

UNIVERSIDADE DO SAGRADO CORAÇÃO

BÁRBARA RODRIGUES

LARISSA CRISTINA SILVA DOS SANTOS

**VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA ANALÍTICA
CROMATOGRÁFICA PARA DETERMINAÇÃO DE
FÁRMACOS ANTIPSICÓTICOS EM URINA**

BAURU
2014

BÁRBARA RODRIGUES
LARISSA CRISTINA SILVA DOS SANTOS

**VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA ANALÍTICA
CROMATOGRÁFICA PARA DETERMINAÇÃO DE
FÁRMACOS ANTIPSICÓTICOS EM URINA**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Centro de Ciências da
Saúde, como parte do requisito para a
obtenção do título de Bacharel em
Biomedicina, sob orientação do Prof. Me.
Fernando Tozze Alves Neves.

BAURU
2014

Rodrigues, Bárbara.

R6961v

Validação de metodologia analítica cromatográfica para determinação de fármacos antipsicóticos em urina / Bárbara Rodrigues; Larissa Cristina Silva dos Santos. -- 2014.
34f. : il.

Orientador: Prof. Me. Fernando Tozze Alves Neves.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Biomedicina) – Universidade do Sagrado Coração – Bauru – SP.

1. Antipsicóticos. 2. Fenotiazínicos. 3. CCD. 4. Urina. 5. FPN. I. Santos, Larissa Cristina Silva dos. II. Neves, Fernando Tozze Alves. III. Título.

BÁRBARA RODRIGUES
LARISSA CRISTINA SILVA DOS SANTOS

**VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA ANALÍTICA CROMATOGRÁFICA
PARA DETERMINAÇÃO DE FÁRMACOS ANTIPSICÓTICOS EM
URINA**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Centro de Ciências da Saúde, como parte do requisito para a obtenção do título de Bacharel em Biomedicina, sob orientação do Prof. Me. Fernando Tozze Alves Neves.

Banca Examinadora:

Prof. Me. Fernando Tozze Alves Neves
Universidade do Sagrado Coração

Prof. Dr Silvana Torossian Coradi
Universidade do Sagrado Coração

Prof. Ms Márcia Clélia Leite Marcellino
Universidade do Sagrado Coração

Bauru, 04 de Dezembro de 2014.

Dedico este trabalho, à
minha família e amigos que
com muita paciência e
carinho me apoiaram.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por me dar forças para lutar e seguir em frente nos desafios da vida, a minha mãe Marimirce Valário Rodrigues que me dá sempre um apoio e sempre segurando minha mão quando preciso, ao meu pai Ronaldo Antônio Crespo Rodrigues que sempre me apoiou e me ajudou em todas as decisões a serem tomadas até aqui e que me deu a oportunidade de cursar a faculdade, ao meu irmão Victor Bruno Rodrigues que me irrita muito mas sempre me aconselhou em tudo e ao meu namorado Julio Cesar Lopes Batistão que é meu companheiro em tudo e me ajuda sempre em tudo que preciso.

Bárbara Rodrigues

Primeiramente agradeço a Deus por estar sempre comigo me fortalecendo a cada novo dia, aos meus pais Miriam de Souza Silva dos Santos e Laercio Xavier dos Santos por serem meu porto seguro, sempre me apoiarem e nunca medirem esforços pra me ajudarem e me dar o melhor, a minha irmã Alyne Fernanda Silva dos Santos que desde o berço é minha melhor amiga, ao meu namorado Moises Isidoro dos Santos por sempre estar do meu lado me ajudando em tudo, a minha companheira de trabalho Bárbara Rodrigues por toda ajuda, ao nosso orientador Prof. Me. Fernando Tozze Alves Neves pela paciência e confiança depositada em nós e, não poderia de deixar de agradecer também as minhas amigas Luize, Tamara, Tamiris e Gabriela que sempre me ajudam e sempre entendem meus momentos de ausência.

Larissa Santos

RESUMO

Os medicamentos representam uma das mais importantes classes de substâncias registradas nas avaliações anuais nos Centros de Controle de Intoxicação (CCI). A maior parte dos medicamentos encontrados em casos de intoxicação são os psicotrópicos, principalmente antidepressivos tricíclicos, benzodiazepínicos e antipsicóticos. Visto que os antipsicóticos contam com alto poder para promover intoxicações, o recurso analítico nas investigações toxicológicas deve ser considerado como uma ferramenta importante e auxiliar no diagnóstico clínico. Entretanto, o tipo e os parâmetros do método analítico a serem utilizados devem ser conhecidos, para se garantir a confiabilidade do laudo toxicológico. Sendo assim, este trabalho teve objetivo avaliar os parâmetros de validação do método de cromatografia em camada delgada para a determinação de fármacos antipsicóticos em urina. Para a realização dos testes foram utilizadas cinco diferentes concentrações (100/50/10/1/0,1ppm) dos fármacos antipsicóticos fenotiazínicos clorpromazina, flufenazina e prometazina diluídos em urina e avaliados quanto aos aspectos de sensibilidade e especificidade com os reativos de DRAGGENDORF e FPN. A partir dos resultados obtidos, foi possível verificar que o reativo que apresentou melhor sensibilidade foi o DRAGENDORFF no fármaco prometazina na concentração de 1 ppm, entretanto nenhum dos fármacos apresentou especificidade adequada quanto a capacidade de diferenciar os fármacos testados. Dessa forma, consideramos necessária a combinação de outros métodos de ensaios imediatos para se tentar otimizar a confiabilidade no laudo toxicológico. Esta combinação pode ser útil para fazer com que as análises toxicológicas tenham maior precisão e confiabilidade, facilitando a obtenção dos resultados e o possível tratamento da intoxicação em tempo adequado.

Palavras Chave: Fenotiazínicos. Cromatografia em Camada Delgada. Urina. Reativo FPN. Dragendorff

ABSTRACT

The medicines represent one of the most important classes of substances registered on the annual evaluations in the Poison Control Centers (PCC). Most medicines found in poisoning cases are the psychotropic drugs, especially tricyclic antidepressants, benzodiazepines and antipsychotics. Since the antipsychotics have a high power to cause poisonings, the analytical tool in the toxicology investigations must be considered important and must help in the clinical diagnosis. However, the types and parameters of the analytical method to be used must be known in order to guarantee the reliability of the toxicology report. Thus, this study aimed to evaluate the validation parameters of the thin-layer chromatography method for the determination of antipsychotic medicines in the urine. In order to carry out the tests, we used five different concentrations ((100/50/10/1/0,1ppm) of the antipsychotic medicines – phenothiazine, chlorpromazine, promethazine, fluphenazine - diluted urine. We evaluated sensitivity and specificity aspects with FPN and Dragendorff's reagents. Based on the results obtained, we were able to verify the reagent that showed the best sensitivity was the Dragendorff's in the promethazine medicine in the concentration of 1 ppm. However, no medicine showed an appropriate specificity regarding the capacity to differentiate the medicines tested. Thus, we consider the combination of other immediate methods of testing necessary to try to optimize the toxicological report reliability. Such combination can be useful to make the toxicology analyzes more accurate and reliable, facilitating the achievement of results and the possible poisoning treatment in appropriate time.

Keywords: Phenothiazines. PCC. Urine. Reactive FPN. Dragendorff

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	Núcleo fenotiazínico	12
Figura 2	Substituições no anel fenotiazínico	13
Figura 3	Sequência metodológica	23
Figura 4	Aplicação das amostras na placa cromatográfica	24
Figura 5	Análise cromatográfica dos padrões de fenotiazínicos com a revelação com o reagente cromatogênico FPN	26
Figura 6	Análise cromatográfica dos padrões de fenotiazínicos com a revelação com o reagente cromatogênico DRAGENDORFF	27
Figura 7	Análise cromatográfica das amostras de fenotiazínicos com a revelação com o reagente cromatogênico FPN	28
Figura 8	Análise cromatográfica das amostras de fenotiazínicos com a revelação com o reagente cromatogênico DRAGENDORFF	29

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	10
2	DESENVOLVIMENTO	12
2.1	ASPECTOS QUÍMICO-FARMACOLÓGICOS DOS ANTIPSICÓTICOS FENOTIAZÍNICOS	12
2.2	ASPECTOS TOXICOLÓGICOS DOS ANTIPSICÓTICOS FENOTIAZÍNICOS.....	14
2.3	ANÁLISES TOXICOLÓGICAS EM TRIAGEM DE FÁRMACOS	15
2.4	FLUIDO BIOLÓGICO COMO AMOSTRA TOXICOLÓGICA: URINA.....	17
2.5	CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA.....	17
2.5.1	Princípios da cromatografia.....	17
2.5.2	Fase estacionária	18
2.5.3	Fase móvel.....	19
2.5.4	Aplicação e Revelação	19
3	OBJETIVOS	21
3.1	OBJETIVO GERAL	21
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	21
4	METODOLOGIA	22
4.1	MATERIAIS	22
4.2	MÉTODOS	22
4.2.1	Preparo das soluções padrões.....	22
4.2.2	Preparo das soluções amostras.....	23
4.3	ANÁLISES ESTATÍSTICAS	25
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	26
6	CONCLUSÃO	31
7	CONSIDERAÇÕES FINAIS	32
	REFERÊNCIAS	33

1 INTRODUÇÃO

No Brasil, os medicamentos representam a principal classe de agente tóxico segundo dados do Sistema Nacional de Informações Tóxico Farmacológicas (SINITOX). No ano de 2011, 29,47% das intoxicações ocorridas foram por medicamentos, sendo a circunstância principal a tentativa de suicídio com 11402 casos registrados. (SINITOX, 2014).

Segundo dados do Centro de Controle de Intoxicação da Prefeitura do Município de São Paulo (CCI-SP) nos anos de 1998 a 2002, os medicamentos corresponderam ao maior número de intoxicações humanas com 43,4% do total de ocorrências. (MOREAU, 2008).

Segundo a Associação Americana de Centros de Controle de Intoxicação as classes de medicamentos mais utilizadas nas tentativas de suicídio são analgésicos, anestésicos e anticonvulsivantes. Já no Brasil os psicotrópicos como os antidepressivos tricíclicos, os benzodiazepínicos e os antipsicóticos representam as classes utilizadas com mais frequência nestes casos. (FERNANDES et al., 2006; NETO et al., 2009).

Dentre os medicamentos psicotrópicos, os antipsicóticos constituem uma classe de grande importância toxicológica. Os derivados fenotiazínicos por sua vez são considerados um dos mais importantes grupos de medicamentos desta classe na prática clínica, sendo assim, sua utilização também está associada ao frequente aparecimento das intoxicações por medicamentos. (SCHVARTSMAN, 1991).

Nestes casos a toxicologia de urgência representa a principal ferramenta de resolução na prática clínica aplicada, sendo utilizados diversos tipos de metodologias analíticas. Tais metodologias devem apresentar características adequadas para determinar o tipo de agente tóxico presente nas diferentes amostras biológicas disponíveis, assim como, quando necessário, identificar e quantificar o composto. (CAZENAVE, 2008).

A urina é um fluido biológico extensamente utilizado em análises toxicológicas, principalmente as de emergência, pois é uma das matrizes com menor número de interferentes endógenos, uma vez que é constituída principalmente por água e somente apresenta níveis significativos de proteínas e lipídios em estados patológicos. Além disso, quando comparada ao sangue, a urina frequentemente apresenta concentrações mais altas de xenobióticos e/ou seus produtos de

biotransformação. Devido a sua correlação com os efeitos ser baixa devido a grande variedade de fatores que afetam a taxa de excreção de determinado composto e o volume urinário, os resultados obtidos nas análises feitas em urinas estabelece somente resultados qualitativos. (COSTA, 2008)

Como os medicamentos constituem os maiores responsáveis pelas emergências toxicológicas, a Cromatografia em Camada Delgada (CCD) é uma das técnicas analíticas mais utilizadas pelos Centros de Controle de Intoxicação, para uma triagem dos possíveis agentes envolvidos nos casos de intoxicação aguda. (MOREAU, 2008).

A CCD consiste num método analítico de separação dos constituintes de uma mistura pela migração diferencial destas substâncias em duas fases: uma estacionária e a outra móvel. A separação é realizada devido as diferentes características químicas de cada substância e a sua afinidade por uma das fases. (LOPES, 2006).

Entretanto para que ocorra a correta utilização das informações qualitativas obtidas a partir de uma análise em CCD, torna-se importante conhecer as características de validação desta metodologia com o objetivo de otimizar o método de forma a proporcionar melhores resultados no laudo toxicológico final.

2 DESENVOLVIMENTO

2.1 ASPECTOS QUÍMICO-FARMACOLÓGICOS DOS ANTIPSICÓTICOS FENOTIAZÍNCOS

Em 1930, os antipsicóticos foram utilizados pela primeira vez como drogas sedativas e, posteriormente, com pré-anestésicos. Somente em 1950 o medicamento passou a ser utilizado para o tratamento de doenças mentais como: esquizofrenia, distúrbios bipolares, surtos de agressividade e outras psicoses. Eles também possuem outros usos que, porém, são menos difundidos como potencializadores de analgésicos, sedativos e anestésicos, além do tratamento da alucinação alcoólica não associada a abstinência. (SILVA, 2010).

A fórmula estrutural das fenotiazinas (Figura 1) é formada por estruturas tricíclicas e, seus derivados, são formados a partir da substituição de um átomo de carbono em um dos anéis benzeno na posição dois (é essencial à atividade antipsicótica) e, no átomo de nitrogênio do anel piridínico na posição dez. Os fenotiazínicos podem ser divididos em até três grupos: alifáticos, piperidínicos ou piperazínicos e, são divididas segundo o tipo de substituição no nitrogênio aromático. Dependendo da estrutura química algumas fenotiazinas são mais ou menos sedativas e, podem produzir, ou não, hipotensão. (MORAIS; OLIVEIRA, 2010).

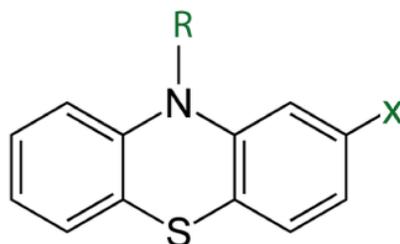


Figura 1 – Núcleo fenotiazínico.
Fonte: KOROLKOVAS; BURCKHALTER (2008).

Segundo estudos sobre a relação estrutura-atividade, conclui-se que as características estruturais relacionadas com a alta potência antipsicótica são: sistema anelar tricíclico com seis ou sete membros no anel central, uma cadeia de três átomos entre o anel central e o grupo amino terminal e/ou um átomo ou Grupo que atrai elétrons. Com bases livre, os fenotiazínicos são insolúveis em água por

isso, são usados geralmente como sais (cloridratos) que se apresentam como pó cristalino branco e solúvel em água. (KOROLKOVAS; BURCKHALTER, 2008).

Os fenotiazínicos possuem como fórmula química estrutural três anéis, na qual dois benzênicos se ligam ao enxofre e ao nitrogênio. As substituições podem ocorrer nas posições 2 e 10 (Figura 2). Sendo assim, com as possíveis alterações, os compostos alifáticos se tornam mais sedativos sendo seguidos pelos compostos piperídínicos e posteriormente os compostos piperazínicos que são menos sedativos porém, mais estimulantes que as duas classes citadas anteriormente. (LARINI, 1987).

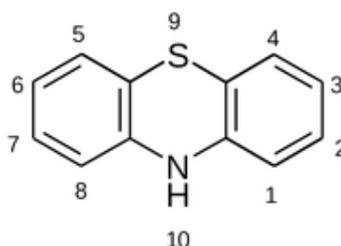


Figura 2 – Substituições no anel fenotiazínico.
Fonte: KOROLKOVAS; BURCKHALTER (2008).

Os antipsicóticos são indicados para o tratamento de problemas psiquiátricos como transtornos esquizoafetivo, esquizofrenias, estados de citação não maníaco, síndrome de Tourette, controle de náuseas e vômitos, pré-medicação cirúrgica, tratamento de soluços incoercíveis e Coreia de Huntington. (SILVA, 2010, p. 75).

Esses compostos são administrados muitas vezes por via parenteral ou oral e, são absorvidos através do trato gastrointestinal. Suas maiores concentrações são encontradas nos pulmões, fígado e baço. Segundo alguns autores é possível que existam, teoricamente, 168 produtos de biotransformação resultantes de diversas reações, entre elas: Reação de hidroxilação, N-oxidação, mono e bidimetilação, oxidação da cadeia lateral, formação de sulfóxidos e, ainda pela conjugação com o UDPGA ou com o PAPS. (LARINI, 1987).

Sua absorção gastrointestinal é errática e sua biodisponibilidade por via parenteral é de 4 a 10 vezes maior por se tratarem de drogas extremamente lipossolúveis, com meia-vida prolongada (20 a 40 horas), grande volume de distribuição e alto valor de ligação proteica o que explica o fato de uma diálise no tratamento desta intoxicação ser ineficaz. Além disso, os antipsicóticos podem

atravessar a barreira hematoencefálica e, também podem ser encontrados no leite materno. Sua eliminação do organismo ocorre somente após glucoronização hepática que ocorre tanto pela via urinária quanto pela biliar. (SILVA, 2010).

Os fenotiazínicos são agentes bloqueadores centrais da dopamina. Eles exercem essa função em todas as quatro grandes vias dopaminérgicas cerebrais. Os efeitos extrapiramidais são vinculados à via Nigro-estriatal; a elevação da prolactina e outros efeitos neuroendócrinos à sua ação na via túbero-infundibular, e efeitos antipsicóticos e eventuais efeitos adversos cognitivos ao bloqueio mesolímbico e mesocortical respectivamente. (FROTA, 2003)

2.2 ASPECTOS TOXICOLÓGICOS DOS ANTIPSICÓTICOS FENOTIAZÍNICOS

Desde os tempos pré-históricos os efeitos, causados pelos medicamentos, já eram conhecidos pelos povos primitivos pelo fato deles, intuitivamente, procurarem na natureza fonte para a cura de seus males físicos e mentais. A partir daí o homem vem até os dias de hoje sendo exposto a substâncias químicas que, quando interagem com o organismo resultam em reações benéficas adversas ou em intoxicações quando em doses excessivas. (OGA; CAMARGO; BASTITUZZO, 2008).

A intoxicação, sob todos seus aspectos, é o foco principal do estudo da toxicologia. Para isso, podemos entender, que a intoxicação nada mais é que a manifestação clínica e/ou laboratorial de efeitos causados pela interação do agente tóxico com o organismo causando uma patologia. Para isso o agente tóxico conta com fatores que são de extrema importância para sua ação como: solubilidade, grau de ionização e sua excreção. Esses compostos agem ao nível do sistema nervoso central e provocam o bloqueio da transmissão dopaminérgica. Quando se trata de sistema nervoso autônomo eles são fracamente anticolinérgicos, anti-histamínicos, anti-serotoninérgicos e bloqueadores alfa adrenérgicos. Segundo diversos autores eles não causam dependência, porém exigem devida orientação e receita médica e controle de venda e uso. (LARINI, 1997).

Além dos efeitos terapêuticos essas drogas também podem produzir efeitos tóxicos como: alterações hematológicas (casos fatais de granulocitose, ocorrência de trombocitopenia, anemia e leucopenia discretas), alterações hepáticas (hepatite obstrutiva secundária ao edema da célula hepática) e sintomas extrapiramidais

(síndrome idêntica ao parkinsonismo). Portanto apesar de termos um vasto número de produtos, a escolha para uso de um antipsicótico deve ser feita de forma cautelosa, sempre fazendo uma comparação entre sua eficácia no controle de sintomas e seu efeito tóxico. (OGA; CAMARGO; BASTITUZZO, 2008).

2.3 ANÁLISES TOXICOLÓGICAS EM TRIAGEM DE FÁRMACOS

As análises toxicológicas são requisitadas sempre que se faz necessário prevenir, esclarecer e verificar uma intoxicação. Também auxiliam no tratamento mostrando o perfil clínico da depuração em andamento. (MORAES; SZNELWAR; FERNICOLA, 1991).

Em situações de urgência, é realizada uma sequência de procedimentos analíticos para se identificar, confirmar e quantificar os compostos químicos. (MOREIRA; CALDAS, 2001).

Sua característica fundamental é que a substância química de interesse possui forte ligação com uma matriz biológica, porém este processo deve ser analisado previamente, pois, pode haver alteração de resultados por causa da escolha errônea da matriz biológica. Obrigatoriamente são feitas quatro perguntas antes de se realizar a análise: “Para quê?”; “O quê?”; “Onde?” e “Como?”. (MORAES; SZNELWAR; FERNICOLA, 1991).

Segundo Moreira; Caldas (2001) o “Para quê?” trata da finalidade da realização da análise, portanto, é ela que orienta o planejamento analítico. Quando a análise é utilizada para esclarecimento ela é conhecida como “análise toxicológica de urgência” e deve ser realizada dentro de um prazo de até 24 horas. Quando se trata de uma confirmação de uma intoxicação aguda ou não, quase sempre, o pedido se prende a um diagnóstico preferencial. Nos dois casos a análise é utilizada para pesquisa de uma substância desconhecida e/ou quantificação do tóxico para se verificar a eficácia do tratamento.

É de extrema necessidade o conhecimento prévio do toxicante e, essa resposta é avaliada na pergunta “O quê?”. Deve-se conhecer a toxicocinética e a toxicodinâmica para saber se a análise será dirigida para o agente químico precursor e/ ou a um de seus produtos de biotransformação e, também se há necessidade de se avaliar algum indicador que aponte o efeito do toxicante no organismo. Geralmente os toxicantes são agrupados de acordo com suas propriedades físico-

químicas e, no organismo se encontram ligados às proteínas. (MORAES; SZNELWAR; FERNICOLA, 1991).

A definição da amostra a ser utilizada da resposta a pergunta “Onde?”. A amostra selecionada é aquela que melhor representa a biodisponibilidade, a eliminação ou o efeito do toxicante no organismo. Se a finalidade da análise for para esclarecimento de intoxicação letal a matriz será proveniente do material de necropsia (tecidos, fluídos e órgãos). Em intoxicações agudas o sangue e/ou urina são as amostras mais utilizadas. Líquidos de diálise são indicados para acompanhamento do tratamento e medicamentos, alimentos, vômito e líquido de lavagem gástrica encontrados juntos ao paciente também são de suma importância. (MOREIRA; CALDAS, 2001).

Para resposta da última questão “Como?”, deve ser definido o método que será utilizado para análise. O método deve possuir exatidão, precisão e alta sensibilidade devido a baixa concentração do toxicante ou de seu produto de biotransformação na amostra. (MORAES; SZNELWAR; FERNICOLA, 1991).

Em qualquer método a sequência da análise toxicológica compreende três fases: a separação onde o analisando é retirado da matriz, a extração onde ele é concentrado e purificado e depois a identificação. Para uma boa interpretação dos resultados a análise deve ser realizada junto com uma amostra negativa (branco). (MORAES; SZNELWAR; FERNICOLA, 1991).

A escolha do método de triagem é fundamental, pois define a gama de analitos que serão procurados e detectados. Sendo assim o método deverá ter sensibilidade e abrangência para ser suficiente. Em geral, para análises de urgência a urina é a principal amostra a ser utilizada e, o sangue, é a amostra de escolha para quantificação. Os maiores responsáveis pelas emergências toxicológicas são os medicamentos e, para uma triagem dos possíveis agentes envolvidos nos casos de intoxicação aguda uma técnica bastante empregada pelos centros de controle de intoxicação é a Cromatografia em Camada Delgada (CCD). A amostra biológica de escolha para essa triagem é a urina, pois é de fácil coleta, está disponível em grandes volumes e, geralmente a concentração da maioria das substâncias na urina é maior que a do sangue. (MOREAU, 2008).

2.4 FLUIDO BIOLÓGICO COMO AMOSTRA TOXICOLÓGICA: URINA

A urina é considerada uma matriz como o menor número de interferentes endógenos, por ser constituída principalmente por água. Por esse motivo ele é muito utilizada nas análises toxicológicas. (COSTA, 2008).

Segundo Silva (2010), “[...] a via renal constitui a principal via de excreção de drogas. Por esse motivo, nesse trabalho, utilizamos a amostra de urina como amostra principal”.

Para se ter uma análise confiável os cuidados devem ter início no momento da coleta do material que será analisado. A coleta, da amostra de urina, deve ser realizada em um frasco que tenha o tamanho adequado para o volume que irá ser utilizado para a análise (geralmente 50mL). É importante também observar as características físico-químicas do analito que irá ser determinado para se escolher o frasco apropriado, se de plástico ou vidro, pois alguns analitos exigem que o recipiente seja de vidro, porém, na maioria das vezes pode-se usar frascos comuns de plástico.. Quando comparada ao sangue, ela pode apresentar concentrações bem mais altas de xenobióticos e/ou produtos de transformação. Graças a essas características ela passou a ser utilizada, como principal amostra, em muitas técnicas entre elas a Cromatografia em Camada Delgada (CCD). (COSTA, 2008).

Muitas vezes a coleta da urina é inviável, principalmente em uma análise toxicológica de urgência onde o indivíduo encontra-se desacordado portanto, pela questão do tempo de espera para coleta da amostra, a análise se torna inviável. Quando a coleta é realizada e se tem uma continuidade da análise, os resultados obtidos revelam apenas que a substância estava no organismo (teste qualitativo), pois mesmo sendo uma matriz de extrema importância, sua correlação com os efeitos é baixa devido à variedade de fatores que afetam a taxa de excreção de determinado composto e o volume urinário. (KLASSEN, 2008).

2.5. CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA

2.5.1 Princípios da cromatografia

A Cromatografia em Camada Delgada é considerada um método para triagem de substâncias desconhecidas devido à sua simplicidade, baixo custo e habilidades de gerar vários parâmetros de referência, num curto espaço de tempo. Para isto,

previamente, há necessidade de que se faça um bom trabalho de padronização, para que se possa conhecer o comportamento das substâncias frente aos sistemas-solventes e agentes cromogênicos. (MORAES; SZNELWAR; FERNICOLA, 1991).

A técnica de separação por CCD consiste na separação de compostos de uma mistura pelo diferencial de migração desses compostos entre a fase estacionária e a móvel. A fase estacionária é uma camada fina formada por um sólido granulado e depositada sobre uma placa de vidro, alumínio ou outro suporte inerte. A fase móvel é uma mistura de solventes que é polarizada de acordo com a natureza química a serem separadas. As amostras à serem analisadas são extraídas pelo método de extração líquido-líquido e posteriormente levadas a evaporação do solvente e ressuspensas para a aplicação junto com as soluções padrão em pontos próximos ao extremo inferior da placa, sempre tomando cuidado para que eles não fiquem mergulhados na fase móvel e mantenham a distância adequada entre as aplicações adjacentes. (MOREAU, 2008).

Como já dito, a fundamentação da técnica é feita no processo de separação que é baseado na adsorção, porém, essa separação, também pode ocorrer por participação ou troca iônica, quando são usadas fases estacionárias tratadas, o que faz com que esse método seja útil na separação de substâncias hidrofóbicas e hidrófilas. Os adsorventes mais utilizados são: a sílica, alumina, celulose e poliamida. (BAILEY, 2004).

O campo das análises toxicológicas de urgência e a CCD como técnica de triagem exigem uma padronização prévia do comportamento das substâncias de interesse para ser usada como referência no conhecimento do analito desconhecido. A escolha dos fármacos a serem padronizados deve ser feita de acordo com sua natureza: ácida, neutra ou alcalina e, o procedimento deve ser realizado com sistemas e reagentes cromogênicos adequados. Após a realização de todo procedimento, as manchas reveladas pela amostra desconhecida devem ser comparadas com a padronização para, a partir daí se reconhecer a substância. (MOREAU, 2008).

2.5.2 Fase estacionária

A fase estacionária é uma fina camada formada por um sólido granulado onde será feita a aplicação para análise e posteriormente será colocada em uma cuba

contendo a fase móvel. Ela pode ser formada por sílica, alumina ou poliamida. (MOREAU, 2008).

A sílica (SiO_2) é um material altamente poroso e, sem sombra de dúvidas, é um dos adsorventes mais utilizados na cromatografia por adsorção. Possui caráter fracamente ácido que pode ser aumentado devido à presença de impurezas ácidas fazendo que ocorra, por consequência do aumento do caráter ácido, fenômenos de quimiosorção de bases ou reações ácido-catalisadas. (COLLINS; BRAGA; BONATO, 2006).

A alumina (Al_2O_3), depois da sílica, é o adsorvente mais utilizado. Possui caráter alcalino, mas depois de sua preparação pode adquirir características neutra e ácida. Antes de ser utilizada deve-se atentar para o fato de que ela pode catalisar diversas reações orgânicas. É utilizada principalmente na separação de compostos lipofílicos e na separação de substâncias que possuem variação de pH entre ácido, neutro e alcalino. (COLLINS; BRAGA; BONATO, 2006).

Segundo Lopes (1987) a celulose é empregada como suporte na fase estacionária líquida da cromatografia pelo princípio de participação o troca iônica. Ela é utilizada na separação de nucleotídeos, proteínas e ácidos nucléicos. Possui a vantagem de ter um desenvolvimento mais rápido e sensibilidade aumentada.

2.5.3 Fase móvel

O solvente utilizado na fase móvel deve ser escolhido cuidadosamente visto que, podem ocorrer alterações na separação das substâncias caso ele seja escolhido de forma errônea. É necessário considerar a natureza química das substâncias que serão separadas e do solvente para que haja um bom desenvolvimento cromatográfico e a análise seja concluída com sucesso. (COLLINS; BRAGA; BONATO, 2006).

2.5.4 Aplicação e Revelação

Após a evaporação da extração, os resíduos das amostras são ressuspendidos e são aplicados cuidadosamente nas cromatoplasas. Deve-se observar que deve ser deixada uma distância entre as aplicações. (LOPES, 1987)

O conjunto seco, com os pontos já aplicados, é colocado em uma cuba que contém a fase móvel. A partir daí tem-se início o desenvolvimento cromatográfico, onde os componentes são separados por diferença de velocidade, em função do avanço da fase móvel sobre a fase estacionária pela capilaridade e das diferentes forças de interação com a fase estacionária. Após o desenvolvimento as placas são secas e depois são reveladas, normalmente, por agentes cromogênicos. (MOREAU, 2008).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar os parâmetros de validação do método de cromatografia em camada delgada para a determinação de fármacos antipsicóticos em urina.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a sensibilidade do método de cromatografia em camada delgada para as amostras de urina contendo os compostos antipsicóticos.
- Avaliar a especificidade do método de cromatografia em camada delgada para as amostras de urina contendo os antipsicóticos.

4 METODOLOGIA

4.1 MATERIAIS

Para a realização das análises cromatográficas em camada delgada (CCD) foram utilizadas fitas de pH (MACHERY-NAGEL), pipetador automático (KACIL), ponteiras, placa de sílica gel 60 (MACHERY-NAGEL), balança analítica (SARTORIUS; MARTE/BL210S; AL500), agitador magnético com aquecimento (TECNAL/TE-0851), agitador de tubos (IKA) e banho de ultrassom. (UNIQUE/ULTRA CLEANER 1400).

4.2 MÉTODOS

Para a realização da pesquisa de compostos orgânicos em fluido biológico (urina) foi utilizada uma metodologia adaptada de Moraes; Sznelwar; Fernicola (1991) e Moreau (2008).

4.2.1 Preparo das soluções padrões

Para a realização dos testes em cromatografia em camada delgada foram utilizados os padrões dos fármacos antipsicóticos fenotiazínicos: clorpromazina, flufenazina e prometazina.

Para a padronização das placas cromatográficas foram pesados exatamente 10 mg de cada fármaco e diluídos com metanol para as concentrações de 100, 50, 10, 1 e 0,1 ppm (mg/L). Posteriormente todas as concentrações foram evaporadas totalmente em capela e ressuspendidas com 1 mL de metanol para a aplicação nas placas.

As cromatoplasmas de sílica gel 60 foram aquecidas a 105°C durante 30 minutos para ativação. Posteriormente 50 µl de cada padrão dos fármacos foram aplicados separadamente na placa cromatográfica e colocados para eluição em cuba cromatográfica (previamente saturada durante 15 minutos) contendo a mistura de solventes metanol:hidróxido de amônia a 25% (100:1,5), percorrendo uma distância máxima de 10 cm. Após o término da corrida do solvente, a placa foi levada a capela para favorecer a evaporação dos solventes residuais e posteriormente serão aplicados os reativos cromatogênicos.

Após a revelação dos fármacos com os reativos cromatogênicos, foi realizado o cálculo do Fator de Retenção, sendo este procedimento realizado para identificar previamente o tipo de coloração a ser formada na reação entre cada fármaco padrão utilizado e os reativos cromatogênicos, assim como a determinação distância percorrida na cromatoplaça como base para o cálculo do Rf (medida da distância percorrida pela amostra dividida pela distância percorrida pela fase móvel).

4.2.2 Preparo das soluções amostras

Para a realização dos testes de sensibilidade e especificidade inicialmente foram pesados 10 mg dos fármacos (clorpromazina, flufenazina e prometazina) e diluídos para as concentrações de 100, 50, 10, 1 e 0,1 ppm (mg/L) com urina e realizados conforme esquema abaixo (Figura 3).

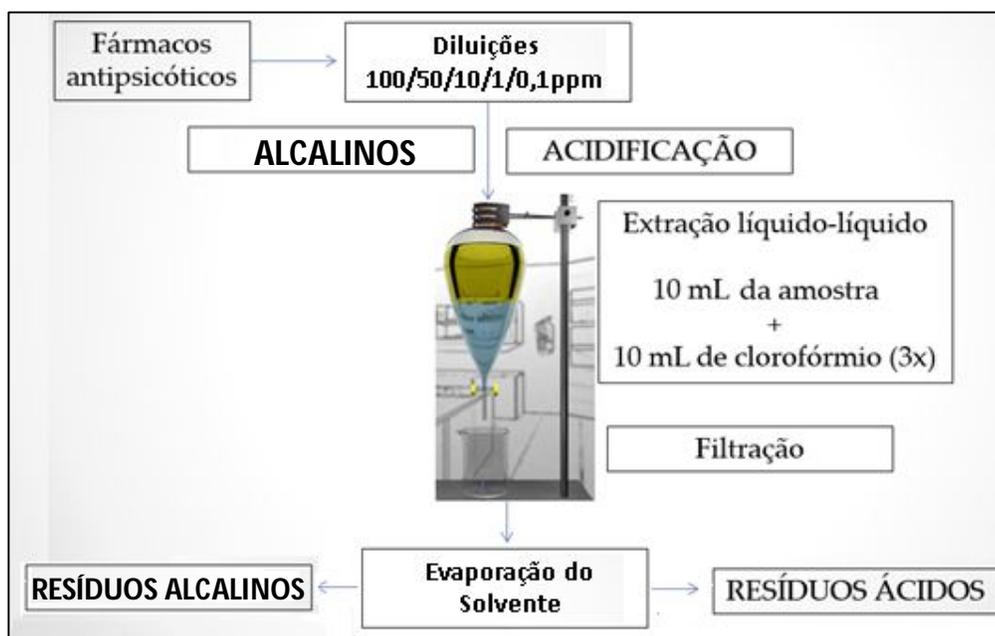


Figura 1 – Sequência metodológica.

Fonte: Elaborado pelo autor

A partir das concentrações obtidas nas diluições de cada fármaco, foram transferidos separadamente alíquotas de 10 mL para funis de separação. Posteriormente foi verificado o pH da urina, ajustando para a faixa de 4,0 a 5,0 com H₂SO₄ 90%. Após este ajuste foi utilizado o volume de 10 mL de clorofórmio para a

realização do processo de extração líquido-líquido, agitando-se o funil durante 30 segundos em movimento rotatórios contínuos.

Depois de decorrido os 30 segundos o funil foi colocado em repouso para a separação completa das fases, sendo realizada em seguida a filtração por meio de papel de filtro contendo sulfato de sódio anidro, para adsorver a água residual. A fase clorofórmica foi recolhida em béquer para posterior análise. Os procedimentos de adição de clorofórmio, agitação, separação e filtração foram repetidos mais duas vezes da mesma forma, para se otimizar o processo de extração dos fármacos, sendo o filtrado recolhido no mesmo béquer da primeira extração. Após o recolhimento dos três filtrados, o béquer foi submetido à evaporação total do solvente em capela.

Para dar prosseguimento as análises, a mesma amostra de urina foi alcalinizada com NaOH 50%, ajustando o pH para a faixa de 9,0 a 10,0. Os procedimentos de adição de clorofórmio, agitação, separação e filtração já citados anteriormente foram realizados na mesma proporção, sendo recolhido o filtrado em um segundo béquer. Após o recolhimento dos três filtrados, este segundo béquer também foi submetido à evaporação total do solvente em capela.

Após total evaporação dos solventes, foi utilizado 1 mL de metanol para a ressuspender as amostras. Para a aplicação das amostras na cromatoplasca de sílica gel 60, foram utilizados 50 µl de cada amostra separadamente (Figura 4)



Figura 4 - Aplicação das amostras na placa cromatográfica.
Fonte: Elaborado pelo autor.

Após a aplicação, as cromatoplasmas foram colocadas para eluição em cuba cromatográfica contendo a mistura de solventes metanol:hidróxido de amônia a 25% (100:1,5), percorrendo uma distância máxima de 10 cm. Após o término da corrida do solvente, a placa foi levada a capela para favorecer a evaporação dos solventes residuais e posteriormente foram aplicados os reativos cromatogênicos.

Após a revelação dos fármacos com os reativos cromatogênicos, foi realizado o cálculo do Rf e a comparação entre as manchas obtidas nas aplicações das soluções padrão dos fármacos com as manchas obtidas após o processo de extração líquido-líquido.

A sensibilidade dos reativos foi verificada quanto a capacidade de formar reações coloridas nas cromatoplasmas que representaram a presença do fármaco pesquisado. Já a avaliação da especificidade foi verificada quanto a formação de coloração diferenciada para cada tipo de fármaco em relação aos reativos cromatogênicos utilizados e o valores de Rf obtidos.

4.3 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os resultados obtidos com a realização dos testes laboratoriais foram submetidos a um tratamento estatístico por meio dos métodos da estatística descritiva. Este tipo de estatística foi utilizado para organizar, resumir e descrever os aspectos importantes de um conjunto de características observadas ou comparar tais características entre dois ou mais conjuntos. Os resultados obtidos foram expressos na forma de tabelas com o objetivo de fornecer uma ideia mais precisa e possibilitar uma informação mais rigorosa aos dados. (SILVESTRE, 2007).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na avaliação dos padrões dos fármacos fenotiazínicos (flufenazina, clorpromazina e prometazina) com a aplicação do revelador cromatogênico FPN, foi possível verificar que os fármacos clorpromazina e prometazina reagiram e promoveram o aparecimento de coloração rosa (Figura 5).

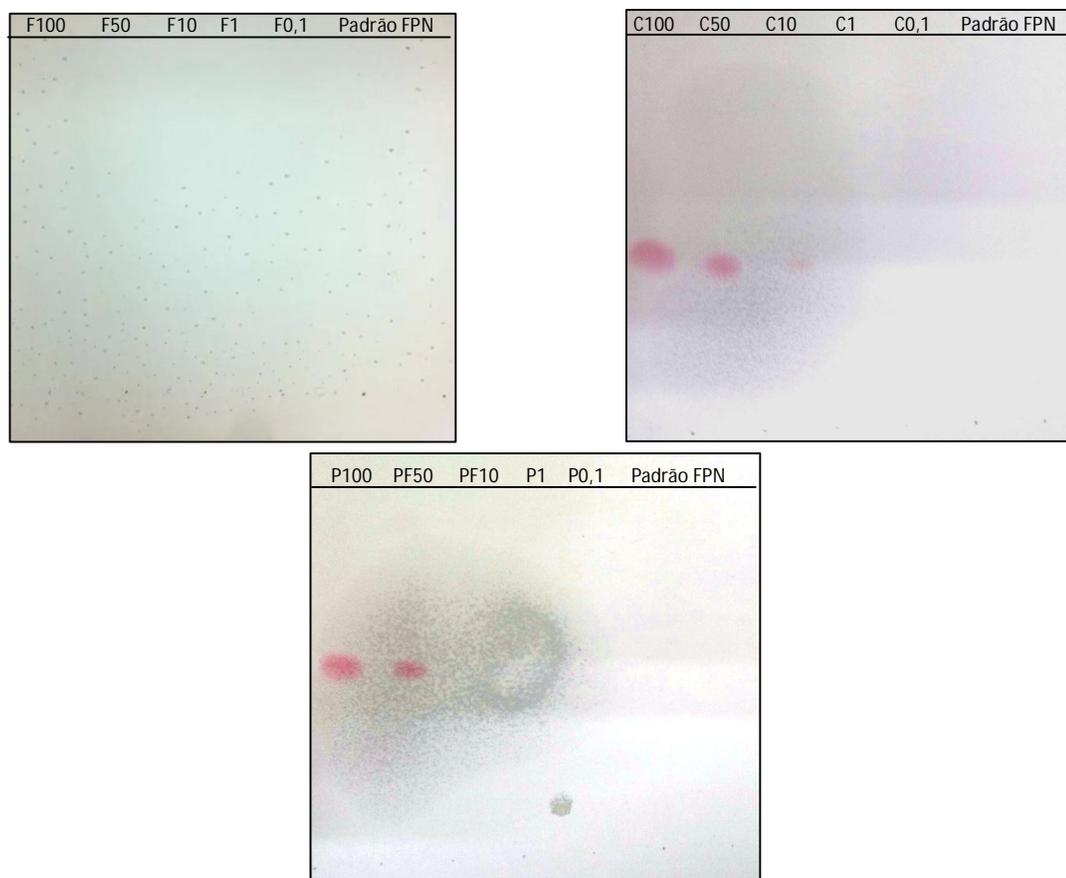


Figura 5 – Análise cromatográfica dos padrões de fenotiazínicos com a revelação com o reagente cromatogênico FPN.

Legenda: C – clorpromazina; P - prometazina; F – flufenazina.

Em relação a sensibilidade, o fármaco clorpromazina apresentou valores mínimos de positividade no teste na concentração de 10 ppm. Já em relação a especificidade, não houve diferenças quanto ao tipo de coloração formada entre o fármacos, entretanto houve diferenças quanto ao valor de Rf para os fármacos clorpromazina ($R_f = 0,45$) prometazina ($R_f = 0,62$).

Na avaliação dos padrões dos fármacos fenotiazínicos (flufenazina, clorpromazina e prometazina) com a aplicação do revelador cromatogênico

DRAGENDORFF, não foi possível verificar formação de coloração positiva apenas nos fármacos flufenazina (Figura 6).

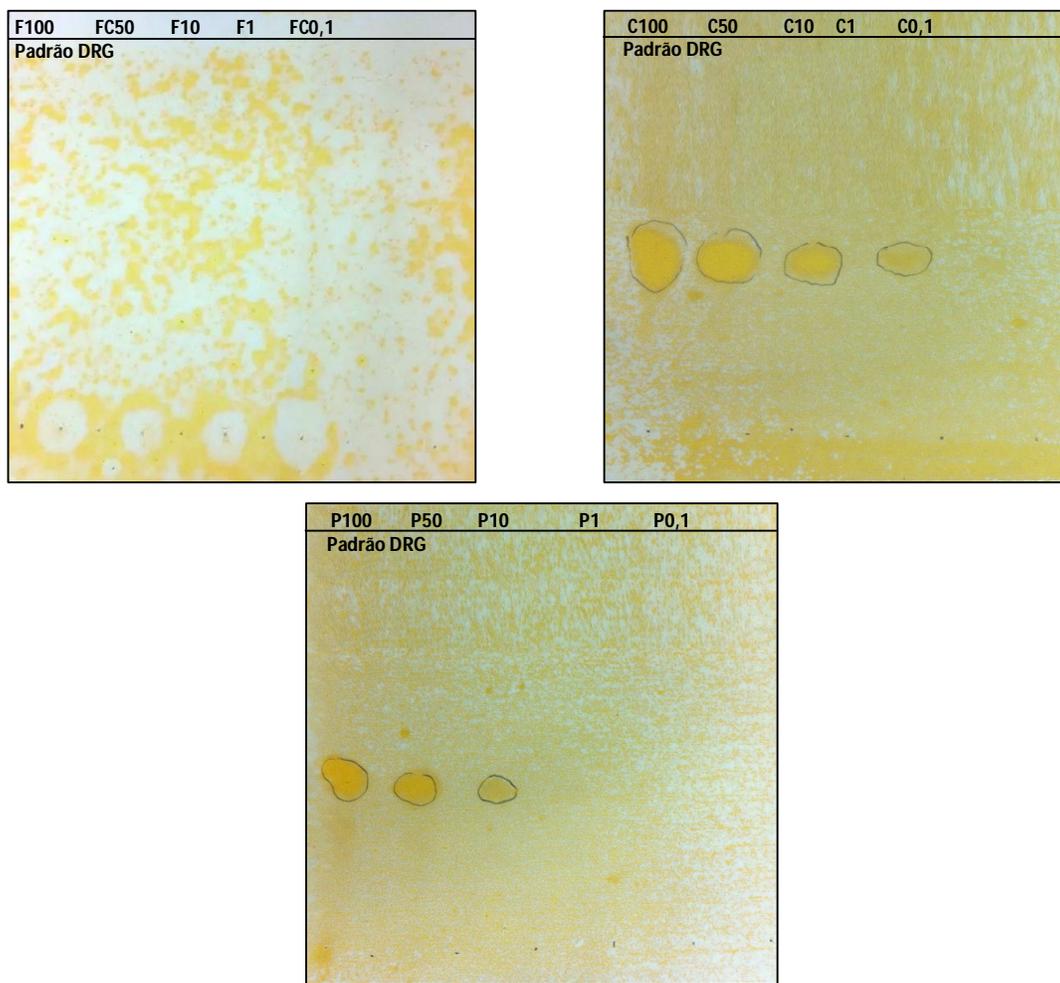


Figura 6 – Análise cromatográfica dos padrões de fenotiazínicos com a revelação com o reagente cromatogênico DRAGENDORFF.

Legenda: C – clorpromazina; P - prometazina; F – flufenazina; DRG – Dragendorff.

Em relação a sensibilidade o fármaco clorpromazina apresentou valores mínimos de positividade no teste na concentração de 1 ppm. Já em relação a especificidade, não houve diferenças quanto ao tipo de coloração formada entre o fármacos, entretanto houve diferenças quanto ao valor de Rf para os fármacos, clorpromazina (Rf = 0,45) prometazina (Rf = 0,62).

Na avaliação das amostras dos fármacos fenotazínicos nas placas ácidas após a aplicação do revelador cromatogênico FPN, houve formação de coloração positiva em todos os fármacos, exceto na flufenazina (Figura 7).

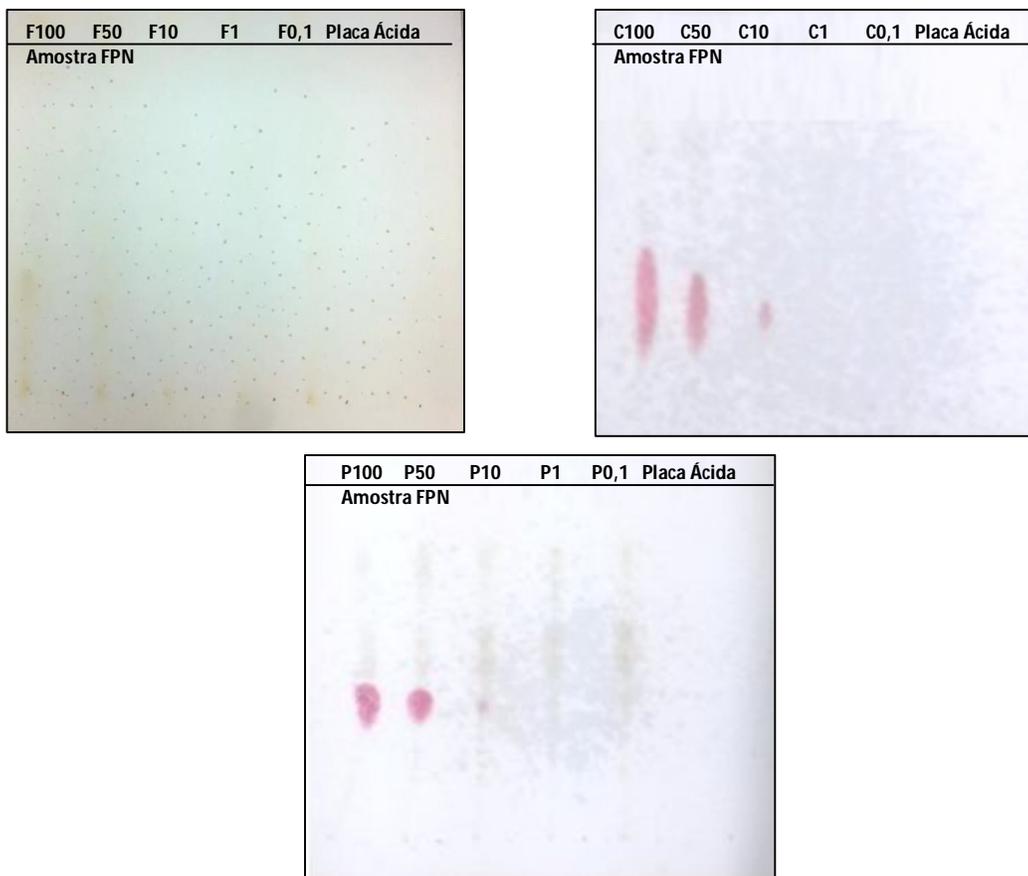


Figura 7 – Análise cromatográfica dos padrões de fenotiazínicos com a revelação com o reagente cromatogênico FPN.
Legenda: C – clorpromazina; P - prometazina; F – flufenazina.

Em relação a sensibilidade os fármacos clorpromazina e prometazina apresentaram valores mínimos de positividade no teste na concentração de 10 ppm.

Em teste de sensibilidade, realizados por Martin (2013) e Oliveira (2012) no com o Reativo FPN, em tubos de ensaio, foi possível verificar positividade clorpromazina e levomepromazina nas concentrações de 0,5 e 1,0 mg/ml, respectivamente. Tal diferença pode estar relacionada ao processo de extração do fármaco a partir da amostra, pois na técnica de triagem em tudo de ensaio, a amostra é utilizada de forma direta, enquanto para na CCD, são realizadas várias etapas até a reação final com o reagente cromatogênico, o que pode diminuir a concentração final a ser obtida.

Já em relação a especificidade, não houve diferenças quanto ao tipo de coloração formada entre os fármacos, entretanto houve diferenças quanto ao valor de R_f para os fármacos clorpromazina ($R_f = 0,45$) e prometazina ($R_f = 0,62$).

Segundo Oliveira (2012) na análise do parâmetro especificidade dos reativos para os fármacos fenotiazínicos, foi possível verificar que os reativos FORREST e FPN apresentaram diferenças de coloração entre os fármacos testados, o que representa uma característica positiva para a diferenciação de compostos analisados durante a triagem toxicológica. Resultados semelhantes foram descritos por Martin (2013) também em testes imediatos.

Segundo Moreira; Caldas (2001) o reativo FPN é utilizado para ensaios específicos de análise de compostos fenotiazínicos como a clorpromazina e outros derivados. O aparecimento de colorações que variam de rosa, vermelho, laranja, do violeta ao azul indica a presença de um derivado de fenotiazínico. A reação com FPN é rápida em média 5 segundos. (ANTON, 2012).

Na avaliação das amostras dos fármacos fenotiazínicos nas placas ácidas após a aplicação do revelador cromatogênico DRAGENDORFF, houve formação de coloração positiva em todos os fármacos, exceto na flufenazina (Figura 8).

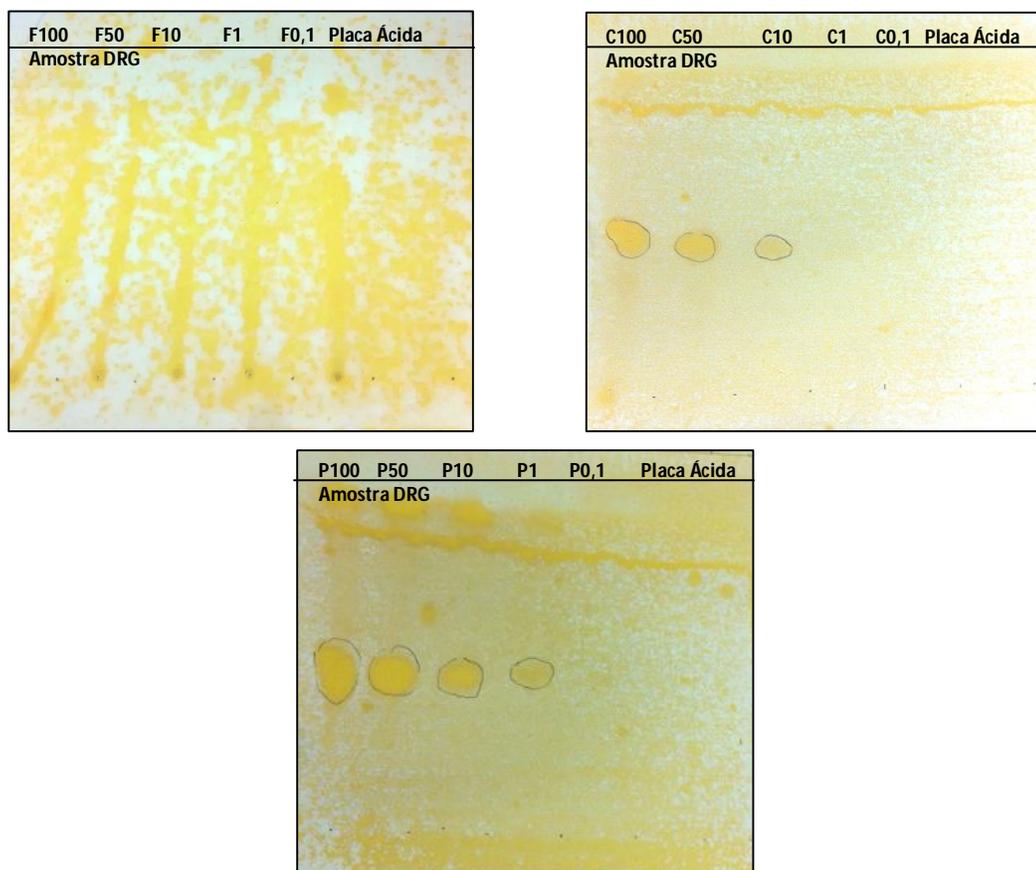


Figura 8 – Análise cromatográfica dos padrões de fenotiazínicos com a revelação com o reagente cromatogênico DRAGENDORFF.

Legenda: C – clorpromazina; P - prometazina; F – flufenazina; DRG – Dragendorff.

Em relação a sensibilidade dos fármacos, apenas a prometazina apresentaram valores mínimos de positividade no teste na concentração de 1 ppm, enquanto o fármaco clorpromazina apresentou valores mínimos na concentração de 10 ppm. A Flufenazina não apresentou formação de coloração positiva em nenhum das concentrações testadas.

Na avaliação da sensibilidade do Reativo DRAGENDORFF em testes de triagem, Oliveira (2012) e Martin (2013) verificaram diferenciação de coloração alaranjada formada quando comparado ao branco de reativos em concentrações de 1,0 e 0,1 mg/mL para todos os fármacos.

Em relação à seletividade não foi possível verificar diferenciação das cores formadas entre os compostos. Resultados semelhantes foram encontrados por Oliveira (2012) e Martin (2013).

Segundo Martin (2013) dos fármacos fenotiazínicos clorpromazina, levomepromazina, prometazina e flufenazina, não foi possível a formação de coloração característica alaranjada nas concentrações testadas (10, 1 e 0,1 ppm).

Tais resultados diferem dos resultados encontrados devido a variações na metodologia utilizada quanto ao volume de amostra no processo de extração líquido-líquido e volume de aplicação nas placas cromatográficas.

Segundo Moreira, Caldas (2001) o Reativo de Dragendorff reage com compostos que contém nitrogênio em sua estrutura, podendo apresentar a formação de coloração laranja, vermelho-alaranjado ou vermelho, sendo muito utilizado na detecção geral de aminas orgânicas.

6 CONCLUSÃO

Nas análises toxicológicas de urgência e emergência os exames de triagem devem representar uma importante ferramenta complementar no diagnóstico dos casos de intoxicações por substâncias desconhecidas.

Desta forma, os laboratórios de toxicologia devem dispor de diferentes métodos de análise a partir de reativos químicos e reveladores cromogênicos variados, visto que a sensibilidade e especificidade destes compostos apresentam-se variadas.

Sendo assim, concluímos que os reativos cromatogênicos testados não apresentaram sensibilidade e especificidade adequada para todos os fármacos, sendo dessa forma, necessária a combinação de outros métodos de ensaios imediatos para se tentar otimizar a confiabilidade no laudo toxicológico. Esta combinação dos métodos pode ser útil para fazer com que as análises toxicológicas tenham maior precisão e confiabilidade, facilitando a obtenção dos resultados e o possível tratamento da intoxicação em tempo adequado.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Novos estudos deverão ser realizados para determinar os níveis de especificidade e sensibilidade destes reativos para outros compostos fenotiazínicos, assim como para outras classes de fármacos psicotrópicos que possam ser utilizados em associações nas intoxicações agudas.

REFERÊNCIAS

ANTON, E. **Apostila de Análise Toxicológicas**. 2012. Disponível em <<http://PT.scribd.com/doc/72511582/6/MODELO-DE-LAUDO-PARA-ANÁLISE-TOXICOLÓGICA>>. Acesso em: 10 out. 2014.

ALCÂNTARA, H. R. **Toxicologia clínica e forense**. São Paulo: Organização Andrei, 1985. p. 17.

BAILEY, L. C. **Cromatografia**. In.: GENNARO, A. R. Remington: a ciência e a prática da farmácia. 20 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. p. 605-632.

CAZENAVE, S. O. S. **Análise de Urgência**. In.: MOREAU, R. L. M.; SIQUEIRA, M. E. P. B. Ciências Farmacêuticas: Toxicologia Analítica. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008. p. 59-69.

COLLINS, C. H.; BRAGA, G.; BONATO, P. S. **Fundamentos de Cromatografia**. 1 ed. Campinas: Ed. Unicamp, 2006.

COSTA, J. L. **Características das amostras convencionais e não-convencionais**. In.: MOREAU, R. L. M.; SIQUEIRA, M. E. P. B. **Toxicologia Analítica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008. p. 40.

FERNANDES, G. et al. Impacto das intoxicações por antidepressivos tricíclicos comparados aos deprimidores do “sistema nervoso central”. **Arq. Ciênc. Saúde**. jul-set, v. 13, n. 3, P. 61-65, 2006.

FROTA, L. H. **Cinquenta anos de medicamentos antipsicóticos em psiquiatria**. 1 ed. Eletrônica. Rio de Janeiro: 2003. 486 pp Disponível em: <<http://www.medicina.ufrj.br/cursos/frota%20livro%20i%20%26%20ii.pdf>> Acesso em: 22/09/2014.

KLASSEN, C. D. **Casarett and Doull's toxicology: the basic science of poisons**. 7 ed. New York: McGrawHill Medical, 2008.

KOROLKOVAS, A.; BURCKHALTER, J. H. **Química Farmacêutica**. São Paulo: Guanabara- Koogan, 1988. p.455-463.

LARINI, L. **Toxicologia**. 3. ed. São Paulo: Manole, 1997

LOPES, J. L. C.; Cromatografia em Camada Delgada. In COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L. **Introdução a métodos cromatográficos**. Campinas: Ed. UNICAMP, 1987.p. 58-60.

LOPES, J. L. C. Cromatografia em camada delgada. In.: COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. **Fundamentos de cromatografia**. Campinas: UNICAMP, 2006. p. 67-86.

MARTIN, A. P. **Avaliação comparativa dos métodos de detecção de fluídos biológicos contendo fenotiazínicos**. 2013. 51f. (Graduação em Farmácia) – Universidade Sagrado Coração, Bauru, 2013.

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

MORAIS, R. M. O.; OLIVEIRA I. R. **Antipsicóticos**. In.: SILVA, P. Farmacologia. 8 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2010. p.313-328

MOREAU, R. L. M. Fármacos: Triagem em Urina por Cromatografia em Camada Delgada (CCD). In.: MOREAU, R. L. M.; SIQUEIRA, M. E. P. B. **Toxicologia Analítica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008. p. 254-255.

MOREIRA, A. H. P.; CALDAS, L. Q. A **Intoxicações agudas**: bases do diagnóstico clinico-laboratorial de urgência. 1 ed. Rio de Janeiro: Revinter, 2001.

NETO, V. A. M et al. Aspectos epidemiológicos da intoxicação por medicamentos em crianças e adolescentes atendidos no centro de assistência toxicológica do estado do Ceará. **Revista Baiana de Saúde Pública**. v. 33, n. 3, jul/set. 2009, p. 388-401.

OLIVEIRA, E. F. **Avaliação comparativa dos métodos de detecção de fluídos biológicos contendo fenotiazínicos**. 2012. 44 f. (Graduação em Farmácia) – Universidade Sagrado Coração, Bauru, 2012.

OGA, S. CAMARGO, M. M. A.; BASTITUZZO, J. A. O. **Fundamentos de Toxicologia**. 3. ed. São Paulo: Atheneu, 2008.

SILVA, P. **Farmacologia**. 8 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2010.

SILVESTRE, A. L. **Análise de Dados e Estatística Descritiva**, Belo Horizonte: Escolar, 2007.

Sistema Nacional de Informações Tóxico Farmacológicas. SINITOX. **Registro de intoxicações_Dados nacionais_2011**. c2014. Disponível em: <http://www.fiocruz.br/sinitox_novo/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?sid=386> Acesso em: 10/02/2014.

SCHVARTSMAN, S. **Intoxicações agudas**. 4 ed. São Paulo: Sarvier, 1991.
Sistema Nacional de Informações Tóxico Farmacológicas. SINITOX. **Registro de intoxicações_Dados nacionais_2011**. c2014. Disponível em: <http://www.fiocruz.br/sinitox_novo/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?sid=386> Acesso em: 10/02/2014.