito reduzido, F é a constante de Faraday, a é a área superficial do eletrodo em cm^2 , D_A é o coeficiente de difusão da espécie A em cm^2s^{-1} e c_A é a concentração de A. [45]

O perfil voltamétrico fornece informações como a presença do fenômeno de transporte de difusão ou adsorção, a transferência de carga lenta ou rápida, ou mesmo se a reação é reversível ou não. Tendo todos esses elementos como base, é possível avaliar o mecanismo que ocorre quanto à interação entre o analito e o eletrodo e meio.

Nos últimos tempos, observa-se que esta técnica vem sendo amplamente utilizada na área forense, como na análise de entorpecentes: cocaína, Δ^9 -THC da maconha e MDMA [46-49], ou mesmo na análise de metais provenientes de resíduos de disparos [50,51] e na determinação de metais pesados em água [52,53].

Tal fato pode ser atribuído em partes, pelo seu baixo custo e rapidez na análise aliados a sensibilidades e possibilidade de detectar analitos em níveis de traços. Assim, tais técnicas voltamétricas são vistos como potenciais testes rápidos com maior confiabilidade em relação aos *spot tests*, com parâmetros analíticos equiparados aos obtidos em técnicas convencionais, como as cromatografias gasosa ou líquida de alta eficiência. [46]

1.4.1. Análise de LSD por Voltametria Cíclica

Em Julho de 2014 foi divulgado um trabalho na literatura retratando o uso de técnicas eletroanalíticas para análise do LSD, tais como a Voltametria Cíclica, através de um sistema contendo perclorato de tetrabutilamônio ($(\text{Bu}_4\text{N})\text{ClO}_4$) em solvente dimetilformamida (DMF) [54]. Anteriormente, os únicos dados encontrados eram sobre estudos sobre o ácido lisérgico, em que constatou que sua oxidação ocorria a 0,8V (vs. Ag/AgCl) em meio orgânico de acetonitrila, contendo LiClO_4 em $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ como eletrólito suporte e também com o carbono vítreo como eletrodo de trabalho. [55,56]

Do trabalho recentemente publicado, podem-se obter informações sobre uma resposta eletroanalítica na CLAE acoplado ao detector eletroquímico, e possibilitar diferentes variações na metodologia experimental para estudos voltamétricos. Essas variações abrangem

o solvente, o eletrólito de suporte, o material do sensor e etc.. Além disto, por ser o ácido lisérgico a substância precursora do LSD, com estrutura química extremamente parecida, espera-se que suas propriedades eletroquímicas possam ser, também, encontradas na dietilamida do ácido lisérgico.^[55]

Previamente, verificou-se na literatura que a eletrodimerização oxidativa ocorre na parte indólica da estrutura do ácido lisérgico por causa da posição do carbono C-2, que pode ser facilmente atacado. Quando a posição C-2 é bloqueada, o composto formado não pode ser oxidado eletroquimicamente, não apresentando sinal pela técnica de voltametria cíclica, comprovando que essa parte do ácido lisérgico é responsável pela reação redox, o que pode ser observado também em seus derivados.^[55,56]

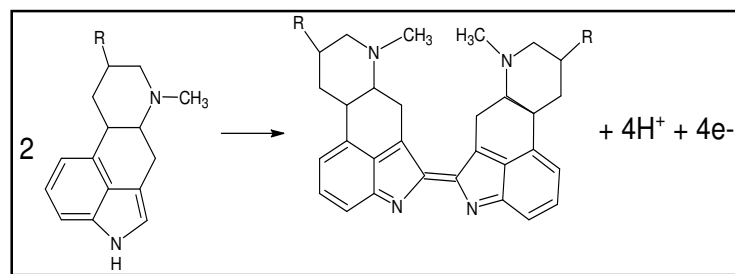


Figura 08: Processo de oxidação eletroquímica do ácido lisérgico e derivados.^[54]

Esses estudos referenciados são os únicos encontrados, demonstrando um vasto campo a ser explorado quanto à análise eletroquímica do LSD por Voltametria Cíclica, em que se pode explorar o eletrólito de suporte utilizado, o material do eletrodo de trabalho, solução entre outras possibilidades.

1.5. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

A técnica de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) – *High Performance Liquid Chromatography (HPLC)* – consiste no uso de pressões elevadas para permitir a

passagem do solvente por colunas fechadas constituídas de partículas muito finas que fornecem separações eficientes, ou seja, de alta resolução.^[44]

Pode-se obter a seletividade em um método cromatográfico através da escolha da coluna a ser utilizada. Esta fase estacionária faz parte do processo de separação do analito de interesse do restante da amostra, em que se tem em sua maioria a sílica quimicamente modificada, o que acaba por dar um caráter mais apolar (como o grupo octadecil $-C_{18}H_{37}$, C18) ou polar, que é o caso do grupo amino ($-NH_2$).^[45]

Nesta parte, de todo o processo de análise por cromatografia, reside também algumas limitações quanto à composição de fase móvel e amostra. A estabilidade dessas fases estacionárias quimicamente ligadas está relacionada com a perda do silano nas fases ligadas por causa da hidrólise, o que é mais acentuado ao se passar soluções com pH abaixo de 2,0.

Já no uso de solução de fase móvel com pH acima de 8,0 há a reação de grupos hidroxilas com silanóis residuais, ocorrendo a dissolução da sílica e por consequência, diminuindo o tempo de vida da fase estacionária.^[56]

Após passar pela coluna, a amostra segue para o detector, que fornece o sinal cromatográfico observado e a ser tratado. Por sua vez, tem-se a possibilidade de se acoplar dois tipos de detecções em série a fim de fornecer mais informações acerca do composto de interesse.

1.5.1. Detectores para sistemas de CLAE

O detector mede de forma contínua alguma propriedade física ou físico-química da amostra e emite um sinal para registro de acordo com a quantidade de analito presente. A variedade de detectores para sistemas de CLAE é grande e engloba a fluorescência, índice de refração, absorvância de luz entre outros.^[45]

No presente trabalho serão abordados os detectores de arranjo de diodo e eletroquímico. Cada um desses encontra-se em categorias diferentes, sendo o primeiro de classe ótica, a mais utilizada em sistemas CLAE e o segundo, mais específico e menos explorado.^[57,58]

Através do detector de arranjo de diodos (DAD) tem-se como base a resposta do analito em função da sua absorvância em um dado comprimento de onda. Trata-se de um método de detecção não destrutivo (ao contrário de detecções eletroquímicas, por exemplo), o que permite ser acoplado a outros detectores em sequência. [57]

Nesta configuração, há uma grade holográfica em que os comprimentos de onda resultantes são focalizados sobre uma fila de fotodiodos, e isto comporta a obtenção da varredura de todo o espectro. Consequentemente, há um sistema mais completo e o fornecimento de mais informações qualitativas em relação ao detector de ultravioleta. [45,57,58]

Os detectores eletroquímicos – aqui referenciados como ECD (*Electrochemical Detector*) – podem ser de dois tipos: amperométrico e coulométrico. No presente estudo, o equipamento trabalhou na segunda configuração, uma vez que 100% do analito sofre a reação redox ao ser submetido a um potencial pré estabelecido através de um eletrodo poroso com grande área de trabalho. No caso do amperométrico, apenas uma parte (aproximadamente 20% do analito presente) passará por este processo redox, e em compensação, o ruído da linha de base é bem menor. [44,58]

A detecção eletroquímica se define através da resposta na forma de corrente que é proporcional à concentração do soluto em mais de seis ordens de grandeza. Através de um potencial pré-estabelecido, tem-se a oxidação ou redução do analito de interesse. São necessários solventes com eletrólitos dissolvidos e indica-se trabalhar com a eluição isocrática durante a corrida cromatográfica. [44]

Este tipo de detecção é visto como promissor por sua alta sensibilidade e não dependência na absorvância de luz da molécula. A resposta se dá pela oxidação ou redução dos compostos orgânicos, oferecendo alta seletividade, alta detectabilidade e também com custo inferior aos detectores de UV e de fluorescência, pois não há filtros e monocromadores. [57]

Comparando-se a sensibilidade dos detectores, apresentam-se na Tabela 02, os valores de limite de detecção aproximados para cada tipo. Observa-se que a sensibilidade no caso do detector eletroquímico é 10 vezes maior que em relação à detecção por absorvância no UV VIS, porém este último é o mais comumente utilizado nas configurações de equipamento de cromatografia.

Tabela 02: Comparação dos valores de Limites de Detecção (LD) obtidos entre detectores comerciais para CLAE. ^[44]

Detector	LD aproximado (ng)
Ultravioleta	0,1 – 1,0
Índice de refração	100-1000
Evaporativo com espalhamento de luz	0,1-1,0
Eletroquímico	0,01-0,1
Fluorescência	0,0001-0,001

1.5.2. Parâmetros cromatográficos

O cromatograma fornece informações que são valiosas para avaliar se uma dada metodologia é mais adequada. Essas informações são obtidas através de cálculos envolvendo dados que o pico cromatográfico fornece. Na Figura 09 tem-se esquematizado um cromatograma com as informações que são levantadas para futuros cálculos de parâmetros cromatográficos.

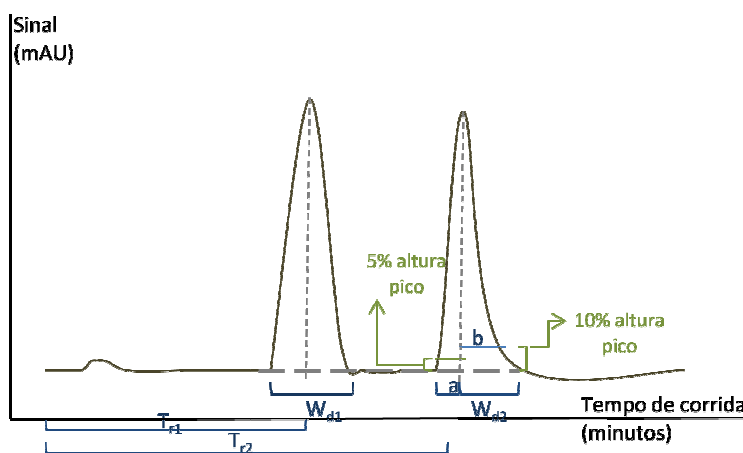


Figura 09: Representação de um cromatograma com indicações de alguns parâmetros cromatográficos. (adaptado da referência ^[56])

Em que se tem t_R representa o tempo gasto desde a injeção do analito no sistema cromatográfico até a saída do ponto máximo do pico referente ao mesmo e Wd é a largura da base do pico cromatográfico.

Através do processamento dos dados pelos softwares de cromatografia, é possível calcular o valor da integração da área do sinal e coletar diversas informações, dentre as quais, sobre a altura e tempo mais exatos sobre o pico e assim obter os parâmetros cromatográficos a serem ponderados ao se desenvolver uma nova metodologia. No caso, são mencionados abaixo apenas aqueles utilizados neste trabalho para avaliação ao longo do processo de otimização do sinal:

Tempo de retenção relativo

A partir das medidas t_R e t_M (correspondente ao tempo que a molécula do analito fica na fase móvel), pode-se obter o tempo de retenção relativo (t'_R) que representa o tempo que o analito fica na fase estacionária

$$t'_R = t_R - t_M$$

Ao se determinar o tempo de corrida de uma dada análise, leva-se em consideração o tempo de retenção do analito de interesse. As implicações do tempo de análise, além de mostrar quão rápido uma metodologia pode ser, levam principalmente ao consumo de reagente utilizado na fase móvel.

Fator de retenção (k)

O fator de retenção é determinado pela razão dos tempos que as moléculas permanecem na fase estacionária e na fase móvel.

$$k = \frac{(t_R - t_M)}{t_M} = \frac{t'_R}{t_M}$$

Fator de Assimetria (As) e Fator de Alargamento (Tf)

Esses fatores são indicadores da simetria dos picos, sobre a presença de distorções e caudas no sinal, sendo o fator de assimetria calculado a partir das distâncias entre o eixo central do pico a 10% da altura do pico e o fator de alargamento, a 5%.

$$As = \frac{b}{a}$$

$$Tf = \frac{(a+b)}{2a}$$

Ao se analisar a resposta cromatográfica procura-se os resultados cujas distorções sejam menores (menores valores numéricos desses parâmetros), garantindo assim, uma melhor integração de área dos picos. Tem-se como ideal pico com maior altura e com menor alargamento.

1.5.3. Análise de LSD por técnicas cromatográficas

As principais técnicas utilizadas para a análise de LSD são cromatografia gasosa (CG) e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), acopladas a um espectrômetro de massas. A cromatografia gasosa, apesar de apresentar boa sensibilidade para análise de LSD, apresenta uma problemática que é a volatilização da solução com LSD e, por isso, a cromatografia líquida acoplada a detector de fluorescência ou espectrometria de massas (LC – MS) tem sido mais utilizada ultimamente.

Há várias metodologias por esta técnica visando a identificação e quantificação do LSD em diferentes amostras biológicas, tais como soro, urina, fios de cabelo, humor vítreo e suor ^[59-64]. Desta forma, tem-se na realidade, a determinação de seus metabólitos nessas matrizes, sendo a urina a mais estudada. Este tipo de metodologia compõe grande parte dos trabalhos científicos encontrados na literatura, e há uma menor parcela referente à quantificação de LSD propondo a sua determinação cromatográfica desta droga em amostras apreendidas.

O uso de cromatografia líquida como método para análise de LSD tem sido usado por muitos anos, pelo menos desde 1985^[64]. Além disso, o conhecimento da técnica vem se solidificado entre os profissionais e seu uso é comumente visto em diversos laboratórios. Atenta-se também ao fato de que no Brasil, muitos laboratórios forenses possuem apenas o cromatógrafo em suas estruturas, não permitindo o acoplamento com outras técnicas, tais como Espectrometria de Massa. Surge assim, uma demanda em estudos que busquem quantificar o LSD em amostras através do sistema de CLAE^[36].

Conforme já foi mencionado, o uso de cromatografia líquida como método de análise de LSD vem sendo utilizado há muitos anos, empregando-se principalmente o detector de fluorescência^[61,62,65,67].

A fluorescência natural verificada na estrutura do analito permite sua detecção a limite de detecção relativamente baixo^[38], cujo valor de 20.0 µg/mL mencionado anteriormente, é possível de ser encontrado em algumas metodologias^[36]. Porém, há a propensão de interferência vinda de outros compostos com propriedades de fluorescência também. Observa-se nos trabalhos publicados na literatura a predominância do emprego deste detector, vindo seguido de alguns estudos com a detecção UV VIS. De fato, algumas das principais metodologias recomendadas para análise de LSD em amostras apreendidas se utilizam dessas duas detecções.^[1,65]

Seguindo-se a linha de opções de detectores, há a escassez de literatura sobre a resposta do LSD em específico a detectores eletroquímicos, principalmente em amostras apreendidas. Em um levantamento bibliográfico, há apenas um estudo sobre a determinação de diversas drogas alcaloides – e dentre elas o LSD - em matriz biológica^[69,70]. Desta forma, o conhecimento do comportamento oxidativo do ácido lisérgico e estudos eletroanalíticos a serem realizados sobre a molécula de LSD, permitem explorar este sinal eletroquímico a fim de se obter uma metodologia alternativa à sua detecção cromatográfica.

As informações voltamétricas vêm ao encontro da metodologia cromatográfica no momento que a detecção eletroquímica é utilizada junto ao cromatógrafo. Ao configurar a metodologia, necessita-se o conhecimento do potencial que o analito de interesse fornecerá uma corrente de pico referente ao processo redox, bem como o eletrólito de suporte que deverá estar presente na fase móvel que permitirá um melhor sinal.

1.6. Validação

Validação é a comprovação de que os requisitos para uma aplicação ou análise específicas foram atendidos. Através do fornecimento de evidência objetiva, demonstra-se que os métodos de ensaio executados conduzem a resultados confiáveis e adequados à qualidade pretendida. ^[71-74]

A validação relaciona-se com o desenvolvimento de metodologias em dois níveis: primeiramente, tem-se adaptações de um procedimento já existente a fim de otimizá-lo e adequá-lo para uma nova aplicação; em outro cenário, quando há um novo método de análise. ^[74]

O INMETRO (Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia) publica algumas diretrizes para a validação de metodologias em caráter de recomendação. O documento tem como base um levantamento na literatura dos principais artigos e guias de órgãos mundiais como a *International Standard Organization (ISO)*, *Association of Official Analytical Chemists (AOAC)*, Eurachem entre outros. ^[71-78]

Através das três últimas versões deste documento - intitulado DOQ CGRE008 - verificam-se as equações e parâmetros a serem utilizados nas metodologias trabalhadas ao longo deste projeto. Além disso, os conceitos e a avaliação de cada figura de mérito foram embasados em diversos artigos específicos sobre validação e nas outras referências citadas acima. ^[71-73]

Ao propor uma metodologia, a Eurachem recomenda que alguns parâmetros sejam avaliados, de acordo com o que a Tabela 03 apresenta ^[74]. Para cada figura de mérito apresentada, tem-se a sua respectiva definição. As suas fórmulas, equações e critérios utilizados estão descrito ao longo da seção da Parte Experimental, discutida posteriormente nesta dissertação.

Tabela 03: Parâmetros de validação que são mais comumente avaliados em um método analítico em desenvolvimento. ^[74-78]

Parâmetro	Definição
Especificidade/ Seletividade	Capacidade de a metodologia detectar o analito mesmo em presença de outras substâncias de comportamento similar frente ao mesmo detector.
Faixa de trabalho	Intervalo entre os níveis inferior e superior de concentração do analito em que a determinação possui precisão, exatidão e linearidade.
Limite de Detecção (LD)	Concentração derivada da menor medida detectada com confiança em um procedimento analítico.
Limite de Quantificação (LQ)	Menor concentração do analito que pode ser determinada com níveis aceitáveis de exatidão e precisão.
Exatidão (análise de recuperação)	Proximidade de um valor medido com o valor real. Sua medida é verificada por ensaios de tendência/recuperação.
Precisão (repetitividade)	Proximidade entre resultados independentes ao se utilizar um mesmo procedimento experimental, podendo ser o desvio padrão da medida.
Robustez	Medição da capacidade de uma dada metodologia se manter inalterada com pequenas variações nos parâmetros experimentais.

Um aspecto a ser discutido é a precisão, em que se avaliam as análises realizadas por um mesmo operador, mesmo equipamento, mesmo laboratório e um curto intervalo de tempo entre as leituras. Ao se variar uma dessas quatro variáveis, passa-se a ter um cálculo de precisão intermediária, também conhecida como reprodutibilidade interna.

A reprodutibilidade é uma figura de mérito que é avaliada ao se ter pelo menos dois laboratórios realizando a mesma metodologia, medindo o grau de concordância entre os resultados um mesmo analito, efetuadas em condições variadas de medição.

Assim, o processo de validação por completo envolve ensaios interlaboratoriais e ensaios de proficiência, incluindo-se outras figuras de mérito, calculadas ao final do processo.

Inserindo o contexto forense, a validação garante a confiabilidade dos resultados obtidos em dado procedimento experimental, independente de qual categoria a técnica analítica está. Garante-se assim a especificidade na detecção de uma substância e a quantificação com seus desvios para um resultado final, essenciais ao se dar um parecer técnico sobre a composição de uma substância suspeita.

Apesar da vasta quantidade de documentos sobre validação, infelizmente ainda são poucas as metodologias presentes em protocolos oficiais que são validadas para os casos de amostras apreendidas. ^[33]

2. OBJETIVOS

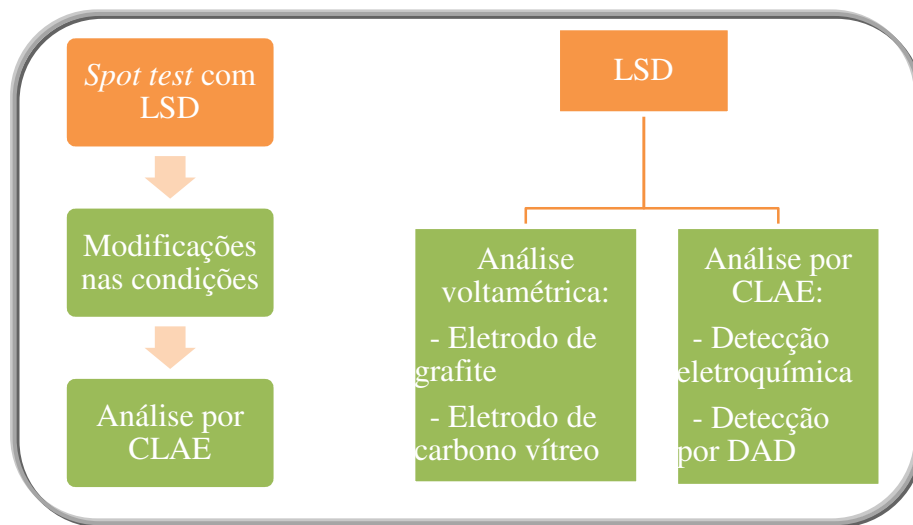
O presente trabalho tem como objetivo a determinação de LSD em amostras apreendidas através de metodologias voltamétrica e cromatográfica. A partir do estudo do comportamento eletroquímico do LSD visa-se desenvolver um procedimento experimental para a sua análise por Voltametria Cíclica e viabilizar metodologias em Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com detecção eletroquímica. Em paralelo, para fins de comparação, busca-se uma otimização na determinação cromatográfica deste analito junto à detecção por arranjo de diodo.

Além disso, espera-se aproveitar os complexos formados em *spot test* a fim de se obter uma resposta específica a este analito por metodologias cromatográficas.

Como meta final deste trabalho, pontua-se a validação dos procedimentos para viabilizar sua aplicação na rotina de um laboratório de química forense, fornecendo metodologias que atendam às necessidades atuais.

3. PARTE EXPERIMENTAL

Os experimentos realizados neste trabalho percorreram por duas vertentes, resumidas no Esquema 02. Em um primeiro momento, testaram-se algumas modificações nas condições que os *spot tests* são realizados para viabilizar a análise cromatográfica. Na segunda etapa, medidas por CLAE e por Voltametria Cíclica do LSD foram realizados paralelamente.



Esquema 02: Fluxograma de trabalho para os experimentos deste presente projeto.

Utilizou-se do padrão de LSD para todos os experimentos, sendo este encontrado na forma de ampola em concentração de $1,0 \text{ mg mL}^{-1}$ em acetonitrila, da marca Cerilliant.

3.1. Extração de amostras

Em parceria com a Polícia Científica de Ribeirão Preto, foram coletadas algumas amostras de selos, em que se extraiu o analito de interesse através da metodologia empregada na literatura. ^[36,79]

Preparou-se uma mistura de metanol:água na proporção 1:1 (v/v), utilizando-se o metanol da marca Merck em grau cromatográfico e a água MilliQ. Em frascos devidamente protegidos da luz, os selos foram colocados em 2,0 mL dessa solução, em banho ultrassônico em 3 ciclos de 6 minutos cada, com troca do solvente.

Utilizou-se um picnômetro e uma balança analítica Mettler Toledo AB204 para a determinação do valor da densidade desta mistura de metanol e água, em triplicata.

Considerando que a quantidade de LSD encontrada em selos varia de 20 a 150 μg , ao final deste procedimento de extração tem-se uma faixa de concentração de $1,031 \cdot 10^{-5}$ a $7,730 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$. [7,8]

Todas as amostras foram posteriormente armazenadas em geladeira, com frascos protegidos com capa de plástico de cor preta ou envoltos com papel alumínio. [80]

As soluções das amostras foram designadas como Am1, Am2, Am3 e sendo todas elas submetidas previamente à análise *full scan* por Espectrometria de Massas com o desígnio de prever a composição presente nesses selos.

3.2. *Spot test*

Os reagentes colorimétricos utilizados foram Ehrlich, Froehde e FBK e suas composições são apresentadas no Esquema 03. Os reagentes utilizados nesta etapa foram de grau P.A., sendo o etanol proveniente da marca Merck e o molibdato de sódio e o ácido clorídrico, da Synth. Já o p-dimetilaminobenzaldeído (p-DMAB) e o Fast Black K (FBK) foram da marca Sigma Aldrich. [37-39]

Reagente de Ehrlich <ul style="list-style-type: none">• 0,2 g p-dimetilaminobenzaldeído• 5,0 mL Ácido Clorídrico concentrado• 5,0 mL Etanol
Reagente de Froehde <ul style="list-style-type: none">• 1,0 mL Molibdato de Sódio 0,2 mol L⁻¹• 9,0 mL Ácido Clorídrico concentrado
Reagente de FBK <ul style="list-style-type: none">• Solução aquosa 0,5% FBK (m/m)

Esquema 03: Composição dos reagentes de *spot test* para identificação do LSD.

Modificaram-se as condições das reações de modo a ter soluções com pH em valor aceitável para a instrumentação cromatográfica e remoção de partículas suspensas por filtração e banho ultrassônico. Nesta etapa foi necessário apenas o pHmetro da marca Labmeter e modelo PHS-3B.

As variações envolveram a substituição do ácido forte por uma solução contendo acetato de amônio (Neon, grau P.A. ACS) com ácido acético (Merck, grau P.A.). A substituição de etanol por metanol (Sigma Aldrich, grau cromatográfico) ocorreu com a finalidade de aproximar a composição de amostra com a fase móvel a ser utilizada no sistema cromatográfico.

Todos os reagentes e respectivas soluções modificadas foram testados com uma alíquota de solução do padrão de LSD em concentração de $2,84 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, e também com a solução de branco, correspondente à acetonitrila.

Com o objetivo de melhor organizar os experimentos envolvendo as mudanças nas condições, fez-se uso de um planejamento fatorial para as alterações com o reagente de Ehrlich, utilizando-se dois níveis e dois fatores (álcool e ácido). Portanto, ao total foram 4 experimentos, considerando-se os fatores como a alteração do ácido e do álcool. No Quadro 01 segue a matriz de coeficientes de contraste para este experimento, sendo a “acidez mais

fraca” referente à substituição do ácido clorídrico pela solução de acetato de amônio, e a variação de álcool do etanol para metanol. ^[81,82]

Quadro 01: Planejamento de experimentos para a modificação do teste com reagente de Ehrlich.

Experimento	Variações	
	Ácido	Álcool
1	Acidez mais fraca (-)	Metanol (-)
2	Ácido forte (+)	Metanol (-)
3	Acidez mais fraca (-)	Etanol (+)
4	Ácido forte (+)	Etanol (+)

Este mesmo planejamento experimental não se aplicou no caso da modificação do reagente de Froehde, pois a única alteração realizada foi em relação à acidez do meio, não tendo portanto duas variáveis para montar a matriz de coeficientes de contraste. Os testes sobre este reagente visaram obter o pH 3,0 na solução final.

Acerca do reagente FBK, cujo preparo consiste apenas na dissolução de 5% do sal em água ^[42], focou-se na alteração de composição de solvente e deste modo, houve apenas uma variável experimental.

3.3. Espectrometria de Massas








A técnica de *full scan* por Espectrometria de Massa foi utilizadas nas amostras reais com o intuito de verificar a presença de LSD e de outras drogas que podem ser encontradas na forma de selo.

Junto às leituras das soluções de extração de amostra, injetou-se uma solução de padrão de LSD em acetonitrila na concentração $1,175 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$. A ausência de sinais

referentes à molécula de LSD implica em uma amostra candidata para análise de possíveis interferentes pelas metodologias desenvolvidas.

A análise foi realizada usando um sistema ACQUITY UPLC *H-Class* acoplado ao espectrômetro de massas quadrupolo tandem Xevo[®] TQ-S (Waters Corporation, Milford, MS, USA), equipado com uma fonte de ionização Z-spray operando em modo positivo de análise.


Um volume de 2 mL de amostra foi injetada dentro da fonte de eletrospray via inserção direta usando uma mistura de Água/Metanol + 0.1% de Ácido Fórmico a uma taxa de fluxo de 0.1 mL min⁻¹, sem o uso de coluna cromatográfica. Os parâmetros de operação utilizados na fonte de ionização Z-spray foram:

-  Voltagem do capilar = 3.20 kV,
-  Voltagem do cone = 40 V,
-  Source offset = 60 V,
-  Temperatura da fonte Z-spray = 150 °C,
-  Temperatura de dessolvatação do gás N₂ = 250 °C,
-  Fluxo do gás de dessolvatação = 700 L h⁻¹.
-  A faixa de massas usada no modo de análise *full-scan* foi de 100 a 1000 unidades de massa (u).

3.4. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

3.4.1. Soluções

Testaram-se três possibilidades de fase móvel, cujas composições foram retiradas da literatura, para detecção de LSD em amostras biológicas^[36,66,69,70]:

-  Solução aquosa de acetato de amônio 1,0 g/L em proporção 1:1 (v/v) com a mistura composta por metanol: acetonitrila 75:25 (v/v);

- ☞ Solução aquosa de acetato de amônio $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ com 0,25% de trietilamina (atingindo um pH entre 7,0 e 8,0) e acetonitrila na proporção 70:30 (v/v);
- ☞ Água, acetonitrila e solução de perclorato de amônio $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ em metanol, em que se testou com a proporção de composição de solvente orgânico com água em 95:5 e 85:15 (v/v).

Todas as soluções foram filtradas à vácuo em membranas de $0,45 \mu\text{m}$ e submetidas a um fluxo de nitrogênio junto a um banho ultrassônico.

Para as leituras, utilizou-se da solução de padrão comercial de LSD diluído em acetonitrila e posteriormente dois conjuntos de soluções de variadas concentrações oriundas dessa, em uma série estaria diluída em metanol e água na proporção 1;1 v/v e a outra, em acetonitrila.

3.4.2. Instrumentação

Para as análises cromatográficas utilizou-se o equipamento Ultimate 3000 da Thermo Scientific, com amostrador automático WPS3000 e detectores de arranjo de diodo (DAD - *Diode Array Detector*) e Eletroquímico (ECD - *Electrochemical Detector*), modelo CoulochemIII.

Para a análise dos complexos formados a partir da reação colorimétrico do LSD com os reagentes para *spot test*, planejou-se a utilização do detector DAD e posteriormente a verificação de resposta em detecção eletroquímica.

A célula eletroquímica que o compõe é constituída de eletrodo de trabalho de grafite, contra eletrodo de carbono e eletrodo de referência de paládio, disponíveis em sequência ao detector de arranjo de diodo.

Sobre a análise do LSD, primeiramente, alguns testes foram realizados variando-se a coluna como a C18 da marca ACE ® (partículas de $5 \mu\text{m}$, e dimensões de $250 \times 4,6 \text{ mm}$). Posteriormente, optou-se em trabalhar com uma fase estacionária de natureza mais polar,

sendo a coluna Gold Amino da Thermo Scientific (partículas de 5µm, e dimensões de 250 x 4,6 mm), com agrupamentos -NH₂ ligados à cadeia de carbonos.

Todas as leituras foram realizadas com a coluna a 30°C e amostrador a 10°C para evitar a degradação do analito, e nas primeiras análises optou-se em condicionar o detector eletroquímico a fazer a leitura a 800 mV. Tal escolha foi baseada na informação que a oxidação do grupo indol presente no ácido lisérgico se dá próximo a este potencial ^[55,56]. Com o prosseguimento da pesquisa, e um novo levantamento da literatura, este valor passou a ser 1250 mV.

Ao se obter um cromatograma que apresentasse resposta para o LSD, foram otimizados os seguintes parâmetros experimentais: volume de injeção, composição de fase móvel e fluxo. Desta forma, estabeleceram-se como condições experimentais:

- ☞ Fase Móvel: NH₄ClO₄ 0,01 mol L⁻¹ em metanol:acetonitrila:água;
- ☞ Temperatura do amostrador: 10 °C;
- ☞ Temperatura de coluna: 30 °C;
- ☞ Volume de injeção: 20 µL;
- ☞ Vazão da Fase Móvel (ECD): 0,55 mL min⁻¹;
- ☞ Vazão da Fase Móvel (DAD):0,60 mL min⁻¹;
- ☞ Potencial de trabalho na célula eletroquímica: 1250 mV
- ☞ Comprimento de onda: 310 nm.

Realizar as leituras com o detector de arranjo de diodo (DAD) em um comprimento de onda de 310 nm partiu da informação de resposta do LSD a esta fase móvel de perclorato de amônio 0,01 mol L⁻¹ em metanol, porém não de modo específico, e com configuração de coluna e temperaturas diferentes ^[1,69,70].

Após coletar os dados, utilizou-se o software Chromeleon 7 fornecido pela fabricante do cromatógrafo para a integração dos picos e fornecimento dos parâmetros cromatográficos.

3.5. Voltametria Cíclica

3.5.1. Soluções

Este estudo ocorreu em paralelo às análises cromatográficas, e assim acabou-se por utilizar o perclorato de amônio, cuja utilização já foi indicada para resposta eletroquímica de drogas alcalinas ^[69,70].

Os estudos cromatográficos prosseguiram com a presença em menor proporção de água, considerando a recomendação do fabricante. Sob este pretexto, os estudos se iniciaram utilizando-se o primeiro nas seguintes composições de solventes para NH_4ClO_4 em $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ (marca JT Baker, grau P.A.) :

 Metanol:Água 95:5 v/v;

 Metanol:Água 85:15 v/v;

Todas as soluções foram submetidas a um fluxo de nitrogênio por 15 minutos a fim de diminuir uma possível interferência do oxigênio eletroativo.

As leituras de LSD foram feitas primeiramente utilizando-se o padrão comercial diluído em acetonitrila. Em uma etapa posterior, prepararam-se as mesmas diluições com o solvente de extração que é composto por metanol e água.

3.5.2. Instrumentação

As leituras por Voltametria Cíclica foram realizadas equipamento Autolab modelo PGSTAT128N da Metrohm, em célula eletroquímica, protegida da luz por uma capa de plástico de cor preta envolta, com a seguinte configuração:

- 🖨 Eletrodo de Referência: Ag/AgCl (solução de KCl saturada);
- 🖨 Eletrodo Auxiliar: Espiral de Pt;
- 🖨 Eletrodos de Trabalho: Disco de Platina (diâmetro 3mm), Disco de Carbono Vítreo (diâmetro de 3 mm) e Disco de Grafite Poroso (diâmetro de 3 mm).

Para essas leituras, desconsiderou-se a diferença no potencial de junção de líquido entre o eletrodo de referência e o meio da solução de eletrólito suporte.

O condicionamento do ambiente para todas as análises foi determinado em temperatura de 23°C e submetido à iluminação emitida por lâmpada incandescente. [80]

As velocidades de varredura estabelecidas para as análises voltamétricas foram em 5 mV s⁻¹, 10 mV s⁻¹, 25 mV s⁻¹, 50 mV s⁻¹, 75 mV s⁻¹, 100 mV s⁻¹ e 125 mV s⁻¹. Todas as leituras foram realizadas em 5 repetições e dentro do intervalo de potencial de -0,5 V a 2,0V.

3.6. Figuras de mérito para validação

Sensibilidade e linearidade

Estes dois parâmetros são obtidos a partir da equação da reta dada para o gráfico dos resultados dos ensaios em função da concentração do analito. A sensibilidade pode ser mensurada através do coeficiente angular e a linearidade pelo coeficiente de correlação linear. [71-73]

Limite de Detecção (LD)

Para os estudos voltamétrico e cromatográfico apresentados, adotou-se a determinação do LD através das informações fornecidas pela curva analítica.

$$LD = 3,3 * \frac{\sigma}{S}$$

Onde:

σ = desvio padrão do coeficiente linear da curva de calibração (obtido por software de tratamento de dados, como o OriginPro 8 utilizado neste estudo);

S = sensibilidade, obtida pelo coeficiente angular da curva analítica.

Há outras maneiras de calcular este valor, porém já foi pontuado na literatura ^[83,84] sobre a maior confiança estatística no uso das informações fornecidas pela curva analítica para esta determinação de concentração.

Limite de Quantificação (LQ)

Para o Limite de Quantificação (LQ) também se adotou o cálculo a partir dos parâmetros da curva analítica, conforme exposto no item anterior à este ^[83,84].

$$LQ = 10 * \frac{\sigma}{S}$$

A determinação do LQ através deste cálculo se mostra mais eficiente, uma vez que a relação sinal-ruído – muitas vezes utilizada para a determinação deste valor – se mostra com caráter subjetivo, o que pode levar a valores muito distintos entre si.

Tendência e recuperação

A tendência é calculada a partir da medição de uma solução contendo a concentração de padrão conhecida e mede-se razão entre o valor observado a partir da equação da curva de calibração e o valor esperado, em que o resultado é expresso em porcentagem. ^[75]

O ensaio de recuperação para a Voltametria Cíclica foi realizado utilizando-se uma concentração de LSD em $7,28 \cdot 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ e fez-se o cálculo da concentração obtida pela curva analítica. Nas análises cromatográficas, para este cálculo utilizou-se a concentração de $5,77 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$.

Teste de seletividade/especificidade

O teste de especificidade é realizado a partir de uma análise de soluções de branco da curva, analito, solução de branco com e sem analito. Uma vez que as outras substâncias que compõem o branco de amostra, por exemplo, não apresentam resposta para as metodologias empregadas, tem-se a especificidade.

Para o teste de seletividade são realizadas leituras de duas soluções contendo uma mesma concentração de LSD mas que diferem entre si por uma conter a matriz de amostra e outra não.

Neste estudo, considerou-se como matriz de amostra, a solução extraída de um selo apreendido que não contém LSD e cuja composição não interferia no sinal de interesse. Para esta informação, analisou-se esta amostra por Espectrometria de Massas, além de constatar a ausência de resposta para as metodologias voltamétrica e cromatográfica. Deste modo, utilizou-se da Amostra 3 como a solução de matriz, cujo resultado foi comparado com a solução utilizada para a confecção da curva analítica.

As medidas são realizadas com 7 repetições, de acordo com o que é recomendado na literatura e uma vez com os resultados obtidos, permite-se correlacionar a razão das variâncias (representado por s) obtidas para cada solução e aplicar o Teste F.

$$F_{\text{calculado}} = \frac{s_1}{s_2}$$

A variância com maior valor será o numerador da fração, e com o $F_{\text{calculado}}$, compara-se com o valor tabelado – em um nível de 95% de confiança – igual a 4,28. Caso o $F_{\text{calculado}}$ seja menor, tem-se que a matriz não tem efeito algum sobre a quantificação do analito. [72,73]

Avaliação de robustez

A análise de robustez por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência deu-se através do Teste de Youden, a fim de verificar qual o efeito de cada variável no sistema. Nesse método ordena-se 7 variáveis e combina-as gerando no total 8 experimentos a serem realizados. [73-75]

Tabela 04: Fatores variados no Teste de Youden para a análise cromatográfica utilizando-se a detecção eletroquímica.

Denominação	Valor nominal	Parâmetro	Variação	Parâmetro
Vazão (mL min ⁻¹)	0,55	A	0,6	A
% de água	15 %	B	12 %	B
Potencial	1250 mV	C	1300 mV	C
Solvente para LSD	Branco de amostra	D	Acetonitrila	D
Amostrador (°C)	10	E	13	E
% de acetonitrila	4%	F	2%	F
Coluna (°C)	30 °C	G	27 °C	G

Tabela 05: Fatores variados no Teste de Youden para a análise cromatográfica utilizando-se a detecção por arranjo de diodo.

Denominação	Valor nominal	Parâmetro	Variação	Parâmetro
Vazão (mL min ⁻¹)	0,60	A	0,57	A
% de água	5 %	B	9 %	B
Comprimento de onda	310 nm	C	300 nm	C
Solvente para LSD	Branco de amostra	D	Acetonitrila	D
Amostrador(°C)	10 °C	E	13 °C	E
% de acetonitrila	1%	F	3%	F
Coluna (°C)	30 °C	G	27 °C	G

O presente estudo aborda dois tipos de detecção, tornando necessária a realização do Teste de Youden para cada caso.

Para a determinação da robustez, os parâmetros apresentados nas Tabelas 04 e 05 são combinados totalizando 8 experimentos a serem realizados de forma aleatória. Apresenta-se na tabela seguinte a combinação de parâmetros proposta por Youden que orienta a condição experimental a ser obedecida em cada experimento denominado como “Exp.”.

Quadro 02: Combinação dos parâmetros experimentais combinados de acordo com o proposto pelo Teste de Youden.

A	A	A	A	A	a	A	a
B	B	b	b	B	B	B	b
C	C	C	c	C	c	C	c
D	D	d	d	D	d	D	D
E	E	E	e	E	E	E	E
F	F	f	F	F	f	F	F
G	G	g	G	G	G	G	g
Exp.1	Exp.2	Exp.3	Exp.4	Exp.5	Exp.6	Exp.7	Exp.8

Fixa-se a concentração de LSD em $20 \mu\text{g g}^{-1}$ para realizar o comparativo entre cada variação em que as informações da área do pico cromatográfico, tempo de retenção e fator de assimetria são utilizadas dentro do cálculo:

$$\text{Efeito A/a} = \frac{\sum(\text{Exp.1,Exp.2,Exp.3,Exp.4})}{4} - \frac{\sum(\text{Exp.5,Exp.6,Exp.7,Exp.8})}{4}$$

Cumprir informar que o primeiro conjunto de somatória engloba os resultados obtidos para os experimentos com as condições nominais e o segundo, com os experimentos com as variações. Segue-se este mesmo padrão para as 7 variações e depois compara-se o resultado obtido, em que maiores diferenças expressam maior influência de uma dada variável ao sistema.

Precisão

A precisão pode ser avaliada através da repetitividade e reprodutibilidade. O desvio padrão relativo de uma dada medida (DPR) fornece o nível de concordância entre replicatas.

[84]

Calcula-se o limite de repetitividade “r” que indica até que diferença de valor entre as replicatas de uma amostra é tolerada. Considerando um nível de significância em 95%, tem-se o cálculo de r através do produto [73]:

$$r = 2,8 * \sigma$$

Sendo σ , o desvio padrão associado aos ensaios de repetitividade, ou seja, seguindo como pré requisitos os mesmos procedimento de medição, analista, instrumento, local e as leituras sendo realizadas em curto espaço de tempo. O resultado final pode ser expresso como a média entre os valores obtidos.

Precisão intermediária

Para estimar a precisão intermediária, fixaram-se todas as condições de análise e houve um espaçamento de 2 dias entre as análises. Deste modo, manteve os mesmos analista e equipamento em um número de 7 replicatas de análise.

A determinação de desvio padrão de precisão intermediária (S_{pi}) foi realizada conforme cálculo abaixo ^[72,73]:

$$S_{pi} = \sqrt{\frac{1}{t(n-1)} \sum^t \sum^n (y_{jl} - \bar{y}_j)^2}$$

Onde:

t = total de amostras ensaiadas;

n = ensaios realizados por amostra (neste estudo foram 5 repetições);

j = número da amostra;

l= número do ensaio;

y_{jl} = resultado do ensaio k da amostra j;

y_j = média aritmética dos resultados da amostra j.

Faixa de trabalho/Faixa linear

A determinação da faixa de trabalho segue a faixa de aplicação para o ensaio que será aplicado. Os valores medidos obtidos tem que estar linearmente correlacionado às concentrações, incluindo que os valores medidos próximos ao limite inferior da faixa de

trabalho possam ser distinguidos dos brancos dos métodos. Esse limite inferior deve, portanto, ser igual ou maior do que o limite de detecção do método. ^[76]

Cumpra informar que a curva analítica deve incluir também em seus primeiros pontos, valores próximos à concentração estipulada pelo Limite de Quantificação (LQ). ^[74]

A faixa de trabalho obedece aos limites observados quanto à linearidade da resposta com a concentração trabalhada. A partir de uma determinada concentração, tem-se uma saturação do sinal observado, não obedecendo mais a equação da reta proposta para o método.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos contemplam as observações levantadas junto aos *spot tests*, o estudo eletroanalítico do LSD por Voltametria Cíclica e pela técnica de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com detecções por arranjo de diodo e eletroquímica, bem como a leitura de amostras apreendidas comparando-as aos espectros de massa. Por fim de cada metodologia analisada apresentam-se as figuras de mérito para a validação.

A análise de amostras reais é parte importante de todo o desenvolvimento experimental realizado por se tratar da aplicação final das metodologias apresentadas. Além disso, uma revisão de cada procedimento com o registro de literatura e uma comparação entre todas as metodologias desenvolvidas auxiliam a avaliar melhor o desempenho de cada uma para a determinação de LSD.

Cabe ressaltar que os estudos voltamétrico e cromatográfico ocorreram em paralelo, tentando-se aproximar as condições experimentais para as duas técnicas. Os primeiros estudos voltamétricos tiveram a grafite como material de eletrodo de trabalho para que a composição do sistema se aproximasse com a configuração do detector cromatográfico do tipo eletroquímico.

4.1. Spot test

As alterações em cada reagente colorimétrico foram realizadas a fim de obter soluções que possam ser injetadas em um sistema cromatográfico, ou seja, sem partículas suspensas em solução e pH final variando entre 2,0 e 8,0. A Figura 10 ilustra as reações ocorridas ao se ter cada reagente em sua composição original junto à solução de padrão de LSD de concentração $1,645 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$.

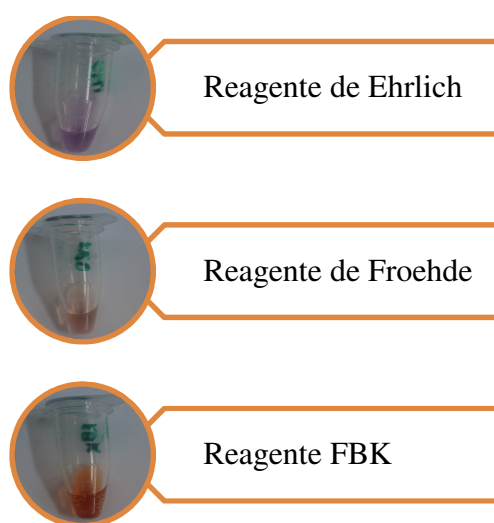


Figura 10 Coloração final ao reagir $200 \mu\text{L}$ do LSD $1,645 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ com $200 \mu\text{L}$ reagentes colorimétricos em suas composições originais.

No caso do Reagente de Ehrlich, o intuito da substituição do álcool utilizado é de aproximar-se da composição de fase móvel a ser utilizada no cromatógrafo. O uso de acetato de amônio com ácido acético – que em solução apresentou pH 4,5 - teve o mesmo embasamento, somado ao fato de necessitar-se de um valor de pH mais alto na solução a ser injetada a fim de não danificar o equipamento.

A Tabela 06 apresenta os resultados obtidos para cada experimento do planejamento realizado com as alterações na composição do reagente de Ehrlich, junto ao pH medido após a adição ao LSD.

Tabela 06: Resultados obtidos ao modificar o reagente de Ehrlich.

	Ácido	Álcool	pH	Alterações	pH final	Mudança de cor?
Experimento 1	Acetato de amônio	Metanol	1,41	Adição acetato de amônio em solução	3,84	Não
Experimento 2	HCl 36,5%	Metanol	1,25	Espera de 10 minutos	---	Sim
Experimento 3	Acetato de amônio	Etanol	4,02			Não
Experimento 4*	HCl 36,5%	Etanol	1,05	---	---	Sim

* Composição original do reagente de Ehrlich

Com a mudança do etanol da composição para metanol observou-se que a reação demora mais para ocorrer, sendo a cor violeta surgindo após aproximadamente 10 minutos. O aumento no valor de pH não se mostrou eficiente para que o teste qualitativo do LSD tivesse o efeito esperado, sendo necessária uma condição extrema de acidez em pH 1,0. Por fim, deu-se por encerrada esta parte, não prosseguindo para a análise cromatográfica.

Com o reagente de Froehde, variou-se apenas a proporção de ácido a ser adicionado, exposto na Tabela 07. Observou-se que a condição ácida com pH da solução final próxima a 1,0 se mostrou necessária para a mudança de cor, indicando a possibilidade da presença de LSD na amostra.

Tabela 07: Resultados obtidos ao modificar o reagente de Froehde.

Ácido	Composição	Resultado	pH
Ácido. Acético 99,8%	50%	Sem mudança de cor	3,0
HCl 36,5%	50%	Após 15 minutos muda de cor	1,0
HCl 36,5%	Adições de 10% de ácido	Início sem mudança de cor	
	Ao final obteve-se 50%	Após 25 minutos muda para cor rósea	1,0

Era de conhecimento a necessidade de um meio ácido para que a mudança de cor acontecesse junto ao reagente de Froehde, porém, buscou-se saber se em condições menos agressivas o mesmo resultado poderia ocorrer. Assim como foi o caso do reagente de Ehrlich,

não foi possível prosseguir com a análise do complexo formado junto ao LSD por CLAE a fim de não danificar o equipamento cromatográfico por causa da acidez da solução a ser injetada (ressalta-se a recomendação de injeção de soluções com pH entre 2,0 e 8,0).

Ao reagir o Reagente FBK com o LSD presente na sua solução de padrão (incolor), observa-se a mudança de cor para a coloração alaranjada. Porém, constata-se a presença de material particulado presente em solução, o que é de conhecimento sobre o prejuízo ao sistema cromatográfico por ocasionar entupimento em seus componentes.

A primeira tentativa em eliminar esse material consistiu em um banho ultrassônico por 15 minutos, contudo, não se obteve sucesso com tal etapa. O reagente em si possui algumas partículas suspensas, e mesmo após a filtração à vácuo, com papel de filtração de poro de 0,45 µm não foi possível observar seu efeito como teste colorimétrico.

Em tentativas posteriores, alterou-se o solvente utilizado, passando para acetonitrila, metanol, incluindo misturas de cada um desses com água, conforme a Tabela 08 apresenta. Acetonitrila e metanol são solventes que solubilizam o LSD e estão presentes no padrão comercial e na extração de selos, respectivamente, o que justifica a escolha desses para tais testes.

Tabela 08: Resultados obtidos ao modificar o reagente FBK.

Solvente	Material particulado?	Mudança de cor?	Alterações	Mudança de cor?
Água	Sim	Sim	Filtração do reagente Diluição em 10 vezes	Não Sim
Água : Acetonitrila (1:1)	Não	Sim	Cor final alaranjado	
Acetonitrila	Não	Sim	Cor final alaranjado	
Metanol	Sim	Sim	Filtração do reagente	Não
Água:Metanol (1:1)	Sim	Sim	Filtração do reagente	Não

Com esta modificação realizada, ao se fazer o teste do reagente FBK com o branco – a acetonitrila utilizada para dissolução da solução de padrão – percebe-se que há mudança para a mesma coloração após aproximadamente 25 minutos.

Frente a esta constatação, o cronograma para os experimentos envolvendo *spot tests* foi interrompido para este projeto, passando-se a focar apenas na etapa paralela proposta.

4.2. Perfil das amostras extraídas

Junto às amostras extraídas na Polícia Civil do Estado de São Paulo, foi analisado a solução padrão de LSD com seu respectivo branco (no caso, apenas a acetonitrila) e o branco de amostra por Espectrometria de Massas.

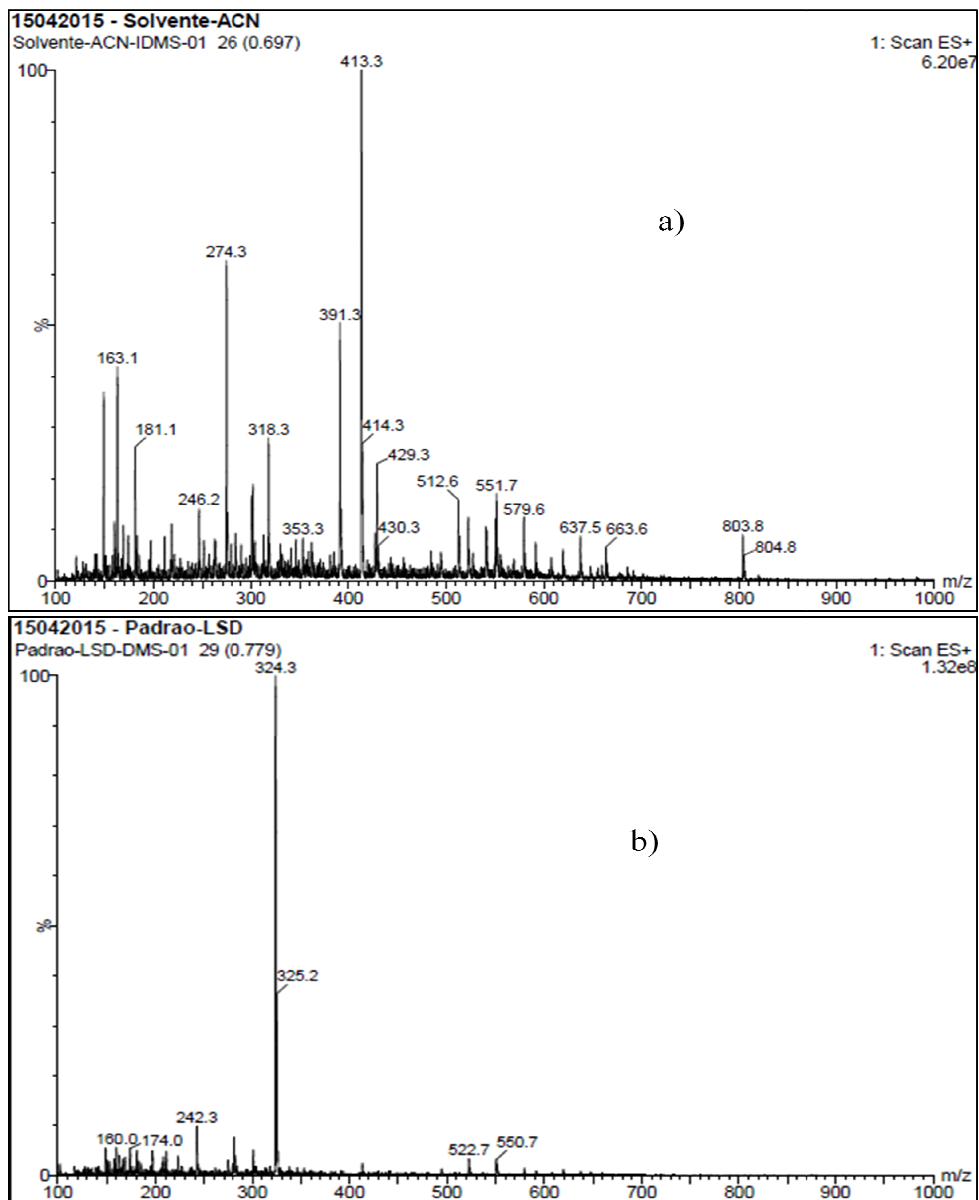


Figura 11: Espectro de massas obtidos para análise de a) acetonitrila e b) Solução padrão de LSD em acetonitrila a concentração de $1,17 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$.

Os resultados apontaram que a amostra Am1 possuíam um pico correspondente à relação massa/carga 323,4 idêntico ao observado na solução do padrão. Através desta mesma comparação, constatou-se que as amostras Am2 e Am3 não continham o analito de interesse.

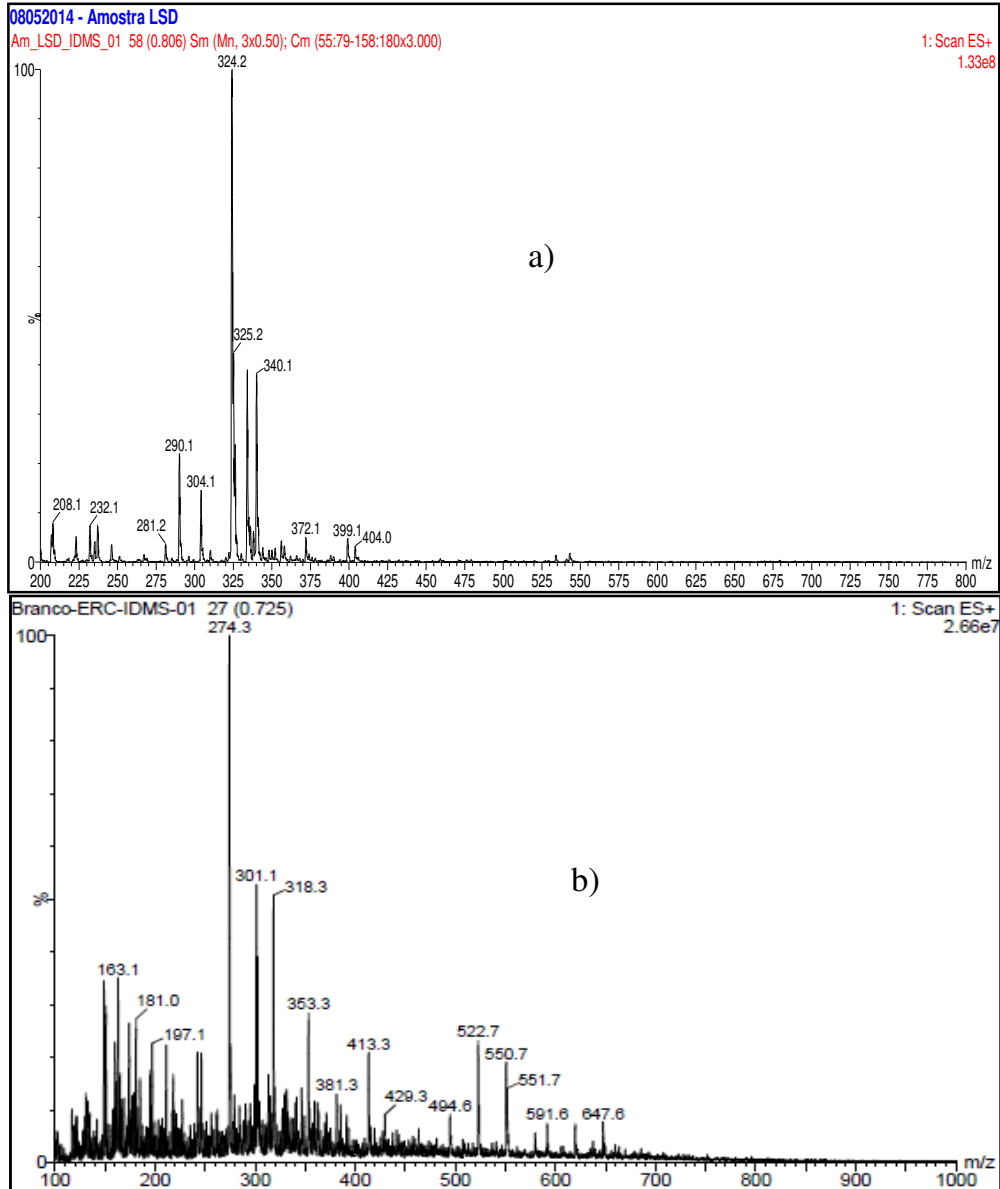


Figura 12: Espectros de massa obtidos para a) Amostra 1 e b) Solução de branco de amostra, que é o solvente utilizado na extração de selos.

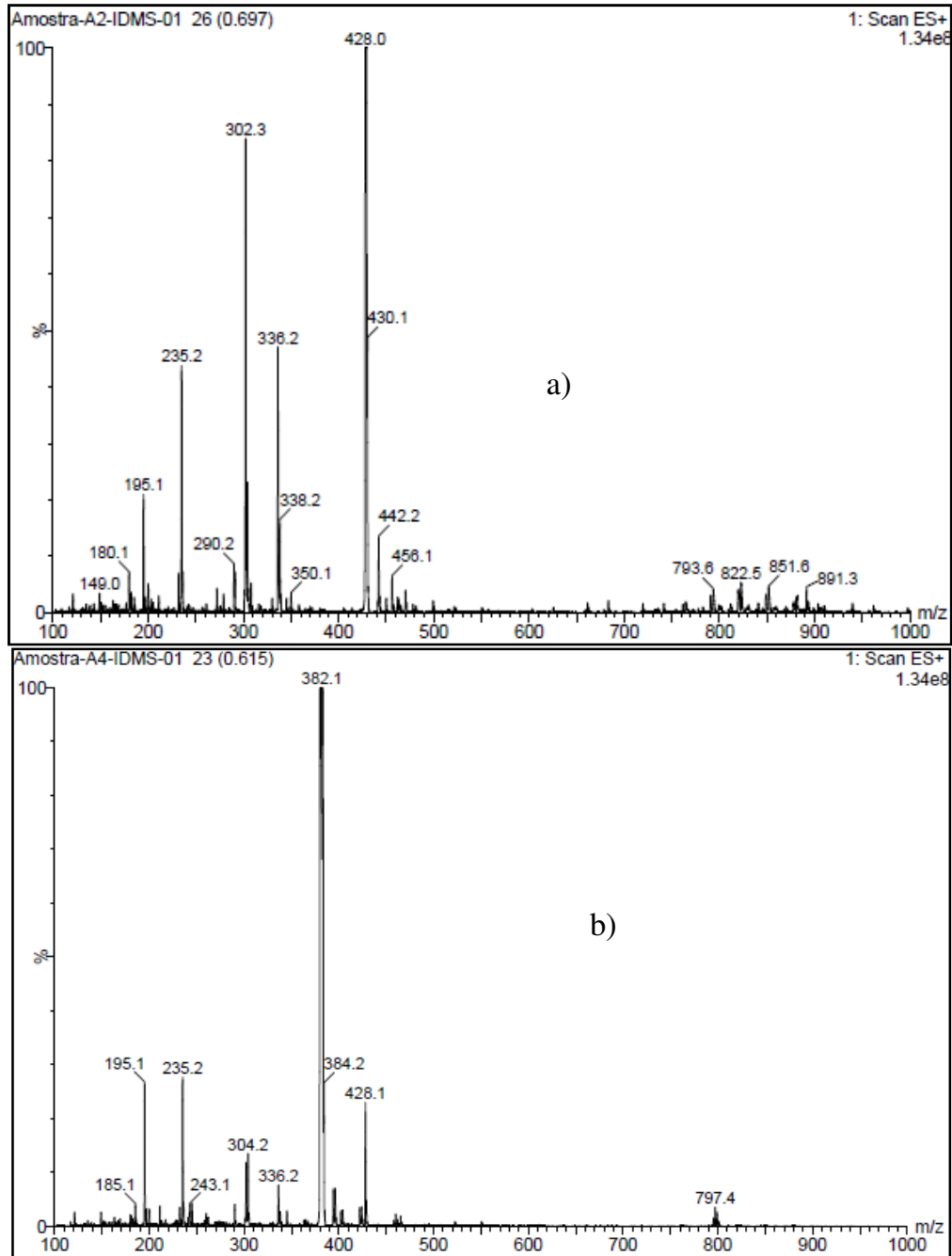


Figura 13: Espectros de massa das amostras 2 e 3, representados por a) e b), respectivamente.

Na Figura 12a) referente ao espectro obtido para a Amostra 1, observa-se um pico de maior intensidade de massa/carga de 324,2. Além deste, observa-se que há o pico de 340,1 também a ser levado em consideração. A presença deste sinal possivelmente é resultado da reação que ocorre com o LSD quando em presença de água, em que há a quebra de uma ligação dupla para a formação de um derivado com um agrupamento hidroxila, resultando em outros produtos derivados do LSD. [85,86]

Não foi possível realizar a análise de Espectrometria de Massas no mesmo dia de extração desta amostra, ficando um intervalo de tempo de 35 dias aproximadamente entre estes dois eventos, o que pode favorecer esta formação de derivados do LSD. ^[85,86]

Os espectros de massa das Amostras 2 e 3 (Figura 13) mostram sinais de maior abundância para compostos em 428,0 e 382,1 respectivamente. Em nenhum dos dois espectros há um pico em 324,3 como é o caso do padrão de LSD ao realizar a comparação. Deste modo, a quantificação de LSD em amostra real é possível apenas na Amostra 1, restando as outras para verificação de interferência de efeito de matriz.

4.3. Voltametria Cíclica

4.3.1. Análise de resultados

As análises em Voltametria Cíclica ocorreram paralelamente às análises de CLAE, a fim de se obter mais informações sobre o comportamento eletroquímico do LSD. Verificou-se a resposta para os eletrodos de platina, carbono vítreo e grafite nas formas de discos, em que as Figuras 14 a 16 ilustram as respostas obtidas para os eletrodos.

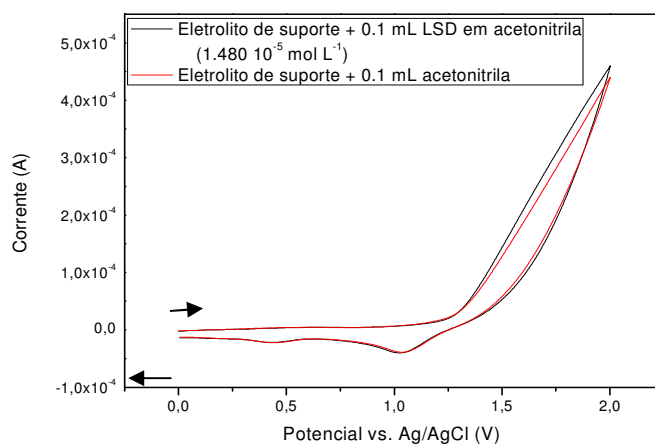


Figura 14: Voltamogramas obtidos em resposta à adição de LSD e à adição de quantidade equivalente de acetonitrila com eletrodo de trabalho de Platina e velocidade de varredura 10 mV s^{-1} . Eletrólito de suporte NH_4ClO_4 $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ em metanol e água na proporção 95:5 v/v.

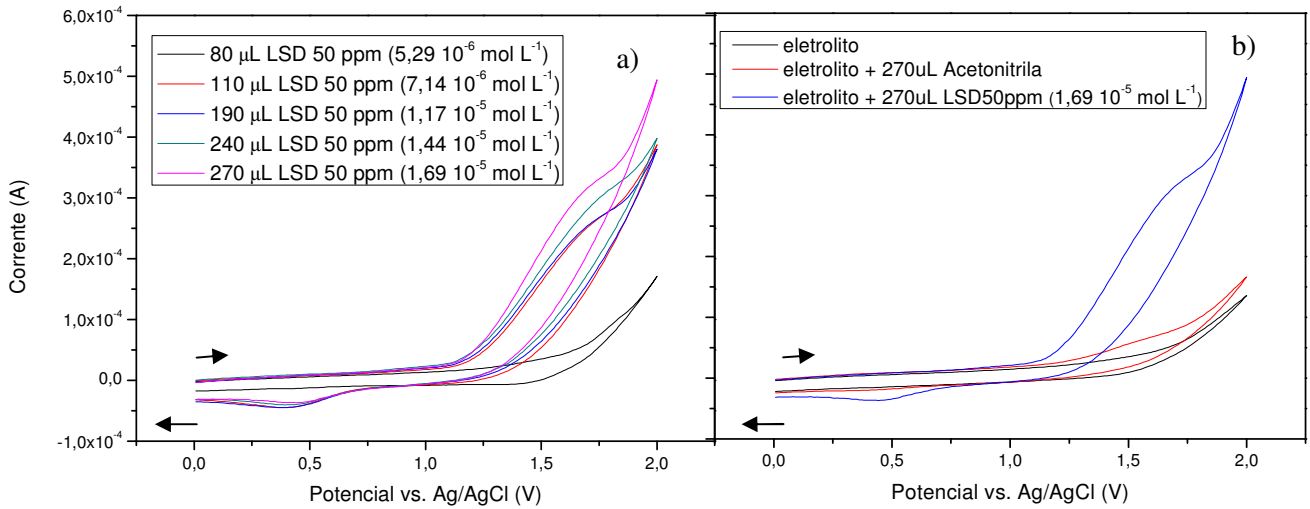


Figura 15: a) Voltamogramas obtidos em resposta às sucessivas adições de LSD b) adição de quantidade equivalente de acetonitrila. Eletrodo de trabalho de grafite e velocidade de varredura 10 mV s^{-1} . Eletrólito de suporte NH_4ClO_4 $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ em metanol e água na proporção 95:5 v/v.

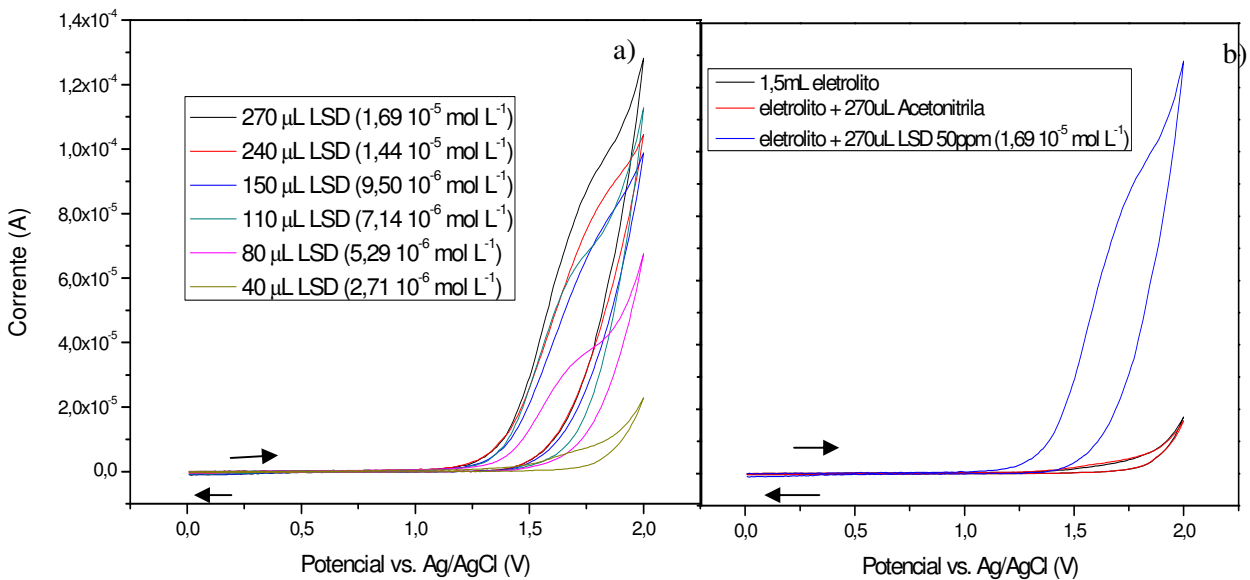


Figura 16: a) Voltamogramas obtidos em resposta às sucessivas adições de LSD b) adição de quantidade equivalente de acetonitrila. Eletrodo de trabalho de carbono vítreo e velocidade de varredura 10 mV s^{-1} . Eletrólito de suporte NH_4ClO_4 $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ em metanol e água na proporção 95:5 v/v.

O uso de metanol se mostrou importante ao ampliar faixa de varredura da análise, uma vez que o potencial de decomposição possui valor maior ^[87]. Desta forma, foi possível estender a leitura até 2,1 V a fim de se conferir o perfil do pico anódico observado, o que não mostrou uma melhora no sinal.

O potencial de pico para o LSD no eletrodo de grafite foi de 1590 mV e a partir desta informação é possível conhecer qual o valor de potencial a ser aplicado na célula eletroquímica no sistema cromatográfico. Sabe-se que por se tratar a Voltametria Cíclica de um sistema cujas medidas não contam com um fluxo e a configuração da célula eletroquímica é diferente, as adaptações de metodologia são aproximações.

Um aspecto a ser observado são as performances dos eletrodos de grafite e de carbono vítreo, em que para uma mesma concentração de LSD ($1,69 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$), a intensidade de corrente para este último é 30% maior. Em concentrações mais baixas é possível observar o sinal em eletrodo de carbono vítreo e não em grafite, o que leva a um limite de detecção em maior concentração neste último caso. Tais fatos levam a prosseguir os estudos de determinação de LSD por Voltametria Cíclica utilizando-se apenas o eletrodo de carbono vítreo.

Uma vez obtido um resultado com boa resolução com o eletrodo de carbono vítreo, as análises voltamétricas englobaram a comparação do sinal anódico do LSD frente às algumas variações de condições experimentais para estudo de otimização de sinal: variação de concentração de eletrólito de suporte, mudança na proporção de água e análise da solução de branco como solvente para diluição de amostras (teste da interferência da solução de branco de amostra).

Sabe-se que o excesso de eletrólito de suporte na solução contribui para diminuir a resistência não compensada da solução, o que acaba por melhorar o sinal apresentado. Além disso, os efeitos de interferência de matriz e de uniformidade entre as forças iônicas da solução são pontuados como consequências vantajosas. Por tais razões, a solução de eletrólito de suporte foi preparada concentrando na ordem de 10 vezes o NH_4ClO_4 e seu desempenho verificado ^[43].

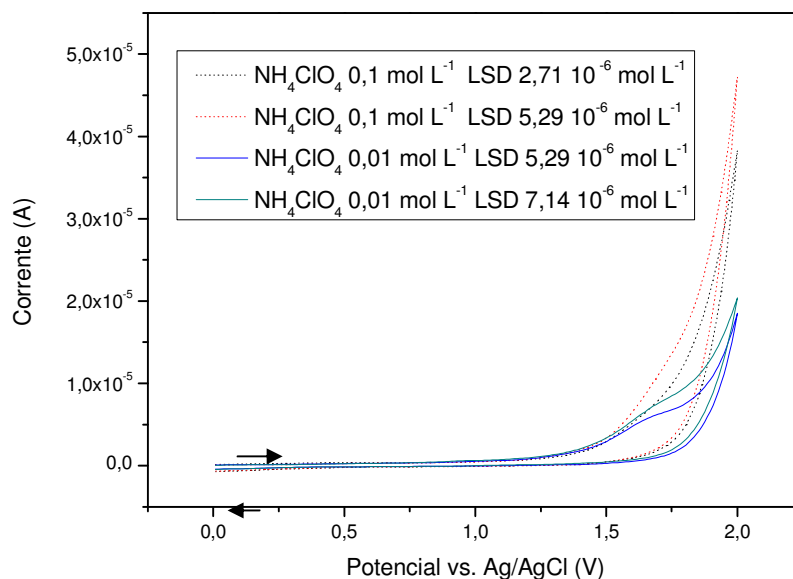


Figura 17 : Voltamogramas comparativos sobre o efeito da concentração de NH_4ClO_4 em adições de solução de padrão de LSD em acetonitrila, eletrodo de carbono vítreo e velocidade de varredura 10 mV s^{-1} .

O aumento da concentração do eletrólito de suporte na solução não resultou em resultados com maiores correntes de pico, conforme mostra a Figura 17. O uso de concentrações mais diluídas para esta metodologia mostrou uma melhor resolução do pico anódico. Em uma mesma concentração de LSD, $5,29 \cdot 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$, é possível ter uma estimativa do valor de corrente de pico com maior precisão.

Uma explicação para este perfil pode estar na impureza que o reagente possui, causando uma reação com o analito de interesse ou interagindo com a superfície do eletrodo modificando a cinética de toda a reação^[88]. Curiosamente, o mesmo comportamento foi observado no estudo mais recente realizado sobre o LSD, em que se suspeita da interação do analito com o eletrólito de suporte^[54].

Verificou-se a influência da água no sistema ao variar a proporção em o triplo da condição trabalhada. Na Figura 18 observa-se que o potencial de pico fica em torno de 1640 mV, ou seja, um valor próximo em comparação ao observado na presença de menos água. O sinal anódico obtido não possui a mesma definição que o observado na figura anterior, o que pode ser considerado como uma dificuldade na estimativa do valor de corrente de pico.

A literatura mais recente^[54] reporta também que a presença acima de 10% de água no meio acaba por alargar o pico e torna-os com definição pior, em um meio composto por DMF.

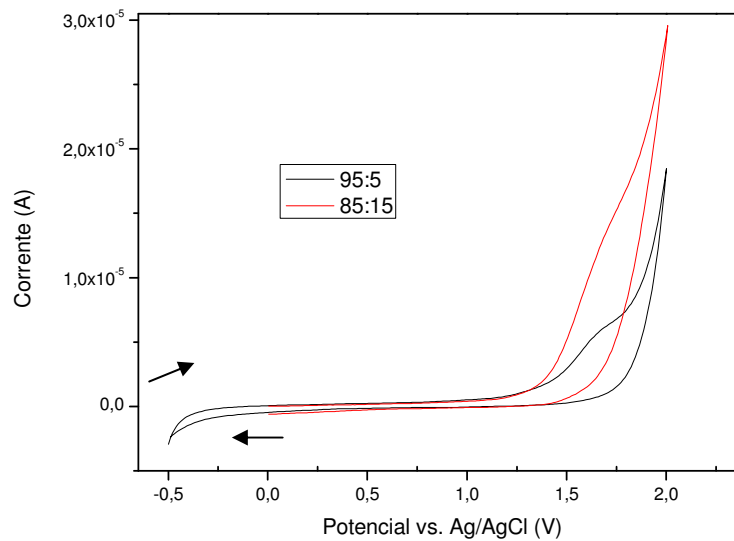


Figura 18: Voltamogramas de LSD a $6,24 \cdot 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ diluído em acetonitrila em um sistema de NH_4ClO_4 $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ em metanol e água, nas proporções de 85:15 v/v e 95:5 v/v, eletrodo de carbono vítreo e velocidade de varredura 10 mV s^{-1} .

Optou-se em trabalhar com a proporção 95:5 v/v de NH_4ClO_4 $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ em metanol e água para as medidas, prosseguindo-se os estudos com esta proporção. A diferença no perfil voltamétrico pode ser explicado pela maior presença de eletrólito de suporte para condução da reação.

Ao se realizar os testes de interferência da matriz de amostra, a fim de verificar a especificidade, identificou-se que a uma mesma concentração de LSD tem-se uma diferença considerável entre os sinais ao se alterar o solvente para a diluição de amostra, principalmente quanto à sua resolução. A Figura 19 ilustra os voltamogramas cíclicos obtidos para uma adição de $80 \mu\text{L}$ de LSD em concentração de $50 \mu\text{g g}^{-1}$ utilizando-se acetonitrila (solvente presente na ampola do padrão da substância) e o branco de amostra (metanol:água 1:1 v/v). No primeiro caso, o valor de concentração é igual a $6,23 \cdot 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ e com o segundo solvente, tem-se $7,21 \cdot 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$.

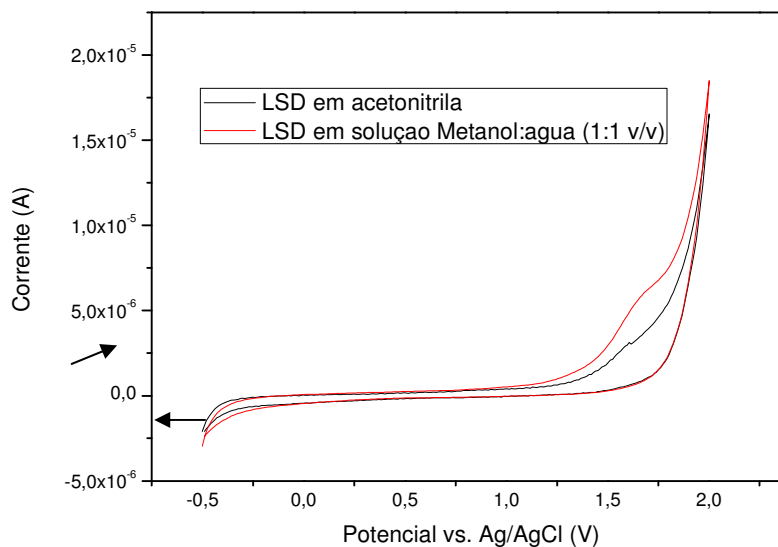


Figura 19: Voltamogramas comparando o sinal de 80 μ L de LSD a 50 μ g g⁻¹ ao ser diluído em diferentes solventes; meio na proporção de 95:5 v/v de NH₄ClO₄ 0,01 mol L⁻¹ em metanol e água; eletrodo de carbono vítreo e velocidade de varredura de 10 mV s⁻¹.

A curva analítica confeccionada para análise voltamétrica teve o uso da solução de branco de extração como solvente de diluição. Ao fazer esta mudança, considerou-se também a alteração da densidade da solução de branco para o cálculo da concentração de LSD em mol L⁻¹.

A acetonitrila tem densidade de aproximadamente 0,7867 g mL⁻¹, enquanto que a mistura de metanol:água na proporção 1:1 (v/v) foi determinada através do uso de picnômetro e constatou um valor de 0,9213 g mL⁻¹.

O potencial de pico anódico para o LSD foi por volta de 1640 mV. No caso de se utilizar a acetonitrila, este potencial tinha valor em torno de 1690 mV. Deste modo, há uma pequena diminuição no valor do potencial de pico para a molécula ao se modificar o solvente de diluição utilizado. Esta constatação somada a melhor definição da resposta voltamétrica, direcionaram os estudos de quantificação do LSD utilizando-se o solvente de extração no preparo das soluções de padrão diluídas. Para a determinação de LSD presente no meio, utiliza-se da curva de calibração, com respostas e relação linear representadas nas Figuras 20 e 21.

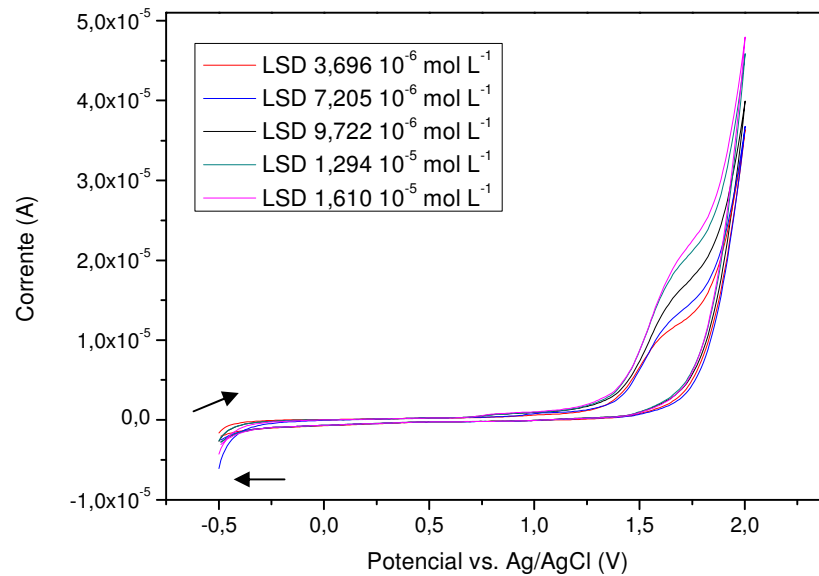


Figura 20 Voltamogramas referentes às sucessivas adições de LSD diluído em solução de branco de amostra, em sistema de 95:5 v/v de NH_4ClO_4 $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ em metanol e água. Eletrodo de trabalho de carbono vítreo e velocidade de varredura 10 mV s^{-1} .

Através da extrapolação da linha-base nos voltamogramas acima, os valores de corrente de pico foram estimados. As leituras foram realizadas em 5 repetições, estimando o desvio padrão (SD) de cada nível de concentração, que possibilita a montagem da curva analítica da Figura 21.

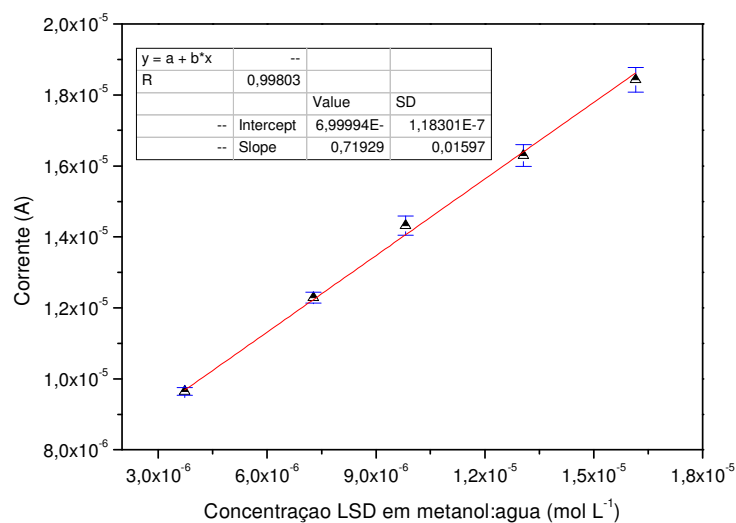


Figura 21 : Curva analítica obtida a partir dos valores de corrente de pico dos voltamogramas (e os respectivos desvios padrões para cada medida) para adições de LSD diluído em solução de branco de amostra.

Através da curva analítica extrapolada, tem-se que a equação que descreve a corrente em função da concentração de LSD é $I_{pa} = 0,726 \text{ A [LSD]} + 6,999 \cdot 10^{-6}$, com LD e LQ iguais a $5,38 \cdot 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ e $1,62 \cdot 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$. Neste caso o coeficiente de linearidade foi igual a 0,9980.

Leituras com concentração de LSD de $1,98 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ mostram que o aumento do sinal já não é mais proporcional, o que indica uma possível saturação do sinal analítico, alcançando o limite máximo da faixa linear.

Ao se utilizar a acetonitrila como solvente de diluição da solução de padrão para a adição na célula eletroquímica, trabalhou-se com uma linearidade de 0,9696 e sendo os valores de LD e LQ calculados iguais a $1,92 \cdot 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ e $6,37 \cdot 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$, respectivamente. O coeficiente de linearidade obtido foi abaixo do apresentado na curva analítica exposta na Figura 21.

A diluição realizada utilizando-se a solução de branco de amostra mostrou além de sinais voltamétricos com melhor resolução, melhor linearidade e valores de LD e LQ mais baixos, o que torna a metodologia mais adequada para a quantificação de LSD.

Uma vez conhecida o melhor desempenho do solvente de branco para a dissolução das soluções de padrão, prosseguiu-se as leituras para explorar como a resposta se dá neste sistema voltamétrico. O estudo de velocidade foi realizado com a intenção de obter mais informações acerca do mecanismo de reação que impera sobre o sinal observado do LSD. Fixou-se a concentração de $1,31 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ e variaram-se as velocidades de varredura, conforme a Figura 22 exhibe.

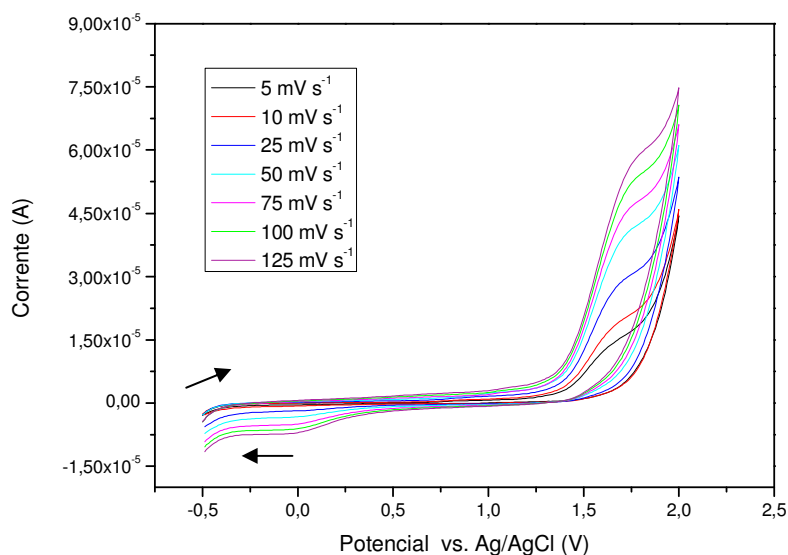


Figura 22: Voltamogramas referentes às variações de velocidades de varreduras na presença de LSD em concentração de $1,31 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ diluído em metanol:água 1:1 (v/v) utilizando-se NH_4ClO_4 $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ em metanol:água 95:5 (v/v).

Observa-se que em velocidades de varreduras maiores, há um sinal catódico em aproximadamente 0,0 V. Não foi constatada uma mudança neste pico proporcional à variação da concentração de LSD no sistema, não servindo, portanto como uma medição quantitativa da droga. Esta resposta catódica serve como informação para analisar um dos parâmetros abordados no estudo sobre o tipo de mecanismo de reação que ocorre.

A respeito da resposta oxidativa que o LSD apresentou, realizou-se uma série de análise a partir de parâmetros apresentados na Tabela 09, adaptada da literatura ^[87]. Ao se variar a velocidade de varredura, pode-se obter os dados que compuseram os gráficos que estão representados nas Figuras 23a a 23d.

Tabela 09: Resumo sobre as características observadas para os mecanismos de reação a serem elucidados a partir de um voltamograma cíclico. (adaptado da referência ^[87])

Mecanismo	E_p com v	ΔE_p (mV)	I_p oxid vs. $v^{1/2}$	I_p red/ I_p oxid	Observação
Transferência rápida de elétron	Não varia	$57/n$	Cte.	1	Difusão
Transferência lenta de elétron	Varia	$57/n$	Cte.	1	Transferência de elétron
Transferência de elétron irreversível	Varia	Sem pico de volta	Cte.		
Transferência de carga seguida de etapa química reversível	Varia	---	Cte.	1 a menor velocidade. Diminui com maior velocidade	Mecanismo EC
Transferência de carga seguida de etapa química irreversível	Varia	Sem pico de volta em baixa velocidade	Cte.	<1 a velocidade baixa; tende a aumentar com velocidade	Mecanismo EC
Etapa química irreversível precede transferência de elétron	*	---	Diminui com velocidade	<1 a velocidade baixa; aumenta com velocidade	Mecanismo CE

E_p = potencial de pico; v = velocidade de varredura; I_p oxi = corrente de pico de oxidação; I_p red = corrente de pico de redução * = varia na direção oposta; n = número de elétrons; cte = constante.

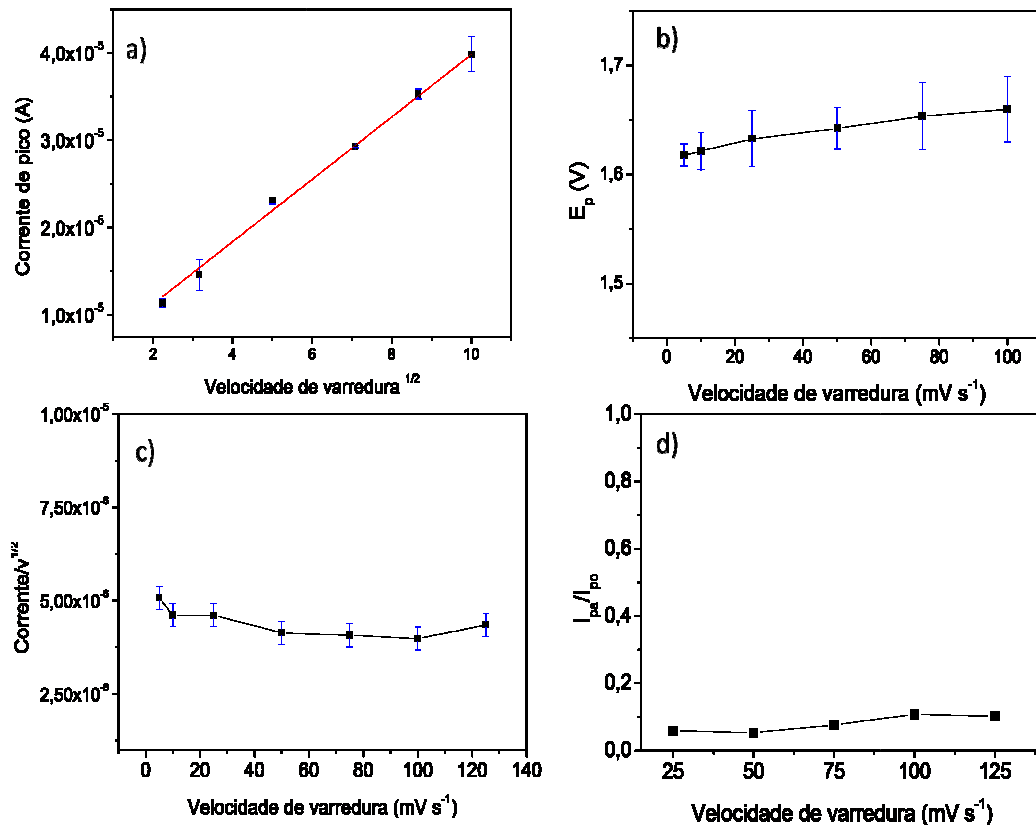


Figura 23: Estudo sobre os resultados de corrente de pico ao se variar a velocidade de varredura com concentração de LSD utilizada em $9,82 \cdot 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ para as medidas em Voltametria Cíclica com eletrodo de carbono vítreo: a) Relação entre a corrente de pico e a raiz da velocidade de varredura, em $(\text{mV s}^{-1})^{1/2}$; b) Variação do potencial de pico (E_p) com a velocidade de varredura; c) Variação da razão corrente de pico/raiz da velocidade de varredura com a velocidade de varredura; d) Variação da razão entre as correntes de pico anódica e catódica com a velocidade de varredura (em mV s^{-1}).

Ao relacionar o valor da corrente de pico com a raiz quadrática da velocidade de varredura há uma relação linear (Figura 23a), cujo coeficiente de linearidade obtido foi de 0,9909 para uma relação de $I_p(\mu\text{A}) = 4,044v^{1/2}(\text{mV s}^{-1}) + 1,888$. De acordo com a Equação de Randles Sevcik, a relação entre essas duas variáveis caracteriza a difusão como sendo o fenômeno de transporte que rege todo o sistema.

$$I_p = 0,4463(\text{nF})^{3/2}(\text{RT})^{-1/2}a\text{CD}_0^{1/2}v^{1/2}$$

Da equação acima, tem-se que I_p como a corrente de pico, n é o número de elétron envolvido na reação, F , R and T são respectivamente as constantes de Faraday, constante dos

gases e temperatura. a é a área eletroativa do eletrodo de trabalho e C é a concentração do analito em solução, D_0 é o coeficiente de difusão relativo à espécie eletroativa e v é a velocidade de varredura.

A linearidade entre corrente a corrente de pico com os valores de velocidade caracterizaria um processo de adsorção do analito à superfície do eletrodo. Para o sistema analisado, constatou-se que o coeficiente de ajuste linear entre essas duas variáveis teve um valor de 0,9668. Tal fato seria também verificado caso ocorresse diminuição da intensidade de sinal em leituras sucessivas, sem a renovação da superfície do eletrodo.

Os gráficos ilustrados na Figura 23b a Figura 23d são transcrições das relações que a Tabela 9 mostra. Observando as respostas obtidas, é possível prever qual o tipo de mecanismo que se tem em torno da reação eletroquímica. Na Figura 23b tem-se uma tendência de aumento da relação entre o potencial de pico anódico e a velocidade de varredura. [87-89]

Para observar se houve mudança no valor de corrente de pico com a velocidade de varredura, expressou-se a razão da intensidade de corrente com a raiz de velocidade de varredura frente à diferentes valores desta variável e na Figura 23c tem-se valores praticamente constantes. Os valores da fração calculada para a primeira variável variaram entre $4,0110^{-6}$ a $4,62 \cdot 10^{-6} \text{ A s}^{1/2} \text{ mV}^{-1/2}$ com um erro na medição de $3,08 \cdot 10^{-7}$. Ao se considerar esta incerteza de medição, tem-se que esses valores são praticamente constantes. [87-89]

O cálculo da razão de corrente catódica com a anódica foi realizado a partir da velocidade de varredura de 25 mV s^{-1} , pois abaixo desta, não é possível observar este sinal referente à redução. Constata-se que os valores dessas divisões estão muito abaixo de 1,0, porém há uma tendência de aumento em velocidades mais rápidas (Figura 23d). Pelas observações constatadas nos gráficos da Figura 24, tem-se caracterizado um mecanismo do tipo EC, com uma transferência de carga seguida por uma reação química irreversível. [87-89]

Estudos futuros, como a realização de uma eletrólise seguida de uma técnica de Cromatografia Gasosa acoplada de Espectrometria de Massa, permitirá elucidar acerca do produto formado neste processo eletroquímico.

Por fim, uma comparação entre a metodologia proposta e aquelas reportadas na literatura mostra-se de grande importância. Assim como no estudo mais recente do LSD [54],

tem-se o fenômeno de difusão caracterizando a interação entre o analito e o eletrodo, e o mecanismo EC ditando a cinética eletroquímica. É interessante observar que o uso de e concentração mais elevadas de eletrólito de suporte não atingiu também o resultado esperado, ou seja, picos com melhor resolução.

Ampliando-se esta análise com outros artigos, o uso de carbono vítreo como eletrodo de trabalho e de sais de perclorato (perclorato de lítio, perclorato de amônio e perclorato de tetrabutilamônio) se mostraram como eficientes em todos os casos. Tem-se na Tabela 10 um comparativo entre metodologia e resultados em cada um dos casos.

Tabela 10: Comparativo entre as metodologias atual e da literatura.

Procedimento	Atual	Inczefy, <i>et al</i> [55]	Merli <i>et al.</i> [54]
Analito	LSD	Ácido lisérgico	LSD
Eletrólito de suporte	NH ₄ ClO ₄	LiClO ₄	(Bu ₄ N)ClO ₄
Solvente	Metanol:água	Acetonitrila	Dimetilformamida
Potencial de pico anódico	1640 mV	800 mV	913 mV, 1139 mV
Mecanismo	EC	Irreversível	EC

Ambas as referências propõem uma reação de dimerização como produto da oxidação ocorrendo na estrutura indólica da molécula. O procedimento recentemente proposto por Merli *et al.* [54] obtém dois picos anódicos e um catódico em que todos são proporcionais à quantidade de LSD presente no meio, e sendo este sinal do processo de redução observado também apenas a maiores valores de velocidade de varredura.

Na metodologia proposta no presente trabalho, é possível utilizar-se apenas de um sinal anódico para relacionar com a presença do LSD. Em todos os trabalhos, o uso de solvente orgânico junto a um sal de perclorato se mostraram como fatores em comum para obter uma resposta voltamétrica.

4.3.2. Parâmetros de validação em Voltametria Cíclica

Para o teste de seletividade (Figura 24) utilizou-se da leitura de uma mesma concentração de LSD diluído com a solução de extração (branco de amostra) comparando-se com a mesma mistura de metanol: água usada na extração de selos cuja ausência de LSD era de conhecimento prévio a partir dos espectros de massa.

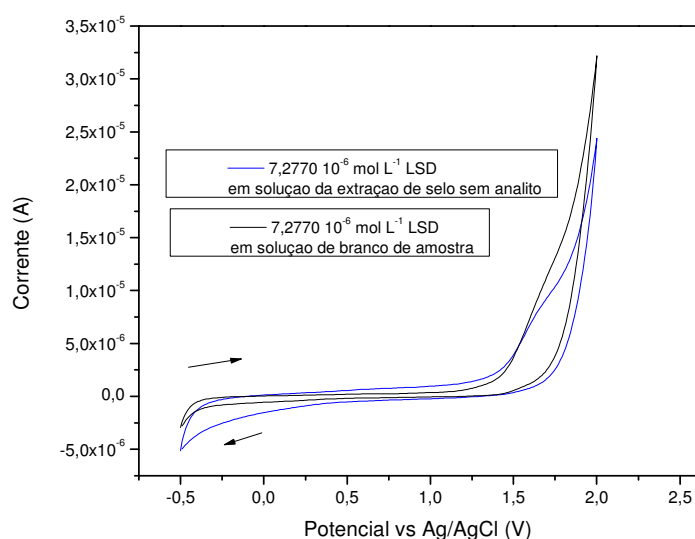


Figura 24: Comparação de voltamogramas para o teste de seletividade; eletrodo de carbono vítreo e velocidade de varredura de 10 mV s^{-1} .

A razão obtida entre as variâncias das medidas nas duas condições (com solução de extração de selo sem analito e com solução do branco de amostra) foi igual a 2,96. O valor de F_{tabelado} é em 4,28 (para quando se utiliza de 7 repetições) e como $F_{\text{calculado}}$ é menor que o F_{tabelado} , tem-se que a não influência da matriz sobre a precisão do método.

O cálculo do limite de repetitividade para cada nível resultou nos seguintes valores: $3,041 \cdot 10^{-7} \text{ A}$ (ponto 1), $4,194 \cdot 10^{-7} \text{ A}$ (ponto 2), $7,521 \cdot 10^{-7} \text{ A}$ (ponto 3), $8,498 \cdot 10^{-7} \text{ A}$ (ponto 4) e $9,002 \cdot 10^{-7} \text{ A}$ (ponto 5). Ou seja, tais valores representam as variações toleradas nas medidas de corrente de pico para a respectiva concentração.

A Tabela 11 reúne os valores para os parâmetros analíticos descritos ao utilizar o carbono vítreo como material de eletrodo de trabalho. No caso do grafite, observou-se que sua aplicação em rotinas de análises não é vantajosa devido aos altos valores de limites de

detecção e quantificação que são acima às concentrações de LSD obtidas após sua extração em selos.

Tabela 11: Valores dos parâmetros analíticos para a validação de metodologia para a Voltametria Cíclica utilizando-se eletrodo de carbono vítreo.

	Valores
LD	$5,38 \cdot 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$
LQ	$1,62 \cdot 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$
Precisão (Desvio Padrão Relativo)	1,52%
Limite de repetitividade (r)	$3,041 \cdot 10^{-7} \text{ A}$ a $9,002 \cdot 10^{-7} \text{ A}$ Média $6,02 \cdot 10^{-7} \text{ A}$
Precisão intermediária (interdias)	3,37%
Linearidade	0,9980
Sensibilidade	$0,726 \text{ A L mol}^{-1}$
Recuperação	91,89%
Faixa de trabalho	$1,62 \cdot 10^{-6}$ a $1,98 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$

Através dos parâmetros analíticos, tem-se por fim uma metodologia cuja capacidade de detectar e quantificar o LSD em amostras apreendidas atingem os valores de concentrações de analito geralmente encontrados.

Dentro do cenário de validação de metodologias, tem-se a importância de ensaios de proficiência entre diferentes de laboratórios, o que não foi possível realizar neste projeto. Esses resultados oriundos de ensaios interlaboratoriais permitem o cálculo de outros parâmetros e por fim, uma validação completa.

4.4. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

4.4.1. Análise de resultados

As primeiras análises foram realizadas em coluna C18 com fase móvel composta de acetato de amônio dissolvido em água (pH desta solução de 5,07) junto a uma mistura de metanol e acetonitrila (75:25 v/v) na proporção 1:1 v/v. Posteriormente utilizou-se como fase móvel o acetato de amônio em água com trietilamina (até a obter um pH de 7,38) e acetonitrila na proporção 70:30 v/v. Essas metodologias já foram reportadas na literatura para análise de LSD em amostras biológicas e em amostras apreendidas, porém, em estudos limitados à detecção por UV VIS, sem ainda explorar um possível sinal vindo da detecção eletroquímica.^[36,66]

Analisando-se os cromatogramas obtidos, optou-se pela mudança para a coluna Gold Amino, em que seu caráter mais polar em relação à coluna C18 se mostrou favorável para a análise do LSD. A Figura 25 compila todas as primeiras tentativas realizadas para a determinação eletroquímica do LSD, em diferentes possibilidades, e a ausência de resposta para essas condições levaram a uma mudança na estratégia para o desenvolvimento de metodologias neste tipo de detector.

Além da fase estacionária utilizada, sabe-se que a ausência de sinal também é devida a uma não adequação das soluções que compõem a fase móvel como eletrólito de suporte para que a reação eletroquímica ocorra.

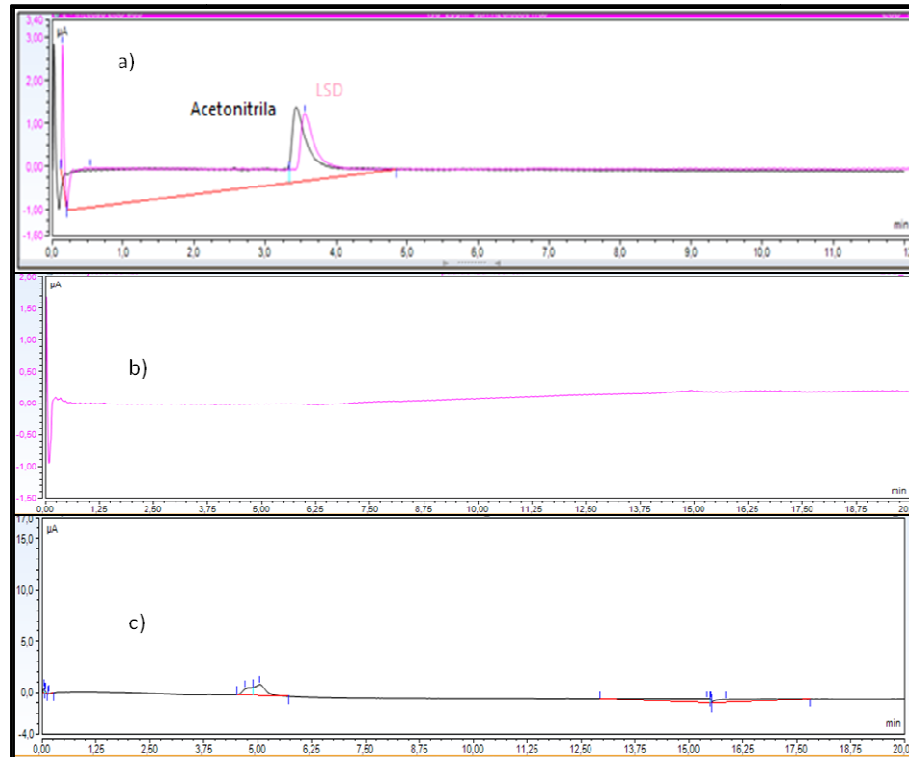


Figura 25: Cromatogramas do LSD em detector eletroquímico a 800 mV: a) fase móvel acetato de amônio e metanol e acetonitrila (75:25) – 1:1 v/v - pH 5,07 com coluna C18; fluxo $0,7 \text{ mL min}^{-1}$ e injeção $50 \mu\text{L}$. b) fase móvel acetato de amônio e trietilamina pH 7,38 e água 70:30 e coluna Gold Amino; fluxo $0,7 \text{ mL min}^{-1}$ e injeção $50 \mu\text{L}$. c) fase móvel acetato de amônio e metanol e acetonitrila (75:25) – 1:1 v/v - pH 5,07 com coluna C18; fluxo $0,7 \text{ mL min}^{-1}$ e injeção $50 \mu\text{L}$.

Como dito anteriormente, este conjunto de dados fez parte da primeira estratégia adotada para o desenvolvimento de novas metodologias de análise cromatográfica com detecção eletroquímica. Resolveu-se focar em uma segunda estratégia de desenvolvimento de análise em cima de outros trabalhos publicados em literatura sobre a análise cromatográfica de LSD.

Com base nas informações levantadas na literatura ^[69,70], estabeleceu-se como fase móvel o NH_4ClO_4 $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ em metanol e água e a presença de acetonitrila para a análise de LSD. A literatura reporta o uso de NH_4ClO_4 em metanol nesta concentração para a análise de drogas alcaloides (ou seja, não específico para o LSD) em matriz de urina e priorizando a detecção por fluorescência. Ainda tem-se a fase móvel sem nenhuma composição aquosa e a detecção eletroquímica realizada em eletrodo de carbono vítreo (sendo que este presente

estudo, as análises são desenvolvidas em eletrodo de grafite), além de coluna cromatográfica C8, diferente da utilizada neste trabalho, que é a Gold Amino.^[69,70]

Além disso, o uso do perclorato de amônio dentro de uma fase móvel com composição 100% em metanol como é reportado poderia implicar e complicações para a coluna em médio prazo. A presença de acetonitrila na composição auxiliaria em uma melhor definição dos picos, uma vez que este é o solvente presente nas soluções de padrão a serem injetadas.

As alterações realizadas neste procedimento experimental levam à verificação de figuras de mérito para a validação da metodologia proposta. Para a detecção em arranjo de diodo, foi estabelecido o comprimento de onda em 310 nm, já trabalhado na literatura^[63]. O processo de validação de amostras se revela como importante também ao se realizar alterações em condições experimentais.

Ao configurar a célula eletroquímica, verifica-se o valor de potencial a ser configurado em comparação ao potencial obtido na Voltametria Cíclica: o próprio fabricante estabelece uma correção de - 300 mV, ou seja, o potencial de 1590 mV, observado ao aplicar a técnica eletroanalítica ao migrar para um sistema cromatográfico deverá ser aproximadamente 1290 mV. Esta adaptação dos sistemas leva em conta a mudança do eletrodo de referência de uma célula eletroquímica com Ag/AgCl para o Paládio do sistema cromatográfico.

A presença de uma vazão, propulsionada pelo sistema de bombas, muda o mecanismo em relação à Voltametria Cíclica, pois se passa a ter um fator de convecção. Ao se trabalhar com detecção eletroquímica, comparou-se o sinal obtido ao condicionar a célula a 1250 mV e 1300 mV e optou-se em trabalhar com o primeiro potencial, pela melhor definição de sinal comprovada pelos valores do fator de alargamento, em que a 1300 mV tem-se o dobro que em 1250 mV.

Inicialmente, trabalhou-se uma mesma condição experimental para os dois tipos de detecção. Entretanto, no decorrer da otimização de metodologia, constatou-se que seria melhor desenvolver um procedimento para cada detecção.

Uma vez que o uso da composição de NH_4ClO_4 e água na proporção 95:5 (v/v) se mostrou com melhor desempenho nas leituras em Voltametria Cíclica, iniciou-se a leitura cromatográfica nesta mesma proporção. Assim como na medida voltamétrica, fez-se também a comparação do sinal ao se aumentar a quantidade de água na fase móvel (composição de fase orgânica e fase aquosa em 85:15 v/v), ilustrado na Figura 26.

A fim de se aproximar da composição orgânica da solução a ser injetada, incluiu-se a acetonitrila como parte da fase móvel, já que este é o solvente utilizado nas soluções de padrão comercial. Picos negativos pode ser consequência de diferenças nas composições da solução a ser injetada e da fase móvel. Iniciou-se as leituras considerando a proporção de NH_4ClO_4 em metanol:acetonitrila:água em 94:1:5 e 84:1:15.

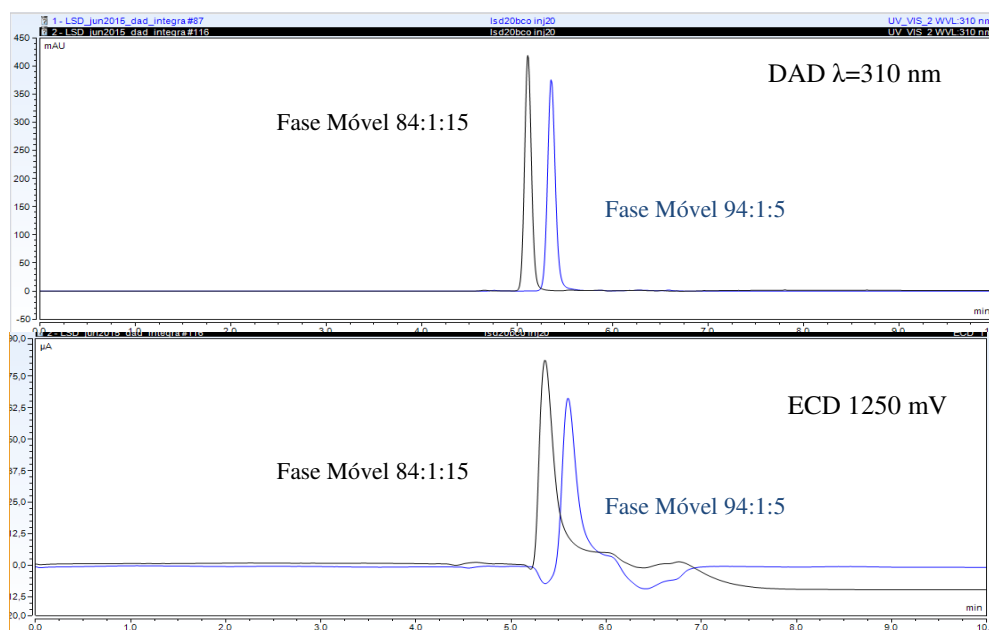


Figura 26: Cromatogramas com as detecções em arranjo de diodo e eletroquímico com injeção de 20 μL de LSD $4,86 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ dissolvido na solução de branco, variou-se a proporção da fase móvel entre NH_4ClO_4 :acetonitrila:água (amostrador a 10 $^{\circ}\text{C}$; coluna Gold Amino a 30 $^{\circ}\text{C}$; vazão 0,55 mL min^{-1}).

Observa-se que a mudança nesta proporção de solvente tem maior efeito resolução do pico com a detecção eletroquímica, em que o aumento na proporção de água elimina a variação da linha base anterior ao pico de interesse. No caso da detecção por arranjo de diodo, há uma diferença de aproximadamente 0,25 minutos entre os dois sinais, além de maior altura de pico. Este comportamento é explicado pela menor interação entre o analito e a fase estacionária, e a uma maior força de eluição da fase móvel.

Ao se aumentar a força eluente, mais rapidamente os solutos sairão da fase estacionária. Neste estudo, verifica-se que o aumento da proporção de um solvente polar (água), favoreceu a saída do soluto dentro de um sistema cromatográfico em que a coluna

cromatográfica tem caráter mais polar em relação a uma coluna C18, por exemplo, o que caracterizaria uma fase reversa.

A Tabela 12 expõe os valores de alguns parâmetros cromatográficos obtidos após a integração dos picos ilustrados na Figura 27. Mesmo em uma menor concentração de eletrólito de suporte presente no meio, a proporção 84:1:15 é mais favorável à detecção eletroquímica. Na proporção 94:1:5 a linha cromatográfica em forma de vale antes do pico e a cauda subsequente fazem com que o sinal não tenha uma boa definição.

Tabela 12: Comparação dos parâmetros cromatográficos para as duas detecções em duas composições de fase móvel distintas para LSD a $5.768 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ e volume de injeção $20 \mu\text{L}$.

	Fase Móvel 94:1:5		Fase móvel 84:1:15	
	DAD $\lambda=310 \text{ nm}$	ECD 1250 mV	DAD $\lambda=310 \text{ nm}$	ECD 1250 mV
Tempo de retenção	5,357 min		5,110 min	5,357 min
Área	36,8129 mAU*min	Parâmetros sem boa definição	35,7258 mAU*min	18,7498 $\mu\text{A} \cdot \text{min}$
Fator de assimetria	1,12		1,12	3,70
Altura	376,44 mAU		418,69 mAU	82,78 μA

Uma análise sobre os parâmetros mostra que não há uma diferença significativa entre os valores da área do pico cromatográfico obtido em DAD com as duas composições de fase móvel vistas, com uma diferença de aproximadamente 40 mAU a mais na altura frente à aproximadamente 1,1 mAU*min unidades menor de área para a composição de maior proporção de água.

Acerca da acidez da fase móvel, observa-se que ao trabalhar em uma faixa mais neutra, tem-se uma resposta com pico mais definido e não alargado. Ao testar uma composição com caráter mais ácido (pH aparente em 4,14), observa-se que o tempo de

retenção para o analito diminui em aproximadamente 1 minuto. Isto se deve à protonação do nitrogênio presente na fase estacionária e da própria molécula de LSD e por consequência, tem-se uma menor interação entre esses dois componentes, adiantando a saída da substância de interesse.

Além disso, não se verifica uma melhor definição do pico cromatográfico, o que finda que o aumento de acidez no meio que a fase móvel se encontra não beneficia a análise cromatográfica em nenhum dos dois detectores utilizados.

O pKa do LSD é igual a 7,8^[92] e a literatura já reportou sobre melhores resultados ao utilizar uma fase móvel com pH em aproximadamente 2 unidades abaixo do pKa da substância de interesse^[93]. Neste caso, tem-se o pH aparente no valor na faixa de 5,77 a 6,11 e sabe-se que se trata de uma estimativa de valor, uma vez que o eletrodo utilizado para a medição de pH não era específico para solventes orgânicos.^[94]

Resultados com valores de pH aparente em torno desta faixa de valor mostraram os cromatogramas com pico melhor definido e com menor alargamento. Ao se trabalhar com este valor de pH, tem-se todo o analito de interesse na sua forma não ionizada. A literatura também já reportou que o pH aparente em torno desses valores são mais indicados a serem trabalhados para a técnica de CLAE em detecção UV VIS, porém utilizou-se outro sal na composição de fase móvel.^[95]

Tal como foi avaliado nas medidas voltamétricas, verificou-se o desempenho do tipo de solução utilizada para a diluição do padrão comercial de LSD a ser injetado no cromatógrafo.

Assim como o estudo voltamétrico apontou, o uso da solução de extração (branco de amostra) como solvente de diluição do LSD, resulta em uma melhora no sinal, constatado nas duas detecções trabalhadas e apresentado na Figura 27.

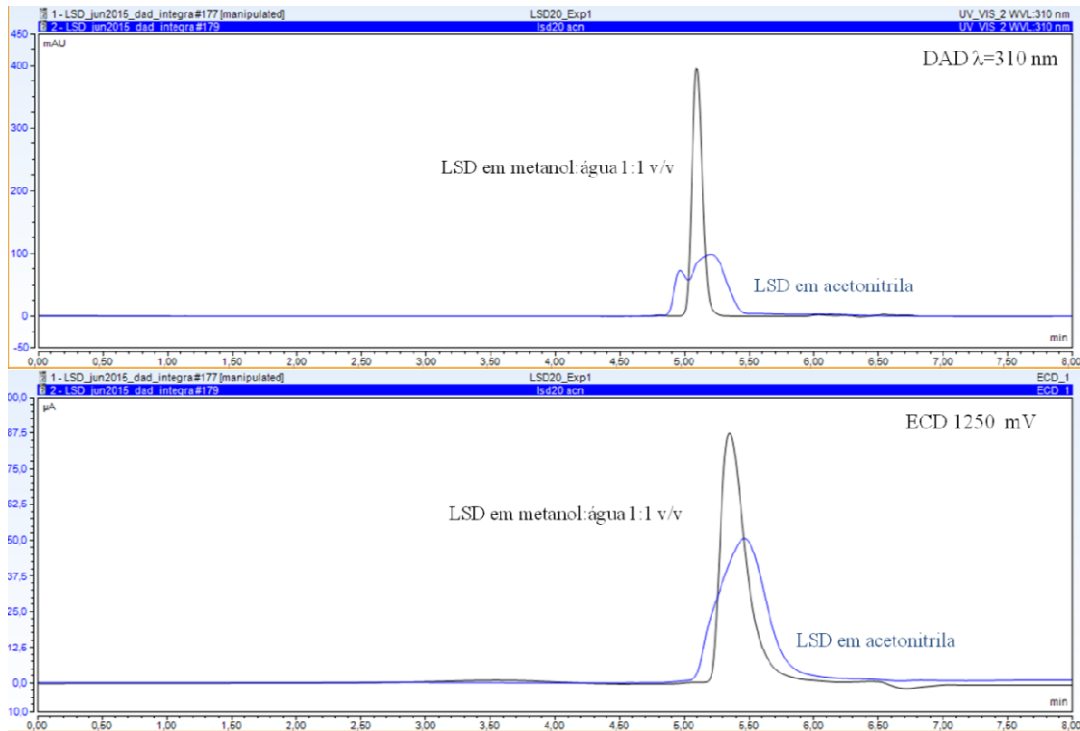


Figura 27: Comparação de cromatogramas obtidos para detecções por arranjo de diodo (λ 310 nm) e eletroquímico (1250 mV) para o LSD $20 \mu\text{g g}^{-1}$ diluído em acetonitrila e solvente de branco de extração. Injeção de $20 \mu\text{L}$, fase móvel NH_4ClO_4 em metanol:acetonitrila:água na proporção 81:4:15 v/v.

No caso do DAD, tem-se que áreas iguais a 37,9583 (altura 396,88 mAU) e 35,7427 mAU*min (altura 96,96 mAU) para os solventes de solução de extração e acetonitrila, respectivamente. Na detecção eletroquímica, ao se utilizar o branco de amostra tem-se a área em 19,7588 $\mu\text{A}\cdot\text{min}$ (altura 86,89 μA) e com a acetonitrila este valor é de 21,3549 $\mu\text{A}\cdot\text{min}$ (altura 49,71 μA).

Os valores das áreas dos picos cromatográficos foram dados para quando o LSD está em concentração de $20 \mu\text{g g}^{-1}$. Em acetonitrila (concentração $4,70 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$) o sinal é 6,63% menor que ao se utilizar a solução de extração de amostra (concentração $5,75 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$) na detecção por arranjo de diodos. No caso da detecção eletroquímica, esta diferença fica em torno de 8,36%, sendo o uso de acetonitrila responsável por um atraso no tempo de retenção em 0,13 minutos aproximadamente.

Apesar da proximidade dos valores de áreas cromatográficas obtidas em DAD, as alturas para os sinais correspondentes a cada solvente são muito diferentes. Como consequência, tem-se que os parâmetros de cálculo de fator de alargamento em menores

dimensões, obtendo assim um resultado menor, sendo este o perfil de maior interesse para um sinal cromatográfico.

A ocorrência de picos cromatográficos menos largos ao se utilizar a mistura de metanol e água para a diluição do padrão de LSD pode ser atribuída à maior polaridade que esta solução tem em relação à acetonitrila. Assim como o uso de uma fase móvel com mais água favorece a saída do analito, a sua diluição nesta solução de extração permite uma menor interação com a fase estacionária.

Ao obter um sinal cromatográfico, é de grande importância verificar a melhor definição do sinal, o que implica em picos com maior altura, ausência de pico duplo e menor assimetria. Um menor alargamento do pico implica diretamente no fator de alargamento e assimetria do sinal e a disposição de dois picos como são ilustrados na Figura 27 levam a uma baixa resolução de sinal.

Tais características de menores alargamento e assimetria são constatadas ao se utilizar a mistura de álcool e água para a diluição do padrão, optando-se em trabalhar com este solvente mesmo que as diferenças nos valores de área ainda não sejam significativas.

A presença do pico duplo no cromatograma em DAD (Figura 26 e 27) pode ser explicada pela maior interação entre o analito e a fase estacionária. Uma eluição mais rápida ou uma menor quantidade de sítios de interação podem favorecer a definição do sinal. Assim, ao aumentar o fluxo para $0,7 \text{ mL min}^{-1}$ e diminuir o volume de injeção pela metade, tem-se tal problema resolvido.

Deste modo, ao se diminuir o volume de injeção, este pico duplo desaparece. Contudo, trabalhar com um volume de injeção de $10 \mu\text{L}$ levou a uma curva analítica com menor coeficiente de linearidade e menor sensibilidade. Tais informações junto LD e LQ em concentrações acima da faixa de concentração de LSD encontrada nos selos tornam a metodologia não ideal para análise.

Com base nessas observações, adotou-se o uso da solução de extração de amostra como solvente de diluição para as soluções de padrão de LSD, pois tem-se a eliminação do pico duplo sem prejudicar os parâmetros analíticos, conforme será apresentado a diante.

Acerca da escolha da temperatura para condicionar as soluções no amostrador automático do equipamento, teve-se como base a degradação do LSD quando exposto a temperaturas acima de 30°C^[80,92].

4.4.2. Detecção por Arranjo de Diodo

A absorção na região do UV da molécula de LSD se deve às insaturações presentes nas suas ligações, sendo então a estrutura aromática presente como a principal responsável pela resposta neste detector.^[96]

Sobre o uso do detector de arranjo de diodo, recomenda-se o uso de NH_4ClO_4 0,01 mol L^{-1} em metanol como fase móvel para análise deste analito, porém a literatura pontua o uso de detector de fluorescência com melhor desempenho e não há registros de estudos com variações na metodologia a fim de otimizar o sinal.^[01]

Conforme já foi mencionado, o processo de validação também engloba as alterações que são realizadas em uma dada metodologia. Assim, a verificação das figuras de mérito ao utilizar o DAD é fundamentada na modificação das condições experimentais, tais como a coluna e a composição da fase móvel. A literatura retrata o uso de uma coluna C8 com uma fase móvel 100% orgânica, o que vai de encontro às recomendações do fabricante sobre a utilização de uma pequena porcentagem de água quando se trabalha com solução tampão, visando preservar melhor a coluna.

Partiu-se da informação acerca do comprimento de onda de absorbância da molécula, cujo valor é de 310 nm, utilizado em outras metodologias^[66]. Ao trabalhar com a detecção em arranjo de diodo, pode-se ter informação sobre uma varredura de espectro, à medida que os compostos são eluídos da coluna. Na Figura 28 tem-se o registro do espectro obtido para a solução de padrão de LSD, com o comprimento de onda de 312 nm com maior intensidade de absorbância (desconsiderando a absorbância proveniente do solvente, em torno de 200 nm).

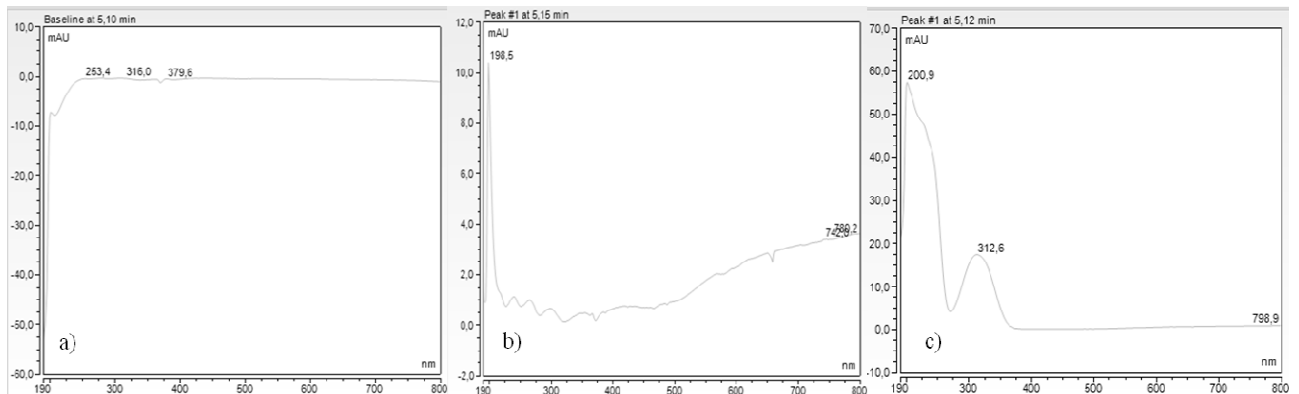


Figura 28: Espectros obtidos na faixa do UV VIS para a) acetonitrila; b) solução de branco de amostra; c) solução de padrão de LSD $1\mu\text{g g}^{-1}$ diluída em solução de branco de amostra.

Desta maneira, para o composto que eluiu aos 5,12 minutos tem-se a sua varredura em todos os comprimentos de onda de UV e visível e constata-se a sua maior absorvância em 312,6 nm. Esta informação com o espectro da solução de padrão de LSD é de importante posteriormente, pois se tem mais um parâmetro para comparação das amostras.

Já foi exposto que o uso de fase móvel contendo as proporções de solvente orgânico e água em 95:5 e 85:15 dão resultados cujos parâmetros cromatográficos são próximos (ver Figura 26) ocorrendo um adiantamento no tempo de retenção ao se utilizar uma maior quantidade de água.

Ao se considerar as constatações realizadas anteriormente acerca do uso de solução de extração de amostra como solvente para diluição do padrão de LSD, foi possível determinar as curvas analíticas.

O desenvolvimento de curva analítica se deu em ambas as condições propostas. Posteriormente, verificou-se a sensibilidade e linearidade de cada caso para avaliar a melhor metodologia a ser aplicada. Ao utilizar a composição de fase móvel com menor proporção de água, cuja curva está representada na Figura 29, foi possível obter resultados mais satisfatórios.

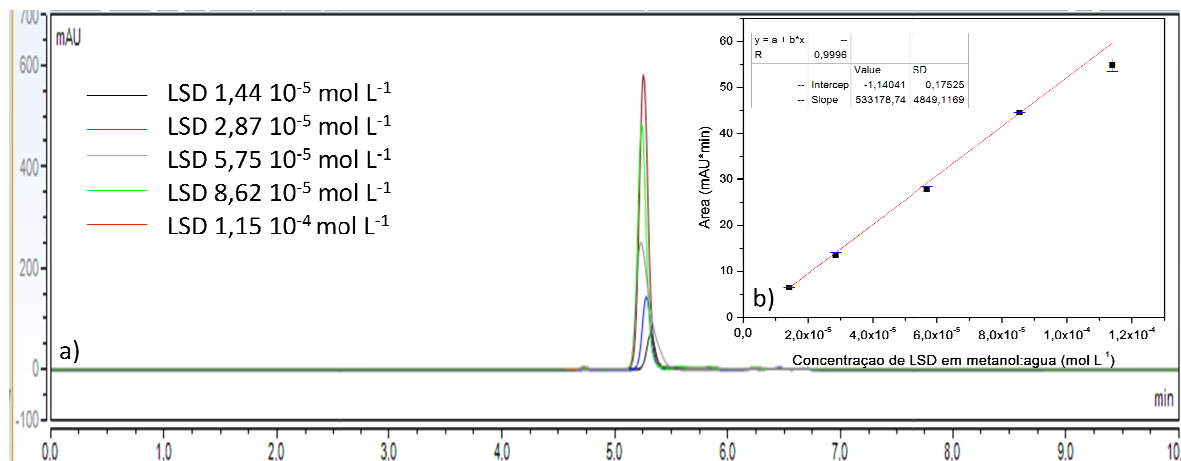


Figura 29: a) Cromatogramas das concentrações de LSD para a determinação da curva analítica. b) Curva analítica obtida ao se utilizar de CLAE com detecção de arranjo de diodos a $\lambda = 310$ nm, fase móvel NH_4ClO_4 :acetonitrila:água em 94:1:5 (v/v/v) a $0,60 \text{ mL min}^{-1}$; injeção $20 \mu\text{L}$; Desvios padrão de cada medida estão reportados no gráfico.

Em concentrações de LSD acima de $1,15 \cdot 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, observa-se que há uma saturação do sinal do detector, estabelecendo desta maneira o limite máximo a ser trabalhado nesta metodologia.

A relação linear entre a área de pico cromatográfico e a concentração de LSD pode ser expressa pela equação $A_{\text{sinal}} = 533178,74 [\text{LSD}] - 1,4041$, sendo A_{sinal} , a área em $\text{mAU} \cdot \text{min}$ e a concentração de LSD em mol L^{-1} . A sensibilidade obtida ao se condicionar a fase móvel como 94:1:5 de NH_4ClO_4 em metanol:acetonitrila:água foi de $533178,74 (\text{mAU} \cdot \text{min}) \text{ L mol}^{-1}$, enquanto que a composição em 84:1:15 mostrou a curva com este parâmetro igual a $452281,41 (\text{mAU} \cdot \text{min}) \text{ L mol}^{-1}$.

A linearidade para ambas as condições foram bem próximas, com coeficientes de correlação linear de 0,9997 e 0,9906 para respectivamente, as condições com maior e menor proporção de solvente orgânico.

Dentro da composição orgânica, a condição inicial com acetonitrila em 94:1:5 da proporção NH_4ClO_4 em metanol:acetonitrila:água se mostrou satisfatória, uma vez que não há a presença de “picos negativos”, o que poderia interferir no valor da área de integração do sinal.

Buscando otimizar o tempo para análise, a condição experimental em 85:15 de composição orgânica:água poderia ser utilizada para a quantificação de LSD em selos e deste

modo, viabilizaria uma mesma metodologia aplicada a dois tipos de detecção que estão conectados em série no equipamento.

Para esta condição experimental, ter-se-ia uma fase móvel com NH_4ClO_4 $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ em metanol:acetonitrila:água na proporção 81:4:15. Entretanto, no caso da análise em DAD, cabe ressaltar que ao se adotar este procedimento, não se tem os melhores valores de sensibilidade e a linearidade.

4.4.3. Detecção eletroquímica

Conforme foi exposto anteriormente, a detecção eletroquímica em sistemas de CLAE já foi reportada na literatura ^[69,70] porém em uma metodologia não específica para drogas alcaloides em matriz biológica. A partir deste estudo, aproveitou-se a informação sobre a composição de eletrólito de suporte a ser utilizado no presente trabalho.

As análises voltamétricas acabaram por auxiliar na determinação de potencial a ser trabalhado, bem como no tipo de sinal – anódico - a ser observado. Fixado esses itens, trabalhou-se na otimização de metodologia, observando principalmente a melhor definição de sinal obtida.

A Figura 26 já demonstra que a detecção eletroquímica requer que os estudos sejam realizados em fase móvel na composição orgânica:água em 85:15. No caso da proporção 95:5, a integração dos picos cromatográficos está sujeita a maiores erros, apesar de os estudos voltamétricos apontarem voltamogramas com melhor definição de sinal para este caso.

Em uma primeira etapa, procurou-se manter o sinal cromatográfico mais constante em torno do pico de resposta ao LSD. Assim, o “pico negativo” foi eliminado ao aumentar a proporção de acetonitrila presente na fase móvel, ou seja, a proporção entre NH_4ClO_4 em metanol:acetonitrila:água obedeceu a divisão 81:4:15.

No caso da detecção por arranjo de diodo, esta quantidade de acetonitrila foi menor, trabalhando-se na composição de 94:1:5. O aumento deste solvente na composição da fase móvel não implicou em cromatogramas com pico mais definido. Desta forma, apresenta-se na Figura 30 a curva analítica obtida para o LSD.

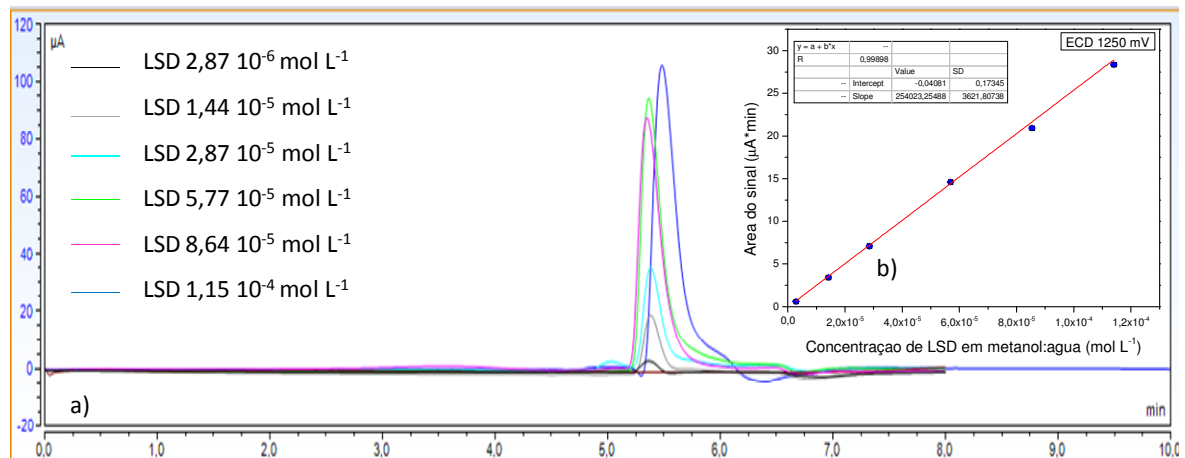


Figura 30: a) Cromatogramas das concentrações de LSD para a determinação da curva analítica. Curva analítica obtida ao se utilizar de CLAE com detecção eletroquímica a 1250 mV, fase móvel NH_4ClO_4 :acetonitrila:água em 81:4:15 (v/v/v) a $0,55 \text{ mL min}^{-1}$; injeção $20 \mu\text{L}$; Desvios padrão de cada medida estão reportados no gráfico.

A curva analítica dada pela Figura 30 para a detecção eletroquímica mostra o desvio padrão em valores muito baixos, boa linearidade e um limite de quantificação de $6,828 \cdot 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$, inferior à concentração mais baixa encontrada em selos. A relação entre o sinal observado e a concentração de LSD é descrita pela equação $A_{\text{sinal}} = 260311,909[\text{LSD}] - 0,1119$ sendo A_{sinal} , a área em $\mu\text{A} \cdot \text{min}$ e a concentração de LSD em mol L^{-1} .

Ao se realizar medições em concentrações de LSD iguais a $1,44 \cdot 10^{-4}$ e $1,63 \cdot 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, não há mais a mesma linearidade encontrada na curva analítica, o que leva a restringir a medida para até $1,15 \cdot 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, que é o último ponto da curva.

Uma comparação entre os dois tipos de detecção mostra que o sinal eletroquímico apresenta maior largura e o valor de área menor. Por fim, a diferença entre os tempos de retenção do LSD com o detector DAD e o eletroquímico é de aproximadamente 0,2 minutos. Esses dois detectores estão conectados em série no equipamento o que faz com que dentro de uma corrida cromatográfica rápida de 10 minutos, em menos de 30 segundos é possível ter duas respostas específicas para o analito oriundas de fontes diferentes de sinal.

4.4.4. Validação de metodologia CLAE com DAD e ECD

Em ambas as detecções, utilizou-se uma solução de LSD de concentração $8,64 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ (equivalente à solução de LSD em $20 \mu\text{g g}^{-1}$) para fins de controle de qualidade e ensaio de recuperação. Acerca deste parâmetro, os valores obtidos foram 100,87% (DAD) e 95,98% (ECD), o que leva a constatação de o primeiro detector ser mais exato que o último.

Ao se analisar concentrações de $1,42 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ e $1,71 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, seus sinais correspondentes não obedecem ao perfil de linearidade em ambas as detecções. Desta forma, garante-se que a metodologia seguirá a equação proposta para até uma concentração de LSD de $1,14 \cdot 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, o que equivale a aproximadamente 221 μg da droga presente em um selo.

Lembrando-se que a quantidade geralmente encontrada nas amostras apreendidas pela polícia varia de 20 μg a 150 μg , pontua-se a aplicabilidade das metodologias desenvolvidas para as duas detecções junto ao sistema CLAE à realidade encontrada nas apreensões de drogas.

O cálculo do limite de repetitividade permite definir as variações das medidas que podem ser admitidas para as repetições de uma medida em um nível da curva analítica e é determinado através do cálculo apresentado na Parte Experimental. No caso da detecção por arranjo de diodo, tem-se que esta variação parte de 0,0281 mAU*min (Ponto 1); 0,0984 mAU*min (Ponto 2); 0,3466 mAU*min (Ponto 3); 0,4985 mAU*min (Ponto4) e 1,1477 mAU*min (Ponto5).

Com a detecção eletroquímica, os valores de limite de repetitividade para o primeiro ao sexto ponto foram, respectivamente, em $\mu\text{A} \cdot \text{min}$: 0,0651, 0,1070, 0,1598, 0,1534, 0,1782, 0,2115. Maiores variações são admitidas em maiores concentrações. Esses valores permitiram estabelecer melhor a precisão entre as replicatas para as leituras de uma solução em um dado nível de concentração na confecção da curva analítica.

A análise da robustez dos métodos foi feita utilizando-se o Teste de Youden, que permite analisar o quanto cada variável imposta ao sistema estudado pode interferir no resultado final obtido. Apresentam-se na Tabela 13 os valores de área para cada experimento proposto, de acordo com as diferentes combinações que estão no Quadro 02, relacionando os

parâmetros apresentados nas Tabelas 04 e 05. Posteriormente, a Tabela 14 mostra os resultados após realizar o cálculo proposto na Parte Experimental, relacionando-se os valores com as áreas do sinal obtidas ao se utilizar a condição proposta com os valores alcançados ao se impor variações em cada parâmetro.

Tabela 13: Valores de tempo de retenção e áreas obtidas para cada experimento planejado pelo Teste de Youden para uma concentração de LSD de $20 \mu\text{g g}^{-1}$.

	ECD		DAD	
	T_r	Área ($\mu\text{A}\cdot\text{min}$)	T_r	Área ($\text{mAU}\cdot\text{min}$)
Exp1	5,345	19,8903	5,200	11,6307
Exp2	5,453	10,3352	5,093	16,6448
Exp3	5,598	6,2856	4,853	26,8626
Exp4	5,552	9,3769	4,780	26,9874
Exp5	5,000	17,4367	5,713	30,6438
Exp6	5,103	9,0983	5,703	31,0237
Exp7	5,023	20,8350	5,210	25,4563
Exp8	5,112	9,8629	5,643	22,1572

Tabela 14: Valores obtidos para o efeito de cada variável, de acordo com o cálculo proposto pelo Teste de Youden.

	ECD	DAD
Efeito A/a	-2,8362	-6,7889
Efeito B/b	2,6000	-2,8801
Efeito C/c	6,4436	-0,5549
Efeito D/d	4,6815	-9,9071
Efeito E/e	-3,2117	-2,0145
Efeito F/f	2,5032	-2,1421
Efeito G/g	3,8200	-0,3026

Ao analisar a detecção eletroquímica, observa-se que a variação no potencial a ser aplicado influenciou mais no resultado. Já era de conhecimento que a área cromatográfica

observada em 1300 mV possuía uma largura maior (e consequentemente maior fator de assimetria) em relação à quando se condiciona o procedimento em 1250 mV, mas este se mostrou como o fator mais influenciador.

Sucessivamente, tem-se que o solvente utilizado para a diluição do padrão de LSD como o segundo fator de impacto no resultado por esta detecção. Neste caso, também era de conhecimento da etapa de desenvolvimento de metodologia sobre a sua influência na definição do valor. Através deste teste realizado previamente, tem-se esta comparação de forma não qualitativa apenas, conforme foi apresentado.

Já no caso da detecção por arranjo de diodo, a variável de maior influência no sistema, é o solvente utilizado no preparo de soluções contendo LSD. Na Figura 28 já foi discutido sobre o desempenho cromatográfico ao se alterar o solvente de acetonitrila para a mistura de álcool e água, mas na ocasião foi observada que tal mudança foi mais notável ao se observar a assimetria do pico e não no valor de área.

A vazão em que a fase móvel é bombeada pelo sistema revelou ser o segundo parâmetro de maior impacto nos resultados cromatográficos com DAD. De fato, já foi discutido anteriormente que ao se utilizar uma maior vazão, há uma melhor definição de sinal de pico.

Enquanto que a pequena variação de 50 mV no potencial aplicado no detector eletroquímico implicou como um fator de maior influência, a diferença de 10 nm no comprimento de onda da detecção por arranjo de diodos se revelou como um parâmetro de menor impacto no resultado obtido. Tais constatações tiveram como base os resultados observados para o “Efeito C” da Tabela 14.

Em relação ao teste de seletividade, tem-se na Figura 31 a comparação dos resultados utilizando-se uma solução de LSD na concentração $25 \mu\text{g g}^{-1}$ em solução de metanol e água e em solução da extração de selo (Amostra 3) conforme os espectros de massa da Figura 13.

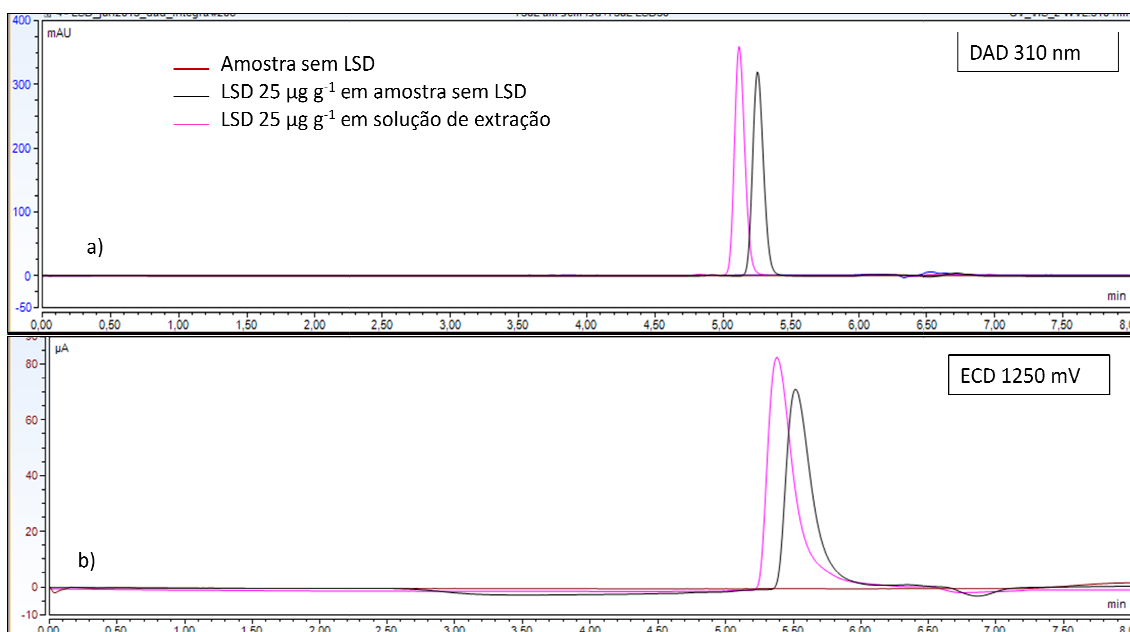


Figura 31: Teste de seletividade para LSD para CLAE utilizando-se o LSD $25 \mu\text{g g}^{-1}$ em solvente a solução de extração de selo sem o analito e a em outro caso, a mistura de metanol e água. a) resultado para detecção por arranjo de diodo em comprimento de onda 310 nm, fase móvel 94:1:5 (NH_4ClO_4 em metanol:acetonitrila:água); b) resultado para detecção eletroquímica em 1250 mV, fase móvel 81:4:5 (NH_4ClO_4 em metanol:acetonitrila:água).

Sabe-se que o F_{tabelado} para este grau de liberdade é de 4,28 e para ambas as detecções o $F_{\text{calculado}}$ foi abaixo desse valor, sendo 3,01 (detecção eletroquímica) e 1,37 (detecção por arranjo de diodo). Conforme foi visto anteriormente, valores de $F_{\text{calculado}}$ abaixo de 4,28 provam que a matriz não tem efeito importante sobre as metodologias e consequentemente, demonstra-se que as análises em ambas as detecções, são seletivas para o LSD, mesmo em uma matriz contendo outros componentes provenientes da extração de selo (tais como a própria tinta presente).

A Tabela 15 reúne os valores obtidos para as figuras de mérito a fim de se validar as metodologias, seguindo os parâmetros analíticos que foram propostos na introdução deste trabalho e com os cálculos apresentados na seção da Parte Experimental.

Tabela 15: Valores das figuras de mérito para validação das metodologias desenvolvidas para Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com as detecções por arranjo de diodo (DAD) e eletroquímica (ECD).

	CLAE DAD	CLAE ECD
LD	$1,08 \cdot 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$	$2,14 \cdot 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$
LQ	$3,29 \cdot 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$	$6,47 \cdot 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$
Precisão (Desvio Padrão Relativo)	2,41%	1,69%
Limite de repetitividade (r) sobre a área de pico	0,0281 a 1,1477 mAU*min Média 0,4239 mAU*min	0,0651 a 0,2115 $\mu\text{A} \cdot \text{min}$ Média 0,1458 $\mu\text{A} \cdot \text{min}$
Precisão intermediária (interdias)	1,48%	2,30%
Linearidade	0,9997	0,9990
Sensibilidade	$533178,74 \text{ mAU min L mol}^{-1}$	$260311,9087 \mu\text{A min L mol}^{-1}$
Recuperação	100,87%	95,98%
Faixa de trabalho (mol L^{-1})	$3,29 \cdot 10^{-6}$ a $1,154 \cdot 10^{-4}$	$6,47 \cdot 10^{-6}$ a $1,154 \cdot 10^{-4}$

A detecção eletroquímica mostrou um bom desempenho ao se otimizar sua condição de análise. Tal afirmação tem como base o valor de LD e LQ encontrados - $2,14 \cdot 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ e $6,47 \cdot 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ - e a boa linearidade entre sinal e concentração. Ao contrário do que já foi apresentado na literatura sobre esta detecção ^[70], em que se relata sobre parâmetros analíticos não satisfatórios, a análise se mostrou adequada para a determinação de LSD.

4.5. Estudo complementar sobre o efeito da solução de extração

Ao longo dos experimentos, foi constatado que tanto para as técnicas voltamétrica como para as cromatográficas, houve uma melhor definição dos picos de resposta quando alterou-se o solvente de diluição para preparo das soluções de padrão de LSD.

O padrão comercial contém o LSD em acetonitrila, por ser este o solvente mais indicado por causa da estabilidade da substância ^[85]. Assim, para esta mudança de solvente,

atentou-se em preparar todas as soluções no momento de análise, em ambiente com luz incandescente, não estocando – as para utilizar posteriormente.

A literatura reporta que em meio aquoso e/ou alcoólico, o LSD passa por reações que formam derivados e se interconvertem em isômeros [85,86]. Deste modo, verificou-se se esta formação seria instantânea, o que influenciaria na interpretação dos resultados observados, gerando dúvidas quanto às respostas voltamétrica e cromatográfica serem oriundas do LSD ou de algum de seu derivado.

Prepararam-se duas soluções de LSD a partir do padrão comercial em concentração de $10 \mu\text{g g}^{-1}$ em dois tipos de solvente distintos: acetonitrila – que é o solvente presente na ampola – e a mistura de metanol:água 1:1 v/v, utilizada na extração de amostras e que apresentou melhores resultados quando analisados por Voltametria Cíclica e CLAE.

Logo após o preparo das soluções foram feitas as leituras por Espectrometria de Massa no modo *full scan*. O resultado desta análise é reportado na Figura 32 em que se constata apenas o pico de massa/carga correspondente à massa molecular de LSD, sem qualquer outro sinal que possa indicar a formação imediata de algum dos seus derivados.

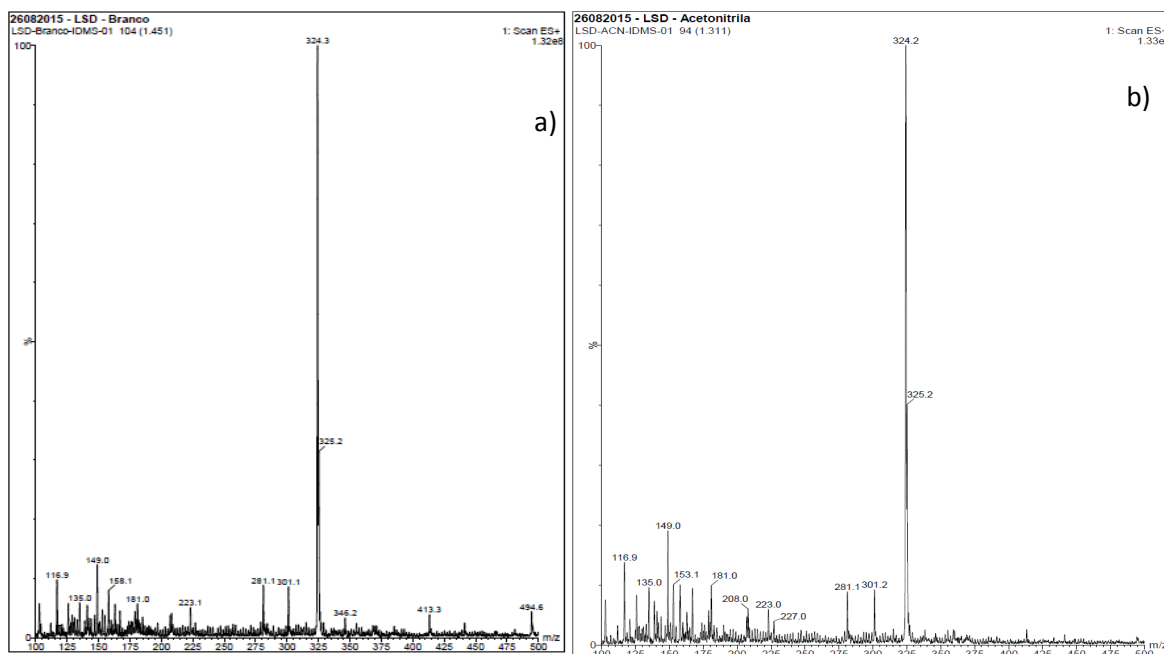


Figura 32: Espectros de massa correspondentes à soluções recém preparadas de LSD $10 \mu\text{g g}^{-1}$ em diferentes solventes: a) solução de extração de amostra (metanol e água); b) acetonitrila.

Após um intervalo de 10 dias, com as soluções armazenadas em frascos âmbar e em temperatura ambiente, fez-se a mesma análise por Espectrometria de Massas a fim de verificar se houve o surgimento de algum pico que poderia ser de um derivado do LSD. (Figura 33)

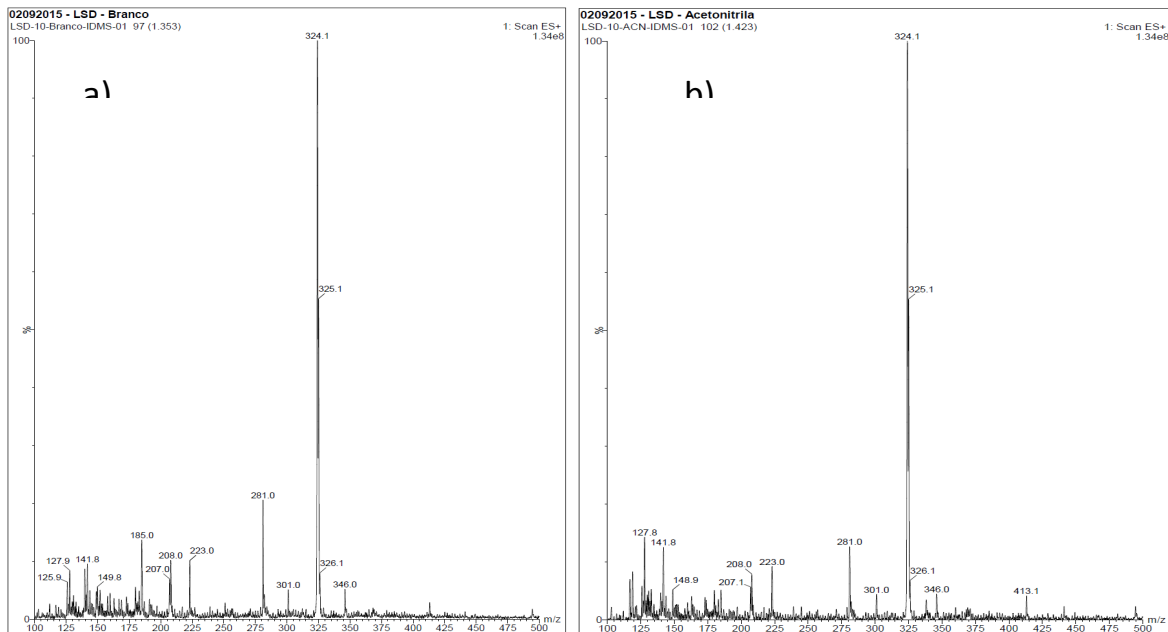


Figura 33: Espectros de massa correspondentes à soluções de LSD $10 \mu\text{g g}^{-1}$ preparadas 10 dias antes e armazenadas em temperatura ambiente dentro de frascos âmbar, em diferentes solventes: a) solução de extração de amostra (metanol e água); b) acetonitrila.

Através dos espectros apresentados, conclui-se que as reações que dão origem aos derivados de LSD não ocorrem instantaneamente e garante-se desta maneira que todos os resultados observados no processo de desenvolvimento de metodologias em que se empregou o uso desta solução de extração, são correspondentes ao LSD de fato.

4.6. Análises de amostras por CLAE e Voltametria Cíclica

Na Figura 34, as amostras 2 e 3 analisadas não apresentaram o sinal correspondente ao LSD em tempo de retenção de aproximadamente 5,40 minutos para a detecção por arranjo de diodo e 5,60 minutos para a detecção eletroquímica. Já a primeira amostra apresentou sinais para os dois detectores e as suas intensidades foram relacionadas com a concentração do analito presente através da curva analítica.

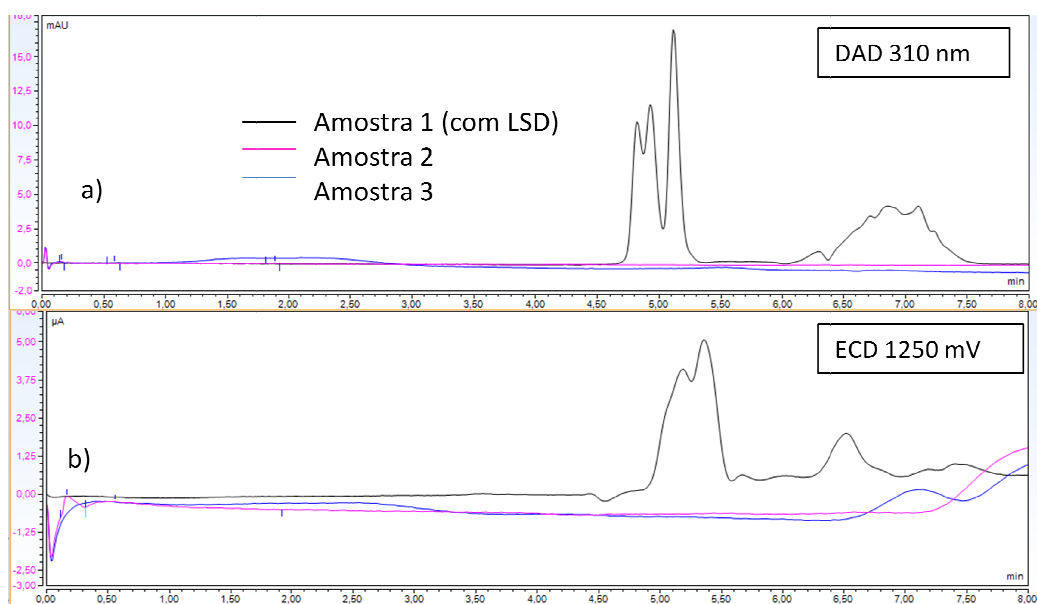


Figura 34 : Análise dos selos apreendidos sob suspeita de conterem LSD. a) resultado para detecção por arranjo de diodo em comprimento de onda 310 nm, fase móvel 94:1:5 (NH_4ClO_4 em metanol:acetonitrila:água); b) resultado para detecção eletroquímica em 1250 mV, fase móvel 81:4:5 (NH_4ClO_4 em metanol:acetonitrila:água).

Analogamente, pela técnica de Voltametria Cíclica tem-se que a amostra 1 apresentou um sinal anódico em um potencial de 1640 mV, ao contrário das amostras 2 e 3, o que é apresentado na Figura 35.

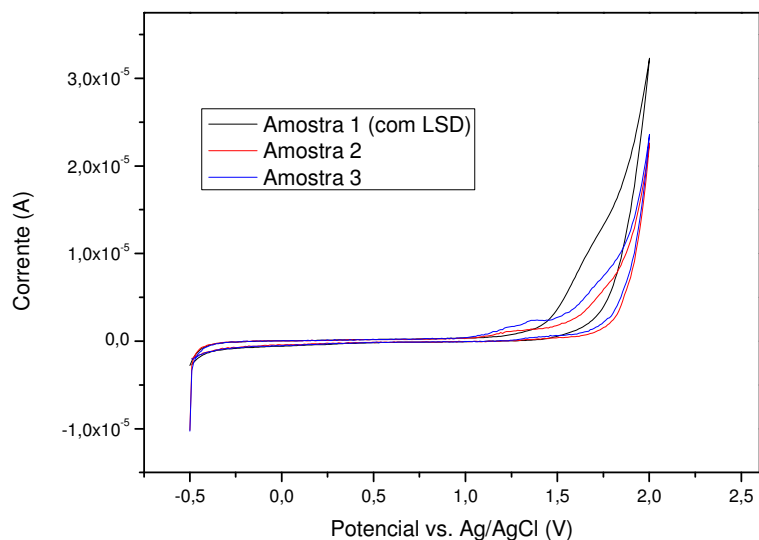


Figura 35: Voltamogramas obtidos para as amostras de selos fornecidas pela Polícia Civil; eletrodo de carbono vítreo; 10 mV s^{-1} .

A presença de LSD na amostra 1 e sua ausência nas outras duas amostras mostram resultados coerentes com as informações prévias dos espectros de massa de cada alíquota, que estão nas Figuras 12 e 13. As amostras que não resultaram no sinal de massa/carga referente ao LSD, não resultaram em picos cromatográficos em nenhuma das duas detecções cromatográficas nem por Voltametria Cíclica.

Considerando-se ainda o fator de diluição da amostra no momento de extração da amostra com solvente em banho ultrassônico, calculou-se a quantidade de LSD presente na amostra 1 através do cálculo por cada metodologia. Para esta mesma amostra, a quantidade de LSD encontrado foi: $30,235 \mu\text{g}$ (determinação por Voltametria Cíclica); $26,842 \mu\text{g}$ (em CLAE DAD) e $27,683 \mu\text{g}$ (por CLAE ECD).

Observa-se que há uma proximidade entre os valores obtidos entre as três técnicas, apesar de a detecção por arranjo de diodo apresentar um valor mais distante em relação aos resultados para a detecção eletroquímica do sistema cromatográfico, ou mesmo por Voltametria Cíclica. Esta última técnica, por sua vez, apresentou maiores resultados para a amostra analisada, o que pode ser explicado pela diferença de tempo de aproximadamente 2 meses entre a medida voltamétrica e cromatográfica. Possivelmente, houve a degradação do LSD presente nesta amostra ou mesmo a sua reação com outros constituintes do selo.

Por último, registram-se na Figura 36 os espectros obtidos ao longo da faixa de UV-VIS para as amostras, sendo este um dado qualitativo a ser somado sobre a presença ou ausência do LSD nos selos analisados.

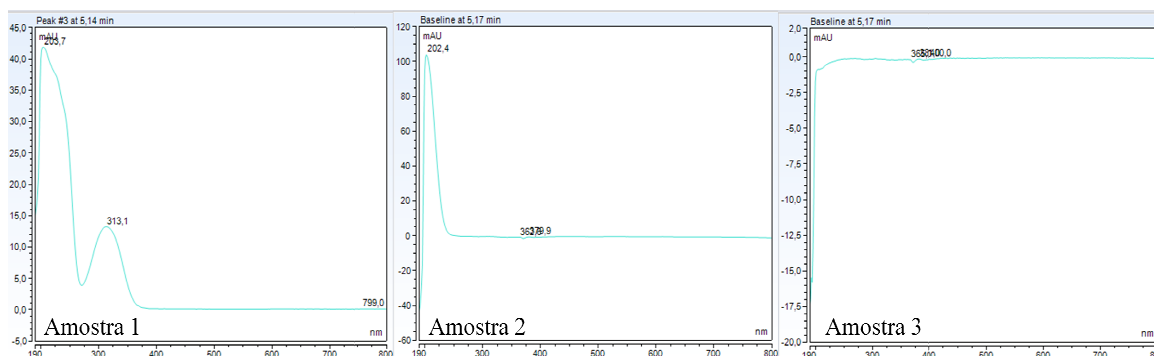


Figura 36: Espectros correspondentes à varredura nos comprimentos de onda do UV VIS para as três amostras, realizadas pelo detector de arranjo de diodo.

Através dos espectros apresentados, constata-se a presença do pico de absorção no comprimento de onda de 313,1 nm, que seria equivalente à absorção do LSD. Na Figura 36 tem-se que o resultado quando a solução de padrão de LSD é injetada é de um pico em 312,6 nm.

4.7. Comparativo entre as técnicas utilizadas

Através dos resultados apresentados é possível resumir as informações levantadas neste trabalho. Apresentam-se os parâmetros analíticos dos 3 procedimentos explorados: cromatográfico com detecção por arranjo de diodo, posteriormente o eletroquímico junto às medidas voltamétricas com carbono vítreo como eletrodo de trabalho. Na Tabela 16 tem-se uma comparação entre as três técnicas utilizadas tendo como base os parâmetros referentes à curva de calibração.

Tabela 16: Comparativo entre as três técnicas utilizadas no presente estudo.

	Voltametria Cíclica	CLAE (DAD)	CLAE (ECD)
Linearidade	0,9980	0,9997	0,9990
Sensibilidade	$7,1929 \cdot 10^{-7} \text{ A L mol}^{-1}$	$533178,74 \text{ mAU min L mol}^{-1}$	$260311,9087 \text{ } \mu\text{A min L mol}^{-1}$
LD	$5,38 \cdot 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$	$1,08 \cdot 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$	$2,14 \cdot 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$
LQ	$1,64 \cdot 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$	$3,29 \cdot 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$	$6,47 \cdot 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$
Faixa de trabalho	de $1,64 \cdot 10^{-6}$ a $1,98 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$	$3,29 \cdot 10^{-6}$ a $1,15 \cdot 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$	$6,47 \cdot 10^{-6}$ a $1,15 \cdot 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$

A respeito da metodologia, observa-se que em todos os casos a diluição da solução de padrão apresentou melhores respostas ao utilizar-se da solução de extração de amostra como solvente. Cabe ressaltar que a concentração encontrada em selos varia de $1,03 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ a $7,73 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, valores que estão dentro da faixa de trabalho das três metodologias.

A possibilidade de automação no equipamento cromatográfico torna-o como uma técnica mais prática. Além disso, trata-se de uma técnica bem conhecida, e é possível dispor em série dois tipos de detecção. Em um tempo de corrida de menos de 10 minutos pode-se ter resultados referentes ao LSD tendo como base diferentes princípios químicos, como a absorção de luz e a eletroquímica.

Entre as duas detecções exploradas para o sistema cromatográfico, o eletroquímico não se revelou como melhor para a detecção de menores concentrações de LSD em relação ao DAD e em ambos os casos a saturação de sinal se deu em quantidades de LSD similar.

Obtendo-se concentrações de LD e LQ com valores abaixo das cromatográficas, há a técnica voltamétrica. Através desses resultados, mostra-se que a Voltametria Cíclica pode quantificar o LSD em teor muito menor da quantidade encontrada, porém, a linearidade atribuída à sua curva de calibração possui o ajuste mais baixo. A faixa de trabalho para a técnica voltamétrica é mais restrita em relação às metodologias cromatográficas, embora abranja a concentração de LSD encontrada em selos.

Ao retomar ao que já foi discutido na Tabela 01 sobre as técnicas analíticas, os estudos apresentados neste trabalho propõem três procedimentos analíticos classificados na Categoria

B. As validações realizadas conferem maior confiabilidade no resultado para as metodologias propostas.

5. CONCLUSÕES

O desenvolvimento de metodologia cromatográfica através dos produtos formados em *spot test* não atingiu os objetivos esperados, uma vez que a adaptação desses testes para tal análise não se mostrou satisfatória. No entanto, cumpre pontuar sobre os objetivos alcançados ao desenvolver metodologias voltamétrica e cromatográfica.

Os resultados obtidos por Voltametria Cíclica sobre a molécula de LSD permitiram o desenvolvimento de uma metodologia para a sua quantificação bem como viabilizara a análise por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com detecção eletroquímica. Junto a este processo, houve a otimização do procedimento de análise cromatográfica com a detecção por arranjo de diodo, além de se apresentar a possibilidade de em uma mesma condição experimental, ter os resultados de ambas as detecções em série.

Avaliando-se a técnica voltamétrica junto às análises por CLAE com as detecções de arranjo de diodo e eletroquímica, verifica-se a adequação das três metodologias à realidade encontrada sobre as amostras apreendidas e com parâmetros analíticos muito próximos. Os estudos acerca do comportamento do LSD por essas técnicas permitiram o desenvolvimento de metodologias e por fim a comparação sobre o desempenho de cada uma.

Essas metodologias abrangeram as principais figuras de mérito dentro da validação analítica propostas em literatura específica, tendo, portanto a confiabilidade garantida para a aplicação na rotina de análises em um laboratório de Química Forense.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] - DIVISION OF NARCOTIC DRUGS. **Recommended Methods for testing Lysergide (LSD)** - Manual for use by National Narcotics Laboratories. New York: United Nations, 1989.25p
- [2] - UNITED NATIONS OFFICE ON DRUGS AND CRIME. **World Drug Report 2015**. Viena: UNODC, 2015.162p
- [3] - CARLINI E. A. **II Levantamento domiciliar sobre o uso de drogas psicotrópicas no Brasil: estudo envolvendo as 108 maiores cidades do país**. São Paulo: CEBRID, 2006.31p
- [4] - ANDRADE, A. G.; DUARTE, P. C. A. V.; OLIVEIRA, L. G. **I Levantamento Nacional sobre o Uso de Álcool, Tabaco e Outras Drogas entre Universitários das 27 Capitais Brasileiras**. Brasília: SENAD, 2010.17p
- [5] - DUARTE, P. C. A. V.; STEMPLIUK, V. A.; BARROSO, L. P. **Relatório brasileiro sobre drogas**. Brasília: SENAD, 2009.48p
- [6] - Global Drug Survey 2015. GDS 2015 by Adam Winstock. Disponível em <http://www.globaldrugsurvey.com/the-global-drug-survey-2015-findings/>. Acesso em 15 Dez 2015.
- [7] - DRUMMER, O.; ODELL, M.; DRUMMER, O. H. **The forensic Pharmacology of drugs of abuse**. Londres: *Arnold Press*, 2001.480p
- [8] - LSD Samples Analysis. *Erowid.org*. Jun 25, 2009. Produced by E. Hidalgo. Disponível em https://www.erowid.org/chemicals/lsd/lsd_article3.shtml. Acesso em 15 Out 2015.

- [9] - BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução da Diretoria Colegiada - RDC nº 37 de 3 de julho de 2012. Dispõe sobre a Listas de Substâncias Uso Proscrito no Brasil. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 3 de julho de 2012. Nº.127 - Seção 1.
- [10] - HOFFMAN, A. *LSD – My problem child*. Nova York: *McGraw-Hill*, 1980.209p
- [11] - KAST, E. C. A concept of death. In B. Aaronson, & H. Osmond (Eds.), *Psychedelics: The Uses and Implications of Hallucinogenic Drugs*. Nova York: Anchor Books, p.366-381, 1970.
- [12] - KAST, E. C.; COLLINS, V. J. Lysergic acid diethylamide as an analgesic agent. **Anesthesia and Analgesia**. Baltimore, v.43, p.285-291, 1964.
- [13] - PAHNKE, W. N.; et al. LSD-assisted psychotherapy with terminal cancer patients. **Current Psychiatric Therapies**. Nova York, v.9, p.144-152, 1969.
- [14] - GROF, S. et al. LSD-assisted psychotherapy in patients with terminal cancer. **International Pharmacopsychiatry**. Basel, v.8, p.129-144, 1973.
- [15] - KURLAND, A. A. LSD in the supportive care of the terminally ill cancer patient. **Journal of Psychoactive Drugs**. San Francisco, v.17, p.279-290, 1985.
- [16] - HOFFER, A. A program for the treatment of alcoholism: LSD, malvaria and nicotinic acid. In H.A. Abramson (Ed.), *The Use of LSD in Psychotherapy and Alcoholism*. Indianapolis: BobbsMerrill, p.343-406, 1967.
- [17] - KURLAND, A. A. et al. Psychedelic therapy utilizing LSD in the treatment of the alcoholic patient: a preliminary report. **The American Journal of Psychiatry**. Arlington, v.123, p.1202-1209, 1967.
- [18] - HALPERN, J. H. **The** use of hallucinogens in the treatment of addiction. **Addiction Research**. Londres, v.4, p.177-189, 1996.

- [19] - SAVAGE, C.; JACKSON, D.; TERRILL, J. LSD, transcendence, and the new beginning. **The Journal of Nervous and Mental Disease**. Baltimore, v.135, p.425-439, 1962.
- [20] - BRANDRUP, E.; VANGGAARD, T. LSD treatment in a severe case of compulsive neurosis. **Acta Psychiatrica Scandinavica**. Malden, v.55, p.127-141, 1977.
- [21] - LEONARD, H. L.; RAPOPORT, J. L.. Relief of obsessive-compulsive symptoms by LSD and psilocin. **The American Journal of Psychiatry**. Arlington, v.144, p.1239-1240, 1987.
- [22] - RANG, H. P.; DALE, M. M. and RITER, J. M. **Farmacologia**. 3ª edição. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1997.692p
- [23] - JULIEN, R. M. **A Primer of Drug Action**. Eighth edition, New York: Freeman, 1998. 512p
- [24] - PASSIE, T.; HALPERN, J. H.; STICHTENOTH, D. O.; EMRICH, H. M.; HINTZEN, A. The Pharmacology of Lysergic Acid Diethylamide: a Review. CNS Neuroscience & Therapeutics. Oxford, v.14, n.4, p.295–314, 2008.
- [25] - ANDERSON, G. M.; BRAUN, G.; BRAUN, U.; NICHOLS, D. E.; SHULGIN, A. T. 1978 (Research Monograph), n.22; **Absolute configuration and psychotomimetic activity**, in Quantitative Structure Activity Relationships of Analgesics, Narcotic Antagonists, and Hallucinogens. NIDA, National Institute on Drug Abuse, p.8-15, Bethesda, 1978.
- [26] - PFAFF, R. C.; HUANG, X.; MARONA-LEWICKA, D.; OBERLENDER, R.; AND NICHOLS, D. E. 1994 (Research Monograph), n.146; **Lysergamides Revisited**, in Hallucinogens: An Update. NIDA, National Institute on Drug Abuse, p.52-73, Bethesda, 1994.

- [27] - SHULGIN, A. **TIHKAL**.1st edition. California: Transform Press. 1997. 704p. Disponível em https://www.erowid.org/library/books_online/tihkal/tihkal26.shtml. Acesso em 15 Out. 2015.
- [28] - CANEZIN, J. et al. Determination of LSD and its metabolites in human biological fluids by high-performance liquid chromatography with electrospray tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography B**. Amsterdam, v. 765, p.15-27, 2001.
- [29] - KLETTE, K. L. et al. Metabolismo f lysergic acid diethylamide (LSD) to 2-oxo-3-hydroxy-LSD (O-H-LSD) in human liver microsomes and cryopreserved human hepatocytes. **Journal of Analytical Toxicology**. Oxford, v.24, n.7, p.550-556, 2000.
- [30] - **Erowid LSD (Acid) Vault: Effects**. Disponível em <http://www.erowid.org/chemicals/lsd/lsd_effects.shtml> Acesso em: 15 Out. 2015;
- [31] - NICHOLS, D. E. Hallucinogens. **Pharmacology & Therapeutics**. Kansas, v.101, n.2, p.131-81, 2004.
- [32] - NATIONAL FORENSIC SCIENCE TECHNOLOGY CENTER. Forensic Science Simplified Project: A Simplified Guide to Forensic Drug Chemistry. Florida: NFSTC. 2011. 23p
- [33] - SCIENTIFIC WORKING GROUP FOR THE ANALYSIS OF SEIZED DRUGS. **Recommendations version 7.0**. SWGDRUG, 2014. 79p (material disponível em< <http://www.swgdrug.org/approved.htm>>. acessado em 20 Outubro 2015)
- [34] - AUSTRALIAN INSTITUTE OF CRIMINOLOGY. **Trends & Issues in crime and criminal justice**. Canberra: Australian Government, 2014. 7p
- [35] - JUNGREIS, E. Spot Test Analysis: Clinical, Environmental, Forensic, and Geochemical Applications. 1st Ed. New York: John Wiley & Sons, 1985. 315p

- [36] - MARINHO, P.A.; LEITE, E.M.A. Quantification of LSD in illicit samples by High Performance Liquid Chromatography. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**. São Paulo, v. 46, n.4, 2010.
- [37] - Johns, S.H.; Wist, A.A.; Najam, A.R. Spot Tests: A Color Chart Reference for Forensic Chemists. **Journal of Forensic Science**. Malden, v.24, n.3, p. 631-649 , 1979
- [38] - National Institute of Justice – Law enforcement and corrections standards and testing program. **Color test reagent/kits for preliminary identification of drugs of abuse**. NIJ Standard – 0604.01. *U.S. Department of Justice*, Jul/2000.
- [39] - KOVAR, K.A.; LAUDSZUN, M. **Chemistry and Reaction Mechanisms of Rapid Tests for Drugs of Abuse and Precursors Chemicals**. SCIENTIFIC AND TECHNICAL NOTES V.89-51669 - SCITEC/6. Tubingen: *United Nations*, 1989.19p
- [40] - BUCHWALD, H.; RICHARDSON, E. – Molybdic acid and its organic complexes – IV. **Journal of Inorganic and Nuclear Chemistry**. Oxford, v 15, p 133-139., 1960.
- [41] - LUTWAK, L.; SACKS, J.. The catalytic effect of molybdate on the hydrolysis of organic phosphates. **Journal of Biological Chemistry**. Rockville., v. 200, pp 565-569, 1953.
- [42] - PILAŘOVÁ, P.; KASTNER, P.; KLIMEŠ, J. Isolation and Identification of Amphetamines in Urine by Thin-Layer Chromatography. **Journal of Planar Chromatography**. Budapeste, v. 21, n. 6, p. 465–468, 2008.
- [43] - BARD, A. J.; FAULKNER, L. R. **Electrochemical methods: fundamentals and applications**. 2nd Ed., New York: Wiley, 2001. 864p
- [44] - HARRIS, D.C.. **Análise Química Quantitativa**. Tradução de José Alberto Portela Bonapace e Oswaldo Esteves Barcia. 6^a Ed. Rio de Janeiro: LTC Editora. 2003. 876p

- [45] - SKOOG, D. A.; WEST, D. M.; HOLLER, F. J.; CROUCH, S. R.. Fundamentos de química analítica. Tradução de Robson Mendes Matos, 9^a ed., São Paulo: Cengage Learning. 2014. 1088p
- [46] - OIYE, E.N. et al. Voltammetric determination of cocaine in confiscated samples using a cobalt hexacyanoferrate film-modified electrode. **Forensic Science International**. Limerick, v.192, n.1-3, p. 94-97, 2009.
- [47] - DE OLIVEIRA, L. S. et al. Voltammetric analysis of cocaine using platinum and glassy carbon electrodes chemically modified with uranyl Schiff base films. **Microchemical Journal**. New York, v. 110, n. 6, p. 374-378, 2013.
- [48] - BALBINO, M.A. et al. A Comparative Study Between Two Different Conventional Working Electrodes for Detection of Δ^9 -Tetrahydrocannabinol Using Square-Wave Voltammetry: a New Sensitive Method for Forensic Analysis. **Journal of the Brazilian Chemical Society**. São Paulo, v. 25, p. 589-596, 2014.
- [49] - TADINI, M. C.; et al. Developing electrodes chemically modified with cucurbit[6]uril to detect 3,4-methylenedioxymethamphetamine(MDMA) by voltammetry. **Electrochimica Acta**. New York, v. 121, p. 188-193, 2014.
- [50] - WOOLEVER, C.A.; STARKEY, D.E.; DEWALD, H.D. Differential pulse anodic stripping voltammetry of lead and antimony in gunshot residues. **Forensic Science International**. Limerick, v.102, p.45-50, 1999.
- [51] - WOOLEVER, C.A; DEWALD, H.D..Differential pulse anodic stripping voltammetry of barium and lead in gunshot residues. **Forensic Science International**. Limerick, v.1117, p.185-190, 2001.

- [52] - SONTHALIA, P.; MCGAW E., SHOW, Y. Metal ion analysis in contaminated water samples using anodic stripping voltammetry and a nanocrystalline diamond thin-film electrode. **Analytica Chimica Acta**. Amsterdam., v. 522, n. 1, 20, pp 35–44, 2004.
- [53] - POLLARD P. et al. Environmental Forensic Investigations: The Potential Use of a Novel Heavy Metal Sensor and Novel Taggants. **Chapter 30** in Criminal and Environmental Soil Forensics. p 477-490. Ed Springer, New Delhi, India.
- [54] - MERLI, D. et al. Electrochemistry and analytical determination of lysergic acid diethylamide (LSD) via adsorptive stripping voltammetry. **Talanta**. Amstaerdam,, v.130, p 456-461, 2014.
- [55] - INCZEFFY, J.; SOMODI, Z.B.; PAP-SZIKLAY, Z.; FARSANG, G. The study of the differential pulse voltammetric behaviour of ergot alkaloids and their determination by DC amperometric detection in a FIA system. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**. Londres, v.1, p.191-196, 1993.
- [56] - DANKHAZI, T.; FEKETE, E.; PAA1, K.; FARSANG, G. Electrochemical oxidation of lysergic acid-type ergot alkaloids in acetonitrile. Part 1. Stoichiometry of the anodic oxidation electrode reaction. **Analytical Chimica Acta**. Amsterdam, v.282, p. 289-296, 1993.
- [57] - COLLINS,C.H.; BRAGA, G.L.; BONATO, P.S. (orgs). Fundamentos de Cromatografia. Campinas: Editora Unicamp. 2006.453p
- [58] - SNYDER, L.R.; GLAJCH, J.L.; KIRKLAND, J.J. Practical hplc metohod development. Ed John Wiley & Sons. New York, 1988.
- [59] - MAUBLANC, J.; LAMBALLAIS, F.; BARGEL, S.. LSD in pubic hair in a fatality. **Forensic Science International**. Limerick, v.218, n.1, p.25-27, 2012.
- [60] - MENG, C. MCCOOEYE, M. A.; FRASER, C.; MESTER, Z. Quantitation of Lysergic Acid Diethylamide in Urine Using Atmospheric Pressure Matrix-Assisted Laser

Desorption/Ionization Ion Trap Mass Spectrometry. **Analytical Chemistry**. Washington, v. 76, n. 22, p.7143-48, 2004.

[61] - FAVRETTO, D.; FRISON, G.; MAIETTI, S.; FERRARA S. D. LC-ESI-MS/MS on an ion trap for the determination of LSD, iso-LSD, nor-LSD and 2-oxo-3-hydroxy-LSD in blood, urine and vitreous humor. **International Journal of Legal Medicine**. Heidelberg, v. 121, n.4 , p.259-65, 2007.

[62] - LIBONG, D.; BOUCHONNET, S.; RICORDEL, I. A selective and sensitive method for quantitation of lysergic acid diethylamide (LSD) in whole blood by gaschromatography-ion trap tandem mass spectrometry. **Journal Of Analytical Toxicology**. Oxford, v.27, n.1, p.24-29, 2003.

[63] - GILL, R.; KEY, J.A. :High-performance liquid chromatography system for the separation of ergot alkaloids with applicability to the analysis of illicit lysergide (LSD). **Journal of Chromatography**. Amsterdam, v.346,p. 423-427, 1985.

[64] - BERGEMANN, D.; GEIER, A.; VON MEYER, L.. Determination of lysergic acid diethylamide in body fluids by high-performance liquid chromatography and fluorescence detection—a more sensitive method suitable for routine use. **Journal of Forensic Sciences**. Malden, v. 44, n. 2, p 372-374. 1999

[65] - MCDONALD, P.A. et al. An Analytical Study of illicit Lysergide. **Journal of Forensic Sciences**. Malden, v. 29, n. 1, p 120-130, 1984.

[66] - LECHOWIKZ, W. LSD determination using high-performance liquid chromatography with fluorescence spectroscopy HPLC. **Z Zagadnień Nauk S¹dowych**. v. 39, 1999, p. 54–64.

[67] - REUSCHEL, S. A.; EADES, D.; FOLTZ, R. Recent advances in chromatographic and mass spectrometric methods for determination of LSD and its metabolites in physiological specimens. **Journal of Chromatography B**. Amsterdam, v.733, n.1-2, p.145-59, 1999.

- [68] - CODY, J. **Chapter 4: Hallucionogens.** Handbook of Analytical Separation, v6, p. 175 – 203, Elsevier, 2008.
- [69] - FLANAGAN, R.J. High Performance Liquid Chromatographic analysis of basic drugs on silica columns using non aqueous ionic eluents. Part I: Factors influencing retention, peak shape and detector response. **Journal of Chromatography.** Amsterdam, v. 323, p. 173-189, 1985.
- [70] - JANE, I.; MCKINNON, A.; FLANAGAN, R.J. High Performance Liquid Chromatographic analysis of basic drugs on silica columns using non aqueous ionic eluents. Part II: Application of UV, fluorescence and electrochemical oxidation detection. **Journal of Chromatography.** Amsterdam, v. 323, p. 191-225, 1985.
- [71] - INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, NORMALIZAÇÃO E QUALIDADE INSUDTRIAL. **Orientação sobre validação de métodos de ensaios químicos (DOQ-CGCRE-008 2007).** Revisão 02. INMETRO. 2007. 25p.
- [72] - INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, NORMALIZAÇÃO E QUALIDADE INSUDTRIAL. **Orientação sobre validação de métodos de ensaios químicos (DOQ-CGCRE-008 2010).** Revisão 03. INMETRO. 2010. 20p.
- [73] – INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, NORMALIZAÇÃO E QUALIDADE INSUDTRIAL. **Orientação sobre validação de métodos de ensaios químicos (DOQ-CGCRE-008 2011).** Revisão 04. INMETRO. 2011. 20p
- [74] - EURACHEM. CITAC Guide CG 4: Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement. 3rd Ed. 2012. 141p
- [75] ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. AOAC Official methods of analysis. Appendix D: guidelines for collaborative study procedures to validate characteristics of a method of analysis. Washington: AOAC, 2002.20p

- [76] WOOD, R. How to validate analytical methods. **Trends in analytical chemistry**. Amsterdam, v. 18, n. 9-10, p.624-632, 1999.
- [77] - INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, NORMALIZAÇÃO E QUALIDADE E TECNOLOGIA. **Vocabulário Internacional de Metrologia**: Conceitos fundamentais e gerais e termos associados (VIM 2012). *Duque de Caxias*: INMETRO, 2012. 95p
- [78] - INTERNATIONAL UNION OF PURE AND APPLIED CHEMISTRY. *Compendium of Chemical Terminology*: Goldbook. Version 2.3.3. IUPAC. 2014. 1670p
- [79] - Tibor Veress. Study of the Extraction of LSD from Illicit Blotters for HPLC Determination, **Journal of Forensic Sciences**. Malden, v. 38, n. 5, p. 1105- 1110, 1993.
- [80] - LI, Z.; MCNALLY, A.J.; WANGM S.J. Stability study of LSD under various storage conditions. **Journal of Analytical Toxicology**. Oxford, v. 22, p 520-525, 1998.
- [81] - TEÓFILO, R.F.; FERREIRA, M.M.C. Quimiometria II: Planilhas Eletrônicas para cálculos de planejamentos experimentais, um tutorial. **Química Nova**. São Paulo, v. 29, n. 2, p. 338-350, 2006.
- [82] - LEARDI, R. Experimental design in chemistry: A tutorial. **Analytical Chimica Acta**. Amsterdam, v. 652, p. 161-172, 2009.
- [83] - RIBANI, M. et al. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**. São Paulo, v. 27, n. 5, p 771-780, 2004
- [84] PASCHOAL, J.A.R. et al. Validação de métodos cromatográficos para a determinação de resíduos de medicamentos veterinários em alimentos. **Química Nova**. São Paulo, v. 31, n. 5, p1190-1198, 2008.
- [85] - CREWS, C. Analysis of Ergot Alkaloids. **Toxins**. Basel, v. 7, p. 2024-2050, 2015.

- [86] - NIWAGUCHI, T.; INOUE, T. Photodecomposition of Lysergic Acid Diethylamide (LSD). **Proceedings of the Japan Academy**. Tokyo, v. 47, p. 747-750, 1971.
- [87] - HAMANN, C. H.; HAMNETT, A.; VIELSTICH, W. *Electrochemistry*. 2nd Ed. Weinheim: Wiley, 2007. 550p
- [88] - WANG, J. *Analytical electrochemistry*. 3rd.Ed. New Jersey: Wiley, 2006. 272p
- [89] - HEDGE, R.N. et al – Electro-oxidation of atenolol at a glassy carbon electrode. **International Journal of Electrochemical Science**. Servie, v.3, p. 302-304, 2008.
- [90] - SAWYER, D. T.; SOBKOWIAK, A.; ROBERTS, J. L. *Electrochemistry for chemists*. 2nd Ed., New York: Wiley, 1995.
- [91] - COMPTON, R. G.; BANKS, C. E. *Understanding voltammetry*. 2nd. Ed. Imperial College Press, 2011.429p
- [92] - National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Database; CID=5761, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5761> (accessed Oct. 5, 2015)
- [93] - QUEIROZ, M.E.C.; LANÇAS, F.M. Análise de fármacos em material biológico: acoplamento microextração em fase sólida “no tubo” e cromatografia líquida de alta eficiência. **Química Nova**. São Paulo, v. 28, n. 5, p 880-886, 2005
- [94] CASTRO, G.T.; GIORDANO, O.S.; BLANCO, S.E. Determination of the pKa of hydroxyl-benzophenones in ethanol-water mixtures. Solvent effects. **Journal of molecular structure**. Guilderland, v. 626, p. 167-178, 2003.
- [95] - JAPP, M.; GILL, R.; OSSELTON; M.D. The Separation of Lysergide (LSD) from Related Ergot Alkaloids and Its Identification in Forensic Science Casework Samples. **Journal of Forensic Sciences**, Malden, v. 32, n. 4, p. 933-940, 1987.

[96] - BOWEN, J, M.; MCMORROW, H. A.; PURDIE, N. Quantitative Determination by Circular Dichroism of Lysergic Acid Diethylamide in Confiscated Material. **Journal of Forensic Science**. Malden, v. 27, n. 4, p. 822-826, 1982.

[97] - CESAR, I.C.; PIANETTI, G.A.. Robustness evaluation of the chromatographic method for the quantitation of lumefantrine using Youden's test. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**. São Paulo, vol 45, n2, p 235-240, 2009.