



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DA PARAÍBA
CAMPUS I
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE FARMÁCIA
CURSO DE FARMÁCIA**

ALESKA MARIA PEREIRA DA COSTA

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA BIOANALÍTICA
PARA IDENTIFICAÇÃO DE BROMAZEPAM EM AMOSTRAS DE URINA
UTILIZANDO CLAE**

CAMPINA GRANDE – PB

2016

ALESKA MARIA PEREIRA DA COSTA

DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA BIOANALÍTICA
PARA IDENTIFICAÇÃO DE BROMAZEPAM EM AMOSTRAS DE URINA
UTILIZANDO CLAE

Trabalho de conclusão de curso apresentado
ao curso de Farmácia da Universidade
Estadual da Paraíba em exigência para
obtenção do grau de Bacharel em Farmácia.

Orientador (a): Prof^a. Dr^a. SAYONARA MARIA LIA FOOK

CAMPINA GRANDE – PB

2016

É expressamente proibida a comercialização deste documento, tanto na forma impressa como eletrônica. Sua reprodução total ou parcial é permitida exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, desde que na reprodução figure a identificação do autor, título, instituição e ano da dissertação.

C837d Costa, Aleska Maria Pereira da.
Desenvolvimento e validação de metodologia bioanalítica para identificação de bromazepam em amostras de urina utilizando Clae [manuscrito] / Aleska Maria Pereira da Costa. - 2016.
35 p. : il. color.

Digitado.
Monografia (Graduação em Farmácia) - Universidade Estadual da Paraíba, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, 2016.

"Orientação: Prof. Dra. Sayonara Maria Lia Fook, Departamento de Farmácia".

1. Bromazepam. 2. Intoxicações medicamentosas. 3. Cromatografia líquida. I. Título.

21. ed. CDD 615.704

ALESKA MARIA PEREIRA DA COSTA

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA BIOANALÍTICA
PARA IDENTIFICAÇÃO DE BROMAZEPAM EM AMOSTRAS DE URINA
UTILIZANDO CLAE**

Trabalho de conclusão de curso apresentado
ao curso de graduação em farmácia da
Universidade Estadual da Paraíba em
exigência para obtenção do grau de
Bacharel em Farmácia.

Aprovado em 16/05/2016.

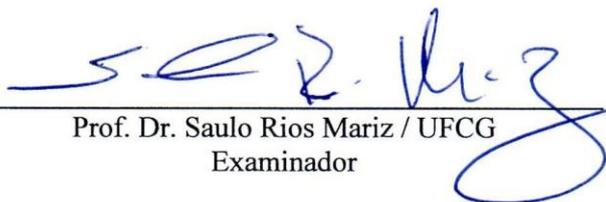
BANCA EXAMINADORA



Prof.^a Dr.^a Sayonara Maria Lia Fook / UEPB
Orientadora



Prof. Me. Geovani Pereira Guimarães / UEPB
Examinador



Prof. Dr. Saulo Rios Mariz / UFCG
Examinador

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	5
2	REVISÃO DE LITERATURA	8
3	METODOLOGIA	15
3.1	DELINEAMENTO DO ESTUDO	15
3.2	MATERIAIS, REAGENTES, EQUIPAMENTOS E ACESSÓRIOS	15
3.3	DESENVOLVIMENTO DO MÉTODO BIOANALÍTICO	15
3.3.1	Preparo das Soluções.....	15
3.3.2	Coleta das Amostras Biológicas.....	16
3.3.3	Extração Líquido-Líquido (ELL) na Matriz Biológica.....	16
3.4	VALIDAÇÃO DO MÉTODO	17
3.4.1	Efeito Matriz	17
3.4.2	Seletividade.....	17
3.4.3	Linearidade	18
3.4.4	Limite de Detecção e Limite de Quantificação	18
3.4.5	Precisão.....	18
3.4.6	Exatidão	19
3.4.7	Robustez	19
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	20
4.1	DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DA METODOLOGIA BIOANALÍTICA	20
4.2	APLICAÇÃO DO MÉTODO	28
5	CONCLUSÃO	31
	REFERÊNCIAS	32

DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA BIOANALÍTICA PARA IDENTIFICAÇÃO DE BROMAZEPAM EM AMOSTRAS DE URINA UTILIZANDO CLAE

COSTA, Aleska Maria Pereira da¹; FOOK, Sayonara Maria Lia²

RESUMO

Intoxicações medicamentosas constituem um problema de ordem social, pois enfrentamos atualmente um consumo indiscriminado de medicamentos pela população global. Esse fato leva a grandes índices de intoxicações, que geram efeitos nocivos à saúde e ocasionam altos custos aos hospitais, além de superlotá-los. Há uma necessidade de metodologias analíticas validadas, precisas e rápidas, capazes de identificar e quantificar os fármacos causadores da intoxicação, para evitar maiores complicações, e ajudar no êxito do tratamento da intoxicação. A identificação e determinação de fármacos em amostras biológicas, tais como plasma e urina, em baixas faixas de concentração, são em sua maioria baseadas em extrações líquido-líquido e seguidas de determinação cromatográfica. A Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (Clae) é um método físico-químico de separação muito empregado nessa identificação. O presente trabalho teve por objetivo desenvolver e validar uma metodologia robusta e capaz de identificar bromazepam em amostras de urina de pacientes intoxicados, visto ser o segundo medicamento mais consumido no Brasil no período de 2007 a 2010. As amostras foram preparadas e processadas por extração líquido-líquido, identificadas e quantificadas por Clae, e as etapas de validação da metodologia analítica seguiram as recomendações estabelecidas pela Agência Nacional de vigilância Sanitária (Anvisa). O método proposto mostrou-se seletivo; linear, com um coeficiente linear de 0,9966; com precisão e exatidão satisfatórias e dentro dos padrões de variação permitidos, bem como o método foi considerado robusto de acordo com as Resoluções nº 899/2003 e nº 27/2012 ambas da Anvisa.

PALAVRAS-CHAVE: Bromazepam. Cromatografia Líquida. Estudo de Validação.

¹ Acadêmica do curso de Farmácia pela Universidade Estadual da Paraíba.
aleska63@hotmail.com

² Professora Doutora do departamento de Farmácia da Universidade Estadual da Paraíba.
sayonarafook@hotmail.com.br

1 INTRODUÇÃO

Intoxicações constituem um problema de ordem social e uma das principais causas de atendimento médico no Brasil. O consumo indiscriminado de medicamentos pela população global tem levado a grandes índices de intoxicações, que geram efeitos nocivos à saúde e ocasionam altos custos aos hospitais, além de superlotá-los. Intoxicações medicamentosas são geralmente causadas pelo uso inadequado de medicamentos; por erros de medicação; superdosagem acidental (grande parte em crianças); uso em abusos sexuais ou para a tentativa de suicídio, sendo esta a principal circunstância relatada nas estatísticas (SINITOX, 2016).

É crucial que haja fiscalização da venda desses medicamentos por parte dos órgãos competentes, já que esta se encontra defeituosa, como também um maior cuidado e atenção no uso desses medicamentos por parte da população.

Estatísticas do relatório anual de 2014 da *American Association Of Poison Control Centers* (AAPCC) / National Poison Data System (NPDS), relataram cerca de 2,9 milhões de casos de exposição a substâncias perigosas ou potencialmente perigosas nos Estados Unidos da América (EUA). De todas as exposições humanas as substâncias mais envolvidas foram analgésicos (13%), cosméticos/ produtos de higiene pessoal (9%), domissanitários (9%), sedativos / hipnóticos /antipsicóticos (7%) e antidepressivos (5%). Entretanto, quando se separa a categoria por idade em adultos com mais de vinte anos, os sedativos/ hipnóticos/ antipsicóticos representam a segunda classe com maior da taxa de exposições graves.

Em Portugal, dados do Instituto Nacional de Emergência Médica (INEM)/ Centro de Informação Antivenenos (CIAV) de 2014, mostraram que os medicamentos estão no topo da listagem como o principal agente envolvido nas intoxicações atingindo 21.656 casos de um total de 31.641.

Nos anos de 2013-2014, o *National Poisons Information Service* (NPIS) do Reino Unido detectou os medicamentos como sendo o principal agente causal da exposição tóxica, com 69,9% dos casos. A idade mais reportada foi o grupo: menor de cinco anos. Observa-se que essas crianças estão tendo fácil acesso a medicamentos que deviam estar guardados em locais de difícil obtenção para evitar um uso inadequado por elas, já que ainda não sabem dos riscos propensos. Logo, seria primordial uma maior atenção e cuidado dos pais ou cuidadores. Outro grupo que ocupou posição considerável foi a

faixa etária de adultos entre 20 e 39 anos. Este fato se deve, possivelmente, à utilização de medicamentos intencionalmente na tentativa de suicídio.

No Brasil, em 2012, dados publicados nos anuários estatísticos do Sinitox expõem que os medicamentos representam o primeiro lugar como agente causal das intoxicações atendidas e notificadas nos centros de todo o país, e já vem ocupando essa posição há alguns anos, tornando-se uma questão preocupante no Brasil e no mundo, visto que os medicamentos também estão no topo da lista de agente causador das intoxicações em países desenvolvidos (SINITOX, 2016).

Dados de 2012 do Centro de Intoxicações de Campina Grande (CEATOX-CG), comprovaram que, do atendimento de intoxicações por medicamentos, a circunstância mais elevada é a tentativa de suicídio: o número alcançou 103 casos (56,28%) de um total de 183. Ou seja, mais da metade dos atendimentos dessas intoxicações têm como circunstância a tentativa de suicídio, seguido pelo acidente individual acometido principalmente nas crianças de 1 a 9 anos (SINITOX, 2016).

O atendimento a pacientes com um quadro de intoxicação medicamentosa requer meios seguros para o auxílio clínico do diagnóstico no âmbito hospitalar, principalmente se houver dúvidas quanto ao agente causador da intoxicação (NERY, 2011). Por conseguinte, há uma necessidade de metodologias analíticas validadas e capazes de identificar e quantificar os fármacos causadores da intoxicação, para evitar maiores complicações, e ajudar no êxito do tratamento da intoxicação.

A determinação de fármacos em amostras biológicas, como a exemplo do plasma e urina em baixas faixas de concentração, é, em sua maioria, baseada em métodos de Extração Líquido-Líquido (ELL) e Extração em Fase Sólida (EFS), seguidos de identificação por técnicas Cromatográficas. A Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (Clae) é um método físico-químico de separação muito empregado para identificação de fármacos em fluidos biológicos (CAMILLO, 2014; LANÇAS, 2009).

Para que haja a identificação de fármacos em amostras biológicas é preciso cumprir os requisitos que garantam a confiabilidade da metodologia empregada, de resultados eficientes e de sensibilidade, justificando o fato de que há uma indispensabilidade da validação de metodologias com o objetivo de garantir fidedignidade dos dados.

A validação é a comprovação de que os ensaios cumprem os requisitos específicos para um determinado uso, gerando informações confiáveis e reproduzíveis (BRASIL, 2003). Atualmente a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa) é quem

estabelece as normas para o guia de validação de métodos analíticos e bioanalíticos, determinando os parâmetros e procedimentos a serem realizados, tendo como normas em vigor a resolução RDC n° 899, de 29 de maio de 2003 e a resolução RDC n° 27, de 17 de maio de 2012, esta última também dispõe sobre a validação de métodos bioanalíticos, porém voltada para estudos com fins de registro e pós-registro de medicamentos.

Segundo a resolução n° 899/2003, a validação deve conter ensaios de especificidade e seletividade, curva de calibração/linearidade, precisão, exatidão, limite de detecção (LD), limite de quantificação (LQ) e robustez conforme as especificações para cada ensaio. No que se refere à resolução n° 27/2012, esta insere, além dos ensaios mencionados anteriormente, os parâmetros efeito matriz, efeito residual e estabilidade.

Neste contexto, o objetivo do trabalho fundamentou-se em desenvolver um método bioanalítico para identificação do fármaco bromazepam, em amostras de urina baseado em cromatografia líquida de alta eficiência, validando o mesmo de acordo com parâmetros sugeridos nas Resoluções n° 899/2003 e n° 27/2012, além da perspectiva de aplicabilidade do método após a validação.

2 REVISÃO DE LITERATURA

Uma significativa parcela dos medicamentos prescritos no Brasil é da classe dos psicofármacos. Estima-se que pelo menos 13% do total de fármacos consumidos no nosso país envolva benzodiazepínicos, antidepressivos e neurolépticos, anticonvulsivantes ou estimulantes do Sistema Nervoso Central (SNC) (LUCHETTI et al., 2010).

Os benzodiazepínicos possuem propriedades sedativo-hipnóticas, estes podem ser classificados de diversas maneiras, uma delas é de acordo com o subgrupo farmacológico, classificando-os em: ansiolíticos (Alprazolam, Bromazepam, Clobazam, Clordiazepóxido, Cloxazolam, Diazepam, Lorazepam, Oxazepam), indutores de sono (Flunitrazepam, Flurazepam, Midazolam, Nutrazepam, Triazolam), anticonvulsivantes (Clonazepam, Diazepam, Nitrazepam), relaxantes musculares (Diazepam, Clordiazepóxido), medicação pré-anestésica (Lorazepam, Diazepam, Flunitrazepam) etc. (FORSAN, 2010). Sendo o bromazepam um dos benzodiazepínicos mais consumidos no mundo.

O Ácido Gama-Aminobutírico (GABA) é o principal neurotransmissor inibitório do SNC (SILVA, 2002). O tipo de receptor $GABA_A$ é o alvo molecular dos benzodiazepínicos, estes são moduladores alostéricos de receptores do $GABA_A$, que se ligam ao complexo molecular de canais de cloreto. O $GABA_A$ possui cinco subunidades da glicoproteína transmembrana dispostas em torno do canal de cloreto central (receptor ionotrópico). A ação ansiolítica dos benzodiazepínicos é decorrente de sua ligação com receptores próprios localizados no complexo receptor benzodiazepínico/receptor $GABA_A$ /canal de cloro, resultando na abertura dos canais de cloretos ativados pelo GABA e, conseqüentemente, na hiperpolarização celular pelo aumento do influxo de cloreto, o que deprime a excitação celular. Diferentemente dos barbitúricos, os benzodiazepínicos não ativam diretamente o receptor $GABA_A$, ele modula a ação do neurotransmissor GABA; esta característica confere a esta classe de medicamentos maior segurança terapêutica (DELL'OSSO; LADER, 2013; RUDOLPH; KNOFLACH, 2011; RIHEL; SCHIER, 2013; VARGAS, 2005).

Os benzodiazepínicos são, em sua maioria, bases fracas, possuindo boa absorção por via oral, atingindo pico de concentração plasmática em aproximadamente uma hora. Estes se ligam fortemente a proteínas plasmáticas e, em função da alta lipossolubilidade,

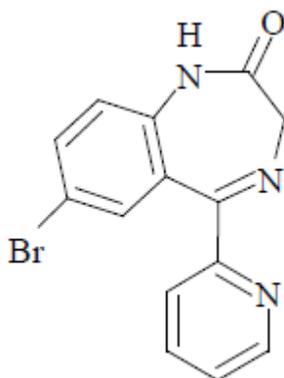
acumulam-se gradualmente na gordura corporal. Os benzodiazepínicos são metabolizados no fígado. O metabolismo é dependente do CYP3A4 e a maioria sofre oxidação microsomal (reação de fase I), subseqüentemente, os metabólitos são conjugados (reação de fase II) por glicuroniltransferases para formar glicuronídeos, que são excretados na urina. Porém, muitos metabólitos de fase I mostram-se ativos com meia vida maiores que as drogas originais (HOWARD et al, 2014; SILVA et al, 2002).

No tratamento das intoxicações por benzodiazepínicos, o flumazenil é um antídoto eficaz, agindo como antagonista dos benzodiazepínicos. Porém é usado apenas em casos graves, quando o paciente chega a casos de depressão respiratória e coma, pois existe o risco de convulsões, principalmente quando ingeridos junto a antidepressivos tricíclicos (KRESHAK et al., 2012).

Segundo os dados da Anvisa (2011), no Brasil, Clonazepam, Bromazepam e Alprazolam participam do grupo de substâncias controladas mais consumidas no período de 2007 a 2010, sob a vigência da portaria SVS/MS nº 344/98. De acordo com dados de Cruz (2015), o consumo de bromazepam em 2015 no Brasil alcançou a marca de 1,5 toneladas, tendo um dos mais altos índices de prescrições.

O bromazepam (figura 1) é um composto de fórmula molecular $C_{14}H_{10}BrN_3O$ e 316,15 g/mol de massa molecular. Apresenta-se como pó cristalino, branco ou ligeiramente amarelado, e inodoro, que é insolúvel em água, ligeiramente solúvel em etanol e cloreto de metileno (BRASIL, 2010).

Figura 1- Estrutura química do bromazepam



Fonte: BRASIL, 2010

É um fármaco pertencente à classe dos benzodiazepínicos, possuindo grande uso na clínica. Sua utilização se dá no tratamento a curto prazo de condições de ansiedade, de insônia, tensão e outras queixas somáticas ou psicológicas associadas à síndrome de ansiedade. É indicado também para o uso adjuvante da ansiedade e agitação associadas a transtornos psiquiátricos (DRUGBANK, 2008).

Assim como os fármacos da classe dos benzodiazepínicos, o bromazepam atua no receptor de GABA, do tipo GABA_A, causando uma alteração conformacional que promove a abertura dos canais de cloreto e, conseqüentemente, a hiperpolarização celular pelo aumento do influxo de cloreto, o que deprime a excitação celular (SALEM; BARSOUM; IZAKE, 2004).

O bromazepam é bem absorvido no trato gastrointestinal. O pico plasmático é alcançado dentro de duas horas após administração oral, classificando-o no grupo dos benzodiazepínicos de longa ação. Apresenta teor médio de ligação às proteínas plasmáticas de 70% e valores de pKa 11, e log P 2,54. A sua meia vida de eliminação varia entre 15 e 20 horas, ocorrendo através da excreção urinária, com metabolização hepática por via oxidativa CYP3A4 (DRUGBANK, 2008; LIMA, 2009).

O bromazepam produz dois metabólitos conhecidos: 3-hidroxi-bromazepam e 2-amino-3-hidroxi-5-bromobenzoilpiridina, sendo a recuperação urinária cerca de 3% da dose excretada na urina como fármaco inalterado, e, aproximadamente, 40% na forma conjugada (SALEM; BARSOUM; IZAKE, 2004).

Altas doses, deste fármaco pode acarretar em um quadro de intoxicação, sendo os sintomas característicos a sedação, relaxamento muscular, confusão, amnésia anterógrada, perda da consciência, hipotensão, bradicardia, podendo levar a depressão respiratória (MARC, 2008).

Nessa acepção no atendimento aos pacientes intoxicados, a anamnese, base do diagnóstico clínico, e o diagnóstico laboratorial são de suma importância para o atendimento inicial e para o prognóstico do caso. As análises toxicológicas de emergência devem ser realizadas no menor espaço de tempo possível (CARRAZA, 2014).

As informações colhidas diretamente com o paciente e/ou seus acompanhantes e investigações das circunstâncias envolvidas orientam o diagnóstico na maioria dos casos. Entretanto, a história nem sempre é obtida facilmente, em especial quando se trata de crianças, que quase nunca falam o que ingeriram; pacientes que tentam suicídio ou mesmo nos casos de violência sexual que há ingestão de substâncias que causam

amnésia anterógrada como é o caso dos benzodiazepínicos. Nessas situações, as informações devem ser confirmadas, se possível, com as manifestações clínicas e laboratoriais esperadas na intoxicação com o agente tóxico implicado na história.

Diversas técnicas podem ser usadas nas análises toxicológicas. Essas técnicas poderão ser a Cromatografia em Fase Gasosa (CG), com detectores variados: detector de ionização de chama (FID), detector de nitrogênio e fósforo (NP), de captura de elétrons (CE), fotoionização (PID); Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (Clae), com detector de arranjo de diodos (DAD), ou de fluorescência acopladas, ou não, a espectrometria de massa (MS), espectrometria de Ultravioleta-Visível (UV/VI), de absorção atômica e, até mesmo, o espectrofotômetro de infravermelho constituem-se no “*core*” de um laboratório de análises toxicológicas de emergência. A Clae é um dos métodos mais regularmente empregados na identificação de agentes tóxicos em fluidos biológicos (CARRAZA, 2014; CECCATO, 2003; NOBILIS, 2003).

A cromatografia líquida é muito utilizada na análise de fármacos, pois não se necessita volatilizar o composto, e assim correr o risco de perder o analito. Além disso, não é preciso o uso de soluções derivatizantes, as quais geralmente são substâncias de alta toxicidade (LOFFLER; TERNES, 2003).

Segundo Peres (2002), no processo da cromatografia líquida há uma partição dos componentes de uma mistura entre a fase móvel e a fase estacionária, que é constituída de partículas sólidas empacotadas em uma coluna. A fase móvel deve ser compatível com o detector empregado e possuir polaridade adequada para permitir uma separação conveniente dos componentes da amostra. Os solventes mais usados são: água, o metanol e a acetonitrila.

A utilização do detector UV tem ainda grande uso devido ao custo acessível, tanto para aquisição, quanto para manutenção dos equipamentos, bem como a ampla versatilidade na aplicação (CAMILLO, 2014).

Para a análise por cromatografia é necessário que as amostras passem por um processo de limpeza que minimizem ou retirem todos os interferentes presentes na matriz em estudo e assim facilite o processo de análise cromatográfica.

A Extração Líquido-Líquido (ELL) é um processo de separação que pode ser usado para prévia limpeza das amostras de um estudo, esta consiste no emprego de duas fases imiscíveis, denominadas de fase A e fase B, em que a fase A contém o soluto de interesse, e a fase B é geralmente o solvente orgânico. Quando as fases entram em contato, o soluto presente na fase A desloca-se, por afinidade ao solvente orgânico, para

a fase B. Em seguida, as fases são colocadas em repouso e, então, separadas mecanicamente por agitação, para obtenção da fase de interesse (LANÇAS, 2004).

Todas essas técnicas possuem poder de identificação, porém devem ser técnicas sistematizadas e validadas. A validação é a comprovação de que os ensaios cumprem os requisitos específicos para um determinado uso gerando informações confiáveis e reproduzíveis (BRASIL, 2003).

Atualmente a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa) é quem estabelece as normas para o guia de validação de métodos analíticos e bioanalíticos, determinando os parâmetros e procedimentos a serem realizados.

Segundo a resolução n° 899/2003, a validação deve conter ensaios de especificidade e seletividade, curva de calibração/linearidade, precisão, exatidão, limite de detecção (LD), limite de quantificação (LQ) e robustez conforme as especificações de cada ensaio. No que tange a RDC n° 27/2012, essa traz algumas modificações nos parâmetros a serem seguidos, preconizando que sejam feitos ensaios de efeito residual e efeito matriz; além de alterar a intitulação da especificidade para seletividade e exigir um número maior de amostras da precisão e exatidão, o que proporciona mais rigor a esses parâmetros.

A seletividade e a especificidade são dois parâmetros da validação que estão relacionados, podendo ser considerados termos sinônimos, onde se definem como a capacidade do método de medir com exatidão um analito na presença de impurezas e componentes da matriz estudada (BRASIL, 2003; GRAEF, 2007; VALENTINI; SOMMER; MATIOLI, 2007).

A Anvisa recomenda que amostras da matriz biológica (sangue, plasma, urina, etc) obtidas de 6 indivíduos diferentes sejam processadas e analisadas, e que cada amostra branco (matriz biológica isenta de padrão do fármaco e do padrão interno) deve ser testada utilizando o procedimento e as condições cromatográficas propostas, sendo os resultados comparados com aqueles obtidos em solução aquosa do analito (BRASIL, 2003).

O Efeito matriz é um dos parâmetros que a resolução n° 899/2003 não estabelece em seu escopo. Porém, a resolução n° 27/2012 preconiza que deve haver o teste de efeito matriz nas amostras do processo de validação a fim de verificar o efeito causado por componentes da matriz biológica, na resposta do analito ou Padrão Interno (PI).

Segundo a ANVISA, o efeito matriz é analisado através de amostras de matrizes biológicas processadas e adicionadas do analito (padrão) e PI, e de soluções nas mesmas

concentrações das amostras de controle de qualidade de baixa concentração (CQB) e controle de qualidade de alta concentração (CQA). Quando outras matrizes biológicas, que não o plasma, forem utilizadas devem ser analisadas 6 (seis) amostras de fontes distintas (BRASIL, 2012).

A linearidade é um parâmetro utilizado para verificar se os resultados obtidos são diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra estudada em um intervalo de concentração apropriada. É recomendado a análise para a curva de calibração da amostra branco (matriz biológica isenta de padrão do fármaco e do padrão interno), da amostra zero (matriz biológica mais o padrão interno) e de, no mínimo, 6 (seis) amostras contendo padrão do fármaco e padrão interno que constituirão os pontos da reta, contemplando o limite de variação esperado (ROCA et al. 2007).

As determinações da curva de calibração devem ser feitas a partir de amostras extraídas da matriz apropriada, no mínimo 6 (seis) concentrações diferentes, tendo como critérios de aceitação um desvio menor ou igual a 20% em relação a concentração nominal para o Limite Inferior de Quantificação (LIQ); e um desvio menor ou igual a 15 % em relação à concentração nominal para as outras concentrações da curva de calibração; como também preconiza um coeficiente de correlação linear igual ou superior a 0,98 (BRASIL, 2003).

A RDC nº 27/2012 traz definições e limites de variações equivalentes a RE nº 899/2003, diferindo no fato de deixar explícito que devem ser construídas e avaliadas, no mínimo, três curvas de calibração que incluam a análise da amostra branco, da amostra zero e de, no mínimo, 6 amostras de diferentes concentrações do padrão do analito adicionadas de PI.

A precisão de um método analítico avalia a proximidade dos resultados em uma série de medidas e pode ser determinada em condições de repetibilidade utilizando-se, no mínimo, 3 (três) concentrações (baixa, média e alta), contemplando a faixa de variação do procedimento, com no mínimo, 5 determinações por concentração (BRASIL, 2003).

A precisão deve ser determinada em uma mesma corrida (precisão intracorrída) e em corridas diferentes (precisão intercorrídas). A partir desses valores obtidos, calcula-se a média, o Desvio Padrão (DP), e o Desvio Padrão Relativo (DPR) ou o Coeficiente de Variação (CV%) que é expresso em termos de percentagem, não se admitindo valores superiores a 15%, exceto para o LIQ, para o qual se admite valores menores ou iguais a 20% (BRASIL, 2003; BRASIL, 2012).

A exatidão é calculada como porcentagem de recuperação da quantidade conhecida do analito adicionado à amostra, ou como a diferença percentual entre as médias e o valor verdadeiro aceito (BRASIL, 2003). Porém a Resolução n° 27/2012 explica que a exatidão é expressa pelo Erro Padrão Relativo (EPR%), e aceita os mesmos valores de variação para precisão e exatidão estabelecidos na Resolução n° 899/2003, não admitindo valores superiores a $\pm 15\%$ (quinze por cento) do valor nominal, exceto para o LIQ, para o qual não se admitem valores superiores ou inferiores $\pm 20\%$ (vinte por cento) do valor nominal.

Embora a RE n° 899/2003 comporta-se semelhantemente à RDC n° 27/2012 no que diz respeito aos valores de variação para precisão e exatidão, bem como no número mínimo de replicatas (cinco), esta apresenta uma divergência na quantidade de concentrações do ensaio – a RDC n° 27/2012 estabelece 5 concentrações, enquanto que a RE n° 899/2003, apenas 3.

O Limite de Quantificação (LQ) é obtido por meio da análise da matriz biológica contendo concentrações decrescentes do fármaco até o menor nível quantificável com precisão e exatidão aceitáveis. O LQ deve ser, no mínimo, cinco vezes superior a qualquer interferência da amostra branco no tempo de retenção do fármaco. É expresso em porcentagem, sendo obtido através da relação entre o desvio padrão e a inclinação da curva de calibração, ou a partir do ruído: o limite de quantificação é aquele que produz relação sinal ruído superior a 10:1 (BRASIL, 2003; RIBANI et al., 2004).

O Limite de Detecção (LD) é obtido através da análise de soluções de concentrações conhecidas e decrescentes do fármaco, obtendo-se o menor nível detectável. Recomenda-se que o LD seja de 2 a 3 vezes superior ao ruído da linha de base (BRASIL, 2003).

Por fim, entende-se por Robustez de um método analítico sua capacidade em resistir a pequenas e deliberadas variações dos parâmetros analíticos. Durante o desenvolvimento da metodologia deve-se avaliar a robustez. Constatando-se a susceptibilidade do método a variações nas condições analíticas, estas deverão ser controladas e precauções devem ser incluídas no procedimento para maior confiança dos resultados (BRASIL, 2003).

3 METODOLOGIA

3.1 DELINEAMENTO DO ESTUDO

Tratou-se de um estudo experimental e analítico, desenvolvido no Laboratório de Certificação e Desenvolvimento de Biomateriais (Certbio), da UEPB, no período compreendido entre agosto de 2014 a dezembro de 2015.

3.2 MATERIAIS, REAGENTES, EQUIPAMENTOS E ACESSÓRIOS

Éter etílico; clorofórmio; n-hexano; ácido clorídrico; hidróxido de Amônio; e ácido ortofosfórico foram obtidos da VETEC[®]; sulfato de sódio anidro (Synth[®]); acetronitrila e metanol grau HPLC (Merck[®]) e água deionizada obtida de um sistema Milli-Q. Padrões de referência bromazepam e diazepam obtidos da Pharmapele manipulação (Campina Grande-Paraíba); fitas de pH; filtros de papel; filtros de seringa com membrana PTFE 47mm-0,45µm, frascos de vidro, tubos de ensaio, pipetas automáticas.

Cromatógrafo Líquido Ultrarrápido, da marca SHIMADZU PROMINENCE UFLC XR/Ultra Fast Liquid Chromatography, equipado com duas bombas de fluxo de solventes (LC 20AD), injetor automático, lâmpada de deutério, detector UV visível (SPD 20A) e um programa de computação para integralização dos dados (interface CBM 20A). A coluna cromatográfica foi do tipo C-8 (Shim-pack XR-ODS 3.0mmi.d.x50mm/S/N 00132748).

3.3 DESENVOLVIMENTO DO MÉTODO BIOANALÍTICO

3.3.1 Preparo das Soluções

As soluções-padrão de estoque do fármaco bromazepam e diazepam, foram preparadas em metanol (grau HPLC, Merck[®]), na concentração de 1 mg/mL e acondicionadas em geladeira a aproximadamente 8°C.

3.3.2 Coleta das Amostras Biológicas

Foram coletados aproximadamente 50 mL da urina matinal de doadores dos diferentes gêneros e idades, saudáveis, e que não faziam uso de medicamentos.

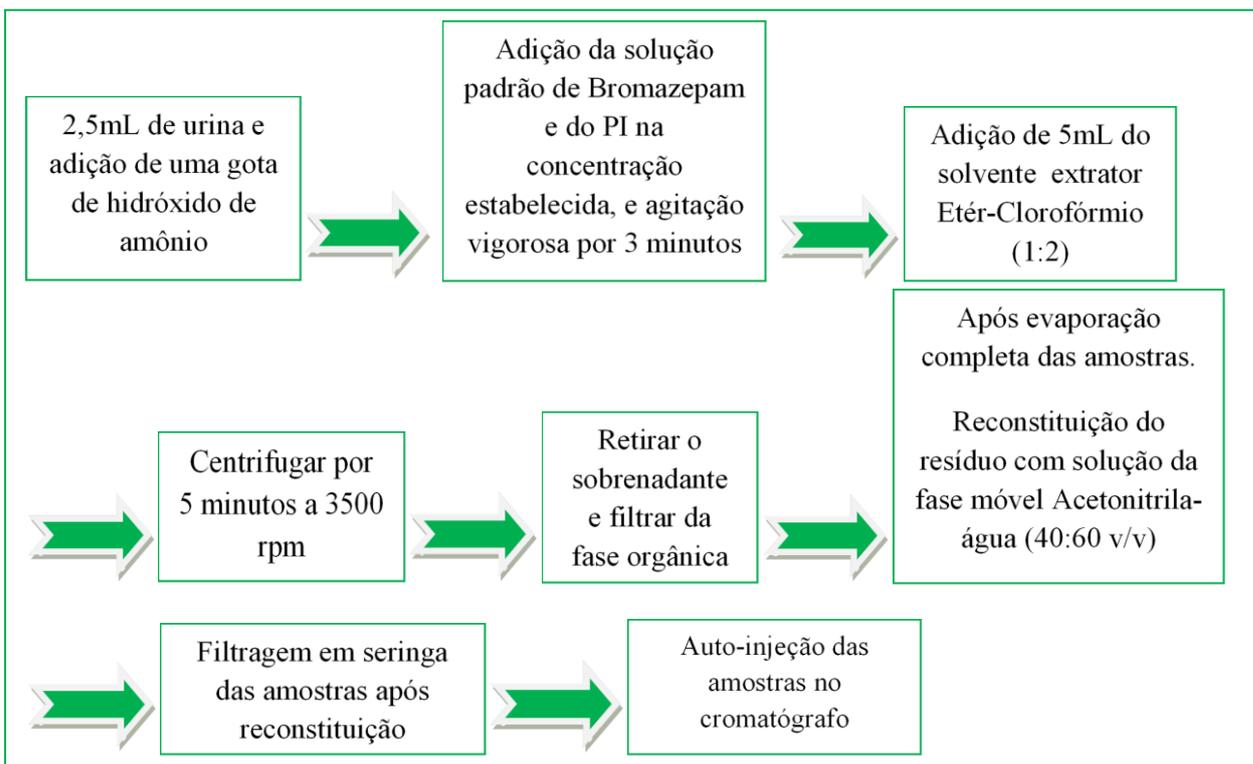
3.3.3 Extração Líquido-Líquido (ELL) na Matriz Biológica.

Um importante passo no processo extrativo é a retirada dos interferentes da amostra sem que prejudique a eficácia do método. Para a ELL do trabalho foi usado o método de *Stas-Otto*, que considera o caráter ácido/base de cada substância e do meio em que esta se encontra, bem como o seu grau de ionização, que é um dos fatores influentes em sua solubilidade em solventes orgânicos.

Na fase de extração foram realizados vários procedimentos de *Clean-up* (para a otimização das amostras), pela técnica de ELL. Desse modo, urinas de fontes distintas foram coletadas (n=6), ajustadas o pH e fortificadas com o fármaco Bromazepam para serem submetidas à ELL.

O processo extrativo das amostras (esquema 1) consistiu em preparar e ajustar o pH das urinas coletadas, além de adicionar o solvente orgânico. Além dessas etapas, a depender do parâmetro a ser analisado nas etapas de validação, fez-se necessário fortificá-las com o padrão (bromazepam) e PI numa faixa de concentração variável.

Esquema 1: Processo de extração líquido-líquido das amostras de urina fortificadas com as soluções do bromazepam e do PI (diazepam), na concentração estabelecida para cada parâmetro avaliado.



Fonte: Dados da pesquisa, 2015

3.4.1 Efeito Matriz

Para avaliar esse parâmetro foi comparada a área do pico obtida para as amostras adicionadas do fármaco durante a extração, com aquela das amostras preparadas em solução da fase móvel sem processo extrativo, sob as mesmas condições e concentração do analito de interesse, sendo definido como o Fator de Matriz Normalizado (FMN) por PI conforme a fórmula a seguir (Equação 1):

$$FMN = \frac{\text{Resposta do analito em matriz/Resposta do PI em matriz}}{\text{Resposta do analito em solução/Resposta do PI em solução}} \quad (\text{Equação 1})$$

O Coeficiente de variação (CV%) do FMN deve ser inferior a 15%.

3.4.2 Seletividade

A seletividade do método foi avaliada através do processo extrativo de 6 amostras de urina de fontes distintas em restrição do uso de qualquer medicamento, sendo

considerado seletivo quando no tempo de retenção do analito em estudo não se encontra interferentes significativos da matriz estudada. Essas amostras não sofreram fortificação com o padrão (bromazepam) e foram extraídas apenas com ajuste de pH e solvente extrator, para posterior filtração e análise no cromatógrafo.

3.4.3 Linearidade

A faixa de trabalho para a linearidade contemplou o intervalo de concentração de 12 a 300 $\mu\text{g/mL}$, visto que foi a faixa mais analisada na literatura para benzodiazepínicos e para técnica de Clae, além de ser uma faixa de sensibilidade para a quantidade de fármaco excretado na urina de forma inalterada. Para a construção da curva foram fortificadas amostras de urina em triplicata nas concentrações de 12,0; 24,0; 50,0; 100,0; 150,0 e 300 $\mu\text{g/mL}$ com o padrão bromazepam, e com adição do padrão interno na concentração fixa de 100 $\mu\text{g/ml}$ em todas as amostras. As análises foram realizadas incluindo também triplicatas da amostra branca (apenas urina na ausência de qualquer padrão), e da amostra zero (fortificada apenas com o padrão interno). A partir dessas análises, ocorridas em 3 diferentes dias, se foi possível construir uma curva de calibração por dia de análise. As amostras foram extraídas conforme o processo extrativo descrito no Esquema 1. O tratamento estatístico se deu por meio da planilha de validação do trabalho de Ribeiro e Ferreira (2008).

3.4.4 Limite de Detecção e Limite de Quantificação

Ambos foram avaliados por meio da análise de amostras de concentrações conhecidas e decrescentes do fármaco, até o menor nível detectável com boa precisão e exatidão.

3.4.5 Precisão

A precisão foi avaliada no mesmo dia e em dias alternados, consistindo da preparação das amostras em estudo por processo extrativo da matriz, em que a contaminação com padrão contemplou o intervalo linear do método com 3 concentrações: baixa (36 $\mu\text{g/mL}$), média (100 $\mu\text{g/mL}$) e alta (300 $\mu\text{g/mL}$), em 5 replicatas cada. Os resultados obtidos foram calculados segundo a equação:

$$\text{DPR \%} = \frac{\text{DP}}{\text{CMD}} \times 100 \quad (\text{Equação 2})$$

Onde: DP é o desvio padrão, e CMD a Concentração Média Determinada.

Não admitindo valores superiores a 15%, exceto para o LIQ, para o qual se admite valores menores ou iguais a 20% (BRASIL, 2003).

3.4.6 Exatidão

A exatidão do método foi avaliada no mesmo dia e em dias alternados, a partir da preparação das amostras por processo extrativo da matriz, e da contaminação com padrão no intervalo linear do método com 3 concentrações: baixa (36 µg/mL), média (100 µg/mL) e alta (300 µg/mL), em 5 replicatas cada. Os resultados obtidos foram calculados segundo a equação:

$$\text{EPR \%} = \frac{\text{concentração experimental} - \text{valor nominal}}{\text{valor nominal}} \times 100 \quad (\text{Equação 3})$$

A exatidão também foi avaliada através da recuperação, calculada pela razão da quantidade de substância adicionada pela quantidade recuperada em porcentagem.

$$\text{Exatidão recuperação} = \frac{\text{concentração média experimental}}{\text{concentração teórica}} \times 100 \quad (\text{Equação 4})$$

3.4.7 Robustez

A avaliação consistiu em pequenas e deliberadas modificações na proporção da fase móvel, no comprimento de onda, no fluxo e na temperatura do forno, observando-se a influência dessas modificações nos parâmetros da validação.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DA METODOLOGIA BIOANALÍTICA

Na fase de desenvolvimento do método, um importante passo foi a otimização das condições de análise de cada fármaco. Os fatores mais adequados foram os apresentados na Tabela 1.

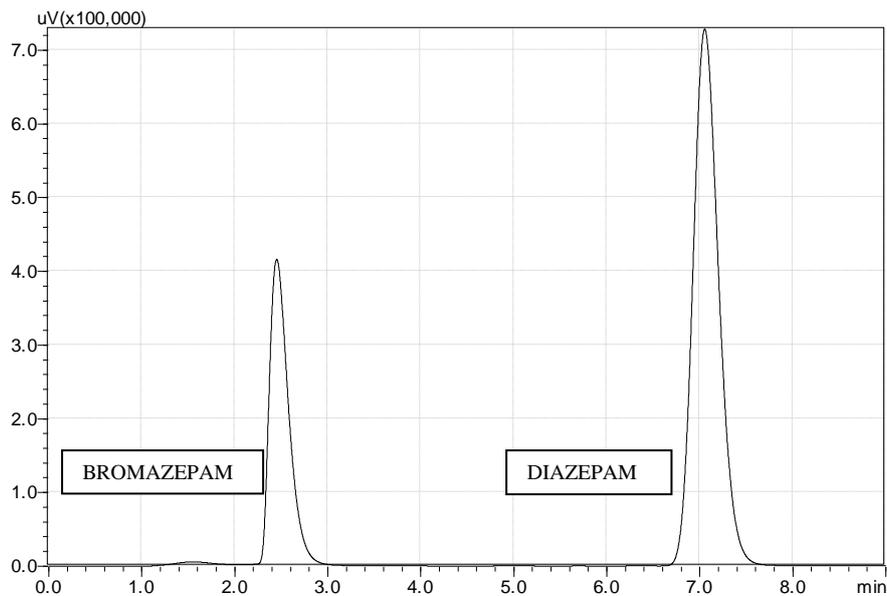
Tabela 1: Otimização das condições testadas para a análise do padrão bromazepam na concentração de 150µg/mL.

Condições	Resultados
Comprimento de onda (detector)	234nm
Composição da fase móvel	Acetonitrila-água (40:60 v/v) acidificada a pH 2,5 com ácido ortofosfórico
Fluxo da fase móvel	0,2 mL/ min
Volume de injeção da amostra	10 µL/min
Temperatura do forno	28° C
Pressão média da coluna	55atm

Fonte: Dados da pesquisa, 2015

O diazepam foi escolhido como padrão interno, sendo avaliado nas mesmas condições de análise propostas para o bromazepam. As condições utilizadas permitiram separar de forma eficaz o pico cromatográfico durante a corrida analítica (Figura 2), diferenciando seu tempo de retenção (6,9 min.) em relação ao tempo de retenção do bromazepam (2,6 min.).

Figura 2: Cromatograma da solução padrão de bromazepam e padrão interno (diazepam), dissolvidos em fase móvel nas concentrações de 100µg/mL e 150µg/mL respectivamente. Fase móvel: Acetonitrila-água (40:60 v/v), fluxo 0,2mL/min.

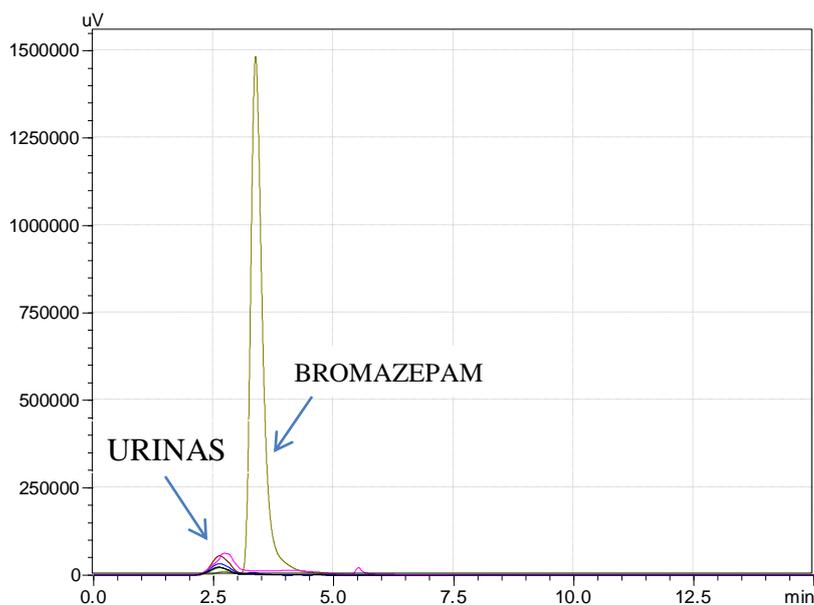


Fonte: dados da pesquisa, 2015

Após determinadas as condições analíticas ideais, o método desenvolvido foi validado conforme parâmetros propostos pela resolução n° 899/2003 e RDC n° 27/2012, contemplando a determinação da seletividade, efeito matriz, linearidade, precisão, exatidão e robustez.

O método proposto se mostrou seletivo, pois as amostras de urina (n=6) desprovidas do fármaco e submetidas ao processo de extração, não apresentaram picos de interferentes no mesmo tempo de retenção do analito quando comparadas a amostras com o fármaco em estudo (Figura 3).

Figura 3: Cromatograma da seletividade (amostras branco extraídas) em comparação com o pico do padrão bromazepam.



Fonte: dados da pesquisa, 2015

O efeito matriz do método foi avaliado segundo a RDC n° 27/2012 que utiliza para este cálculo o Fator de Matriz Normalizado (FMN).

$$FMN = \frac{(2393602,0/17430346,6)}{(4201193,1/16019990,6)}$$

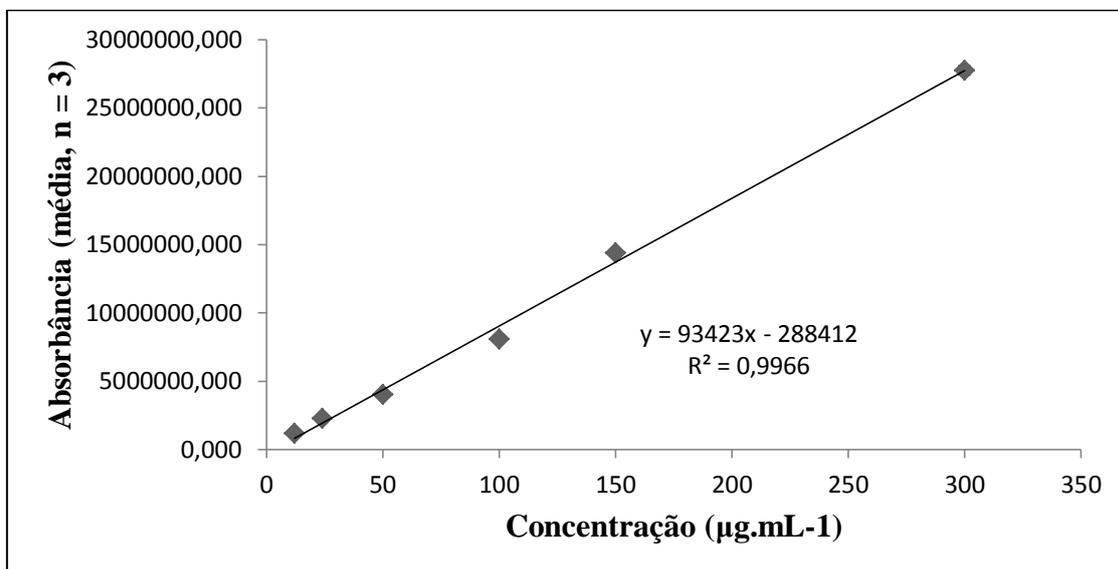
$$FMN=0,523643$$

Segundo Viswanathan et. al (2007), um valor de FMN menor que 1 (um) sugere supressão de ionização, um valor maior do que 1 (um) pode ser devido ao aumento de ionização e também pode ser causado pela perda de analito na ausência de matriz durante a análise. A supressão iônica causada pelo FMN menor que 1, pode levar a aumento do sinal/ruído durante a análise, o que influencia nos valores de LD, LQ, e desvio padrão.

O efeito matriz pode causar também aumento da resposta de recuperação, uma das formas de minimizar suas interferências é o uso de padrões internos, e a realização da curva de calibração na própria matriz (PINHO, 2009). A partir dessa análise a matriz foi utilizada com todo cuidado em busca de uma limpeza eficaz dos seus interferentes, e uso de padrão interno como forma de ajudar a minimizar os efeitos que a matriz pode causar.

O método se mostrou linear na faixa de concentração avaliada (12 a 300 µg/mL), sendo obtida a equação de regressão linear $y = 93423x - 288412$; o coeficiente de determinação (R^2) de 0,9966; e coeficiente de correlação (r) de 0,99830 (figura 4), e o coeficiente de variação inferior a 15% para todos os pontos avaliados (Tabela 2).

Figura 4: Curva de calibração média de bromazepam, nas concentrações 12,0; 24,0; 50,0; 100,0; 150,0 e 300,0µg/mL.



Fonte: Dados da pesquisa, 2015

Tabela 2: Valores das áreas dos picos pós-extração e do coeficiente de variação (CV%) para o fármaco bromazepam na curva analítica.

Concentração	Áreas	Média das áreas	DPR(%)	CV(%)
12 µg/mL	1152021	1171455,1667	1,93	1,92738703
	1196223			
	1166122			
24 µg/mL	2256941	2269400,0333	1,34	1,336491068
	2246919			
	2303740			
50 µg/mL	4044139	4031576,0000	0,35	0,354289969
	4016040			
	4034549			
100 µg/mL	8015174	8078650,6333	0,71	0,708215738
	8094530			
	8126248			
150 µg/mL	14254057	14379565,6667	1,32	1,31939998
	14597822			
	14286818			
300 µg/mL	27881180	27755914,000	1,23	1,225730138
	28015734			
	27370828			

Fonte: Dados da pesquisa, 2015

Legenda: Coeficiente de Variação (CV); Desvio Padrão Relativo (DPR)

Os valores de CV evidenciados demonstraram que as condições propostas propiciaram ao método uma boa aceitabilidade, uma vez que os mesmos foram bem menores que os limites preconizados.

A Resolução nº 899/2003 estabelece para o LQ a utilização da razão de 5:1 entre o sinal e o ruído da linha de base. Já para o LD, a resolução recomenda a razão de 2 ou 3:1. Os dados foram tratados por uma planilha de validação, a qual forneceu resultados de limite de detecção no valor de 3,23 µg/mL e o limite de quantificação 10,78 µg/mL, sendo assim considerados valores satisfatórios, uma vez que a técnica por UV não é tão sensível quando comparada ao detector com espectrômetro de massa LC-MS/MS (CHÈZE; VILLAIN; PÉPIN, 2004).

Os dados de precisão foram obtidos através da avaliação de 3 (três) níveis de concentração: (36 µg/mL), (100 µg/mL) e (300 µg/mL), em quintuplicata, sendo avaliados intracorrída e intercorrída e assim obtidas as médias para o cálculo do DPR% (Tabela 3, 4 e 5).

Tabela 3: Resultados obtidos para os estudos da precisão na concentração baixa de 36 µg/mL, intercorridas e intracorridas (3dias alternados), realizados em quintuplicata.

Concentração Real (36 µg/mL)	Concentração pós-extração	Média da concentração pós-extração	DP	DPR (%)
1º dia	36,37223783	36,81514	0,766197887	2,081203241
	36,66484498			
	36,88807126			
	37,41499076			
	36,73553631			
2º dia	35,75951875	39,01102	3,467121479	8,887543773
	38,29959415			
	38,29959415			
	39,14436565			
	38,09599385			
3º dia	35,75951875	37,50636	2,933963736	7,822576587
	37,68936463			
	38,98038257			
	39,03023678			
	36,07230618			

Fonte: Dados da pesquisa, 2015

Legenda: Desvio Padrão (DP); Desvio Padrão Relativo (DPR)

Tabela 4: Resultados obtidos para os estudos da precisão na concentração média de 100 µg/mL, intercorridas e intracorridas (3dias alternados), realizados em quintuplicata.

Concentração Real (100 µg/mL)	Concentração pós-extração	Média da concentração pós-extração	DP	DPR (%)
1º dia	103,7477043	103,7998	5,054961452	4,869914443
	101,1640952			
	107,3312557			
	101,5362444			
	105,2197424			
2º dia	101,5363726	101,9128141	4,935673561	4,843035298
	99,40334077			
	99,62372718			
	105,219988			
	103,7806421			
3º dia	107,3312557	108,2055	1,009145345	0,932619271
	108,3911621			
	108,5170072			
	108,1071696			
	108,6806741			

Fonte: Dados da pesquisa, 2015

Legenda: Desvio Padrão (DP); Desvio Padrão Relativo (DPR)

Tabela 5: Resultados obtidos para os estudos da precisão na concentração alta de 300 µg/mL, intercorridas e intracorridas (3dias alternados), realizados em quintuplicata.

Concentração Real (300 µg/mL)	Concentração pós-extração	Média da concentração pós-extração	DP	DPR (%)
1º dia	299,1166312	303,6798355	5,276456247	1,737506291
	305,1546635			
	303,0940554			
	304,9124019			
	306,1214256			
2º dia	305,4614519	306,45706	1,706462254	0,55683568
	306,8769745			
	307,7104912			
	306,1149566			
3º dia	306,1714916	304,4133922	12,87533097	4,229554709
	297,0141171			
	310,5583888			
	306,7979163			
	310,727539			
	296,969000			

Fonte: Dados da pesquisa, 2015

Legenda: Desvio Padrão (DP); Desvio Padrão Relativo (DPR)

A partir dos resultados obtidos, o método proposto apresentou precisão intracorridas e intercorridas, com médias de DPR% em todas as amostras, abaixo dos 15% aceitáveis.

A exatidão foi avaliada nas concentrações de 36 µg/mL (nível baixo), 100 µg/mL (nível médio) e 300 µg/mL (nível alto), em quintuplicata, sendo expressos os ERP% para cada concentração e calculados a sua recuperação (Tabela 6).

Tabela 6: Resultados obtidos para os estudos da exatidão intercorridas e intracorridas (3 dias alternados), realizados em quintuplicata.

Concentração Real (µg/mL)	Média das concentrações pós-extração	DPR médio (%)	(EPR%)	Exatidão (Recuperação média) %
36	37,41377044	6,263774534	3,92714	103,927
100	101,5964653	8,358365625	1,59646	101,596
300	304,8500959	2,174632227	1,61669	101,616

Fonte: Dados da pesquisa, 2015

Legenda: Desvio Padrão Relativo (DPR), Erro Padrão Relativo (EPR)

O critério de aceitação para a exatidão foi uma variação de $\pm 15\%$ para todas as amostras. As amostras tiveram valores aceitáveis de ERP%, mostrando que o método é confiável neste parâmetro ou: exato.

A recuperação reflete a eficiência de extração de um método analítico, expressa como a porcentagem da quantidade conhecida de um analito, feita na comparação dos resultados analíticos de amostras, acrescidas de padrão e submetidas ao processo de extração, com os resultados analíticos do padrão em solução não extraídos (BRASIL, 2003). Uma recuperação eficiente é avaliada a partir das características de cada analito (pKa, coeficiente de partição, meio de extração e ajuste de pH) quanto maior a afinidade do analito pelo solvente, maior será a sua extração, conseqüentemente terá altos níveis de recuperação. Segundo o trabalho de Silvério, uma fase extratora constituída de acetronitrila apresenta uma maior recuperação e boa resposta cromatográfica (QUEIROZ et al, 2001; SILVÉRIO et al, 2012).

A recuperação do método foi satisfatória visto que a resolução n° 899/2003, estabelece porcentagens de recuperação próximos a 100%, como sendo desejáveis.

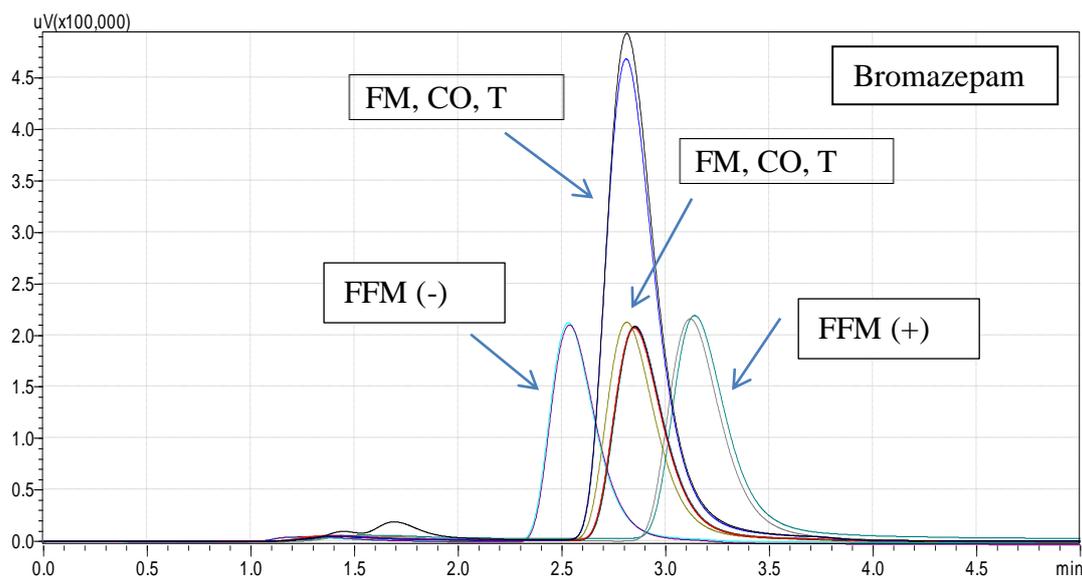
Na robustez do método foi avaliada a influência das modificações efetuadas (Tabela 7), e avaliada a influência dessas modificações no tempo de retenção, nos interferentes, na precisão e na linearidade do método. O método analítico mostrou-se robusto frente às pequenas e deliberadas modificações dos seus parâmetros analíticos, determinando que se houver variações, ainda assim ele possui fidedignidade (Figura 5).

Tabela 7: Robustez das condições testadas para a análise da capacidade do método resistir a variações.

Robustez	Variações (-)	Variações (+)
Comprimento de onda	230 nm	238 nm
Composição da fase móvel	Acetonitrila-água (38:62)	Acetonitrila-água (42:58)
Fluxo da fase móvel	0,18 mL/min	0,22 mL/min
Temperatura do forno	26°C	30°C

Fonte: Dados da pesquisa, 2015

Figura 5: Cromatograma de avaliação das modificações nos parâmetros para robustez no fármaco bromazepam.



Fonte: Dados da pesquisa, 2015

Legenda: Fluxo da Fase Móvel (FFM); Fase Móvel (FM); Comprimento de onda (CO); Temperatura (T).

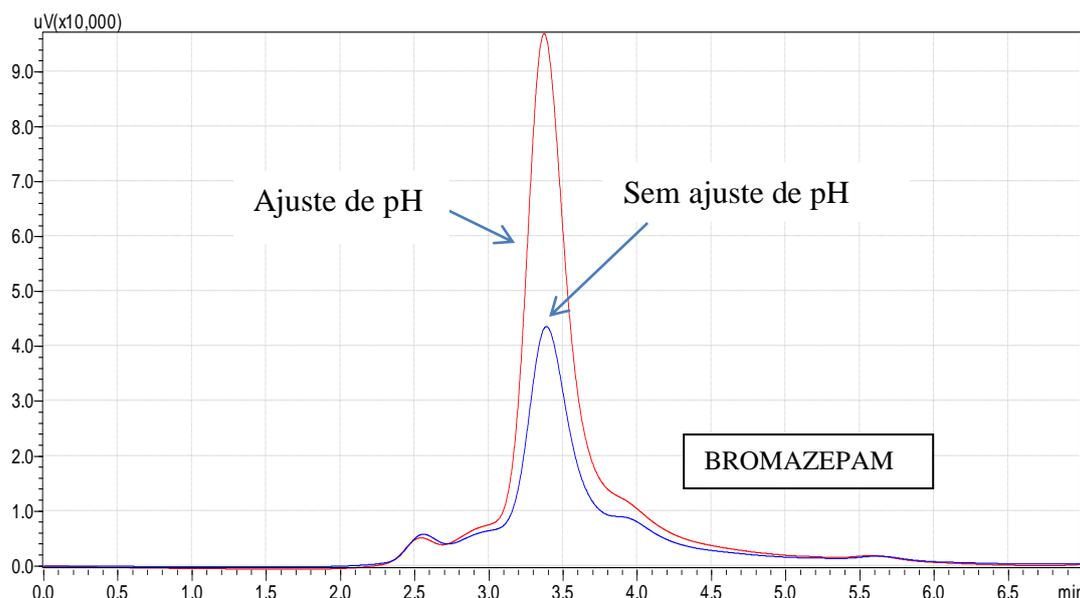
Como pode ser visto na figura 5, os picos do bromazepam, após as mudanças na fase móvel, no comprimento de onda e na temperatura, não alteraram o tempo de retenção do fármaco, nem afetaram a precisão no método.

Todavia quando o fluxo foi diminuído, ele retardou o tempo de retenção do fármaco, e quando foi aumentado, aumentou o tempo de retenção; valendo salientar que essas mudanças no fluxo não prejudicaram o método, uma vez que não foram encontrados interferentes no novo tempo de retenção no qual o bromazepam aparece, e já é sabido que modificações no fluxo modificam o tempo de retenção.

4.2 APLICAÇÃO DO MÉTODO

O método desenvolvido e validado foi aplicado em uma amostra real de um doador (masculino) em uso terapêutico de bromazepam (3mg/dia). O procedimento consistiu na coleta da amostra e na análise da mesma por processo extrativo descrito no método validado (Esquema 1), sendo realizadas 2 extrações (Figura 6): uma com ajuste de pH (pico vermelho) e outra extração da amostra sem ajuste de pH (pico azul), e posterior injeção da amostra no cromatógrafo. O cromatograma obtido encontra-se ilustrado na Figura 6.

Figura 6: Amostra real em uso terapêutico de bromazepam após extração utilizando como fase-móvel acetonitrila-água (40:60 v/v) em 234nm.



Fonte: Dados da pesquisa, 2016

Os valores encontrados na amostra com ajuste de pH, para o tempo de retenção e área do pico foram 2,56 minutos e 107260,2, respectivamente. A partir da equação da reta e área obtida foi possível calcular a concentração da amostra, encontrando-se o valor de 4,23 $\mu\text{g/mL}$ e observando-se que o valor encontrado está dentro do limite de detecção, porém fora do limite de quantificação.

Portanto, pode-se dizer que o método proposto pode ser usado, eficazmente, para o diagnóstico de casos de intoxicações por bromazepam. Observa-se, ainda, a melhora do pico (vermelho), quando teve um ajuste de pH para cerca de 10, conforme recomendado no processo extrativo do método.

Segundo Chèze (2004), após a administração única de 12 mg de bromazepam a 10 indivíduos, foi atingido um pico de concentração média no plasma de 131 ng/ml entre 1 e 4 horas, diminuindo com uma meia vida média de 11,9 h.

A administração única de comprimidos de benzodiazepínicos conduz a baixos níveis do fármaco e metabólitos na urina, dado que concentrações constantes, em sua maioria, são alcançadas apenas após alguns dias de tratamento. Técnicas clássicas como Clae com detector UV, muitas vezes, não são suficientes para quantificar casos de administração única, sendo necessárias técnicas mais sensíveis quando se trata de baixas dosagens (CHÈZE, 2004). Diante do exposto, não foi possível a quantificação da amostra com precisão e exatidão desejáveis visto ser um uso terapêutico do fármaco, estando em uma faixa de baixa concentração fora do limite de quantificação,

possibilitando apenas a identificação do fármaco vez que estava dentro do limite de detecção; todavia, casos de intoxicação abrangem altas dosagens, o que leva a crer que nesses casos serão executáveis a etapa de quantificação com precisão e exatidão satisfatórias.

5 CONCLUSÃO

O método bioanalítico desenvolvido foi otimizado em busca das melhores condições para identificação do bromazepam por cromatografia líquida de alta eficiência, sendo em seguida validado de acordo com os parâmetros da RE n° 899 de maio de 2003 e RDC n° 27 de maio de 2012.

O método mostrou-se satisfatório, apresentando-se em conformidade quanto aos parâmetros de seletividade, linearidade, precisão, exatidão e robustez.

Nessa perspectiva, os objetivos propostos foram alcançados com a validação satisfatória do método e aplicação em amostras reais de um doador em uso terapêutico de bromazepam, predizendo que o método pode ser utilizado para diagnosticar casos de intoxicação pelo referido fármaco. Pode-se ainda dizer que esta metodologia pode ser utilizada para identificação de outros medicamentos da mesma classe terapêutica, uma vez que compostos com ação farmacológica e estrutura química muito semelhante podem ser diferenciados e identificados com pequenos ajustes no método.

REFERÊNCIAS

American Association Of Poison Control Centers (AAPCC): National Poison Data System. Overview of the 2014 Annual Report of the American Association of Poison Control. Centers' National Poison Data System. Disponível em: <<http://www.aapcc.org/data-system/>>. Acesso em: 16 mar. 2016

BRASIL. ANVISA - AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. Resolução RDC nº 899, de maio de 2003. **Diário Oficial da União**. Poder Executivo, Brasília, 2003.

BRASIL. ANVISA - AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Dispõe sobre os requisitos mínimos para a validação de métodos bioanalíticos empregados em estudos com fins de registro e pós-registro de medicamentos. Resolução RDC nº 27, de maio de 2012. **Diário Oficial da União**. Poder Executivo, Brasília, 2012.

BRASIL. ANVISA - AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Dispõe sobre a atualização do anexo I, listas de substâncias entorpecentes, psicotrópicas percussoras e outras sob controle especial, da portaria SVS/MS nº 344, de 12 de maio de 1998 e dá outras providências. Resolução RDC nº 36, **Diário Oficial da União**. Seção 1, de 5 de agosto de 2011.

BRASIL. Farmacopeia Brasileira. 5.ed. Brasília: AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2010.

CARRAZA, M. Z. N. Análises toxicológicas de emergência. In: OGA, S. **Fundamentos da toxicologia**. 2.ed. São Paulo: Atheneu, cap. 4.15, 2014.

CAMILLO, E. **Desenvolvimento de método para a determinação de nicotina e clozapina em plasma humano utilizando CLAE-UV**. 2014. Dissertação (Mestrado) Programa de Pós-Graduação de Ciências da Saúde. Universidade de Brasília, 2014.

CECCATO, R.; KLINKENBERG, P.H.; HUBERT, B. Sensitive determination of buprenorphine and its N-dealkylated metabolite norbuprenorphine in human plasma by liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**. v. 32, p. 619– 631, 2003.

CHÉZE, M.; VILLAIN, M.; PÉPIN, G. Determination of bromazepam, clonazepam and metabolites after a single intake in urine and hair by LC–MS/MS-Application to forensic cases of drug facilitated crimes. **Forensic Science International**. v. 145 p.123– 130, 2004.

CRUZ, M. G. **Lorazepam no tratamento do alcoolismo: uma revisão**. 2015. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Farmácia)-Universidade de Brasília-UnB/Faculdade de Ceilândia -FCE, 2015.

DRUGBANK DATABASE 3.0. Bromazepam. Disponível em: <<http://www.drugbank.ca/drugs/DB00829>>. Acesso em: 18 mar 2015.

DELL'OSSO, B.; LADER, M. Do benzodiazepines still deserve a major role in the treatment of psychiatric disorders? A critical reappraisal. **European Psychiatry**. v.28, Issue.1, p. 7–20, Janeiro de 2013.

FORSAN, M. A. **O uso indiscriminado de benzodiazepínicos: uma análise crítica das práticas de prescrição, dispensação e uso prolongado**. 2010. Trabalho de Conclusão de Curso de Especialização (Atenção Básica em Saúde da Família)– Universidade Federal de Minas Gerais. Campos Gerais, 2010.

GRAEF, L. E. **Desenvolvimento e validação de um método analítico quantitativo por eletroforese capilar para tuberculostáticos de primeira escolha**. 2007. Curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 2007.

HOWARD, P.; et al. Therapeutic Reviews: Benzodiazepines. **Journal of Pain and Symptom Management**. v.47, Issue.5, p. 955–964, maio de 2014.

Instituto Nacional de Emergência Médica (INEM): Centro de Informação Antivenenos- CIAV. Estatísticas- Intoxicações-2014. Disponível em: < <http://www.inem.pt/stats/stats.asp?stat=20&stats=23> >. Acesso em: 22 mar. 2016.

KRESHAK, A. A. et al. A Poison Center's Ten-year Experience with Flumazenil Administration to Acutely Poisoned Adults. **The Journal of Emergency Medicine**. v.43, n.4, p. 677–682, Outubro de 2012.

LANÇAS, F. M. **Extração em Fase sólida (SPE)** - São Carlos: Rima, 2004.

LANÇAS, F. M. A Cromatografia Líquida Moderna e a Espectrometria de Massas: finalmente “compatíveis”? **Scientia Chromatographica**. v. 1, n. 2, 2009.

LOFFLER, D.; TERNES, T. A. Determination of acidic pharmaceuticals, antibiotics and ivermectin in river sediment using liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**. v. 1021, p. 133–144, 2003.

LIMA, A. P. S. **Desenvolvimento de métodos eletroforéticos e cromatográficos para a determinação de benzodiazepínicos como adulterantes em formulações fitoterápicas para emagrecimento**. 2009. Dissertação (Mestrado em química analítica). Centro de Ciências Naturais e Exatas. Universidade Federal de Santa Maria, 2009.

LUCHETTI, G. et al. Fatores associados ao uso de psicofármacos em idosos asilados. **Revista de Psiquiatria do Rio Grande do Sul**. Rio Grande do Sul, v. 32, n. 2, p. 38-43, 2010.

MARC, B. Current clinical aspects of drug-facilitated sexual assaults in sexually abused victims examined in a forensic emergency unit. **Therapy Drug Monitoring**. v. 30, n. 2, p. 218-224, 2008.

NERY, A. A. P. **Ensaios cromatográficos para identificação de Fenobarbital em urina, para o diagnóstico laboratorial de intoxicações humanas**. 2011. Trabalho de

Conclusão de Curso (Bacharelado em Farmácia)- Universidade Estadual da Paraíba, Campina Grande, 2011.

National Poisons Information Service (NPIS). Public health England. Report 2013/2014. Disponível em: < <http://www.npis.org/annualreports.html>>. Acesso em: 22 mar. 2016.

NOBILIS, M. et al. Comparative biotransformation and disposition studies of nabumetone in humans and minipigs using high-performance liquid chromatography with ultraviolet fluorescence and mass spectrometric detection. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**. v.32, p.641– 656, 2003.

PERES, T. B. Noções Básicas de Cromatografia. Centro de Pesquisa e Desenvolvimento de Proteção Ambiental. **Biológico**, São Paulo, v. 64, n. 2, p. 227-229, Julho de 2002.

PINHO, G. P. de. **Efeitos de componentes da matriz na análise de agrotóxicos por cromatografia gasosa**. Tese (Doutorado) Programa de Pós-Graduação em Agroquímica. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-Minas Gerais, 2009.

QUEIROZ, S. C. N.; COLLINS, C. H.; JARDIN, I. C. S. F. Métodos de extração e/ou concentração de compostos encontrados em fluidos biológicos para posterior determinação cromatográfica. **Química Nova**. v.24, n. 1, p. 68-76, 2001.

RIHEL, J.; SCHIER, A. F. Sites of action of sleep and wake drugs: insights from model organisms. **Current Opinion in Neurobiology**. v. 23, p. 831-840, 2013.

RIBANI, M. et al. Validação de métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**. São Paulo, v. 27, n. 5, p. 771-780, 2004.

RIBEIRO, F. A de L; FERREIRA, M. M. C. Planilha de validação: uma nova ferramenta para estimar figuras de mérito na validação de métodos analíticos univariados. **Química Nova**. v. 31, n.1, p. 164-171, 2008.

ROCA, M. F. L. et al. Desenvolvimento e validação de método analítico: passo importante na produção de medicamentos. **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 88, n. 4, p. 177-180, 2007.

RUDOLPH, U.; KNOFLACH, F. Beyond classical benzodiazepines: Novel therapeutic potential of GABA_A receptor subtypes. **Nature Reviews Drug Discovery**. v.10, p.685– 697, julho de 2011.

SALEM, A.A; BARSOUM, B.N; IZAKE, E.L. Spectrophotometric and fluorimetric determination of diazepam, bromazepam and clonazepam in pharmaceutical and urine samples. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**. v. 60, p.771–780, março de 2004.

SINTOX. SISTEMA NACIONAL DE INFORMAÇÃO TÓXICO-FARMACOLÓGICA. CENTRO DE INFORMAÇÃO CIENTÍFICA E TECNOLÓGICA. FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ. **Casos Registrados de**

Intoxicação Humana, de Intoxicação Animal e de Solicitação de Informação por Região e por Centro. Brasil, 2016. Disponível em: <http://www.fiocruz.br/sinitox_novo/media/b1.pdf>. Acesso em: 25 de fevereiro de 2016.

SILVA L, VERGARA E, YERA I, FEIJOSO, E. Utilización de benzodiazepinas em la atención Primaria de salud. **Revista Cubana de Medicina General Integral.** v. 3, n. 18, p. 187-190, 2002.

SILVÉRIO, F. O.; et al. Análise de agrotóxicos em água usando extração líquido-líquido com partição em baixa temperatura por cromatografia líquida de alta eficiência. **Química Nova.** v. 35, n. 10, 2012.

VALENTINI, S. R.; SOMMER, W. A.; MATIOLI, G. **Validação de métodos analíticos.** Arquivos do Mudi, v. 11, n. 2, p. 26-31, 2007.

VARGAS, K. F. M. **Administração de anfetamina e pentilenotetrazol após primeira passagem com tempo reduzido induz tolerância de primeira passagem no labirinto em cruz elevado.** 2005. Dissertação parcial para Mestrado (Mestrado em Farmacologia). Universidade Federal do Paraná. Paraná, 2005.

VISWANATHAN, C. T. et al. Quantitative bioanalytical methods validation and implementation: best practices for chromatographic and ligand binding assays. **Pharmaceutical Research.** v. 24, n. 10, p 1962-1973, Outubro de 2007.