



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

NATHÁLIA ALEXANDRA DE OLIVEIRA CARTAXO

**Ensaio cromatográfico para identificação de Diazepam® em
urina no diagnóstico laboratorial de intoxicações humanas**

CAMPUS I
CAMPINA GRANDE – PB
2011

NATHÁLIA ALEXANDRA DE OLIVEIRA CARTAXO

Ensaio cromatográfico para identificação de Diazepam® em urina no diagnóstico laboratorial de intoxicações humanas

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado na forma de Artigo Científico ao Departamento de 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

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA CENTRAL – UEPB

C322e Cartaxo, Nathália Alexandra de Oliveira.
Ensaio cromatográfico para identificação de Diazepam em urina no diagnóstico laboratorial de intoxicações humanas .[manuscrito] / Nathália Alexandra de Oliveira Cartaxo. – 2011.

22 f : il. color.

Digitado.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Farmácia) – Universidade Estadual da Paraíba, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, 2011.

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

1. Medicamento. 2. Cromatografia. 3. Toxicologia. I. Título.

21. ed. CDD 615.6

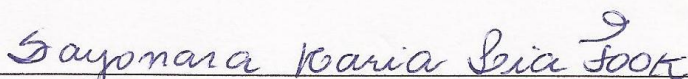
NATHÁLIA ALEXANDRA DE OLIVEIRA CARTAXO

Ensaio cromatográfico para identificação de Diazepam® em urina no diagnóstico laboratorial de intoxicações humanas

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado na forma de Artigo Científico ao Departamento de Farmácia da Universidade Estadual da Paraíba, em cumprimento à exigência para obtenção do grau de Bacharel em Farmácia.

Aprovado em 01/11/2011
Campina Grande - PB

BANCA EXAMINADORA



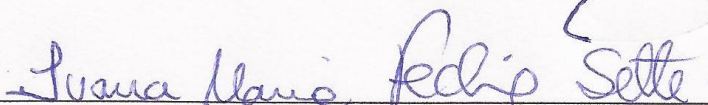
Prof.^ª Dr.^ª Sayonara M.^ª Lia Fook - UEPB

Orientadora – 1º. Membro



Prof.^º Dr.^º Saulo Rios Mariz - UFCG

Examinador – 2º. Membro



Prof.^ª Dr.^ª Ivana Maria Fachine Sette- UEPB

Examinadora – 3º. Membro

DEDICATÓRIA

À toda minha família, pelo investimento, dedicação, confiança e amizade, DEDICO.

AGRADECIMENTOS

À Deus por sua imensa bondade, lealdade e por cada vitória alcançada durante toda a minha vida.

Aos meus pais e meus irmãos por acreditarem no meu sucesso profissional e por todo investimento depositado ao longo desses cinco anos de graduação.

Ao meu namorado Fabricio Macedo Furtado pelo apoio, compreensão, companheirismo e acima de tudo, por ser um grande amigo em todas as horas.

À minha orientadora Sayonara Maria Lia Fook pela confiança e por aceitar-me como sua orientanda. Agradeço por seus ensinamentos e amizade, que levarei por toda minha vida.

À professora Clésia Pachú, por ter me dado a oportunidade de ser sua orientanda na Extensão de 2008 e 2009.

À toda minha turma de Farmácia 2007.1, em especial aos amigos Deysiane, Renata, Fernando, Francinaldo, Thiago, João Paulo e Alisson pelos momentos de amizade, união e alegria ao longo do curso.

Aos meus professores de forma geral, por suas contribuições na transmissão de conhecimentos, com o objetivo de nos tornarmos profissionais qualificados.

Aos funcionários da UEPB, pela presteza e atendimento quando nos foi necessário.

Aos pacientes, funcionários, estagiários e todos aqueles que trabalham no Ceatox-CG que contribuíram direta ou indiretamente na pesquisa.

À todos que fazem parte do departamento de Farmácia.

À todos aqueles que, apesar de não terem sido citados acima, contribuíram direta ou indiretamente na conclusão da minha graduação, os meus sinceros agradecimentos.

"Há homens que lutam um dia e são bons.
Há outros que lutam um ano e são melhores.
Há os que lutam muitos anos e são muito bons.
Porém, há os que lutam toda a vida.
Esses são os imprescindíveis."

(Bertolt Brecht)

Trabalho de Conclusão de Curso (TCC) apresentado na forma de Artigo Científico, seguindo as normas da Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas ISSN: 1516-9332 versão impressa

ENSAIOS CROMATOGRÁFICOS PARA IDENTIFICAÇÃO DE DIAZEPAM EM URINA NO DIAGNÓSTICO LABORATORIAL DE INTOXICAÇÕES HUMANAS

Chromatographic tests for identification of diazepam in urine in the laboratory diagnosis of human poisoning

Nathália Alexandra de Oliveira Cartaxo^{1*}; Alisson Álamo Pereira Nery¹; Saulo Rios Mariz²; Sayonara Maria Lia Fook¹

1. Departamento de Farmácia, Universidade Estadual da Paraíba (UEPB), Centro de Informação e Assistência Toxicológica de Campina Grande (Ceatox-CG).

2. Unidade de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Campina Grande (UFCG).

* nathalia_cartaxo@hotmail.com

RESUMO

Os medicamentos são responsáveis por 29% dos eventos toxicológicos no Brasil, dentre os quais se destaca os Benzodiazepínicos. Todavia, a ausência de um serviço especializado de análises toxicológicas na Paraíba dificulta um diagnóstico mais preciso dos casos. A Cromatografia em Camada Delgada Comparativa (CCDC) é uma técnica de separação simples, de baixo custo e de boa sensibilidade. Neste trabalho, realizaram-se ensaios cromatográficos com a CCDC como técnica de separação e identificação (qualitativa e/ou semi-quantitativa) para pesquisa de Diazepam® em urina de pacientes com histórico de exposição tóxica, atendidos no Ceatox-CG. O método foi otimizado, validado e aplicado de acordo com RDC/Anvisa nº 899/2003. Os parâmetros avaliados foram: Seletividade, Recuperação, Precisão e Exatidão, Limite de Detecção (LD) e Limite de Quantificação (LQ). As condições cromatográficas para a análise de Diazepam® foram: extração em meio ácido e básico, eluição em Clorofórmio-Acetona 4:1 (v/v) e revelação com o agente reativo de Dragendorff. Após os ensaios de validação, analisou-se 14 amostras de pacientes com história de ingestão de medicamentos. A eficiência do método de extração foi avaliada pela exatidão, obtendo-se 74% de recuperação. O LD obtido foi de 500 µg/mL e o LQ 750 µl/mL. Apenas 01 amostra foi positiva para Diazepam®. O método demonstrou atender aos requisitos de boas práticas em laboratórios exigidos pela RDC nº 899/2003, sendo sensível, exato e preciso.

Unitermos: Benzodiazepínicos. Cromatografia. Método. Validação.

ABSTRACT

Drugs are responsible about 29% toxicological events in Brazil, among which stands out the Benzodiazepines. However, the absence of a specialized toxicological analysis in Paraíba difficult a more precise diagnosis of the cases. The Comparative Thin Layer Chromatography (TLC) is a separation technique simple, low cost and good sensitivity. In this search, were made chromatographic assays with the CCDC how separation technique and identification (qualitative and semiquantitative) for search of diazepam in urine of intoxicated patients in Campina Grande city. The method was optimized according to RDC/Anvisa nº 899/2003. The parameters analyzed was: selectivity, recovery, precision, accuracy, detection limit (DL), quantification limit (QL). The chromatographic conditions for the analysis of diazepam were: extracted in acidic and basic, elution with chloroform-acetone 4:1 (v / v) and revelation with the agent Dragendorff reagent. After the validation tests, was analyzed 14 samples from patients with a history of drug intake. The efficiency of the extraction method was observed for the accuracy, obtaining 74% recovery. The DL obtained was 500 mg / mL and the QL 750 mg / mL. Only 01 sample was positive for diazepam. The method showed answer the requirements of good laboratory practices required by the RDC nº 899/2003, being sensitive, accurate and precise.

Keywords: Benzodiazepines. Chromatography. Method. Validation.

INTRODUÇÃO

Diazepam é uma droga de simples administração e de baixo custo que pertence ao amplo grupo de agentes farmacológicos chamados benzodiazepínicos. São largamente prescritos para o tratamento de ansiedade, insônia ou apreensão. No entanto, é também rotineiramente indicado como padrão de primeira linha no tratamento de convulsões agudas e estados epiléticos prolongados (SARNOWSKA, *et al* 2009).

É metabolizado lentamente com uma meia-vida de 20 a 40 horas, podendo ser detectado durante uma semana ou mais após a interrupção do uso. No fígado, pelo complexo do citocromo P450, é biotransformado em três importantes metabólitos ativos: N-desmethyldiazepam ou nordiazepam, oxazepam e termazepam que são excretados principalmente na urina como glicoronídeo após dose oral ou intravenosa. Tanto o Diazepam® como seu metabólito, o desmetildiazepam, se ligam extensivamente às proteínas plasmáticas. Potencializa a ação inibitória do GABA, pois prolonga a abertura dos canais de Cloreto (ABU-QARE E ABOU-DONIA, 2001; ROUINI *et al*, 2008).

A resposta do organismo humano aos medicamentos resulta em reações benéficas, adversas ou, quando em doses excessivas, resulta em exposições tóxicas, refletindo em um conjunto de sinais e sintomas que demonstram o desequilíbrio orgânico promovido pela ação de agentes tóxicos, decorrentes de causas externas, sejam elas acidentais ou intencionais. Os efeitos tóxicos ou a absorção de dose excessiva do Diazepam® parecem ser conseqüentes de sua ação direta sobre o Sistema Nervoso Central e está usualmente associada com sedação, sonolência, fala arrastada, diplopia,

disartria, ataxia e confusão mental. Podem ocorrer depressão respiratória e hipotensão arterial. Na maioria dos casos a evolução é benigna, mas existem relatos de coma e inclusive de óbitos após o uso de benzodiazepínicos de ação muito curta, especialmente quando administrados por via intravenosa. Crianças, idosos e pacientes com insuficiência cardiorrespiratória são mais sensíveis e o álcool e barbitúricos podem potencializar os efeitos tóxicos (BRASIL, 2011)

Em vários países do mundo, inclusive no Brasil, os medicamentos são motivos de grande preocupação para as autoridades e os profissionais de saúde, pois é considerado o principal agente de intoxicação dentre os agentes capazes de causar exposições tóxicas ao ser humano, como alimentos, medicamentos, agrotóxicos, raticidas, plantas, animais peçonhentos/aranhas, etc, (LEITE & AMORIM, 2011; SINITOX, 2011). Todavia, a ausência, de um serviço especializado de análises toxicológicas na Paraíba, dificulta um diagnóstico mais preciso dos casos e, conseqüentemente, impede melhorias na eficiência do tratamento desses agravos o que geraria maior qualidade de vida para a população (AZEREDO, *et al*, 2004).

Dentre as várias técnicas úteis para a análise de Benzodiazepínicos destaca-se a cromatografia que, por se tratar de um método físico-químico, pode ser utilizada para analisar, identificar ou separar os componentes de uma mistura em amostras biológicas. Para a pesquisa de fármacos, como o Diazepam®, em material biológico, a urina é geralmente a escolha, por apresentar elevada concentração dos fármacos e por esses serem eliminados, geralmente através da excreção renal, sob forma intacta ou sob a forma de metabólitos, produtos da biotransformação (MORYIA, 2009; KARP, 2005).

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 o diazepam (AMÉRICO, MOSSIN, NISHIYAMA, 2008; AZEREDO, *et al*, 2004).

No entanto, os métodos para a determinação quantitativa ou semi-quantitativa de fármacos devem ser validados em ordem da garantia da segurança dos resultados de doseamento, para que se tornem úteis e confiáveis e possam ser utilizados na rotina laboratorial, sendo um dos mais importantes estágios de desenvolvimento de novos métodos analíticos ou procedimentos (MOJSIEWICZ-PIEŃKOWSKA, 2011; ROCA *et al*, 2007). Dessa forma, validação é definida como o ato de tornar legítimo ou legal determinado procedimento, processo, material, atividade ou sistema, visando diminuir ou controlar os fatores que levam à imprecisão ou inexatidão, para garantir a confiabilidade e rastreabilidade dos dados gerados. Para tanto, deve apresentar: especificidade, linearidade, intervalo, precisão, sensibilidade, limite de quantificação, exatidão, robustez,

conforme aplicação analítica do método em questão (VALENTINI, SOMMER, MATIOLI, 2007; RIBANI, *et al*, 2004).

Assim, o principal interesse deste trabalho foi propor o desenvolvimento de um método para a pesquisa de Diazepam® em amostras biológicas no diagnóstico laboratorial de exposição tóxica por medicamentos, utilizando a CCDC.

MATERIAIS E MÉTODOS

MATERIAIS

Foram utilizados nesta pesquisa os seguintes compostos: comprimidos de Diazepam® de 10 mg (Lote3040201), Acetona (Vetec®), Clorofórmio (Vetec® e Fmaia®), Éter (Vetec®), Isopropanol (Vetec®), Metanol (Vetec®), Solução de Ácido Clorídrico a 10%, Solução de Hidróxido de Sódio a 10%, Solução de Dragendorff iodado, Sulfato de Sódio Anidro (Vetec) e água destilada.

MÉTODOS

Ensaio Cromatográfico

1) Preparação do padrão e extração do analito das matrizes biológicas para posterior identificação.

O fármaco considerado analito pelo presente artigo foi: Diazepam® (Benzodiazepínico), o qual possui caráter ácido/neutro. A matriz biológica em estudo foi a urina.

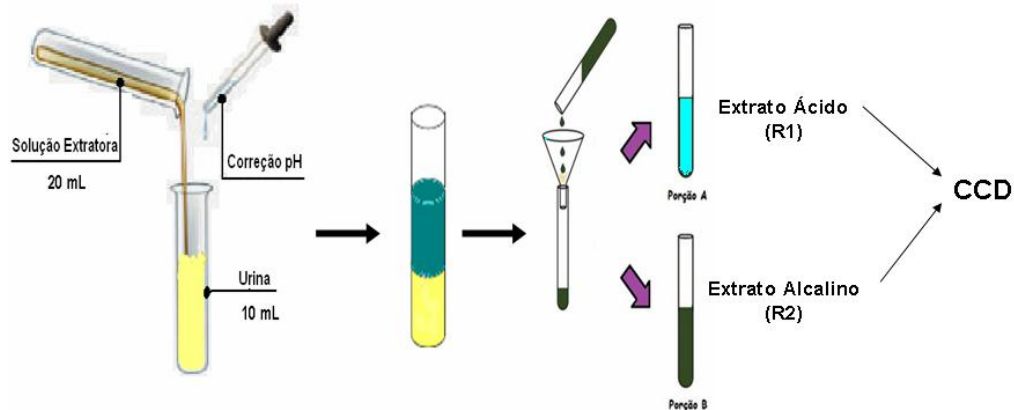
A solução-padrão, foi preparada pela dissolução do fármaco em metanol para obter a concentração de 2 mg/ mL.

Na fase de desenvolvimento do método um importante passo é a retirada dos interferentes das amostras. Para isto foram realizados vários procedimentos de *Clean-up*, usando Extração Líquido-Líquido (LLE) ([FIGURA 1](#)).

Para a LLE foi utilizado o método de *Stas-Otto*, que considera o caráter ácido/base de cada substância e do meio em que essa se encontra bem como o seu grau de ionização como fatores influentes em sua solubilidade em solventes orgânicos. O analito foi extraído da amostra biológica com pH previamente ajustado entre 4,0 – 5,0 e as substâncias de caráter alcalino na faixa de 8,5 – 9,0. A 10 mL de urina foram adicionados, duas vezes, 20 mL de éter-clorofórmio (1:3 v/v) para a extração alcalina e 20 mL de clorofórmio- isopropanol (95:5 v/v), para a extração ácida. Terminada a extração, a alíquota final, foi transferida para um frasco âmbar.

Este volume foi evaporado até a secura em temperatura ambiente. Após a evaporação dos solventes, os resíduos secos de cada extração foram ressuspensos em 500 μ L de metanol e aplicados nas cromatofolhas na fase de identificação.

Figura 1 - Esquema de extração do neuropsicofármaco sintético Diazepam®.

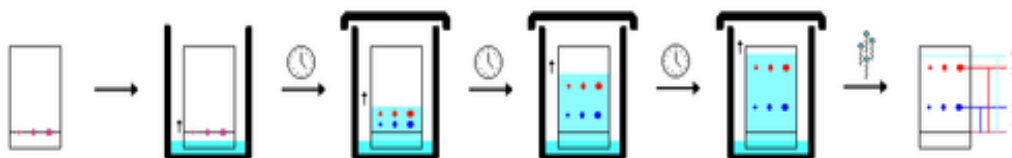


Fonte: Dados da Pesquisa

2) Identificação dos neuropsicofármacos sintéticos

Os ensaios para identificação e semi-quantificação dos neuropsicofármacos foram realizados através de Cromatografia em Camada Delgada Comparativa (CCDC), utilizando-se cromatofolhas de alumínio de sílica gel e como sistema de solvente a mistura clorofórmio-acetona (4:1 v/v) (FIGURA 2). Os parâmetros utilizados na validação do medicamento em estudo foram feitos mediante a análise comparativa do Fator de Retenção (FR) e da cor desenvolvida frente ao agente cromogênico Dragendorff Iodado (DI) empregado para detecção do perfil cromatográfico do benzodiazepínico, sendo analisados concomitantemente.

Figura 2 - Esquema de eluição por Cromatografia em Camada Delgada.



Fonte: Dados da Pesquisa

3) Ensaio de Validação

Para os ensaios de validação foram realizados atendendo aos requisitos exigidos pela Resolução/Anvisa nº 899 de 29 de maio de 2003 da Agência Nacional de Vigilância

Sanitária. Sendo os parâmetros avaliados: Seletividade, Recuperação, Precisão e Exatidão, Limite de Detecção e Limite de Quantificação.

Seletividade

A seletividade do método foi avaliada através da extração de amostras de urina contaminadas e não contaminadas (n=5), por LLE e depois analisadas por CCDC.

Recuperação

Os experimentos de recuperação foram feitos a partir da acuidade visual dos analistas comparando-se com a solução padrão, que apresenta 100% de recuperação, com cada amostra extraída - fortificadas em três níveis de concentração (baixa=500µg/mL; média=750 µg/mL e alta= 1000 µg/mL, com n=3) - e no final, resultando em uma taxa média de recuperação.

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

A leitura O Limite de Detecção (LD), o Limite de Quantificação (LQ), a exatidão e a precisão foram determinados a partir da Recuperação.

O LD é o menor valor de concentração capaz de produzir o efeito esperado, como a mudança de cor, ou seja, foi avaliado por meio da análise de soluções de concentrações conhecidas e decrescentes do analito, até o menor nível detectável.

O LQ foi determinado partindo-se de soluções de concentrações conhecidas e pela acuidade visual dos analistas, comparando a tonalidade/intensidade desenvolvidas pelo padrão e amostras

Exatidão e Precisão

A exatidão e a precisão foram determinadas utilizando-se 3 (três) concentrações (baixa, média e alta), realizando-se, 6 (seis) determinações por concentração. Adicionalmente à precisão, foi realizada a Repetibilidade (precisão intra-corrída): Aplicando o mesmo método, para a mesma amostra, realizado no mesmo laboratório e com o mesmo operador, utilizando os mesmos instrumentos e em um curto intervalo de tempo. E a Reprodutibilidade (precisão inter-corrída): Aplicando-se o mesmo método, para a mesma amostra, utilizando equipamentos e operadores diferentes.

4) Dados Epidemiológicos

Delineamento do Estudo

Trata-se de uma pesquisa prospectiva, transversal, com abordagem semi-quantitativa, exploratória e descritiva, de todos os casos registrados de exposições tóxicas agudas por medicamentos entre janeiro a junho de 2011, no Ceatox-CG. A

pesquisa foi submetida ao Comitê de ética da UEPB, segundo a Resolução/UEPB/196/96, e Resolução/UEPB/CONSEPE/10/2001.

Instrumento de Coleta de Dados e Variáveis

Para o estudo epidemiológico das intoxicações, os dados foram coletados através das fichas de notificação do Sistema Nacional de Informações Tóxico-Farmacológicas (Sinitox) do Ministério da Saúde. Onde as variáveis estudadas foram:

Variáveis demográficas e socioeconômicas:

- Faixa Etária

0 I---- 10

10 I---- 20

20 I---- 30

30 I---- 40

40 I---- 50

50 I---- 60

60 I---- 70

70 I---- 80

- Gênero

- Grupo de medicamentos responsável pela intoxicação e as associações de medicamentos.

- Circunstâncias

RESULTADOS

O método de extração utilizado, partição líquido-líquido, demonstrou-se eficaz, pois a solubilidade do fármaco avaliado possui uma elevada afinidade pela mistura de solventes utilizados nesse procedimento. A TABELA I mostra como foram fortificadas e extraídas as amostras de urina.

Tabela I - Extrações do Diazepam®, em três concentrações (n = 3)

Nota: µL = microlitro, µg = micrograma, mL = mililitro; SP = Solução padrão

Níveis de concentração	Volume	Concentração
1	250 µL da SP	500 µg / mL da SP
2	375 µL da SP	750 µg / mL da SP
3	500 µL da SP	1000 µg / mL da SP

Fonte: Dados da Pesquisa

A metodologia desenvolvida e validada mostrou-se em conformidade com as especificações da legislação vigente no Brasil (BRASIL, 2003).

Na avaliação do parâmetro seletividade, os resultados preliminares mostraram que nas placas com amostras não fortificadas (TABELA II), não foram detectados interferentes nas condições de extrações estabelecidas. Assim o método mostrou-se seletivo, já que as amostras não mostraram nenhum pico semelhante aos desenvolvidos pelos padrões.

TABELA II - Determinação do parâmetro seletividade, análise de diazepam e respectivas amostras branco, resultados expressos pelo Rf e Cor do spot

Nota: DI = Dragendorff iodado; ABac = amostra branco ácida; Rf = fator de retenção; c = cor castanha.

Fase móvel / Agente cromogênico	
Clorofórmio-Acetona (4:1, v/v) / DI	
Fármaco / Amostras	Rf e Cor
Padrão Diazepam ®	0,85 + c
ABac1	-
ABac2	-
ABac3	-
ABac4	-
ABac5	-

Fonte: Dados da Pesquisa

Para os ensaios de recuperação, foi observada a intensidade do spot desenvolvido em cada amostra para cada nível de fortificação (TABELA III e FIGURA 3). A eficiência do procedimento foi observada pelo aumento da tonalidade/intensidade do spot ser proporcional ao nível de concentração para cada nível de fortificação, obtendo um taxa de recuperação equivalente à 74% do analito impregnado nas amostras-testes.

Tabela III - Rf e cor do Diazepam®, em três níveis de concentrações (n = 3)

Nota: Rf= Relative Front; +cs (cor castanho fraco); µl= microlitros; SP= solução padrão

Fase móvel / Agente cromogênico	
Clorofórmio-Acetona (4:1, v/v) / DI	
Fármaco / Amostras	Rf e Cor
Solução Padrão Diazepam (SP)	0,85 + cs
Amostra Fortificada com 125 µl da SP	0,85 + cs
Amostra Fortificada com 250 µl da SP	0,85 + cs

Amostra Fortificada com 500 µl da SP

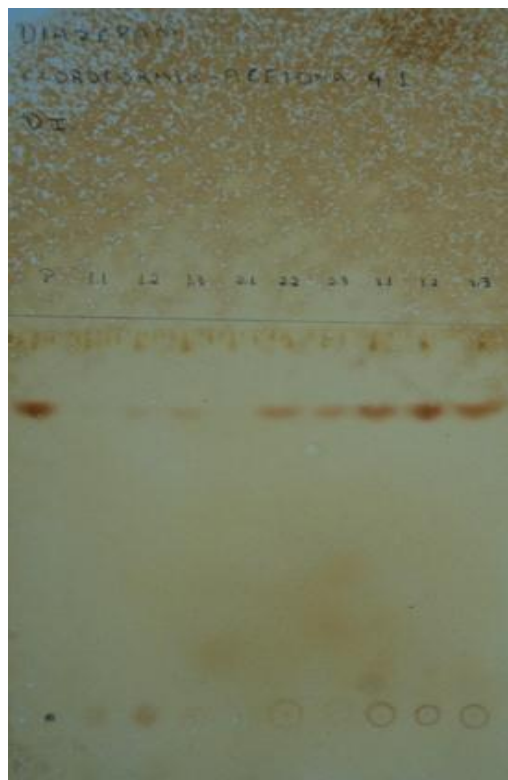
0,85 + cs

Fonte: Dados da Pesquisa

O método demonstrou ser exato, fato confirmado pelos testes de recuperação. Os ensaios do parâmetro precisão, mostraram-se eficientes nas análises intra e inter-corridas mostrando que o método é repetível e reprodutível.

O LD e o LQ, para o Diazepam®, foram de 500µg/mL e 750 µg/mL, respectivamente.

Figura 3 - Identificação de Diazepam® em três níveis de fortificação (n = 3): alta, média e baixa.



Fonte: Dados da Pesquisa

Após os ensaios de validação, foram analisadas 14 (quatorze) amostras de pacientes com história de tentativa de suicídio por ingestão de medicamentos. Sendo apenas 01 (uma) positiva para o Benzodizepínico Diazepam®, coincidindo cor castanha e Rf (0,85) comparada ao padrão. A única amostra positiva para Diazepam® presente na urina de um paciente encontra-se na [FIGURA 4](#), mostrando mesmo Rf e cor comparada ao padrão, ambos com Rf = 0,85 e cor castanha.

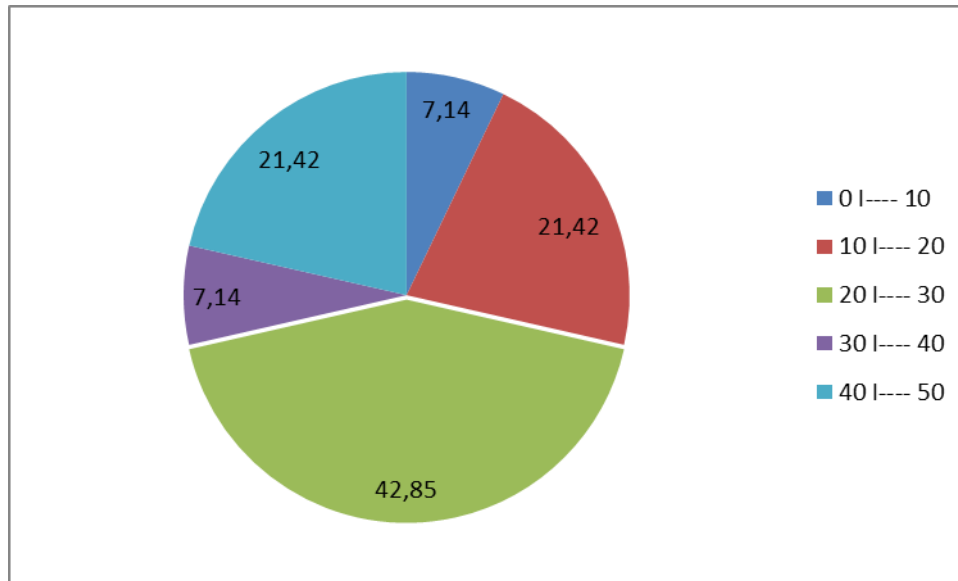
Figura 4 - Amostra positiva para Diazepam® de um paciente do Ceatox-CG.



Fonte: Dados da Pesquisa

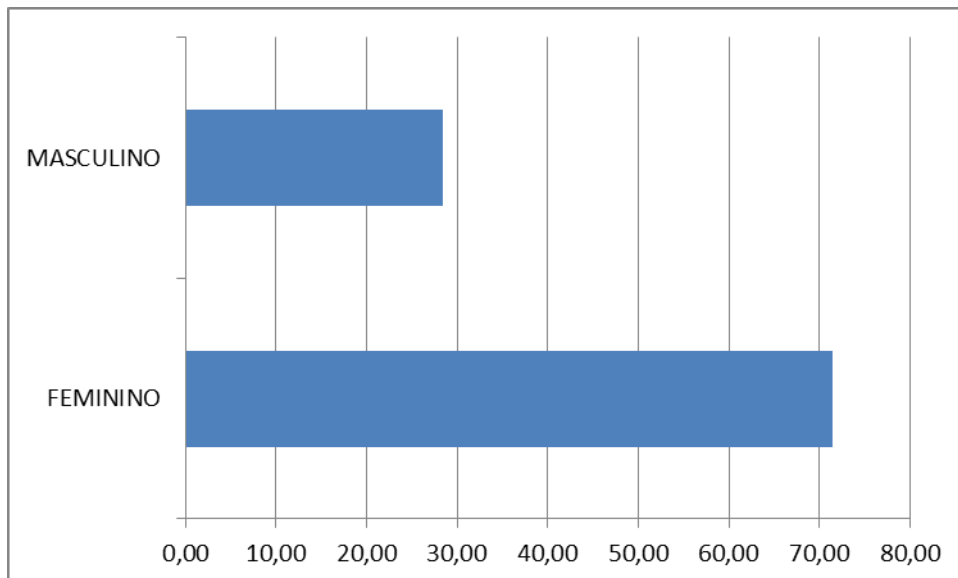
Em relação às variáveis demográficas faixa etária e gênero, pôde-se constatar que mais de 40% dos pacientes que ingeriram algum tipo de medicamento possui entre 20 e 30 anos de idade e mais de 70% é do gênero feminino, como mostra as FIGURAS 5 e 6.

Figura 5 - Distribuição do número de casos de exposições tóxicas por medicamentos, de acordo com a faixa etária, no Ceatox-CG, no período compreendido entre janeiro de 2011 a agosto de 2011. (n =141)



Fonte: Dados da Pesquisa

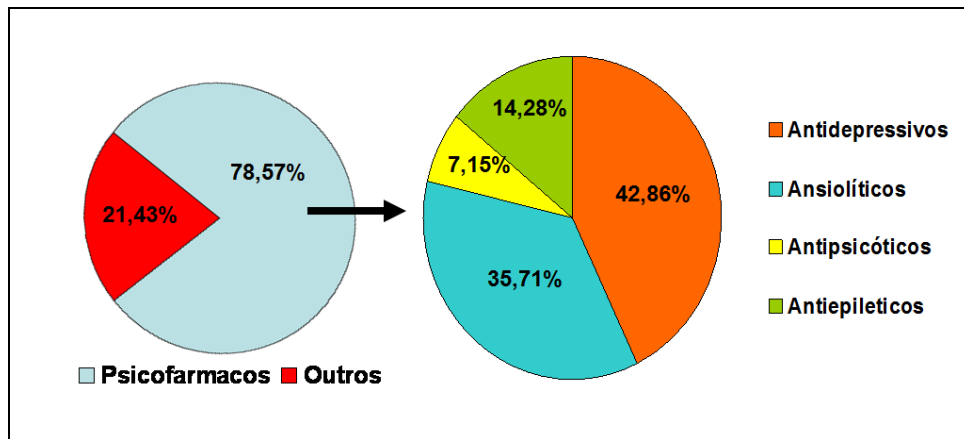
Figura 6 - Distribuição do número de casos de intoxicações por medicamentos, de acordo com o gênero, no Ceatox-CG, no período compreendido entre janeiro de 2011 a agosto de 2011. (n = 141)



Fonte: Dados da Pesquisa

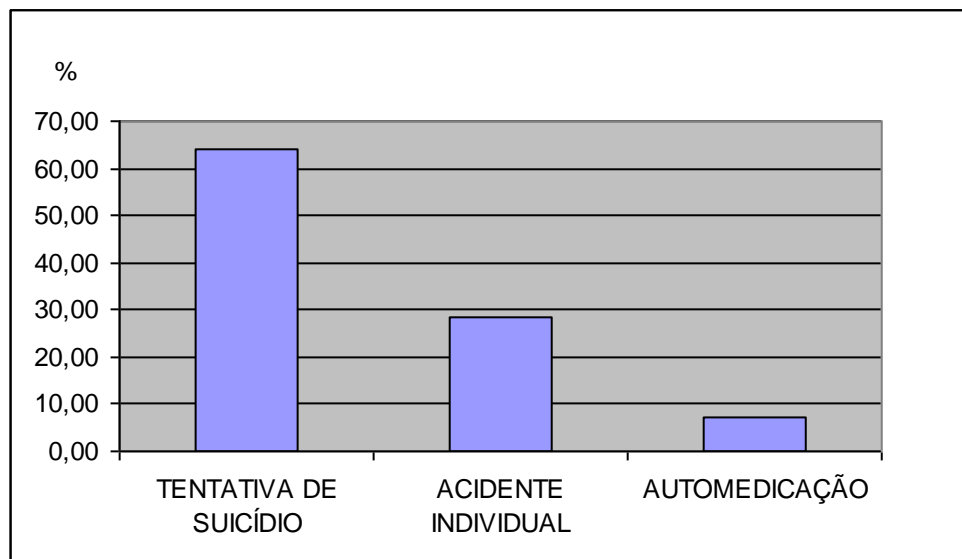
Dos pacientes assistidos no Ceatox-CG, por exposição tóxica aguda, causada pelo uso de medicamentos, 78,57% deles ingeriram psicofármacos, sendo 35,71% ansiolíticos, incluindo o Diazepam® ([FIGURA 7](#)). A circunstância mais frequente foi a tentativa de suicídio ([FIGURA 8](#)).

Figura 7 - Distribuição do número de casos de exposições tóxicas por medicamentos, de acordo com o grupo farmacológico, no Ceatox-CG, no período compreendido entre janeiro de 2011 a agosto de 2011. (n = 141)



Fonte: Dados da Pesquisa

FIGURA 8 - Distribuição do número de casos de exposições tóxicas por medicamentos, de acordo com a circunstância, no Ceatox-CG, no período compreendido entre janeiro de 2011 a agosto de 2011. (n = 141)



Fonte: Dados da Pesquisa

DISCUSSÃO

O método de extração empregado mostrou-se adequado para identificar Diazepam® em urina de pacientes com história de exposição tóxica, apresentando uma recuperação (74%), semelhante ao trabalho desenvolvido por Lopes (2005). Inclusive, Ribani *et al* (2004) justifica essa afirmação quando relata que a recuperação não precisa ser necessariamente 100%, no entanto, a extensão da recuperação de um analito e do seu padrão devem ser consistentes e reprodutíveis.

A OMS define tentativa de suicídio como um ato de conseqüências não fatais no qual o indivíduo inicia deliberadamente um comportamento que lhe causará dano, se não houver intervenção de outrem, ou, deliberadamente, ingere uma substância em excesso face à habitual prescrição ou uso terapêutico reconhecido, a fim de provocar alterações desejadas por ele mesmo, a partir de conseqüências reais ou esperadas. Em uma análise de vinte publicações de diferentes países sobre o assunto, as taxas de tentativas de suicídio variam de 2,6 a 542 por 100 mil habitantes, sendo o grupo de risco constituído de indivíduos jovens, principalmente do sexo feminino (BERNADES, TURINI, e MATSUO, 2010). Estas estatísticas corroboram com o que foi observado em nosso estudo.

Os mesmos autores supracitados afirmam que pacientes que tentam suicídio, em sua grande maioria fazem uso de mais de um tipo de substância química – medicamentosa ou não – quando o método é a intoxicação voluntária. No entanto, não é possível descartar a possibilidade de omissão quanto ao relato de que os pacientes fizeram uso apenas dos medicamentos descritos nas fichas de notificação.

Os fármacos psicoativos, principalmente os tranqüilizantes, antidepressivos e anticonvulsivos, possuem alta participação entre os medicamentos utilizados nas tentativas de suicídio e corresponderam a 57,5% dos casos estudados no Brasil (MORAIS, et al, 2008; SINITOX, 2011). No Ceatox-CG, no ano de 2011, essa prevalência apresentou-se um pouco mais elevada, representando 78,57% dos casos, dentre os 14 pacientes avaliados.

CONCLUSÕES

Os dados aqui relatados mostram que a Cromatografia em Camada Delgada Comparativa (CCDC), apesar de exigir um maior tempo de análise em relação às outras técnicas cromatográficas, contribuiu para o desenvolvimento e validação do método em estudo, já que detectou Diazepam® em urina, sendo uma técnica eficaz, simples de executar e de baixo custo em relação à outras técnicas como espectrofotometria UV/Vis, Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (Clae), Cromatografia Gasosa (CG) e Eletroforese Capilar (EC).

Assim, este método pode ser aplicado em amostras biológicas na rotina de um laboratório de emergência toxicológica e nos serviços públicos de saúde, auxiliando na

confirmação do diagnóstico e no prognóstico dos pacientes com histórico de exposição tóxica por medicamentos.

Embora o método seja adequado para triagem, os resultados mostram que a quantificação de fármacos por métodos baseados no uso de CCDC deve ser interpretada com cautela, especialmente devido à incerteza associada a este tipo de comparação. Portanto, quando a quantificação dos fármacos é baseada apenas na comparação visual dos "Spots" das amostras e dos padrões o método tem caráter semi-quantitativo.

Uma tendência atual é combinar o uso de CCDC com a extração de amostras com colunas de extração em fase sólida. O uso desta estratégia para a extração das amostras aumenta a seletividade do método, um problema frequentemente encontrado quando fármacos são extraídos por extração líquido-líquido. Sugere-se o desenvolvimento de novas pesquisas e que um número mais significativo de amostras sejam analisadas.

Não obstante, o método demonstrou atender aos requisitos de boas práticas em laboratórios exigidos pela Resolução supracitada, sendo, portanto, sensível, exato e preciso.

Por fim, a tentativa de suicídio no caso de intoxicação por medicamentos prevaleceu como circunstância. Portanto, é interessante que, os prescritores saibam avaliar cautelosamente o estado psíquico e emocional do paciente antes de receitar medicamentos psicoativos, que é o grupo farmacológico mais freqüente e com maior risco toxicológico nessa situação. É de extrema importância o desenvolvimento de campanhas de conscientização para o uso racional de medicamentos, bem como de programas de assistência capazes de identificar e intervir nas situações de risco para o ato suicida.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ) e a Pró-Reitora de Pesquisa (PROPESQ) da Universidade Estadual da Paraíba pelo apoio financeiro.

REFERÊNCIAS

- ABU-QARE, A. W.; ABOU-DONIA, M. B. Chromatographic method for the determination of diazepam, pyridostigmine bromide, and their metabolites in rat plasma and urine. **Journal of Chromatography B**, Durham, v. 754, p. 503–509, apr. 2001.
- 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.
- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). **Bulário Eletrônico**. Disponível em: <<http://www4.anvisa.gov.br/BularioEletronico/>>. Acesso em: 05 de outubro de 2011.
- AZEREDO, F. S. DE; GUIMARÃES, R. I. ; PAULA, J. R. DE, CUNHA, L. C. Validação de técnica analítica em cromatografia em camada delgada comparativa para a identificação de fármacos anorexígenos sintéticos em produtos fitoterápicos. **Revista Eletrônica de Farmácia**, Goiás, v.1, p. 17-24, nov. 2004.
- 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 da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). **Resolução - RDC Nº 899 de 29/05/2003**. Dispõe sobre o Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. Diário Oficial [da] República República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 02 de junho de 2003.
- KARP, GERALD. **Biologia Celular e Molecular: Conceitos e Experimentos**. 3 ed. Barueri: Manole, 2005.
- LEITE, E. M. A.; AMORIM, L. C. A. **Noções Básicas de Toxicologia**. Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas Faculdade de Farmácia- UFMG. 2006. Disponível em: <<http://www.farmacia.ufmg.br/lato/APTOXG2006.doc>>. Acesso em: 17 mar. 2011.
- LOPES, L. B. **Estratégias para o aumento da penetração cutânea de fármacos peptídeos: avaliação *in vitro* e *in vivo* de sistemas de liberação de moléculas carreadoras**. 2005. 150 f. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade de São Paulo. São Paulo, 2005.
- MORYIA, F. Urine levels of drugs for which Triage DOA screening was positive. **Legal Medicine**, v. 11, p. 434 – 436, dec. 2009.
- MORAIS; I. C. O. et al. de Perfil epidemiológico das intoxicações medicamentosas registradas pelo Centro de Assistência e Informação Toxicológica de Campina Grande (PB) no período de 2005 a 2007. **Revista Brasileira de Farmácia**. v. 89, n. 4, p. 352-357, ago, 2008.
- MOJSIEWICZ-PIEŃKOWSKA, K. Size exclusion chromatography with evaporative light scattering detection as a method for speciation analysis of polydimethylsiloxanes. II. Validation of the method for analysis of pharmaceutical formulations. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 56, jul. 2011
- 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**, Pernambuco, v. 88, n. 4, p. 177-180, jul. 2007.

ROUINI, M. R. ; ARDAKANI, Y. H.; MOGHADDAM, K. A.; SOLATANI, F. An improved HPLC method for rapid quantitation of diazepam and its major metabolites in human plasma. **Talanta**, v. 75, p 671–676, dec. 2008.

SARNOWSKA, A.; BERESEWICZ, M.; ZABLOCKA, B.; DOMANSKA-JANIK, K. Diazepam neuroprotection in excitotoxic and oxidative stress involves a mitochondrial mechanism additional to the GABA_AR and hypothermic effects. **Neurochemistry International**, v. 55 p. 164-173, feb. 2009.

SILVA, J. A; BEDOR, D. C. G; SOUSA, C. E. M. *et al.* Desenvolvimento e validação de método analítico para quantificação de diclofenaco de dietilamônio em pele humana por cromatografia líquida de alta eficiência. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, Paraíba, v. 31, n. 1, mar. 2010. 6 p.

SINITOX, Sistema Nacional de Informação Tóxico-Farmacológica. **Centro de Informação Científica e Tecnológica**, Fundação Oswaldo Cruz. Disponível em: < <http://www.fiocruz.br/sinitox>>. Acesso em 04 de abril de 2011.

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