

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**Geovane de Almeida Saldanha**

**DETERMINAÇÃO DE BENZODIAZEPÍNICOS EM PLASMA POR  
CROMATOLOGRAFIA LÍQUIDA COM DETECTOR ULTRAVIOLETA-  
VISÍVEL EMPREGANDO MICROEXTRAÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO  
DISPERSIVA**

Santa Maria, RS  
2020

**Geovane de Almeida Saldanha**

**DETERMINAÇÃO DE BENZODIAZEPÍNICOS EM PLASMA POR  
CROMATOGRÁFIA LÍQUIDA COM DETECTOR ULTRAVIOLETA-VISÍVEL  
EMPREGANDO MICROEXTRAÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO DISPERSIVA**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de Concentração em Análises Clínicas e Toxicológicas, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do título de **Mestre em Ciências Farmacêuticas**.

Orientador: Prof. Dr. André Valle de Bairros

Santa Maria, RS  
2020

This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Finance Code 001

Saldanha, Geovane

DETERMINAÇÃO DE BENZODIAZEPÍNICOS EM PLASMA POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA COM DETECTOR ULTRAVIOLETA-VISÍVEL EMPREGANDO MICROEXTRAÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO DISPERSIVA / Geovane Saldanha.- 2020.

88 p.; 30 cm

Orientador: André Valle de Bairros

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas, RS, 2020

1. microextração líquido-líquido dispersiva 2. benzodiazepínicos 3. plasma 4. cromatografia líquida 5. intoxicações I. Valle de Bairros, André II. Título.

Sistema de geração automática de ficha catalográfica da UFSM. Dados fornecidos pelo autor(a). Sob supervisão da Direção da Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central. Bibliotecária responsável Paula Schoenfeldt Patta CRB 10/1728.

Declaro, GEOVANE SALDANHA, para os devidos fins e sob as penas da lei, que a pesquisa constante neste trabalho de conclusão de curso (Dissertação) foi por mim elaborada e que as informações necessárias objeto de consulta em literatura e outras fontes estão devidamente referenciadas. Declaro, ainda, que este trabalho ou parte dele não foi apresentado anteriormente para obtenção de qualquer outro grau acadêmico, estando ciente de que a inveracidade da presente declaração poderá resultar na anulação da titulação pela Universidade, entre outras consequências legais.

**Geovane de Almeida Saldanha**

**DETERMINAÇÃO DE BENZODIAZEPÍNICOS EM PLASMA POR  
CROMATOGRÁFIA LÍQUIDA COM DETECTOR ULTRAVIOLETA-VISÍVEL  
EMPREGANDO MICROEXTRAÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO DISPERSIVA**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do título de **Mestre em Ciências Farmacêuticas**.

**Aprovado em 27 de Março de 2020**

---

**André Valle de Bairros, Dr. (UFSM)**  
(Presidente/Orientador)

---

**Sarah Carobini Werner De Souza Eller Franco de Oliveira, Dra. (UFCSPA)**

---

**Osmar Damian Prestes, Dr. (UFSM)**

Santa Maria, RS  
2020

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus por ter me dado forças em todos os momentos de fraqueza, medo, indecisão e pensamentos de desistência da pós-graduação.

Ao meu orientador, Professor Doutor André Valle de Bairros por todos os ensinamentos sobre toxicologia, cromatografia e também pela ajuda e paciência em toda minha trajetória neste mestrado.

Aos meus pais e meus irmãos por todo o apoio afetivo e financeiro.

Aos meus colegas de laboratório do NAT-UFSM, Vithoria, Marcelo, Dener e Luana por toda a ajuda na execução dos meus experimentos, em especial ao aluno de graduação André Lucas por me acompanhar desde o início do meu projeto.

Aos professores Cristiane da Silva, Andrea Adams e Sergio Dalmora por me permitirem utilizar equipamentos de seus laboratórios. Em especial ao professor Rafael Moresco, pois meu projeto não teria sido realizado sem sua ajuda fundamental.

Ao professor Marcelo da Rosa pelos ensinamentos em Cromatografia Líquida, sua visão de química pura e teórica foi fundamental para execução de experimentos.

Ao técnico Ritiel Corrêa da Cruz pelos ensinamentos práticos do Cromatógrafo líquido usado no desenvolvimento do projeto.

Agradeço também aos colegas de pós-graduação pelo companheirismo durante as disciplinas e pelo conhecimento adquirido em outras áreas de pesquisa.

Agradeço às minhas amigas Denise e Adriane pelos ótimos momentos de risadas durante os intervalos do almoço.

Ao meu companheiro Romulo Portella da Silva por me ajudar a focar neste momento de leitura e escrita da minha dissertação e pelos vários momentos de alegria e companheirismo.

Aos meus amigos de Rosário do Sul, pela verdadeira amizade, junções e churrascos em todos os momentos em que pude descansar um pouco das atividades diárias na UFSM.

À CAPES por me conceder uma bolsa de pesquisa durante todo o meu mestrado, esta foi vital para minha permanência no projeto.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da UFSM pela oportunidade de estudo e auxílio financeiro para apresentação de trabalhos nos eventos científicos ToxiLatin e CBTOX/TIAFT.

## RESUMO

### DETERMINAÇÃO DE BENZODIAZEPÍNICOS EM PLASMA POR CROMATOLOGRAFIA LÍQUIDA COM DETECTOR ULTRAVIOLETA-VISÍVEL EMPREGANDO MICROEXTRAÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO DISPERSIVA

AUTOR: GEOVANE DE ALMEIDA SALDANHA  
ORIENTADOR: ANDRÉ VALLE DE BAIROS

Os medicamentos tem sido os principais agentes envolvidos em intoxicações no país. Segundo o último relatório do Sistema Nacional de Informações Toxicológico-Farmacológicas, estes agentes totalizaram 20367 casos de intoxicação representando 26,79% de todos os agentes envolvidos. Dentre este total, 9983 casos são de tentativa de suicídio. Os medicamentos psicotrópicos da classe dos benzodiazepínicos foram os agentes com maior representatividade neste cenário. Dentre os representantes, o Clonazepam (Rivotril®) se destacou em 1506 casos (1223 em circunstância intencional). Benzodiazepínicos possuem características farmacológicas as quais estão relacionadas à tentativas de suicídio e como facilitadores de crimes. Como estas características não são exclusivas desta classe de medicamentos, é necessário o desenvolvimento de um método analítico que possa detectar e quantificar estes fármacos com especificidade e sensibilidade suficientes para auxiliar na conduta profissional de médicos e outros profissionais da saúde em casos de intoxicação acidental ou intencional. Neste contexto, o sangue é considerado uma matriz complexa que permite avaliar a concentração deste xenobiótico que ainda está ativo no organismo, podendo correlacionar seus níveis com efeitos biológicos, além de ser uma amostra de escolha para fins toxicológicos. Entretanto, procedimentos extrativos são necessários como etapa anterior a injeção cromatográfica para promover o *clean-up* da matriz biológica, evitando danos ao equipamento e a outros insumos assim como concentrar os analitos de interesse para permitir a detecção pelo sistema cromatográfico. Entre as técnicas extrativas, a microextração líquido-líquido dispersiva (DLLME) destaca-se por se tratar de um processo rápido, simples, baixo custo e aplicável a qualquer laboratório e que foi pouco explorada para fins de análises toxicológicas. O objetivo geral desta pesquisa foi o desenvolvimento de um método analítico para análise de benzodiazepínicos em plasma visando auxiliar na conduta médica em casos de intoxicação acidental ou intencional oriundos do Hospital Universitário de Santa Maria localizado na Universidade Federal de Santa Maria (HUSM-UFSM). Os resultados mostraram que o procedimento extrativo ficou otimizado da seguinte forma, a partir de 500 µL de plasma, previamente alcalinizados a pH 10, são adicionados 0,013 g de cloreto de sódio, depois são injetados simultaneamente 400 µL de clorofórmio e 700 µL de acetonitrila, o conteúdo é homogeneizado em vórtex por 10 segundos e depois colocado banho ultrassônico por 1 minuto, depois centrifuga-se à 10000 rpm/10 minutos, a fase orgânica é coletada, evaporada e ressuspendida em 30 µL de fase móvel (água pH 9/metanol/acetonitrila, 63:19:18) e são injetados 20 µL no HPLC-DAD. Na validação analítica, segundo os guias da UNODC e SWGTOX, não foi possível validar todos os parâmetros, sendo possível a aplicação deste método apenas para triagem.

**Palavras-chave:** microextração líquido-líquido dispersiva, benzodiazepínicos, plasma, cromatografia líquida, intoxicações

## ABSTRACT

### DETERMINATION OF BENZODIAPINES IN PLASMA BY HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY WITH ULTRAVIOLET-VISIBLE DETECTOR APPLYING DISPERSIVE LIQUID-LIQUID MICROEXTRACTION

AUTHOR: GEOVANE DE ALMEIDA SALDANHA  
ADVISOR: ANDRÉ VALLE DE BAIROS

Drugs has been the main agents involved in intoxications in Brazil. According to the latest report of SINITOX, these agents summed up 20367 cases representing 26,79% of all agents involved. Among them, 9983 cases were suicide attempts. Psychotropic drugs of the benzodiazepine class were the agents with bigger representativity in this scenario. Among them, Clonazepam (Rivotril®) was involved in 1506 cases (1223 under intentional circumstance). Benzodiazepines possess pharmacological characteristics convenient for suicide attempts and as drug facilitated crimes. As these characteristics are not exclusive of this drug class, it is necessary a development of an analytical method capable of detect and quantify these drugs with adequate specificity and sensitivity to help in the doctor behavior and other health professionals in accidental or intentional intoxications. In this context, blood is considered a complex matrix that allows to determine the concentration of this xenobiotic which is still active in the organism, allowing to correlate its levels with the biological effects, besides being a sample of choice for toxicological analysis. However, extractive procedures are necessary as previous step to promote biological matrix clean up, avoiding equipment damage and to other inputs as concentrate the analytes of interest allowing the chromatographic system detection. Among the extractive techniques, the dispersive liquid-liquid microextraction (DLLME) stands out for being a quick, simple, low cost process adaptable in any laboratory and it was little explored for the purpose of toxicological analyses. The main objective of this research was the development for an analytical method for the benzodiazepine analysis in plasma aiming to improve the medical behavior in accidental or intentional intoxications from the Hospital Universitário de Santa Maria located in the Universidade Federal de Santa Maria (HUSM-UFSM). The results revealed that the extractive procedure got optimized this way, from 500  $\mu$ L of plasma, previously alkalized to pH 10, are added 0,013 g of sodium chloride, then 400  $\mu$ L of chloroform and 700  $\mu$ L of acetonitrile are injected simultaneously, the content is homogenized in vortex for 10 seconds, then it is placed under ultrasonic bath por 1 minute, then the tube is centrifuged by 10000 rpm/10 minutes, the organic phase is collected, dried and resurrected with 30  $\mu$ L of mobile phase (water pH 9/methanol/acetonitrile, 63:19:18) and 20  $\mu$ L in the HPLC-DAD. In the analytical validation, according to UNODC and SWGTOX guides, it wasn't possible to validate all the parameters, it is possible to apply this method only for screening.

**Key words:** dispersive liquid-liquid microextraction, plasma, liquid chromatography, intoxications

## LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 – Perfil de eluição de padrões de bromazepam, clonazepam, alprazolam, nordiazepam e diazepam.....	43
Gráfico 2 – Amostra de soro desproteínizado conforme o método de Larsen e colaboradores (2011).....	44
Gráfico 3 – Soro desproteínizado conforme técnica de Molaei e colaboradores (2015).....	44
Gráfico 4 – Soro desproteínizado conforme técnica de Zhou e colaboradores (2015).....	45
Gráfico 5 – Soro desproteínizado conforme técnica de Ghambarian e colaboradores (2016)....	45
Gráfico 6 – Plasma EDTA desproteínizado conforme técnica de Molaei e colaboradores (2015).....	46
Gráfico 7 – Plasma EDTA desproteínizado conforme técnica de Marin e colaboradores (2012).....	46
Gráfico 8 - Plasma CPDA-1 desproteínizado conforme técnica de Larsen e colaboradores (2011).....	47
Gráfico 9 – Plasma citratado desproteínizado conforme técnica de Larsen e colaboradores (2011).....	47
Gráfico 10 – Plasma heparinizado desproteínizado conforme técnica de Larsen e colaboradores (2011).....	48
Gráfico 11 – Plasma heparinizado desproteínizado conforme técnica de Molaei e colaboradores (2015).....	48
Gráfico 12 – Eficiência de extração para bromazepam, clonazepam, alprazolam, nordiazepam e diazepam nos diferentes solventes extratores.....	49
Gráfico 13 – Eficiência de extração para bromazepam, clonazepam, alprazolam, nordiazepam e diazepam nos diferentes solventes dispersores.....	50
Gráfico 14 – Eficiência de extração para bromazepam, clonazepam, alprazolam, nordiazepam e diazepam nos valores de pH de 8 a 11.....	51
Gráfico 15 – Eficiência de extração para bromazepam, clonazepam, alprazolam, nordiazepam e diazepam nas concentrações de cloreto de sódio de 0, 2,5 e 3% m/v.....	52
Gráfico 16 – Eficiência de extração para os analitos bromazepam, clonazepam, alprazolam, nordiazepam e diazepam usando vórtex e banho de ultrassom.....	53
Gráfico 17 – Eficiência de extração para clonazepam, alprazolam, nordiazepam e diazepam nos diferentes volumes de solvente extrator.....	54
Gráfico 18 – Eficiência de extração para clonazepam, alprazolam, nordiazepam e diazepam nos	



diferentes volumes de solvente dispersor.....	55
Gráfico 19 – Eficiência de extração para os analitos bromazepam, clonazepam, alprazolam, nordiazepam e diazepam nos diferentes tempos de centrifugação.....	56
Gráfico 20 – Cromatograma para benzodiazepínicos após DLLME em amostras de plasma. A) amostra branco de plasma B) padrões de benzodiazepínicos e padrão interno; C) amostra fortificada com os analitos de interesse e padrão interno. Tempo de retenção de clonazepam (5,5 min), alprazolam (7,3 min), nordiazepam (11,5 min), diazepam (14 min) e difenilamina (26 min) no comprimento de onda de 254 nm.....	58

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Estrutura química básica de benzodiazepínicos e seus grupos.....	15
Figura 2 – Produtos de biotransformação de Flunitrazepam, Midazolam e Alprazolam.....	18

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Parâmetros físico e químicos de Alprazolam (AZ), Bromazepam (BZ), Clonazepam (CZ), Diazepam (DZ) e Midazolam (MZ).....	16
Tabela 2 – Propriedades físicas e químicas dos solventes dispersores utilizados em DLLME...	22
Tabela 3 – Propriedades físicas e químicas dos solventes extratores utilizados em DLLME.....	22
Tabela 4 – O uso da microextração líquido-líquido dispersiva para determinação de benzodiazepínicos.....	30
Tabela 5 – Fases móveis avaliadas neste estudo.....	35
Tabela 6 – Parâmetros de confiança do método validado para determinação de benzodiazepínicos em amostra de plasma.....	57

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

SINITOX	Sistema Nacional de Informações Toxicológico-Farmacológicas
CIT	Centro de Informações Toxicológicas
BDZs	Benzodiazepínicos
GABA	Ácido aminogamabutírico
LC	Cromatografia líquida
UV	Ultravioleta
MS	Espectrômetro de massas
CE	Eletroforese capilar
MEKC	Cromatografia eletrocínica micelar
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência
GC	Cromatografia gasosa
QQQ	Triplo quadrupolo
MWD	Detector de múltiplos comprimentos de onda
ESI	Ionização por eletrospray
FID	Detector de ionização de chama
DAD ou PDA	Detector de arranjo de diodos
DLLME	Microextração líquido-líquido dispersiva convencional
UA	Assistida por ultrassom
SPE	Extração em fase sólida
SFOD	Gota orgânica flutuante solidificada
FASS	Empilhamento da amostra amplificada por campo
IL	Líquido iônico
UA-LDS-DLLME	Microextração líquido-líquido dispersiva com solvente de baixa densidade assistida por ultrassom
MEPS	Microextração em sorvente empacotado
CA	Assistida por ciclodextrina
HS	Extração por Head-Space
7-AC	7-aminoclonazepam
7-AF	7-aminoflunitrazepam
7-AN	7-aminonitrazepam
$\alpha$ -HA	$\alpha$ -hidróxialprazolam
$\alpha$ -HE	$\alpha$ -hidróxietilflurazepam
AZ	Alprazolam
BZ	Bromazepam
CB	Clobazam
CZ	Clonazepam
CD	Clordiazepóxido
CT	Clotiazolam
DL	Delorazepam
DF	Desalquilflurazepam
DZ	Diazepam
DC	Diclazepam
EZ	Estazolam
EI	Etizolam
FE	Fenazepam
FN	Flunitrazepam
FR	Flurazepam

FB	Flubromazepam
HT	Hidróxitriazolam
LE	Loflazepato etil
LZ	Lorazepam
LM	Lormetazepam
ME	Medazepam
MZ	Midazolam
NT	Nitrazepam
NZ	Nordiazepam
OZ	Oxazepam
TZ	Temazepam
TT	Tetrazepam
TO	Triazolam
PZ	Prazepam
CP	Citalopram
SR	Sertralina
ZP	Zolpidem
ZC	Zopiclona
CM	Carbamazepina
CPDA-1	Citrato de sódio, fosfato, dextrose, adenina

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	14
1.1 JUSTIFICATIVA.....	15
1.2 OBJETIVOS.....	15
1.2.1 Objetivo geral.....	15
1.2.2 Objetivos específicos.....	15
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	16
2.1 BENZODIAZEPÍNICOS.....	16
2.1.1 Farmacologia.....	16
2.1.2 Toxicidade.....	21
2.2 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência.....	21
2.3 Microextração Líquido-Líquido Dispersiva (DLLME).....	23
2.1.3 Determinação de BDZs empregando a Microextração Líquido-Líquido Dispersiva (DLLME).....	27
3. ENSAIO LABORATORIAL.....	35
3.1 Instrumentação.....	35
3.2. Materiais e reagentes.....	35
3.3 Determinações por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência.....	36
3.3.1 Fase estacionária.....	36
3.3.2 Fase móvel.....	36
3.4 Seleção da matriz biológica.....	37
3.5 Otimização da DLLME.....	38
3.5.1 Tipos de solvente extrator.....	38
3.5.2 Tipos de solvente dispersor.....	39
3.5.3 Efeito salting-out.....	39
3.5.4 Agitação por vórtex e banho de ultrassom.....	39
3.5.5 Avaliação do pH.....	40
3.5.6 Tempo e velocidade de centrifugação.....	40
3.5.7 Volumes de solvente extrator.....	40
3.5.8 Volumes de solvente dispersor.....	40
3.6 Determinação dos benzodiazepínicos por DLLME.....	41
3.7 Validação analítica.....	41
3.7.1 Limite de detecção.....	41
3.7.2 Limite de quantificação.....	41
3.7.3 Especificidade/Seletividade.....	42
3.7.4 Recuperação.....	42
3.7.5 Linearidade.....	42
3.7.6 Precisão intra e inter-dia.....	43
3.7.7 Acurácia (Inexatidão).....	43
3.7.8 Integridade da diluição e efeito memória ( <i>carryover</i> ).....	43
4. RESULTADOS.....	44
4.1 Escolha da fase estacionária.....	44
4.2 Escolha da fase móvel.....	44
4.3 Escolha da matriz biológica.....	45
4.4 Otimização da DLLME para benzodiazepínicos em amostra de plasma.....	51
4.4.1 Otimização do solvente extrator.....	51
4.4.2 Otimização do solvente dispersor.....	52
4.4.3 Otimização do pH.....	53
4.4.4 Otimização do efeito salting out.....	54

4.4.5 Otimização da força de agitação por vórtex e banho de ultrassom .....	55
4.4.6 Otimização do volume de solvente extrator .....	56
4.4.7 Otimização do volume de solvente dispersor .....	57
4.4.8 Otimização do tempo e velocidade de centrifugação .....	58
4.5 Validação da DLLME para benzodiazepínicos em amostra de plasma .....	58
5. DISCUSSÃO .....	61
6. CONCLUSÃO .....	70
7. ANEXOS .....	82
ANEXO A .....	82
ANEXO B .....	85
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	71

## 1. INTRODUÇÃO

Os medicamentos tem sido os principais agentes envolvidos em intoxicações no país. Segundo o último relatório do Sistema Nacional de Informações Toxicofarmacológicas (SINITOX, 2017), estes agentes totalizaram 20367 casos de intoxicação representando 26,79% de todos os agentes envolvidos. Dentre este total, 9983 casos são de tentativa de suicídio.

Neste mesmo ano, o Centro de Informações Toxicológicas (CIT-RS) apresentou um relatório de atendimentos que contabilizaram 7404 de casos de exposição humana envolvendo medicamentos e 4259 foram de tentativa de suicídio somente no estado do Rio Grande do Sul (RS) (CIT, 2017). No ano seguinte, esta realidade se manteve e o relatório de 2018 apresentou ainda mais casos de intoxicação relacionados à medicamentos (CIT, 2018).

Os medicamentos psicotrópicos da classe dos benzodiazepínicos foram os agentes com maior representatividade neste cenário. Dentre os representantes, o Clonazepam (Rivotril®) se destacou em 1506 casos (1223 em circunstância intencional) (CIT, 2018). Esta classe de medicamentos atua na depressão do Sistema Nervoso Central (SNC) na modulação alostérica do receptor GABA<sub>A</sub>, sendo eficaz no tratamento de ansiedade, insônia, convulsões e como relaxante muscular (BRUNTON, KNOLLMANN, HILAL-DANDAN; 2017). Desde 1950, quando foram sintetizados os primeiros representantes, até hoje estão presentes pela sua relativa segurança e rápido início de ação, estima-se que no Brasil quase 2% da população seja usuária crônica destes fármacos (FIORELLI e ASSINI, 2017). Porém, estes fármacos são os principais responsáveis por intoxicações no Brasil e Rio Grande do Sul (AZEVEDO *et al.*, 2016; OLIVEIRA, 2017; CIT, 2018)

Neste contexto, as análises toxicológicas têm o papel de proporcionar suporte médico-legal na detecção, identificação e quantificação dos agentes envolvidos em intoxicações (FLANAGAN *et al.*, 2007). Dentre as técnicas disponíveis, a cromatografia líquida é uma das mais utilizadas devido a sua versatilidade, robustez e gama de detectores, possibilitando a determinação de compostos presentes em matrizes não-biológicas e biológicas como o sangue (SAMANIDOU, UDDIN, PAPADOYANNIS, 2009).

O sangue é considerado uma matriz complexa que permite avaliar a concentração de xenobiótico que ainda está ativo no organismo, podendo correlacionar seus níveis com efeitos biológicos, além de ser uma amostra de escolha para fins toxicológicos (FERNANDES, 2013). Entretanto, procedimentos extrativos são necessários como etapa anterior a injeção cromatográfica para promover o *clean-up* da matriz biológica, evitando danos ao equipamento



e a outros insumos assim como concentrar os analitos de interesse para permitir a detecção pelo sistema cromatográfico (OLIVEIRA, 2019). Entre as técnicas extrativas, a microextração líquido-líquido dispersiva (DLLME) destaca-se por se tratar de um processo rápido, simples, baixo custo e aplicável a qualquer laboratório e que foi pouco explorada para fins de análises toxicológicas.

## 1.1 JUSTIFICATIVA

Benzodiazepínicos possuem características farmacológicas convenientes para tentativas de suicídio e como facilitadores de crimes. Como estas características não são exclusivas desta classe de medicamentos, é necessário o desenvolvimento de um método analítico que possa detectar e quantificar estes fármacos com especificidade e sensibilidade suficientes para auxiliar na conduta profissional de médicos e outros profissionais da saúde em casos de intoxicação acidental ou intencional. Além disso, hospitais de pequeno porte não possuem equipamentos e/ou profissionais com conhecimento técnico suficiente que possibilitem a análise destes casos.

## 1.2 OBJETIVOS

### 1.2.1 Objetivo geral

O objetivo geral desta pesquisa foi o desenvolvimento de um método analítico para análise de benzodiazepínicos em plasma visando auxiliar na conduta médica em casos de intoxicação acidental ou intencional oriundos do Hospital Universitário de Santa Maria localizado na Universidade Federal de Santa Maria (HUSM-UFSM).

### 1.2.2 Objetivos específicos

Nas seguintes drogas benzodiazepínicas: alprazolam, clonazepam, nordiazepam e diazepam:

- a) Avaliar de fase estacionária e fase móvel.
- b) Otimização da matriz biológica apropriada.
- c) Otimizar o procedimento extrativo baseado em DLLME.
- d) Validar o procedimento extrativo baseado em DLLME.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 BENZODIAZEPÍNICOS

#### 2.1.1 Farmacologia

Benzodiazepínicos (BDZs) são fármacos psicotrópicos empregados no tratamento da ansiedade, transtorno do pânico e insônia, além disso também são usados para pré-anestesia e para endoscopia. O mecanismo de ação destes fármacos é atuar no aumento da afinidade do neurotransmissor ácido gama-aminobutírico (GABA) pela subunidade A aumentando a frequência de abertura dos canais condutores de cloretos. São fármacos mais seguros, em comparação aos barbitúricos, pois a sua atuação depende da liberação pré-sináptica de GABA, enquanto que na sua ausência, não possuem efeitos na função do receptor GABA<sub>A</sub>. Além disso, o aumento da dosagem de barbitúricos é proporcional ao aumento da função do GABA<sub>A</sub> enquanto que BDZs não atuam diretamente no canal de cloretos e sim na sua modulação alostérica. (BRUNTON, KNOLLMANN, HILAL-DANDAN; 2017).

A partir da estrutura química básica existem grupos que se diferem através dos grupamentos e estes são os 1,2-BDZs como o triazolam, alprazolam e estazolam, os 1-4-BDZs como bromazepam e medazepam e o 1,5-BDZ como o clobazam (Figura 1) (JAPP *et al.*, 1988; PubChem, 2020).

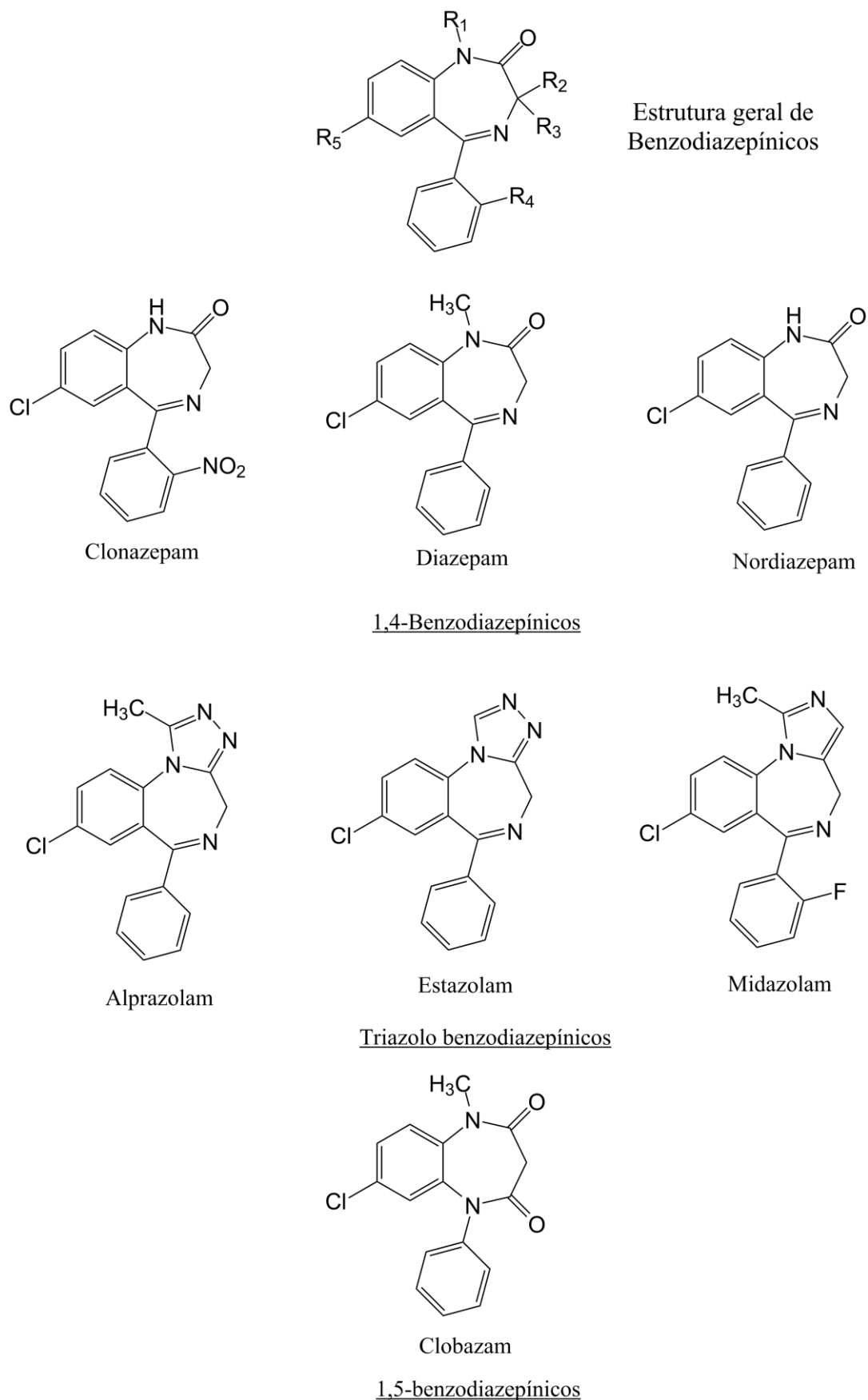


Figura 1 – Estrutura química básica de benzodiazepínicos e seus grupos, adaptado de JAPP e colaboradores (1988) e PubChem (2020)

Estes fármacos apresentam propriedades farmacológicas descritas como sedativa/hipnótica, relaxante muscular, ansiolítica e anticonvulsivante (SANTOS *et al.*, 2009).

Os parâmetros farmacocinéticos e farmacodinâmicos dos benzodiazepínicos são variados, pois cada molécula de fármaco apresenta uma lipofilicidade e produtos de biotransformação diferentes, na tabela (Tabela 1) e figura (Figura 2) abaixo serão mostrados alguns medicamentos da classe com suas características físico-químicas e produtos de biotransformação.

Tabela 1 – Parâmetros físico e químicos de Alprazolam (AZ), Bromazepam (BZ), Clonazepam (CZ), Diazepam (DZ) e Midazolam (MZ)

Parâmetros	AZ	BZ	CZ	DZ	MZ
t <sub>1/2</sub> (h)	11,2-15	10-20	23-40	20-40	1,8-6,4
pK	5,01	2,65-12,24	1,89-11,65	3,4-2,92	3,41-6,19/ 5,5
log P	3,02	2,05	2,41	3,08	4,33
Ligação às proteínas plasmáticas	80%	70%	90%	98%	95%
λ <sub>máximo</sub> (nm)	222 <sup>1</sup>	233 <sup>2</sup>	248 <sup>3</sup>	242 <sup>4</sup>	220 <sup>5</sup>
Faixa terapêutica (ng/mL)	5-50	50-200	4-80	100-2500 120-800 (para NZ)	6-15 60-80 (em 1 hora)

Fonte: PubChem Open Chemistry Database, 2017; KATZUNG; MASTERS; TREVOR, 2014; BRUNTON; CHABNER; KNOLLMANN, 2012; CHEMICALIZE, 2016; HIEMKE e colaboradores (2017), NZ – nordiazepam, t<sub>1/2</sub> meia-vida plasmática; pK<sub>a</sub>, constante de dissociação; λ<sub>máximo</sub>, comprimento de onda de absorção máxima, <sup>1</sup>em etanol, <sup>2</sup>em metanol, <sup>3</sup>7,5% metanol em isopropanol, <sup>4</sup>em álcool acidificado, <sup>5</sup>em 2-propanol

A absorção destes fármacos é rápida, alcançando altas taxas de biodisponibilidade, como, por exemplo, o diazepam por via oral (99%). A distribuição é variada, pois depende da lipofilicidade da molécula e da taxa de ligação às proteínas plasmáticas (PERSONA *et al.*, 2015). A metabolização ocorre por fases I e/ou II especialmente por oxidação microsomal e pelas isoenzimas do citocromo P450, CYP3A4 e CYP2C19, alguns fármacos geram metabólitos ativos por α-hidroxilação como alprazolam e triazolam e outros são desmetilados como visto em diazepam e clordiazepóxido, sendo então conjugados com glicuronídeos para eliminação urinária (TREVOR, 2017).

Atualmente, segundo a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA, 2019), os representantes disponíveis no mercado são alprazolam, bromazepam, clonazepam, cloxazolam,

diazepam, estazolam, flunitrazepam, lorazepam e midazolam. Suas apresentações farmacêuticas estão em comprimidos e soluções orais.

Figura 2 – Produtos de biotransformação de Flunitrazepam, Midazolam e Alprazolam

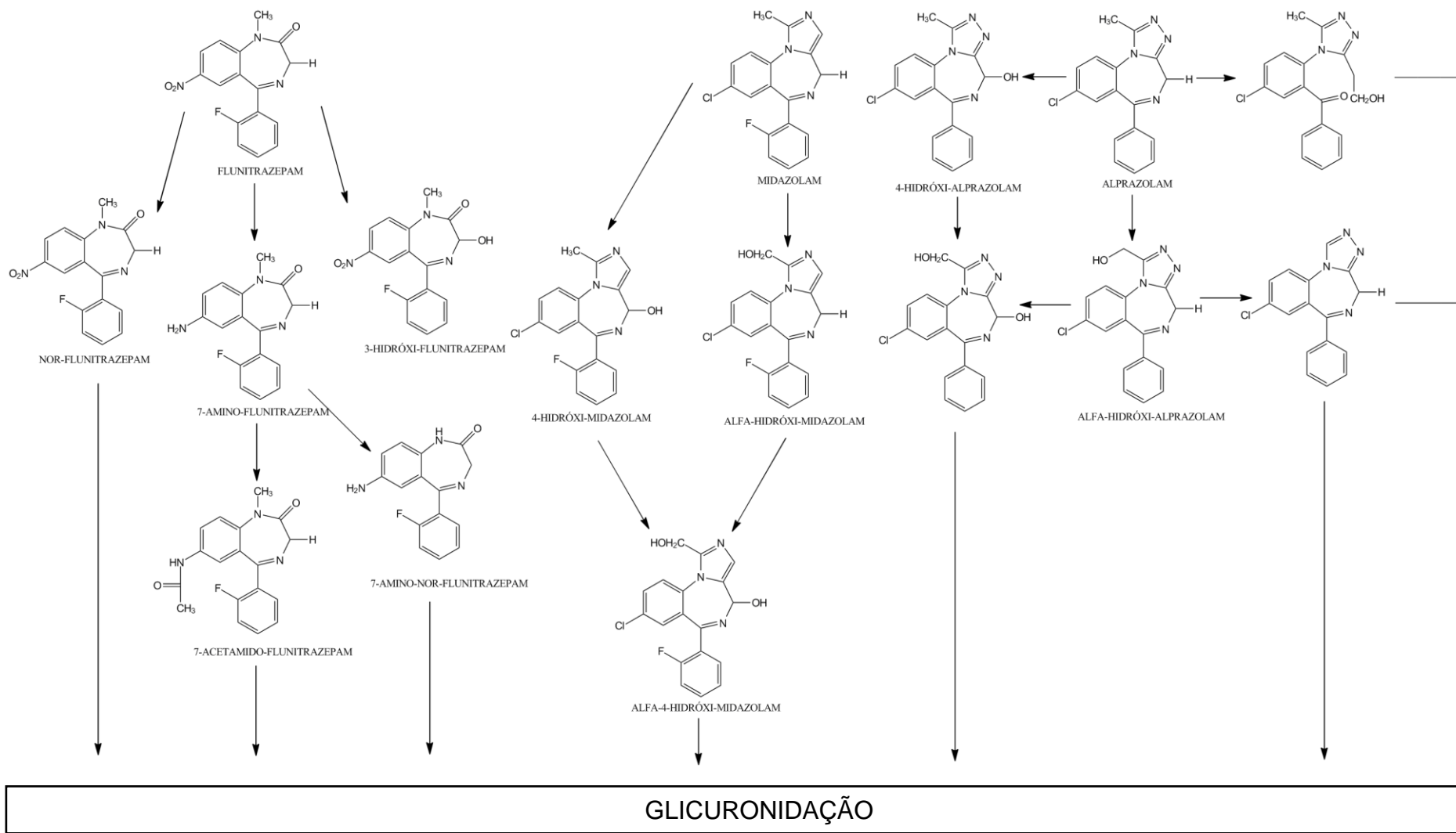


Figura 2 – Produtos de biotransformação de Flunitrazepam, Midazolam e Alprazolam, elaborado com base em Schultz, 1989

### 2.1.2 Toxicidade

Os BDZs quando administrados isoladamente raramente causam óbito do indivíduo. Pacientes com uma overdose normalmente apresentam depressão do Sistema Nervoso Central (SNC) com sinais vitais normais. A ingestão de BDZs com etanol, opioides ou outros agentes hipnóticos tem sido a causa de intoxicações agudas, pois potencializam o efeito depressor do SNC. Os sintomas apresentados são ataxia, problemas de dicção, comprometimento respiratório, estupor e/ou coma (GRELLER & GUPTA, 2018).

Ainda, o risco de morte pelo uso de BDZs também está associado a pacientes com histórico de abuso de fármacos, esquizofrenia, doenças renais ou hepáticas e idosos (PALMARO, DUPOUY, LAPEYRE-MESTRE, 2015). O uso terapêutico à longo prazo também apresenta problemas como sintomas de abstinência, tolerância farmacodinâmica, recidiva de ansiedade, risco de quedas, fraturas e prejuízo cognitivo (SJÖSTEDT *et al.*, 2017).

Devido às características farmacológicas destes fármacos, eles têm sido usados como drogas facilitadores de crime, pois possuem um efeito adverso conveniente que é a amnésia anterógrada (VARMA, 2016).

## 2.2 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

A Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC, do inglês *High Performance Liquid Chromatography*) é um método analítico de separação com inúmeras aplicações cujo princípio baseia-se na interação dos compostos com uma fase estacionária e uma fase móvel pelo processo de partição. A fase móvel deve ser um solvente que dissolva a amostra sem interação química entre elas, ainda deve ser alta pureza, para que não surjam contaminantes que possam afetar a sensibilidade e a detecção do analito por ultravioleta. A polaridade também deve ser adequada para permitir a separação dos componentes e ser compatível com o detector (LIMA, 2009; PERES, 2012).

Existem dois tipos de separação: Fase normal e fase reversa. A fase normal ocorre quando a constituição da fase estacionária é de sílica não modificada ou modificadas com a incorporação de grupamentos polares (cianopropil, nitropropil, diol, aminopropil, dimetilaminopropil), garantindo uma polaridade maior que a fase móvel. Já a fase reversa apresenta fase estacionária de sílica modificada com grupamentos alquilas de cadeia longa (octil, octadecil, cicloexil, fenil). Esta escolha é definida pela polaridade dos compostos alvo (RAMOS, 2014).

Os analitos são determinados pelos detectores, dispositivos que respondem à presença de compostos e emitem um sinal elétrico em resposta proporcional à concentração do analito em função do tempo. Entre os detectores mais utilizados, destacam-se o eletroquímico, fluorescência, acoplamento ao espectrômetro de massas e o ultravioleta-visível (UV-Vis) (SOUSA, 2016).

O detector UV/Vis é o aparato mais utilizado por LC devido ao custo de aquisição, aplicabilidade e fácil manuseio, apresentando um limite de detecção na ordem de 10 picogramas (pg) (esta ordem de medida depende do analito, instrumento e condições de análise). Este equipamento opera na faixa de 190 a 800 nm e as moléculas que possuem grupamentos cromóforos, substâncias que possuem elétrons capazes de absorver energia na luz UV ou Vis, passam pelo detector e absorvem radiação estimada e assim podem ser mensurados (SKOOG *et al.*, 2014). Considerando o aspecto espectrofotométrico, o detector de arranjo de diodos (DAD), também conhecido como *photodiode array detector* (PDA), emprega o mesmo sistema de detecção dos analitos destacados pelo UV/Vis. Contudo, este aparato permite realizar a varredura na região UV/Vis, avaliações analíticas pós-análise e seleção de vários comprimentos de onda para múltiplos compostos, o que garante um aumento da seletividade da corrida cromatográfica (RAIMUNDO JR & PASQUINI, 1997).

Apesar das aplicabilidades, detectores UV/Vis e DAD apresentam algumas limitações como a análise de compostos que possuam apenas ligações saturadas em sua molécula, não conseguem absorver a luz UV e Vis e conseqüentemente não são passíveis de serem determinadas por este aparato. Também há a necessidade de avaliar previamente qual o melhor comprimento de onda, pois a fase móvel influencia na absorvidade das moléculas, dessa forma, são necessários mais experimentos iniciais. Ainda, existem compostos com pequena absorvidade na região ultravioleta, sendo necessário um processo de derivatização (LASMAR, 2007).

Entre os analitos que são passíveis de serem determinados por LC-UV/Vis, os benzodiazepínicos apresentam os requisitos mínimos necessários como a presença de grupos cromóforos. Contudo, a concentração dos mesmos em matrizes biológicas é baixa, em parte por causa da posologia (0,25 mg a 10 mg) e das etapas de biotransformação (BAIRROS, 2014). Apesar da flexibilidade do LC e seus respectivos detectores, em casos de baixas concentrações e/ou necessidade *clean up*, processos extrativos são necessários para determinação destes analitos. A extração líquido-líquido (LLE), extração em fase sólida (SPE) e a extração por Head-Space (HS) são consideradas técnicas de extração convencionais. Por isso, novos



procedimentos devem ser explorados e a microextração líquido-líquido dispersiva (DLLME) é uma alternativa para tal fim.

### 2.3 Microextração Líquido-Líquido Dispersiva (DLLME)

A técnica de microextração líquido-líquido dispersiva foi desenvolvida por Rezaee e colaboradores (2006) sendo um grande avanço no pré-tratamento de amostras por reduzir a quantidade de amostra e reagentes necessários mantendo alta seletividade e recuperação (REZAAE *et al.*, 2006).

Esta técnica geralmente envolve um sistema ternário: um solvente extrator e um solvente dispersor são injetados em uma matriz aquosa rapidamente formando uma nuvem. Após centrifugação, o sistema entra rapidamente em equilíbrio devido à grande área superficial das gotas de solvente extrator e a amostra, sendo considerada uma técnica exaustiva (HERRERA-HERRERA *et al.*, 2010).

A DLLME tem alguns parâmetros a serem definidos inicialmente e podem ser otimizados dependendo do objetivo analítico pretendido. Estes são a natureza do solvente extrator, a natureza do solvente dispersor, os volumes destes solventes, a força iônica, o pH da amostra e o tempo de extração (ZULOAGA *et al.*, 2015).

Os solventes extratores apresentam algumas características desejáveis como ser de densidade maior que da água, pressão de vapor relativamente baixa, temperatura de ebulição relativamente alta e baixa solubilidade em água para que estes não evaporem facilmente durante o processo extrativo garantindo a eficiência da técnica. Já os solventes dispersores devem ser selecionados conforme a solubilidade na fase aquosa e orgânica. O volume afeta diretamente o grau de dispersão do solvente extrator na fase aquosa e também o volume de fase sedimentada, por isso estudos de otimização devem ser realizados que o volume de dispersor seja o mínimo possível que garanta um alto fator de concentração e fase sedimentada suficiente para as análises posteriores (MUDIAM *et al.*, 2012; LOBO, 2015).

Os solventes extratores mais utilizados em DLLME são clorofórmio, tetracloreto de carbono, clorobenzeno, tricloroetileno, diclorometano, hexano e 1,1,1-tricloroetano. E os solventes dispersores mais comuns são acetona, acetonitrila, metanol, *tert*-butilmetil éter e o tetraidrofurano (ALVES, 2010). Além destes solventes convencionais, existem outros que surgiram em novas versões de DLLME, que são os solventes de baixa densidade. Nas tabelas 2 e 3 estão descritas as propriedades físicas e químicas dos solventes extratores e dispersores.

Tabela 2 – Propriedades físicas e químicas dos solventes dispersores utilizados em DLLME

<b>Solventes</b>	<b>Coefficiente de partição (log P)</b>	<b>Densidade (g/mL)</b>	<b>Temperatura de fusão (T°C)</b>	<b>Temperatura de ebulição (T°C)</b>
Acetona	-0,24	0,79	-96,55	55,75
Metanol	-0,77	0,79	-97,8	64,7
Etanol	-0,31	0,79	-114,14	78,24
Acetonitrila	-0,34	0,78	-46	81,6
Tetrahidrofurano	0,46	0,89	-108,3	66
Isopropanol	0,05	0,79	-87,9	82,3

Fonte: PubChem, 2020

Tabela 3 – Propriedades físicas e químicas dos solventes extratores utilizados em DLLME

<b>Solventes</b>	<b>Coefficiente de partição (log P)</b>	<b>Densidade (g/mL)</b>	<b>Temperatura de fusão (T°C)</b>	<b>Temperatura de ebulição (T°C)</b>
Clorofórmio	1,97	1,48	-63,47	61,12
Hexano	3,90	0,66	-95,35	68,73
Tetracloroeto de carbono	2,83	1,59	-22,2	76,7
Diclorometano	1,25	1,33	-95	39,75
Benzeno	2,13	0,88	5,5	80
Tolueno	2,73	0,87	-95	110,6
Acetato de etila	0,73	0,90	-84	77,1
Diexil éter	4,88	0,80	-34,5	223
Tetracloroetileno	3,4	1,63	-22,2	121,2
1-octanol	3,0	0,83	-14,7	194,7
1-nonanol	3,77	0,83	-5	213,3
1-decanol	4,57	0,83	7	229
1-undecanol	4,72	0,83	19	243
1-dodecanol	5,13	0,83	24	259

Fonte: PubChem, 2020

A força iônica, também conhecida como efeito *salting-out*, é uma propriedade do qual uma determinada concentração de íons em solução afetam o procedimento extrativo, aumento a diferença de polaridade entre a fase aquosa e orgânica. Em geral, o cloreto de sódio é o mais

usado, porém também pode-se aplicar cloreto de potássio, nitrito de sódio ou sulfato de sódio. Quando se adiciona um destes sais em uma solução aquosa ocorre aumento da força iônica do meio, o qual reduz a solubilidade dos analitos na matriz aquosa assim como a formação de esferas de hidratação e melhora a captação destes pelo solvente extrator. As concentrações variam conforme o volume de matriz, pois pode ocorrer saturação do meio e esse efeito pode piorar as taxas de extração (XIA *et al.*, 2012, MALAEI, RAMEZANI, ABSALAN, 2018).

O pH da amostra é escolhido conforme as curvas de dissociação (pK) dos analitos. Este parâmetro afeta tanto a eficiência de extração como também influencia no carregamento de interferentes da matriz. Tratando-se de análises cromatográficas, a escolha de um pH ácido ou alcalino está também dependente do equipamento de determinação, pois o perfil de separação dos analitos pode ser diferente. Em extrações de múltiplos analitos um pH médio deve ser definido como o ideal para garantir a seletividade e detectabilidade dos analitos. Em alguns casos, pode-se priorizar pelos analitos com menor absorvidade para alcançar melhores valores de limite de quantificação e de detecção (JOYUBAN *et al.*, 2015). Conforme a otimização do processo extrativo, a escolha de um pH definido nem sempre é avaliada, pois o objetivo analítico já pode ter sido alcançado ou o analito não possui grupamentos ionizáveis.

O tempo de extração é definido como o intervalo entre a injeção dos solventes extrator e dispersor, algum outro procedimento necessário (exemplo, derivatização), até o final da centrifugação. Este parâmetro nem sempre é levado em conta, pois a DLLME é considerada uma técnica em que o equilíbrio da extração é alcançado rapidamente (YAZDI, RAZADI, YAZDINEJAD, 2008). Em comparação a microextração em fase líquida, do inglês *liquid phase microextraction* (LPME) e em fase sólida, do inglês *solid phase microextraction* (SPME), a DLLME supera a limitação do longo tempo de estado de equilíbrio presente na LPME, pois nesta técnica há uma pequena área de contato entre a amostra e o solvente extrator prejudicando os fatores de enriquecimento. Quanto a SPME, além da pequena superfície de contato, ocorre o efeito memória após sucessivas extrações, principalmente quando há imersão direta na matriz, o que diminui o tempo de vida útil. Somando-se a isso, o material extrativo da SPME é de alto custo (MORADI *et al.*, 2011; MOREIRA *et al.*, 2014).

Entretanto, devido a características dos principais solventes extratores empregados na DLLME assim como limitações do poder de extração para alguns analitos, outras estratégias utilizando esta técnica são empregadas nesta microextração (ALCANTARA *et al.*, 2016; MANSOUR e KHAIRY, 2017). Entre elas, está a DLLME assistida por ultrassom (UA-DLLME).

A microextração assistida por ultrassom, do inglês *Ultrasound-assisted microextraction* (UA-DLLME), tem sido útil para o aumento da taxa de extração, pois a frequência aplicada na amostra ajuda a diminuir a emulsão formada na interface das fases orgânica e aquosa gerada pela injeção simultânea dos solventes extrator e dispersor. Desta forma, os analitos que ainda estiverem nesta emulsão serão carreados pelo solvente extrator aumentando a taxa de transferência de massa e eficiência do processo extrativo (FERNÁNDEZ *et al.*, 2016; MALAEI, RAMEZANI, ABSALAN, 2018). Outra proposta é a microextração por gota orgânica flutuante solidificada (SFOD).

A DLLME por gota orgânica flutuante solidificada, do inglês *solidification of floating organic droplet* (SFOD), baseia-se no uso de solventes com temperatura de fusão de 10 a 25°C, como 1-undecanol e 1-dodecanol. Após a dispersão e separação de fases, o sobrenadante é congelado facilitando a coleta da fração que contém os analitos e minimizando os erros de coleta. Em comparação a DLLME convencional possuiu uma taxa de extração menor, porém os solventes usados são de baixa toxicidade e não há uso de agitação (LEONG, FUH, HUANG, 2014). Seguindo a tendência *Green Chemistry*, há também a DLLME usando líquidos iônicos (IL-DLLME).

A microextração com líquidos iônicos, do inglês *Ionic liquid microextraction* (IL-DLLME) tem sido bastante estudada devido as diversas propriedades que os íons oferecem como ponto de fusão, viscosidade, densidade e miscibilidade com água e outros solventes. Além disso, eles apresentam estabilidade térmica, baixa pressão de vapor e seletividade variável devido à flexibilidade estrutural (RYKOWSKA, ZIEMBLÍNSKA, NOWAK, 2018). Um exemplo destes solventes é o 1-hexil-3-metilimidazol hexafluorofosfato [C6MIm][PF6]. De Boeck e colaboradores (2019) também relataram a aplicabilidade destes solventes iônicos em microextrações líquido-líquido para remoção de proteínas do sangue.

Uma outra variação de DLLME, que também segue os princípios da *Green Chemistry*, é baseada em solventes de baixa densidade, do inglês, *Low-density-solvent based solvent demulsification* DLLME (LDS-SD-DLLME). Esta estratégia está fundamentada em solventes de densidade menor que a da água. Deste modo, a fração orgânica, onde está o solvente extrator contendo os analitos de interesse, situa-se na parte superior, o que minimiza os riscos de coleta para análise posterior, ainda ajuda a estender a vida útil de equipamentos mais antigos e menos sensíveis, porém dispositivos especiais de gargalo estreito são requeridos (NORONHA *et al.*, 2015; SEEBUNRUENG, SANTALADCHAIYAKIT, SRIJARANAI, 2015). Exemplos destes solventes envolvidos são 1-octanol, xilol, tolueno e hexano. A principal vantagem destes

solventes é que a maioria deles são compatíveis com fases móveis usuais em cromatografia líquida e não há necessidade de evaporação de solvente ou reconstituição (MANSOUR & DANIELSON, 2017).

Vários estudos foram realizados com matrizes não biológicas como água, solo, chá, alimentos, bebidas alcoólicas e biológicas como soro, leite, urina, plasma, sangue total, cabelo e saliva (MARTINS *et al.*, 2012; ÇABUK & KÖKTÜRK, 2013, MOREIRA *et al.*, 2014). Entre os analitos passíveis de serem extraídos pela DLLME estão praguicidas, hormônios, metais e fármacos (XIA *et al.* 2012; SANAGI *et al.*, 2012; TALEBIANPOOR *et al.*, 2014; JAIN e SINGH, 2016, LIMA, PAPAI, GAUBEUR, 2018). Uma gama de medicamentos psicotrópicos apresenta potencial de serem extraídos por esta microextração e a classe dos benzodiazepínicos é uma delas.

### **2.1.3 Determinação de BDZs empregando a Microextração Líquido-Líquido Dispersiva (DLLME)**

O primeiro estudo de DLLME aplicado à benzodiazepínicos foi de Melwanki e colaboradores (2009) e teve como objetivo a determinação de 7-aminoflunitrazepam ( $\log P = 1,3$ ) por LC-ESI-MS/MS empregando DLLME convencional. Neste experimento foram utilizados diclorometano como solvente extrator e isopropanol como solvente dispersor. Esta molécula é o principal produto de biotransformação de flunitrazepam na urina, por isso sua determinação em baixos níveis é importante devido a sua relevância como droga facilitadora de crime.

A avaliação de diversos solventes extratores, solventes dispersores, alcalinização da urina e efeito *salting-out* foram realizados e o método ficou otimizado da seguinte forma. A amostra de urina foi alcalinizada com 0,2 M de amônia e 5% de cloreto de sódio (m/v), o conteúdo foi centrifugado à 3500 rpm por 10 minutos. O sobrenadante (5 mL) foram coletados para extração com 250 µL de diclorometano e 500 µL de isopropanol. Após centrifugação à 4000 rpm por 10 minutos, o sedimento foi coletado, evaporado e ressuspenso com fase móvel e então 20 µL foram injetados no LC-ESI-MS/MS. O limite de detecção para este método foi de 0,025 ng/mL.

Vardini e colaboradores (2011) desenvolveram uma técnica extrativa para alprazolam, oxazepam e diazepam em urina com determinação por HPLC-UV em 230 nm empregando DLLME convencional. O experimento teve otimização de eficiência de extração com diferentes solventes extratores, dispersores e efeito *salting-out* com obtenção de limites de detecção de 0,7 ng/mL para alprazolam e oxazepam e 0,3 ng/mL para diazepam.

Fernández e colaboradores (2013) delinearão uma DLLME assistida por ultrassom para 7 benzodiazepínicos (alprazolam, bromazepam, clonazepam, diazepam, lorazepam, lormetazepam e tetrazepam) em plasma por UHPLC-PDA. Este método teve o diferencial da inclusão de banho ultrassônico a fim de melhorar a eficiência extrativa. Além disso, também compararam a quantificação destes analitos por UHPLC-PDA e HPLC-PDA nos comprimentos de onda de 200 a 400 nm. Os limites de detecção obtidos após otimização dos parâmetros da extração foram de 1,7 a 10,6 ng/mL.

Khodadoust e Ghaedi (2013) planejaram um método extrativo para clordiazepóxido em urina através de um desenho experimental estatístico, que reduz a quantidade de experimentos necessários para desenvolver a metodologia. Deste modo, há uma diminuição no tempo de desenvolvimento e custo. A validação deste processo gerou um limite de detecção de 0,5 ng/mL.

Ghobadi, Yamini e Ebrahimpour (2014) investigaram uma extração por SPE acoplada a DLLME com determinação de diazepam, midazolam e alprazolam por cromatografia gasosa com detector de ionização por chama (GC-FID) para amostras de água ultrapura, água de torneira, sucos de frutas e urina. Esta metodologia foi aplicada inicialmente para remover interferentes da matriz e então realizar a extração propriamente dita com clorofórmio e acetona. Os limites de detecção para estes analitos nesta técnica foram de 0,1, 0,1 e 0,2 ng/mL respectivamente para diazepam, midazolam e alprazolam.

Fisichella, Odoardi e Strano-Rossi (2015) criaram um método multi-analito envolvendo drogas de abuso, benzodiazepínicos e outros fármacos psicotrópicos usando UHPLC-MS/MS em sangue empregando UA-DLLME. Inicialmente foi realizada desproteinização da amostra com metanol, após adição de cloreto de sódio, alcalinização com tampão carbonato para atingir o pH 9 e posteriormente foram adicionados clorofórmio e metanol. O conteúdo foi colocado em banho ultrassônico por 1 minuto e centrifugado à 4000 rpm por 5 minutos, o sedimento foi evaporado e reconstituído com fase móvel para injeção posterior. O limite de detecção para todos os benzodiazepínicos e outros psicotrópicos estudados foi de 2 ng/mL. Para drogas de abuso, o limite de detecção foi entre 0,05 a 2 ng/mL.

Goudarzi e colaboradores (2015) também partiram do princípio de um desenho experimental estatístico, Box-Behnken, para otimizar o desenvolvimento de um processo extrativo em soro para determinação de nitrazepam e midazolam. Neste estudo, a variação UA-SEME-SFOD-DLLME foi aplicada usando como 1-undecanol como solvente extrator, dodecil sulfato de sódio como agente surfactante e Tween 80 como emulsionante em um tempo de

extração de 20 minutos em pH 7,88. Esta variação de DLLME aplica um agente surfactante, substituindo o agente dispersor, para acelerar a dispersão do solvente extrator na fase aquosa. Embora as características de um agente surfactante apresentem melhora significativa na extração, há a necessidade de uso de banho ultrassônico para desfazer a emulsão na interface das fases e para este estudo o tempo necessário para atingir o objetivo analítico foi longo. Os limites de detecção obtidos foram de 0,017 e 0,086 ng/mL respectivamente para nitrazepam e midazolam.

Olędzka e colaboradores (2015) estudaram uma abordagem diferente para determinação de benzodiazepínicos em urina por cromatografia eletrocínética capilar usando empilhamento de amostra amplificada por campo. Esta metodologia permite a concentração de analitos em um capilar melhorando significativamente a sensibilidade do método. A eletroforese capilar, em geral, apresenta menor tempo de corrida, porém em comparação à cromatografia líquida a sensibilidade da técnica é menor. O empilhamento de amostra amplificado por campo compensa este ponto e assim foi efetiva na determinação de clordiazepóxido, estazolam, temazepam, midazolam, clonazepam, lorazepam, lormetazepam e medazepam com limites de detecção entre 20 e 30 ng/mL.

Mashayekhi e Khalilian (2016) desenvolveram metodologia similar à de Ghobadi, Yamini e Ebrahimpour (2014) em relação a aplicação de SPE combinada a DLLME para determinação de alprazolam, oxazepam e diazepam em urina e plasma. Inicialmente as amostras foram carregadas em sorvente C18, previamente condicionado com acetona. Após remoção dos interferentes endógenos, a extração foi realizada com diclorometano e etanol. O extraído foi então analisado por cromatografia líquida em 230 nm. Os limites de detecção obtidos por este procedimento foram de 0,7 ng/mL em plasma e 0,3 ng/mL em urina para oxazepam e alprazolam e 0,4 ng/mL em plasma e 0,07 ng/mL em urina para diazepam.

Outro estudo envolvendo UA-DLLME-SFOD foi realizado por Farsimadan e colaboradores (2016) para determinação de citalopram, diazepam e sertralina em comprimidos, soro e urina. Um desenho experimental fatorial denominado Plackett-Burman foi realizado para estimar a influência relativa dos fatores analíticos envolvidos na resposta analítica. O procedimento extrativo envolveu 1-undecanol e etanol como solventes extrator e dispersor, aplicação de banho ultrassônico (60 KHz/10 minutos), centrifugação (3000 rpm), banho de gelo para coleta da fase orgânica e posterior análise em HPLC em 240 nm. O limite de detecção obtida para diazepam foi de 0,8 ng/mL.

Análise para novos benzodiazepínicos envolvendo DLLME também foi relatada. Meng e colaboradores (2017) aplicaram UA-LDS-DLLME para determinação de fenazepam, diclazepam, flubromazepam e etizolam em urina por GC-MS/MS. Estes analitos surgiram como novas substâncias psicoativas envolvidas em casos de abuso. Esta análise teve uma metodologia estatística de superfície de resposta para otimização do processo extrativo. Acetato de etila foi o solvente de melhor eficiência extrativa com poucas impurezas carreadas em comparação à ciclohexano, tolueno, acetato de butila e acetato de octila. Após otimização de outros parâmetros, os limites de detecção obtidos foram de 3 ng/mL para flubromazepam, fenazepam e etizolam e 1 ng/mL para diclazepam.

De Boeck e colaboradores (2017) desenvolveram e validaram um método extrativo IL-DLLME para determinação de 7-aminoflunitrazepam, alprazolam, bromazepam, clobazam, clonazepam, clotiazepam, diazepam, estazolam, etil loflazepato, etizolam, flurazepam, lormetazepam, midazolam, oxazepam, prazepam, temazepam, triazolam, zolpidem e zopiclona em sangue total por LC-ESI-MS/MS. A partir de 1 mL de sangue total, foram adicionados 2 mL de tampão aquoso pH 8,0 e 60 µL de 1-butil-3-metilimidazol hexafluorofosfato ([BMIm][PF<sub>6</sub>]). O conteúdo foi rotacionado à 50 rpm por 5 minutos e depois centrifugado à 3500 rpm por 6 minutos. A fase orgânica foi diluída 1:10 com metanol e injetada no cromatógrafo. Os limites de detecção foram de 0,003 ng/mL (loprazolam) a 4,74 ng/mL (clordiazepóxido). Em 2018, De Boeck e colaboradores realizaram a aplicação deste método validado em amostras de sangue *post-mortem* em 11 casos diferentes.

Em 2018, Piergiovanni e colaboradores desenvolveram e compararam 3 métodos extrativos (DLLME, UA-DLLME e MEPS) para análise de 8 benzodiazepínicos (clordiazepóxido, flurazepam, bromazepam, oxazepam, lorazepam, clobazam, clonazepam e flunitrazepam) em bebida alcoólicas e não alcoólicas comerciais empregando HPLC-UV. Estas amostras foram selecionadas devido a ocorrência de crimes em bebidas adulteradas com fármacos desta classe.

DLLME envolvendo esta matriz com este objetivo foi o primeiro estudo descrito na literatura, portanto um protocolo teve de ser estabelecido envolvendo a otimização dos parâmetros clássicos: diferentes solventes extratores (diclorometano, hexano, heptano, tolueno, octanol, ciclohexano), solventes dispersores (acetoneitrila, acetona, THF, 2-propanol), volumes variáveis destes solventes e efeito *salting-out*.

Após a otimização, o método extrativo DLLME ocorreu da seguinte forma, 1 mL da amostra foi homogeneizado com 250 mg de cloreto de sódio, então foram adicionados 200 µL



de diclorometano e 300  $\mu\text{L}$  de acetonitrila, o conteúdo foi aspirado e ejetado 30 vezes para formação da nuvem dispersiva. Em UA-DLLME, após execução das mesmas etapas anteriores houve imersão do conteúdo em banho ultrassônico por 1 minuto e separação das fases por centrifugação à 5500 rpm por 5 minutos, 1,5 mL da fração foi coletada, evaporada for fluxo de nitrogênio e ressuspende na fase móvel com injeção posterior no HPLC.

O procedimento usando MEPS foi executado da seguinte forma: o cartucho C18 foi condicionado com 3 ciclos de acetonitrila seguidos de 3 ciclos de água, secagem em 20 ciclos de aspiração, extração com 3 ciclos de 100  $\mu\text{L}$  do equivalente à amostra real, secagem novamente, eluição com 3 ciclos de 100  $\mu\text{L}$  de uma mistura 90:10 (v/v) de acetonitrila e água com 0,1% de ácido fórmico e por último lavagem com 3 ciclos de 2-propanol.

A extração em água tônica mostrou melhores limites de detecção para clordiazepóxido, bromazepam, clonazepam e flunitrazepam no método MEPS; para Spritz, DLLME não foi mais efetiva apenas para clonazepam e flunitrazepam e para suco de frutas vermelhas, DLLME obteve melhor detectabilidade para os analitos clordiazepóxido, flurazepam, oxazepam, lorazepam, clonazepam e clobazam. Em suma, DLLME foi o método superior na extração de baixas concentrações destes benzodiazepínicos estudados e MEPS é indicado para extração para amostras mais concentradas, esta proposta obedeceu aos princípios da *Green Chemistry*.

Chen, Chen e Chang (2018) apresentaram uma nova proposta extrativa envolvendo DLLME usando ciclodextrina como novo agente dispersivo (CA-DLLME). Este método foi aplicado para pré-concentração de carbamazepina e clobazam com subsequente determinação por cromatografia eletrocínética micelar (MEKC) em urina. A utilidade da ciclodextrina neste contexto é na diminuição da tensão superficial entre duas fases pela formação de complexos entre o solvente orgânico e ciclodextrina, aumentando assim a área de contato entre as fases orgânica e aquosa. A metodologia utiliza uma alíquota de 1 mL de solução tamponada (pH 7) contendo os analitos e  $\alpha$ -ciclodextrina, 100  $\mu\text{L}$  de clorofórmio são injetados formando a nuvem. A mistura é então centrifugada por 5 min à 22000 g, 60  $\mu\text{L}$  do sedimento são coletados, secos à vácuo e ressuspensos com 5  $\mu\text{L}$  de tampão fosfato (75 mM) contendo o padrão interno. A análise gerou um limite de detecção de 0,5 ng/mL para clobazam.

Um resumo dos procedimentos utilizando DLLME para benzodiazepínicos que estão disponíveis na literatura científica estão descritas na tabela 4.

Tabela 4 – O uso da microextração líquido-líquido dispersiva para determinação de benzodiazepínicos.

<b>Matriz</b>	<b>Analitos</b>	<b>Instrumentação</b>	<b>Detectabilidade (ng/mL)</b>	<b>Ensaio extrativo</b>	<b>Referência</b>
Urina	7-AF	LC-ES-MS/MS	0,025	DLLME	Melwanki <i>et al.</i> , 2009
Urina	AZ, DZ, OZ	HPLC-UV	0,3- 0,7	DLLME	Vardini <i>et al.</i> , 2011
Plasma	AZ, BZ, CZ, DZ, LZ, LM e TT	UPLC-PDA	1,7 – 10,6	UA-DLME	Fernández <i>et al.</i> , 2013
Água, urina, plasma e comprimidos	CD	HPLC-UV	0,5	DLLME	Khoudadoust e Ghaedi, 2013
Água ultrapura, “água de torneira”, sucos de frutas, urina	DZ, MZ e AZ	GC-FID	0,1- 0,2	SPE-DLLME	Ghobadi <i>et al.</i> , 2014
Sangue	7-AC, 7-AF, 7-AN, $\alpha$ -HA, $\alpha$ -HE, AZ, BZ, CD, CB, CZ, DL, DF, DZ, EZ, FN, FB, HT, LZ, LM, MZ, NT, OZ, TZ e TO	UHPLC-MS/MS	2,0	UA-DLLME	Fisichella <i>et al.</i> , 2015
Soro	NT e MZ	HPLC-MWD	0,017 e 0,086	UA-SEME-SFOD-DLLME	Goudarzi <i>et al.</i> , 2015
Urina	CD, EZ, TZ, MZ, CZ, LZ, LM e ME	CE-DAD	50- 100	DLLME-FASS	Olędzka <i>et al.</i> , 2015

Urina, plasma	OZ, AZ e DZ	HPLC-UV	0,4- 0,7	SPE-DLLME	Mashayekhi & Khalilian, 2016
Comprimidos, plasma e urina	CP, DZ, SR	HPLC-MWD	2,7	UA-DLLME-SFOD	Farsimadan <i>et al.</i> , 2016
Sangue total	7-AF, AZ, BZ, CB, CZ, CT, DZ, EZ, LE, EI, FR, LM, MZ, OZ, PZ, TZ, TO, ZP e ZC	LC-ESI-MS/MS	0,003 – 4,74	IL-DLLME	De Boeck <i>et al.</i> , 2017
Urina	FE, DC, FB e EI	GC-QQQ-MS	1 – 3	UA-LDS-DLLME	Meng <i>et al.</i> , 2017
Bebidas alcoólicas	CD, FR, BZ, OZ, LZ, CB, CZ e FN	HPLC-UV	0,86 – 1,75	DLLME, UA-DLLME, MEPS	Piergiovanni <i>et al.</i> , 2018
Urina	CB	CE-MEKC	0,5	CA-DLLME	Chen, Chen, Chang, 2018
Sangue total	7-AF, AZ, BZ, CB, CZ, CT, DZ, EZ, LE, EI, FR, LM, MZ, OZ, PZ, TZ e TO	LC-ESI-MS/MS	0,003 – 4,74	IL-DLLME	De Boeck <i>et al.</i> , 2018

LC – Cromatografia líquida, UV – Ultravioleta, MS – Espectrômetro de massas, CE – Eletroforese capilar, MEKC - Cromatografia eletrocinética micelar, HPLC – Cromatografia líquida de alta eficiência, GC – Cromatografia gasosa, QQQ – Triplo quadrupolo, MWD – Detector de múltiplos comprimentos de onda, ESI – Ionização por eletrospray, FID – Detector de ionização de chama, DAD ou PDA – Detector de arranjo de diodos, DLLME - Microextração líquido-líquido dispersiva convencional, UA– Assistida por ultrassom, SPE – Extração em fase sólida , SEME – Microextração emulsiva aprimorada por surfactante, SFOD - Gota orgânica flutuante solidificada, FASS - empilhamento da amostra amplificada por campo , IL - Líquido iônico, UA-LDS-DLLME - Microextração líquido-líquido dispersiva com solvente de baixa densidade assistida por ultrassom, MEPS – Microextração em sorvente empacotado, CA- Assistida por ciclodextrina. 7-aminoclonazepam (7-AC), 7-aminoflunitrazepam (7-AF), 7-aminonitrazepam (7-AN),  $\alpha$ -

hidróxialprazolam ( $\alpha$ -HA),  $\alpha$ -hidróxietilflurazepam ( $\alpha$ -HE), alprazolam (AZ), bromazepam (BZ), citalopram (CP), clobazam (CB), clonazepam (CZ), clordiazepóxido (CD), clotiazolam (CT), diazepam (DZ), delorazepam (DL), desalquilflurazepam (DF), diclazepam (DC), estazolam (EZ), etizolam (EI), fenazepam (FE), flunitrazepam (FN), flurazepam (FR), flubromazepam (FB), hidróxitriazolam (HT), loflazepato etil (LE), lorazepam (LZ), lormetazepam (LM), medazepam (ME), midazolam (MZ), nitrazepam (NT), nordiazepam (NZ), oxazepam (OZ), prazepam (PZ), temazepam (TZ), tetrazepam (TT) e triazolam (TO).

### 3. ENSAIO LABORATORIAL

#### 3.1 Instrumentação

- Cromatógrafo líquido 1 – IntraLab®: monocanal, detector UV-Vis (180-700 nm), injetor manual com loop de 20 µL, aquisição e análise de dados por software N2000.
- Cromatógrafo líquido 2 – Shimadzu®: bomba LC-20AT, detector de arranjo de fotodiodos (DAD) SPD-M20A, controlador de sistema CBM-20A, degaseificador DGU-20A5 e injetor manual de 20 µL. A aquisição e análise dos dados foram efetuadas através do Software LC-SOLUTION.
- pHmetro digital Digimed® modelo DM-22, eletrodo combinado de pH, faixa de leitura de pH -2 a 20
- Balanças analíticas: Shimadzu® modelo AX200 e BEL modelo Mark 220 Classe II.
- Homogeneizador Biomixer® modelo QL-901 de 2800 rpm.
- Banhos de ultrassom SoniClean® 2 (40 KHz de frequência e aquecida à 35°C) e Cristófoli® (42 KHz com aquecimento opcional).
- Ultracentrífuga Eppendorf® modelo 5427 R, faixa de temperatura de -11 a 40°C, velocidade máxima de 25000 x g (16220 rpm).
- Microseringa Hamilton® de 100 µL para HPLC.
- Colunas para cromatografia líquida de fase reversa:
  - Agilent® Zorbax Eclipse C18 3,5 µm 2,1 x 50 mm, pH 2-9 (Santa Clara, EUA);
  - Waters® XTerra MS C18 5 µm 4,6 x 150 mm, pH 1-12 (Milford, EUA);
  - Waters® Symmetry C18 3,5 µm 2,1 x 50 mm, pH 2-8 (Milford, EUA);
  - Agilent® Eclipse XDB-C18 5 µm 4,6 x 150 mm, pH 2-9 (Santa Clara, EUA);
  - Waters® XBridge 3,5 µm 4,6 x 150 mm (Milford, EUA).

#### 3.2. Materiais e reagentes

Foram utilizados tubos de coleta de sangue à vácuo sem anticoagulante e com anticoagulante EDTA, citrato e heparina obtidos de CRAL® (Cotia, Brasil) para coleta de amostra. Os solventes utilizados foram acetonitrila e metanol grau HPLC marca Tedia® (Fairfield, EUA) enquanto acetato de etila, ácido trifluoroacético, clorofórmio, etanol, isopropanol, tetrahidrofurano, trietilamina oriundos da marca Vetec® (Duque de Caxias, Brasil). Padrões analíticos da farmacopeia americana (USP) com 99% de pureza de alprazolam

(AZ), bromazepam (BZ), nitrazepam (NT), diazepam (DZ), nordiazepam (NZ), midazolam (MZ), clonazepam (CZ), medazepam (ME), clordiazepóxido (CDZ), lorazepam (LZ), flunitrazepam (FZ) e temazepam (TZ). Difenilamina da marca Sigma-Aldrich® (Sant Louis, EUA) foi utilizado como padrão interno. Acetato de amônio, cloreto de sódio, hidróxido de sódio, ácido clorídrico, ácido perclórico e sulfato de sódio foram adquiridos da marca Belga® (Curitiba, Brasil).

### 3.3 Determinações por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

#### 3.3.1 Fase estacionária

As fases estacionárias presentes em todas as colunas usadas em todo o desenvolvimento experimental são do tipo octadecil (C18), usadas em cromatografia em fase reversa. Embora o empacotamento fosse comum entre as colunas estudadas, o comprimento e o tamanho de partícula apresentam diferenças o que foi evidente no perfil de eluição e tempo de corrida.

Todas as colunas foram utilizadas durante a seleção de fase móvel com os padrões analíticos, agentes desproteinizantes e testes iniciais com DLLME. Para as colunas de 5 cm de comprimento, o comportamento cromatográfico dos picos gerados apresentou-se de alta resolução e com tempo de corrida de até 15 minutos, devido ao seu pequeno tamanho de partícula, vazões de no máximo 0,5 mL/min puderam ser trabalhados. Para as colunas de 15 cm, a resolução dos picos foi menor e uma vazão de 1,0 mL/min foi necessária para manter o tempo de corrida similar.

Os ensaios de otimização da DLLME e validação analítica foram realizados com a coluna Waters® XBridge 3,5 µm 4,6 x 150 mm com pré-coluna utilizando cartuchos C-18 x 4mm x 3mm.

#### 3.3.2 Fase móvel

Inicialmente foram testadas diversas condições cromatográficas visando a separação do maior número de padrões de benzodiazepínicos possível em um tempo de corrida adequado. Os padrões de benzodiazepínicos testados foram: alprazolam (AZ), bromazepam (BZ), nitrazepam (NT), diazepam (DZ), nordiazepam (NZ), midazolam (MZ), clonazepam (CZ), medazepam (ME), clordiazepóxido (CD), lorazepam (LZ), flunitrazepam (FZ) e temazepam (TZ). Estas condições estão descritas na tabela abaixo (Tabela 5).

Tabela 5 – Fases móveis avaliadas neste estudo.

<b>Fase móvel</b>	<b>Referência</b>
Água/Metanol/Acetonitrila (63:19:18)	Kuroda <i>et al.</i> , 1995
Água/Metanol (43:57) com 250 µL de trietilamina, (pH 6,0 e 8,0)	Willems <i>et al.</i> , 1985
Metanol/Ácido perclórico (100 mL + 10 µL)	Gill <i>et al.</i> , 1986
Água/Acetonitrila (53:47)	Tomasini <i>et al.</i> , 1985
Água/Metanol (40:60)	Vasiliades, 1981
Água/Metanol (35:65)	Emery e Kowtko, 1979
Água/Acetonitrila (40:60)	Khodadoust e Ghaedi, 2013
Metanol/50 mM acetato de amônio em H <sub>2</sub> O (60:40)	Yuan <i>et al.</i> , 2000

### 3.4 Otimização da matriz biológica

Os benzodiazepínicos apresentam alta taxa de ligação às proteínas plasmáticas variando entre 70 a 98%, devido a esta característica farmacocinética, técnicas de desproteinização foram avaliadas com o propósito de analisar o fármaco na forma livre. Os agentes desproteinizantes testados foram metanol, etanol, acetonitrila, acetona, ácido tricloroacético (10 e 20%) e ácido clorídrico com ácido trifluoroacético nas amostras de soro; plasma com EDTA; plasma com citrato de sódio; plasma com heparina e plasma com CPDA-1.

A primeira técnica testada, segundo Larsen e colaboradores (2011), utiliza 100 µL de plasma com 200 µL de acetonitrila, este conjunto é homogeneizado e centrifugado por 10 minutos à 14000 x g, após, 50 µL do sobrenadante é transferido para um tubo e então se adiciona 150 µL da fase móvel de interesse.

A segunda técnica, segundo Molaei e colaboradores (2015), usa 2 mL de plasma com 100 µL de ácido clorídrico e 100 µL de ácido trifluoroacético, a mistura é homogeneizada e centrifugada por 5 minutos à 3000 rpm, o sobrenadante é retirado e então se adiciona a fase móvel de interesse.

A terceira técnica, segundo Zhou e colaboradores (2015), utiliza 50 µL de plasma com 150 µL de metanol, a mistura é homogeneizada por 3 minutos e centrifugada por 5 minutos à 16242 x g, deste, 150 µL do sobrenadante é coletado e seco, os resíduos são reconstituídos com fase móvel, homogeneizados e então injetados no cromatógrafo.

Ghambarian e colaboradores (2016) também descreve uma outra técnica semelhante a anterior onde 2 mL de plasma com 1 mL de metanol são misturados, homogeneizados por 2 minutos, o conjunto é colocado em gelo por 5 minutos e depois em temperatura ambiente por 10 minutos, a amostra então é centrifugada a 4000 rpm por 5 minutos, deste tubo 1,5 mL do sobrenadante são transferidos para outro tubo e o pH é ajustado para 10.

Outra técnica utiliza 1 mL de soro com 600 µL de acetonitrila, a mistura é homogeneizada e centrifugada a 4000 rpm por 5 minutos, destes se retira uma alíquota e adiciona a fase móvel de interesse (Goudarzi *et al.*, 2017).

E por fim, a última técnica avaliada, conforme Marin *et al.* (2011), usa 250 µL de amostra (plasma ou soro) com 750 µL de acetonitrila fortificado com fenfluramina a 100 ng/mL, a mistura é homogeneizada e centrifugada por 5 minutos a 3500 rpm. O sobrenadante é retirado, secado e então o resíduo é reconstituído com fase móvel.

Todas estas técnicas foram comparadas quanto à limpidez do sobrenadante resultante, rapidez na evaporação do solvente e comportamento cromatográfico.

### 3.5 Otimização multivariada da DLLME

O desenvolvimento desta técnica extrativa teve início a partir de um artigo de Fernández e colaboradores (2013). Neste artigo são utilizados 500 µL de plasma e 2 mL de metanol, este volume de solvente orgânico age como desproteinizante e agente dispersor, o conteúdo é homogeneizado e centrifugado por 5 minutos à 3500 rpm. No sobrenadante são adicionados 250 µL de clorofórmio, esta mistura é transferida para outro tubo contendo 4,5 mL de água (pH 9,0) com 200 mg de cloreto de sódio. Ocorre a formação de uma “nuvem”, este tubo é colocado em banho de ultrassom por 2 minutos e centrifugado por 5 minutos à 3500 rpm para separação de fases. A fase aquosa (superior) é descartada e o sedimento é coletado, secado e ressuspenso na fase móvel para análise por HPLC. A partir deste estudo, diversas etapas foram otimizadas.

#### 3.5.1 Tipos de solvente extrator

Neste experimento foram avaliados os solventes extratores hexano, tolueno, clorofórmio, diclorometano e acetato de etila. Inicialmente 500 µL de plasma contaminado com um pool de benzodiazepínicos na concentração de 2 µg/mL contendo difenilamina como padrão interno foram homogeneizados em vórtex (2800 rpm) por 10 segundos com 200 µL de tampão pH 10 e então 500 µL do solvente extrator com 300 µL de metanol (solvente dispersor) foram



injetados em conjunto dentro da amostra, o conteúdo foi centrifugado por 10 minutos à 10000 rpm, a fase orgânica foi coletada, evaporada sob fluxo de ar e ressuspensa em 30 µL de fase móvel.

### **3.5.2 Tipos de solvente dispersor**

Neste experimento foram avaliados os solventes dispersores metanol, acetonitrila, isopropanol, tetrahidrofurano, etanol e acetona assim como a ausência de solvente dispersor. Inicialmente 500 µL de plasma contaminado com um pool de benzodiazepínicos na concentração de 2 µg/mL contendo difenilamina como padrão interno com 200 µL de tampão pH 10 foram homogeneizados em vórtex (2800 rpm) por 10 segundos e então 500 µL de tolueno com 300 µL de solvente dispersor foram injetados em conjunto dentro da amostra, o conteúdo foi centrifugado por 10 minutos à 10000 rpm, a fase orgânica foi coletada, evaporada sob fluxo de ar e ressuspensa em 30 µL de fase móvel.

### **3.5.3 Efeito salting-out**

Experimento realizado nas mesmas condições descritas acima, porém concentrações de 0%, 2,5% (0,0125 g) e 3% (0,025 g) de cloreto de sódio foram adicionadas previamente homogeneização.

### **3.5.4 Agitação por vórtex e banho de ultrassom**

Inicialmente, avaliou-se a eficiência de extração com homogeneização por vórtex nos tempos de 0, 15, 30, 45 e 60 segundos. Fixado o tempo de agitação por vórtex, comparou-se com a capacidade extrativa do banho de ultrassom. Neste experimento foi realizada a comparação da eficiência de extração com vórtex Biomixer QL-901 de 2800 rpm e do banho de ultrassom SoniClean 2 de 40 KHz de frequência e aquecida à 35°C nos tempos de 30, 60, 150 e 300 segundos. Uma alíquota de 500 µL de plasma contaminado com pool de benzodiazepínicos e padrão interno, contendo 0,0125 g de NaCl passaram pelo processo de extração com 500 µL de clorofórmio e 300 µL de acetonitrila, homogeneização por vórtex ou banho de ultrassom por 30 segundos, então foram centrifugados por 10 minutos à 10000 rpm, a fase orgânica foi coletada, evaporada por fluxo de ar e ressuspensa com 30 µL de fase móvel.

### **3.5.5 Avaliação do pH**

Experimento realizado com uma alíquota de 500 µL de plasma alcalinizados com uma solução de 50% de NaOH na faixa de pH entre 8-11 contaminado com pool de analitos de interesse, uma massa de 0,0125 g de NaCl passaram pelo processo de extração com 500 µL de clorofórmio e 300 µL de acetonitrila, homogeneização por vórtex de 10 segundos, banho de ultrassom por 60 segundos, então foram centrifugados por 10 minutos à 10000 rpm, a fase orgânica foi coletada, evaporada por fluxo de ar e ressuspensa com 30 µL de fase móvel.

### **3.5.6 Tempo e velocidade de centrifugação**

Experimento realizado sob as mesmas condições acima descritas, porém com variações no tempo de centrifugação de 10, 8, 6, 4 e 2 minutos e velocidades de 10000, 8000, 6000, 4000 e 2000 rpm.

### **3.5.7 Volumes de solvente extrator**

O experimento foi realizado com uma alíquota de 500 µL de plasma, alcalinizado com uma solução de 50% de hidróxido de sódio até o pH 10,0 e fortificado com pool de analitos de interesse, contendo 0,0125 g de NaCl passaram pelo processo de extração com volumes de 100, 200, 300, 400 e 500 µL de clorofórmio e 300 µL de acetonitrila, homogeneização por vórtex de 10 segundos, banho de ultrassom por 60 segundos, então foram centrifugados por 10 minutos à 10000 rpm, a fase orgânica foi coletada, evaporada por fluxo de ar e ressuspensa com 30 µL de fase móvel.

### **3.5.8 Volumes de solvente dispersor**

O experimento foi realizado com uma alíquota de 500 µL de plasma, alcalinizado com hidróxido de sódio (NaOH) no pH 10,0, contaminado com pool de benzodiazepínicos e padrão interno, contendo 0,0125 g de NaCl passaram pelo processo de extração com 400 µL de clorofórmio e volumes de 400, 500, 600, 700 e 800 µL de acetonitrila, homogeneização por vórtex de 10 segundos, banho de ultrassom por 60 segundos, então foram centrifugados por 10 minutos à 10000 rpm, a fase orgânica foi coletada, evaporada por fluxo de ar e ressuspensa com 30 µL de fase móvel.

### 3.6 Determinação dos benzodiazepínicos por DLLME

Após serem realizados testes de otimização, a DLLME ficou especificada da seguinte forma. Em um tubo de 2 mL são adicionados 500 µL de plasma citratado, o pH é previamente ajustado para 10 com hidróxido de sódio, são adicionados 0,015 g de cloreto de sódio, este tubo é homogeneizado em vórtex por 30 segundos. Após, são injetados simultaneamente 400 µL de clorofórmio e 700 µL de acetonitrila, o tubo é então fechado e colocado em banho de ultrassom por 1 minuto, passa por centrifuga à 1000 rpm por 10 minutos, a fração aquosa (superior) é coletada e desprezada e a fração orgânica (inferior) é transferida para um vial e evaporada sob fluxo de ar constante sem aquecimento. O resíduo é ressuspensionado em 30 µL de fase móvel e são injetados 20 µL no HPLC.

### 3.7 Validação analítica

Os parâmetros limite de detecção (LD), limite de quantificação (LQ), especificidade/seletividade, recuperação, precisão intra e interdia, acurácia e linearidade foram avaliados segundo o guia da UNODC (2009) e os parâmetros *carryover* e integridade da diluição foram avaliados segundo o guia da SWGTOX (2013). O padrão interno difenilamina foi adicionado na concentração de 250 ng/mL.

#### 3.7.1 Limite de detecção

Utilizou-se um pool de plasma como branco, do qual foi adicionado o padrão dos analitos de interesse em concentrações decrescentes (triplicatas). A resposta equivalente a três vezes sinal:ruído delimitou este parâmetro.

#### 3.7.2 Limite de quantificação

Os critérios de aceitação para limite de quantificação foram de coeficiente de variação  $\leq 20\%$  para precisão e 80-100% de exatidão. Este parâmetro foi avaliado inicialmente em triplicata nas concentrações de 100, 75, 60, 50 e 25 ng/mL para bromazepam, nordiazepam e diazepam; 50, 37,5 25 e 12,5 ng/mL para clonazepam e alprazolam. Após esta triagem, realizou-se uma análise em sextuplicata para confirmar o referido valor para cada analito. O LQ

escolhido para clonazepam e alprazolam foi de 50 ng/mL e para nordiazepam e diazepam foi de 60 ng/mL.

### **3.7.3 Especificidade/Seletividade**

A seletividade/especificidade foi avaliada utilizando 13 potenciais compostos que podem interferir na análise. Os analitos avaliados foram: cafeína, ácido acetilsalicílico, dipirona, paracetamol, varfarina, furosemida, atenolol, ibuprofeno, fenobarbital, medazepam, efedrina, fenilpropanolamina e salbutamol na concentração de 1000 ng/mL. As amostras passaram pelo processo extrativo conforme descrito no tópico 3.6. O critério de aceitação deste ensaio foi ausência de substâncias interferentes no tempo de retenção dos analitos de interesse e respectivo padrão interno.

### **3.7.4 Recuperação**

Os estudos de recuperação foram realizados através da preparação de dois conjuntos de amostras de plasma. Um conjunto de amostras (conjunto A), que consiste em três concentrações, 50 ng/mL para alprazolam e clonazepam e 60 ng/mL para nordiazepam e diazepam (primeira concentração), 180 ng/mL (segunda concentração) e 430 ng/mL (terceira concentração). O segundo conjunto (conjunto B), analitos foram adicionados nas amostras com a mesma concentração do conjunto A após o procedimento da DLLME. Todo procedimento realizado em sextuplicata.

A recuperação absoluta foi avaliada por comparação da resposta média obtida para o conjunto A e a resposta do conjunto B (100%). O Guia de Validação de Métodos Analíticos da UNODC (UNODC, 2009) não considera este fator como indicativo para reprovação do teste, desde que os demais parâmetros da validação alcancem os propósitos desejados.

### **3.7.5 Linearidade**

A curva de linearidade foi realizada em sextuplicata para cada ponto dos analitos de interesse, do qual iniciou-se pelo LQ (50 ng/mL para alprazolam e clonazepam e 60 ng/mL para nordiazepam e diazepam) seguido de 80, 160, 250, 500, 1000 e 1500 ng/mL.

### **3.7.6 Precisão intra e inter-dia**

A precisão intra e inter-dia foram realizadas através da análise de amostras de plasma contendo três concentrações conhecidas em três dias consecutivos. As concentrações avaliadas foram de 60 ng/mL para alprazolam e clonazepam e 75 ng/mL para nordiazepam e diazepam no ponto mais baixo, 180 ng/mL para todos no ponto intermediário e 430 ng/mL no ponto mais alto em sextuplicata.

### **3.7.7 Acurácia (Inexatidão)**

Uma curva foi construída nas concentrações de 50 ng/mL para alprazolam e clonazepam e 60 ng/mL para nordiazepam e diazepam, 250 ng/mL e 500 ng/mL para todos em triplicata. Após, as concentrações testes foram de 60 ng/mL para alprazolam e clonazepam e 75 ng/mL para nordiazepam e diazepam, 180 ng/mL para todos e 430 ng/mL para todos, em sextuplicata.

### **3.7.8 Integridade da diluição e efeito memória (*carryover*)**

Inicialmente uma curva foi construída nas concentrações de 50 ng/mL para alprazolam e clonazepam e 60 ng/mL para nordiazepam e diazepam; 250 ng/mL e 500 ng/mL para todos em triplicata. Uma alíquota de 500 µL de plasma foi contaminada com um pool de benzodiazepínicos na concentração de 4 µg/mL, contendo padrão interno, e então diluída 25 vezes com plasma isento de analitos para a concentração de 160 ng/mL. Após injeção do extraído da amostra nesta concentração, foram injetadas 3 amostras branco para avaliação de efeito memória.

## 4. RESULTADOS

### 4.1 Escolha da fase estacionária

Durante a avaliação de escolha da fase estacionária para definição do número de analitos alvo deste estudo, ocorreram algumas situações. Os experimentos com as colunas de 5 cm (3,5 µm de tamanho de partícula), foi percebida uma limitação no número de padrões de benzodiazepínicos que pudessem ser trabalhados devido ao comprimento da coluna não ser o suficiente para que ocorresse separação adequada dos analitos em tempo hábil, ainda, os 13 padrões de benzodiazepínicos apresentam propriedades físicas e químicas similares o que gerou co-eluição, sendo uma limitação para análise por HPLC-DAD.

Análises em modo gradiente foram realizadas para solucionar esta situação, porém se observou que havia um tempo de reequilíbrio da condição inicial necessário entre injeções para estabilização do sistema cromatográfico e este ponto inviabilizaria a etapa de validação, fato observado em todas as colunas testadas.

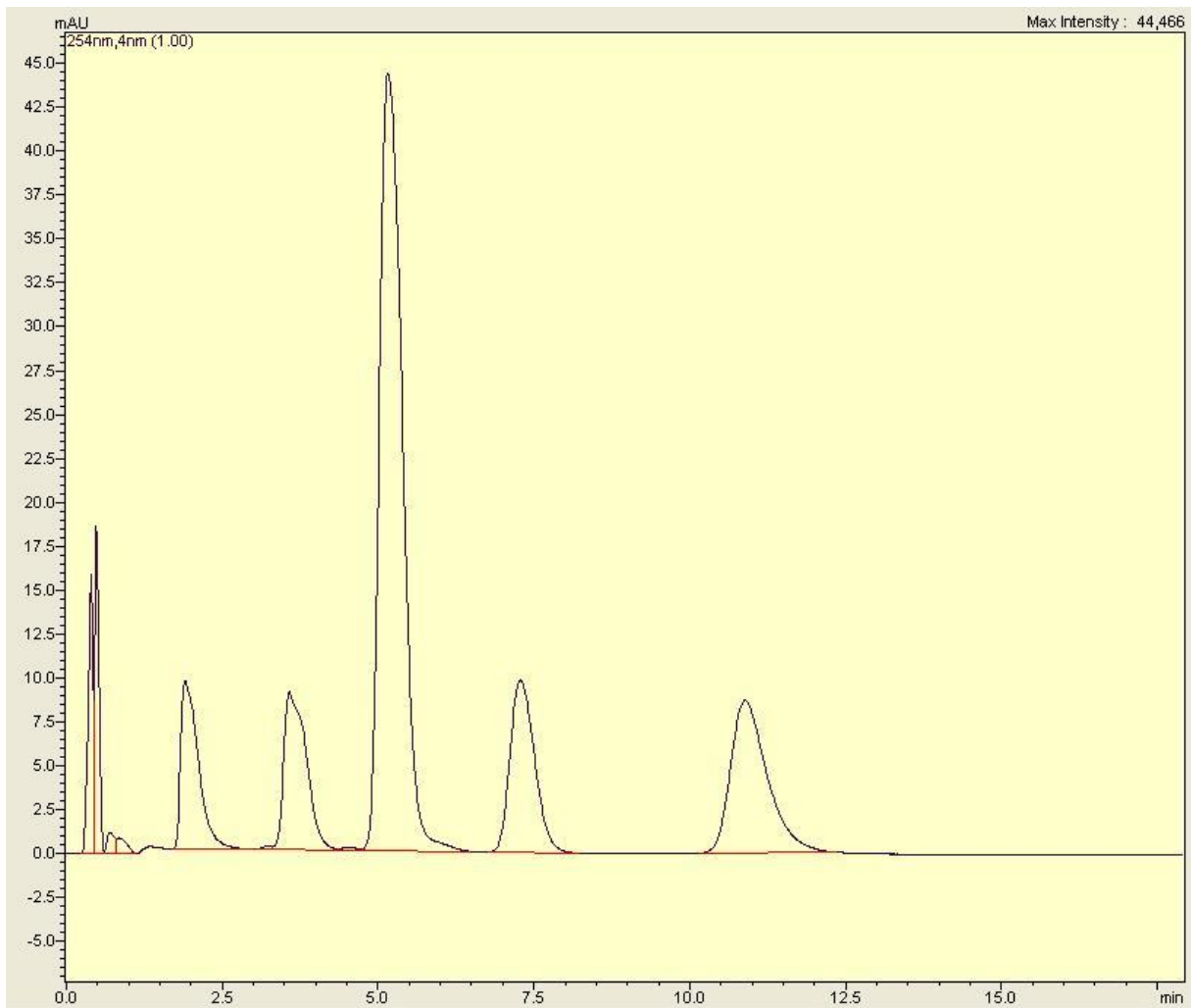
Além disso, a constante alcalinização da fase móvel também foi um fator importante para a redução da vida útil das colunas evidenciado pela perda de resolução dos picos interferindo diretamente na qualidade da análise cromatográfica.

Após análise de diferentes parâmetros como vazão, tamanho de coluna e fases móveis com o propósito de desenvolver um perfil cromatográfico com o maior número de benzodiazepínicos possíveis em uma mesma corrida cromatográfica, as situações de co-eluição não puderam ser resolvidas e então se optou pelo método de Kuroda e colaboradores para análise bromazepam, clonazepam, alprazolam, nordiazepam e diazepam.

Diante destas situações observadas durante a seleção de fase estacionária, a coluna Waters® XBridge 3,5 µm 4,6 x 150 mm foi definida para os ensaios de otimização da DLLME e validação analítica.

### 4.2 Escolha da fase móvel

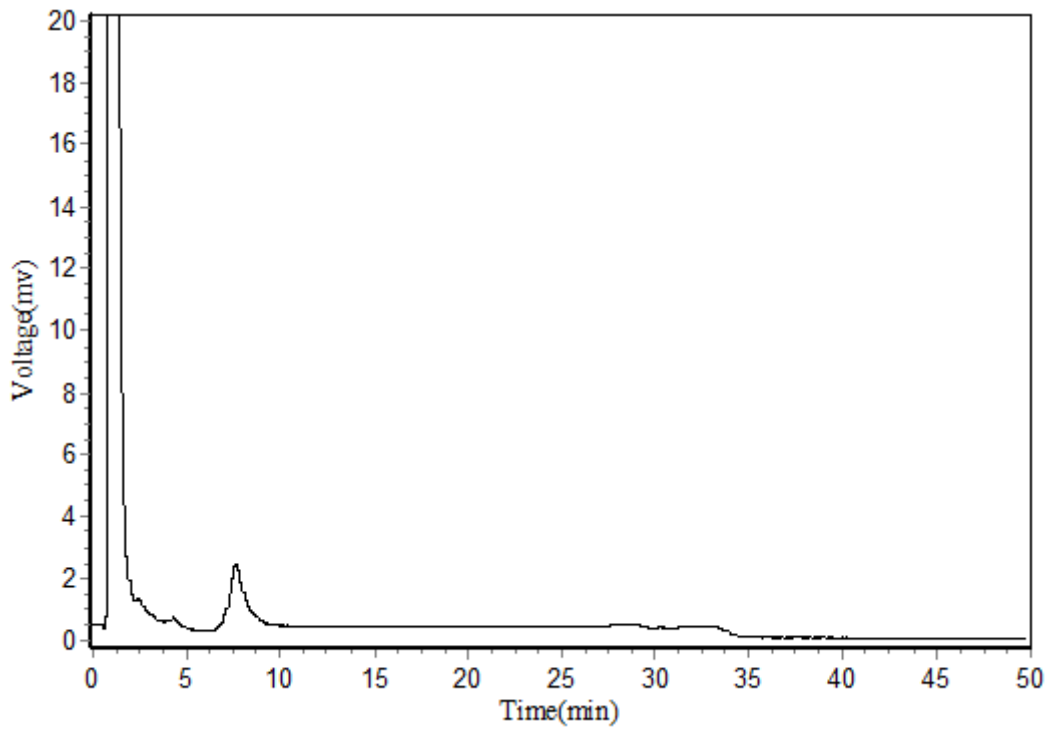
A escolha da fase móvel foi baseada na tentativa de reproduzir o perfil cromatográfico dos estudos analisados no tópico 3.3.2, entre estes estudos a fase móvel que apresentou comportamento similar com os experimentos realizados é constituída de água em pH 9 com trietilamina/metanol/acetonitrila nas proporções de 63:19:18 para os analitos alprazolam, clonazepam, nordiazepam e diazepam. O cromatograma deste perfil está mostrado abaixo (Cromatograma 1).



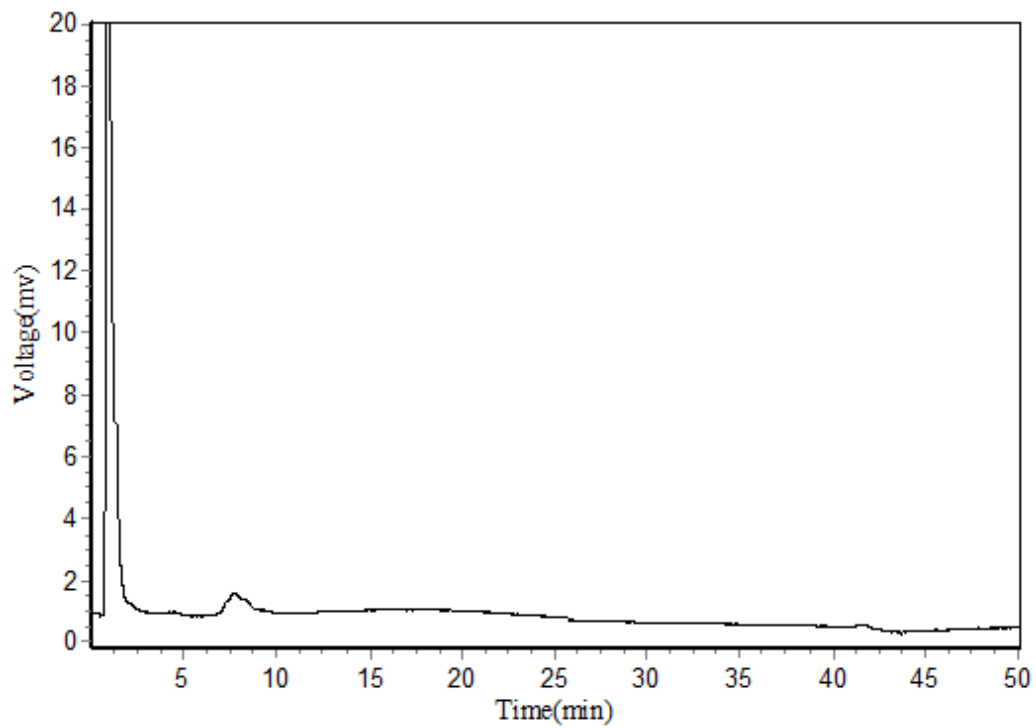
Cromatograma 1 – Perfil cromatográfico dos padrões bromazepam, clonazepam, alprazolam, nordiazepam e diazepam, respectivamente da esquerda para a direita.

#### 4.3 Escolha da matriz biológica

As matrizes biológicas soro e plasma desproteinizados conforme as técnicas descritas no tópico 3.4 foram comparadas conforme a limpidez do sobrenadante, rapidez na evaporação do solvente e comportamento cromatográfico. Abaixo estão os cromatogramas das injeções dos sobrenadantes isentos de analitos.

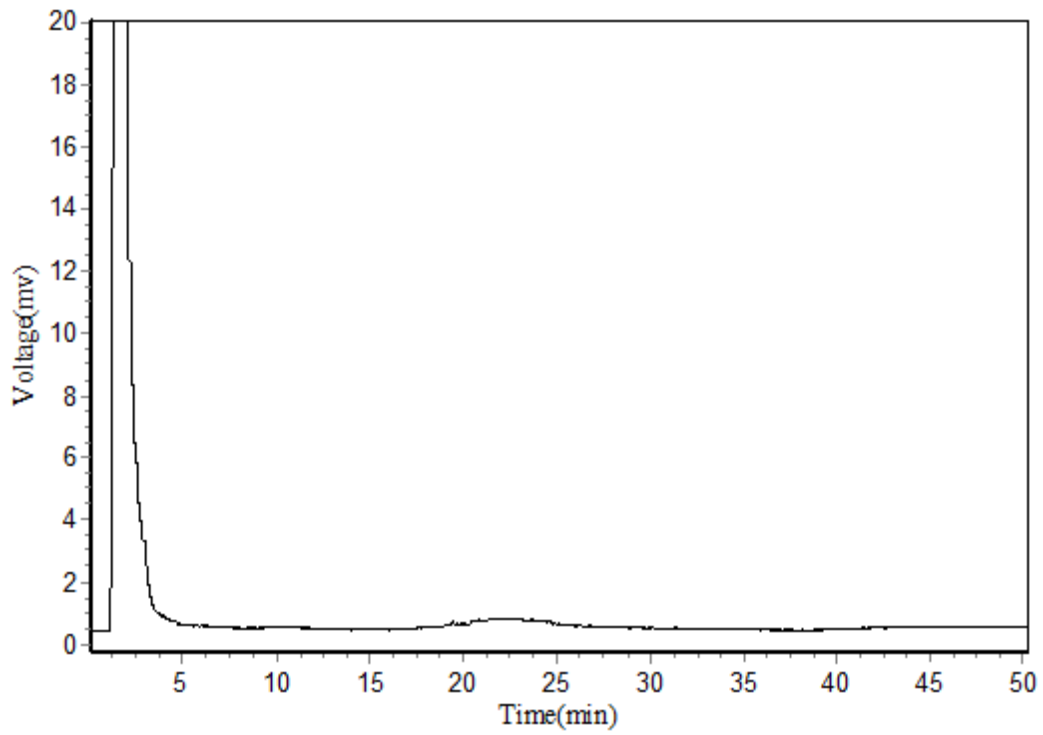


Cromatograma 2 – Amostra de soro desproteinizado conforme o método de Larsen e colaboradores (2011)

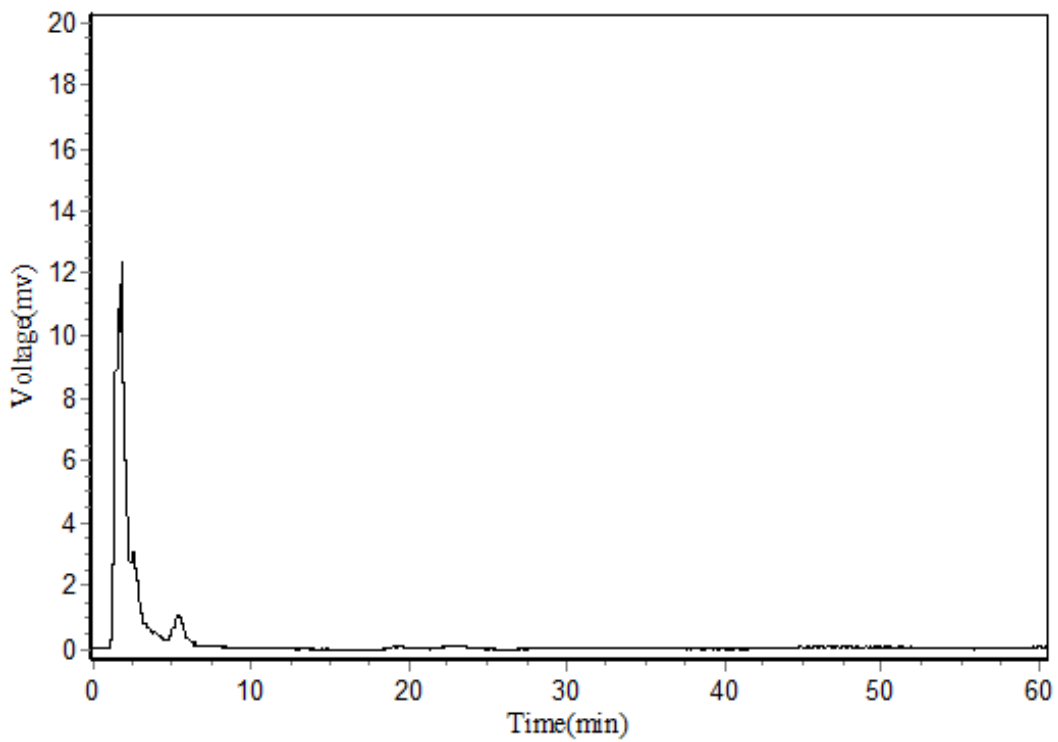


Cromatograma 3 – Soro desproteinizado conforme técnica de Molaei e colaboradores (2015)

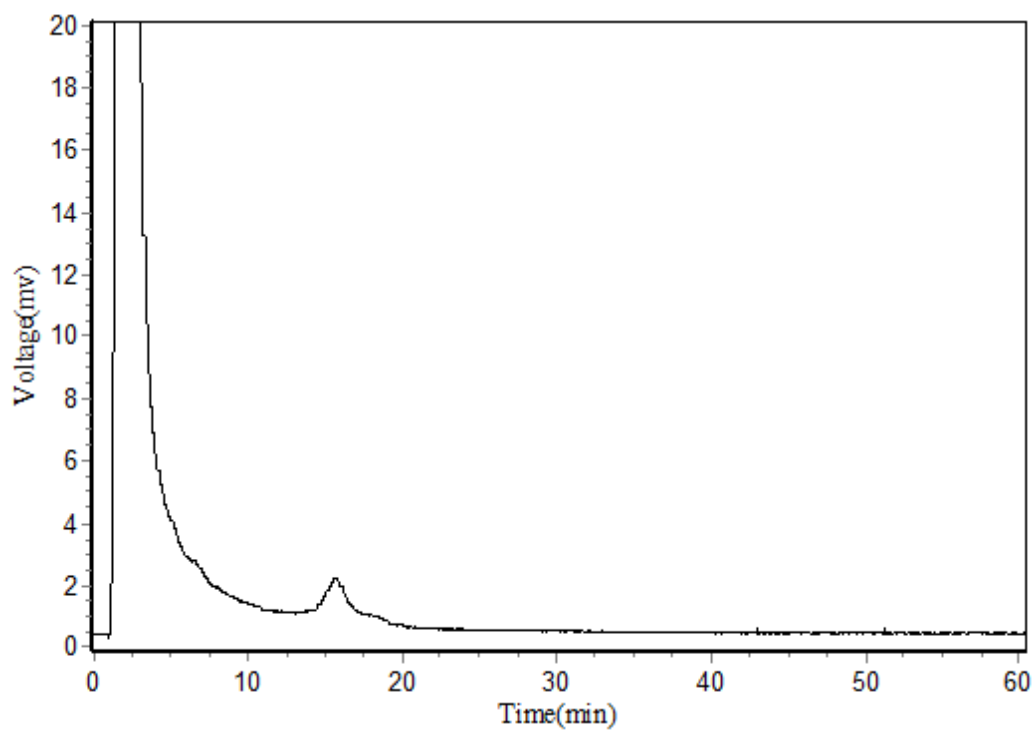




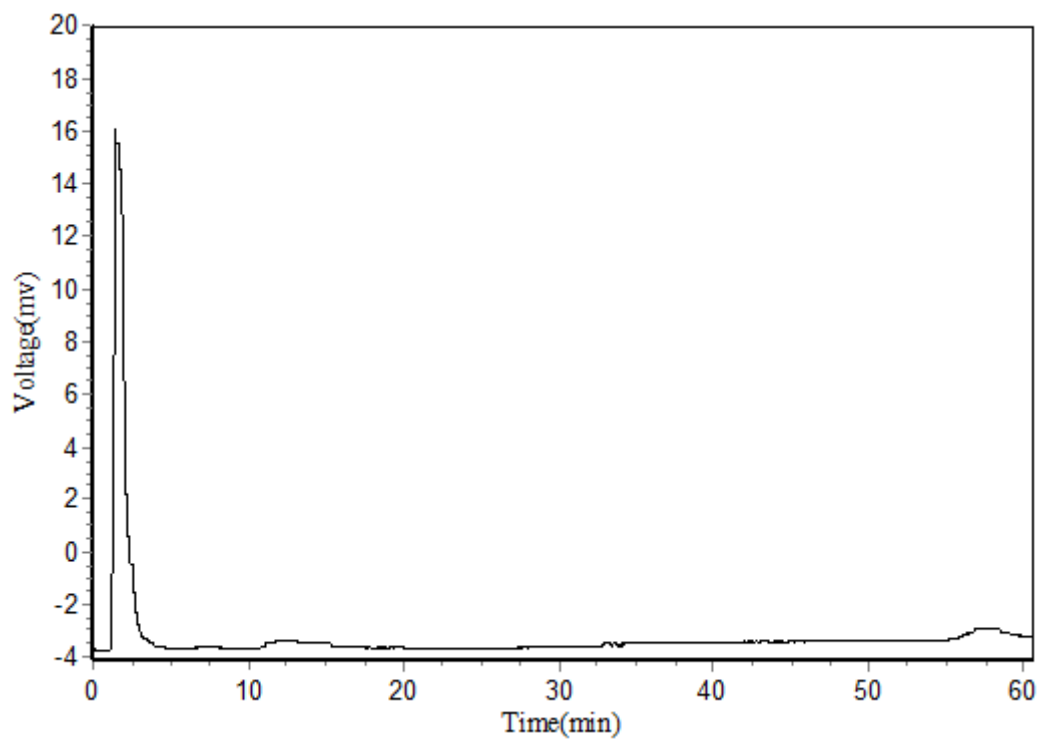
Cromatograma 4 – Soro desproteinizado conforme técnica de Zhou e colaboradores (2015)



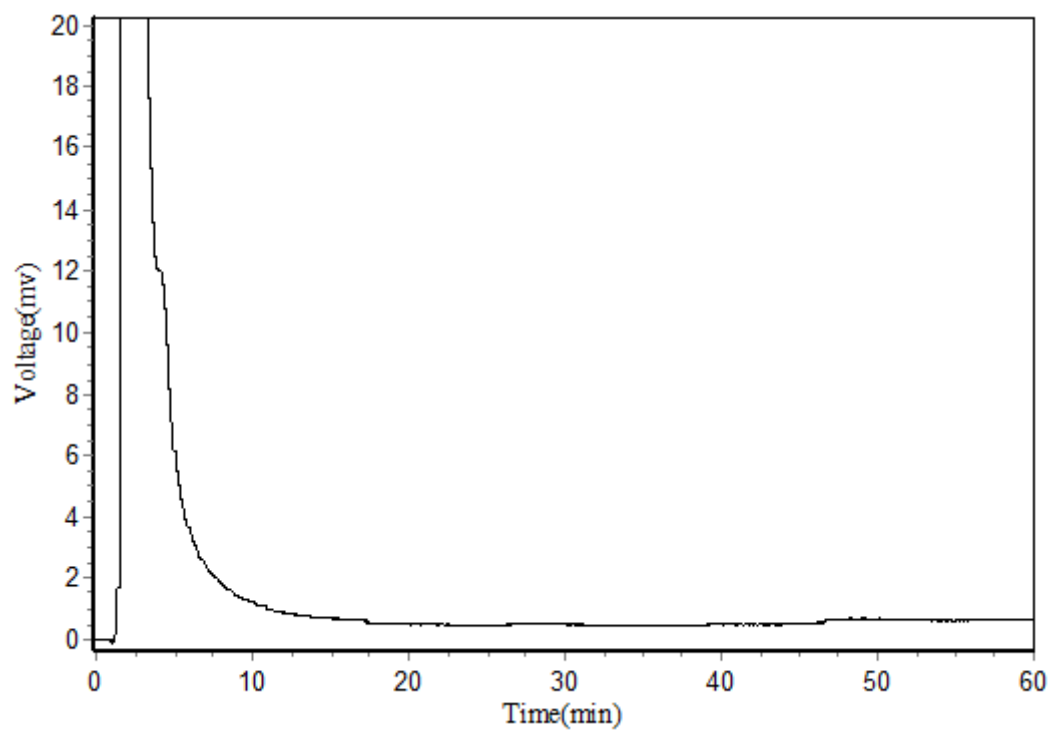
Cromatograma 5 – Soro desproteinizado conforme técnica de Ghambarian e colaboradores (2016)



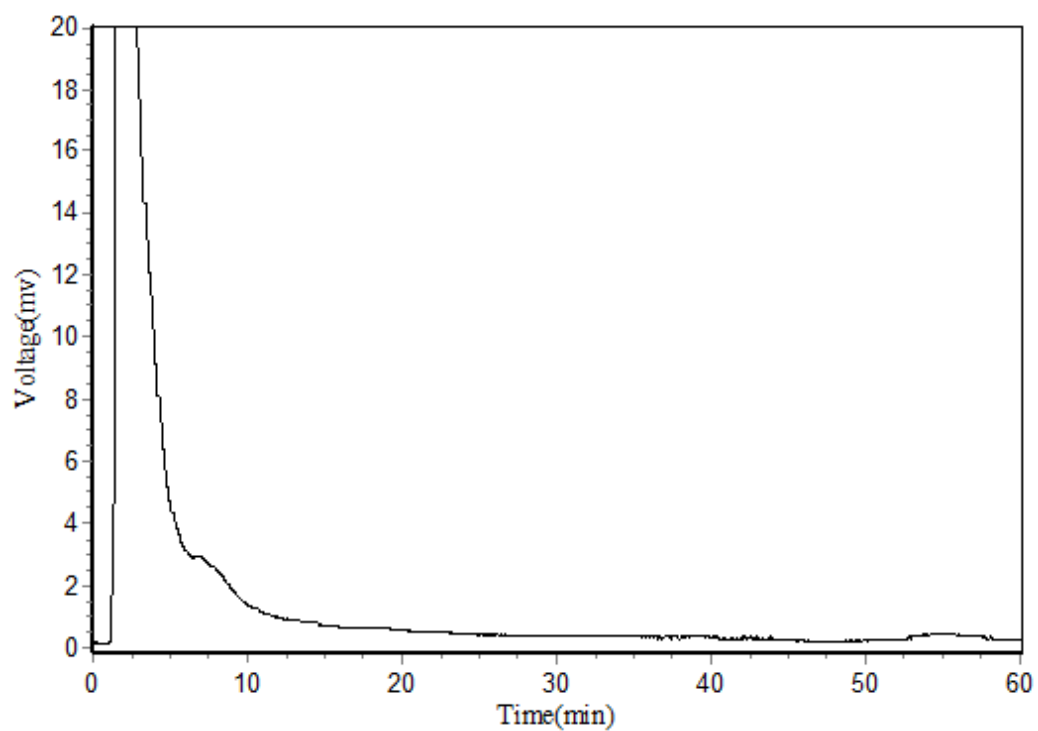
Cromatograma 6 – Plasma EDTA desproteinizado conforme técnica de Molaei e colaboradores (2015).



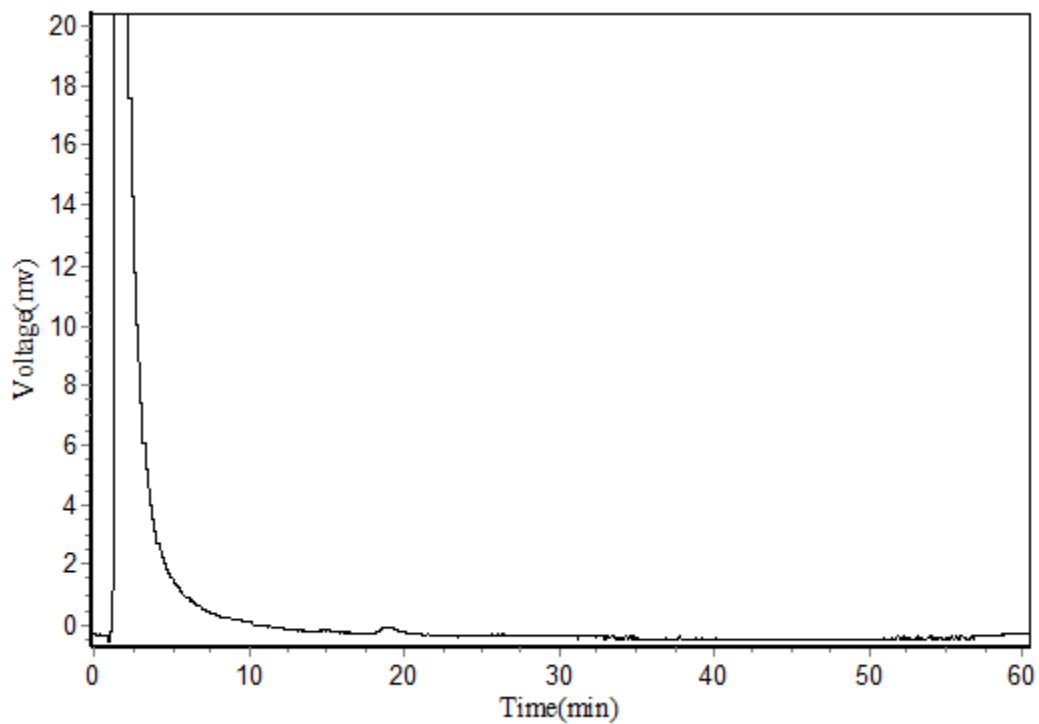
Cromatograma 7 – Plasma EDTA desproteinizado conforme técnica de Marin e colaboradores (2012).



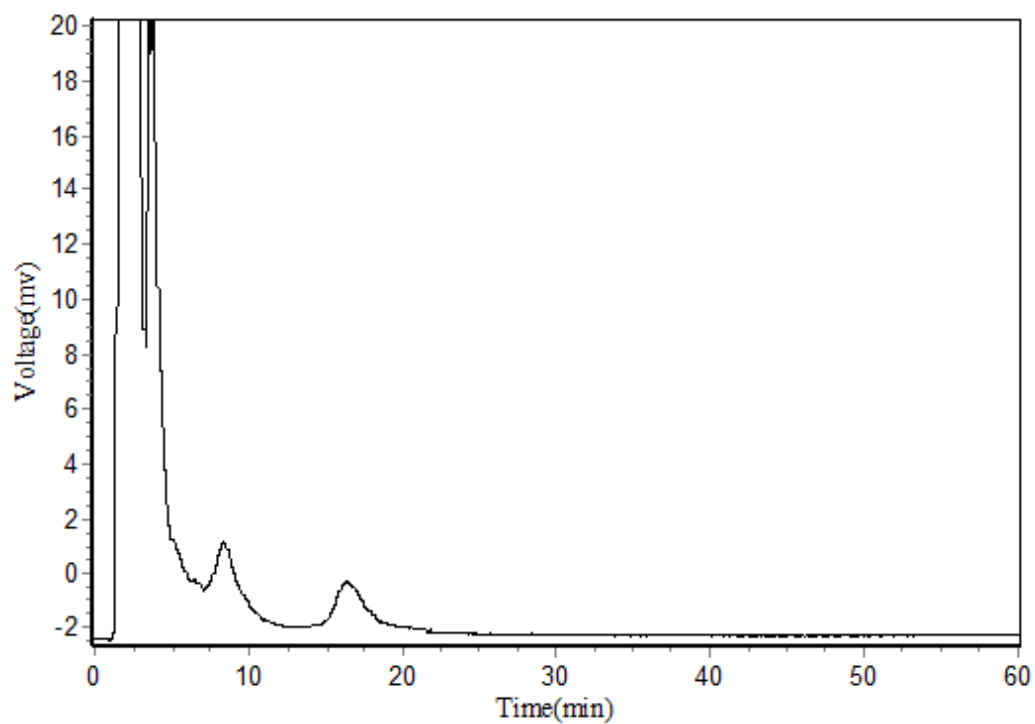
Cromatograma 8 – Plasma CPDA-1 desproteinizado conforme técnica de Larsen e colaboradores (2011).



Cromatograma 9 – Plasma citratado desproteinizado conforme técnica de Larsen e colaboradores (2011).



Cromatograma 10 – Plasma heparinizado desproteinizado conforme técnica de Larsen e colaboradores (2011).



Cromatograma 11 – Plasma heparinizado desproteinizado conforme técnica de Molaei e colaboradores (2015).

Houve comparação de todos os tipos de amostras com todas as 6 técnicas desproteinizantes, porém as que não possuem cromatogramas apresentaram turbidez no sobrenadante e não foram injetadas no HPLC por proteção da coluna e do equipamento.

#### 4.4 Otimização da DLLME para benzodiazepínicos em amostra de plasma

##### 4.4.1 Otimização do solvente extrator

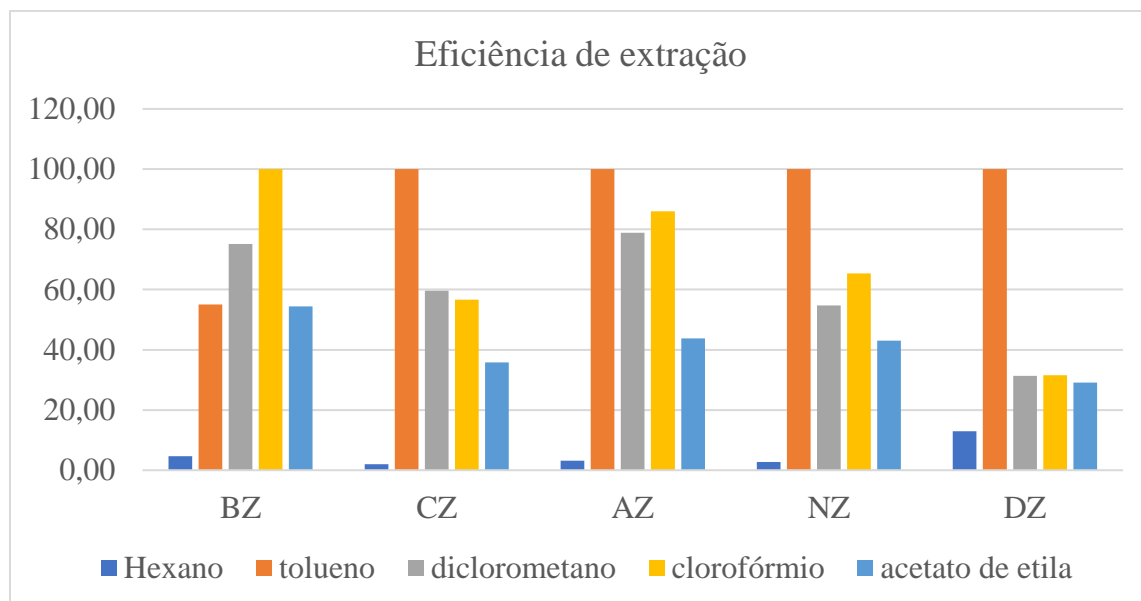


Gráfico 1 – Eficiência de extração para bromazepam, clonazepam, alprazolam, nordiazepam e diazepam nos diferentes solventes extratores.

A partir da comparação de área relativa, o tolueno foi o solvente com maior eficiência de extração para clonazepam, alprazolam, nordiazepam e diazepam, sendo que o clorofórmio foi o melhor para bromazepam. Entretanto, o tolueno foi descartado como solvente extrator, pois carregava muitos interferentes endógenos da matriz e isso era perceptível pela rápida saturação da pré-coluna, portanto para os ensaios seguintes, o clorofórmio foi definido como solvente extrator.

#### 4.4.2 Otimização do solvente dispersor

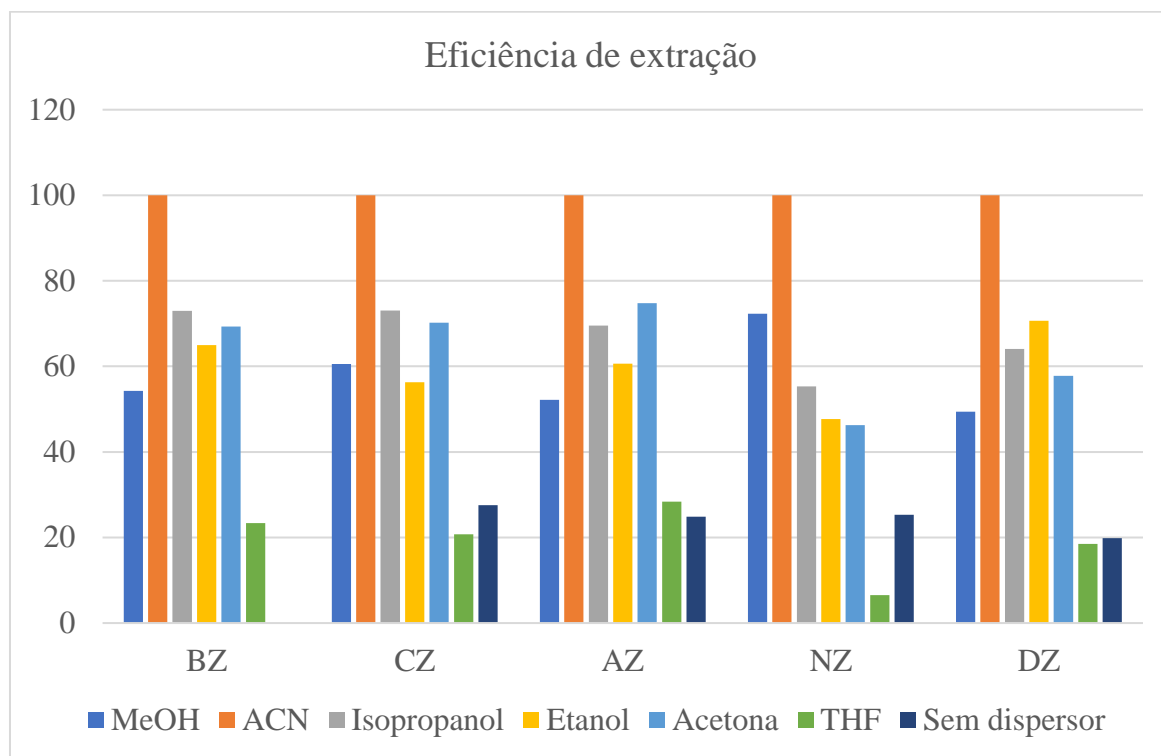


Gráfico 2 - Eficiência de extração para bromazepam, clonazepam, alprazolam, nordiazepam e diazepam nos diferentes solventes dispersores.

A eficiência de extração, de acordo com a área relativa, mostrou que a acetonitrila foi o solvente que melhor dispersou o solvente extrator na amostra para todos os analitos testados, inclusive na ausência de solvente dispersor.

#### 4.4.3 Otimização do pH

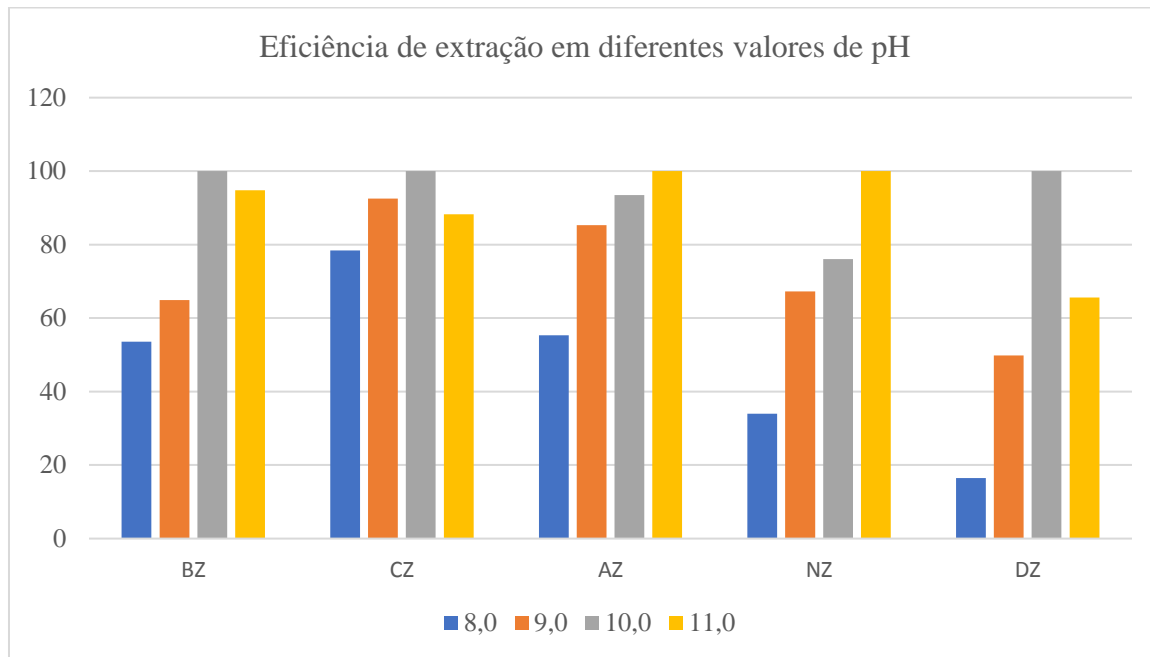


Gráfico 3 – Eficiência de extração para bromazepam, clonazepam, alprazolam, nordiazepam e diazepam nos valores de pH de 8 a 11.

Este parâmetro mostrou uma diferença de eficiência extrativa entre os valores de pH 10 e 11. O pH 10 foi melhor para os analitos bromazepam, clonazepam e diazepam, e o pH 11 foi melhor para alprazolam e clonazepam. O valor de pH 10, neste contexto, foi definido, pois clonazepam e bromazepam possuem menores detectabilidades e menor concentração plasmática na faixa terapêutica. Além disso, o clonazepam possui maior importância toxicológica devido as estatísticas de intoxicações ocorridas no estado do Rio Grande do Sul.

#### 4.4.4 Otimização do efeito salting out

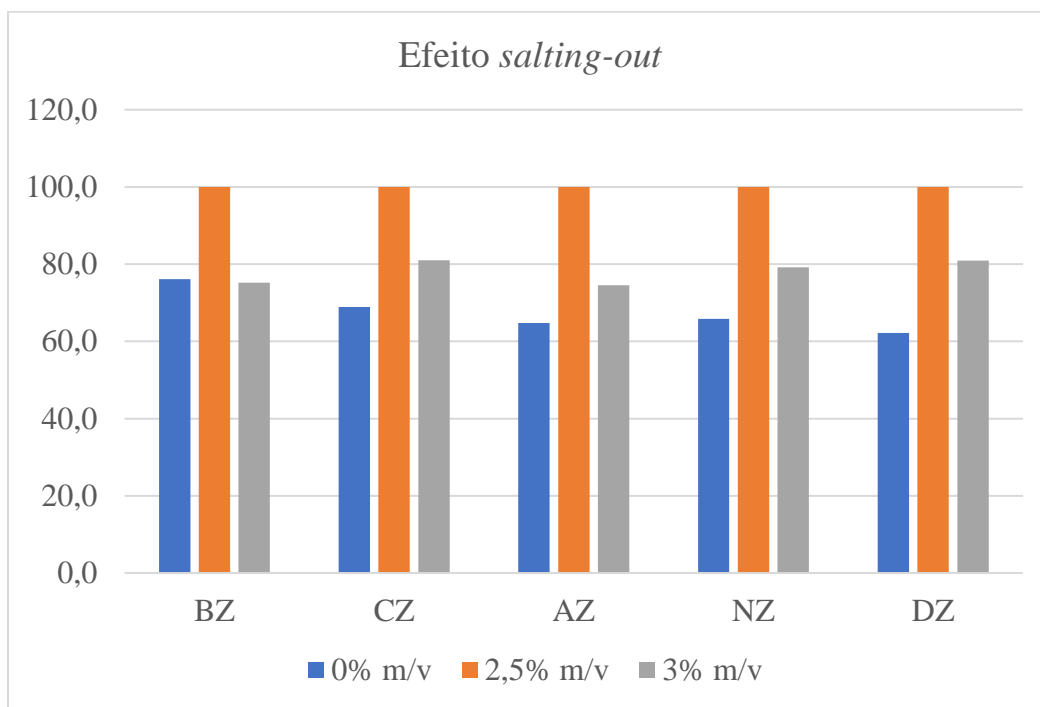


Gráfico 4 – Eficiência de extração para bromazepam, clonazepam, alprazolam, nordiazepam e diazepam nas concentrações de cloreto de sódio de 0, 2,5 e 3% m/v.

O efeito *salting-out* foi melhor observado na concentração de 2,5% m/v de cloreto de sódio, indicando que esta concentração foi a mais efetiva na diminuição da solubilidade dos analitos pela fase aquosa sendo melhor captados pelo solvente extrator.



#### 4.4.5 Otimização da força de agitação por vórtex e banho de ultrassom

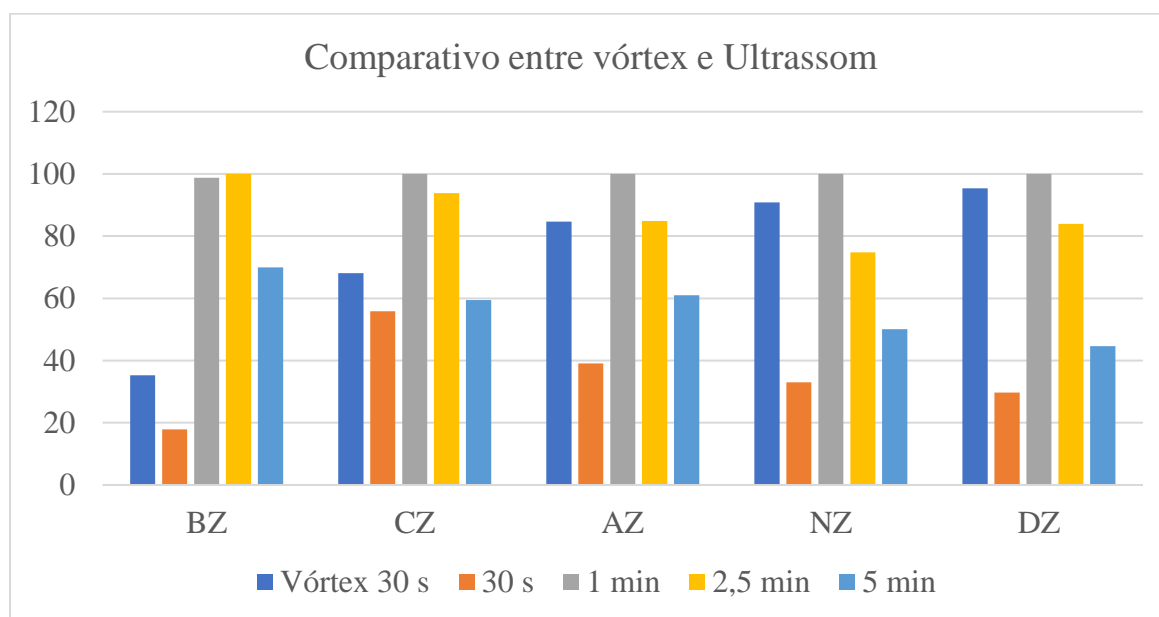


Gráfico 5 – Eficiência de extração para os analitos bromazepam, clonazepam, alprazolam, nordiazepam e diazepam usando vórtex e banho de ultrassom

O uso de vórtex para homogeneização dos solventes extrator e dispersor na amostra foi mais efetivo que o banho ultrassônico apenas no tempo de 30 segundos, a partir de 1 minuto o ultrassom foi mais eficiente, pois ajuda a desfazer a emulsão na interface das fases orgânica e aquosa pelo processo de cavitação. Deste modo, ocorre maior transferência do analito presente nesta emulsão para a fração orgânica. Entretanto, com o aumento do tempo ocorre prejuízo da extração, devido ao aquecimento, assim ocorre perda de solvente orgânico pela volatilização do clorofórmio.

#### 4.4.6 Otimização do volume de solvente extrator

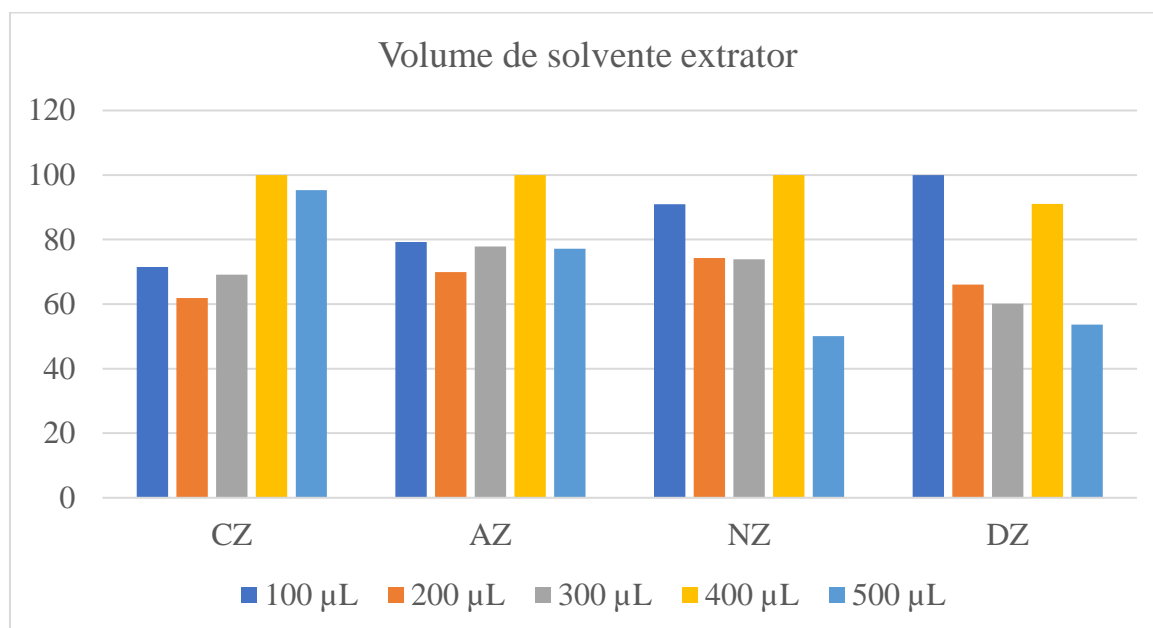


Gráfico 6 – Eficiência de extração para clonazepam, alprazolam, nordiazepam e diazepam nos diferentes volumes de solvente extrator.

Este experimento mostrou que o melhor volume de extração para clonazepam, alprazolam e nordiazepam foi de 400 µL, sendo apenas o diazepam em 500 µL. A diferença de 100 µL não foi significativa, pois a faixa terapêutica do diazepam é a maior entre todos os analitos testados, assim esta perda de eficiência pode ser efetuada sem prejuízo de alcance da faixa terapêutica (100-2500 ng/mL). Volumes maiores não puderam ser testados, pois o tubo possui a limitação de capacidade 2 mL.

#### 4.4.7 Otimização do volume de solvente dispersor

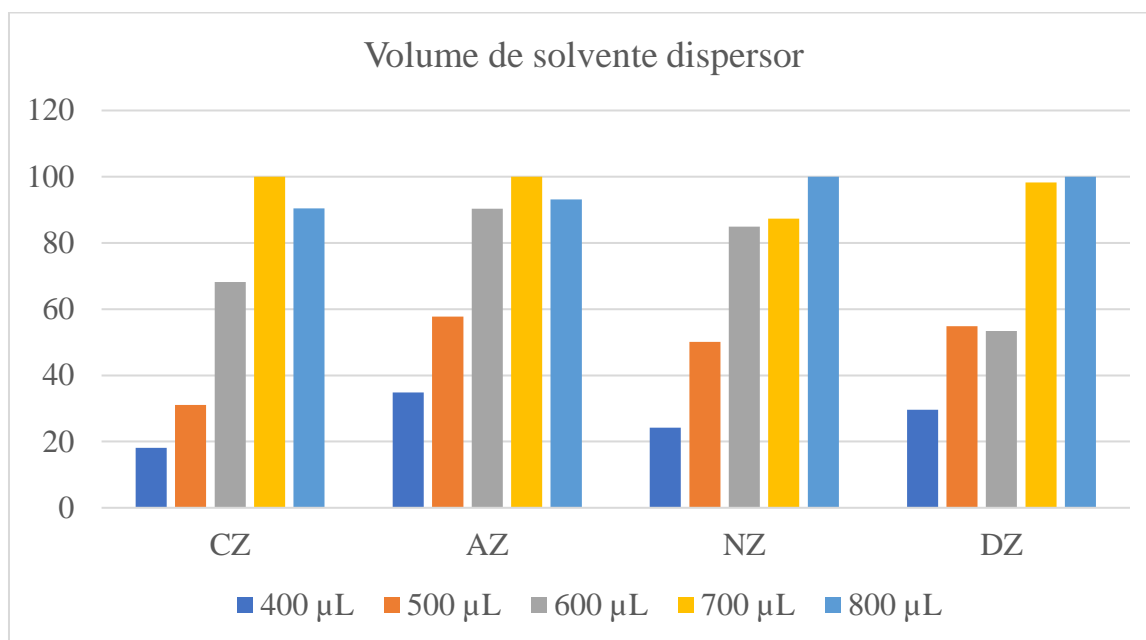


Gráfico 7 - Eficiência de extração para clonazepam, alprazolam, nordiazepam e diazepam nos diferentes volumes de solvente dispersor.

O volume de solvente dispersor impacta diretamente no quanto haverá distribuição do solvente extrator na amostra, para os analitos clonazepam e alprazolam o volume de 700 µL foi o que melhor apresentou este efeito, e para nordiazepam e diazepam foi o volume de 800 µL. O volume de 700 µL foi escolhido, pois, assim como ocorreu no volume de solvente extrator, esta diferença de 100 µL não foi significativa, pois a faixa terapêutica do nordiazepam e diazepam são maiores que do clonazepam e alprazolam. Volumes maiores também não puderam ser testados, pois o tubo possui a limitação de capacidade 2 mL. Volumes de tubo acima de 2 mL não seriam compatíveis com a ultracentrífuga.

#### 4.4.8 Otimização do tempo e velocidade de centrifugação

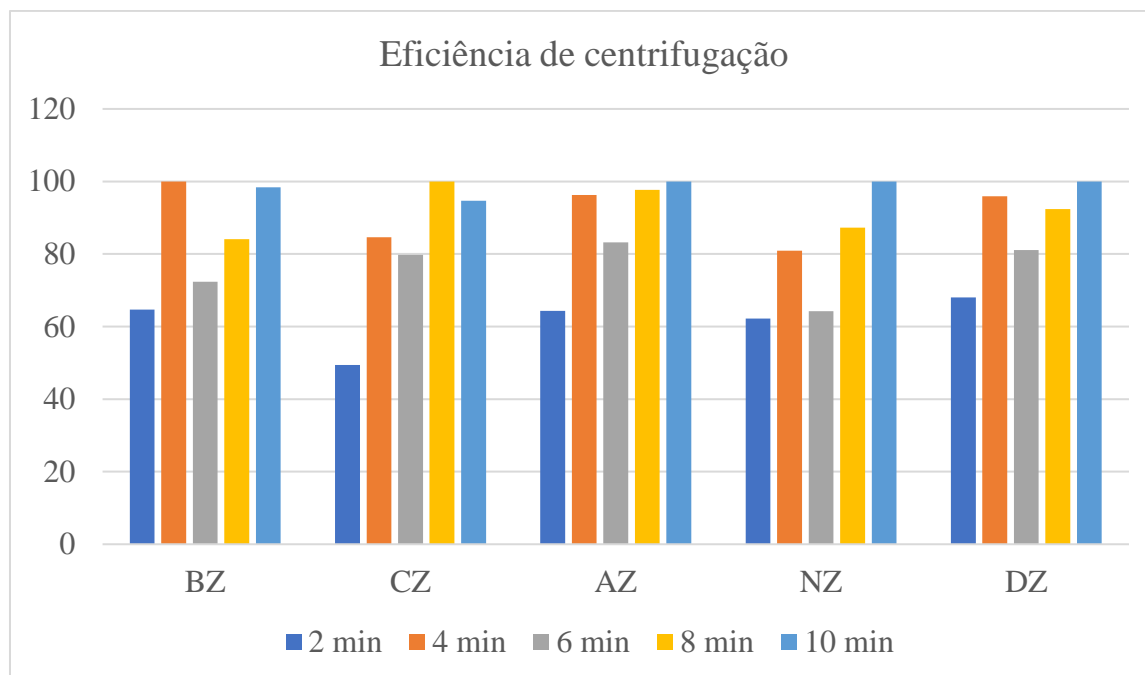


Gráfico 8 – Eficiência de extração para os analitos bromazepam, clonazepam, alprazolam, nordiazepam e diazepam nos diferentes tempos de centrifugação.

O tempo de 10 minutos foi escolhido por ser melhor para a maioria dos analitos. A velocidade de centrifugação também foi avaliada fixando este tempo de 10 minutos nas velocidades de 2000, 4000, 6000, 8000 e 10000 rpm, este parâmetro foi avaliado visualmente apenas, sendo 10000 rpm a melhor velocidade que separou as fases orgânica e aquosa com melhor eficiência, nas outras velocidades testadas não havia separação total das fases.

#### 4.5 Validação da DLLME para benzodiazepínicos em amostra de plasma

A validação do método para benzodiazepínicos foi realizada após otimização da extração desses analitos. O trabalho tem como foco a determinação de concentrações estabelecidas para estes analitos em situações de avaliação de drogas dentro da faixa terapêutica encontrada no sangue e em casos de intoxicação. A linearidade foi efetuada tendo o primeiro ponto o LQ de cada analito até 1500 ng/mL como último ponto. A equação da reta e coeficiente de determinação para os analitos foram: clonazepam ( $y=16,077x+1188,5$ ;  $r^2=0,9983$ ), alprazolam ( $y=913,03x-35597$ ,  $r^2=0,9992$ ), nordiazepam ( $y=144,61x+15409$ ,  $r^2=0,9928$ ) e

diazepam ( $y=269,92x+51751$ ,  $r^2=0,9936$ ). Demais dados da validação estão expostos na tabela 6.

Tabela 6 - Parâmetros de confiança do método validado para determinação de benzodiazepínicos em amostra de plasma.

<b>Parâmetros</b>	<b>Alprazolam</b>	<b>Clonazepam</b>	<b>Diazepam</b>	<b>Nordiazepam</b>
<b>Recuperação (%)</b>				
C1	94,53	116,54	49,04	37,11
C2	80,52	65,28	256,06	74,16
C3	157,23	124,84	143,44	138,89
<b>LD (ng/mL)</b>	40	50	50	50
<b>LQ (ng/mL)</b>	50	50	60	60
<b>Precisão intra-dia (CV%)</b>				
C1	2,12	-	23,85	17,71
C2	5,50	-	13,09	25,93
C3	10,82	-	21,74	17,13
<b>Precisão inter-dia (CV%)</b>				
C1	4,57	-	32,22	82,2
C2	9,27	-	2,70	42,69
C3	8,21	-	6,98	9,62
<b>Exatidão (%)</b>				
C1	133,04	97,5	63,97	46,61
C2	86,26	76,09	99,17	93,96
C3	82,72	75,30	84,79	90,06
<b>Integridade da diluição</b>				
<b>Precisão (CV%)</b>				
25 vezes (160 ng/mL)	5,35	17,95	12,89	25,16
<b>Exatidão (%)</b>				
25 vezes (160 ng/mL)	86,17	59,09	42,41	22,85

C1 da recuperação é 50 ng/mL para alprazolam e clonazepam e 60 ng/mL para nordiazepam e diazepam; e C1 da exatidão é 60 ng/mL para alprazolam e clonazepam e 75 ng/mL para nordiazepam e diazepam, C2, 130 ng/mL; C3, 430 ng/mL; LD, limite de detecção; LQ, limite de quantificação; CV%, coeficiente de variação; 25 vezes, 4000 ng/mL; DZ, diazepam, ND, nordiazepam.

Um cromatograma demonstrando o tempo de retenção dos analitos que foram validados está na Figura 7.

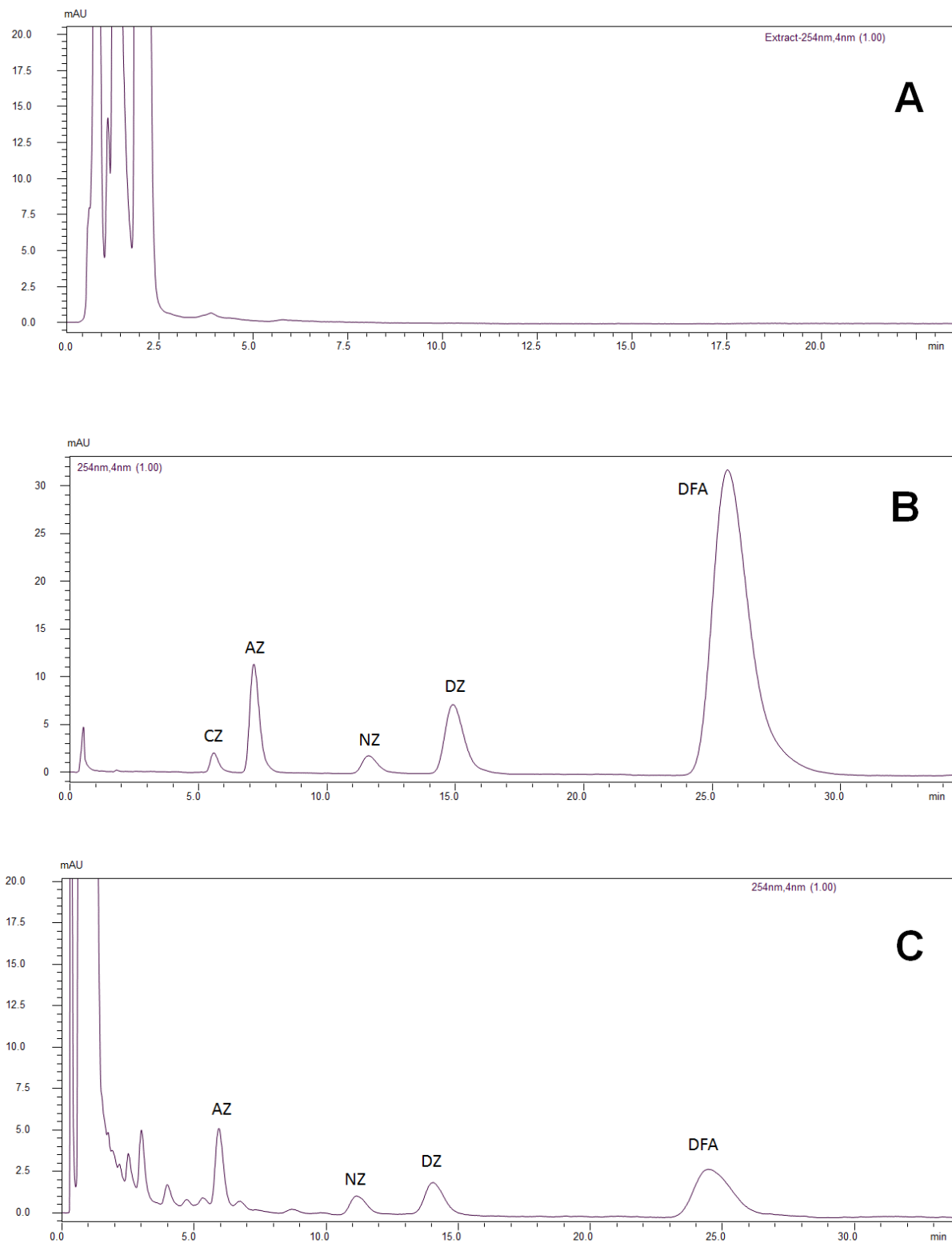


Gráfico 20 – Cromatograma para benzodiazepínicos após DLLME em amostras de plasma. A) amostra branco de plasma B) padrões de benzodiazepínicos e padrão interno; C) amostra

fortificada com os analitos de interesse e padrão interno. Tempo de retenção de clonazepam (5,5 min), alprazolam (7,3 min), nordiazepam (11,5 min), diazepam (14 min) e difenilamina (26 min) no comprimento de onda de 254 nm.

## 5. DISCUSSÃO

Inicialmente os experimentos realizados visaram o desenvolvimento de uma metodologia analítica que fosse capaz de determinar 12 benzodiazepínicos diferentes, em virtude de similaridades nas propriedades físicas e químicas e da limitação técnica do equipamento, optou-se por selecionar aqueles com maior relevância clínica e toxicológica.

Conforme descrito anteriormente, o relatório de 2018 do Centro de Informações Toxicológicas do estado do Rio Grande do Sul mostrou que os benzodiazepínicos totalizaram 2596 casos de intoxicação, sendo o Clonazepam o mais prevalente entre eles com 1506 casos, seguido de Diazepam (604 casos), Alprazolam (225 casos) e Bromazepam (95 casos) (CIT, 2018). Aliado a estes dados, a partir do perfil cromatográfico estabelecido, com base no estudo de Kuroda e colaboradores (1995), foi possível eluição destes benzodiazepínicos e 1 produto de biotransformação (nordiazepam) com separação e resolução adequados.

Ainda, a matriz biológica visada neste estudo foi o plasma, pois este fluido biológico apresenta altas concentrações dos analitos para este tipo de situação, considerando que estes fármacos apresentam alta taxa de ligação às proteínas plasmáticas. Esta amostra proporciona um volume suficiente para manipulação laboratorial e reflete com maior fidedignidade a correlação entre os níveis de fármaco e seus respectivos efeitos no organismo, também possibilita a análise da droga precursora e de produtos de biotransformação. (BULCÃO *et al.*, 2012; MORENO *et al.*, 2014; BORDIN *et al.*, 2015). Esta informação justifica a seleção do nordiazepam, pois é o primeiro produto de biotransformação, também ativo, gerado da metabolização hepática em maior proporção no sangue, a sua determinação junto de diazepam possui uma importância toxicológica na interpretação de casos de intoxicação e auxilia na conduta médica posterior.

Os benzodiazepínicos são substâncias químicas caracterizadas como bases fracas, apresentam em sua estrutura de 1 a 2 grupamentos amina ionizáveis. Conforme o pH do meio, a proporção das formas ionizada e não-ionizada influencia na taxa de absorção e duração do efeito farmacológico. Esta propriedade química foi considerada na otimização da fase móvel deste estudo.

De acordo com a base de dados Chemicalize, gráficos da distribuição de microespécies dos benzodiazepínicos mostram que estes possuem de 2 a 3 diferentes moléculas ionizadas conforme o pH do meio.

A análise das curvas de dissociação dos benzodiazepínicos alprazolam, bromazepam, clonazepam, nordiazepam e diazepam revelam que estes apresentam 100% da forma não-ionizada nas faixas de pH de 5-9 para nordiazepam, 5-14 para alprazolam e diazepam e 4-10 para clonazepam e bromazepam, então um pH de 9 foi definido para a fração aquosa da fase móvel com o objetivo da não eluição de outras formas ionizadas destas moléculas interferindo no perfil cromatográfico deste estudo. A acidificação da fração aquosa da fase móvel não foi considerada, pois o valor necessário para que todas as espécies químicas estivessem 100% ionizadas seria abaixo de 2, este valor de pH seria prejudicial à coluna cromatográfica e também possivelmente ao cromatógrafo líquido (Chemicalize, 2019).

Para a alcalinização da fase móvel, foi utilizada a trietilamina (CAS 121-44-8). Esta substância química apresenta algumas propriedades físicas e químicas benéficas para cromatografia líquida. Esta molécula é derivada da amônia, onde 3 hidrogênios foram substituídos por 3 grupamentos etila se tornando uma amina terciária com um par de elétrons livres, apresenta alto ponto de ebulição (89,3°C), solúvel em água e outros solventes orgânicos, absorvibilidade máxima em 196 nm (em heptano) (PubChem, 2020). Além de ser uma substância alcalinizante, a presença do par de elétrons da amina confere uma melhor homogeneização dos grupamentos octadecil da fase estacionária melhorando a eficiência de separação cromatográfica e resolução dos picos cromatográficos e como possui absorvibilidade em 196 nm, não apresentou interferência no perfil de eluição dos analitos.

Após otimização da fase móvel inicial, foram realizadas análises com agentes desproteinizantes. Como a matriz biológica escolhida foi o plasma, os benzodiazepínicos encontram-se ligados às proteínas plasmáticas devido a sua característica de alta taxa de ligação (acima de 70%), esta propriedade farmacológica é necessária para que os fármacos circulem pelo organismo e atinjam o sítio de ligação, porém para uma análise toxicológica um procedimento de pré-tratamento de amostra é essencial para que sejam removidos interferentes endógenos da matriz, como proteínas, antígenos, anticorpos, outros fármacos, hormônios, entre outros visando a proteção da coluna e equipamentos analíticos. A injeção direta de amostra biológica em sistema cromatográfico revelou que houve aumento da pressão interna e deterioração da coluna cromatográfica (BLANCHARD, 1981).

Os estudos de desproteinização neste projeto foram realizados com metanol, etanol, acetonitrila, acetona, ácido tricloroacético (10 e 20%) e ácido clorídrico com ácido



trifluoroacético em *pool* de amostras de soro; plasma com EDTA; plasma com citrato de sódio; plasma com heparina e plasma com citrato de sódio, fosfato, dextrose, adenina (CPDA-1).

A análise dos cromatogramas de *pool* de amostras sem contaminação de fármaco revelou que a escolha da matriz biológica foi realizada conforme a presença do restante de interferentes endógenos representados pela primeira fração do cromatograma e dos picos que ocorreram ao longo da corrida, sendo assim, a amostra de plasma citratado desproteinizada com ácido clorídrico e ácido trifluoroacético foi escolhida com a menor presença de interferentes endógenos. Entretanto, os testes realizados com fortificação de padrões na amostra de plasma seguida de desproteinização demonstrou significativa perda dos analitos no sobrenadante, inviabilizando a quantificação dos benzodiazepínicos.

Conforme um estudo de De Bruyne, Sinnema, Verweiss (1982), foi relatada a hidrólise de bromazepam na presença de ácido clorídrico. Este artigo investigou este efeito somente com o bromazepam, possivelmente este mesmo efeito tenha ocorrido com os outros analitos testados. Estudos posteriores utilizando estes agentes desproteinizantes não foram mais realizados e então percebeu-se que uma técnica extrativa teria de ser desenvolvida.

A literatura mostra um estudo multicêntrico que foi realizado para definição de monitoramento terapêutico de fármacos usados em neuropsiquiatria com o objetivo de melhorar a interpretação das concentrações plasmáticas e assim otimizar a farmacoterapia de forma individualizada. Informações como isoenzimas hepáticas e transportadores que agem inibindo ou induzindo a metabolização dos fármacos, assim como a faixa terapêutica de referência para cada psicofármaco estão descritas (HIEMKE *et al.*, 2017).

A tabela 4 deste estudo mostra que os benzodiazepínicos alprazolam, bromazepam, clonazepam, diazepam e nordiazepam apresentam, respectivamente, valores de concentração terapêutica de 5-50 ng/mL, 50-200 ng/mL, 4-80 ng/mL, 100-2500 ng/mL e 120-800 ng/mL. O estudo também mostra valores laboratoriais de alerta, esta concentração situa-se acima da janela terapêutica muito próxima da concentração efetiva máxima que representa a resposta adversa.

Este consenso foi utilizado como base para desenvolvimento de um método extrativo capaz de se quantificar os analitos escolhidos nesta faixa de concentração terapêutica dando subsídio para a interpretação de casos de intoxicação. A partir deste valor é possível determinar a situação em que se encontra o paciente no momento da análise e correlacionar os efeitos tóxicos com o valor obtido.

A literatura relata a aplicação de extração líquido-líquido (LLE), extração em fase sólida (SPE) e a extração por Head-Space (HS) para a determinação de fármacos e são consideradas técnicas de extração convencionais, neste estudo avaliamos a DLLME para determinação de

benzodiazepínicos que apresenta melhorias em relação às técnicas convencionais, como utilização de solventes orgânicos reduzida, alta sensibilidade e taxa de recuperação, sendo muito eficiente na quantificação de substâncias em baixos níveis.

Os primeiros estudos de DLLME convencional com benzodiazepínicos foram elaborados por Melwanki e colaboradores (2009), Vardini e colaboradores (2011) e Khoudadoust e Ghaedi (2013). A amostra utilizada foi urina, a qual apresenta um volume disponível para análise maior, em relação ao sangue e outras matrizes, e sua composição majoritária é de água.

O primeiro ponto importante a ser levado em conta é a seleção do solvente extrator. Este foi de alta importância no processo de DLLME, pois deve ser imiscível na matriz e ter alta capacidade de extração. Os solventes convencionalmente utilizados ainda apresentam a vantagem de serem voláteis, o que ajuda a eliminar a interferência destes na cromatografia líquida, pois o resíduo pode ser reconstituído na fase móvel.

Os analitos alvo destes estudos foram 7-aminoflunitrazepam, clonazepam, alprazolam, oxazepam e clordiazepóxido, os quais apresentam coeficientes de partição de, respectivamente, 1,3, 2,41, 3,02, 2,24 e 2,44. Enquanto que os solventes extratores diclorometano e clorofórmio possuem coeficientes de partição de, respectivamente, 1,25 e 1,97. A similaridade dos coeficientes de partição dos analitos e dos solventes extratores representou um ponto importante para a eficiência de extração, entretanto esta propriedade não definiu isoladamente o processo extrativo total, pois o solvente dispersor também influencia o processo extrativo. Sendo que a DLLME é baseada na injeção simultânea destes dois solventes.

Os solventes dispersores apresentam as características de serem solúveis tanto na matriz como no solvente extrator, pois eles devem dispersar o solvente extrator na matriz formando a “nuvem”. Nestes estudos, diversos solventes foram testados a fim de definir qual deles apresentaria melhor dispersão do solvente extrator na matriz gerando um sedimento de volume suficiente para análise. Isopropanol, metanol e etanol apresentaram melhores taxas de enriquecimento nestes estudos.

Os volumes dos solventes extratores e dispersores também foram testados, pois estes parâmetros definem a possibilidade de saturação do sistema e quantidade de sedimento após separação das fases.

No estudo de Melwanki e colaboradores (2009), percebeu-se que em volumes abaixo de 120  $\mu\text{L}$  de diclorometano não houve separação de fases e acima de 250  $\mu\text{L}$  a proporção de solventes diminuiu a probabilidade do número de gotículas formadas e para o isopropanol, volumes abaixo de 500  $\mu\text{L}$  não foram geradas gotículas suficientes para extração e acima de

500 µL, a solubilidade de 7-aminoflunitrazepam foi maior na urina diminuindo a partição deste no diclorometano. Comportamentos similares foram observados nos estudos de Vardini e colaboradores (2011) e Khoudadoust e Ghaedi (2013).

Em relação à instrumentação utilizada, LC-ES-MS/MS e HPLC-UV, há uma diferença significativa na detectabilidade dos analitos, pois com espectrômetro de massas foi possível quantificar os analitos em concentrações muito baixas de acordo com a fragmentação das moléculas já sendo uma técnica confirmatória, enquanto que em HPLC-UV há necessidade de análise confirmatória quando são aplicados casos reais e o comprimento de onda fixo modifica o comportamento da molécula em relação à resposta do detector, pois a absorvidade é diferente para cada analito no mesmo comprimento de onda.

Khoudadoust e Ghaedi (2013), diferentemente dos outros dois estudos, aplicaram um desenho estatístico experimental para redução do número de experimentos de otimização necessários para desenvolvimento da DLLME. Esta aproximação foi efetiva para determinação de um analito, clordiazepóxido, porém para estudos com múltiplos analitos esta aplicação pode não ser muito efetiva, pois existem diferenças de propriedades físicas e químicas que podem limitar o método.

Posteriormente, os estudos de Fernández e colaboradores (2013), Fisichella e colaboradores (2015), Farsimadan e colaboradores (2016) e Meng e colaboradores (2017) desenvolveram DLLME com inclusão de banho ultrassônico.

O primeiro deles avaliou sete benzodiazepínicos comumente usados (alprazolam, bromazepam, clonazepam, diazepam, lorazepam, lormetazepam e tetrazepam) por UHPLC-PDA, o procedimento extrativo teve todos os parâmetros de DLLME avaliados com solventes convencionais, efeito *salting-out* e pH. A inclusão do banho ultrassônico foi o diferencial em relação aos estudos anteriores. O uso de ultrassom auxiliou na aceleração da formação da nuvem, aumentando a eficiência e reduzindo o tempo total de extração. Para 6 dos 7 analitos, o uso de ultrassom foi mais efetivo na extração, em comparação à agitação manual, como representado no valor de área absoluta descrito no estudo.

Fisichella e colaboradores (2015) desenvolveram uma metodologia multi-analitos por LC-MS/MS para drogas de abuso, benzodiazepínicos e outros fármacos psicoativos. Esta metodologia foi delineada com o propósito de análise de casos forenses, a aplicação do banho ultrassônico neste caso foi devido à grande variedade de fármacos e drogas analisadas com o propósito do alcance de baixas concentrações. Notou-se que o tempo de banho ultrassônico não excedeu 1 minuto nestes dois estudos.

Farsimadan e colaboradores (2016) otimizaram uma DLLME com o uso de banho ultrassônico e solventes de baixa densidade. Este estudo foi aplicado para determinação de citalopram, diazepam e sertralina em amostras de soro e urina por HPLC. A utilização de um solvente de baixa densidade, 1-undecanol ( $\log P$  4,72), foi efetiva na determinação destes 3 analitos, pois pode-se congelar a fração orgânica, assim esta é facilmente coletada aumentando a reprodutibilidade do método. O tempo de banho ultrassônico neste estudo foi de 10 minutos devido ao volume de amostra ser de 10 mL e também pela viscosidade do solvente extrator ser maior em relação a dos solventes convencionais.

DLLME também foi relatada na análise de novos benzodiazepínicos usados como novas drogas psicoativas, Meng e colaboradores (2017) otimizaram um procedimento para determinação de 4 novos benzodiazepínicos em urina. A metodologia foi desenvolvida com o uso de acetato de etila sem o uso de solvente dispersor. Neste caso, a aplicação do banho ultrassônico substituiu o uso de solvente dispersor. A oscilação ultrassônica pode ter criado bolhas de cavitação resultando em homogeneização do solvente extrator explicando a melhoria da taxa de transferência de massa entre as duas fases imiscíveis. Além disso, neste estudo também foi desenvolvida um desenho experimental para otimização da DLLME baseado na metodologia de superfície de resposta.

A literatura também relata o uso de técnicas de limpeza de amostra previamente à DLLME. Ghobadi, Yamini e Ebrahimpour (2014) combinaram SPE com DLLME para análise em traços de diazepam, midazolam e alprazolam em amostras de água ultrapura, água potável, sucos de frutas e urina por GC-FID. SPE foi previamente aplicada nas amostras para limpeza de interferentes em cartuchos C18 e então a DLLME foi realizada com clorofórmio. A aplicação da SPE foi ponto chave para alta eficiência de isolamento e purificação dos analitos, embora, no geral, seja um procedimento de maior custo pelo alto fluxo de solvente usado durante o condicionamento e limpeza de amostra. Mashayekhi e Khalilian desenvolveram técnica similar à descrita acima para a análise de alprazolam, oxazepam e diazepam em amostras de urina e plasma. A diferença entre estes dois estudos foi a instrumentação utilizada, porém os limites de detecção alcançados foram similares, mostrando que esta metodologia foi eficaz na detecção em baixas concentrações.

De Boeck e colaboradores (2017) realizaram um estudo com um novo tipo de solvente extrator, o líquido iônico. Este estudo foi o primeiro com DLLME aplicado à sangue total para determinação de múltiplos benzodiazepínicos para aplicação em casos forenses. A eficiência do líquido iônico neste procedimento foi devido às propriedades de estabilidade térmica, baixa

pressão de vapor e seletividade variável devido à flexibilidade estrutural. Estes autores realizaram uma aplicação desta metodologia validada em 11 casos *post-mortem*.

Para o desenvolvimento do método proposto nesta dissertação, os estudos citados acima foram usados como base e tentativas de reprodução foram executadas. A avaliação do solvente extrator foi o primeiro ponto experimento realizado. Os solventes: clorofórmio, hexano, acetato de etila, diclorometano e tolueno foram avaliados. Os resultados mostraram que, inicialmente, tolueno seria a melhor escolha para extração de 4 dos 5 benzodiazepínicos, porém devido ao carregamento de interferentes endógenos da matriz, fato observado pela rápida saturação da pré-coluna, este solvente foi substituído pelo clorofórmio.

O coeficiente de partição dos benzodiazepínicos alvo é, em média, 3,0 e os solventes extratores tolueno e clorofórmio são 2,73 e 1,97. Este dado corrobora com a melhor eficiência de extração apresentada pelo tolueno, porém devido a rápida saturação da pré-coluna, não seria possível validar o método com este solvente, pois iria aumentar muito o custo de consumíveis de cromatografia, além do possível dano a coluna e cromatógrafo líquido. O clorofórmio obteve eficiência similar e não apresentou este efeito negativo na pré-coluna.

Os solventes de baixa densidade 1-octanol, 1-nonanol, 1-decanol, 1-undecanol, 1-dodecanol e diexil éter também foram avaliados para extração, conforme outros estudos de DLLME envolvendo fármacos (RANJBARI, BIPARVA, HADJMOHAMMADI, 2012; GHAMBARI & HADJMOHAMMADI, 2012; SAFDARIAN, HASHEMI, NADERLOU, 2012; TAHERI *et al.*, 2015). Entretanto, houve incompatibilidade da fase móvel e da porção extraída, observado pelo aumento de pressão do sistema e perda de coluna cromatográfica. A aplicação destes solventes de baixa densidade seria mais eficiente com cromatografia gasosa.

O segundo ponto avaliado foi o tipo de solvente dispersor, os solventes acetona, THF, acetonitrila, etanol, metanol e isopropanol foram avaliados. Os resultados mostraram que acetonitrila foi o solvente que melhor dispersou o solvente extrator na matriz, este fato foi evidenciado pelo valor de área absoluta inclusive na comparação com a ausência de solvente dispersor. Ainda foi possível observar que o THF apresentou a pior taxa de extração devido a sua característica ácida e mostrou-se incompatível com a fase móvel em pH 9,0.

Os diferentes valores de pH revelaram que houve uma diferença de eficiência extrativa entre os valores de pH 10 e 11. O pH 10 foi melhor para os analitos bromazepam, clonazepam e diazepam, e o pH 11 foi melhor para alprazolam e clonazepam. O valor de pH 10, neste contexto, foi definido, pois clonazepam e bromazepam possuem menores detectabilidades e menor concentração plasmática na faixa terapêutica.

A escolha de um determinado valor de pH influencia em quais outros compostos podem ser extraídos da matriz afetando a seletividade do método, pois se tratando de uma amostra de um caso real é possível que outras substâncias estejam presentes na matriz. Conforme discutido anteriormente, o pH mantendo a molécula não-ionizada facilita a captação pelo solvente extrator, melhorando as taxas de recuperação do analito.

Outro parâmetro avaliado foi o efeito *salting-out*, as condições testadas de 0, 2,5 e 3% m/v mostraram que a melhor condição de extração foi em 2,5%. A força iônica do meio diminuiu a solubilidade dos analitos pela fase aquosa, melhorando a captação pelo solvente extrator. Este parâmetro apresenta variabilidade, dependendo do analito, a inserção de sal piora a taxa de extração, um exemplo disto foi observado em um estudo de extração de alumínio em água por Rezaee e colaboradores (2010).

A aplicação do banho ultrassônico também foi avaliada neste estudo e comparada com a homogeneização por vórtex. O experimento foi realizado com homogeneização da amostra por vórtex ou banho ultrassônico após injeção simultânea dos solventes extrator e dispersor. O resultado mostrou que nos tempos de 30 segundos para os dois procedimentos, a homogeneização por vórtex apresentou maiores área absolutas para os 5 benzodiazepínicos, entretanto no tempo de 1 minutos de banho de ultrassom a eficiência foi maior. A vibração fornecida pelo banho ultrassônico revelou que ocorreu melhor dissolução da emulsão presente entre as duas fases melhorando a transferência de analito para a fase orgânica. Porém com o passar do tempo, ocorre perdas de solvente extrator provavelmente pela volatilização do clorofórmio.

O uso de banho ultrassônico em DLLME é descrito como uma ferramenta para aumentar a dispersão do solvente extrator melhorando a eficiência e diminuindo o tempo de extração pelo processo de cavitação da amostra. Este estudo foi realizado em um banho ultrassônico com aquecimento de 35°C, foi observado perda da fração orgânica mesmo com a utilização de tubos fechados.

Os volumes dos solventes extrator e dispersor também foram otimizados neste estudo, foram observadas variações de eficiência conforme o analito. O principal fator de decisão de quais volumes optar foi a faixa terapêutica plasmática, pois, para a aplicação na análise de um caso real, é esta característica que ajuda na interpretação clínica e define se o paciente está fora de risco ou não. Os volumes de solvente extrator acima de 400 µL apresentaram piora da taxa de extração possivelmente pela saturação do sistema.

Os últimos parâmetros avaliados foram as velocidades e tempos de centrifugação. Estes parâmetros influenciam na nitidez da separação de fases em um tempo adequado. Os

experimentos revelaram que 10 minutos foi o tempo necessário para separação total das fases em uma rotação de 10000 rpm, em velocidades abaixo deste valor foi observado visualmente que não havia separação total das fases.

Após otimização de todas estas etapas, a validação analítica conforme os guias da UNODC e SWGTOX foi realizada. Os valores de LQ para clonazepam e alprazolam foram definidos em 50 ng/mL e para nordiazepam e diazepam em 60 ng/mL, conforme experimento realizado em 4 concentrações diferentes em triplicata e depois confirmação em sextuplicata. O bromazepam teve de ser retirado do processo de validação, pois o pico cromatográfico apresentou interferência da matriz no início da corrida cromatográfica.

Os limites de detecção foram definidos em 40 ng/mL para alprazolam, 50 ng/mL para clonazepam e 60 ng/mL para nordiazepam e diazepam conforme a relação sinal ruído (1:3). A faixa de linearidade para clonazepam ( $y=16,077x+1188,5$ ;  $r^2=0,9983$ ), alprazolam ( $y=913,03x-35597$ ,  $r^2=0,9992$ ), nordiazepam ( $y=144,61x+15409$ ,  $r^2=0,9928$ ) e diazepam ( $y=269,92x+51751$ ,  $r^2=0,9936$ ), mostrando que estes 4 analitos são lineares na faixa do LQ de cada um até 1500 ng/mL. O parâmetro de especificidade/seletividade mostrou que o método não apresentou interferências fármacos comumente prescritos.

Em relação à precisão intra-dia e inter-dia, este ponto apresentou alguns problemas, o clonazepam não apresentou reprodutibilidade nos 3 dias consecutivos e então foi retirado do desenvolvimento do método. A inexatidão mostrou que apenas a concentração mais baixa de alprazolam ficou fora da faixa de 80 a 120%, conforme especificado pelo guia da UNODC.

As taxas de recuperação para todos os analitos apresentaram variações, porém o Guia de Validação de Métodos Analíticos da UNODC (UNODC, 2009) não considera este fator como indicativo para reprovação do teste.

Não ocorreu efeito memória conforme especificado nas 3 injeções de amostra branco após uma injeção dos analitos na concentração de 500 ng/mL. E por fim, a integridade da diluição mostrou que uma amostra 25x diluída (160 ng/mL) a partir de um pool de benzodiazepínicos na concentração de 4 µg/mL, contendo padrão interno, apresentou precisão e acurácia adequados conforme uma curva previamente estabelecida.

Os estudos relatados na literatura com HPLC-UV em amostras de plasma mostraram um LD de 2,7 ng/mL, faixa de linearidade 9-100 ng/mL e recuperação de 94,3% para clordiazepóxido (Khoudadoust *et al.*, 2013). Mashayekhi e Khalilian, (2016) relataram uma faixa de linearidade 2,5-500 ng/mL (alprazolam e oxazepam), 1-500 ng/mL (diazepam), LD 0,7 ng/mL (alprazolam e oxazepam) e 0,4 ng/mL (diazepam), LQ 2,5 ng/mL (alprazolam e oxazepam) e 1,5 ng/mL (diazepam), recuperação 86% (alprazolam), 84% (oxazepam) e 90%

(diazepam). Em comparação ao método proposto nesta dissertação, o HPLC não seria uma instrumentação limitante na quantificação em baixos níveis, o que mostra que a otimização da DLLME foi bem sucedida alcançando baixas concentrações, porém os problemas enfrentados na validação foram o ponto limitante para assegurar a confiabilidade do método proposto e assim aplicar nos casos reais de intoxicação.

## **6. CONCLUSÃO**

Diante do que foi descrito dos estudos de DLLME com benzodiazepínicos da literatura e do desenvolvimento de uma metodologia analítica para determinação de benzodiazepínicos em plasma proposto neste trabalho, conclui-se que, devido às dificuldades apresentadas na validação analítica, conforme os guias da UNODC e SWGTOX, não foi possível desenvolver um método reprodutível capaz de quantificar os analitos bromazepam, alprazolam, clonazepam, nordiazepam e diazepam em baixas concentrações. Sugere-se que este procedimento seja aplicado em casos de triagem e que investigações mais aprofundadas sejam realizadas para que o método possa ser validado adequadamente com precisão e acurácia adequados.



## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALCANTARA, G. K. S.; CALIXTO, L. A.; DE MORAES, L. A. B.; *et al.* Determination of Levetiracetam in Human Plasma by Dispersive Liquid-Liquid Microextraction Followed by Gas Chromatography-Mass Spectrometry. **Journal of Analytical Methods in Chemistry**, v. 2016, p. 1–12, 2016.

ALMEIDA, A.M.; CASTEL-BRANCO, M.M.; FALCÃO, A.C. Linear regression for calibration lines revisited: weighting schemes for bioanalytical methods. *Journal of Chromatography B*, v. 774(2), p. 215-222, 2002.

ALVES, A.C.H. **Determinação de pesticidas em águas por microextração em fase líquida associada à cromatografia gasosa e espectrometria de massa**. 175p. 2010. Dissertação (Faculdade de Ciências e Tecnologia) – Universidade Nova de Lisboa, Lisboa, 2010.

AZEVEDO, A.J.P.; ARAÚJO, A.A.; FERREIRA, M.A.F. Consumo de ansiolíticos benzodiazepínicos: uma correlação entre dados do SNGPC e indicadores sócio demográficos nas capitais brasileiras. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 21, p. 83-90, 2016.

BAIROS, A.V. **Desenvolvimento de métodos analíticos para a identificação de drogas facilitadoras de crime em amostras de urina**. 146 p. 2014. Tese (Doutorado em Toxicologia e Análises Toxicológicas) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

BAIROS, A.V.; ALMEIDA, R.M.; PANTALEÃO, L.N.; BARCELLOS, T.; SILVA, S.M.; YONAMINE, M. Determination of low levels of benzodiazepines and their metabolites in urine by hollow-fiber liquid phase microextraction (LPME) and gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS). **Journal of Chromatography B**, v. 975, p. 24-33, 2015.

BLANCHARD, J.. Evaluation of the relative efficacy of various techniques for deproteinizing plasma samples prior to high-performance liquid chromatographic analysis. **Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications**, v. 226, n. 2, p. 455–460, 1981.

BORDIN, D.C.M.; MONEDEIRO, F.F.S.S.; CAMPOS, E.G.; ALVES, M.N.R.; BUENO, L.H.P.; MARTINIS, B.S. Técnicas de preparo de amostras biológicas com interesse forense. **Scientia Chromatographica**, v. 7, p. 125-143; 2015.

BRUNTON, L. L.; CHABNER, B. A.; KNOLLMANN, B. C. **As Bases Farmacológicas de Goodman & Gilman**. Porto Alegre: AMGH, 12° Ed., 2012.

BRUNTON, L.L., HILAL-DANDAN, R. & KNOLLMANN, B.C.; **Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics**, 13th edition, New York, USA: McGraw-Hill, 2018.

BULCÃO, R.P.; GARCIA, S.C.; LIMBERGER, R.P.; BAIERLE, M.; ARBO, M.D.; CHASIN, A.A.M.; THIESEN, F.V.; TAVARES, R. Designer drugs: aspectos analíticos e biológicos. **Química Nova**, v. 35, p. 149-158, 2012.  
Chen, Chen, Chang, 2018

CIT. Centro de Informação Toxicológica. Relatório Anual 2017. Dados de atendimento. Disponível em: <https://drive.google.com/file/d/1i7sEb5KaJQWGjNUpf5hcKTicgP7PIrUF/view>

CIT. Centro de Informação Toxicológica. Relatório Anual 2018. Dados de atendimento. Disponível em: <https://drive.google.com/file/d/1fpBaEP-fR9MPzRrfnTvZNVbjjFcUeOk/view>

ÇABUK, H.; KÖKTÜRK, M. Low density solvent-based dispersive liquid-liquid microextraction for the determination of synthetic antioxidants in beverages by high-performance liquid chromatography. **The Scientific World Journal**, v. 2013, 2013.

DE BOECK, M.; MISSOTTEN, S.; DEHAEN, W.; *et al.* Development and validation of a fast ionic liquid-based dispersive liquid-liquid microextraction procedure combined with LC-MS/MS analysis for the quantification of benzodiazepines and benzodiazepine-like hypnotics in whole blood. **Forensic Science International**, v. 274, p. 44–54, 2017.

DE BOECK, M.; DEHAEN, W.; TYTGAT, J.; *et al.* Ionic Liquid-Based Liquid-Liquid Microextraction for Benzodiazepine Analysis in Postmortem Blood Samples. **Journal of Forensic Sciences**, v. 63, n. 6, p. 1875–1879, 2018.

DE BRUYNE, M. M.A.; SINNEMA, A.; VERWEIJ, A. M.A. Hydrochloric acid hydrolysis of bromazepam. Identification and relevance of some additional products. **Pharmaceutisch Weekblad Scientific Edition**, v. 4, n. 1, p. 12–15, 1982.

EMERY, M.; KOWTKO, J. High-Performance Liquid Chromatography of Benzodiazepines I: Stability-Indicating Assay of Diazepam Tablets. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 68, n. 9, p. 1185–1187, 1979.

EPA United States Environmental Protection Agency. Dihexyl ether, CID=112-58-3. Disponível em: <https://comptox.epa.gov/dashboard/dsstoxdb/results?search=DTXSID8059421#properties>. Acessado em 20 de fevereiro de 2020.

FARSIMADAN, S.; GOUDARZI, N.; CHAMJANGALI, M. A.; *et al.* Optimization of ultrasound-assisted dispersive liquid-liquid microextraction based on solidification of floating organic droplets by experimental design methodologies for determination of three anti-anxiety drugs in human serum and urine samples by high p. **Microchemical Journal**, v. 128, p. 47–54, 2016.

FERNANDES, S.C.S. Determinação de sertralina, vanlafaxina e seus metabólitos activos, em sangue e urina, por UPLC-MS/MS. 194p. 2013. Dissertação (Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra Departamento de Química) - Universidade de Coimbra. Coimbra. 2013.

FERNÁNDEZ, Purificación; GONZÁLEZ, Cristina; TERESA PENA, M.; *et al.* A rapid ultrasound-assisted dispersive liquid-liquid microextraction followed by ultra-performance liquid chromatography for the simultaneous determination of seven benzodiazepines in human plasma samples. **Analytica Chimica Acta**, v. 767, n. 1, p. 88–96, 2013.

FERNÁNDEZ, P.; TABOADA, V.; REGENJO, M.; *et al.* Optimization of ultrasound assisted dispersive liquid-liquid microextraction of six antidepressants in human plasma using experimental design. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 124, p. 189–197, 2016.

FIORELLI, K.; ASSINI, F. L. A prescrição de benzodiazepínicos no Brasil: uma análise da literatura. **ABCS Health Sciences**, v. 42, n. 1, p. 184–189, 2017.

FISICHELLA, M.; ODOARDI, S.; STRANO-ROSSI, S. High-throughput dispersive liquid/liquid microextraction (DLLME) method for the rapid determination of drugs of abuse, benzodiazepines and other psychotropic medications in blood samples by liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) and app. **Microchemical Journal**, v. 123, p. 33–41, 2015.

FLANAGAN, R.J.; TAYLOR, A.; WATSON, I.D.; WHELPTON, R. High-Performance Liquid Chromatography. In: *Fundamentals of Analytical Toxicology*. In: **Fundamentals of Analytical Toxicology**. Chichester: John Wiley & Sons, 2007b. p.177-229.

GHOBADI, M.; YAMINI, Y.; EBRAHIMPOUR, B. SPE coupled with dispersive liquid-liquid microextraction followed by GC with flame ionization detection for the determination of ultra-trace amounts of benzodiazepines. **Journal of Separation Science**, v. 37, n. 3, p. 287–294, 2014.

GILL, R.; LAW, B.; GIBBS, J. P. High-performance liquid chromatography systems for the separation of benzodiazepines and their metabolites. **Journal of Chromatography A**, v. 356, n. C, p. 37–46, 1986.

GOUDARZI, N.; FARSIMADAN, S.r; CHAMJANGALI, M. A.; *et al.* Optimization of modified dispersive liquid-liquid microextraction coupled with high-performance liquid chromatography for the simultaneous preconcentration and determination of nitrazepam and midazolam drugs: An experimental design. **Journal of Separation Science**, v. 38, n. 10, p. 1673–1679, 2015.

GOUDARZI, N.; AMIRNAVAEE, M.; ARAB CHAMJANGALI, M.; *et al.* Application of Ultrasound-Assisted Surfactant-Enhanced Emulsification Microextraction Based on Solidification of Floating Organic Droplets and High Performance Liquid Chromatography for Preconcentration and Determination of Alprazolam and Chlordiazepoxide. **Journal of Chromatographic Science**, v. 55, n. 6, p. 669–675, 2017.

GHAMBARI, H.; HADJMOHAMMADI, M.. Low-density solvent-based dispersive liquid-liquid microextraction followed by high performance liquid chromatography for determination of warfarin in human plasma. **Journal of chromatography. B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences**, v. 899, p. 66–71, 2012.

GHAMBARIAN, M.; TAJABADI, F.; YAMINI, Y.; *et al.* Dispersive liquid-liquid microextraction with back extraction using an immiscible organic solvent for determination of benzodiazepines in water, urine, and plasma samples. **RSC Advances**, v. 6, n. 115, p. 114198–114207, 2016.

GRELLER, H., & GUPTA, A. (2018). Benzodiazepine poisoning and withdrawal. In T (Ed.), *UpToDate*. Acessado em 31 de outubro de 2018. Disponível em: <https://www.uptodate.com/contents/benzodiazepine-poisoning-and-withdrawal>

HERRERA-HERRERA, A. V.; ASENSIO-RAMOS, M.; HERNÁNDEZ-BORGES, J.; *et al.* Dispersive liquid-liquid microextraction for determination of organic analytes. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 29, n. 7, p. 728–751, 2010.

HIEMKE, C.; BERGEMANN, N.; CLEMENT, H.; *et al.* Consensus Guidelines for Therapeutic Drug Monitoring in Neuropsychopharmacology: Update 2017. **Pharmacopsychiatry**, v. 51, n. 01/02, p. 9–62, 2018.

JAIN, R; SINGH, R. Applications of dispersive liquid-liquid micro-extraction in forensic toxicology. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, v. 75, p. 227–237, 2016.

JOUYBAN, A.; SOROURADDIN, M. H.; FARAJZADEH, M. A.; *et al.* Determination of five antiarrhythmic drugs in human plasma by dispersive liquid-liquid microextraction and high-performance liquid chromatography. **Talanta**, v. 134, p. 681–689, 2015.

KURODA, N.; ZHOU, B.; NAKASHIMA, K.; *et al.* Preliminary studies on identification and quantitation of several benzodiazepines in human serum by high-performance liquid chromatography. **Rinsho Kagaku (Nippon Rinsho Kagakkai)**, v. 24, n. 4, p. 228–232, 1995.

KATZUNG, B. G.; MASTERS, S. B.; TREVOR, A. J. **Farmacologia Básica e Aplicada**. Porto Alegre: AMGH 12° Ed., 2014.

LARSEN, H. S; CHIN, P. KI; BEGG, E. J; *et al.* Quantification of total and unbound concentrations of lorazepam, oxazepam and temazepam in human plasma by ultrafiltration and LC-MS/MS. **Bioanalysis**, v. 3, n. 8, p. 843–52, 2011.

LOBO, A.M de G. Emprego da microextração líquido-líquido dispersiva na determinação da tafenoquina em Amostras de plasma humano. 64p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal do Amazonas. Amazonas. 2015

KHODADOUST, S.; GHAEDI, M. Optimization of dispersive liquid-liquid microextraction with central composite design for preconcentration of chlordiazepoxide drug and its determination by HPLC-UV. **Journal of Separation Science**, v. 36, n. 11, p. 1734–1742, 2013.

LASMAR, M.C. Determinação de *ecstasy* e derivados anfetamínicos em amostras de urina utilizando-se cromatografia líquida de alta eficiência com detecção de ultravioleta e em comprimidos utilizando-se cromatografia em fase gasosa com detector de ionização de chama. 152p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal do Mato Grosso. Belo Horizonte. 2007.

LEONG, M.I.; FUH, M.R.; HUANG, S.D. Beyond dispersive liquid-liquid microextraction. **Journal of Chromatography A**, v. 1335, p. 2–14, 2014.

LIMA, A.P.S de. Desenvolvimento de métodos eletroforéticos e cromatográficos para a determinação de benzodiazepínicos como adulterantes em formulações fitoterápicas para

emagrecimento. 119p. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Federal de Santa Maria. Santa Maria, 2009.

LIMA, L.C.; PAPAI, R.; GAUBEUR, I.. Butan-1-ol as an extractant solvent in dispersive liquid-liquid microextraction in the spectrophotometric determination of aluminium. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**, v. 50, n. May, p. 175–181, 2018.

MALAEI, R.; RAMEZANI, A.M.; ABSALAN, G.. Analysis of malondialdehyde in human plasma samples through derivatization with 2,4-dinitrophenylhydrazine by ultrasound-assisted dispersive liquid–liquid microextraction-GC-FID approach. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 1089, n. May, p. 60–69, 2018.

MANSOUR, F.R.; DANIELSON, N.D. Solidification of floating organic droplet in dispersive liquid-liquid microextraction as a green analytical tool. **Talanta**, v. 170, p. 22–35, 2017.

MANSOUR, F.R.; KHAIRY, M.A. Pharmaceutical and biomedical applications of dispersive liquid–liquid microextraction. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 1061–1062, n. April, p. 382–391, 2017.

MARIN, S.J.; HUGHES, J.M.; LAWLOR, B.G.; *et al.* Rapid screening for 67 drugs and metabolites in serum or plasma by accurate-mass lc-tof-mS. **Journal of Analytical Toxicology**, v. 36, n. 7, p. 477–486, 2012.

MARTINS, M.L.; PRIMEL, E.G.; CALDAS, S.S; *et al.* Microextração Líquido-Líquido Dispersiva (DLLME): Fundamentos e aplicações. **Scientia Chromatographica**, v. 4, n. 1, p. 29–45, 2012.

MASHAYEKHI, H.A.; KHALILIAN, F.. Development of Solid-Phase Extraction Coupled with Dispersive Liquid-Liquid Microextraction Method for the Simultaneous Determination of Three Benzodiazepines in Human Urine and Plasma. **Journal of Chromatographic Science**, v. 54, n. 6, p. 1068–1073, 2016.

MELWANKI, M.B.; CHEN, W.S.; BAI, H.Y.; *et al.* Determination of 7-aminoflunitrazepam in urine by dispersive liquid-liquid microextraction with liquid chromatography-electrospray-tandem mass spectrometry. **Talanta**, v. 78, n. 2, p. 618–622, 2009.

MENG, L.; ZHU, B.; ZHENG, K.; *et al.* Ultrasound-assisted low-density solvent dispersive liquid–liquid microextraction for the determination of 4 designer benzodiazepines in urine samples by gas chromatography–triple quadrupole mass spectrometry. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 1053, p. 9–15, 2017.

MOLAEI, K.; ASGHARINEZHAD, A.A.; EBRAHIMZADEH, H.; *et al.* Surfactant-assisted dispersive liquid-liquid microextraction of nitrazepam and lorazepam from plasma and urine samples followed by high-performance liquid chromatography with UV analysis. **Journal of Separation Science**, v. 38, n. 22, p. 3905–3913, 2015.

MORADI, M.; YAMINI, Y.; BAHERI, T. Analysis of abuse drugs in urine using surfactant-assisted dispersive liquid-liquid microextraction. **Journal of Separation Science**, v. 34, n. 14, p. 1722–1729, 2011.

MUDIAM, M.K.R.; CHAUHAN, A.; JAIN, R.; *et al.* Development, validation and comparison of two microextraction techniques for the rapid and sensitive determination of pregabalin in urine and pharmaceutical formulations after ethyl chloroformate derivatization followed by gas chromatography-mass spectrom. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 70, p. 310–319, 2012.

National Center for Biotechnology Information. PubChem Database. Midazolam, CID=4192. Disponível em: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Midazolam>. Acessado em 06 de fevereiro de 2020.

National Center for Biotechnology Information. PubChem Database. Acetone, CID=180, Disponível em: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Acetone>. Acessado em 20 de fevereiro de 2020.

National Center for Biotechnology Information. PubChem Database. Methanol, CID=887, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Methanol> (accessed on Feb. 26, 2020)

National Center for Biotechnology Information. PubChem Database. Ethanol, CID=702, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Ethanol> (accessed on Feb. 26, 2020)

National Center for Biotechnology Information. PubChem Database. Acetonitrile, CID=6342, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Acetonitrile> (accessed on Feb. 26, 2020)

National Center for Biotechnology Information. PubChem Database. Tetrahydrofuran, CID=8028, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Tetrahydrofuran> (accessed on Feb. 26, 2020)

National Center for Biotechnology Information. PubChem Database. Isopropyl alcohol, CID=3776, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Isopropyl-alcohol> (accessed on Feb. 26, 2020)

National Center for Biotechnology Information. PubChem Database. Chloroform, CID=6212, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Chloroform> (accessed on Feb. 26, 2020)

National Center for Biotechnology Information. PubChem Database. Hexane, CID=8058, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Hexane> (accessed on Feb. 26, 2020)

National Center for Biotechnology Information. PubChem Database. Carbon tetrachloride, CID=5943, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Carbon-tetrachloride> (accessed on Feb. 26, 2020)

National Center for Biotechnology Information. PubChem Database. Dichloromethane, CID=6344, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Dichloromethane> (accessed on Feb. 26, 2020)

National Center for Biotechnology Information. PubChem Database. Benzene, CID=241, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Benzene> (accessed on Feb. 26, 2020)

National Center for Biotechnology Information. PubChem Database. Toluene, CID=1140, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Toluene> (accessed on Feb. 26, 2020)

National Center for Biotechnology Information. PubChem Database. Ethyl acetate, CID=8857, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Ethyl-acetate> (accessed on Feb. 26, 2020)

National Center for Biotechnology Information. PubChem Database. 1-Octanol, CID=957, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/1-Octanol> (accessed on Feb. 26, 2020)

National Center for Biotechnology Information. PubChem Database. Tetrachloroethylene, CID=31373, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Tetrachloroethylene> (accessed on Feb. 26, 2020)

National Center for Biotechnology Information. PubChem Database. 1-Decanol, CID=8174, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/1-Decanol> (accessed on Feb. 26, 2020)

National Center for Biotechnology Information. PubChem Database. 1-Nonanol, CID=8914, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/1-Nonanol> (accessed on Feb. 26, 2020)

National Center for Biotechnology Information. PubChem Database. 1-Undecanol, CID=8184, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/1-Undecanol> (accessed on Feb. 26, 2020)

National Center for Biotechnology Information. PubChem Database. 1-Dodecanol, CID=8193, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/1-Dodecanol> (accessed on Feb. 26, 2020)

National Center for Biotechnology Information. PubChem Database. Triethylamine, CID=8471, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Triethylamine> (accessed on Mar. 12, 2020)

National Center for Biotechnology Information. PubChem Database. 7-Aminoflunitrazepam, CID=92294, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/7-Aminoflunitrazepam> (accessed on Mar. 16, 2020)

National Center for Biotechnology Information. PubChem Database. Oxazepam, CID=4616, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Oxazepam> (accessed on Mar. 16, 2020)

NORONHA, L.M.S.; NEVES, A.A.; QUEIROZ, M.E.L.R.; *et al.* Evaluation of the Effects of Hofmeister Series on Salting Out in the Determination of Organophosphorous Pesticides and Pyrethroids by LDS/DLLME. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 26, n. 9, p. 1897–1901, 2015.

OLĘDZKA, I.; KULIŃSKA, Z.; PRAHL, A.; *et al.* Simultaneous separation of eight benzodiazepines in human urine using field-amplified sample stacking micellar electrokinetic chromatography. **Journal of Analytical Toxicology**, v. 39, n. 6, p. 436–443, 2015.

OLIVEIRA, J. de F.M. Internações Hospitalares e mortalidade por intoxicação medicamentosa em São Paulo. 137p. Tese (Doutorado em Ciências) – Universidade de São Paulo. São Paulo. 2017

OLIVEIRA, L.G. Desenvolvimento e Validação de Métodos Cromatográficos acoplados à Espectrometria de Massas para Determinação de Resíduos em Amostras de Peixes. 73p. Tese (Doutorado em Química) – Universidade Federal do Rio Grande. Rio Grande. 2019.

PALMARO, A.; DUPOUY, J.; LAPEYRE-MESTRE, M. Benzodiazepines and risk of death: Results from two large cohort studies in France and UK. **European Neuropsychopharmacology**, v. 25, n. 10, p. 1566–1577, 2015.

PERES, TB. Noções básicas de cromatografia. **Revista Biológica, São Paulo**, p. 227–229, 2002.

PERSONA, K.; MADEJ, K.; KNIHNNICKI, P.; PIEKOSZEWSKI, W. Analytical methodologies for the determination of benzodiazepines in biological samples. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 113, p. 239-264, 2015.

PIERGIOVANNI, M.; CAPIELLO, A.; FAMIGLINI, G.; *et al.* Determination of benzodiazepines in beverages using green extraction methods and capillary HPLC-UV detection. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 154, p. 492–500, 2018.

RAIMUNDO, Jr IM & PASQUINI, C. Espectrofotometria multicanal e arranjo de fotodiodos. *Química Nova*, v. 20, p. 83-88, 1997.

RAMOS, R.R. Desenvolvimento de uma metodologia de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) para análise sara de petróleo. 87p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Escola Politécnica da Universidade de São Paulo. São Paulo. 2014.

RANJBARI, E.; BIPARVA, P.; HADJMOHAMMADI, M.R. Utilization of inverted dispersive liquid–liquid microextraction followed by HPLC-UV as a sensitive and efficient method for the extraction and determination of quercetin in honey and biological samples. **Talanta**, v. 89, p. 117–123, 2012.

REZAAE, M.; ASSADI, Y.; MILANI HOSSEINI, M.R.; *et al.* Determination of organic compounds in water using dispersive liquid-liquid microextraction. **Journal of Chromatography A**, v. 1116, n. 1–2, p. 1–9, 2006.

RYKOWSKA, I.; ZIEMBLIŃSKA, J.; NOWAK, I. Modern approaches in dispersive liquid-liquid microextraction (DLLME) based on ionic liquids: A review. **Journal of Molecular Liquids**, v. 259, p. 319–339, 2018.

SAFDARIAN, M.; HASHEMI, P.; NADERLOU, M.. In-line cold column trapping of organic phase in dispersive liquid–liquid microextraction: Enrichment and determination of curcumin in human serum. **Journal of Chromatography A**, v. 1244, p. 14–19, 2012.

SAMANIDOU, V.F; UDDIN, M.N; PAPADOYANNIS, I.N. Benzodiazepines: sample preparation and HPLC methods for their determination in biological samples. **Bioanalysis**, v. 1, n. 4, p. 755–84, 2009.



SANAGI, M.M.; ABBAS, H.H.; IBRAHIM, W.A.W.; *et al.* Dispersive liquid–liquid microextraction method based on solidification of floating organic droplet for the determination of triazine herbicides in water and sugarcane samples. **Food Chemistry**, v. 133, n. 2, p. 557–562, 2012.

SANTOS, F.M. dos; GONÇALVES, J.C.S.; CAMINHA, R.; *et al.* Pharmacokinetic/pharmacodynamic modeling of psychomotor impairment induced by oral clonazepam in healthy volunteers. **Therapeutic Drug Monitoring**, v. 31, n. 5, p. 566–574, 2009.

SCHUTZ, H. **Benzodiazepines II. A Handbook. Basic Data, Analytical Methods, Pharmacokinetics, and Comprehensive Literature.** Springer-Verlag. Berlin Heidelberg, 1989.

SEEBUNRUENG, K.; SANTALADCHAIYAKIT, Y.; SRIJARANAI, S.. Vortex-assisted low density solvent liquid–liquid microextraction and salt-induced demulsification coupled to high performance liquid chromatography for the determination of five organophosphorus pesticide residues in fruits. **Talanta**, v. 132, p. 769–774, 2015.

SINITOX. Sistema Nacional de Informações Tóxico-Farmacológicas. Casos registrados de intoxicação humana, de intoxicação animal e de solicitação por agente tóxico, 2017. Disponível em: <https://sinitox.icict.fiocruz.br/sites/sinitox.icict.fiocruz.br/files//Brasil4.pdf>.

SINITOX. Sistema Nacional de Informações Tóxico-Farmacológicas. Casos Registrados de Intoxicação Humana por Agente Tóxico e Circunstância. Brasil, 2017. Disponível em: <https://sinitox.icict.fiocruz.br/sites/sinitox.icict.fiocruz.br/files//Brasil6.pdf>.

SINITOX. Sistema Nacional de Informações Tóxico-Farmacológicas. Óbitos Registrados de Intoxicação Humana por Agente Tóxico e Circunstância. Brasil, 2017. Disponível em: [https://sinitox.icict.fiocruz.br/sites/sinitox.icict.fiocruz.br/files//Brasil11\\_0.pdf](https://sinitox.icict.fiocruz.br/sites/sinitox.icict.fiocruz.br/files//Brasil11_0.pdf).

SJÖSTEDT, C.; OHLSSON, H.; LI, X.; *et al.* Socio-demographic factors and long-term use of benzodiazepines in patients with depression, anxiety or insomnia. **Psychiatry Research**, v. 249, n. May 2016, p. 221–225, 2017.

SKOOG, D.A.; WEST, D.M.; HOLLER, F.J. *et al.* **Fundamentals of Analytical Chemistry.** Andover. Cengage. 2014.

SOUSA, E.S. Desenvolvimento e validação de uma metodologia analítica para determinação de resíduos de agrotóxicos em hortaliças empregando cromatografia líquida com detector de arranjo de diodos. 101p. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Federal da Paraíba. João Pessoa. 2016

SCIENTIFIC WORKING GROUP FOR FORENSIC TOXICOLOGY (SWGTOX). Scientific working group for forensic toxicology (SWGTOX) standard practices for method validation in forensic toxicology. **Journal of Analytical Toxicology**, v. 37, n. 7, p. 452–474, 2013. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23934984%0Ahttp://www.swgtox.org/documents/Validation3.pdf>

TAHERI, S.; JALALI, F.; FATTAHI, N.; *et al.* Sensitive determination of methadone in human serum and urine by dispersive liquid-liquid microextraction based on the solidification of a floating organic droplet followed by HPLC-UV. **Journal of Separation Science**, v. 38, n. 20, p. 3545–3551, 2015.

TALEBIANPOOR, M. S.; KHODADOUST, S.; ROZBEHI, A.; *et al.* Application of optimized dispersive liquid-liquid microextraction for determination of melatonin by HPLC-UV in plasma samples. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 960, p. 1–7, 2014.

TOMASINI, J.L.; BUN, H.; COASSOLO, P.; *et al.* Determination of Clobazam, n-desmethyloclobazam and their hydroxy metabolites in plasma and urine by high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications**, v. 343, n. C, p. 369–377, 1985.

VARDINI, M.T.; MASHAYEKHI, H.A.; SABER-TEHRANI, M. Dispersive liquid-liquid microextraction followed by high-performance liquid chromatography as an efficient and sensitive technique for the simultaneous determination of alprazolam, oxazepam, and diazepam in human urine samples. **Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies**, v. 35, n. 7, p. 988–999, 2012.

VARMA, S. Benzodiazepines and hypnotics. **Medicine**, v. 44, n. 12, p. 764–767, 2016.

VASILIADES, J. Determination of midazolam by high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography**, v. 225, p. 266–271, 1981.

UNODC - UNITED NATIONS OFFICE ON DRUGS AND CRIME. **Guidance for de validation of analytical methodology and calibration of equipment used for testing of illicit drugs in seized materials and biological specimens**. Nova York, 2009. Disponível em <http://www.unodc.org/unodc/en/scientists/guidance-for-the-validation-of-analytical-methodology.html>. XIA *et al.*, 2012.

YAZDI, A; RAZAVI, N; YAZDINEJAD, S. Separation and determination of amitriptyline and nortriptyline by dispersive liquid-liquid microextraction combined with gas chromatography flame ionization detection. **Talanta**, v. 75, n. 5, p. 1293–1299, 2008.

YUAN, H.; MESTER, Z.; LORD, H.; *et al.* Automated in-tube solid-phase microextraction coupled with liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry for the determination of selected benzodiazepines. **Journal of Analytical Toxicology**, v. 24, n. 8, p. 718–725, 2000.

WESTON, S. I.; JAPP, M.; PARTRIDGE, J.; *et al.* Collection of analytical data for benzodiazepines and benzophenones. Appendix. **Journal of Chromatography A**, v. 538, n. 2, p. 277–284, 1991.

WILLEMS, H J; VAN DER HORST, A; DE GOEDE, P N; *et al.* Determination of some anticonvulsants, antiarrhythmics, benzodiazepines, xanthines, paracetamol and chloramphenicol by reversed phase HPLC. **Pharmaceutisch weekblad. Scientific edition**, v. 7, n. 4, p. 150–7, 1985.

ZHOU, Y.; WANG, H.; JIANG, J.; *et al.* Simultaneous determination of remimazolam and its carboxylic acid metabolite in human plasma using ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Journal of chromatography. B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences**, v. 976–977, p. 78–83, 2015.

ZULOAGA, O.; OLIVARES, M.; NAVARRO, P.; *et al.* Dispersive liquid-liquid microextraction: Trends in the analysis of biological samples. **Bioanalysis**, v. 7, n. 17, p. 2211–2225, 2015.

## 8. ANEXOS

### ANEXO A

#### Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

##### 1. Informações sobre o projeto de pesquisa

Título do Projeto de Pesquisa: <i>Rápida determinação de fármacos psicotrópicos em sangue empregando cromatografia líquida com detector ultravioleta/visível</i>
Duração da Pesquisa: <i>4 anos</i>
Nome do pesquisador responsável: <i>André Valle de Bairros</i>
Cargo/ Função: <i>Farmacêutico</i>
Instituição: <i>UFSM/Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas</i>

Prezado senhor(a)

Estamos convidando o senhor, e solicitando autorização ao seu responsável, caso necessário, para sua participação como voluntário(a) do projeto de pesquisa intitulado “*Rápida determinação de fármacos psicotrópicos em sangue empregando cromatografia líquida com detector ultravioleta/visível*” que estamos desenvolvendo em colaboração com o Hospital Universitário de Santa Maria (HUSM)

Esta pesquisa tem o objetivo de desenvolver uma metodologia analítica rápida, confiável e de baixo custo para verificar a presença de medicamentos que estão sendo administrados para o seu tratamento em amostras de sangue (benzodiazepínicos, antidepressivos e anticonvulsivantes).

Se você aceitar, e for permitido participar da pesquisa, precisaremos coletar uma amostra de sangue no volume máximo de 5 mL (equivalente a uma colher de sopa). O risco em relação ao projeto é mínimo, pois a coleta de sangue será através de seringas, agulhas e tubos novos descartáveis realizados por pessoal treinado. Será colhido no mesmo dia de retirada de sangue para exames laboratoriais de rotina, não necessitando que seja realizada uma nova picada de agulha. Os medicamentos dos quais estão sendo administrados ao senhor(a) serão verificados no prontuário médico.

RISCOS: A coleta de sangue pode causar um desconforto (dor da picada) e o procedimento poderá formar uma mancha roxa (hematoma). Serão tomadas providências (como passar uma pomada adequada), para que isto desapareça o mais rápido possível.

BENEFÍCIOS: Ajudará no esclarecimento de casos onde é necessário comprovar o uso dessas substâncias quando ela estiver causando algum dano ao paciente, como intoxicação. Você não terá benefício financeiro nem custos para participar deste estudo.

Você poderá desistir da participação em qualquer momento, sem que haja prejuízo do seu atendimento no hospital.

SIGILO: Não haverá nomes nem outra identificação dos participantes em nenhum relatório ou publicação do estudo. Toda a informação clínica adquirida durante este estudo será tratada como confidencial e será apenas dada a conhecer aos investigadores. Só os dados anônimos serão usados para possível exposição em publicações científicas.

Após o término da pesquisa, os dados serão armazenados com extrema privacidade e confidencialidade dos sujeitos envolvidos no Departamento de Análises Clínicas, sob responsabilidade do pesquisador responsável, por cinco anos. Após este período, serão destruídos.

Os gastos necessários para a sua participação na pesquisa serão assumidos pelos pesquisadores. Fica, também, garantida indenização em casos de danos comprovadamente decorrentes da participação na pesquisa.

Este documento é composto por 2 vias (uma para o coordenador da pesquisa e outra para o participante). Quando você assinar na linha abaixo, isto significa que concorda em participar da pesquisa descrita acima. É preciso que a sua assinatura seja obtida antes da realização de qualquer procedimento do estudo.

Ciente e de acordo com o que foi anteriormente exposto,

Eu, \_\_\_\_\_, após a leitura ou a escuta da leitura deste documento e ter tido a oportunidade de conversar com o pesquisador responsável, para esclarecer todas as minhas dúvidas, estou suficientemente informado, ficando claro para que minha participação é voluntária e que posso retirar este consentimento a qualquer momento sem penalidades ou perda de qualquer benefício. Estou ciente também dos objetivos da pesquisa, dos procedimentos aos quais serei submetido, dos possíveis danos ou riscos deles provenientes e da garantia de confidencialidade, bem como de esclarecimentos sempre que desejar. Diante do exposto e de espontânea vontade, expresso minha concordância em participar deste estudo.

Santa Maria, \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 20\_\_\_\_ .

---

Assinatura do sujeito da pesquisa

---

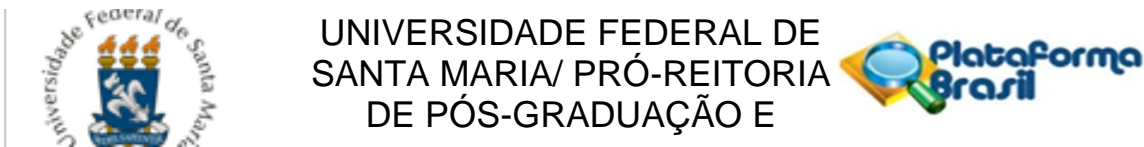
Assinatura do responsável legal

---

Assinatura e carimbo do pesquisador responsável

*Para qualquer questão, dúvida, esclarecimento ou reclamação sobre aspectos éticos dessa pesquisa, favor entrar em contato com o pesquisador pelo telefone: 3220-8018 ou com o Comitê de Ética em Pesquisa da UFSM: Av. Roraima, 1000 - 97105-900 - Santa Maria - RS - 2º andar do prédio da Reitoria. Telefone: (55) 3220-9362 - E-mail: cep.ufsm@gmail.com.*

## ANEXO B



### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

#### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** DETERMINAÇÃO RÁPIDA DE FÁRMACOS PSICOTRÓPICOS NO SANGUE  
EMPREGANDO CROMATOGRAFIA LÍQUIDA COM DETECTOR ULTRAVIOLETA-VISÍVEL

**Pesquisador:** André Valle de Bairros

**Área Temática:**

**Versão:** 3

**CAAE:** 78043917.1.0000.5346

**Instituição Proponente:** Universidade Federal de Santa Maria/ Pró-Reitoria de Pós-Graduação e

**Patrocinador Principal:** Universidade Federal de Santa Maria/ Pró-Reitoria de Pós-Graduação e Pesquisa

#### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 2.353.688

#### Apresentação do Projeto:

Os medicamentos são os principais agentes responsáveis por intoxicações no Brasil, responsáveis por quase 27 mil casos registrados no Brasil e mais de 6 mil ocorrências no estado do Rio Grande do Sul (RS). Os principais toxicantes relacionados foram os benzodiazepínicos, anticonvulsivantes e antidepressivos.

Assim, a proposta deste estudo é padronizar uma estratégia analítica capaz de determinar clonazepam, diazepam, nordiazepam, oxazepam, lorazepam, bromazepam, flunitrazepam, amitriptilina, desipramina, nortriptilina, fluoxetina, norfluoxetina,

carbamazepina, 10,11-carbamazepina epóxido e fenobarbital em amostras de soro humano, tendo como foco principal o fármaco e seus respectivos produtos de biotransformação ativos de importância clínica analítica. Os analitos serão determinados por LC-UV/Vis e as metodologias serão validadas conforme protocolo internacional (UNODC, 2009).

Para tanto, será realizada exclusivamente uma coleta de sangue em tubos sem anticoagulante em pacientes usuários de BZD, AC, ADT e ADISRS e que estão internados no setor psiquiátrico do HUSM (n = 20). Esse número de pacientes é o suficiente para garantir a confiabilidade da

**Endereço:** Av. Roraima, 1000 - prédio da Reitoria - 2º andar

**Bairro:** Camobi

**CEP:** 97.105-970

**UF:** RS

**Município:** SANTA MARIA

**Telefone:** (55)3220-9362

**E-mail:** cep.ufsm@gmail.com

metodologia analítica para fins toxicológicos (LEITE et al., 2009; MENCK et al., 2012; BAIROS et al., 2014). Esses pacientes serão previamente selecionados pelo setor psiquiátrico com aval do coordenador da referida pesquisa antes da coleta, a qual será realizada por pessoal treinado do Laboratório de Análises Clínicas (LAC), que estarão cientes do estudo que será realizado.

A amostra de sangue será obtida nos dias em que esses pacientes realizam punção venosa para outros exames laboratoriais de rotina, evitando o desconforto de nova picada de agulha. Uma alíquota de 5 mL de sangue será repassada ao coordenador do projeto, sendo este volume suficiente para realização dos procedimentos analíticos do estudo.

A identificação dos analitos será baseada no tempo de retenção, comparando-se com aqueles obtidos com padrões analíticos de referência, do qual deve-se obter o mesmo tempo de retenção (amostra e padrão).

**Objetivo da Pesquisa:**

OBJETIVO GERAL: desenvolvimento e validação de um rápido método analítico para determinação de fármacos e seus respectivos produtos de biotransformação utilizando sangue como matriz biológica.

**Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

RISCOS: desconforto no momento da colheita da amostra de sangue para a análise.

BENEFÍCIOS: indiretos através do conhecimento gerado.

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

.

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

Apresenta folha de rosto, registro do projeto, autorização institucional, termo de confidencialidade e termo de consentimento livre esclarecido, devidamente redigidos e assinados.





**Recomendações:**

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

**Considerações Finais a critério do CEP:**

**Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:**

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BASICAS_DO_PROJETO_915078.pdf	25/10/2017 15:17:38		Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLEFinal3.docx	25/10/2017 15:16:53	André Valle de Bairros	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	projeto.pdf	25/10/2017 15:16:31	André Valle de Bairros	Aceito
Outros	Termodeconfidencialidadeassinado.jpg	02/10/2017 13:58:26	André Valle de Bairros	Aceito
Outros	MinutadoprojetoGAP.pdf	02/10/2017 13:51:58	André Valle de Bairros	Aceito
Folha de Rosto	PlataformaBrasilAndreValledeBairros.pdf	02/10/2017 13:51:30	André Valle de Bairros	Aceito
Outros	RegistroProjetoHUSM.jpg	22/06/2017 09:48:41	André Valle de Bairros	Aceito

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

Continuação do Parecer: 2.353.688

SANTA MARIA, 27 de Outubro de 2017

---

**Assinado por:**  
**CLAUDEMIR DE QUADROS**  
(Coordenador)