



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE FARMÁCIA
CURSO DE BACHARELADO EM FARMÁCIA**

ITAVIELLY LAYANY FRANÇA FEITOSA

**OTIMIZAÇÃO DE METODOLOGIA ANALÍTICA PARA PESQUISA DE
FLUOXETINA EM URINA DE PACIENTES INTOXICADOS.**

**CAMPINA GRANDE -PB
2012**

ITAVIELLY LAYANY FRANÇA FEITOSA

**OTIMIZAÇÃO DE METODOLOGIA ANALÍTICA PARA PESQUISA DE
FLUOXETINA EM URINA DE PACIENTES INTOXICADOS.**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao
Curso de Graduação em Farmácia da Universidade
Estadual da Paraíba, em cumprimento à exigência
para obtenção do grau de Bacharel em Farmácia.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. SAYONARA MARIA
LIA FOOK

CAMPINA GRANDE-PB
2012

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA CENTRAL – UEPB

F311o Feitosa, Itavielly Layany França.
 Otimização de metodologia analítica para pesquisa de
 fluoxetina em urina de pacientes intoxicados. [manuscrito] /
 Itavielly Layany França Feitosa. – 2012.
 27 f. : il. color.

Digitado.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em
Farmácia) – Universidade Estadual da Paraíba, Centro de
Ciências Biológicas e da Saúde, 2012.

“Orientação: Profa. Dra. Sayonara Maria Lia Fook,
Departamento de Farmácia.”

1. Cromatografia. 2. Fluoxetina. 3. Espectroscopia. I.
Título.

21. ed. CDD 544.92

ITAVIELLY LAYANY FRANÇA FEITOSA

**OTIMIZAÇÃO DE METODOLOGIA ANALÍTICA PARA PESQUISA DE
FLUOXETINA EM URINA DE PACIENTES INTOXICADOS.**

Aprovado(a) em: 21 DE NOVEMBRO DE 2012

BANCA EXAMINADORA:

Sayonara Maria Lia Fook

Prof^a Dr^a Sayonara Maria Lia Fook
Depto. Farmácia/CCBS/UEPB
Orientador(a)

Nícia Stellita da Cruz Soares

Prof^a Msc Nícia Stellita da Cruz Soares
Depto. Farmácia/CCBS/UEPB
Examinador(a)

Rosemary Sousa Cunha Lima

Prof^a Dr^a Rosemary Sousa Cunha Lima
Depto. Farmácia/CCBS/UEPB
Examinador(a)

AGRADECIMENTOS

Hoje, vivo uma realidade que parece um sonho, mas foi preciso muito esforço, determinação, paciência, perseverança, ousadia e maleabilidade para chegar até aqui, e nada disso eu conseguiria sozinha. Minha eterna gratidão a todos aqueles que colaboraram para que este sonho pudesse ser concretizado.

Grata a Deus por ter me concedido o dom da vida, por ter me dado forças a cada dificuldade, por ter me mostrado o porquê de cada obstáculo que surgiu no meu caminho os quais só me fortaleceram, por ter me dado uma família e amigos maravilhosos, por tudo que tenho nessa vida, pelo seu amor infinito, sem Ele nada sou.

Agradeço aos meus pais, Daniel Aurélio e Josefa Norberto, meus exemplos de vida. Obrigada por cada incentivo, orientação, confiança e compreensão ao longo da minha vida e principalmente nesses últimos cinco anos. Mãe, obrigada por todo amor e pelas orações feitas a cada noite em meu favor. Pai, obrigada pela preocupação para que eu estivesse sempre andando pelo caminho correto.

A minha irmã, Izabela, agradeço por todo amor e carinho. Por todos os ensinamentos que me deram estrutura para que me tornasse a pessoa que sou hoje. Obrigada pelas orações e pela compreensão que tens comigo.

À professora Sayonara Maria Lia Fook que, com muita paciência, atenção e competência, dedicou do seu valioso tempo para me orientar neste trabalho. Aos professores Nícia Stellita, Rosemary Cunha, Josimar Medeiros e Valéria Morgiana, que de maneira direta ou indireta puderam contribuir com meu aprendizado e sucesso na minha vida acadêmica.

Aos meus colegas de classe, em especial, Suellen Feitosa, Brunno Félix e Natan Emanuell, quem aprendi a amar e construir fortes laços. Obrigada por todos os momentos em que fomos estudiosos, brincalhões, atletas, músicos e cúmplices. Porque em vocês encontrei verdadeiros amigos. Obrigada pela paciência, pelo sorriso, pelo abraço, pela mão que sempre se estendia quando eu precisava. Esta caminhada não seria a mesma sem vocês.

Aos meus colegas de Iniciação Científica, principalmente Monalisa, assim como, Lídia, Gabriela, Aleska e Paulo que com dedicação e sabedoria me ajudaram a desenvolver grande parte deste trabalho.

Aos meus amigos, Aninha, Larissa, Kelly, Suelen, Rogers, Aillane e Mayara por todo apoio e cumplicidade. Apesar da distância de alguns, estavam presentes em minha vida.

Obrigada a todos que, mesmo não estando citados aqui, tanto contribuíram para a conclusão desta etapa e para a Itavielly Layany que sou hoje.

OTIMIZAÇÃO DE METADOLOGIA ANALÍTICA PARA PESQUISA DE FLUOXETINA EM URINA DE PACIENTES INTOXICADOS.

FEITOSA, Itavielly Layany França¹, FOOK, Sayonara Maria Lia²

RESUMO

A utilização de psicofármacos tem crescido nas últimas décadas em todo mundo, devido ao aumento dos diagnósticos de transtornos psiquiátricos na população. A depressão é um dos distúrbios afetivos, que resulta na deficiência da transmissão monoaminérgica. A fluoxetina pertence à classe dos inibidores da reuptake da serotonina e é usada no tratamento desta doença. O fato dos medicamentos, principalmente os antidepressivos, serem uma das principais causas das intoxicações no Brasil, aumenta o desafio dos laboratórios de análises toxicológicas a desenvolverem metodologias analíticas para identificar esses fármacos. A cromatografia é um método utilizado para analisar, identificar ou separar os componentes de uma mistura, entre os tipos de cromatografia tem a Cromatografia em Camada Delgada Comparativa (CCDC) e a Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR). O objetivo deste trabalho foi otimizar metodologia analítica para identificação de Fluoxetina em urina de pacientes, atendidos no Centro de Informação e Assistência Toxicológica de Campina Grande (Ceatox-CG), com diagnóstico clínico de exposição tóxica por Fluoxetina. Tratou-se de uma pesquisa transversal, descritiva e analítica. A partir dos dados obtidos, pode-se afirmar que a técnica em CCDC é de fácil execução, barata e precisa, sendo adequada para procedimentos como *Screening* de amostras biológicas. Portanto, reafirma-se a necessidade de confirmá-los por outras técnicas como: a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) e Cromatografia Gasosa (CG) e a Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR), sendo assim possível correlacionar os perfis cromatográficos e espectrofotométricos, entre as diferentes técnicas.

PALAVRAS-CHAVE: Exposições tóxicas. Fluoxetina. Cromatografia. Espectroscopia.

¹Graduanda do Curso de Farmácia Generalista/ Universidade Estadual da Paraíba (UEPB) /
layany_feitosa60@hotmail.com

²Professora do departamento do Curso de Farmácia Generalista/ Universidade Estadual da Paraíba (UEPB)

1 INTRODUÇÃO

A utilização de psicofármacos tem crescido nas últimas décadas em vários países ocidentais e, até mesmo, em alguns países orientais. Esse crescimento tem sido atribuído ao aumento da frequência de diagnósticos de transtornos psiquiátricos na população, à introdução de novos psicofármacos no mercado farmacêutico e às novas indicações terapêuticas de psicofármacos já existentes (RODRIGUES; FACCHINI; LIMA, 2006). Esta classe de medicamentos vem sendo motivo de grande preocupação para as autoridades e os profissionais de saúde, pois é considerado o principal agente de intoxicação humana, representando um grande problema de Saúde Pública (ROCA et al., 2007).

Em relação às doenças psíquicas que afetam a população mundial, estima-se que 450 milhões de pessoas sofrem destes transtornos mentais; entre essas, 70 milhões sofrem dependência do álcool; 50 milhões têm epilepsia; 24 milhões sofrem de esquizofrenia; entre 10 a 20 milhões tentam suicidar-se e destas um milhão o cometem. No Brasil, a depressão situa-se em quarto lugar entre as dez principais patologias que acometem nossa população (BRASIL, 2010).

A descoberta no final da década de 50 de drogas antidepressivas e a sua utilização na prática clínica trouxe um avanço importante no tratamento e no entendimento de possíveis mecanismos subjacentes aos transtornos depressivos. Dessa forma a depressão passava a ser um problema médico, passível de tratamento, semelhante a outras doenças como diabetes e a hipertensão arterial.

A depressão é um transtorno afetivo comum, crônico e recorrente. A prevalência na população em geral é de 3 a 5%, já em populações clínicas, a incidência é ainda maior, uma vez que a depressão é encontrada em 5% a 10% dos pacientes ambulatoriais e 9% a 16% de internados (TENG; HUMES; DEMETRIO, 2005, PAULA 2007).

Os progressos no desenvolvimento de novas drogas e o surgimento de uma nova caracterização da depressão banalizaram o uso dos antidepressivos, logo a depressão passou a ser apresentada como uma doença comum, tratável como qualquer outra. Assim, utilizar um psicofármaco pode ser algo tão absolutamente natural para um grande número de pessoas assim como prescrevê-los, favorecendo este grande problema, o uso indiscriminado de drogas altamente e potencialmente tóxicas para nossos organismos (BENIA, 2005).

Devido a esse aumento de diagnósticos e conseqüentemente venda dos antidepressivos foram muitos os estudos e descobertas. Até, 1980, a depressão era tratada usando os

Antidepressivos Tricíclicos (ADT), os Inibidores da Monoaminoxidase (IMAOs) e o Lítio. Atualmente, uma nova geração de fármacos é utilizada, os Inibidores Seletivos da Recaptação de Serotonina (ISRSs). Os ISRSs pertencem a uma classe de medicamentos utilizados para o tratamento de uma série de patologias relacionadas à fisiologia do neurotransmissor serotonina. O estudo sobre estes fármacos tem melhorado de uma maneira significativa à farmacologia do tratamento de patologias consideradas psíquicas, pelo fato deles serem usados em pequenas doses, revolucionando assim o tratamento da depressão (PRADO et al., 2006; ANDRADE; SILVA, 2007, CARDOSO, 2011).

Como muitas pesquisas apontam, os medicamentos são a principal causa das intoxicações no Brasil nas últimas décadas, sendo assim é necessário o estudo de identificação dessas drogas em pacientes intoxicados, as pesquisas são realizadas por análises toxicológicas de urgência.

A otimização das metodologias analíticas permite que ocorra aplicação de técnicas cromatográficas e espectrofotométricas em amostras biológicas na rotina de um laboratório de emergência toxicológica e nos serviços públicos de saúde, possibilitando assim um auxílio na confirmação do diagnóstico e no prognóstico dos pacientes com histórico de exposição tóxica por medicamentos.

Este trabalho teve como objetivo otimizar um método de identificação e confirmação de Fluoxetina através da comparação das técnicas analíticas em CCDC e FTIR, avaliando os parâmetros de validação de acordo com a Resolução-RDC Nº 899 de 29 de maio de 2003 e analisar o perfil epidemiológico dos pacientes admitidos com história de exposição e ou intoxicação no Hospital de Emergência e Trauma de Campina Grande, atendidos e notificados pelo Centro de Informação Toxicológica de Campina Grande (Ceatox-CG), entre os meses de agosto a setembro de 2012.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

No Brasil e outros países, como Alemanha, Canadá e Inglaterra, os medicamentos vêm preocupando as autoridades e os profissionais de saúde, pois se apresentam como o principal agente tóxico responsável pelos casos de intoxicações humanas, constituindo, portanto, um grande desafio para os que trabalham com a Saúde Pública (FALCÃO, 2004; SISTEMA..., 2012). Intoxicações por medicamentos alcançam o primeiro lugar entre os agentes tóxicos envolvidos em atendimento médico em serviços de urgência e emergência no nosso País. Foi

realizado um estudo que teve como objetivo avaliar o impacto das intoxicações por Antidepressivos Tricíclicos (ADT), atendidos em um hospital terciário comparando com as intoxicações ocasionadas por outras drogas depressoras do Sistema Nervoso Central (SNC), entre os anos de 2001 e 2003. No período de um total de 2.950 atendimentos, 123 foram casos de intoxicação por ADT e 275 casos foram por depressores do SNC (FERNANDES et al., 2006).

Segundo, Lage e Monteiro (2011), o termo depressão foi implantado no século XIX, o qual se relacionava com o termo melancolia que era utilizado até então. Com relação a todas as denominações e classificações, os sintomas centrais da depressão continuam sendo: a tristeza sem motivo justificável, o silêncio devido à dificuldade de falar e expressar seus sentimentos, o desânimo, a falta de interesse pela própria vida, pelo trabalho, pelos compromissos em geral e pelas relações sociais, a irritabilidade, a inapetência e a insônia. O sentimento de angústia, a falta de sentido na vida e de esgotamento caracteriza os casos mais graves, chegando às ideias de tentativas de suicídio (JARDIM, 2011).

Até a década de 80, já havia duas classes de antidepressivos, os Tricíclicos (ADTs) e os Inibidores da Monoaminoxidase (IMAOs) que foram descobertos quase que simultaneamente os quais atuam aumentando o nível cerebral das monoaminas, noradrenalina e serotonina que apresentam boa eficácia devida á sua ação. Contudo, apresentam efeitos colaterais indesejáveis causados pela inespecificidade de sua ação farmacológica letais em casos de superdosagem. Nas últimas décadas, surgiram novas classes de antidepressivos a partir de pesquisa de moléculas desprovidas de efeitos colaterais dos heterocíclicos. Eles diferem dos clássicos ADTs e dos IMAOs irreversíveis pela seletividade farmacológica, modificando e atenuando os efeitos colaterais (STAHL, 1997; MORENO; MORENO; SOARES, 2005).

Os Inibidores Seletivos da Receptação da Serotonina (ISRSs), como a Fluoxetina, Fluvoxamina, Sertralina e Citalopram, iniciaram uma nova era no desenvolvimento de drogas utilizadas no tratamento de transtornos psiquiátricos, foram desenvolvidos na década de 70 e classificados de acordo com a ATC (*Anatomical-Therapeutic-Chemical Classification System*) como psicoanaléptico, drogas que aumentam o tônus psíquico.

A fluoxetina é usada no tratamento da depressão severa. Como esse fármaco é um inibidor da receptação da serotonina e não da receptação de noradrenalina, tem pouca afinidade para os receptores muscarínicos, histamínicos, serotonina e noradrenérgicos o que

explica a menor incidência de efeitos colaterais (SABBIONI et al., 2004; PRADO et al., 2006).

A forma molecular da fluoxetina é a N-metil-8-[4-(trifluorometil)fenoxi] benzenopropanamina, a presença do substituinte p-trifluorometil na molécula parece contribuir para a alta seletividade do fármaco e sua potencialidade para a inibição da recaptação de serotonina, possivelmente como resultado do efeito de repulsão eletrônica ou de lipofilicidade (CARDOSO, 2011).

O fato dos medicamentos serem apontados como a principal causa das intoxicações no Brasil nas últimas décadas, aumenta o desafio dos laboratórios de análises toxicológicas a desenvolverem metodologias analíticas para a pronta pesquisa e identificação de fármacos envolvidos nos casos de intoxicação aguda. O diagnóstico pode ser realizado com o auxílio de exames complementares e análises específicas para determinação do agente tóxico. As análises toxicológicas de urgência, geralmente envolvem agente desconhecido, conhecido ou suspeito, tornando-se um grande desafio identificar e/ou confirmar essa substância química. As principais técnicas empregadas são: Espectrometria, Cromatografia Gasosa (CG), Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC) e Cromatografia por Camada Delgada Comparativa (CCDC), submetendo substâncias de referência a estes sistemas, assim, se pode identificar substâncias presentes nas amostras analisadas, através de comparações do seu comportamento em determinado sistema com o referido padrão de referência. A investigação de fármacos é, provavelmente, a mais frequente dos testes toxicológicos e, dependendo do fármaco e das suas características fármaco-toxicológicas e do tempo decorrido da exposição, pode ser detectado na forma inalterada ou biotransformada em sangue ou na urina (AMÉRICO; MOSSIN; NISHIYAMA, 2008).

Afirma Karp (2005), que a cromatografia, por se tratar de um método físico-químico, pode ser utilizada para analisar, identificar ou separar os componentes de uma mistura em amostras biológicas.

A Cromatografia em Camada Delgada Comparativa (CCDC) pode ser utilizada no diagnóstico de exposições tóxicas por medicamentos por apresentar procedimentos analíticos rápidos, de fácil execução, abrangentes, de baixo custo, auxiliando na identificação de psicofármacos, como a Fluoxetina (TRUJILLO et al., 2007; AMÉRICO; MOSSIN; NISHIYAMA, 2008).

A Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier – FTIR pode ser usada para identificação e caracterização de compostos orgânicos, inorgânicos e poliméricos.

Basicamente o que se mede nesta análise, é a fração da energia transmitida ou absorvida em relação à incidente em determinado comprimento de onda ou número de onda (YANG; IRUDAYARAJ, 2002).

Todos os métodos bioanalíticos que tem por objetivo a identificação e determinação quantitativa de fármacos devem ser validados em ordem da garantia da segurança dos resultados de doseamento. De essa maneira adquirirão importância crescente em todas as áreas de conhecimento que as mesmas possam abranger, facilitando sua execução e garantindo a confiabilidade de tal método (SILVA et al., 2009).

A validação consiste no ato de tornar legítimo ou legal um método, equipamento, sistema ou metodologia através do estabelecimento de documentações, visando diminuir ou controlar os fatores que levam à imprecisão ou inexatidão, para garantir a confiabilidade e rastreabilidade dos dados gerados. Para validar um método é essencial que sejam incluídos pelo menos os seguintes parâmetros: exatidão, que é a proximidade dos resultados obtidos pelo método em estudo em relação ao valor verdadeiro; precisão, que é a avaliação da proximidade dos resultados obtidos em uma série de medidas de uma amostragem múltipla de uma mesma amostra; linearidade, que corresponde à capacidade do método de fornecer resultados diretamente proporcionais à concentração da substância em exame; limite de detecção é estabelecido por meio da análise de soluções de concentrações conhecidas e decrescentes do fármaco, até o menor nível detectável; limite de quantificação é a menor quantidade do analito em uma amostra que pode ser determinada com precisão e exatidão aceitáveis sob as condições experimentais estabelecidas; especificidade, é a capacidade que o método possui de medir exatamente um composto em presença de outros componentes tais como impurezas, produtos de degradação e componentes da matriz; robustez, é a medida de sua capacidade em resistir a pequenas e deliberadas variações dos parâmetros analíticos. (RIBANI, et al., 2004; LANÇAS, 2004; PRADO et al., 2006; VALENTINI; SOMMER; MATIOLI, 2007).

Como pode-se observar são muitos os métodos e técnicas analíticas que nos permitem identificar os princípios ativos presentes em algumas substâncias. Sendo essas técnicas escolhidas a partir da avaliação de alguns fatores, tanto referentes à substância analisada, como suas propriedades químicas, físicas e biológicas, bem como as características da técnica, como: disponibilidade, simplicidade, viabilidade financeira, adequação do método, dentre outros.

3 REFERENCIAL METODOLÓGICO

3.1 Dados Epidemiológicos

Tratou-se de uma pesquisa prospectiva, descritiva e analítica. Os dados epidemiológicos foram coletados dos pacientes admitidos com história de exposição e ou intoxicação no Hospital de Emergência e Trauma de Campina Grande, atendidos e notificados pelo Centro de Informação Toxicológica de Campina Grande (Ceatox-CG), entre os meses de agosto a setembro de 2012. Utilizou-se a ficha do Sistema Nacional de Agravos de Notificação (Sinan)/MS para a coleta dos dados epidemiológicos dos pacientes intoxicados por medicamentos (Anexo A).

3.1.1 Variáveis Demográficas e Socioeconômicas:

- Gênero
- Faixa Etária
- Ocupação

3.1.2 Variáveis Relativas ao Evento:

- Circunstância

3.1.3 Variável relativa ao Agente Tóxico:

Os grupos de medicamentos foram classificados em categorias terapêuticas, segundo o *Anatomical-Therapeutical-Chemical Classification System* (ATC).

Os medicamentos pertencentes ao nono nível dessa classificação, são classificados como os medicamentos que atuam no sistema nervoso central, representado pela letra N. Neste nível estão incluídos os psicodislépticos: ansiolíticos (NO5B), antipsicóticos (NO5A), hipnótico-sedativos (NO5C) e os psicoanalépticos: antidepressivos (NO6A) e estimulantes/psicoestimulantes (NO6B).

3.1.4 Variáveis Relativas à Intoxicação:

- Avaliar os sinais e sintomas
- Evolução:

Alta médica (Cura)

Transferência para outra unidade hospitalar

Ignorado

Óbito

- Classificar os casos quanto à gravidade:

Quanto ao item gravidade, foi adotado o seguinte critério, com base no trabalho de King e Palmisano, 1989.

1- Grave: o paciente que permanece internado após procedimentos do tipo lavagem gástrica ou observação médica.

2- Moderada: ocorre algum procedimento do tipo lavagem gástrica ou observação médica, mas sem internação.

3- Leve: a família recebe somente orientação ou acompanhamento por telefone e nenhum procedimento.

4- Ignorada: não é possível classificar a extensão do dano.

3.2 Dados Experimentais

3.2.1 Ensaios de Desenvolvimento e Validação da Metodologia

- Local da pesquisa: Laboratório de Avaliação e Desenvolvimento de Biomaterias do Nordeste, unidades da UEPB e UFCG.
- Materiais (solventes, reagentes e outros aparatos):

Fluoxetina (fármaco) adquirida pelo padrão USP (*United States Pharmacopeia*)

Hidróxido de amônia Vetec

Clorofórmio Vetec

Sulfato de Sódio Anidro Vetec

Metanol (HPLC) Paneac

Placas de Sílica Gel ALUGRAMSIL G 60F de (20x20) cm² Macherey-Nagel (REF: 818033)

Cubas Cromatográficas

Papel de filtro Qualy

- Equipamentos

Estufa MedClav

Banho de Ultra-Som ULTRAsonic 1440A

Espectrômetro FTIR SPECTRUM 400 Perkin-Elmer (4000 a 600 cm^{-1} para análise das características do grupos funcionais dos fármacos).

3.2.2 Preparação dos Padrões

As soluções estoques foram preparadas pela dissolução de cada composto em água deionizada e metanol, separadamente, para obter a concentração de 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

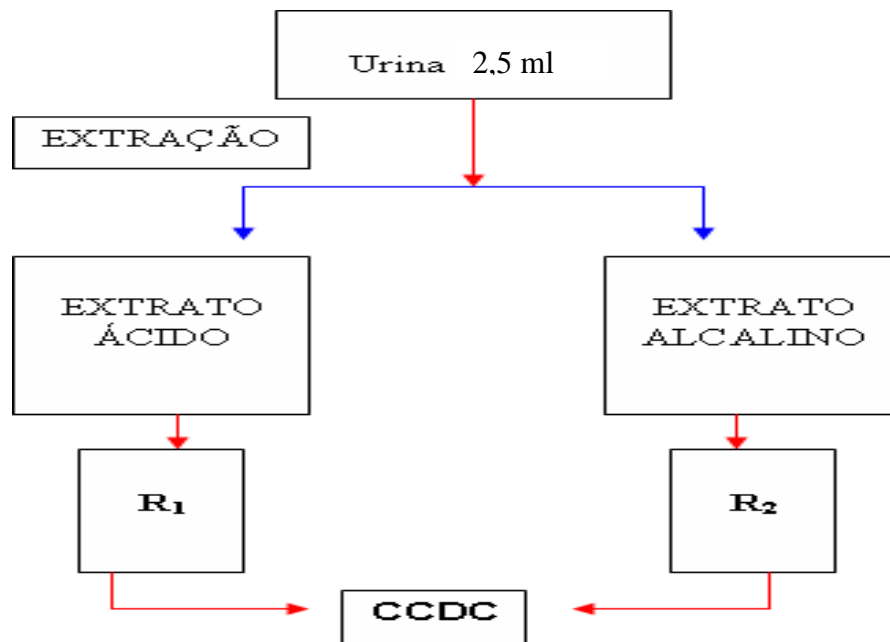
3.2.3 Preparação das Amostras

- Procedimento de Extração: Extração Líquido-Líquido (ELL).

Na fase de desenvolvimento do método um importante passo foi a retirada dos interferentes das amostras. Para isto foram realizados vários procedimentos de *Clean-up*, usando ELL. Para a ELL foi usado o método de *Stas-Otto*, que considera o caráter ácido/base de cada substância do meio em que essa se encontra o seu grau de ionização, como fatores influentes em sua solubilidade em solventes orgânicos, pois a partir de mistura desses, em proporções adequadas, pode-se submeter às amostras à ELL (Figura 01).

Terminada a extração por sonicação ou centrifugação a fase orgânica foi recolhida, evaporada e ressuspendida para análise cromatográfica e espectrofotométrica.

Figura 01 - Esquema de extração das amostras.



FONTE: MORAES, (1991)

3.3 Parâmetros da Análise por CCDC.

A análise por CCDC foi baseada na metodologia clássica descrita por Moraes (1991) com adaptação.

Os resíduos obtidos por ELL, foram ressuspensos em Metanol:Água (9:1) e aplicados nas placas cromatográficas, previamente ativadas em estufas a 105°C por 30 minutos. Aplicaram-se nas placas alíquotas de 20 µL dos extratos obtidos por ELL. Foram utilizados o sistema-solvente constituído de mistura de clorofórmio-metanol (9:1) e o sistema-solvente Clorofórmio/hidróxido de amônia (4:1)

Os cromatogramas foram revelados usando método químico. O agente cromogênico listado foi o Reativo de Dragendorff.

3.3.1 Seletividade

A seletividade do método foi avaliada através da extração de 6 amostras diferentes de urinas de voluntários (n=6), por ELL e depois analisadas por CCDC.

3.3.2 Exatidão e Precisão

O ensaio de exatidão e precisão foi realizado mediante a comparação da solução padrão pura de 400 µg/ml com as demais soluções extraídas de baixa (500µg/ml) média (700 µg/ml) e alta (1000 µg/ml) concentrações, usando como matriz biológica urina de voluntários.

3.3.3 O Limite de Detecção (LD) e o Limite de Quantificação (LQ)

Segundo a Resolução-RDC Nº 899 29 de maio de 2003 para validação de métodos analíticos e bioanalíticos, o Limite de Detecção (LD) é o menor valor de concentração capaz de produzir o efeito esperado, como a mudança de cor. E o Limite de Quantificação (LQ) é a menor quantidade do analito em uma amostra que pode ser determinada com precisão e exatidão aceitáveis sob as condições experimentais estabelecidas

O LD foi determinado por análise de urina contaminada em concentrações decrescentes de fármaco e medicamento até a concentração possível de se detectar a presença de ambos. O LQ foi determinado por análise de urina contaminada em concentrações decrescentes de fármaco e medicamento até a concentração possível de se quantificar a presença de ambos.

3.3.4 Robustez

A robustez de um método analítico é a medida de sua capacidade em resistir a pequenas e deliberadas variações dos parâmetros analíticos. Neste estudo a robustez foi analisada empregando diferentes solventes na preparação da solução padrão do fármaco analisado e nos solventes utilizados na cuba. Os solventes avaliados na preparação dos padrões foram água e metanol e, na preparação dos sistemas-solventes clorofórmio-metanol (9:1) e clorofórmio-hidróxido de amônia (4:1).

3.4 Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier – FTIR

Foram identificadas nas amostras de urina e analisadas as bandas características de Fluoxetina, utilizando a faixa de varredura de 6000 a 400 cm⁻¹, e em temperatura ambiente.

4 DADOS E ANÁLISES DA PESQUISA

4.1 Preparação das Amostras

Na fase de preparação da amostra por ELL, a técnica de sonicação (banho de ultrassom), procedimento que utiliza a energia das ondas sonoras, permitiu uma melhor extração do analito da amostra e, por conseguinte, uma mistura bem mais eficaz, do que a observada pela técnica de centrifugação. De modo semelhante a maior parte dos métodos de análise empregados na determinação de medicamentos em amostras biológicas, a CCDC exige um pré-tratamento das amostras. A ELL foi à metodologia escolhida neste estudo e, em muitos encontrados na literatura que seguem a mesma linha de pesquisa, por apresentarem um menor custo e a boa qualidade dos resultados obtidos (CATTANEO et al., 2007).

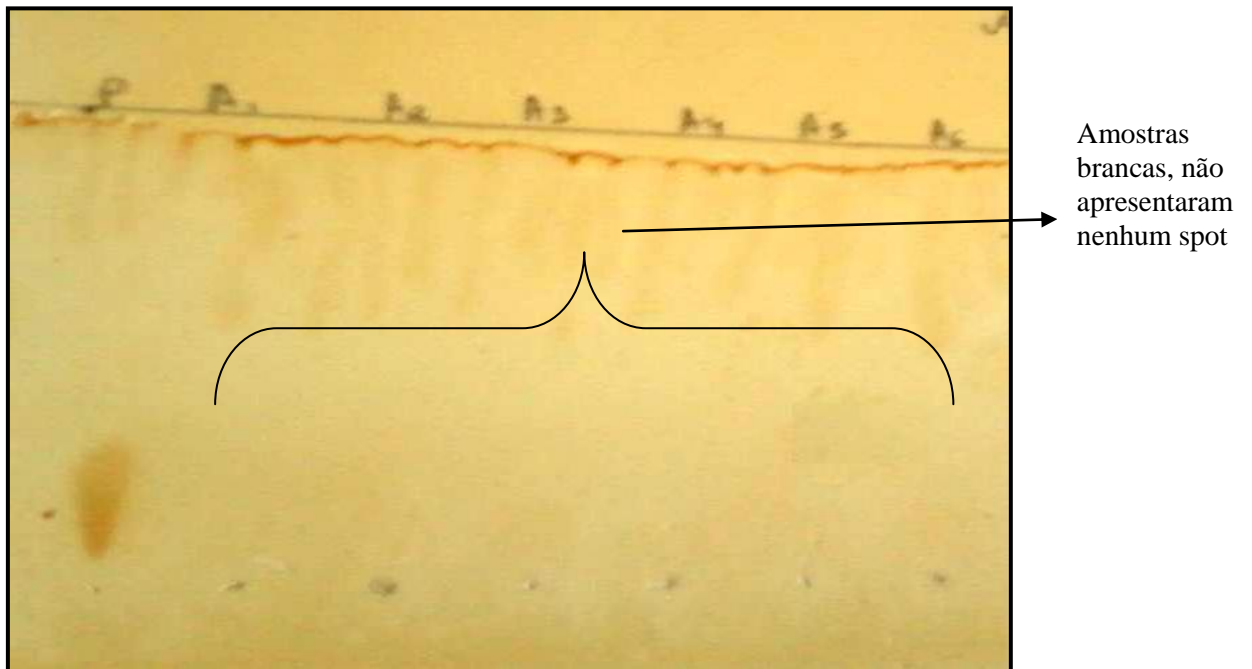
4.2 Validação Método por CCDC

Para a validação metodológica de detecção de Fluoxetina[®] em urina de paciente com histórico de exposição tóxica a esse fármaco, foram empregados, testados e respeitados, vários parâmetros como: seletividade, exatidão, precisão, limite de detecção e quantificação e robustez, seguindo a resolução RDC n° 899 de 29 de maio de 2003, que rege o procedimento de validação.

4.2.1 Seletividade

O ensaio para a avaliação da seletividade é realizado para constatar a capacidade do método de identificar a substância de interesse na presença de outras substâncias que podem ter características semelhantes. Uma das formas de se avaliar este parâmetro é mediante comparação entre a matriz isenta da substância de interesse (amostra branco) com a matriz na qual esta substância foi adicionada (padrão); nesta última, nenhum interferente deve apresentar o tempo de retenção (Rf) da substância de interesse (CHASIN et al., 1998). O método utilizado mostrou ser seletivo para a detecção da Fluoxetina, já que os interferentes que contém na urina, matriz biológica usada neste estudo, não apresentaram na CCDC mancha, “spot”, com o mesmo Rf da Fluoxetina. (Figura 02)

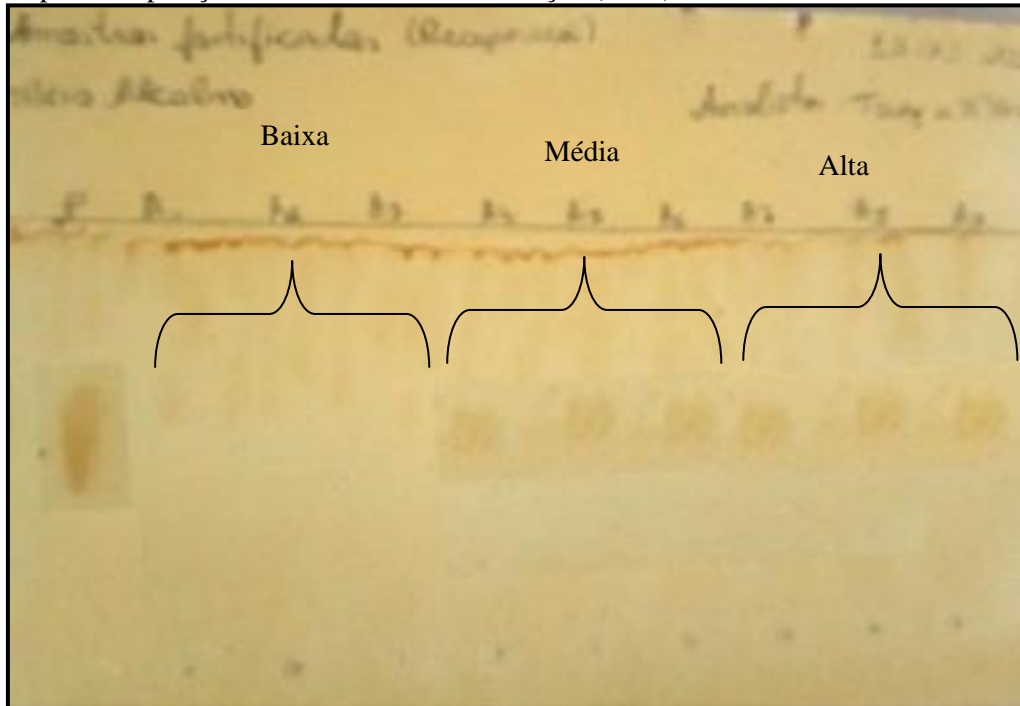
Figura 02-Determinação do parâmetro seletividade, comparação entre o padrão de Fluoxetina® e amostras branco.



4.2.2 Exatidão e Precisão

A exatidão foi demonstrada através do percentual de recuperação do método. A média do percentual recuperado foi de 50% para as amostras extraídas em concentrações tanto de 700 µg/ml e 1000 µg/ml, não tendo assim um coeficiente de variação entre as concentrações média e alta, mostrando que o ensaio é preciso, porém não é exato, devido a pouca recuperação para a finalidade determinada (Figura 03).

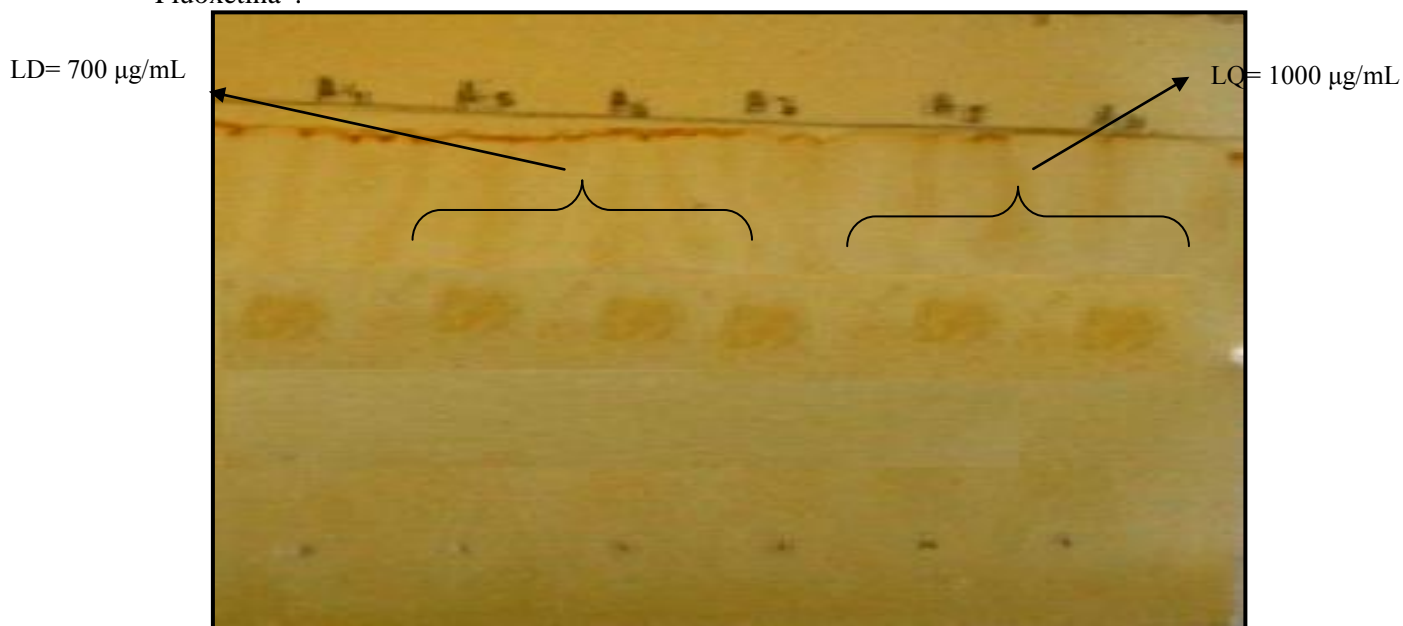
Figura 03- Identificação da solução de padrão da Fluoxetina® e determinação da sua precisão e exatidão, pela recuperação em três níveis de fortificação (n = 3): alta, média e baixa.



4.2.3 Limite de Detecção (LD) e o Limite de Quantificação (LQ)

A determinação do Limite de Quantificação (LQ) e do Limite de Detecção (LD) foram realizados de acordo com a análise das concentrações das amostras extraídas na placa cromatográfica em triplicata. (Figura 4). Segundo Xavier et al., (2007), o limite de detecção é a menor quantidade de analito (fármaco) presente na amostra capaz de produzir a formação de manchas visíveis, os “spots”, na placa cromatográfica. No seu trabalho, todas as quatro concentrações utilizadas foram capazes de produzir resultados positivos, mostrando manchas na mesma posição daquela produzida pelo padrão técnico. O limite de detecção encontrado de aproximadamente, 10 μ g/g de amostra se mostrou adequado. No presente trabalho a menor concentração que foi possível identificar o analito foi de 700 μ g/ mL e a menor concentração a qual podemos quantificá-lo foi 1000 μ g/ mL.

Figura 04- Determinação do Limite de Detecção (LD) e do Limite de Quantificação (LQ) para Fluoxetina[®].



4.2.4 Robustez

A robustez do método cromatográfico foi determinada por análises das amostras sob diferentes condições, mudanças de solventes para preparação das soluções padrão (metanol e água) e sistemas-solventes usadas na eluição (Clorofórmio/Metanol e Clorofórmio/hidróxido de amônia) (Tabela 1). Ao analisar as figuras 05 e 06, os efeitos diferentes dos “spots”, ou seja, a mancha revelada pela amostra/padrão, mostra que o método para essas condições analisadas não é robusto, devido as discrepâncias adquiridas no método com a mudança dos solventes.

Os testes de robustez são de fundamental importância para que os analistas possam conhecer quais os fatores devem ser estritamente controlados durante a execução de um método. Se as alterações das condições de análise produzirem resultados dentro dos limites aceitáveis de seletividade, exatidão e precisão, o método pode ser considerado robusto e tais variações podem ser incorporadas ao procedimento, afirmando assim que seu método pode reproduzir um resultado semelhante mesmo com algumas mudanças na execução (CASSIANO et al., 2009).

Tabela 01 – Avaliação da robustez, usando diferentes solventes, no preparo da solução do padrão de Fluoxetina[®].

Solvente/ sistemas-solventes	Fluoxetina
	<i>R_f</i>

Metanol/Clorofórmio/hidróxido de amônia (4:1)	-
Metanol/Clorofórmio/Metanol (4:1)	-
Água/Clorofórmio/hidróxido de amônia (4:1)	0,12
Água/Clorofórmio/Metanol (4:1)	0,8

NOTA: R_f = Relative Front

Figura 05 – Avaliação da robustez para fluoxetina[®], usando metanol (P₁) e água (P₂), na preparação das soluções padrão.

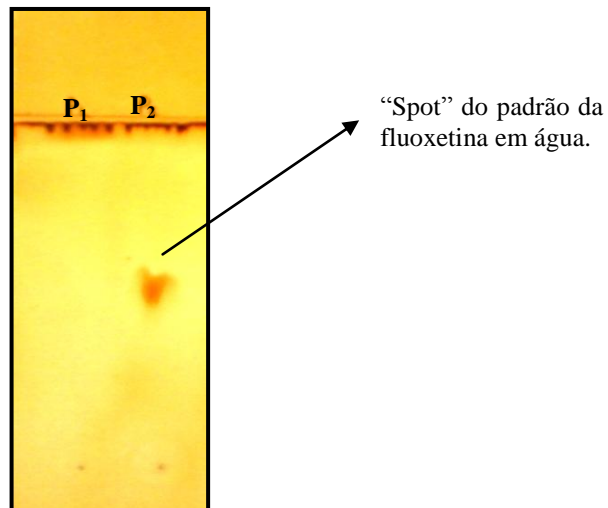


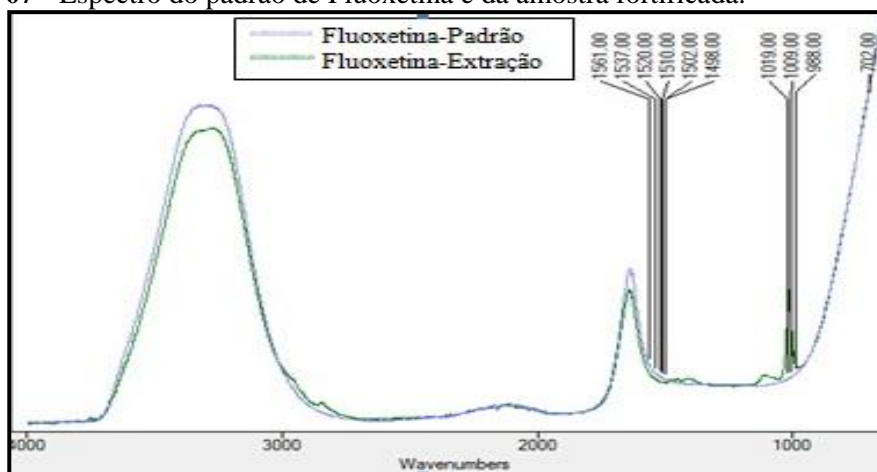
Figura 06 – Avaliação da robustez para fluoxetina[®], usando clorofórmio/metanol (P₁) e clorofórmio/hidróxido de amônia (P₂), na preparação das soluções padrão.



4.3. Identificação por FTIR

As amostras fortificadas, também foram identificadas por FTIR. Os resultados mostraram que a molécula do fármaco mantém as mesmas características do espectro do fármaco padrão. Dessa forma podemos afirmar que a molécula não sofreu alteração durante o processo de extração. A Figura 07 apresenta espectro na concentração igual a 1mg/mL.

Figura 07 - Espectro do padrão de Fluoxetina e da amostra fortificada.



4.4Aplicação do Método

4.4.1Análises das Urinas

No período, entre agosto a setembro de 2012, o Ceatox-CG, registrou 28 casos com história de intoxicação por medicamentos. Os medicamentos mais utilizados foram os neuropsicofármacos (n=18). O Fenobarbital e o Clonazepam, que foram responsáveis pelo maior número de ocorrências (n=8; 44%). As associações medicamentosas com intenção suicida nos chama a atenção (n=10; 55,6%).

Todas as urinas foram colhidas e o método foi aplicado e avaliado. Nas condições analíticas otimizadas não foi detectado nenhum tipo de BZD. Este resultado pode ter ocorrido, devido, possivelmente, a uma baixa dose do medicamento ingerida pelos pacientes ou que o fármaco já tinha sido totalmente metabolizado e excretado antes da coleta da urina que foi avaliada.

Bernades, Turini e Matsuo (2010), realizaram um estudo sobre tentativas de suicídio por superdosagem intencional de medicamentos. Eles afirmaram que os fármacos psicoativos,

principalmente os tranquilizantes, antidepressivos e anticonvulsivantes, possuem alta participação entre os medicamentos utilizados nas tentativas de suicídio e que pacientes que tentam suicídio, geralmente, usam mais de um tipo de substância química.

Os fármacos psicoativos, principalmente os tranquilizantes (Diazepam, Bromazepam), antidepressivos (Amitriptilina) e anticonvulsivantes (Fenobarbital e Carbamazepina), são os medicamentos que mais registram ocorrências tóxicas no Brasil (GANDOLFI; ANDRADE, 2006).

4.4.2 Dados Epidemiológicos dos Pacientes

Os eventos toxicológicos foram mais comuns em mulheres (55,7%), estando de acordo com a maior parte dos estudos descritivos sobre intoxicações por medicamentos encontrados na literatura. É relevante destacar que as mulheres utilizam uma maior quantidade de medicamentos, pelo fato de serem mais acometidas por doenças e serem mais preocupadas com a saúde, levando á automedicação, o que pode ser uma das explicações para o maior número de casos de intoxicações por medicamentos nesse gênero (MENDONÇA; MARINHO, 2005).

Ocorrendo, majoritariamente, a variável circunstância, a tentativa de suicídio (55,7%) e, a idade, entre adultos e jovens (38,9%). Um estudo realizado, entre os anos de 1997 e 2007, no Centro de Controle de Intoxicação (CCI), em Londrina, Paraná, analisando as tentativas de suicídio por overdose intencional de medicamentos, com relação ao gênero e faixa etária, condiz com dados aqui obtidos (BERNADES; TURINI; MATZUO, 2010; SISTEMA..., 2012). Por outro lado, Gandolfi e Andrade (2006) mostra o “acidente individual” como principal fator responsável pelas exposições tóxicas a medicamentos em São Paulo seguido pela tentativa de suicídio.

Acerca da ocupação dos pacientes, os estudantes foram os mais frequentes, com (n=6; 33,3%), este dado entre em desacordo com a mesma variável analisada no estudo de Bernades, Turini e Matsuo (2010), em que mostra que a ocupação mais relevante nos seu estudo são os empregados, e quando esta variável é associada ao gênero, temos com maior prevalência as donas-de-casa que aparecem em segundo lugar neste estudo.

Os resultados das frequências das diferentes variáveis desse evento toxicológico de medicamentos, abordado neste estudo e discutidos acima se encontra resumido na Tabela 02.

Tabela 02 – Distribuição da circunstância, da faixa etária, do gênero, e da ocupação, dos casos de intoxicação por medicamentos, atendidos e notificados no Ceatox-CG, entre agosto a setembro de 2012.

Variável	N	%
Circunstância (N=18)		
Tentativa de Suicídio	10	55,7
Acidental	1	5,7
Outra	7	38,6
Faixa Etária (anos) (N=18)		
1---9	3	16,6
10---19	5	27,8
20---39	7	38,9
> 40	3	16,7
Gênero (N=18)		
Masculino	8	44,4
Feminino	10	55,6
Ocupação (N=18)		
Estudante	6	33,3
Do lar	4	22,2
Outra	8	44,5

Observando-se os sinais e sintomas das intoxicações, as Síndromes Tóxicas por Superdosagem de Sedativos (pupilas mióticas, tremor, hipotensão, confusão mental e sonolência) e a Extrapiramidal (choro monótono, opistótono e distonia), foram predominantes. O quadro tóxico se desenvolve dependendo da dose, do subgrupo terapêutico e do tempo entre a exposição e o atendimento. Os ansiolíticos, principalmente os Benzodiazepínicos (BZD), são compostos que apresentam maior índice terapêutico e menor potencialidade de provocar acidentes fatais e menor tendência para produzir tolerância funcional farmacológica. Foi exatamente essa segurança que favoreceu ao uso indiscriminado dos BDZ, tanto da parte dos médicos, como dos pacientes e dos laboratórios, a partir da década de 70 (FORSAN, 2010).

Em relação à variável evolução, não se registrou nenhum óbito no período estudado. Dados nacionais, entre os anos de 2007 a 2009, mostram que os medicamentos apresentaram baixo coeficiente de letalidade, quando comparado aos agrotóxicos de uso agrícola e as drogas de abuso (SISTEMA..., 2012). Um estudo realizado por Mota et al., (2012), usando dados secundários do Sistema Informação de Mortalidade (SIM)/MS, entre 1996 a 2005, identificou 4.403 óbitos relacionados a medicamentos, entretanto não foi possível estabelecer qual a principal classe de medicamentos nem o princípio ativo envolvido com o agravo.

5 CONCLUSÃO

O método para determinação de fluoxetina foi validado, a fim de otimizar melhores condições para a identificação de Fluoxetina em urina de pacientes intoxicados por este fármaco.

A partir dos dados obtidos, pode-se afirmar que a técnica em CCDC é de fácil execução, barata, reprodutível, abrangente e precisa, sendo adequada para procedimentos como *Screening* de amostras biológicas, pois o mesmo é seletivo e preciso, apesar de não ser exato e robusto para as condições analisadas.

Com esses resultados presuntivos reafirma-se a necessidade de confirmá-los por outras técnicas como: a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), Cromatografia Gasosa (CG) e a Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR), sendo assim possível correlacionar os perfis cromatográficos e espectrofotométricos, entre as diferentes técnicas.

Desta forma, as amostras foram, também, analisadas por FTIR, para confirmar a identidade do fármaco.

REFERÊNCIAS

- AMÉRICO, M. A.; MOSSIN, S. A. G.; NISHIYAMA, P. Perfil de fármacos por espectrofotometria no ultravioleta. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, Paraná, v. 40, n. 4, p. 257-259, ago. 2008.
- ANDRADE, F. M. SILVA, D. K. Farmacogenética de inibidores seletivos de recaptção de serotonina: uma revisão. **Revista de Psiquiatria do Rio Grande do Sul**, Rio Grande do Sul, v.30, n.1, jan. 2007.
- BENIA, L. R. O uso de antidepressivos durante o tratamento analítico. **Revista de Psicanálise**, São Paulo, ano XVIII, n. 183, p. 21-28, 2005.
- BERNADES, S. S.; TURINI, C. A.; MATSUO, T. Perfil das tentativas de suicídio por overdose intencional de medicamentos atendidas por um Centro de Controle de intoxicações do Paraná, Brasil. **Caderno de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 26, n. 7. p. 1366-1372, jul. 2010.
- BRASIL. Ministério do Planejamento, Orçamento e Gestão. **Princípios, diretrizes e ações em saúde mental na administração pública federal**. Brasília, 2010. p. 9.
- CARDOSO, L. V. **Otimização e validação de método empregando SPE e LC-APCI-MA/MS para determinação de fármacos em água de superfície e de abastecimento público**. 2011. 89f. Dissertação (mestrado em química tecnológica e ambiental)- Escola de química e alimentos, Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande do Sul. 2011.
- CASSIANO, N. M. et al. Validação em métodos cromatográficos para análises de pequenas moléculas em matrizes biológicas. **Química Nova**, v. 32, n. 4, p. 1021-1030, 2009.
- CATTANEO, R. et al. Validação de método para determinação de cotinina em urina por cromatografia líquida de alta eficiência. **Revista Brasileira de Toxicologia**, Rio Grande do Sul, v. 19, n. 1, p. 25-31, abril 2007.
- CHASIN, A. A. M. et al. Validação de métodos em análises toxicológicas: uma abordagem geral. **Revista Brasileira de Toxicologia**, v.11, p.1-6, 1998.
- FALCÃO, C. C. **Perfil epidemiológico das intoxicações por medicamentos em crianças de zero a 14 anos registradas no Centro de Informações Toxicológicas de Santa Catarina – CIT/SC (1995-2003)**. Trabalho de Conclusão de Curso (Formação em Medicina) – Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, 2004.
- FERNANDES, G. et al. Impacto das intoxicações por antidepressivos tricíclicos comparados aos depressores do “sistema nervoso central”. **Revista Arquivo de Ciências da Saúde**, v. 13, n. 3, p. 61-65, jul. 2006.
- FORSAN, M. A. **O uso indiscriminado de benzodiazepínicos: uma análise crítica das práticas de prescrição, dispensação e uso prolongado**. 26 f. 2010. Trabalho de Conclusão de Curso de Especialização (Atenção Básica em Saúde da Família) – Universidade Federal de Minas Gerais. Campos Gerais, 2010.

GANDOLFI, E.; ANDRADE, M. G. G. Eventos toxicológicos relacionados a medicamento no Estado de São Paulo. **Revista de Saúde Pública**, São Paulo, v. 40, n. 6, p.1056-64, jul. 2006.

JARDIM, S. Depressão e trabalho: ruptura de laço social. **Revista Brasileira Saúde Ocupacional**, São Paulo, v. 36, n. 123, p. 84-92, maio 2011.

KARP J. **Biologia Celular e molecular: conceitos e experimentos**. 3 ed. Editora Manole, 2005.

LAGE, A. M. V.; MONTEIRO, K. C. C. Depressão – uma ‘psicopatologia’ classificada nos manuais de psiquiatria. **Psicologia: Ciência e Profissão**, v. 27, n.1, p.106-119, 2011

LANÇAS, F. M. **Validação de métodos cromatográficos de análise**. São Carlos: Rima, p. 62, 2004.

MENDONÇA, R. T.; MARINHO, J. L. Discussão sobre intoxicações por medicamentos e agrotóxicos no Brasil de 1999 a 2002. **Revista Eletrônica de Farmácia**, São Paulo, v. 2, n. 2, p. 45-63, 2005.

MORAES, E. C. F. **Manual de Toxicologia Analítica** – São Paulo: Roca,1991. 262 p.

MORENO, R. A.; MORENO, D. H.; SOARES, M. B. Psicofarmacologia dos antidepressivos. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, São Paulo, v. 21, p. 24-40, 2005.

MOTA, D. M. et al. Perfil da mortalidade por intoxicação com medicamentos no Brasil, 1996-2005: retrato de uma década, **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 17, n. 1, p. 61-70, 2012.

PAULA, D. M. L. **Análise toxicológica de antidepressivos em sangue total por cromatografia em fase gasosa com detector de nitrogênio e fósforo**. 2007. 122f. Dissertação (mestrado em toxicologia e análises toxicológicas)- Faculdade de Ciência Farmacêuticas, Universidade de São Paulo. 2007.

PRADO, J. N. et al. Validação de Metodologia Analítica por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência para Doseamento de Cápsulas de Fluoxetina. **Acta Farmacêutica Bonaerense**, v. 25, n. 3, p. 436-40, 2006.

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

ROCA, M. F. de La 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, jul., 2007.

RODRIGUES, M. A. P.; FACCHINI, L. A.; LIMA, M. S. Modificações nos padrões de consumo de psicofármacos em localidade do Sul do Brasil. **Revista de Saúde Pública**, v. 40, n. 1, p. 107-114, 2006.

SABBIONI, C. et al. A rapid HPLC-DAD method for the analysis of fluoxetine and norfluoxetine in plasma from overdose patients. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.36, p. 351-356, 2004.

SILVA, K. E. R. et al. Modelos de Avaliação da Estabilidade de Fármacos e Medicamentos para a Indústria Farmacêutica. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, São Paulo, v.30, n.2, p.1-8, setembro, 2009.

SISTEMA NACIONAL DE INFORMAÇÃO TÓXICO-FARMACOLÓGICA (Sinitox). Centro de Informação Científica e Tecnológica, Fundação Oswaldo Cruz. Disponível em: <<http://www.fiocruz.br/sinitox>>. Acesso em 09 de outubro de 2012.

STAHL, S. M. **Psychopharmacology of Antidepressants**. London: Martin Dunitz, 1997.

TENG, C. T.; HUMES, E. C.; DEMETRIO, F. N. Depressão e comorbidades clínicas. **Revista de Psiquiatria Clínica**, São Paulo, v. 32, n.3, p. 149-159, maio/junho. 2005.

TRUJILLO, L. M. et al. Erro na manipulação de cápsulas de Alprazolam. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, São Paulo, v. 66, n. 3, p. 308-310, 2007.

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

XAVIER, F.G. et al. Cromatografia em camada delgada para o diagnóstico da intoxicação por aldicarb (“chumbinho”) em cães e gatos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, São Paulo v. 59, n. 5, p. 1231-1235, 2007

YANG, H.; IRUDAYARAJ, J. Rapid determination of vitamin C by NIR, MIR and FT-Raman techniques. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, London, v. 54, n. 9, p. 1247-1255, 2002.