

Desenvolvimento de métodos cromatográficos qualitativos para identificação de benzodiazepínicos

Julia de Abreu Gadelha

Farmacêutica graduada pela Universidade Federal do Ceará

Endereço para correspondência: Laboratório de Pesquisa em Toxicologia.

*Autor para correspondência: Laboratório de Pesquisa em Toxicologia.
Rua Alexandre Baraúna, 949 - Rodolfo Teófilo - Fortaleza - CE / CEP 60430-160. 3º andar.

Auriana Serra Vasconcelos

Farmacêutica mestranda em farmacologia da Universidade Federal do Ceará

Vívian Romero Santiago

Farmacêutica Perita legista da Perícia Forense do Ceará e especialista em farmacologia legal.

Wanderley Pinheiro de Holanda Junior

Farmacêutico Perito legista da Perícia Forense do Ceará.

Breno Alves Auad Moreira

Farmacêutico mestrando em ciências farmacêuticas da Universidade Federal do Ceará.

Janete Eliza de Sá Soares

Professora doutora da disciplina de toxicologia de alimentos do Departamento de Farmácia da Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem da Universidade Federal do Ceará.

Teresa Maria de Jesus Ponte Carvalho

Professora doutora da disciplina de Análises Toxicológicas do Departamento de Farmácia da Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem da Universidade Federal do Ceará.

RESUMO

Os benzodiazepínicos são os agentes sedativo-hipnóticos mais prescritos no mundo devido à eficácia terapêutica e ao rápido início de ação. Porém, desde 1970, são descritos casos de dependência devido ao consumo abusivo desses fármacos. Além disso, são utilizados com objetivo criminoso em roubos e estupros através de adulterações em bebidas ou alimentos, sendo os principais, flunitrazepam, clonazepam, diazepam e midazolam. A Toxicologia Forense utiliza métodos analíticos de triagem e de confirmação para a identificação de substâncias, entre eles, os mais utilizados são os métodos cromatográficos. O objetivo desse estudo foi desenvolver métodos cromatográficos qualitativos por Cromatografia em Camada Delgada (CCD) e Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) para a identificação dos benzodiazepínicos (bromazepam, clonazepam, clordiazepóxido, diazepam, flunitrazepam, flurazepam e midazolam). Foram testadas diferentes condições cromatográficas para o aperfeiçoamento dos métodos. Para CCD, selecionou-se a fase móvel acetato de etila:metanol:hidróxido de amônio (89,5:10:0,5) e revelação através da solução de cloreto férrico, de aquecimento e da solução de *Dragendorff* para melhor identificação e separação. Foram observadas colorações diversas de manchas (branco, cinza, amarelo, laranja e marrom) e fatores de retenção entre 0,30 e 0,58. O método foi testado para a análise de duas amostras de comprimidos, que mostraram a presença de flunitrazepam e bromazepam. Para CLAE, utilizando-se coluna C₁₈, comprimento de onda 230nm, fluxo 1mL/min e volume de injeção de 25µL, foram testadas diferentes proporções da fase móvel acetonitrila:metanol:água na tentativa de identificar e separar os sete padrões de benzodiazepínicos, não sendo possível esta separação. Porém, a fase móvel acetonitrila:metanol:água (40:20:40) ajustada em pH 4 com ácido fosfórico (1/2) foi capaz de separar os padrões de flunitrazepam (5,6 min), clonazepam (4,4 min) e diazepam (11,4 min). Além disso, a fase móvel acetonitrila:metanol:água (20:45:35) identificou o midazolam (10,5 min), que não foi detectado nas outras proporções da fase móvel testadas. Diante dos resultados expostos, a metodologia desenvolvida nesse estudo pode ser aplicada nas análises toxicológicas qualitativas com finalidade forense,

GADELHA, Julia de Abreu; VASCONCELOS, Auriana Serra; SANTIAGO, Vívian Romero; JUNIOR, Wanderley Pinheiro de Holanda; MOREIRA, Breno Alves Auad; SOARES, Janete Eliza de Sá; CARVALHO, Teresa Maria de Jesus Ponte. Desenvolvimento de métodos cromatográficos qualitativos para identificação de benzodiazepínicos. RevInter Revista Intertox de Toxicologia, Risco Ambiental e Sociedade, v. 7, n. 3, p. 25-49, out. 2014.

porém, ainda necessita de mais estudos para o aperfeiçoamento do método e para a sua validação analítica.

Palavras-chave: Cromatografia em Camada Delgada. Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência. Toxicologia Forense. Benzodiazepínicos.

ABSTRACT

Benzodiazepines are sedative-hypnotic agents and the most prescribed in the world due to its therapeutic efficacy and rapid onset of action. However, since 1970, cases of dependence due to the abuse of these drugs have been described. Moreover, those agents are used to rob and rape victims through adulteration of food or drinks. The most used are flunitrazepam, clonazepam, diazepam and midazolam. The Forensic Toxicology uses analytical methods of screening and confirmation for the identification of substances. The most common are chromatographic methods. The aim of this study is to develop chromatographic methods for qualitative Thin Layer Chromatography (TLC) and Ultra Performance Liquid Chromatography (UPLC) for the identification of benzodiazepines (bromazepam, clonazepam, chlordiazepoxide, diazepam, flunitrazepam, flurazepam and midazolam). Different chromatographic conditions for the improvement of the methods were tested. For TLC, the mobile phase selected was ethyl acetate: methanol: ammonium hydroxide (89,5:10:0,5) and the visualization agents were ferric chloride solution, heating and *Dragendorff* solution for better separation. Colorations were observed forming several spots (white, gray, yellow, orange and brown) and the retention factors observed, between 0.30 and 0.58. The method was tested for the analysis of two samples of tablets, which showed the presence of flunitrazepam and bromazepam. For UPLC, using a C18 column, wavelength 230nm, flow 1ml/min and injection volume of 25µL were tested different ratios of mobile phase acetonitrile:methanol:water in an attempt to identify and separate the seven patterns of benzodiazepines. The separation was not possible. However, the mobile phase acetonitrile:methanol:water(40:20:40) adjusted to pH 4 with phosphoric acid (1/2) was capable of separating patterns of flunitrazepam (5.6 min), clonazepam (4.4 min) and diazepam (11.4 min). In addition, mobile phase acetonitrile:methanol:water(20:45:35) identified midazolam (10.5 min), which was not detected in other mobile phase ratios tested. The methodology developed in this study can be applied in qualitative toxicological analyzes with forensic purpose; however, it still needs more studies to analytical validation.

Keywords: Thin Layer Chromatography. Ultra Performance Liquid Chromatography. Forensic Toxicology. Benzodiazepines.

GADELHA, Julia de Abreu; VASCONCELOS, Auriana Serra; SANTIAGO, Vívian Romero; JUNIOR, Wanderley Pinheiro de Holanda; MOREIRA, Breno Alves Auad; SOARES, Janete Eliza de Sá; CARVALHO, Teresa Maria de Jesus Ponte. Desenvolvimento de métodos cromatográficos qualitativos para identificação de benzodiazepínicos. RevInter Revista Intertox de Toxicologia, Risco Ambiental e Sociedade, v. 7, n. 3, p. 25-49, out. 2014.

INTRODUÇÃO

A Toxicologia Forense engloba qualquer aplicação da ciência dos toxicantes, com o objetivo de esclarecer uma investigação criminal e está intimamente relacionada à Toxicologia Analítica, a qual consiste na identificação e/ou quantificação de agentes tóxicos e/ou seus metabólitos, como também na detecção de parâmetros relacionados com a exposição à toxicantes que resultam em alterações fisiológicas no organismo (MOREAU; SIQUEIRA, 2008).

As análises toxicológicas com fins médico-legais são empregadas para detectar, identificar e quantificar agentes tóxicos, com aplicação nas análises *post-mortem*, controle de dopagem, toxicodependência, crimes ambientais (OGA; CAMARGO; BATISTUZZO, 2008).

Dentre as metodologias utilizadas nas análises toxicológicas, temos como bastante utilizada a cromatografia. A cromatografia é um método físico-químico de separação, que se baseia na migração diferencial dos componentes de uma mistura, distribuídos em duas fases imiscíveis, a fase móvel e a estacionária. A fase estacionária permanece fixa e a fase móvel passa através dela, arrastando determinados componentes da mistura, enquanto outros ficam retidos na fase estacionária, o que irá resultar na migração diferencial de cada componente (PERES, 2002).

Os métodos cromatográficos possuem boa sensibilidade e são capazes de separar diversos tipos de espécies, desde não voláteis até termicamente instáveis, sendo utilizados para fins qualitativos e quantitativos (TONHI, 2002).

Considerando os diversos tipos de cromatografia, podemos destacar a Cromatografia em Camada Delgada (CCD) e a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).

A Cromatografia em Camada Delgada (CCD) tem sido empregada como método de triagem para a detecção de compostos carbâmicos, como o

aldicarb (XAVIER et al., 2007) e a CLAE como método de confirmação (MELITO, 2004) com finalidade forense. A CLAE é bastante utilizada como método de triagem ou confirmação e, juntamente com a espectrometria de massa, é a técnica de eleição para confirmação por fornecer máxima especificidade possível (MOREAU; SIQUEIRA, 2008).

Dentre as drogas de importância para as situações periciais, destacam-se os benzodiazepínicos, drogas estas que originalmente teriam ação sedativa e hipnótica, podendo ser usados também como agentes antiepilépticos, ansiolíticos, relaxantes musculares e como anestésicos, quando administrados em altas doses e associados a outros fármacos. (GOODMAN, 2006). Entretanto, além da dependência e tolerância, infelizmente, os benzodiazepínicos passaram a ser “conhecidos nas ruas” como drogas facilitadoras de estupros e roubos, possibilitando a venda por traficantes. Os mais conhecidos são o flunitrazepam, designado por “rape drug”, principalmente porque é um indutor do sono, cuja ação se dá de forma rápida e intensa, além de atuar como ansiolítico, relaxante muscular e levar a produção de amnésia (BERTHELON et al., 2003); o clonazepam (POLÍCIA CIVIL DO ESTADO DE RONDÔNIA, 2013); e, o diazepam (AMIR; WAISMAN, 2006), provavelmente, por serem fármacos da classe de benzodiazepínicos com ação mais longa.

Estes fármacos vêm sendo utilizados com o objetivo criminoso de sedar vítimas potenciais de estupro e assalto (CHEN; HU, 1999; BICHOP, LERCH, MCCORD, 2004). Vários casos destes são registrados nas delegacias brasileiras por vítimas induzidas a ingerir bebidas adulteradas com essas substâncias, conhecidas, popularmente, como “Boa Noite Cinderela” (LEIROZ; RIEHL, 2008).

Dessa forma, apesar de serem muito prescritos, os benzodiazepínicos são alvos de uso indiscriminado (LAVIE et al, 2009; FORSAN, 2010), o que torna necessário o desenvolvimento de métodos confiáveis para a análise qualitativa e quantitativa desses fármacos no estudo médico-legal. Além

GADELHA, Julia de Abreu; VASCONCELOS, Auriana Serra; SANTIAGO, Vívian Romero; JUNIOR, Wanderley Pinheiro de Holanda; MOREIRA, Breno Alves Auad; SOARES, Janete Eliza de Sá; CARVALHO, Teresa Maria de Jesus Ponte. Desenvolvimento de métodos cromatográficos qualitativos para identificação de benzodiazepínicos. *RevInter Revista Intertox de Toxicologia, Risco Ambiental e Sociedade*, v. 7, n. 3, p. 25-49, out. 2014.

disso, o desenvolvimento de métodos capazes de identificar substâncias de interesse forense permite estabelecer nexos causais entre um determinado evento e um efeito, ou mesmo a tentativa deste, possibilitando a elucidação de uma investigação (MENEZES et al., 2012).

O presente trabalho tem como objetivo principal desenvolver métodos cromatográficos qualitativos (triagem e confirmação) para identificação dos benzodiazepínicos com finalidade forense, principalmente aqueles fármacos envolvidos em eventos criminosos que necessitam ser identificados para que o procedimento legal seja instaurado.

MÉTODOS

Trata-se de um estudo analítico, qualitativo, utilizando-se o método da Cromatografia em Camada Delgada (CCD) e Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).

As análises foram realizadas em um Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) com sistema de bombeamento, detector com arranjo de diodos (PDA) (*AccelaThermoScientific*[®]) e sistema de aquisição de dados ChromQuest 5.0 (*ThermoScientific*[®]) e coluna analítica ODS HYPERSIL C₁₈ (250x4,6mm) da *ThermoScientific*[®].

Os reagentes sólidos foram pesados em balança analítica de precisão RK[®]-200. A água utilizada no preparo das soluções foi purificada em Sistema MilliQ – ELGA[®]. As soluções foram filtradas em sistema de filtração com bomba a vácuo GAST[®], membrana Pall Corporation[®] tipo PTFE (0,45- 47mm) e homogêneas em banho ultrason QUIMIS[®] modelo Q335D. Foram utilizados micropipetadores automáticos PIPETMANNeo[®] GILSON e as medidas de pH foram feitas no Phmetro JENWAY[®] modelo 3510.

Foram utilizados os seguintes solventes e materiais: Água purificada em sistema MilliQ[®] (resistividade 18,2 MΩ.cm); Acetato de etila (ISO FAR[®]); Metanol e Hidróxido de amônio para análise - P.A. (VETEC[®]); Metanol e

GADELHA, Julia de Abreu; VASCONCELOS, Auriana Serra; SANTIAGO, Vívian Romero; JUNIOR, Wanderley Pinheiro de Holanda; MOREIRA, Breno Alves Auad; SOARES, Janete Eliza de Sá; CARVALHO, Teresa Maria de Jesus Ponte. Desenvolvimento de métodos cromatográficos qualitativos para identificação de benzodiazepínicos. RevInter Revista Intertox de Toxicologia, Risco Ambiental e Sociedade, v. 7, n. 3, p. 25-49, out. 2014.

Acetonitrila grau HPLC (TEDIA®); Cromato placas (Sílica gel 60 F₂₅₄ MERCK®).

Os padrões de benzodiazepínicos analisados, bem como duas amostras de comprimidos foram cedidos pela Perícia Forense do Ceará (PEFOCE).

Cromatografia em Camada Delgada (CCD)

Foram preparadas soluções de benzodiazepínicos 5% em metanol grau CLAE. Os padrões utilizados no trabalho foram: bromazepam, clonazepam, clordiazepóxido, diazepam, flunitrazepam, flurazepam e midazolam. As amostras de comprimidos foram maceradas utilizando grau e pistilo e, em seguida, extraídas com metanol.

Foram utilizados os seguintes reveladores: cloreto férrico 10% (FeCl₃), aquecimento (Δ) e solução de *dragendorff*. A fase móvel utilizada foi acetato de etila:metanol:hidróxido de amônio (89,5:10:0,5).

Primeiramente, foi feita a padronização com os benzodiazepínicos bromazepam, clonazepam, clordiazepóxido, diazepam, flunitrazepam, flurazepam e midazolam.

A aplicação dos padrões na placa cromatográfica foi feita utilizando-se capilares de vidro (volume de $\frac{1}{4}$). Após a aplicação dos padrões, a cromatoplaça foi levada para a cuba cromatográfica contendo o sistema solvente acetato de etila: metanol: hidróxido de amônio (89,5:10:0,5) e foi deixada eluir até 10 cm. Com a eluição completa, a cromatoplaça foi deixada à temperatura ambiente para secagem e, em seguida revelada, primeiramente, com o cloreto férrico a 10%, depois foi aquecida por 5 minutos em estufa a 100° C, e, por último, revelada com a solução de *Dragendorff*.

Para a análise das amostras de comprimidos, aplicou-se pequenas quantidades das soluções das amostras na cromatoplaça, juntamente com as soluções padrões de benzodiazepínicos, e seguiram-se os mesmos procedimentos descritos acima após a aplicação.

Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

As soluções dos fármacos de bromazepam, clonazepam, clordiazepóxido, diazepam, flunitrazepam, flurazepam e midazolam foram preparadas a 5% em metanol grau HPLC (solução estoque) e, em seguida, diluídas para uma concentração de 250µg/mL (solução trabalho). Essas soluções foram mantidas sob refrigeração até o momento de uso.

Diferentes comprimentos de onda foram analisados com a finalidade de selecionar o que permitia melhor visualização dos padrões de benzodiazepínicos. Os comprimentos testados foram: 210; 230 e 315nm.

Para a escolha da composição da fase móvel para a separação cromatográfica testaram-se os seguintes solventes em diferentes proporções: acetonitrila (ACN), metanol (MetOH) e água purificada (H₂O). As composições testadas foram: ACN:MetOH:H₂O (40:20:40), ACN:MetOH:H₂O (40:20:40) acidificada com H₃PO₄ (1:2) até pH 4, ACN:MetOH:H₂O (30:20:42), ACN:MetOH:H₂O (35:20:45), ACN:MetOH:H₂O (35:25:40), ACN:MetOH:H₂O (30:25:45), ACN:MetOH:H₂O (45:35:20) e ACN:MetOH:H₂O (20:45:35). Todas elas, antes do uso, foram degaseificadas em aparelho para banho ultrassônico e a água foi filtrada através de papel de filtro, com auxílio de bomba de vácuo.

Foi utilizada a coluna cromatográfica de fase reversa ODS HYPERSIL C18 (250 x 4,6 mm x 5µm), tomando-se como base dados da literatura (LIMA, 2009; KASSAB; LANGUE, 2009; SESHAGIRI RAO; USHA RANI, 2009; SRUTHI et al, 2012).

As determinações cromatográficas foram feitas em CLAE e os sete benzodiazepínicos estudados foram determinados pela cromatografia líquida em fase reversa (CL-FR), fluxo 1mL/min e eluição isocrática composta de fase móvel contendo os solventes acetonitrila, metanol e água.

Para evitar grandes oscilações de absorvância na linha de base, a coluna cromatográfica era condicionada com a fase móvel a ser utilizada nos experimentos por aproximadamente 20 minutos. Após esse tempo, eram

injetados 25µL dos padrões, observando-se a detecção através do tempo de retenção. Diversas proporções da fase móvel composta pelos três solventes (acetoneitrila, metanol e água) foram testadas, descritas no item 3.4.2.3. Porém, nem todos os benzodiazepínicos puderam ser testados em cada fase devido a problemas técnicos do equipamento.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Determinações por Cromatografia em Camada Delgada (CCD)

No procedimento de revelação da cromatoplaça foi utilizado, inicialmente, a solução de cloreto férrico ($FeCl_3$), sendo possível a visualização de três dos sete benzodiazepínicos (bromazepam, clordiazepóxido e flunitrazepam). No entanto, as manchas eram muito claras e fugazes. Então, a cromatoplaça foi aquecida para a melhor fixação das manchas e, em seguida, foi revelada com a solução de Dragendorff. Após esse revelador, foi possível a visualização dos sete padrões de benzodiazepínicos, mostrando-se manchas bem mais visíveis (Tabela 1).

Segundo Clarke (1986), o cloreto férrico ($FeCl_3$) é capaz de revelar grupamentos fenólicos, já a solução de *Dragendorff* é capaz de revelar compostos alcaloides, devido as reações químicas que ocorrem entre essas substâncias. No entanto, apesar dos benzodiazepínicos não possuírem grupamentos fenólicos e nem pertencerem à classe dos alcaloides, esses reveladores são descritos como eficientes na literatura (MORAES; SZNELWAR; FERNICOLA, 1991).

Tabela 1 – Comportamento dos benzodiazepínicos frente aos reveladores utilizados na CCD. Sistema-solvente: acetato de etila:metanol:hidróxido de amônio(89,5:10:0,5).

Padrão	$FeCl_3$	Δ (aquecimento)	<i>Dragendorff</i>
Bromazepam	Amarelo	Cinza-esverdeado	Marrom-esverdeado
Clonazepam	-	-	Laranja-claro
Clordiazepóxido	Branco	Amarelado	Laranja-amarronzado
Diazepam	-	Esbranquiçado	Laranja
Flunitrazepam	Branco	Amarelado	Laranja
Flurazepam	-	Esbranquiçado	Laranja
Midazolam	-	Esbranquiçado	Laranja-claro

GADELHA, Julia de Abreu; VASCONCELOS, Auriana Serra; SANTIAGO, Vívian Romero; JUNIOR, Wanderley Pinheiro de Holanda; MOREIRA, Breno Alves Auad; SOARES, Janete Eliza de Sá; CARVALHO, Teresa Maria de Jesus Ponte. Desenvolvimento de métodos cromatográficos qualitativos para identificação de benzodiazepínicos. RevInter Revista Intertox de Toxicologia, Risco Ambiental e Sociedade, v. 7, n. 3, p. 25-49, out. 2014.

Um aspecto importante observado na revelação da cromatoplaça foi que as manchas correspondentes aos padrões de clonazepam e midazolam eram muito fugazes, e a mancha correspondente ao padrão de bromazepam persistia ao passar do tempo, ficando com uma coloração roxa.

A fase móvel utilizada em CCD não deve ser pouco polar, incapaz de remover os compostos do ponto de aplicação, e nem muito polar, capaz de arrastar os compostos até o topo da placa cromatográfica. Sendo assim, melhores resultados são obtidos com misturas de solventes (DEGANI; CASS; VIEIRA, 1998).

No caso da separação dos benzodiazepínicos estudados, a fase móvel constituída pelos solventes acetato de etila (89,5 mL), metanol (10 mL) e hidróxido de amônio (0,5mL) foi capaz de permitir o deslocamento na fase estacionária de todos os padrões de benzodiazepínicos, obtendo valores do fator de retenção (Rf) na faixa de 0,3 a 0,6. Apesar da proximidade de alguns valores, foi possível a identificação de cada benzodiazepínico, já que durante a análise dos resultados em CCD também se leva em consideração as cores das manchas obtidas durante a revelação (Tabela 2).

Tabela 2 – Valores de Rf obtidos na análise dos benzodiazepínicos por CCD frente à fase móvel acetato de etila:metanol:hidróxido de amônio (89,5:10:0,5).

Padrão	Fator de Retenção
Bromazepam	0,50
Clonazepam	0,35
Clordiazepóxido	0,55
Diazepam	0,57
Flunitrazepam	0,58
Flurazepam	0,38
Midazolam	0,30

As amostras de comprimidos foram identificadas frente às condições previamente estabelecidas, sendo elas: fase móvel -acetato de etila:metanol:hidróxido de amônio (89,5:10:0,5) e reveladores –solução de cloreto férrico, aquecimento e solução de *Dragendorff*. As soluções das amostras foram aplicadas na cromatoplaça juntamente com os padrões de

benzodiazepínicos, a fim de identificar o(s) princípio(s) ativo(s) presente(s) nos comprimidos.

A Tabela 3 apresenta os resultados das amostras de comprimidos e dos padrões de benzodiazepínicos estudados frente às condições cromatográficas já estabelecidas, descrevendo as cores e os valores do Rf produzidos pelos reveladores solução de cloreto férrico (FeCl₃) a 10%, aquecimento (Δ) e solução de *Dragendorff*.

Tabela 3 - Comportamento dos padrões e amostras analisadas por CCD. **Eluente:** acetato de etila:metanol:hidróxido de amônio (89,5:10:0,5); **Reveladores:** cloreto férrico, aquecimento e *Dragendorff*.

Padrão/Amostra	FeCl ₃	Δ	<i>Dragendorff</i>	Rf
Bromazepam	Amarelo	Cinza-esverdeado	Marrom-esverdeado	0,60
Clonazepam	-	-	Laranja-claro	0,44
Clordiazepóxido	Branco	Amarelo	Laranja-amarronzado	0,58
Diazepam	Branco	Esbranquiçado	Laranja	0,69
Flunitrazepam	Branco	Amarelo	Laranja	0,69
Flurazepam	-	-	Laranja	0,50
Midazolam	Róseo	Esbranquiçado	Laranja-claro	0,43
Amostra 1	Branco	Amarelo	Laranja-claro	0,67
Amostra 2	Amarelo	Esverdeado discreto	Esverdeado	0,62

As Figuras 1 e 2 mostram as placas cromatográficas reveladas com a solução de cloreto férrico a 10% e com a solução de *Dragendorff*, respectivamente.

Figura 1 – Cromatoplaça por CCD após revelação com solução de cloreto férrico. Fase móvel: acetato de etila:metanol:hidróxido de amônio (89,5:10:0,5).

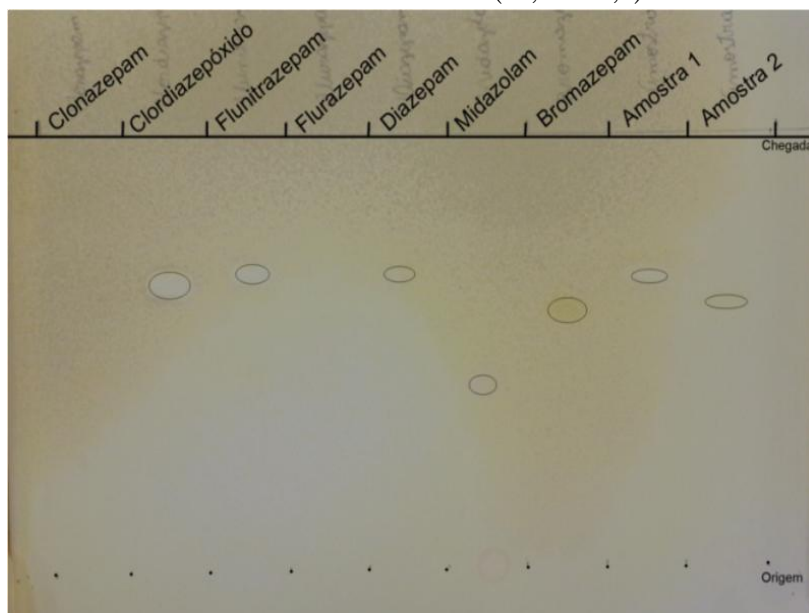
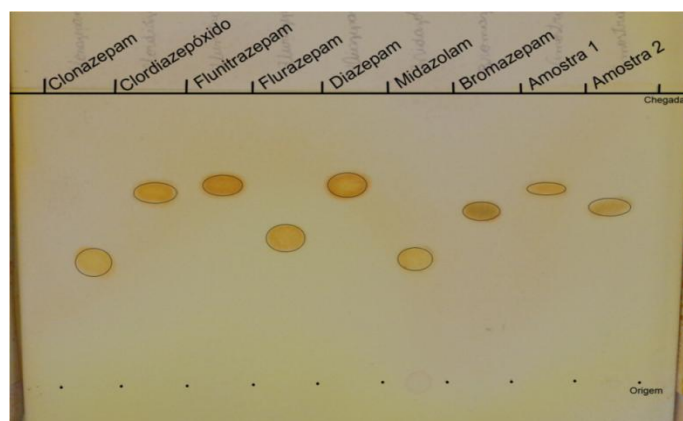


Figura 2 – Cromatoplaça por CCD após revelação com solução de Dragendorff. Fase móvel: acetato de etila:metanol:hidróxido de amônio (89,5:10:0,5).



Analisando o comportamento das amostras através da comparação com os padrões, é possível identificá-las qualitativamente, porém, ainda será necessária a confirmação dos resultados, já que a CCD é utilizada como técnica de triagem. Na amostra 1 há a suspeita de flunitrazepam, já na amostra 2 suspeita-se do bromazepam, pois os valores de Rf estão bem próximos dos padrões desses fármacos, bem como revelaram de forma semelhante aos padrões citados.

Determinações por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência em Fase Reversa (CLAE-FR)

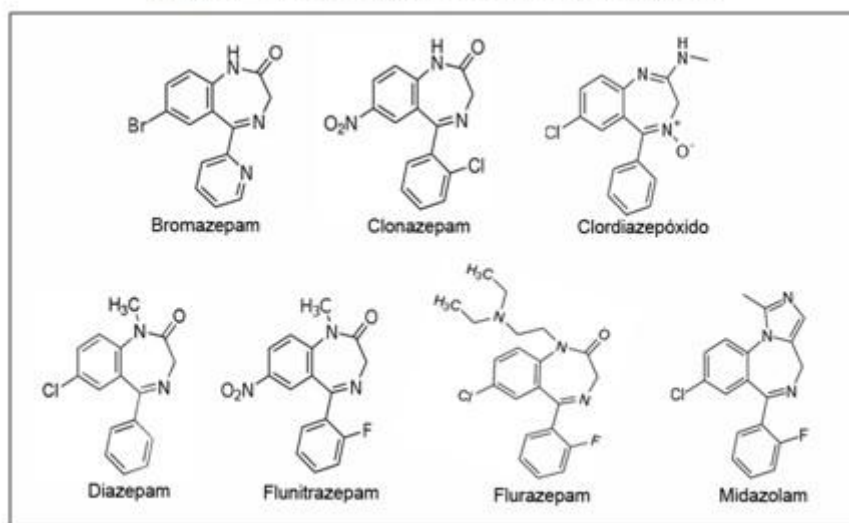
O comprimento de onda ideal é aquele em que o composto apresenta absorção máxima e livre de interferências (COLLINS; BRAGA; BONATO, 2007). Dessa forma, entre os comprimentos de onda analisados, o escolhido foi o de 230nm.

A escolha do solvente para a eluição depende da sua polaridade e da sua capacidade de remover os analitos adsorvidos na fase estacionária. Para as colunas menos polares, como a C₁₈, utilizada na CLAE-FR, o solvente de eluição precisa ter características bem polares, como a água, o metanol e a acetonitrila (HAGE; CARR, 2011). Portanto, neste estudo os solventes escolhidos para composição da fase móvel foram a acetonitrila, o metanol e a água, testados em diferentes proporções.

Não foi possível encontrar uma fase móvel que separasse bem todos os sete padrões de benzodiazepínicos. No entanto, foi possível visualizar comportamentos diferentes de cada padrão com a utilização das diferentes proporções da fase móvel.

De acordo com a teoria de Brønsted-Lowry, os ácidos são todas as espécies químicas capazes de doar um próton (íon H⁺) a outra substância, já as bases são as espécies químicas capazes de aceitar um próton de um ácido (ATKINS; JONES, 2006). Observando a estrutura dos benzodiazepínicos estudados nesse trabalho (Figura 3), é possível perceber que todos eles podem funcionar como bases, pois são capazes de receber íons H⁺ através do grupamento carbonila, porém, somente o bromazepam, o clonazepam e o clordiazepóxido podem funcionar como ácidos, ou seja, são capazes de doar íons H⁺ através do grupamento amina.

Figura 3 – Estrutura química dos benzodiazepínicos



Fonte: Encyclopedia of drugs: benzodiazepines.

Tabela 4 - Benzodiazepínicos como bases e ácidos de Brønsted-Lowry

Benzodiazepínico	Doação de H ⁺	Acepção de H ⁺	pKa
Bromazepam	Um	Três	12,24 (fortemente ácido) 2,68 (fortemente básico)
Clonazepam	Um	Quatro	11,89 (fortemente ácido) 1,86 (fortemente básico)
Clordiazepóxido	Um	Três	18,52 (fortemente ácido) 6,43 (fortemente básico)
Diazepam	Nenhum	Dois	2,92 (fortemente básico)
Flunitrazepam	Nenhum	Quatro	1,7 (fortemente básico)
Flurazepam	Nenhum	Três	8,71 (fortemente básico)
Midazolam	Nenhum	Quatro	6,57 (fortemente básico)

Fonte: Drug bank: open data drug & drug target database

O tempo de retenção engloba todo o tempo em que o analito permaneceu no sistema cromatográfico, desde a injeção até a saída do ponto máximo do pico. Esse tempo leva em consideração a interação do analito com a fase móvel e com a fase estacionária, bem como a força do solvente de eluição, ou seja, a capacidade do eluente de deslocar os solutos mais retidos na fase fixa para permitir sua detecção. Quanto mais forte o solvente de

GADELHA, Julia de Abreu; VASCONCELOS, Auriana Serra; SANTIAGO, Vívian Romero; JUNIOR, Wanderley Pinheiro de Holanda; MOREIRA, Breno Alves Auad; SOARES, Janete Eliza de Sá; CARVALHO, Teresa Maria de Jesus Ponte. Desenvolvimento de métodos cromatográficos qualitativos para identificação de benzodiazepínicos. RevInter Revista Intertox de Toxicologia, Risco Ambiental e Sociedade, v. 7, n. 3, p. 25-49, out. 2014.

eluição, menor o tempo de retenção, ou seja, o analito será detectado mais rapidamente. Em fase normal, o solvente forte é mais polar e vai reduzir a retenção, já o mais fraco é menos polar e vai aumentar a retenção. Porém, em fase reversa, o solvente fraco é o mais polar e o solvente forte é o menos polar (COLLINS; BRAGA; BONATO, 2007). Portanto, na cromatografia em fase reversa, o solvente fraco possui alta afinidade pelo analito mais polar, podendo arrastá-lo mais rapidamente durante a corrida; já o solvente forte possui baixa afinidade pelo analito mais polar, demorando mais tempo para arrastá-lo.

Tabela 5 - Forças de eluição de solventes em sílica por cromatografia em fase normal.

Solvente	Força de eluição em Sílica (ϵ°)
Acetonitrila	0,52
Metanol	0,70
Água	>0,73

Fonte: Hage; Carr, 2011

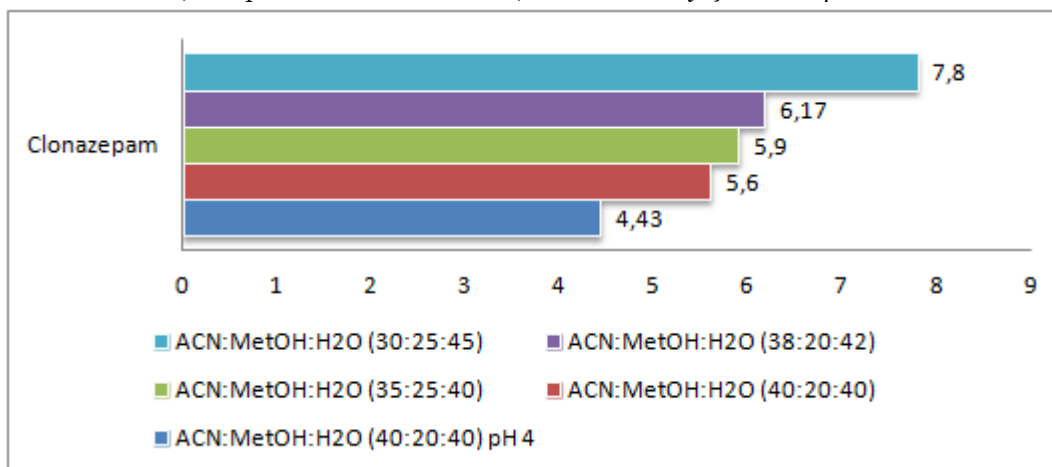
A Tabela 5 contém as forças de eluição dos solventes por cromatografia em fase normal, mostrando que a água é o solvente mais forte, o metanol médio e a acetonitrila o mais fraco. Porém, por fase reversa, na detecção de analitos mais polares, ocorre o inverso, a acetonitrila passa a ser o solvente mais forte, seguido do metanol e a água o mais fraco.

Foram testadas diferentes proporções da fase móvel ACM:MetOH:H₂O na tentativa de identificar e separar cada um dos sete padrões de benzodiazepínicos analisados. A seguir, os comportamentos desses padrões serão descritos separadamente frente à fase móvel.

Bromazepam Entre todas as fases móveis analisadas, só foi possível a detecção do padrão de bromazepam na fase ACN:MetOH:H₂O (40:20:40) acidificada com ácido fosfórico a pH 4, com formação de pico no tempo de retenção de 4,45 minutos.

Clonazepam Após análise por CLAE nas fases móveis constituídas por ACN:MetOH:H₂O nas diversas proporções, foram obtidos diferentes tempos de retenção do clonazepam (Figura 4).

Figura 4 - Comportamento do clonazepam frente às fases móveis compostas por ACN:MetOH:H₂O em diferentes proporções. Condições cromatográficas: coluna C₁₈, fluxo 1mL/min; comprimento onda 230nm, volume de injeção de 25µL.

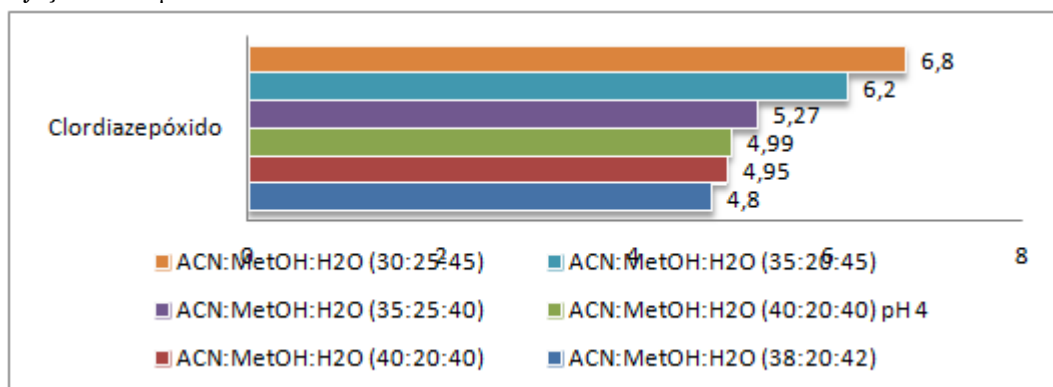


Comparando esses tempos de retenção frente às fases móveis nas variadas proporções, é possível fazer algumas observações com relação aos solventes de eluição utilizados. Ao comparar a fase móvel na proporção ACN:MetOH:H₂O 40:20:40, acidificada com H₃PO₄ (4,4min) e sem acidificação (5,6min), percebeu-se que a fase acidificada foi capaz de reduzir o tempo de retenção, ou seja, aumentou a interação da fase móvel com o clonazepam, levando, entre as proporções testadas, ao menor tempo de retenção obtido desse padrão.

Comparando as proporções ACN:MetOH:H₂O 30:25:45 (7,8min) e 35:25:40 (5,9min), notou-se que o aumento de acetonitrila e a diminuição da água resultou na redução do tempo de retenção, mostrando que a acetonitrila aumenta a interação do clonazepam com a fase móvel, mas a água reduz a interação. Além disso, comparando as proporções ACN:MetOH:H₂O 38:20:42 (6,2min) e 35:25:40 (5,9min), percebeu-se que o aumento de metanol é capaz de reduzir o tempo de retenção, ou seja, também aumenta a interação do clonazepam com a fase móvel.

Clordiazepóxido Os diferentes tempos de retenção do padrão de clordiazepóxido frente à fase móvel ACN:MetOH:H₂O nas diversas proporções encontram-se na Figura 5.

Figura 5 - Comportamento do padrão de clordiazepóxido frente às fases móveis compostas por ACN:MetOH:H₂O em diferentes proporções. Condições cromatográficas: coluna C18, fluxo 1mL/min; comprimento onda 230nm, volume de injeção de 25µL.

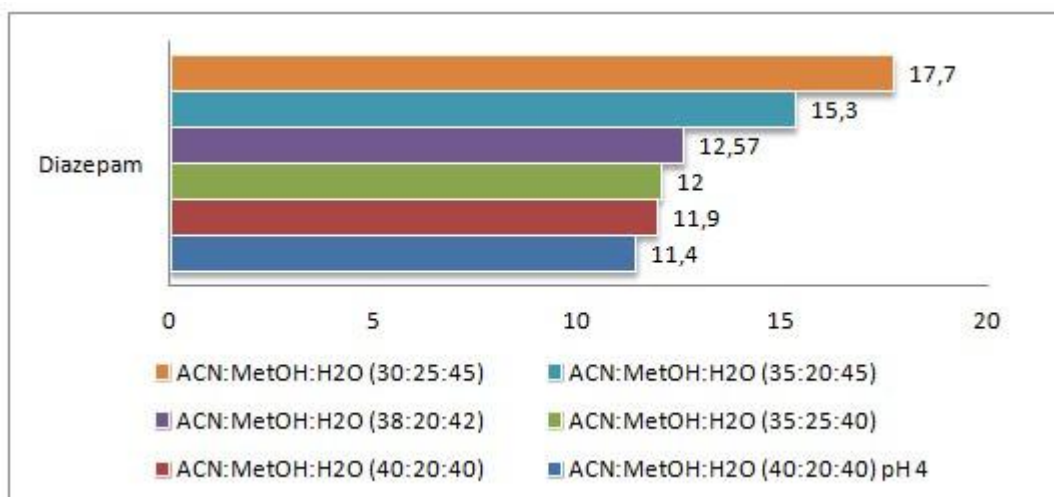


Com relação à acidificação da fase móvel, não ocorreu alteração significativa no tempo de retenção do clordiazepóxido. E, diferente do clonazepam, a fase móvel que permitiu uma eluição mais rápida desse padrão foi ACN:MetOH:H₂O na proporção 38:20:42 (4,8min), sendo assim, ao comparar esse resultado com o obtido na proporção 40:20:40 (4,95min) nota-se que o aumento da acetonitrila e redução da água levou a um pequeno aumento do tempo de retenção, diferente do observado para o clonazepam.

Comparando as eluições quando se utilizou ACN:MetOH:H₂O nas proporções 35:20:45 (6,2min) e 35:25:40 (5,27min), notou-se que o aumento de metanol, com redução da água, é capaz de reduzir o tempo de retenção. Porém, ao comparar os resultados obtidos com a fase ACN:MetOH:H₂O nas proporções 30:25:45 (6,8min) e 35:20:45 (6,2min), observou-se que o aumento de acetonitrila e o a redução de metanol levou à redução do tempo de retenção.

Diazepam Os tempos de retenção obtidos do padrão diazepam nas diferentes fases móveis testadas encontram-se na Figura 6.

Figura 6 - Comportamento do padrão de diazepam frente às fases móveis compostas por ACN:MetOH:H₂O em diferentes proporções. Condições cromatográficas: coluna C18, fluxo 1mL/min; comprimento onda 230nm, volume de injeção de 25µL.



Entre todos os benzodiazepínicos estudados, o diazepam foi o que obteve os maiores tempos de retenção. Observando a tabela 4 é verificado que ele não é capaz de doar íons H^+ e recebe apenas dois, sendo, entre os sete padrões estudados, o que menos interage com a fase móvel.

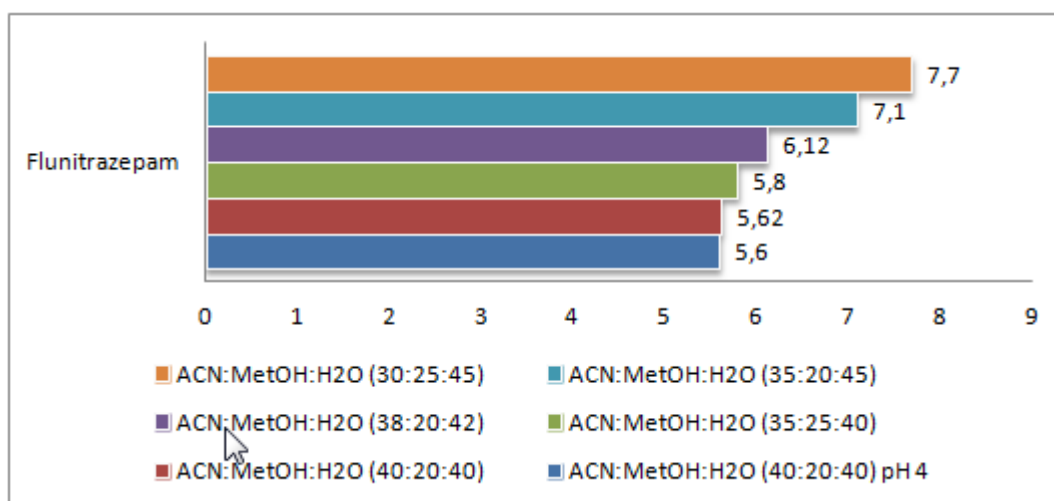
A fase móvel ACN:MetOH:H₂O (40:20:40) em pH 4 ajustado com H₃PO₄ foi a que obteve o menor tempo de retenção, demonstrando que a acidificação da fase diminui a retenção. Isso ocorre porque o diazepam não é doador de prótons e, portanto, em meio ácido, recebe prótons e fica dissociado (mais polar), reduzindo a interação com a fase estacionária e, conseqüentemente, o tempo de retenção.

Ao comparar as proporções de ACN:MetOH:H₂O 30:25:45 (17,7min) e 35:20:45 (15,3min), percebe-se que ambas possuem o mesmo somatório de acetonitrila e metanol (55%), porém, com tempos de retenção diferentes e menor ao utilizar maior quantidade de acetonitrila, solvente de eluição mais forte que o metanol. Para esse padrão, a acetonitrila e o metanol também se mostraram inversamente proporcionais ao tempo de retenção. Com relação à água, percebe-se que as duas proporções de fase móvel em que ela estava em maior quantidade (30:25:45 e 35:20:45) tiveram os maiores tempos de retenção, demonstrando que a água é diretamente proporcional à retenção.

Flunitrazepam Após a análise por CLAE, observou-se que o flunitrazepam possui comportamento semelhante ao clonazepam (figura 7). É possível justificar isso ao verificar na tabela 4 que ambos são aceptores de quatro íons H^+ , o que leva a interações semelhantes com a fase móvel e, assim, a tempos de retenção semelhantes.

A fase móvel ACN:MetOH:H₂O (40:20:40) em pH 4 foi a que permitiu o menor tempo de retenção, porém, essa acidificação não levou à alteração significativa na retenção, pois não reduziu tanto o tempo de retenção como aconteceu para o clonazepam e diazepam.

Figura 7 - Comportamento do padrão de flunitrazepam frente às fases móveis compostas por ACN:MetOH:H₂O em diferentes proporções. Condições cromatográficas: coluna C18, fluxo 1mL/min; comprimento onda 230nm, volume de injeção de 25 μ L.

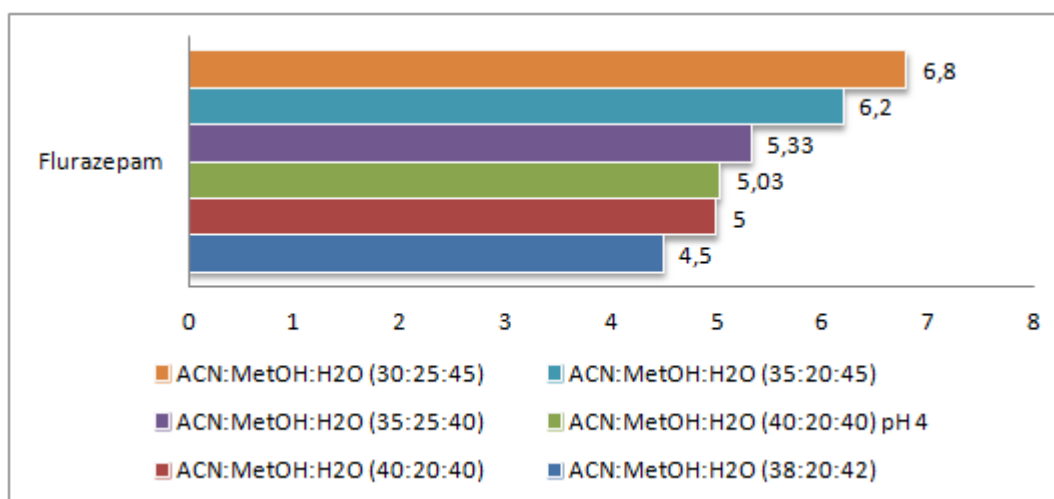


Flurazepam Os resultados dos tempos de retenção obtidos após eluição nas diversas fases (figura 8) mostraram muita semelhança de comportamento com o clordiazepóxido, com tempos de retenção iguais ou bem próximos, o que se justifica ao verificar na tabela 4 que ambos são aceptores de três íons H^+ .

A acidificação da fase móvel não alterou significativamente o tempo de retenção. A fase móvel que permitiu menor retenção também foi ACN:MetOH:H₂O na proporção 38:20:42 (4,5min), que, ao comparar com a proporção 40:20:40 (5min), notou-se que o aumento de acetonitrila e de água resultou no aumento do tempo de retenção. Porém, ao comparar as proporções 30:25:45 (6,8min) e 35:20:45 (6,2min), observa-se que o aumento

da acetonitrila e a redução do metanol, reduziram o tempo de retenção. E, comparando as proporções 35:20:45 (6,2min) e 35:25:40 (5,33min), percebeu-se que o aumento do metanol e redução da água levaram à redução do tempo de retenção.

Figura 8 - Comportamento do padrão de flurazepam frente às fases móveis compostas por ACN:MetOH:H₂O em diferentes proporções. Condições cromatográficas: coluna C₁₈, fluxo 1mL/min; comprimento onda 230nm, volume de injeção de 25µL.

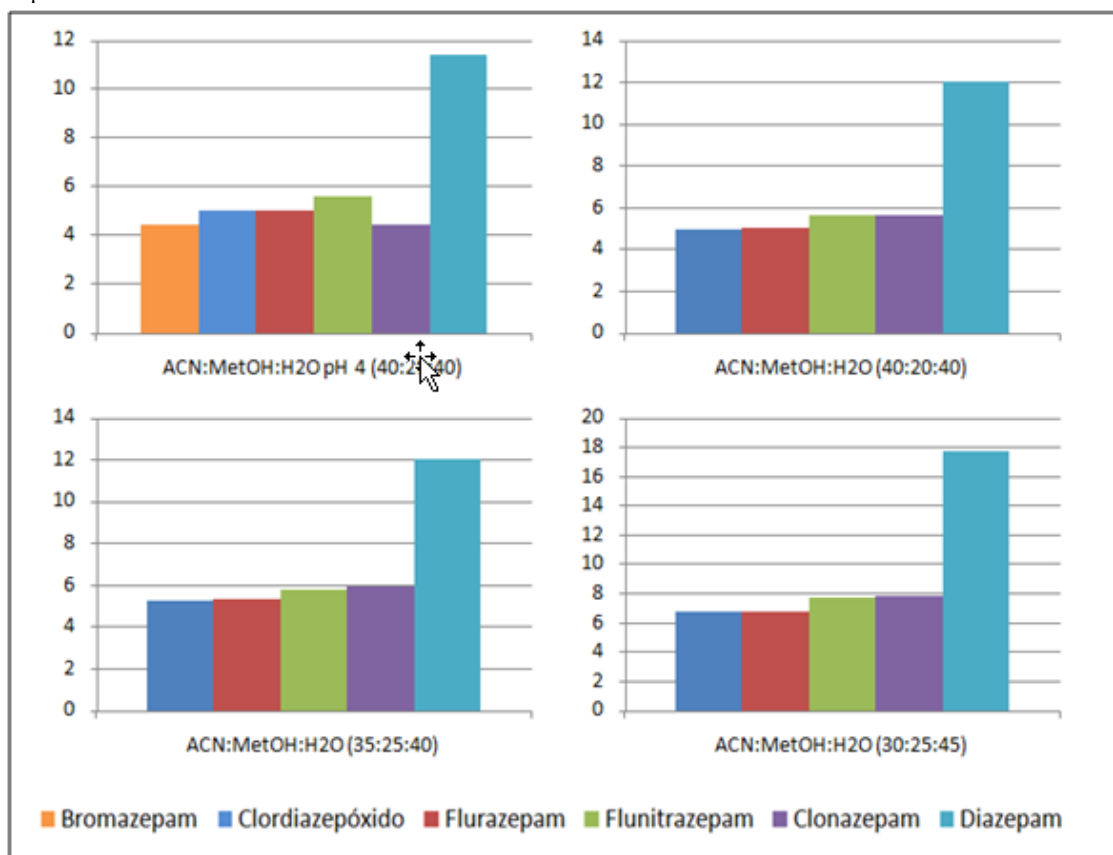


Midazolam Entre todas fases testadas, o midazolam foi detectado apenas na fase móvel ACN:MetOH:H₂O (20:35:45), obtendo tempo de retenção de 10,5 minutos. Essa fase foi escolhida para esse fármaco de acordo com pesquisas na literatura (KASSAB; LANGUE, 2003).

Separação dos padrões de benzodiazepínicos

Na tentativa de separar os padrões de benzodiazepínicos, foram escolhidas quatro fases móveis em diferentes proporções que foram testadas para todos os sete benzodiazepínicos estudados. Os resultados encontram-se na Figura 9.

Figura 9 - Tempos de retenção dos benzodiazepínicos na fase móvel ACN:MetOH:H₂O em diferentes proporções. Condições cromatográficas: coluna C₁₈, fluxo 1mL/min; comprimento onda 230nm, volume de injeção de 25µL.



O diazepam mostrou uma boa separação em relação aos outros padrões em todas as proporções da fase móvel ACN:MetOH:H₂O, pois apresentou tempos de retenção bem superiores em relação a todos os outros.

O flunitrazepam e o clonazepam apresentaram tempos de retenção bem próximos, porém na fase ACN:MetOH:H₂O pH 4 (40:20:40) foi possível a separação dos dois.

O bromazepam fase ACN:MetOH:H₂O pH 4 (40:20:40) mostrou tempo de retenção muito próximo ao clonazepam, não podendo ser separado.

Para o clordiazepóxido e flurazepam não foi possível realizar a separação, pois se comportam muito semelhantes frente às diferentes proporções da fase móvel.

E o midazolam não foi detectado nas proporções da fase móvel presentes nos gráficos da figura 11, mas foi possível sua detecção na fase

GADDELHA, Julia de Abreu; VASCONCELOS, Auriana Serra; SANTIAGO, Vívian Romero; JUNIOR, Wanderley Pinheiro de Holanda; MOREIRA, Breno Alves Auad; SOARES, Janete Eliza de Sá; CARVALHO, Teresa Maria de Jesus Ponte. Desenvolvimento de métodos cromatográficos qualitativos para identificação de benzodiazepínicos. RevInter Revista Intertox de Toxicologia, Risco Ambiental e Sociedade, v. 7, n. 3, p. 25-49, out. 2014.

móvel ACN:MetOH:H₂O (20:35:45), sendo essa fase escolhida para a sua separação.

CONCLUSÃO

As condições cromatográficas (fase móvel e reveladores) utilizadas na Cromatografia em Camada Delgada (CCD) para a separação dos benzodiazepínicos estudados (bromazepam, clonazepam, clordiazepóxido, diazepam, flunitrazepam, flurazepam e midazolam) foram estabelecidas. São elas: fase móvel acetato de etila:metanol:hidróxido de amônia (89,5:10:0,5) e reveladores solução de cloreto férrico, aquecimento e solução de *Dragendorff*.

Na Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), as condições cromatográficas também foram estabelecidas para a identificação dos sete padrões de benzodiazepínicos. São elas: fluxo de 1mL/min, comprimento de onda de 230nm, coluna C₁₈ e fase móvel acetonitrila:metanol:água em eluição isocrática. Porém, não foi possível encontrar uma proporção da fase móvel capaz de separar todos os padrões, necessitando de mais estudos para o aperfeiçoamento do método, sendo sugerida a utilização de eluição por gradiente para esse objetivo. Dos sete padrões de benzodiazepínicos, a fase móvel acetonitrila:metanol:água (40:20:40) ajustada em pH 4 com ácido fosfórico (1:2) foi capaz de permitir a separação de apenas três (flunitrazepam, clonazepam e diazepam). Além disso, a fase móvel acetonitrila:metanol:água (20:45:35) foi capaz de identificar o midazolam, não detectado nas outras proporções, o que permitiu sua separação dos outros padrões.

Apesar de ainda necessitar de mais estudos para o aperfeiçoamento do método na separação dos sete padrões de benzodiazepínicos, os métodos propostos são importantes para as análises toxicológicas qualitativas, com finalidade forense, na identificação dos benzodiazepínicos flunitrazepam,

clonazepam, diazepam e midazolam, fármacos que estão sendo utilizados para a prática de crimes.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMIR, L.; WAISMAN, Y. Medical and toxicological aspects of drug facilitated sexual assault. **Israeli Journal of Emergency Medicine**. Israel, v. 6, n. 3, p. 62-66, 2006.

ATKINS, P. W.; JONES, L. **Princípios de química: questionando a vida moderna e o meio ambiente**. 3. ed. Porto Alegre: Bookman, 2006.

BERTHELON, C. *et al.* Do zopiclone, zolpidem and flunitrazepam have residual effects on simulated task of collision anticipation. **Journal of Psychopharmacology**. London, v. 17, n. 3, p. 324-331, 2003.

BISHOP, S.C.; LERCH, M.; MCCORD, B.R. Micellar electrokinetic chromatographic screening method for common sexual assault drugs administered in beverages. **Forensic Science International**. Estados Unidos, v. 141, p. 7-15, abr., 2004.

CHEN, Y.; HU, A. Simultaneous determination of trace benzodiazepines from drinks by using direct electrospray probe/mass spectrometry. **Forensic Science International**. Hualien, v. 10, p. 79-88, jul., 1999.

CLARKE, E.G.C. **Clarke's Isolation and Identification of Drugs**. 2. ed. The Pharmaceutical Press: London, 1986.

COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. **Fundamentos de cromatografia**. Campinas: Unicamp, 2007. 451 p.

DEGANI, A. L. G.; CASS, Q. B.; VIEIRA, P.C. Cromatografia, um breve ensaio. **Química Nova na Escola Cromatografia**, n. 7, 1998.

DODERMAN, A. M; LIDBERG, L. El abuso de flunitrazepam (Rohypnol) em combinacion com alcohol provoca violencia premeditada grave em varones jóvenes delincuentes. **Revista de Toxicomanías**. Barcelona, v. 28, p. 28-42, 2001.

DRUG BANK. **OPEN DATA DRUG & DRUG TARGET DATABASE**. Disponível em: <<http://www.drugbank.ca>> Acesso em: 15 julho 2013.

GADELHA, Julia de Abreu; VASCONCELOS, Auriana Serra; SANTIAGO, Vívian Romero; JUNIOR, Wanderley Pinheiro de Holanda; MOREIRA, Breno Alves Auad; SOARES, Janete Eliza de Sá; CARVALHO, Teresa Maria de Jesus Ponte. Desenvolvimento de métodos cromatográficos qualitativos para identificação de benzodiazepínicos. **RevInter Revista Intertox de Toxicologia, Risco Ambiental e Sociedade**, v. 7, n. 3, p. 25-49, out. 2014.

ENCYCLOPEDIA OD DRUGS. **BENZODIAZEPINES**. Disponível em: <http://www.drug-encyclopedia.eu/DW_EN/benzodiazepines.shtml> Acesso em: 15 maio 2013.

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

GOODMAN, L. S.; GILMANN, A. G. **As bases farmacológicas da terapêutica**. 11^a ed. Rio de Janeiro: McGraw Hill, 2006.

HAGE, D. S.; CARR, J. D. **Analytical chemistry and quantitative analysis**. 1. ed. New Jersey: Pearson Education, 2011.

KASSAB, N. M.; LANGUE, L. G. R. **Desenvolvimento e validação de métodos analíticos por CLAE para determinação de midazolam em formulações farmacêuticas de uso humano e veterinário**. 2009. Iniciação Científica - Departamento de Farmácia-Bioquímica, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Mato Grosso do Sul, 2009.

LAVIE, E. *et al.* Benzodiazepine use among opiate-dependent subjects in buprenorphine maintenance treatment: correlates of use, abuse and dependence. **Drug and Alcohol Dependence**. Bordeaux, v. 99, p. 338-344, 2009.

MELITO, A. L. Metodologia para identificação cromatográfica de aldicarb em sangue de cães e gatos intoxicados. 64 f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2004.

MENEZES, M.C.; VASCONCELOS, A.S.; SOARES, J. E.S.; HOLANDA JUNIOR, W.P.; CARVALHO, T.M.J.P. Utilização de métodos analíticos na toxicologia forense para identificação de carbamatos presentes no chumbinho. **RevInter Revista Intertox de Toxicologia, Risco Ambiental e Sociedade**, v. 5, n. 3, p. 28-41, 2012.

MORAES, E. C. F.; SZNELWAR, R. B.; FERNICOLA, N. A. G. **Manual de Toxicologia Analítica**. São Paulo: Livraria Roca, 1991. 229 p.

MOREAU, R. L. M.; SIQUEIRA, M. E. P. B. **Toxicologia Analítica**. 1^a Ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.

GADELHA, Julia de Abreu; VASCONCELOS, Auriana Serra; SANTIAGO, Vívian Romero; JUNIOR, Wanderley Pinheiro de Holanda; MOREIRA, Breno Alves Auad; SOARES, Janete Eliza de Sá; CARVALHO, Teresa Maria de Jesus Ponte. Desenvolvimento de métodos cromatográficos qualitativos para identificação de benzodiazepínicos. **RevInter Revista Intertox de Toxicologia, Risco Ambiental e Sociedade**, v. 7, n. 3, p. 25-49, out. 2014.

OGA, S.; CAMARGO, M. M. A.; BATISTUZZO, J. A. **Fundamentos de toxicologia**. 3. ed. São Paulo: Atheneu, 2008.

PERES, T. B. Noções básicas de cromatografia. **Biológico**. São Paulo, v. 64, n. 2, p. 227-229, 2002.

POLÍCIA CIVIL DO ESTADO DE RONDÔNIA. CACOAL – **PC apreende doces com clonazepam**. Rondônia, abr., 2013. Disponível em: <<http://www.pc.ro.gov.br/destaque/cacoal-pc-apreende-doces-com-clonazepam-20130405-2104.html>>. Acesso em: 25 maio 2013.

TONHI, E. *et al.* Fases estacionárias para cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa (CLAE-FR) baseadas em superfícies de óxidos inorgânicos funcionalizados. **Química Nova**. São Paulo, v. 25, n. 4, p. 616-623, 2002.

XAVIER, F.G. *et al.* Cromatografia em camada delgada para o diagnóstico da intoxicação por aldicarb (“chumbinho”) em cães e gatos. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, São Paulo, v. 59, n. 5, p.1231-1235, 2007.