

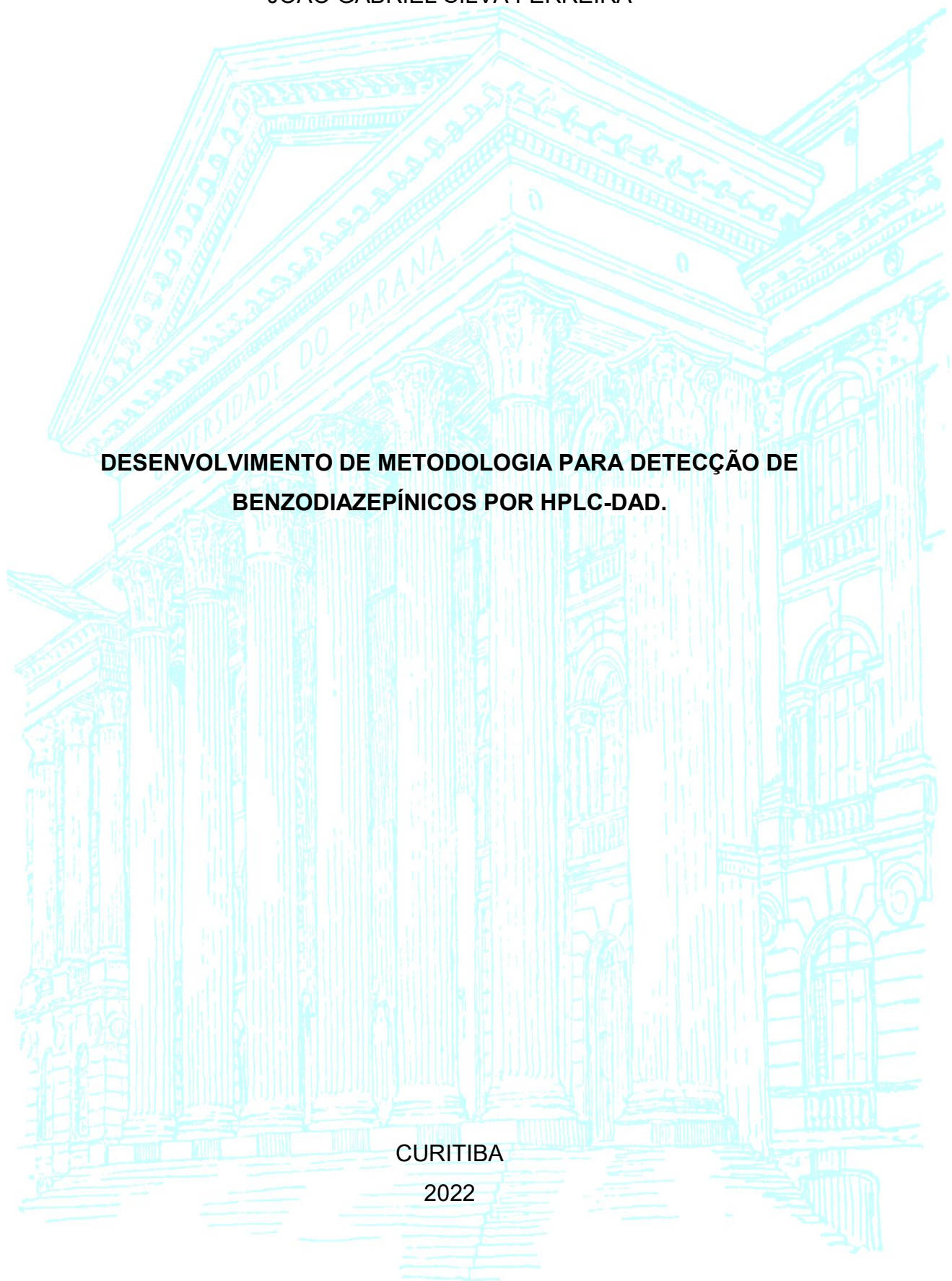
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

JOÃO GABRIEL SILVA FERREIRA

**DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIA PARA DETECÇÃO DE
BENZODIAZEPÍNICOS POR HPLC-DAD.**

CURITIBA

2022



JOÃO GABRIEL SILVA FERREIRA

**DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIA PARA DETECÇÃO DE
BENZODIAZEPÍNICOS POR HPLC-DAD.**

Monografia apresentada ao Curso de Farmácia da Universidade Federal do Paraná como requisito parcial à obtenção do grau de Bacharel em Farmácia.

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Wagner

CURITIBA

2022

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais, Solange da Silva e Danilo Ozores Ferreira pelo apoio incondicional e todos os sacrifícios que me fizeram chegar aonde estou, sem vocês e suas infinitas lições eu não teria a oportunidade de abraçar o mundo e trilhar o caminho em direção aos meus sonhos.

À minha irmã Ana Clara Silva Ferreira por todo o apoio, que mesmo com nossas birras de irmãos nunca deixou de estar lá por mim mesmo nos piores momentos.

Ao meu orientador Professor Dr^o Ricardo Wagner por me guiar, auxiliar e mostrar o caminho perante este desafio.

Aos meus amigos, que estão comigo desde o começo dessa jornada: Luan, Bruna, Tais, Thales, Wellington, Renata, Fernanda, Rafael e Paola. Obrigado por terem sido meu alicerce nos dias ruins e minha luz nos dias bons. Chegamos lá pessoal.

À Universidade Federal do Paraná por ter sido minha casa e minha vida nos últimos anos, levarei para sempre as memórias que aqui criei e cultivei.

Ao universo pela vida e oportunidade de crescer, evoluir e aprender.

E por fim, a todos que me auxiliaram direta ou indiretamente com a elaboração deste projeto.

EPÍGRAFE

“Como é bom ter por que se orgulhar
A vida pode passar, não estou sozinho
Eu sei se tiver fé eu volto até a sonhar”

Charlie Brown Jr.

RESUMO

Este trabalho objetivou a elaboração de uma metodologia reprodutível e eficiente para a identificação de benzodiazepínicos de forma rotineira, ao mesmo tempo em que se procurou demonstrar a possibilidade de adaptação de métodos já publicados para a realidade dos laboratórios. A própria característica dos medicamentos benzodiazepínicos de estimularem o surgimento de dependência, tolerância e abstinência em tempos relativamente curtos de uso somado à sua conhecida utilização como drogas facilitadoras de crimes, torna imprescindível a elaboração de novas formas de análise usando instrumentação existente, sendo a cromatografia líquida de alta eficiência uma das metodologias mais difundidas no mercado. Após busca em literatura científica de métodos já publicados, foram elaborados padrões com diversos benzodiazepínicos de estruturas diferentes, que então passaram por testes em condições selecionadas, sendo estas adaptadas de acordo com seu comportamento buscando otimizar a corrida. A segunda condição testada obteve melhor desempenho, sendo utilizada para elaboração de curvas de calibração para padrões de clordiazepóxido e bromazepam. O presente trabalho obteve êxito em seus objetivos, com passos futuros devendo priorizar a validação da metodologia e propor limites de identificação e quantificação.

Palavras-chave: Benzodiazepínicos; Cromatografia; Identificação; HPLC-DAD.

ABSTRACT

This work had as an objective the elaboration of a reproducible and efficient methodology for the identification of benzodiazepines in routine, at the same time assessing the possibility of adapting published methods for an array of laboratories' reality. The intrinsic characteristic that the benzodiazepines have in stimulating dependence, tolerance and withdrawal symptoms in relatively short periods of treatment, in association of its uses as crime-facilitating drugs, makes the elaboration of new assay methods utilizing already existent instrumentation essential, with high pressure liquid chromatography being one of the most widespread methodologies in the market. After thorough search in scientific databases for already published methods, standard solutions of a selection of benzodiazepines in various structures were prepared, being submitted to the selected conditions, these being adapted according to its behavior in hopes of method optimization. The second tested condition had the better outcome, being used in the elaboration of calibration curves for Bromazepam and Chlordiazepoxide standards. The present work had success in reaching its objectives, with future steps needing to prioritize method validation and identification and quantification limits.

Keywords: Benzodiazepines; Chromatography; Identification; HPLC-DAD.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1	- Estrutura do receptor GABA-A e seus sítios de ligação.....	21
FIGURA 2	- Efeito de limiar no uso de benzodiazepínicos.....	23
FIGURA 3	- Biotransformação do diazepam e bromazepam.....	24
FIGURA 4	- Esquema básico de um sistema CLAE.....	30
FIGURA 5	- Padrões de 1mg/mL.....	33
FIGURA 6	- Planejamento do ensaio de curva de calibração.....	36
FIGURA 7	- Resultado das condições de corrida número 1.....	38
FIGURA 8	- Resultado das condições de corrida número 2.....	39
FIGURA 9	- Cromatograma da corrida de pool clordiazepóxido, diazepam e bromazepam.....	41
FIGURA 10	- Curva de calibração do clordiazepóxido.....	42
FIGURA 11	- Curva de calibração do bromazepam.....	43
FIGURA 12	- Curva de calibração do pool de clordiazepóxido + bromazepam	44

LISTA DE TABELAS

TABELA 1	- Condições de corrida 1.....	35
TABELA 2	- Condições de corrida 2.....	36
TABELA 3	- Concentração dos pontos da curva de calibração.....	37
TABELA 4	- Tempos de retenção da corrida 2.....	40

LISTA DE ABREVIATURAS

BZD	-	Benzodiazepínico
CLAE	-	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
DAD	-	Detector de Arranjo de Diodo
GABA	-	Ácido Gama-Aminobutírico
HPLC	-	High Performance Liquid Chromatography

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
2 OBJETIVOS	13
2.1 OBJETIVO GERAL	13
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	13
3 REVISÃO DE LITERATURA	14
3.1 HISTÓRICO DOS BENZODIAZEPÍNICOS	14
3.2 USO TERAPÊUTICO	16
3.2.1 Ansiolíticos	16
3.2.2 Anticonvulsivantes	17
3.2.3 Hipnóticos	18
3.2.4 Outros usos	19
3.3 FARMACODINÂMICA	20
3.4 FARMACOCINÉTICA	22
3.5 ASPECTOS TOXICOLÓGICOS	25
3.5.1 Efeitos adversos e intoxicação	25
3.5.2 Tolerância	26
3.5.3 Dependência e abstinência	27
3.6 OS BENZODIAZEPÍNICOS COMO FERRAMENTAS CRIMINOSAS	28
3.7 CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA	29
4 METODOLOGIA	32
4.1 Seleção e preparo de padrões	32
4.2 Busca em literatura	33
4.3 Testagem de condições cromatográficas	33
4.3.1 Elaboração das curvas de calibração	36
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	37
5.1 Testagem das condições cromatográficas	37
5.3 Curvas de calibração	41
5.3.1 Curva do Clordiazepóxido	41
5.3.2 Curva do Bromazepam	42
5.3.3 Curva Clordiazepóxido + Bromazepam	43
6 CONCLUSÃO	45
REFERÊNCIAS	47

1 INTRODUÇÃO

É uma afirmação comum a de que casos de ansiedade e outros quadros psiquiátricos relacionados ao medo e apreensão debilitantes estejam em curvas crescentes no século XXI, devido a fatores como a globalização, bastidores políticos, pandemias e exigências profissionais aceleradas. Por mais que não se possa fazer uma afirmação quanto a essa questão devido à falta de estudos comparativos com outros períodos históricos, é verdade que cada vez mais pessoas são diagnosticadas e buscam tratamento (BANDELOW; MICHAELIS, 2015).

As exigências da sociedade por um alívio psicológico permearam a pesquisa e desenvolvimento de diversos fármacos que conseguissem produzir um efeito calmante positivo. Os problemas surgem, no entanto, com a constatação de que determinadas drogas causam um risco significativo à saúde do paciente, sendo um dos casos mais bem estudados o uso de fármacos da classe dos barbitúricos, cuja dose letal é significativamente próxima da dose terapêutica (CORREIA; ALVES, 2002).

Neste contexto de busca por uma medicação “milagrosa” surge, na década de 60, o primeiro composto benzodiazepínico, batizado de clordiazepóxido e com ele abrem-se as portas para o desenvolvimento de novas drogas com o mesmo núcleo (BERNIK, 1999).

São diversos os fatores que tornaram os benzodiazepínicos (BZDs) drogas tão amadas. Os benzodiazepínicos são uma classe de fármacos extremamente versáteis em seu uso, que incluem o tratamento e alívio de Transtorno de Ansiedade Generalizada, Síndrome do Pânico e de quadros convulsivos, bem como alívio de síndrome de abstinência do álcool (EDINOFF *et al.*, 2021). Essa versatilidade se apresenta também em seus diferentes tempos de ação de acordo com a estrutura do fármaco, com a concentração sanguínea máxima sendo obtida em torno de 40 minutos para o medazepam e 2,5 horas para o clonazepam, por exemplo (OGA; CAMARGO; BATISTUZZO, 2008). Além disso, são compostos consideravelmente seguros em seu uso comparados aos seus antecessores barbitúricos, com os quadros de paradas respiratórias por depressão do sistema

nervoso central sendo bem mais raros e permitindo uma margem de dose mais confortável para o paciente (OGA; CAMARGO; BATTISTUZZO, 2008).

No Brasil, há um consumo intenso desta classe de medicamentos. Estudos demonstram que o uso de BZDs chega a 50% dos entrevistados no estado de São Paulo e até mesmo em 90% em estados como Minas Gerais, além de serem mais comuns em pacientes idosos (PASSAGLI; VALADÃO, 2018). Outro fator importante que Passagli e Valadão (2018) apresentam é o de que o consumo de benzodiazepínicos parece dobrar a cada 5 anos devido a fatores como pressão midiática, prescrição inadequada e falta de orientação profissional.

Apesar desta visão otimista do mercado e da classe médica, logo começaram a surgir problemas com a constatação de que o uso prolongado dessas drogas era capaz de desencadear um quadro de dependência e síndrome de abstinência com a sua retirada repentina. Quando isso é somado com o efeito prazeroso que os calmantes são capazes de proporcionar, fomentando seu uso recreativo prolongado, temos um problema de saúde pública significativo. Por exemplo, dados publicados pelo Departamento de Saúde e Serviços Humanos dos EUA em seu folheto “Drug Abuse Warning Network” (Rede de alertas para abuso de drogas, em tradução livre) demonstram que 28,7 % das visitas ao departamento de emergências em hospitais por casos de uso não-médico de fármacos são ocasionadas por benzodiazepínicos, sendo um dos maiores contribuintes o alprazolam (comercializado como *Xanax*® naquele país) (Health and Human Services Department, 2022).

Ainda em relação ao uso não farmacológico dos BZDs há um outro risco associado à esfera criminal. Isto porque algumas destas substâncias, em especial o flunitrazepam, são caracteristicamente utilizadas como ferramentas para dopar indivíduos, em sua grande maioria do sexo feminino, no que ficou popularmente conhecido com a alcunha de “Golpe do Boa Noite Cinderela”, as tornando mais propensas a sofrer agressões sexuais devido à intensa sedação, principalmente durante encontros ou mesmo com conhecidos (ANGLIN; SPEARS; HUTSON, 1997).

Com todo o impacto dos BZDs na sociedade, fez-se necessárias avaliações qualitativas e quantitativas de seu uso e aplicações. Um dos métodos mais sensíveis e utilizados é a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE ou sua sigla em inglês HPLC). Esse aparato consiste na separação por variações de afinidade de um analito pela fase móvel e fase estacionária de acordo com

condições específicas de temperatura, pressão e tempo de corrida (COLLINS; BRAGA; BONATTO, 2006). O uso da CLAE é pautado principalmente no fato de ser uma tecnologia com padrões de sensibilidade, eficiência, resolução e tempo de análise revolucionárias (COLLINS; BRAGA; BONATTO, 2006).

Diversos protocolos foram propostos para a análise cromatográfica de amostras de benzodiazepínicos. No entanto, muitos fazem uso de condições mais refinadas ou equipamentos com alto poder analítico, diminuindo assim sua aplicabilidade em condições menos oportunas. Torna-se evidente então a necessidade de expandir este leque de variáveis cromatográficas, sendo de suma importância a avaliação de novas metodologias levando como base a adaptação de condições pré-existentes e anteriormente estudadas.

Percebe-se a necessidade de se desenvolverem métodos analíticos precisos que possam ser capazes de detectar a presença de benzodiazepínicos em pacientes intoxicados ou mesmo em vítimas de abuso sexual, com os resultados podendo ser utilizados na sequência para nortear protocolos de tratamento e aumentar a robustez de provas criminais em inquéritos policiais.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Este trabalho tem como objetivo desenvolver e propor uma metodologia para identificação de benzodiazepínicos pelo método de cromatografia líquida de alta eficiência, tendo como base estudos previamente publicados e levando em consideração a realidade da estrutura física utilizada.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Busca e seleção em literatura de condições cromatográficas normalmente utilizadas para identificação de benzodiazepínicos.
- Adaptação e testagem de condições selecionadas.
- Elaboração de curvas de calibração para os padrões escolhidos.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 HISTÓRICO DOS BENZODIAZEPÍNICOS

A responsabilidade pela criação da classe dos benzodiazepínicos é atribuída ao químico Leo Sternbach em meados da década de 1950, onde trabalhava como pesquisador nos laboratórios da farmacêutica Hoffman La Roche (WICK, 2013).

A busca por um tranquilizante eficaz, capaz de induzir uma alta resposta depressora no sistema nervoso central, pautou as pesquisas que culminaram na descoberta do primeiro benzodiazepínico registrado, o clordiazepóxido, cujas funções sedativas, ansiolíticas, hipnóticas e anticonvulsivantes eram atrativas quando combinadas ao fato de demonstrarem baixa toxicidade e, na época, aparentarem pouco potencial de dependência (MEHDI, 2012).

Em primeiras tentativas, o clordiazepóxido recém sintetizado foi testado em relação à atividade antipsicótica em pacientes sofrendo de quadros esquizofrênicos, sendo constatado que os efeitos em relação a essa indicação eram nulos. No entanto, notou-se uma elevada atividade ansiolítica que pautou o uso dos benzodiazepínicos nas próximas décadas (BERNIK, 1999).

Com um futuro promissor, a Hoffman LaRoche registra e inicia a comercialização do clordiazepóxido sob o nome *Librium*[®], 5 anos após sua descoberta em 1960. Ainda neste começo da década de 1960 a mesma empresa, buscando outras moléculas com anéis benzodiazepínicos e efeitos semelhantes, produz e inicia a comercialização do diazepam, registrado então como *Valium*[®] (MEHDI, 2012).

Os mecanismos de ação demoraram para serem elucidados completamente, sendo que nos primeiros 15 anos não haviam quaisquer certezas de como realmente as drogas modulavam o sistema nervoso central, com evidências sugerindo impacto de transmissões serotoninérgicas, dopaminérgicas, colinérgicas e noradrenérgicas no efeito, dificultando a proposição de uma teoria robusta (BERNIK, 1999). Hoje se sabe que estas drogas agem como moduladores alostéricos do receptor GABA-a, presente em canais de cloreto (OGA; CAMARGO; BATTISTUZZO, 2008).

É importante frisar o caráter revolucionário destas substâncias na época, tendo em vista que seus efeitos positivos não eram contrabalanceados por efeitos

colaterais graves como ocorria com seus antecessores, os barbitúricos. Assim, era possível expandir seu uso para diversas situações, o que inflamou o mercado e culminou em um crescente intenso do número de prescrições destas drogas (BERNIK, 1999). Na verdade, estas vendas e a animação mercadológica foram tão intensas que no ano de 1977 os benzodiazepínicos eram considerados a classe de fármacos mais vendida no mundo inteiro (BALON *et al.*, 2020).

O impacto da dispensação exacerbada dos benzodiazepínicos deu origem a um período de mau uso das substâncias e, conforme as prescrições aumentavam e novos estudos foram realizados, percebeu-se o potencial que os BZDs possuíam em causar dependência e síndromes de abstinência em retiradas súbitas após uso prolongado (BERNIK, 1999). Na década de 1980 essas preocupações passaram a ser externalizadas e a imagem de drogas milagrosas teve uma ruptura, com a marginalização e o medo por parte da sociedade se tornando cada vez mais óbvios (WICK, 2013).

A revolução dos benzodiazepínicos começava então a passar por uma nova fase, onde as autoridades reguladoras começaram a publicar protocolos de prescrição visando diminuir os riscos associados ao uso destas drogas (BERNIK, 1999).

Um dos exemplos mais bem registrados ocorreu no Reino Unido em 1985, onde foi publicada uma lista limitada de dispensação intermediada pelo National Health System (NHS). Como resultado foi possível observar em primeira mão a diminuição gradual de prescrições no ano de 1986, ao passo que no resto do mundo as vendas aumentaram tendo em vista a regulação precária da dispensação destas drogas (WOODS; KATZ; WINGER, 1992). É importante observar, no entanto, que o declínio de vendas se iniciou antes deste período, mais precisamente entre 1981 e 1984, possivelmente devido à má reputação que os BZDs passaram a carregar (WOODS; KATZ; WINGER, 1992).

Atualmente as diretrizes preconizam um uso mais agudo dos benzodiazepínicos, como publicado pelo comitê de segurança de medicamentos americano em 1988 em relação à indicação para ansiedade e insônia, recomendando o uso apenas para “alívio a curto prazo (3 a 4 semanas) e apenas se a condição for severa, debilitante e que sujeite o indivíduo à um extremo sofrimento” (MEHDI, 2012). No Brasil este controle foi dado pela Portaria 344/1998 e suas atualizações publicadas periodicamente pela Agência de Vigilância Sanitária

(ANVISA), que classifica os benzodiazepínicos como substâncias capazes de gerar dependência física ou psíquica e, portanto, sendo agregados no grupo B1 com retenção de receita azul (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 1998).

No geral pode-se afirmar que as problemáticas relacionadas à dependência e abuso, unido com o advento de drogas mais seletivas como antidepressivos, para o tratamento da ansiedade, relegou atualmente os benzodiazepínicos a usos geralmente associados a distúrbios de sono (FIORELLI; ASSINI, 2017).

3.2 USO TERAPÊUTICO

Os benzodiazepínicos são conhecidos por possuírem um amplo espectro de efeitos farmacológicos, sendo que todos os representantes desta classe são capazes de exercer estes efeitos, variando apenas no grau de intensidade de acordo com sua estrutura molecular (OGA; CAMARGO; BATTISTUZZO, 2008).

A seguir serão discutidas as diversas ações terapêuticas das quais se há um registro de eficácia.

3.2.1 Ansiolíticos

Os benzodiazepínicos foram a primeira classe de fármacos comprovadamente eficaz no tratamento clínico de ansiedade generalizada, apresentando uma melhora nos sinais clínicos da doença e assim sendo utilizados amplamente pela medicina moderna. Uma revisão sistemática com meta-análise publicada por Slee e colaboradores (2019) demonstrou que o lorazepam, em especial, possui uma das melhores taxas de eficácia no tratamento. Seu uso, no entanto, está pautado por uma aceitabilidade mais baixa do que para outras drogas como a pregabalina, sendo também controverso o uso de BZDs no geral em períodos longos de tempo devido ao potencial de dependência e abuso (SLEE *et al.*, 2019).

Determinadas recomendações foram publicadas em relação ao uso de benzodiazepínicos específicos no tratamento de casos de ansiedade. Por exemplo, podemos avaliar as publicações britânicas para o diazepam, cujo uso está pautado nas condições de que a doença esteja em uma fase severa ou debilitante e sendo administrado em um período de tempo limitado de no máximo 4 semanas. Além

disso, recomenda que a dose seja a menor possível capaz de exercer o efeito terapêutico desejado (LADER, 1999).

Esses fatos descrevem uma característica importante na terapêutica da ansiedade por benzodiazepínicos: o fato de ser geralmente um tratamento curto. Isto ocorre devido à característica desta classe agir majoritariamente no componente somático da doença, com seus efeitos positivos no geral surgindo nas primeiras 6 semanas do esquema terapêutico, sendo este período o bastante para pelo menos metade dos pacientes (ANDREATINI, BOERNGEN-LACERDA e FILHO, 2001).

Alguns dos representantes benzodiazepínicos utilizados pelo seu efeito ansiolítico incluem: Clordiazepóxido, lorazepam, alprazolam, flurazepam e o diazepam. (CORREIA e ALVES, 2002; PASSAGLI e VALADÃO, 2018).

3.2.2 Anticonvulsivantes

Benzodiazepínicos são as drogas de primeira escolha no tratamento de diversas mazelas envolvendo convulsões, mais especificamente em convulsões após anóxia cerebral e no *status epilepticus* (RISS *et al.*, 2008). Isto se deve principalmente ao fato de apresentarem rápido início de ação, baixa toxicidade e alta eficácia, com poucas drogas conseguindo se equiparar a estes efeitos (RISS *et al.*, 2008).

O *status epilepticus* é caracterizado por uma convulsão prolongada durando mais de 10 minutos ou por uma série consecutiva de convulsões sem retorno a um estado basal, sendo também uma emergência neurológica comum (OCHOA; KILGO, 2016).

Características farmacocinéticas estão relacionadas com a escolha do medicamento dentro dos benzodiazepínicos. Por exemplo, observa-se que o diazepam possui um período de ação de 15 a 30 minutos, com crises de convulsão prolongadas podem culminar em uma recaída epiléptica após este período em metade dos pacientes. Em comparação, o lorazepam consegue manter este efeito de controle das convulsões por um período de 1 a 2 dias, com baixa recorrência das crises (ANDERSON, 2010).

Geralmente as vias de administração destas drogas para crises convulsivas varia das outras indicações, tanto pelo fato de ser um uso de caráter emergencial,

necessitando de rápido início de ação quanto pelo estado debilitado do paciente que impede o consumo oral efetivo. Assim, as vias intravenosa e retal se tornam mais proeminentes, com estudos em relação ao uso sublingual e intranasal se mostrando promissores também neste contexto (ANDERSON, 2010; OCHOA; KILGO 2016).

Alguns dos benzodiazepínicos utilizados no tratamento incluem (OCHOA; KILGO 2016):

- a) **CLOBAZAM:** utilizado devido à sua maior afinidade pela subunidade 2-alfa do receptor GABA-A, culminando aparentemente em maior efeito antiepiléptico em detrimento do efeito sedativo.
- b) **DIAZEPAM E LORAZEPAM:** Utilizados em condições agudas de ataque convulsivo.
- c) **CLONAZEPAM:** Possui efeito mais duradouro devido ao seu tempo de meia-vida elevado, de aproximadamente 30 a 40 horas, sendo aprovado em países como os EUA para síndromes mioclônicas e atônicas.

De todo modo, apesar de serem tratamentos de escolha em emergências epiléticas, decai novamente o estigma dos benzodiazepínicos como terapia: sua capacidade de induzir dependência e síndromes de abstinência. Portanto, seu uso profilático para condições crônicas como epilepsia refratária é controverso, sendo indicado no geral apenas para terminar o estado convulsivo (OCHOA; KILGO 2016).

3.2.3 Hipnóticos

O quadro de insônia remete a um sintoma caracterizado por uma incapacidade de iniciar o estado de sono ou de mantê-lo, apresentando também baixa qualidade e duração bem como interrupção abrupta deste estado (CORREIA; ALVES, 2002). Pode ser classificada em:

- a) Transitória: de 3 a 5 dias, com causalidade definida como estresses passageiros,
- b) Média duração: até 3 semanas de duração, envolve causas mais traumáticas como luto ou perdas significativas,
- c) Crônica: dura mais de 3 semanas, geralmente envolvendo outras condições crônicas como depressão ou hábitos não-sadios como abuso de substâncias.

Levando em conta essa condição, são utilizados benzodiazepínicos como hipnóticos bem estabelecidos para manejo do estado de sono. Pode-se considerar que essas drogas tenham efeito de facilitador do sono tanto por sua ação farmacológica direta quanto pelo alívio de sintomas de ansiedade que possam estar ocasionando a insônia (CORREIA; ALVES, 2002).

O tratamento com benzodiazepínicos deve levar em conta dois fatores proeminentemente: Indução rápida do estado de sono, relacionado com absorção veloz e culminando em ação rápida e na interrupção do efeito após o período de sono ideal, pois efeitos duradouros prejudicam a performance diária do paciente, assim exigindo um tempo de meia-vida seletivo na escolha da farmacoterapia (GREENBLATT *et al.*, 1982).

Os hipnóticos benzodiazepínicos, bem como outros fármacos mais recentes como o Zolpidem, são capazes de diminuir o tempo para a fase 2 do sono REM, o número de vezes em que o paciente desperta durante a noite e o tempo de vigília após o início do sono. Deve-se atentar, porém, ao fato de que certos fármacos como o midazolam apenas melhoram o sono por curtos períodos, em torno de 2 horas, tendo usos limitados e podendo gerar incômodo nos pacientes (MONTI, 2000).

As adversidades surgem, no entanto, quando observamos determinadas características dos BZDs, principalmente em sua habilidade de diminuir o sono de ondas lentas e o sono REM. Além disso, fármacos como o triazolam, midazolam e flunitrazepam, com meia vida curta ou intermediária, podem dar lugar a uma reincidência da insônia após o término do período de tratamento. Aliado com o fato de que o uso de benzodiazepínicos é recomendado apenas por período de tempo limitado, temos uma situação que exige grande discernimento do prescritor (MONTI, 2000).

3.2.4 Outros usos

Além de seus usos clássicos e mais ortodoxos que incluem indução do sono, tratamento da ansiedade e como anticonvulsivantes, os benzodiazepínicos possuem usos alternativos de acordo com sua ação depressora do SNC.

Uma utilidade desses fármacos está na inibição aguda de mioespasmos, sendo útil para tratamentos de injúria muscular, com o efeito sinérgico de também agir como sedativos potentes (CASHIN *et al.*, 2021). O fármaco mais comumente

empregado nesta situação é o diazepam, devido ao conhecimento satisfatório de seus efeitos colaterais e à facilidade de dosagem. Além deste, é bem estabelecido que o tetrazepam tem o maior efeito antiespasmódico de toda a classe dos BZDs em relação ao seu efeito sedativo (PEREIRA; SANTOS; SANTOS, 2003).

O protocolo de tratamento com o diazepam nestas condições é descrito da seguinte maneira:

(...) inicia-se o tratamento com doses baixas – 0,1 a 0,2mg/kg/dia –, divididas em três a quatro doses. Todavia, é possível iniciar-se o tratamento mais levemente, através de uma dose única noturna e incrementos progressivos, dados em função da tolerância; sendo boa, incrementa-se a dose à razão de 0,1 mg/kg a cada quatro a cinco dias, até chegar a uma dose de manutenção de 0,2 a 0,8 mg/kg/dia. Não se obtendo resultados satisfatórios, deve-se aumentar a dose de maneira mais espaçada. (PEREIRA; SANTOS; SANTOS, 2003, p.56).

Os benzodiazepínicos são também reconhecidamente utilizados nos tratamentos de abstinência do álcool em pacientes alcoólatras. Os objetivos deste tratamento devem incluir principalmente o alívio do sofrimento e de condições físicas como convulsões (LEJOYEUX; SOLOMON; ADES, 1998).

Benzodiazepínicos são considerados fármacos de escolha nestas condições por apresentarem características desejáveis como prevenção de *delirium tremens*, diminuição na agitação e incidência de ataques convulsivos e boa margem de segurança quando utilizados em curto prazo (LEJOYEUX; SOLOMON; ADES, 1998). Todas as variantes dentro da classe dos BZDs aparentam ser igualmente eficazes no manejo da síndrome de abstinência por álcool, sendo a escolha feita de acordo com as características farmacocinéticas desejadas (SACHDEVA; CHOUDHARY; CHANDRA, 2015).

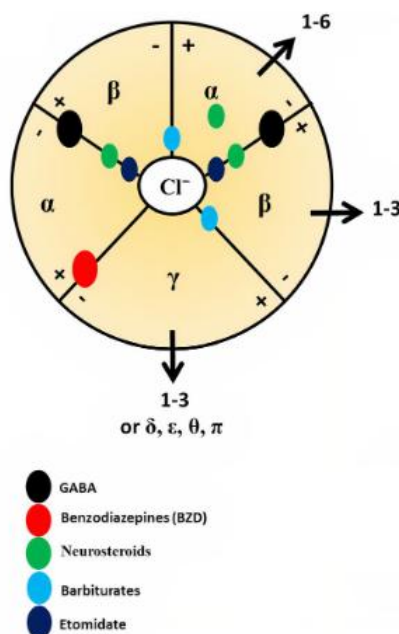
De forma geral, benzodiazepínicos de curta ação como o lorazepam devem ser utilizados em condições específicas como problemas hepáticos e em pacientes sob risco médico em condições de sedação prolongada como idosos. Já benzodiazepínicos de ação longa como o diazepam e o clordiazepóxido são mais comumente utilizados devido ao seu menor potencial de gerar sintomas de rebote como convulsões (SACHDEVA; CHOUDHARY; CHANDRA, 2015).

3.3 FARMACODINÂMICA

Os benzodiazepínicos exercem sua função através da modulação alostérica dos receptores GABA-A. Existem outras formas do receptor GABA, denominados GABA-B e GABA-C, porém estes não têm papel relevante no efeito mediado pelos BZDs estudados durante o desenvolvimento deste trabalho (GRIFFIN III *et al.*, 2013).

Os receptores GABA-A são canais iônicos compostos de 5 glicoproteínas que compõem subunidades em sua estrutura, sendo estas: 2 subunidades alfa, duas subunidades beta e uma subunidade gama (FIGURA 1). Sua variabilidade ainda é potencializada pelo fato de que cada um destes módulos possui isoformas diferentes, aumentando ou diminuindo a afinidade com os medicamentos benzodiazepínicos (GRIFFIN III *et al.*, 2013).

FIGURA 1: Estrutura do receptor GABA - A e seus sítios de ligação



FONTE: adaptado de Ghit *et al.* (2021)

Em cada receptor GABA-A existe um único sítio de ligação aos BZDs cuja localização se encontra entre a subunidade alfa e a subunidade gama. A presença de resíduos de histidina nas isoformas 1, 2, 3 e 5 da subunidade alfa melhora a ligação com os BZDs, tornando estas muito mais relevantes para a prospecção farmacológica dos benzodiazepínicos. De modo antagônico, as isoformas 4 e 6 desta mesma subunidade possuem resíduos de arginina no lugar de histidina,

fazendo com que a ligação seja prejudicada (GOETZ et al., 2009; GRIFFIN III *et al.*, 2013).

A variabilidade de efeitos dos benzodiazepínicos também pode ser explicada pelas diferentes isoformas das subunidades constituintes do receptor GABA-A. Por exemplo, a subunidade Alfa-1 é responsável por parte dos efeitos anticonvulsivantes, pela amnésia anterógrada e pelo efeito hipnótico. Esta forma do receptor é a mais comum dentre todas com uma incidência de 60% do total de receptores GABA-A, estando presente em grandes volumes no tálamo, córtex e cerebelo. Já a já a isoforma alfa-2 é mais ligada aos efeitos ansiolíticos e miorrelaxantes, com presença marcante no sistema límbico e neurônios motores. Com esta perspectiva em mente, pode-se avaliar o porquê de a amnésia ser um efeito colateral relevante destas drogas, por exemplo (GRIFFIN III *et al.* 2013).

É importante citar aqui que diversos estudos foram realizados com o intuito de entender a presença de sítios de ligação tão específicos dentro do organismo humano para substâncias consideradas exógenas, como os BZDs. Hoje se entende que estes sítios foram originalmente preparados para abrigar moléculas endógenas com efeitos semelhantes aos benzodiazepínicos, sendo algumas destas a iosina, hipoxantina e até mesmo o tromboxano (CORREIA; ALVES, 2002).

O importante é que, ao ligarem-se neste ponto específico do receptor, os benzodiazepínicos geram uma mudança conformacional no próprio receptor através do deslocamento da proteína gabamodulina. Isto gera um aumento de afinidade entre o GABA-A e seu ligante natural, o Ácido gama-aminobutírico (GABA). O receptor GABA-A comporta dois sítios de ligação para o GABA, que quando fixado no receptor força a abertura do canal de cloreto gerando a hiperpolarização neuronal responsável por deprimir o sistema nervoso (CORREIA; ALVES, 2002).

3.4 FARMACOCINÉTICA

Como todo fármaco, atentar para as características cinéticas dos benzodiazepínicos é de suma importância na avaliação de sua eficácia e toxicidade. De forma geral, sabe-se que os benzodiazepínicos são completamente absorvidos por via oral (em um período de geralmente 1 a 3 horas), porém isto não significa que todos os medicamentos desta classe irão se comportar da mesma maneira. Por exemplo, é reconhecido que o diazepam possui uma biodisponibilidade de quase

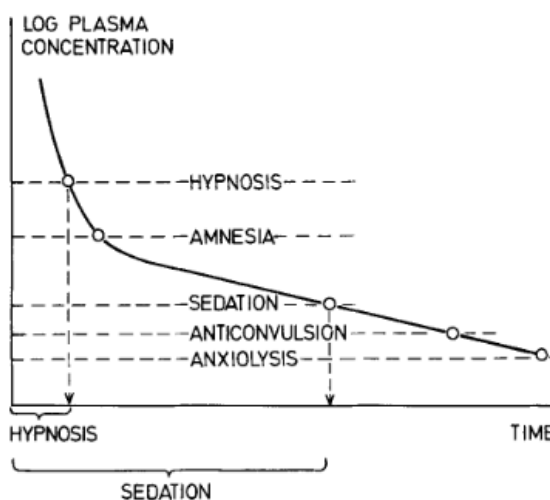
100%, sugerindo efeito de metabolismo de primeira passagem desprezível, ao contrário do midazolam que sofre deste fenômeno em taxas de até 72% da dose original absorvida (CORREIA; ALVES, 2002; NILSSON, 1991; PASSAGLI; VALADÃO, 2018).

A velocidade de absorção é um fator determinante no uso dos benzodiazepínicos na rotina médica. Isto ocorre pela ampla gama de efeitos associados à classe, fazendo com que seu uso seja pautado pelo efeito clínico desejado pelo prescritor. Assim, medicamentos que são absorvidos mais rapidamente como o diazepam têm mais valor no tratamento de quadros agudos de ansiedade ou como hipnóticos (GREENBLATT *et al.* 1981).

Outro ponto de atenção no uso dos benzodiazepínicos está no conceito de limiares. Esta característica diz respeito ao fato de que altas concentrações do fármaco são capazes de gerar efeitos hipnóticos mais intensos, ao passo que a decadência da concentração plasmática gera efeitos menores ao atingir determinados limiares. Efetivamente, ao almejar por um efeito de caráter mais intenso deve-se sempre ter em mente que efeitos de limiares mais baixos como o ansiolítico e o amnésico serão prolongados (NILSSON, 1991).

Este efeito pode ser observado de maneira mais didática na próxima imagem (FIGURA 2):

FIGURA 2 - Efeito de limiar do uso de benzodiazepínicos



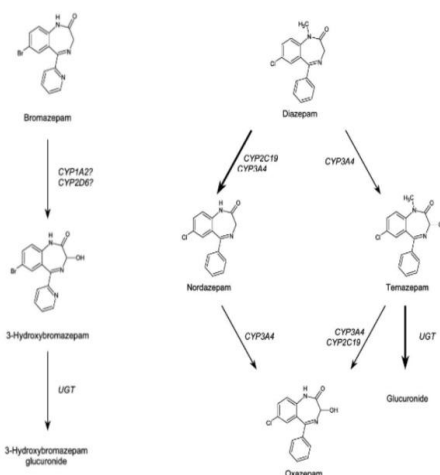
FONTE: NILSSON (1991).

Em relação à distribuição, nota-se que os benzodiazepínicos possuem uma forte ligação com as proteínas plasmáticas, sendo que esta ligação varia de 60 a 90% da droga absorvida dependendo do benzodiazepínico ingerido. Este processo de distribuição é creditado a uma difusão passiva, com variações sendo observadas em pacientes com fatores de vida que tenham resultado em aumento de tecido adiposo (GREENBLATT *et al.*, 1983; PASSAGLI; VALADÃO, 2018).

Uma característica marcante e também crítica na estratégia de escolha de um benzodiazepínico se encontra na sua capacidade de gerar metabólitos ativos no organismo após processamento enzimático. Assim, são capazes de manter seu efeito por um período muito prolongado, o que pode ser visto como uma adversidade ao estender efeitos colaterais sérios. Medicamentos como o diazepam, e clordiazepóxido estão inseridos nesta regra, enquanto outros como lorazepam e oxazepam não geram metabólitos com poder farmacológico (CORREIA; ALVES, 2002).

A biotransformação dos benzodiazepínicos ocorre principalmente por reações catalisadas pelo citocromo p450, como as enzimas CYP3A4 e CYP2C19, através de reações de N-desmetilação, oxidação e hidroxilação, sendo então conjugadas posteriormente com ácido glucurônico e eliminadas predominantemente na urina (FIGURA 3). Algumas destas drogas, no entanto, não passam pelo metabolismo de fase 1 produzido pelo citocromo p450, sendo conjugadas diretamente com ácido glucurônico como é o caso do lorazepam e oxazepam (PASSAGLI e VALADÃO, 2018; MANDRIOLI, MERCOLINI e RAGGI, 2008).

FIGURA 3 - Biotransformação do diazepam e bromazepam



FONTE: adaptado de MANDRIOLI, MERCOLINI e RAGGI (2008).

Levando em consideração os pontos anteriores, foi proposta uma classificação dos benzodiazepínicos de acordo com seu tempo de meia vida no organismo, variando entre BZDs de longa duração e de duração ultracurta (MANDRIOLI; MERCOLINI; RAGGI, 2008).

LONGA DURAÇÃO

Possuem uma meia vida no organismo de 24 horas ou mais, sendo a longa duração de seus efeitos resultado de metabólitos ativos ou da própria droga base. Alguns exemplos incluem o diazepam e o clordiazepóxido (GREENBLATT *et al.* 1981).

CURTA DURAÇÃO ou INTERMEDIÁRIA

O tempo de meia vida gira entre 5 a 24 horas no organismo. Geralmente estas drogas não possuem metabólitos ativos ou estes não são significativamente potentes. São incluídas em protocolos de tratamento com múltiplas doses diárias, porém retirada do organismo é mais rápida e com menos dificuldades. Representantes desta classe incluem o flunitrazepam e lorazepam (GREENBLATT *et al.* 1981).

ULTRACURTA DURAÇÃO

Com o tempo de meia vida inferior a 5 horas, estes benzodiazepínicos são usados como indutores hipnóticos ou agentes de sedação rápida. Incluem o triazolam e temazepam (GREENBLATT *et al.* 1981).

3.5 ASPECTOS TOXICOLÓGICOS

3.5.1 Efeitos adversos e intoxicação

Os benzodiazepínicos são essencialmente considerados drogas seguras, principalmente ao compararmos com seus predecessores, os barbitúricos. No entanto, não estão livres de apresentarem uma gama de efeitos adversos e potencialmente fatais com o abuso (PASSAGLI; VALADÃO, 2018).

Alguns efeitos adversos mais brandos descritos para os BZDs incluem sedação, fadiga, vertigens, letargia e discernimento comprometido. Estes sintomas costumam aparecer algumas horas depois ao uso, podendo em alguns casos surgir em até um dia após a ingestão. Efeitos adversos graves como ataxia, depressão respiratória, coma e morte não ocorrem normalmente em doses terapêuticas, sendo exclusivas de superdoses ou uso concomitante com outras drogas como o etanol e fenobarbital. (CORREIA e ALVES, 2002; PASSAGLI e VALADÃO, 2018).

Em idosos, a toxicidade de benzodiazepínicos pode ser amplificada por determinadas condições fisiológicas próprias do envelhecimento, como diminuição na quantidade de enzimas metabolizadoras, metabolismo cerebral propício ao efeito de depressores e ainda a maior proporção de tecido adiposo em relação ao peso, gerando uma maior distribuição de fármaco (CORREIA; ALVES, 2002).

O diagnóstico de intoxicação é geralmente baseado em sinais clínicos, onde muitas vezes o próprio paciente é capaz de fornecer informações acerca da ingestão do medicamento. Deve-se realizar um diagnóstico diferencial baseado na premissa de que estes sintomas podem estar relacionados com outras substâncias como opióides e etanol, bem como outras condições médicas como é o caso da hiponatremia e hipoglicemia (KANG; GALUSKA; GHASSEMZADEH, 2022).

O tratamento para a intoxicação por benzodiazepínicos é quase exclusivamente voltado ao suporte de funções vitais, com a manutenção da respiração por ventilação mecânica. O flumazenil, um antagonista competitivo do receptor GABA-A, pode ser utilizado em situações limitadas como na intoxicação de pacientes cujo uso de benzodiazepínicos não é extenso ou habitual. Isto ocorre, pois, além dos riscos relevantes de sua utilização como ataque cardíaco, este é capaz de precipitar sintomas de abstinência, ansiedade e convulsões fatais em usuários crônicos dos benzodiazepínicos. Assim, deve-se considerar se o risco é válido para a recuperação do paciente (KANG; GALUSKA; GHASSEMZADEH, 2022).

3.5.2 Tolerância

Os riscos do uso de benzodiazepínicos e a responsabilidade por sua reputação controversa estão em grande maioria relacionados com a sua capacidade de gerar tolerância e dependência em usuários a longo prazo.

A tolerância aos benzodiazepínicos é classificada como funcional, isto significa que está intimamente ligada à diminuição no número ou sensibilidade de receptores GABA-A, modificações na ligação do próprio GABA endógeno no receptor ou mudanças mais profundas na transmissão serotoninérgica e noradrenérgica (OGA; CAMARGO; BATTISTUZZO, 2008).

Esta tolerância se apresenta aos poucos, com os efeitos sendo abrandados de forma gradual, com o primeiro a ser atenuado sendo a sedação e ataxia, seguido do efeito anticonvulsivante e por fim o ansiolítico. Esta tolerância é diretamente proporcional ao uso de doses elevadas e tempo de tratamento (OGA; CAMARGO; BATTISTUZZO, 2008).

3.5.3 Dependência e abstinência

A dependência aos benzodiazepínicos pode se apresentar de duas formas: A primeira é a emocional, relacionada à experiência prazerosa e subjetiva em pacientes suscetíveis a essa necessidade, levando a um abuso e eventual aparecimento de sintomas físicos. Já a dependência física se apresenta com sintomas como disforia, agitação, insônia, convulsões e êmese. Essa dependência é maior com o uso de benzodiazepínicos de ação curta, com sintomas graves de abstinência surgindo na interrupção abrupta (OGA; CAMARGO; BATTISTUZZO, 2008).

Ambas as apresentações ocorrem mesmo em pacientes utilizando doses terapêuticas quando o tratamento é prolongado, com a interrupção do uso sendo dificultada por diversos fatores como meia vida de eliminação e potência do fármaco (OGA; CAMARGO; BATTISTUZZO, 2008).

Os mecanismos de desenvolvimento da dependência ainda não são completamente bem estabelecidos, no entanto, algumas teorias são mais bem aceitas no meio científico. Uma delas leva em consideração a característica do receptor GABA-A de possuir uma ampla gama de ligantes. Assim, a ocupação crônica dos receptores pelo benzodiazepínico culmina em uma mudança alostérica do próprio receptor, que o torna menos suscetível a este fármaco e aumenta a afinidade a agonistas inversos, cuja ação é completamente oposta à dos BZDs. O resultado é o aparecimento de alucinações, delírios persecutórios entre outros. Estes efeitos parecem estar ligados à via dopaminérgica, possivelmente precipitada

pela ligação de opióides endógenos no GABA-A (OGA; CAMARGO; BATTISTUZZO, 2008).

A interrupção do uso prolongado é capaz também de gerar uma síndrome que se apresenta de 3 formas: a) Recorrência: com o retorno dos sintomas da doença que estava sendo tratada pelo benzodiazepínico; b) rebote: o retorno dos sintomas, porém em uma intensidade maior que a original e c) Abstinência: onde aparecem novos sintomas ao se diminuir a dose do fármaco. (OGA; CAMARGO; BATTISTUZZO, 2008).

3.6 OS BENZODIAZEPÍNICOS COMO FERRAMENTAS CRIMINOSAS

No contexto criminal, existem substâncias cujo uso é capaz de facilitar a execução de determinados crimes, incluindo estupros, violência sexual no geral, roubos e outros golpes. Estas substâncias são denominadas Drogas Facilitadoras de Crimes (DFCs). Nesta classe estão incluídos alguns benzodiazepínicos, porém o fármaco desta classe mais reconhecidamente utilizado para este fim é o flunitrazepam (TAKITANE *et al.*, 2017).

O flunitrazepam é um benzodiazepínico comercializado originalmente com o nome *Rohypnol*®, e com uso legal respaldado em 64 países segundo levantamento em 1997, incluindo os componentes da América do Sul. É um fármaco de ação intermediária a curta e empregado extensivamente como um potente hipnótico. Seu uso ilícito, no entanto, foi popularizado em bares e baladas devido a sua capacidade de produzir sedação, amnésia e um certo grau de desinibição, principalmente quando associado a outras drogas como o álcool e a heroína nos EUA (ANGLIN, SPEARS e HUTSON, 1997; SIMMONS e CUPP, 1998).

Atualmente, sabe-se que o flunitrazepam é uma droga utilizada de maneira intensa para a facilitação de crimes, tendo em vista sua capacidade de gerar docilidade da vítima e impedir sua reação. Outra característica que a torna propensa a ser utilizada como ferramenta criminosa é o fato de ser inodora, insípida e transparente quando dissolvida principalmente em bebidas alcoólicas, fazendo com que a vítima proceda com a ingestão sem conhecimento algum do golpe, que é conhecido popularmente pelo nome de “Boa Noite Cinderela” (TAKITANE *et al.*, 2017).

Segundo Takitane e colaboradores (2017), o abuso sexual facilitado por drogas (da sigla em inglês DFSA) diz respeito a toda violência sexual em que a vítima esteja inapta a expressar consentimento ou incapacitada devido ao uso de alguma substância. Este pode ser proativo, quando há a administração forçada ou secreta da droga com o objetivo de concretizar o ato criminoso, ou oportunista, quando o criminoso se aproveita da vítima que utilizou a substância de maneira voluntária (TAKITANE *et al.*,2017).

Medidas foram tomadas pelas próprias empresas fabricantes como forma de controlar o uso do flunitrazepam como droga facilitadora de crimes sexuais. Por exemplo, a farmacêutica Hoffman-LaRoche, detentora original do registro comercial do flunitrazepam, já chegou a ponto de alterar a formulação para que possuísse uma cor azul vívida, o que seria um indicativo melhor de que a bebida da vítima foi adulterada, sendo que boa parte da ação tomada por estas empresas se deve ao fato de que o flunitrazepam possui uma síntese difícil, assim o fornecimento é basicamente exclusivo de contrabando do produto comercial (ANGLIN, SPEARS e HUTSON,1997; CYBULSKA, 2002).

A detecção desta droga é difícil devido à baixa dose necessária para ocorrência de seus efeitos, em torno de 2 mg. Assim técnicas sensíveis foram desenvolvidas como imunoensaios em associação com cromatografia gasosa e espectrometria de massas, ocorrendo confirmação positiva principalmente através da identificação de seu metabólito principal, o 7-aminoflunitrazepam (SIMMONS; CUPP, 1998).

3.7 CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA

O desenvolvimento da cromatografia líquida de alta eficiência foi um marco no ramo da análise instrumental, sendo a técnica mais difundida, desenvolvida e utilizada atualmente em laboratórios diversos (MALDANER; JARDIM, 2009).

Sendo oriunda de meados da década de 50, desde os anos 70 a CLAE recebeu uma evolução significativa em sua aplicação, hoje sendo capaz de colocar em usos componentes sofisticados e completamente automatizados, gerando resultados com alta resolução e sensibilidade. Esta transição se dá principalmente pela possibilidade de serem empregadas partículas porosas com diâmetros cada vez menores, facilitando a separação dos componentes sem prejudicar outras

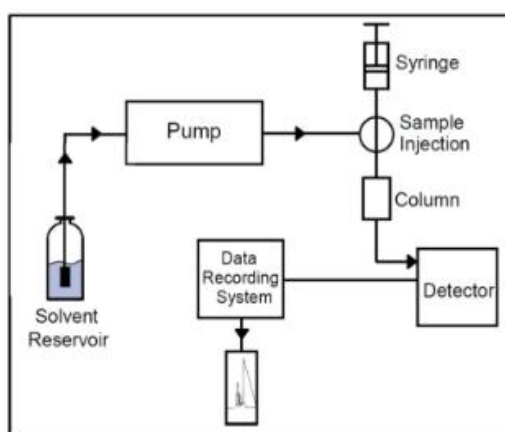
variáveis como pressão (COLLINS, BRAGA e BONATTO, 2006; MALDANER e JARDIM, 2009).

No geral a cromatografia é uma técnica capaz de separar matrizes complexas através de características físicas de seus componentes. Essas características irão pautar a distribuição entre uma fase móvel e uma fase estacionária conforme a amostra migra pelo sistema, sendo a primeira um eluente capaz de carrear e interagir com a amostra e a segunda uma fase imóvel pela qual o líquido irá passar, sendo estas imiscíveis. A afinidade dos diferentes componentes do analito irá variar, levando a uma separação e saída em tempos diferentes do sistema (DEGANI; CASS; VIEIRA, 1998).

A CLAE é uma metodologia que, por utilizar partículas menores na fase estacionária, necessita de um sistema de alta pressão capaz de manter um fluxo de fase móvel constante. Ainda, por ter uma capacidade de separação maior, faz-se necessário um sistema de detecção potente (DEGANI; CASS; VIEIRA, 1998).

Os principais componentes de um sistema de CLAE são: uma coluna reaproveitável, a qual pode ser preenchida com uma série de fases estacionárias de composições e diâmetro de partículas diferentes; um sistema injeção podendo ser manual via seringa ou em válvulas; um sistema de bomba capaz de forçar o fluxo da fase móvel em velocidades aceitáveis e um detector (FIGURA 4), visto que avaliação de frações individuais seria inviável (COLLINS; BRAGA; BONATTO, 2006).

FIGURA 4 - Esquema básico de um sistema CLAE



FONTE: adaptado de Zhang *et al.* (2016).

Os detectores empregados na CLAE são diversos, sendo um dos representantes mais bem estabelecidos o detector de arranjo de diodos ou DAD. O DAD é um detector que opera na faixa do ultravioleta visível, com o diferencial de que, ao contrário dos detectores de ultravioleta clássicos, este é capaz de operar com diferentes comprimentos de onda ao mesmo tempo. Para tal, faz uso da incidência de todos os comprimentos de onda presentes na luz visível através da amostra. Posteriormente, a luz transmitida é dispersada em um prisma para que os feixes de luz de diferentes comprimentos sejam redirecionados para uma gama de diodos diferentes no sistema. O resultado das leituras gera uma varredura de espectro cujo aspecto pode ser comparado com padrões para determinadas substâncias, sendo útil na avaliação da pureza de picos e identificação de amostras (PAPADOYANNIS e GIKA, 2004; ROYAL SOCIETY OF CHEMISTRY, 2022).

Em relação às variáveis de interesse na operação de um sistema de CLAE, alguns fatores são críticos e devem ser adaptados para otimização do método. Alguns deles incluem:

Temperatura

A temperatura em um sistema cromatográfico é capaz de impactar diretamente determinadas características da corrida. Reconhecidamente, temperaturas mais elevadas conseguem reduzir a viscosidade da fase móvel, facilitando a difusão e fluxo através da coluna. Isto tem impacto direto na eficiência do método ao diminuir o tempo de corrida e aumentar a transferência de massa. No entanto, algumas propriedades limitam o emprego de temperaturas elevadas como, por exemplo, a estabilidade das fases móveis e estacionárias, com colunas mais comumente utilizadas como é o caso da fase reversa sílica C18, sendo estáveis até 60 °C apenas (LANÇAS, 2012).

Seleção de fase móvel

A fase móvel para uma corrida cromatográfica deve obedecer algumas regras gerais, que incluem: alta pureza; não dissolver ou decompor a fase estacionária; ser pouco viscosa; ter compatibilidade com o detector; polaridade adequada para separação física da amostra; não decompor a amostra (COLLINS; BRAGA; BONATTO, 2006).

Seleção de fase estacionária

Assim como a fase móvel, algumas características são desejadas na escolha de uma fase estacionária para o desenvolvimento de um método de CLAE, incluindo: baixo custo; fácil introdução e empacotamento na coluna; boa resolução e que geram pouca elevação na pressão do sistema. No entanto, estas características associadas atualmente são apenas utópicas, sendo necessário estabelecer prioridades e sacrificar determinadas qualidades em prol de outras. Por exemplo, partículas esféricas de sílica possuem um melhor empacotamento e resolução, sendo, no entanto, mais caras que partículas irregulares (COLLINS; BRAGA; BONATTO, 2006).

4 METODOLOGIA

4.1 Seleção e preparo de padrões

O presente trabalho se iniciou com uma avaliação dos padrões disponibilizados pelo Laboratório de Toxicologia Clínica do Curso de Farmácia, localizado no Campus Jardim Botânico da UFPR. Foram selecionados de maneira preliminar os seguintes padrões, com os critérios sendo:

- a) Disponibilidade da matéria prima no laboratório suficiente para repetidos testes;
- b) Utilização significativa do fármaco na rotina médica

O preparo da solução estoque de padrões da primeira fase se iniciou através da pesagem em balança analítica de aproximadamente 2 mg de cada um dos padrões selecionados. Na sequência foram realizadas diluições individuais para estes padrões, em balões volumétricos de 5 mL escolhidos e higienizados com metanol previamente, sendo o metanol também o solvente utilizado nesta diluição. O processo findou-se com a transferência quantitativa do líquido para frascos de vidro de 10 mL, totalizando 6 (seis) frascos com os diferentes padrões em concentração de 0,4 mg/mL, que foram devidamente etiquetados e armazenados em temperaturas negativas no freezer disponibilizado pelo laboratório. Os padrões, purificados e prontos para análise, selecionados para uso no primeiro teste de condições de corrida foram: Lorazepam, Oxazepam, Clobazam, Alprazolam, Diazepam e Bromazepam.

Com o decorrer dos experimentos e avaliação do sinal dos cromatogramas notou-se a necessidade de trabalhar com concentrações maiores. Aliado à perspectiva de facilitar eventuais diluições, foram feitas novas soluções-estoque de padrões, desta vez com volume final de 10 mL e em uma concentração de 1 mg/mL, ainda utilizando metanol como solvente e armazenados sob as mesmas condições. Desta vez os padrões selecionados sofreram alterações, sendo realizadas diluições para os seguintes benzodiazepínicos: Alprazolam, Clordiazepóxido, Diazepam e Clobazam (FIGURA 5).

FIGURA 5 - Padrões 1 mg/mL



FONTE: O autor (2022).

4.2 Busca em literatura

O presente trabalho se iniciou por uma busca de artigos científicos indexados em bases de dados como PUBMED, BVS e SCIELO. Para tal foram utilizadas as palavras-chave “BENZODIAZEPINES”, “HPLC” e “ISOCRATIC”, bem como buscas específicas incluindo os termos “ALPRAZOLAM”, “CHLORDIAZEPOXIDE”, “DIAZEPAM”; “LORAZEPAM”, “OXAZEPAM” e “CLOBAZAM”. A pesquisa fez uso dos operadores booleanos AND e OR quando aplicável.

Os resultados não tiveram critério de exclusão quanto à linguagem do texto, sendo avaliados e selecionados em tempo real de acordo com a estrutura, equipamento e coluna disponibilizados na Central Analítica do prédio do curso de farmácia da UFPR.

4.3 Testagem de condições cromatográficas

A seleção das condições de corrida foi realizada de maneira gradual, sendo substituídas de acordo com sua performance no HPLC-DAD presente na central analítica do prédio de farmácia da UFPR. O processo foi padronizado da seguinte forma:

- 1) Preparo da fase móvel, de acordo com o explicitado nos artigos selecionados.
- 2) Diluição dos padrões na concentração desejada (mg/mL) na própria fase móvel.
- 3) Acomodação em *vials* próprios para HPLC, com filtração prévia através de seringas plásticas acopladas a mini filtros.
- 4) Ambientação da coluna com fase móvel e espera para estabilização da lâmpada do detector.
- 5) Corrida dos padrões no método, de forma individual. O tempo de corrida foi padronizado inicialmente em 30 minutos, com o teste da segunda condição de corrida utilizando um tempo de 50 minutos, e utilizou o cromatógrafo Líquido Varian ProStar acoplado a um detector DAD UV-VIS.

Nas duas condições testadas foi utilizada a coluna de fase reversa Zorbax Eclipse Plus C18, com dimensões de 250 x 4,6 mm e tamanho de poro 5 *um*, fabricada pela AGILENT.

Alguns fatores que foram acompanhados durante esta fase de testes e serviram como critérios de seleção para o método final foram:

- Boa resolução dos picos quando comparados em um mesmo cromatograma;
- Pureza dos picos;
- Pressão da coluna estável abaixo de 200 bar (Por conta de limitações técnicas do equipamento utilizado);
- Tempo de corrida relativamente baixo, não ultrapassando os 30 minutos

Condições de corrida 1

Para a corrida com as condições de corrida 1, adaptadas do trabalho de Sultan e El Mubarak (1996), os padrões foram diluídos da solução estoque até uma concentração de 0,001 mg/mL utilizando balões volumétricos de 10 mL e fase móvel como solvente.

Abaixo, na Tabela 1, estão descritas as condições testadas durante a avaliação deste método:

TABELA 1 - CONDIÇÕES DE CORRIDA 1

Adaptado de:	Fase móvel	Volume de injeção	Fluxo*	Fase estacionária	Tempo de eluição	Temperatura	Faixa de leitura UV
Sultan e El Mubarak, 1996	Acetonitrila: Tampão acetato de amônia 0,1M em pH 6,0 (89:11)	5 uL	1,5 mL/min 1,0 mL/min 0,4 mL/min	Sílica Fase reversa C18	30 minutos	25 ° C	254 nm com varredura de 230 a 282 nm

FONTE: O autor (2022)

*O fluxo foi sendo adaptado de acordo com a leitura de pressão do software, de forma a não estourar o limite de pressão acordado.

Preparo da fase móvel do teste 1: Para 1 litro de solução tampão de acetato de amônia foram pesados 7,7 gramas em balança semianalítica posteriormente dissolvidos completamente em 1 litro de água destilada. Após agitação manual com bastão de vidro o pH foi ajustado com o pHmetro da marca NOVA instruments previamente calibrado até que se atingisse pH 6,0.

Para a fase móvel finalizada foram misturados 445 mL de acetonitrila de grau HPLC e 55 mL do tampão medidos em proveta, totalizando 500 mL de fase móvel. A solução então foi filtrada por sistema de vácuo para ser utilizada no HPLC e acomodada em frasco âmbar com capacidade de 1,5 litros.

Condições de corrida 2

As amostras de padrões foram diluídas para uma concentração de 0,003 mg/mL para a testagem das condições de corrida 2, adaptadas do trabalho de Kaliková e colaboradores (2011), sendo eluídas nas seguintes condições:

TABELA 2 - CONDIÇÕES DE CORRIDA 2

Adaptado de:	Fase móvel	Volume de injeção	Fluxo	Fase estacionária	Tempo de eluição	Temperatura	Faixa de leitura UV
Kalíková <i>et al.</i> , 2011	Acetonitrila : H ₂ O acidificada em pH 3,0 (40:60)	5 uL	1,0 mL/min	Sílica Fase reversa C18	30 minutos	35 ° C	254 nm com varredura de 230 a 282 nm

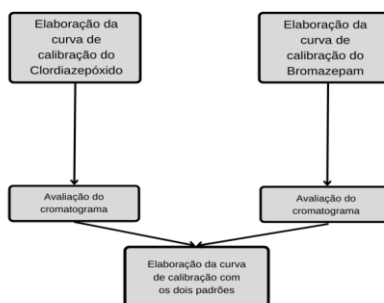
FONTE: O autor (2022)

Preparo da fase móvel do teste 2: Acidificou-se 600 mL de água destilada com o uso de ácido acético glacial até que se alcançasse o pH 3,0, averiguado com pHmetro da marca NOVA instruments. Após este processo foram misturados estes 600 mL de água acidificada com 400 mL de acetonitrila grau HPLC, totalizando 1 litro de fase móvel. A solução então foi filtrada por sistema de vácuo para ser utilizada no HPLC e acomodada em frasco âmbar com capacidade de 1,5 litros.

4.3 Elaboração das curvas de calibração

Os dados da condição de corrida número 2 foram avaliados e optou-se pela seleção de 2 padrões para fins de elaboração de uma curva de calibração, sendo estes o Clordiazepóxido e o Bromazepam. Foi estabelecido o seguinte processo para esta etapa (FIGURA 6):

FIGURA 6- Planejamento do ensaio de curva de calibração.



FONTE: o autor (2022)

As curvas foram elaboradas tendo em mente 6 pontos de leitura, com uma progressão geométrica de 2 vezes o valor do ponto anterior, como disposto na TABELA 3:

TABELA 3 - CONCENTRAÇÃO DOS PONTOS DE LEITURA DA CURVA DE CALIBRAÇÃO

Ponto	Concentração
1	0,003 mg/mL
2	0,006 mg/mL
3	0,012 mg/mL
4	0,024 mg/mL
5	0,048 mg/mL
6	0,051 mg/mL

FONTE: O autor (2022)

Estas diluições foram realizadas partindo das soluções de estoque do Bromazepam e Clordiazepóxido de concentração 1mg/mL, utilizando a própria fase móvel de acetonitrila:água acidificada em pH 3,0 como solvente em balões volumétricos de 10 mL.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Testagem das condições cromatográficas

Condição 1

A condição de número 1, adquirida e adaptada do trabalho realizado por Sultan e El-Mubarak em 1995, foi selecionada por apresentar variáveis mais brandas em relação tanto à aquisição de material de trabalho quanto em relação ao processo cromatográfico, tendo em vista o uso de um método isocrático e de temperatura ambiente para a corrida. No entanto, vale destacar que o método original usufrui de um fluxo elevado de 3,44 mL/min, sendo esta uma das características mais perniciosas ao ritmo do projeto. Com isto em mente, objetivou-se a diminuição do fluxo e avaliação do impacto no cromatograma, sendo este fluxo

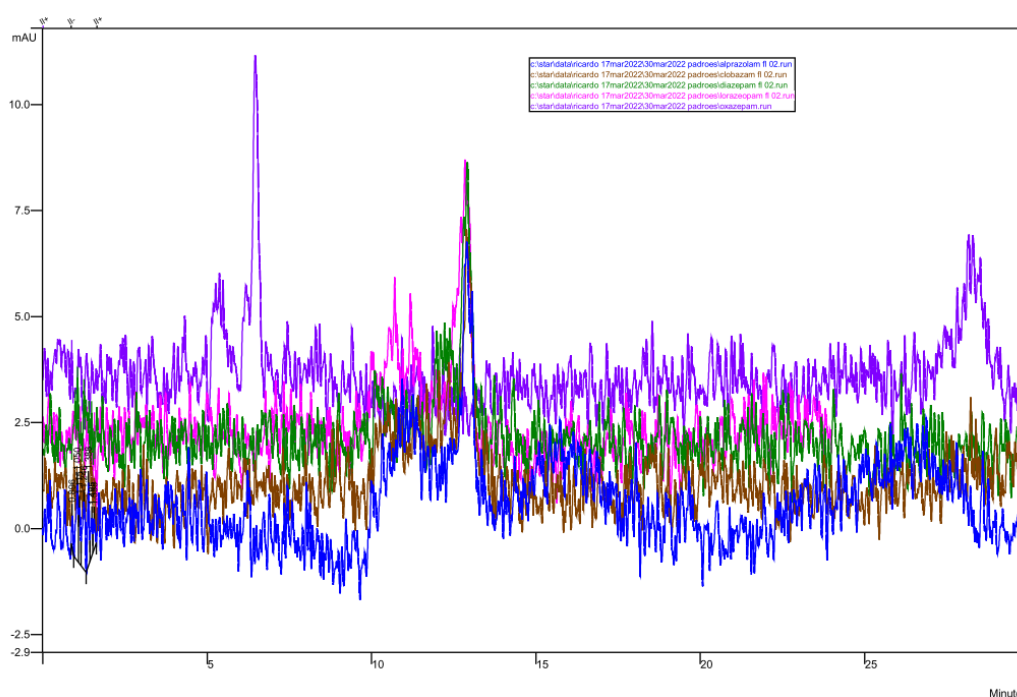
diminuído até que a pressão da coluna se mantivesse em uma faixa tolerável para o equipamento, neste caso abaixo de 200 *bar*.

O fluxo mais aceitável para o equipamento ficou na faixa de 0,4 mL/minuto, sendo este valor fixado nos testes com os padrões.

Outra problemática que surgiu durante os testes preliminares foi o aparecimento de um pico não identificado e cujo espectro não batia com nenhum benzodiazepínico catalogado na literatura, admitiu-se então que este representava um resíduo fixado na própria coluna utilizada, sendo necessária uma limpeza com metanol por 5 horas para retirada de material interferente.

A seguir, na figura 7, está apresentado o cromatograma desenvolvido nesta fase do projeto:

FIGURA 7 - Resultados da corrida em condições 1



FONTE: O autor (2022)

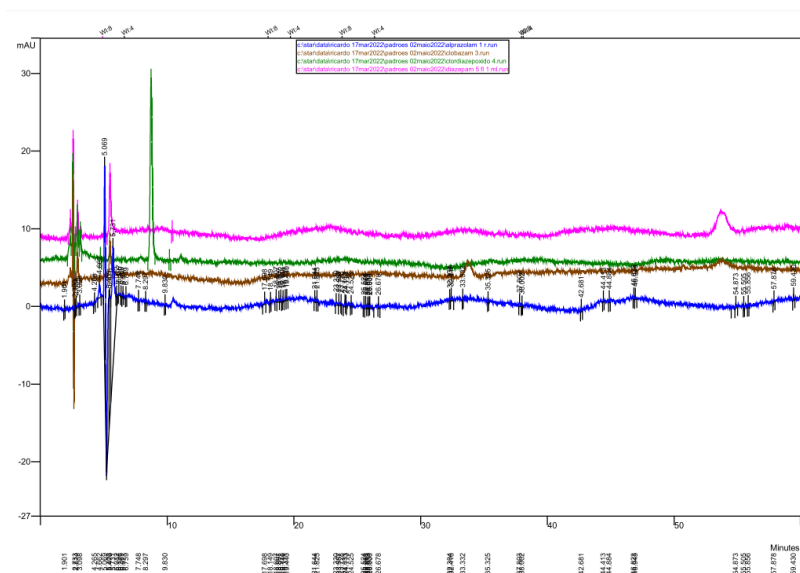
Nota-se que as condições estabelecidas não foram capazes de gerar um cromatograma viável na prática, tendo em vista que não foram observados picos correspondentes aos padrões durante toda a corrida. Uma das razões para tal resultado pode ser discutido em termos de fluxo, tendo em vista que limitações técnicas relacionadas à pressão foram responsáveis pela necessidade de se trabalhar com um fluxo muito baixo, o que pode ter acarretado em grande atraso no

aparecimento de picos. Assim, pode-se supor que em tempos maiores de corrida poderiam ser observadas leituras positivas, porém não há como se afirmar que o perfil deste cromatograma seria viável, constatação que é apoiada pela pouca utilidade de um método extremamente demorado na rotina prática.

Condição 2

O método selecionado foi adaptado do trabalho realizado por Kaliková e colaboradores (2011). Além de ser um método mais recente e trabalhar com um regime isocrático de eluição, apresentou as características desejáveis pensadas previamente, como facilidade de acesso e preparo da fase móvel, tempo de corrida relativamente curto e boa separação dos picos como demonstrado em seus resultados. Algumas alterações, no entanto, tiveram que ser realizadas em prol da adaptação do método à realidade do laboratório sendo estas: redução do fluxo de 2 mL/min descrito no artigo original para 1 mL/min, com o objetivo de reduzir a pressão na coluna para aproximadamente 170 *bar* e o uso de uma temperatura de 35 °C da coluna durante a corrida, com a perspectiva de diminuir a viscosidade fase móvel, melhorar o fluxo e conseqüentemente a velocidade da análise. Foram selecionados para corrida nessa fase do trabalho os padrões de alprazolam, diazepam, clordiazepóxido e clobazam. Os resultados estão descritos na Figura 8, a seguir:

FIGURA 8 - Resultados da corrida em condições 2



FONTE: O autor (2022)

Pode-se averiguar que a corrida alcançou resultados favoráveis, como o aparecimento de picos correspondentes a todos os padrões utilizados com os seguintes perfis de retenção, demonstrados na TABELA 4:

TABELA 4 - TEMPOS DE RETENÇÃO NO TESTE 2

Pico	Padrão	Tempo de retenção (tR)
1	Alprazolam	5,009 minutos
2	Diazepam	5,484 minutos
3	Clobazam	5,731 minutos
4	Clordiazepóxido	9,29 minutos

FONTE: O autor (2022)

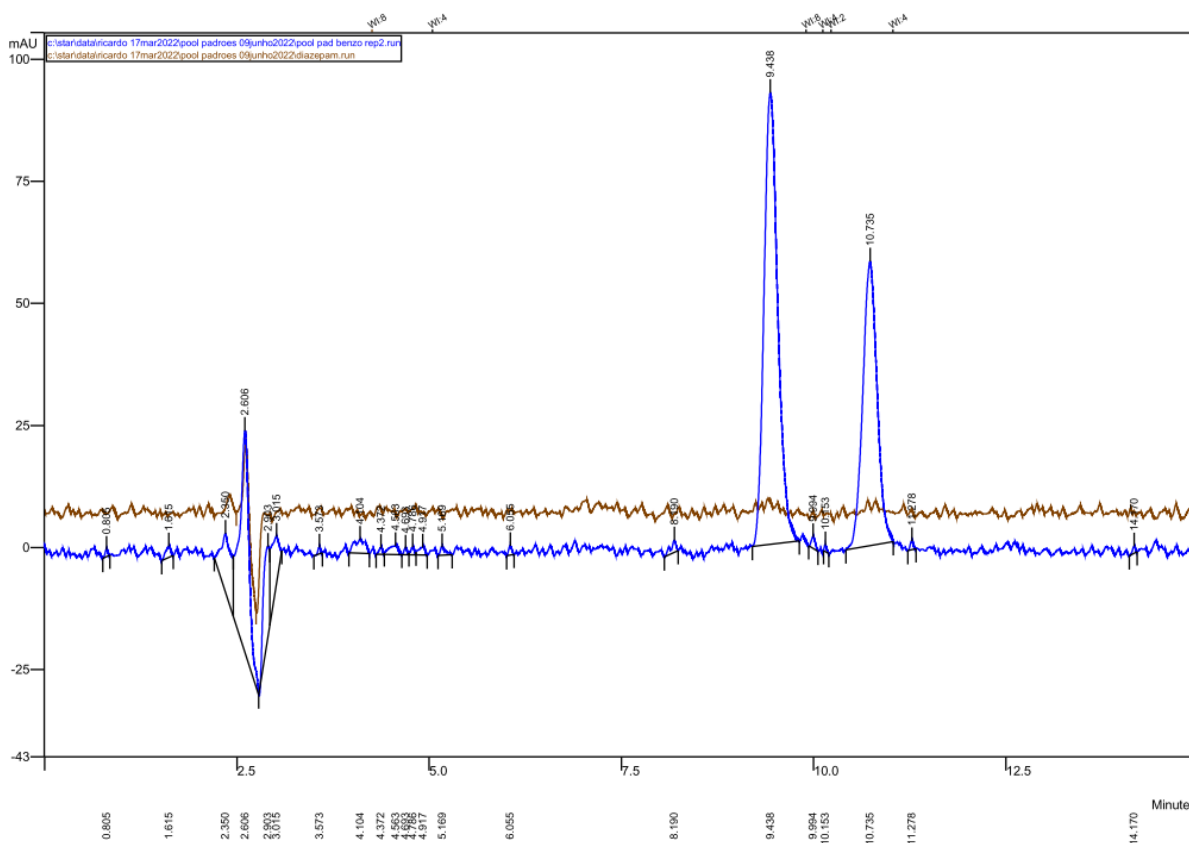
É visível a intensidade do sinal mais elevada para o clordiazepóxido, em relação aos outros padrões, evidenciando uma resposta de detecção mais eficiente ao método.

Outros parâmetros com respostas positivas foram observados e dão embasamento ao uso deste método, como o bom tempo de corrida ao confirmar-se que o último componente é eluído e detectado em um tempo inferior a 15 minutos e o fato de a separação dos picos estar em padrões aceitáveis para uma análise quantitativa.

Algumas ressalvas, no entanto, não podem ser ignoradas como, por exemplo, a presença de uma conjunção entre os picos do diazepam e do alprazolam que evidenciam uma baixa resolução para estes dois componentes específicos. Além disso, a resposta de grande parte dos picos foi baixa na concentração utilizada (0,001 mg/mL), com exceção do clordiazepóxido.

Estas incongruências pautaram a realização de uma nova corrida, desta vez excluindo os padrões de clobazam e alprazolam e buscando averiguar o comportamento do diazepam sem a interferência do alprazolam. Foi também selecionado o uso do bromazepam nas mesmas concentrações nesta etapa, tendo em vista seu bom comportamento no artigo base para estas condições. Este resultado pode ser observado na Figura 9 a seguir:

FIGURA 9 - Cromatograma da corrida de pool clordiazepóxido, diazepam e bromazepam



FONTE: O autor (2022)

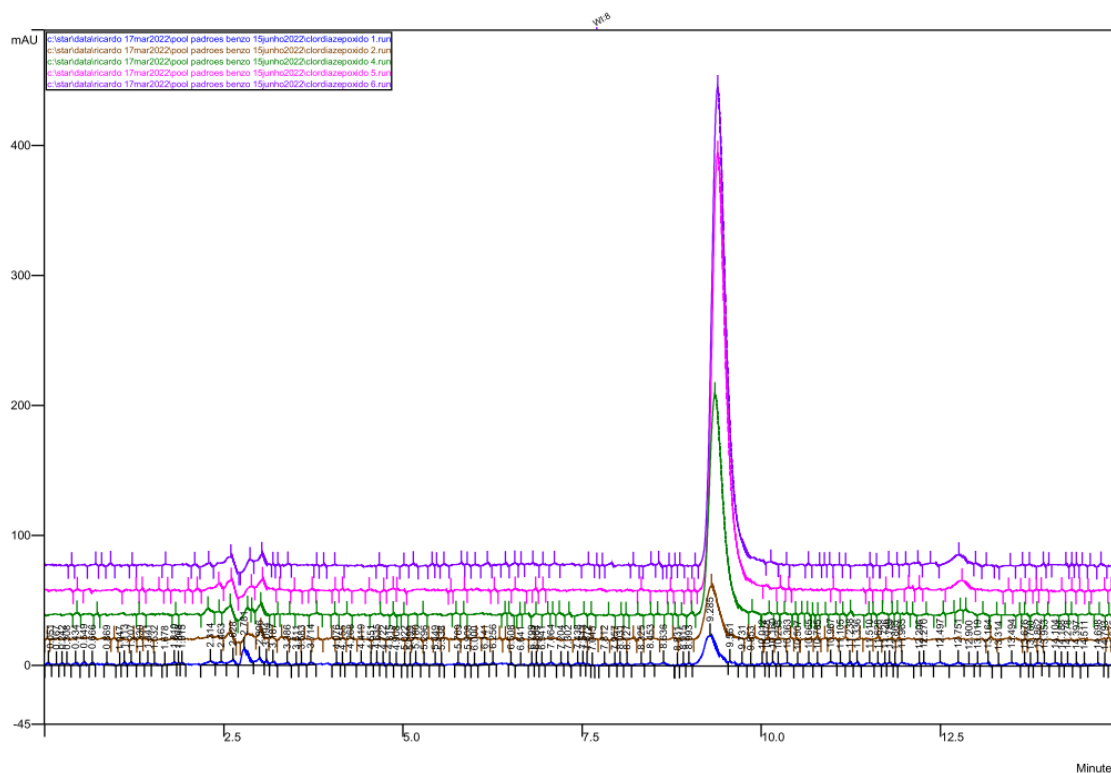
Estas corridas realizadas posteriormente, sob as mesmas condições, demonstraram que o diazepam passou a ter um sinal menos evidente. Optou-se então pela sua exclusão da elaboração das curvas de calibração. Ao mesmo tempo, o bromazepam apresentou um comportamento excelente, com um pico respectivo surgindo em torno de 10,7 minutos e separado das outras amostras, sendo então postulado seu uso no decorrer do resto do trabalho.

5.3 Curvas de calibração

5.3.1 Curva do Clordiazepóxido

O clordiazepóxido foi o primeiro padrão a ser utilizado para a elaboração da curva de calibração, sendo os resultados descritos a seguir na FIGURA 10:

FIGURA 10 - Curva de calibração do clordiazepóxido



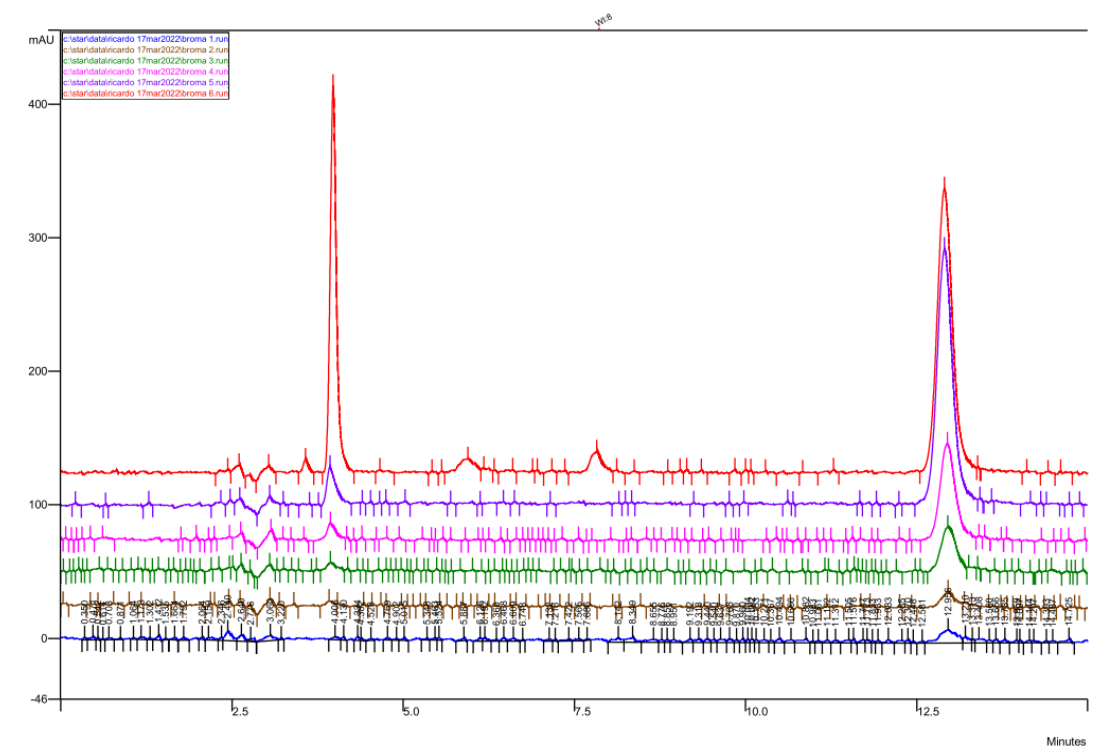
FONTE: O autor (2022)

O cromatograma obtido com as 6 corridas demonstrou um crescimento significativo do sinal detectado em torno de 9 minutos conforme a concentração do padrão aumentava, assim como esperado. O maior salto de sinal entre pontos pode ser visto entre o ponto 4 (0,024 mg/mL) e o ponto 5 (0,048 mg/mL). Outro indicativo obtido da análise deste cromatograma pode ser encontrado ao compararmos o pico 5 e o pico 6. Percebe-se que nesta ocasião há um aumento muito ligeiro na área do pico, condizente com a discreta elevação de concentração entre esses pontos. Pode-se pressupor que a adição de mais pontos com concentrações maiores na curva manteria a proporcionalidade do sinal, sugerindo de forma sutil uma faixa maior de detecção do clordiazepóxido neste método.

5.3.2 Curva do Bromazepam

A curva do bromazepam foi realizada na sequência, em um dia distinto da curva do clordiazepóxido. A seguir está apresentado o cromatograma da FIGURA 11 desta etapa:

FIGURA 11 : Curva de calibração do bromazepam



FONTE: O autor (2022)

Apesar do crescimento da relação entre sinal e concentração estar condizente com o esperado para uma curva, algumas particularidades do espectro saltam aos olhos. Uma delas é o aparecimento de picos em um tempo de retenção de aproximadamente 4 minutos, incongruente com o esperado do pico do bromazepam que é eluído em torno de 13 minutos. Este sinal interferente elevou-se de forma sutil conforme a concentração da solução de padrão aumentava, com um aumento elevado na leitura no ponto 6 da curva.

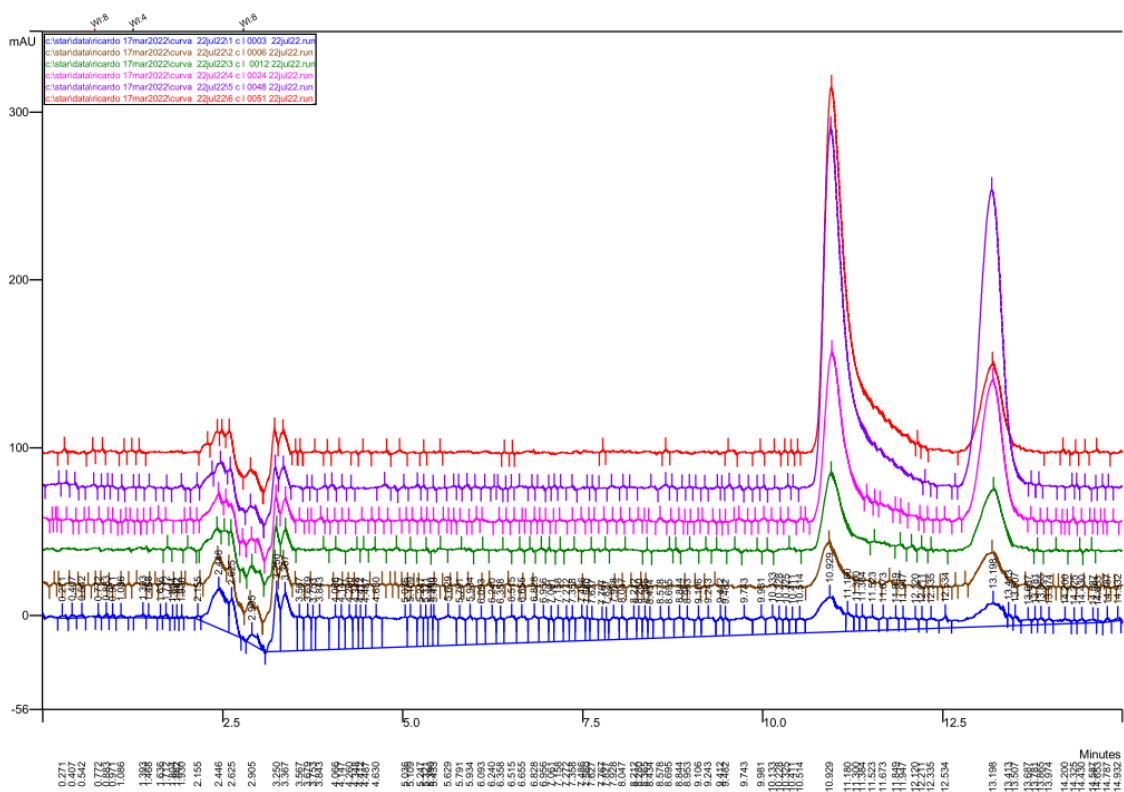
Essa situação poderia ser explicada pela presença de contaminantes na amostra ou frascos onde o padrão foi acondicionado, bem como a possibilidade de produtos de degradação terem se formado no meio tempo entre as análises cromatográficas, tendo em vista que foram realizadas em dias diferentes.

5.3.3 Curva Clordiazepóxido + Bromazepam

Esta curva foi elaborada com o intuito de avaliar se a presença concomitante destes dois fármacos seria capaz de gerar uma interação danosa na detecção dos

picos cromatográficos, a seguir na FIGURA 12 está representado o cromatograma obtido:

FIGURA 12 - Curva de calibração do pool bromazepam + clordiazepóxido



FONTE: O autor (2022)

Percebe-se a ausência do pico indesejável obtido no desenvolvimento do cromatograma da curva de calibração do bromazepam, mesmo com a utilização do mesmo padrão. Este resultado sugere que os picos foram resultado de uma contaminação da própria vidraria utilizada nos testes e que foi contornada com um protocolo de lavagem mais eficiente utilizando metanol.

A menor concentração de bromazepam no ponto 6 foi considerada como um erro de técnica, provavelmente com uma diluição menor do que a desejada, levando em consideração que os outros picos relacionados aos pontos 1 ao 5 apresentam comportamento compatível com o esperado.

Para todas as curvas, nota-se que houve leves deslocamentos do ponto máximo do pico entre cada uma das corridas pontuais. Pressupõe-se que houve um desgaste da bomba, devido ao fato de o cromatógrafo ser utilizado em rotina por muitos membros da universidade e os testes terem durado semanas, assim levando

à variações de pressão e fluxo que podem ocasionar em um deslocamento artificial e variabilidade de resultados. Esta condição, no entanto, foi descartada como relevante ao resultado do projeto tendo em vista que os recursos não permitiriam uma mudança de equipamento a curto prazo e o deslocamento não foi amplo a ponto de prejudicar o perfil cromatográfico desejado.

No geral, os testes foram capazes de proporcionar a finalidade desejada com a proposição inicial do projeto. Utilizando de conhecimentos técnicos, foi possível realizar a adaptação de métodos já disponibilizados no meio científico, mesmo que estes não fossem adequados à realidade do laboratório em sua apresentação bruta. Isto se deve possivelmente ao fato de muitos dos estudos levarem em conta não apenas uma proposição nova de condições, mas sim um foco em otimização máxima de seu método. Assim, ao apresentarem os melhores resultados possíveis com o melhor equipamento disponível, há a abertura para que profissionais atentos discutam e proponham métodos para diminuir a escala de eficiência, ainda assim aproveitando a base da proposta original.

Ainda, com um tempo de corrida relativamente baixo, a condição 2 proposta possui potencial em ser aplicada na rotina para diversas finalidades, como análises forenses ou no controle de qualidade industrial de medicamentos. Todavia é importante citar que as análises realizadas no desenvolvimento deste trabalho levaram em consideração os padrões puros de benzodiazepínicos, assim não se pode afirmar no atual momento que seu uso para metabólitos advindos da biotransformação estejam respaldados em evidências.

6 CONCLUSÃO

Não é um exagero afirmar que os benzodiazepínicos foram, e são, um marco nas ciências farmacêuticas. Seu uso revolucionou a forma como diversas mazelas extremamente comuns na atualidade, como insônia e ansiedade, podem ser tratadas. Ainda assim são substâncias extremamente estigmatizadas, principalmente pelo seu potencial de abuso e uso criminal.

O risco do mau e pernicioso uso destas substâncias serve para lembrar a importância de se estabelecer métodos cada vez mais sensíveis e bem estruturados de detecção. No entanto, este paradigma encontra um bloqueio ao se analisar toda

a heterogeneidade dos laboratórios e centrais analíticas espalhadas pelo mundo, com materiais e equipamentos distintos que podem vir a acarretar em dificuldades de uma boa aplicação dos métodos descritos em literaturas passadas. Tendo isso em mente, reestruturar métodos antigos para uma realidade mais palpável dos analistas deve ser fomentada com o objetivo de alcançar e estabelecer padrões que se adequem ao seu contexto e rotina.

O presente trabalho foi capaz de demonstrar que essa adaptação é possível quando se aplicam os conhecimentos técnicos em relação aos parâmetros básicos do funcionamento de um HPLC-DAD, sendo possível propor, testar, refinar e padronizar um bom método.

Como passo futuro, deve ser priorizada a aplicação do método em uma gama maior de padrões de benzodiazepínicos em prol de estender seu espectro de abrangência de detecção. Além disso, testes devem ser incentivados para chegar A valores de limite de detecção e, posteriormente, em limites de quantificação para que o método também assuma uma face quantitativa e agregue maior valor e flexibilidade de uso.

REFERÊNCIAS

ANDERSON, M. Benzodiazepines for prolonged seizures. **Archives Of Disease In Childhood - Education And Practice**, v. 95, n. 6, p. 183-189, 22 nov. 2010. BMJ. <http://dx.doi.org/10.1136/adc.2009.176321>. Disponível em: <https://ep.bmj.com/content/95/6/183>. Acesso em: 15 jul. 2022.

ANDREATINI, R.; BOERNGEN-LACERDA, R.; FILHO, D. Z. Tratamento farmacológico do transtorno de ansiedade generalizada: perspectivas futuras. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, v. 23, n. 4, p. 233-242, dez. 2001. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/rbp/a/8zzzJyFPhyQ8hRwYKLvV58r/?lang=pt>. Acesso em: 15 jul. 2022.

ANGLIN, D.; SPEARS, K. L.; HUTSON, R. Flunitrazepam and its involvement in date or acquaintance rape. **Academic Emergency Medicine**, Philadelphia, v. 4, n. 4, p. 323- 326, abril 1998. Disponível em:

BALON, R. *et al.* The rise and fall and rise of benzodiazepines: a return of the stigmatized and repressed. **Brazilian Journal of Psychiatry**, v. 42, n. 3, p. 243-244, maio/jun. 2020. Disponível em: https://www.scielo.br/j/rbp/a/5r79GhJTc5b7fSws4vzZsyx_/?lang=en. Acesso em: 22/05/2022.

BANDELOW, B.; MICHAELIS, S. Epidemiology of anxiety disorders in the 21st century. **Dialogues in Clinical Neuroscience**, v. 17, n. 3, p. 327-335, set. 2015. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4610617/>. Acesso em 10/05/2022.

BERNIK, M. A. **Benzodiazepínicos: quatro décadas de experiência**. São Paulo: EDUSP, 1999.

BRASIL. Portaria nº 344 de 12 de maio de 1998. Dispõe sobre a aprovação de regulamento técnico sobre substâncias e medicamentos sujeitos a controle especial. **Ministério da saúde**. Brasília, DF, 12 mai. 1998. Disponível em: https://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/svs/1998/prt0344_12_05_1998_rep.html. Acesso em 30/04/2022.

CASHIN, A. G. *et al.* Efficacy, acceptability, and safety of muscle relaxants for adults with non-specific low back pain: systematic review and meta-analysis. **BMJ**, v. 374, n. 1446, p. 1-12, jun. 2021. Disponível em: <https://www.bmj.com/content/374/bmj.n1446>. Acesso em: 10 jul. 2022.

ROYAL SOCIETY OF CHEMISTRY. **Diode Array Detector**. 2022. Disponível em: <https://www.rsc.org/publishing/journals/prospect/ontology.asp?id=CMO:0002503&MSID=>. Acesso em: 08 ago. 2022.

CYBULSKA, B. Drug-facilitated rape. **Journal Of Family Planning And Reproductive Health Care**, v. 28, n. 3, p. 125-125, 1 jul. 2002. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16259825/>. Acesso em: 09 ago. 2022.

COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. **Introdução a métodos cromatográficos**, 7 ed. São Paulo: Editora UNICAMP, 1997.

CORREIA, J. M. da S.; ALVES, T. C. A. Hipnóticos. In: SILVA, P. **Farmacologia**. 6^a ed, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002. p. 358-366.

DEGANI, A. L. G.; CASS, Q. B.; VIEIRA, P. C.. Cromatografia: um breve ensaio. **Química Nova na Escola**, v. 7, p. 21-25, maio 1998. Disponível em: <http://qnesc.sbq.org.br/online/qnesc07/atual.pdf>. Acesso em: 09 ago. 2022.

EDINOFF, A. N. *et al.* Benzodiazepines: Uses, dangers and clinical considerations. **Neurology International**, v. 13, n. 4, p. 594-607, dez. 2021. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8629021/>. Acesso em: 22/05/2022.

ESTADOS UNIDOS DA AMÉRICA. Department of health and human services. Drug abuse warning networking (DAWN): National estimates of drug-related emergency department visits, 2011. Disponível em: <https://www.samhsa.gov/data/sites/default/files/DAWN2k11ED/DAWN2k11ED/DAWN2k11ED.pdf>. Acesso em: 15/05/2022.

FIORELLI, K.; ASSINI, F. L. A prescrição de benzodiazepínicos no Brasil: uma análise de literatura. **ABCS Health Science**, v. 42, n. 1, p. 40-44, abr. 2017. Disponível em: <https://pesquisa.bvsalud.org/portal/resource/pt/biblio-833095>. Acesso em: 09/05/2022.

GHIT, A. *et al.* GABA A receptors: structure, function, pharmacology, and related disorders. **Journal Of Genetic Engineering And Biotechnology**, v. 19, n. 123, p. 1-15, 21 ago. 2021. Disponível em: <https://jgeb.springeropen.com/articles/10.1186/s43141-021-00224-0>. Acesso em: 05 jul. 2022.

GREENBLATT, D. J., *et al.* Benzodiazepines: a summary of pharmacokinetic properties. **British Journal Of Clinical Pharmacology**, v. 11, p. 11-16, fev. 1981. Disponível em: <https://bpspubs.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1365-2125.1981.tb01833.x>. Acesso em: 10 jul. 2022.

GREENBLATT, D. J., *et al.* Benzodiazepine Hypnotics: kinetic and therapeutic options. **Sleep**, v. 5, n. 1, p. 18-27, 1982. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/6125022/>. Acesso em: 10 jul. 2022.

GREENBLATT, D.J. *et al.* In vitro quantitation of benzodiazepine lipophilicity: relation to in vivo distribution. **British Journal Of Anaesthesia**, v. 55, n. 10, p. 985-989, 01 out. 1983. Disponível em: [https://www.bjanaesthesia.org/article/S0007-0912\(17\)42459-7/fulltext](https://www.bjanaesthesia.org/article/S0007-0912(17)42459-7/fulltext). Acesso em: 05 ago. 2022.

GRIFFIN III, C. E. *et al.* Benzodiazepine pharmacology and central nervous system-mediated effects. **The Ochsner Journal**, v. 13, n. 2, p. 214-223, 2013. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23789008/>. Acesso em: 03 jul. 2022

LADER, M. H. Limitations on the use of benzodiazepines in anxiety and insomnia: are they justified? **European Neuropsychopharmacology**, v. 9, n. 6, p. 399-405, dez. 1999. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10622686/>. Acesso em: 12 jul. 2022.

GOETZ, T. *et al.* GABA A receptors: structure and function in the basal ganglia. **Progress In Brain Research**, v. 160, p. 21-41, 26 fev. 2009. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17499107/>. Acesso em: 03 jul. 2022

KALÍKOVÁ, K. *et al.* Separation and Quantification of 1,4-benzodiazepines: HPLC versus CZE. **Croatica Chemica Acta**, v. 84, n. 3, p. 367-373, 4 fev. 2011. Disponível em: <https://pdfs.semanticscholar.org/518f/a367d9559cf47d4e64118f802a613cd2aa71.pdf>. Acesso em: 17 abr. 2022.

KANG, M.; GALUSKA, M. A.; GHASSEMZADEH, S. **Benzodiazepine Toxicity**. Treasure Island: Statpearls Publishing (Internet), 2022. 11 p. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK482238/#!po=95.4545>. Acesso em: 09 ago. 2022.

LANÇAS, F. M. Efeitos de Temperatura em Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC). **Scientia Chromatographica**, São Carlos, v. 4, n. 1, p. 13-19, 2012. Disponível em: <https://www.iicweb.org/scientiachromatographica.com/files/v4n1a2.pdf>. Acesso em: 05 ago. 2022.

LEJOYEUX, M.; SOLOMON, J.; ADES, J. Benzodiazepine Treatment for Alcohol-Dependent Patients. **Alcohol And Alcoholism**, v. 33, n. 6, p. 563-575, 1 nov. 1998. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9872344/>. Acesso em: 03 jul. 2022.

MALDANER, L.; JARDIM, I. C. S. F. O estado da arte da cromatografia líquida de ultra eficiência. **Química Nova**, Campinas, v. 32, n. 1, p. 214-222, 2009. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/qn/a/M55tSN7MpjG5ztYGZjT4Rcm/abstract/?lang=en>. Acesso em: 08 ago. 2022

MANDRIOLI, Roberto; MERCOLINI, Laura; RAGGI, Maria. Benzodiazepine Metabolism: an analytical perspective. **Current Drug Metabolism**, v. 9, n. 8, p. 827-844, 1 out. 2008. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18855614/>. Acesso em: 05 ago. 2022.

MEHDI, T. Benzodiazepines revisited. **British Journal of Medical Practitioners**, v. 5, n. 1, mar. 2012. Disponível em: <https://www.bjmp.org/content/benzodiazepines-revisited>. Acesso em: 10/05/2022.

MONTI, J. M. Insônia primária: diagnóstico diferencial e tratamento. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, v. 22, n. 1, p. 31-34, mar. 2000. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/rbp/a/zVtNFkkwpgG5ggfmQWchBft/abstract/?lang=en>. Acesso em: 05 jul. 2022.

NILSSON, A. Pharmacokinetics of benzodiazepines and their antagonists. **Baillière'S Clinical Anaesthesiology**, v. 5, n. 3, p. 615-634, dez. 1991. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0950350105800467>. Acesso em: 03 ago. 2022.

OCHOA, J. G.; KILGO, W. A. The Role of Benzodiazepines in the Treatment of Epilepsy. **Current Treatment Options In Neurology**, v. 18, n. 4, p. 1-11, 29 fev. 2016. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26923608/>. Acesso em: 12 jul. 2022

OGA, S.; CAMARGO, M. M. de A.; BATISTUZZO, J. A. de O. **Fundamentos da toxicologia**. 3ª edição, São Paulo: Editora Atheneu, 2008.

PAPADOYANNIS, I. N.; GIKA, H. G. Peak Purity Determination with a Diode Array Detector. **Journal Of Liquid Chromatography & Related Technologies**, v. 27, n. 6, p. 1083-1092, 2004. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1081/JLC-120030180>. Acesso em: 03 ago. 2022.

PASSAGLI M.; VALADÃO, F. N. Benzodiazepínicos. *In*: PASSAGLI, M. **Toxicologia forense: Teoria e Prática**, 5ª ed. Campina: Editora Millenium, 2018.

PEREIRA, C. U.; SANTOS, C. M. T.; SANTOS, E. A. S. Tratamento medicamentoso da espasticidade. **Jornal Brasileiro de Neurocirurgia**, v. 14, n. 2, p. 55-59, ago. 2003. Disponível em: <https://jbnc.emnuvens.com.br/jbnc/article/view/441>. Acesso em: 03 jul. 2022.

RISS, J. *et al.* Benzodiazepines in epilepsy: pharmacology and pharmacokinetics. **Acta Neurologica Scandinavica**, v. 118, n. 2, p. 69-86, ago. 2008. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18384456/>. Acesso em: 15 jul. 2022.

SACHDEVA, A.; CHOUDHARY, M.; CHANDRA, M. Alcohol Withdrawal Syndrome: benzodiazepines and beyond. **Journal Of Clinical And Diagnostic Research**, v. 9, n. 9, p. 1-7, set. 2015. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4606320/pdf/jcdr-9-VE01.pdf>. Acesso em: 03 jul. 2022.

SIMMONS, M. M.; CUPP, M. J. Use and Abuse of Flunitrazepam. **The Annals Of Pharmacotherapy**, v. 32, n. 1, p. 117-119, jan. 1998. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9475831/>. Acesso em: 09 ago. 2022.

SLEE, A. *et al.* Pharmacological treatments for generalised anxiety disorder: a systematic review and network meta-analysis. **The Lancet**, v. 393, n. 10173, p. 768-777, fev. 2019. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30712879/>. Acesso em: 12 jul. 2022.

SULTAN, S; EL MUBARAK, A. High performance liquid chromatographic method for the separation and quantification of some psychotherapeutic benzodiazepines optimized by the modified simplex procedure. **Talanta**, v. 43, n. 4, p. 569-576, abr. 1996. Disponível em:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/0039914095017720>. Acesso em: 9 abr. 2022.

TAKITANE, J. *et al.* Aspectos médico-legais das substâncias utilizadas como facilitadoras de crime. **Saúde Ética & Justiça**, v. 22, n. 2, p. 66-71, 12 dez. 2017. Disponível em: <https://www.revistas.usp.br/sej/article/view/145418>. Acesso em: 09 ago. 2022.

WICK, J. Y. The history of benzodiazepines. **The consultant pharmacist: the journal of the american society of consultant pharmacists**. v. 28 , n. 9, p. 538-548, set. 2013. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24007886/>. Acesso em 30/04/2022.

WOODS, J. H.; KATZ, J. L.; WINGER, G. Benzodiazepines: use, abuse and consequences. **Pharmacological Reviews**, v. 44, n. 2, p. 151-347, jul. 1992. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/21799986_Woods_JH_Katz_JLWinger_G_Benzodiazepines_use_abuse_and_consequences_Pharmacol_Rev_44_151-347. Acesso em: 14/05/2022.

ZHANG, W., *et al.* Extraction and Analysis of Tetrahydrocannabinol, A Cannabis Compound in Oral Fluid. **International Journal Of Biology**, v. 9, n. 1, p. 30-35, 2017. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/312019034_Extraction_and_Analysis_of_Tetrahydrocannabinol_A_Cannabis_Compound_in_Oral_Fluid. Acesso em: 03 ago. 2022.