UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Programa de Pós-graduação em Toxicologia e Análises Toxicológicas

Determinação de flunitrazepam e 7-aminoflunitrazepam em soro por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massa em *tandem* com a utilização de extração *on line*: aspecto forense”.

Denize Duarte Pereira

Dissertação para obtenção do grau
MESTRE

Orientadora:
Profa. Dra. Alice Aparecida da Matta Chasin

São Paulo
2004

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Programa de Pós-graduação em Toxicologia e Análises Toxicológicas

Determinação de flunitrazepam e 7-aminoflunitrazepam em soro por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massa em *tandem* com a utilização de extração *on line*: aspecto forense”.

Denize Duarte Pereira

Dissertação para obtenção do grau
MESTRE

Orientadora:
Profa. Dra. Alice Aparecida da Matta Chasin

São Paulo

2004

10091

DEDALUS - Acervo - CQ

30100010561

Ficha Catalográfica

Elaborada por Maria Inês Prado Brunhera CRB 2.057
Biblioteca Milton José Thomaz – Instituto Fleury.

PEREIRA, Denize Duarte

P414d   Determinação de flunitrazepam e 7-aminoflunitrazepamem soro por
cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massa
em *tandem* com a utilização de extração *on line*: aspecto forense"/ Denize
Duarte Pereira.-- São Paulo, 2004.

Dissertação (mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas da
Universidade de São Paulo. Departamento de Análises Clínicas e
Toxicológicas.

Orientador(a): Chasin, Alica A. da Matta

1. Toxicologia - Flunitrazepam   2. Toxicologia Forense. I. Título. II.
Chasin, Alice A. da Matta, orientador.

615.9 CDD

Denize Duarte Pereira

Determinação de flunitrazepam e 7-aminoflunitrazepam em soro por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massa em *tandem* com a utilização de extração *on line*: aspecto forense”.

Comissão Julgadora
da
Dissertação para obtenção do grau de Mestre

Profa. Dra. Alice Aparecida da Matta Chasin
orientador/presidente

1º. examinador

2º. examinador

02/02/2005.

São Paulo, outubro de 2004.

AGRADECIMENTOS

Ao laboratório Fleury - Centro de Medicina Diagnóstica, pela oportunidade de aprendizado e desenvolvimento deste projeto..

A Profa. Alice Aparecida da Matta Chasin pela orientação, confiança, amizade e incentivo constantes.

Ao Dr. Valdemir Melechco Carvalho, pelos seus ensinamentos, por todos os esclarecimentos científicos relacionados à metodologia utilizada e pelas sugestões valiosas durante todo o desenvolvimento deste trabalho.

Aos colegas do grupo de cromatografia do Laboratório Fleury: Marlene, Marisa, Sandra, Andréa e Mariangela, pelo apoio, pela amizade, paciência e estímulos constantes, que foram muito importantes para conclusão deste trabalho.

Aos meus queridos pais e irmãos, por todo o estímulo, confiança e apoio recebidos ao longo de minha vida.

As minhas eternas companheiras Qin e Zig.

A todos, amigos e colegas, que de alguma forma contribuíram para realização deste trabalho.

RESUMO

PEREIRA, D. D. Determinação de Flunitrazepam e 7-aminoflunitrazepam em soro por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massa em *tandem* com a utilização de extração *on line*: aspecto forense". São Paulo, 2004. Dissertação de Mestrado - Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Universidade de São Paulo.

Atualmente os benzodiazepínicos constituem o grupo de fármacos de prescrição mais consumidas em todo o mundo. Além da utilização desta classe farmacológica como fármacos de abuso, mais recentemente seu uso está associado a uma nova cultura psicodélica emergente. O termo "*club drugs*" tem sido usado para descrever estes fármacos que levam a efeitos psicodélicos e euforizantes. Acresça-se a isto à preocupante utilização destas substâncias em situações de estupro e/ou assalto, as chamadas "*drug-facilitated sexual assault*", destacando-se o flunitrazepam. Devido às pequenas doses administradas e a extensiva metabolização, a identificação do flunitrazepam e seus metabólitos torna-se dificultada em relação a outros benzodiazepínicos. O presente trabalho constitui validação de metodologia analítica que permita a correta identificação e quantificação de flunitrazepam e seu principal produto de biotransformação, o 7-aminoflunitrazepam, em soro. O método desenvolvido mostrou boa linearidade, precisão, exatidão, rendimento e capacidade de detectar os analitos mesmo em baixas concentrações, permitindo desta forma a inferência sobre a realidade dos casos onde se utiliza este fármaco sem fins terapêuticos.

Palavras-chaves: flunitrazepam; 7-aminoflunitrazepam; LC_MS/MS; toxicologia forense.

ABSTRACT

PEREIRA, D. D. **Determination of flunitrazepam e 7-aminoflunitrazepam in serum by high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry using *on line* extraction: “forensic aspect”**. São Paulo, 2004. Dissertação de Mestrado - Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Universidade de São Paulo.

Currently the benzodiazepines are one of the most consumed groups among the prescripion drugs in the world. Beside this, they have been used as drugs of abuse and more recently their use is associated with the new emerging psychodelic culture. The term “*club drugs*” has been used to describe these drugs that cause psychodelic and euphoric effects. In addition to this, there is a growing concern with the use of these substances related to “*drug-facilitated sexual assault*”, among of which Flunitrazepam is pointed out as one of the most important . Due to the small doses involved in the consumption for this purpose and also the extense biotransformation, the identification of this analyte and its metabolites become more difficult than that of other benzodiazepines . This study provides an analytical validation method that enables correct identification and quantification of Flunitrazepam and its main biotransformation product, the 7-aminoflunitrazepam, in serum. The method developed demonstrates good linearity, precision, accuracy, recovery and capacity of detect the analytes, even in low concentration. Thus making possible to makes inferences regarding the reality of cases where it is used as a drug without therapeutic use.

Key words: flunitrazepam, 7-aminoflunitrazepam, LC-MS/MS, forensic toxicology.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Tipos de varredura em MS/MS.....	30
Tabela 2 - Diferentes modos de varredura em MS/MS.....	32
Tabela 3 - Valores de referência de alguns BDZ.....	36
Tabela 4 - Colunas, fases móveis e concentração de formiato de amônio testados na otimização do método cromatográfico.....	55
Tabela 5 - Preparo das amostras e controles para teste de seletividade e especificidade do método.....	62
Tabela 6 - Preparo da curva de calibração de FN e 7-AF.....	63
Tabela 7 - Monitorização dos canais de massa (MRM), voltagem do cone, energia de colisão, obtidos para os analitos e seu padrão isotópico.....	76
Tabela 8 - Parâmetros de afinação do equipamento obtidos para os analitos e seu padrão isotópico.....	76
Tabela 9 - Tempo de retenção, e simetria dos picos cromatográficos.....	77
Tabela 10 - Tempo da válvula <i>diverter Rheodyne</i> na posição <i>load</i> e na posição <i>inject</i> , para otimização da condição de extração.....	82
Tabela 11 - Monitorização dos canais de massa (SRM), voltagem do cone, energia de colisão e demais parâmetros de afinação do equipamento, obtidos para os analitos e seus padrões isotópicos.....	94
Tabela 12 - Fatores de resposta obtidos para a elaboração das curvas analíticas dos analitos em soro e respectivos coeficientes de variação (CV%).....	95
Tabela 13 - Coeficientes de variação das concentrações em soro de FN e 7-AF obtidos nos ensaios de precisão intra e interensaio.....	99
Tabela 14 - Exatidão e recuperação dos métodos propostos para análise de FN e 7-AF em amostras de soro, avaliados em diferentes concentrações.....	105

LISTA DE FIGURAS

Figura 01: Notificação de indivíduos que fizeram uso de alguma <i>club drugs</i> e buscaram atendimento de emergência, nos EUA, no período de 1994 a 2000.....	7
Figura 02: Número de notificações do uso de alguma <i>club drugs</i> e a idade dos usuários, que buscaram atendimento de emergência nos EUA, em 2000.....	7
Figura 3: Estrutura química dos benzodiazepínicos.....	8
Figura 4: Estrutura química do FN.....	9
Figura 5: Comprimidos de FN, Rohypnol - Roche®.....	10
Figura 6: Biotransformação do flunitrazepam (MAHJOUR; STAUB, 2001).....	14
Figura 7: Componentes de um espectrômetro de massa.....	23
Figura 8: Esquema da interface entre a cromatografia líquida e o espectrômetro de massa pela técnica de ionização a pressão atmosférica.....	24
Figura 9: Esquema da interface entre a cromatografia líquida e o espectrômetro de massa por ionização química a pressão atmosférica - APCI.....	25
Figura 10: Representação esquemática do mecanismo de ionização por <i>electrospray</i>	27
Figura 11: Representação esquemática de ESI-MS/MS.....	29
Figura 12: Esquema da monitoração de íons produtos.....	30
Figura 13: Esquema da monitoração de íons precursores.....	31
Figura 14: Esquema da monitoração por varredura de perda neutra constante.....	31
Figura 15: Esquema do monitoramento de reações múltiplas.....	32
Figura 16: Esquema ilustrativo da coluna ADS.....	35
Figura 17: Coluna de superfície semi-permeável - SPS (<i>Semi-Permeable Surface</i>).....	35
Figura 18: Coluna de superfície interna de fase reversa - ISRF (<i>Internal Surface Reverse</i>) Phase).....	35
Figura 19: Válvula seletora eletrônica, <i>diverter Rheodyne</i> integrada ao sistema de LC/MS/MS.....	57
Figura 20: procedimento de extração <i>online</i>	59
Figura 21: Espectro de massa obtido por ES+ no modo <i>full scan</i> de flunitrazepam.....	72

Figura 22: Espectro de massa obtido por ES+ no modo <i>full scan</i> de flunitrazepam d ₇	72
Figura 23: Espectros de massa obtido por ES+ no modo <i>daughter scan</i> dos fragmentos gerados a partir do flunitrazepam, por CID colisão em diferentes energias de colisão.....	73
Figura 24: Espectro de massa obtido por ES+ no modo <i>daughter scan</i> dos fragmentos gerados a partir do flunitrazepam d ₇ , com energia de colisão em 35eV.....	74
Figura 25: Espectro de massa obtido por ES+ no modo <i>full scan</i> de 7-AF.....	74
Figura 26: Espectros de massa obtido por ES+ no modo <i>daughter scan</i> dos fragmentos gerados a partir do 7-AF, por CID com energia de colisão de 35 eV.	75
Figura 27: cromatograma de amostra de soro referência negativa, enriquecida com FN, padrão isotópico FNd ₇ e 7-AF.....	78
Figura 28: cromatogramas de amostra de soro referência negativa, enriquecida com FN, padrão isotópico FNd ₇ , 7-AF com suas respectivas transições de massa.....	79
Figura 29: Efeito da concentração do formiato de amônia em relação à intensidade do sinal dos analitos (área do pico), em solução aquosa de 50 ng/mL.....	80
Figura 30: Concentração de acetonitrila (ACN) em relação à retenção dos analitos de interesse na coluna de extração.....	81
Figura 31: Efeito da adição de sulfato de zinco (ZnSO ₄) e as variáveis temperatura e adição de metanol, sobre o processo de precipitação protéica na extração de flunitrazepam em soro.....	83
Figura 32: Proteínas totais, medidas no extrato obtido após diferentes condições de precipitação protéica na extração de flunitrazepam em soro.....	83
Figura 33: Representação gráfica dos resultados obtidos nos estudos dos interferentes endógenos, comparando-se amostras de soro normais, lipêmicas e hemolisadas.....	84
Figura 34: Espectro de massa obtido por ES+ no modo <i>full scan</i> de alprazolam e a presença do íon-pseudomolecular m/z 309,3.....	85

Figura 35: Espectro de massa obtido por ES+ no modo <i>full scan</i> do padrão interno isotópico de alprazolam d ₅ e a presença do íon-pseudomolecular m/z 314,2.....	85
Figura 36: Espectro de massa obtido por ES+ no modo <i>full scan</i> de bromazepam e a presença do íon-pseudomolecular m/z 316,1.....	86
Figura 37: Espectro de massa obtido por ES+ no modo <i>full scan</i> de clobazam e a presença do íon-pseudomolecular m/z 301,0.....	86
Figura 38: Espectros de massa obtidos por ES+ no modo <i>full scan</i> de clonazepam, variando a voltagem no cone e a presença do íon-pseudomolecular m/z 315,9.....	86
Figura 39: Espectro de massa obtido por ES+ no modo <i>full scan</i> do padrão interno isotópico de clonazepam d ₄ e a presença do íon-pseudomolecular m/z 320,1.....	87
Figura 40: Espectro de massa obtido por ES+ no modo <i>full scan</i> de cloxazolam e a presença do íon-pseudomolecular m/z 349,1.....	87
Figura 41: Espectro de massa obtido por ES+ no modo <i>full scan</i> de diazepam e a presença do íon-pseudomolecular m/z 285,0.....	87
Figura 42: Espectro de massa obtido por ES+ no modo <i>full scan</i> do padrão isotópico de diazepam d ₅ e a presença do íon-pseudomolecular m/z 290,2.....	87
Figura 43: Espectro de massa obtido por ES+ no modo <i>full scan</i> de midazolam e a presença do íon-pseudomolecular m/z 326,0.....	88
Figura 44: Espectros de massa obtidos por ES+ no modo <i>daughter scan</i> dos fragmentos gerados a partir do alprazolam, por CID em diferentes energias de colisão.....	88
Figura 45: Espectros de massa obtidos por ES+, no modo <i>daughter scan</i> , dos fragmentos gerados a partir do padrão isotópico de alprazolam d ₅ , com o aumento da energia de colisão.....	89
Figura 46: Espectros de massa obtidos por ES+ no modo <i>daughter scan</i> dos fragmentos gerados a partir do bromazepam, por CID em diferentes energias de colisão.....	89
Figura 47: Espectros de massa obtidos por ES+ no modo <i>daughter scan</i> dos fragmentos gerados a partir do clobazam, por CID em diferentes energias de Colisão.....	90

Figura 48: Espectros de massa obtidos por ES+ no modo <i>daughter scan</i> dos fragmentos gerados a partir do clonazepam, por CID em diferentes energias de colisão.....	90
Figura 49: Espectro de massa obtido por ES+ no modo <i>daughter scan</i> dos fragmentos gerados a partir do padrão isotópico de clonazepam d_4	91
Figura 50: Espectros de massa obtidos por ES+ no modo <i>daughter scan</i> dos fragmentos gerados a partir do cloxazolam, por CID em diferentes energias de colisão.....	91
Figura 51: Espectros de massa obtidos por ES+ no modo <i>daughter scan</i> dos fragmentos gerados a partir do diazepam, por CID em diferentes energias de colisão.....	92
Figura 52: Espectros de massa obtido por ES+, no modo <i>daughter scan</i> , dos fragmentos gerados a partir do midazolam, por CID colisão em diferentes energias de colisão.....	92
Figura 53: Representação da curva analítica para a determinação de FN em soro nas concentrações de 0,5 a 200 ng/ml.....	96
Figura 54: Representação da curva analítica para a determinação de 7-AF em soro nas concentrações de 0,5 a 200 ng/ml.....	97
Figura 55: Dispersão dos pontos no estudo da precisão inter-ensaio para o FN com concentração de 5 ng/mL.....	100
Figura 56: Dispersão dos pontos no estudo da precisão inter-ensaio para o FN com concentração de 25 ng/mL.....	101
Figura 57: Dispersão dos pontos no estudo da precisão inter-ensaio para o 7-AF com concentração de 5 ng/mL.....	102
Figura 58: Dispersão dos pontos no estudo da precisão inter-ensaio para o 7-AF com concentração de 25 ng/mL.....	103
Figura 59: Percentuais de recuperação obtidos nas amostras de soro enriquecidas com FN em diferentes concentrações.....	106
Figura 60: Percentuais de recuperação obtidos nas amostras de soro enriquecidas com 7-AF em diferentes concentrações.....	107
Figura 61: Estabilidade após três ciclos de congelamento/ descongelamento.....	108
Figura 62: Estabilidade após armazenamento em freezer a -20°C	109
Figura 63: Estabilidade após armazenamento sob refrigeração.....	109

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

RESUMO

ABSTRACT

1. INTRODUÇÃO.....	1
2. GENERALIDADES.....	4
2.1. Histórico.....	5
2.2. Flunitrazepam.....	8
2.3. Toxicocinética.....	12
2.4. Toxicodinâmica.....	16
2.5. Aspectos analíticos.....	17
2.5.1. Técnicas de separação e identificação.....	17
2.5.2. Espectrometria de massas.....	21
2.5.3. Técnicas de extração.....	33
2.5.4. Matrizes biológicas de interesse forense.....	36
3. OBJETIVO E PLANO DE TRABALHO.....	41
4. MATERIAIS.....	43
4.1. Equipamentos.....	44
4.2. Reagentes.....	44
4.3. Padrões.....	45
4.3.1. Analitos.....	45
4.3.2. Padrões internos isotópicos.....	46
4.4. Acessórios.....	46
4.5. Preparo das soluções e reagentes.....	48
4.5.1. Soluções-estoque primárias.....	48
4.5.2. Soluções de trabalho (ST).....	49
4.5.3. Fases móveis.....	49

4.5.4. Outros reagentes.....	49
4.6. Amostras de soro.....	50
4.7. Tratamento estatístico.....	50
5. MÉTODO.....	53
5.1. Espectrometria de massas.....	53
5.1.1. Sistema de etecção.....	53
5.1.2. Otimização dos parâmetros de aquisição por espectrometria de massas.....	53 54
5.2. Sistema Cromatográfico.....	54
5.2.1. Otimização das condições cromatográficas.....	54
5.3. Extração online.....	57
5.3.1. Otimização do procedimento de extração – precipitação protéica.....	 60
5.3.2. Método proposta para pré-extração de flunitrazepam e 7- aminoflunitrazepam em soro.....	 60
5.4. Validação do método proposto.....	61
5.4.1. Especificidade e Seletividade.....	61
5.4.2. Preparação das curvas analíticas – Linearidade.....	63
5.4.3. Parâmetros de confiança analítica ou figuras analíticas de mérito.....	 64
5.4.4. Estudo da estabilidade.....	69
6. RESULTADOS.....	71
6.1. Espectrometria de massas.....	72
6.1.1. Análise dos padrões de fragmentação do FN e do 7-AF.....	72
6.2. Método cromatográfico.....	77
6.2.1. Otimização das condições cromatográficas.....	77
6.3. Extração <i>online</i>	80
6.3.1. Otimização do procedimento de extração – precipitação protéica.....	 82
6.4. Validação do método proposto.....	84
6.4.1. Especificidade e Seletividade.....	84

6.4.2. Linearidade.....	95
6.4.3. Parâmetros de confiança analítica ou figuras analíticas de mérito.....	98
6.4.4. Estudo da estabilidade.....	108
7. DISCUSSÃO.....	110
8. CONCLUSÕES.....	116
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	

1. INTRODUÇÃO

O problema da utilização de drogas que causam dependência é um fato que acompanha a humanidade desde seus primórdios, mas atualmente tem tomado proporções alarmantes devido ao grande consumo, a diversidade e a oferta ser cada vez mais crescente, gerando enormes problemas sociais, econômicos, políticos, de saúde e segurança pública. A dependência de drogas é um sinal de destruição da vida em termos de saúde e de valores, considerado pelo OMS como uma doença epidêmica. Acresça-se a isto os recentes relatos e a nova preocupação dos toxicologistas forenses em relação à preocupante utilização de determinadas substâncias desta categoria que são utilizadas em situações de estupro e/ou assalto, as chamadas *“drug-facilitated sexual assault”*

Os benzodiazepínicos (BDZ) , cuja introdução comercial deu-se no início da década de 60, coincidiu com um aumento no consumo de substâncias psicoativas como um todo e constituem uma categoria de fármacos que podem integrar estes dois propósitos de uso.

Em geral a morte por BDZ é rara, a menos que a droga seja combinada com outros agentes depressores do SNC como álcool e barbitúricos. A associação benzodiazepínico-barbitúrico parece ser a mais grave (LIMA, 1984; OGA, 2003). Porém, uma nova-geração de BDZ, de curta ação, administrados em pequenas doses, tem sido considerados a causa isolada de morte em diversos casos forenses e, dentre eles destaca-se o **flunitrazepam** (FN) (OLSON, 1999).

O flunitrazepam é um dos mais potentes BDZ hipnóticos. Devido às pequenas doses administradas (cerca de 1 a 2mg oral e/ou intravenosa) e a

extensiva metabolização através de diversos caminhos, a identificação do flunitrazepam e seus metabólitos é dificultada em relação a outros BDZ.

Face ao exposto, a perspectiva deste trabalho é possibilitar a validação de metodologia analítica que permita à correta identificação e quantificação de FN e seu principal produto de biotransformação, o 7-aminoflunitrazepam (7-AF), em soro, permitindo desta forma a inferência sobre a realidade dos casos onde se utiliza este fármaco sem fins terapêuticos.

2. GENERALIDADES

2.1. Histórico

Os BDZ após seu surgimento na década de 60, rapidamente deslocaram os barbitúricos e tornaram-se os mais utilizados entre os medicamentos com propriedades sedativas (OGA, 2003; GOODMAN & GILMAN, 1996).

A grande aceitação dos compostos BDZ entre a classe médica e a população leiga pode ser relacionada à sua eficácia como agentes ansiolíticos e hipnóticos, maior índice terapêutico, ou seja, menor potencial de causar dependência e a margem de segurança que apresentam. Atualmente os BDZ constituem o grupo de fármacos de prescrição mais consumidas em todo o mundo (SOARES, et al. 1991; OGA, 2003; GOODMAN & GILMAN, 1996; ELLENHORN & BARCELOUX, 1988).

Além da utilização desta classe farmacológica de fármacos como fármacos de abuso, mais recentemente seu uso está sendo relacionado com a nova cultura psicodélica emergente. Trata-se do que vem ocorrendo nas grandes áreas metropolitanas onde existem diversos clubes, festas ou *raves*. Nestes eventos adultos jovens reúnem-se para escutar e dançar música eletrônica ou *techno-music*, geralmente acompanhada de uma luz pulsante. Para aumentar os efeitos auditivos e visuais, os freqüentadores destas festas geralmente fazem uso de fármacos. Assim, o termo *club drugs* tem sido usado para descrever estas drogas que levam a efeitos psicodélicos e euforizantes.

As *club drugs* incluem drogas lícitas e ilícitas que se tornaram populares nestas *raves*, dentre elas destacam-se: LSD, GHB, metanfetaminas, MDMA e

ecstasy, cetamina escopolamina, e alguns BDZ, sendo o FN, ou roypnol, mais usado para este fim (CLINICAL & FORENSIC, 2001).

Além do efeito euforizante, em sinergismo com o álcool e também outras drogas, há o aumento do potencial sedativo e hipnótico - principalmente do GHB e do FN - onde destas drogas são muitas vezes empregadas em situações de estupro e/ou assalto, são as chamadas *drug-facilitated sexual assault* ou *date-rape drugs*, assim chamadas porque a vítima fica totalmente à disposição do seu agressor e após o evento não se lembra do acontecido, devido à amnésia anterógrada (GOODMAN & GILMAN, 1996; CLINICAL & FORENSIC, 2001).

A maior preocupação com relação ao uso destes fármacos é o aumento significativo do uso entre um público muito jovem, 18 e 25 anos (CLINICAL & FORENSIC, 2001) e a difícil caracterização laboratorial, pois devido ao alto poder de sedação, a concentração de efeito no soro é um tanto baixa (1 a 15ng/mL), o que constitui um complicador analítico. Desta forma, a metodologia para identificação e quantificação do flunitrazepam deve ser tal que concentrações sub-terapêuticas possam ser detectadas (DARIUS & BANDITT, 2000; HACKEETT & MARRAFFA, 2004)

As figuras 1 e 2 destacam alguns dados referentes ao uso destes fármacos, mencionados por indivíduos que buscaram atendimento em centros de emergência, nos Estados Unidos (THE DAWN REPORT, 2002). No Brasil, o CEBRID (Centro Brasileiro de Informações sobre Drogas Psicotrópicas) dispõe de pouquíssimos dados referentes a estas substâncias.

Figura 01: Notificação de indivíduos que fizeram uso de alguma *club drugs* e buscaram atendimento de emergência, nos EUA, no período de 1994 a 2000. (FONTE: Office of Applied, SAMSHA, Drug Abuse Warning Network)

Figura 02. Número de notificações do uso de alguma *club drugs* e a idade dos usuários que buscaram atendimento de emergência nos EUA, em 2000.

(Fonte: Office of Applied, SAMSHA, Drug Abuse Warning Network)

2.2. Flunitrazepam (FN)

Propriedades físico-químicas dos BDZ e FN

Figura 3. Estrutura química dos benzodiazepínicos

O termo BDZ refere-se à porção da estrutura composta por um anel benzeno (A) fundido a um anel diazepínico de sete átomos (B). Entretanto, como todos os BDZ importantes possuem um substituinte 5-arílico (C) e um anel 1,4-diazepina, o termo torna-se sinônimo de 5-arílico-1,4-benzodiazepínicos. A natureza química dos substituintes nas posições 1 a 3 pode variar amplamente, podendo incluir anéis fechados triazólicos (alprazolam) ou imidazólico (midazolam) nas posições 1 e 2 (GOODMAN & GILMAN, 1996).

De acordo com a estrutura química, os BDZ podem ser classificados em três grupos: 1,4-benzodiazepínicos (diazepam, medazepam, nitrazepam, flunitrazepam); triazolobenzodiazepínicos (alprazolam, estazolam) e 1,5-benzodiazepínicos (clobazam, clordiazepóxido).

O FN é muito semelhante ao diazepam (protótipo do grupo), caracterizando-se por apresentar um grupo nitro em R₅ e um flúor em R₄.

Figura 4. Estrutura química do FN

Sinônimos: 1-metil-7-nitro- 5-(2-fluorofenil)- 3H-dihidro-1,4-benzodiazepínico-2(1H)-um;
5-(2-fluorofenil)-1,3-dihidro-1-metil-7-nitro-2H-1,4-benzodiazepínico-2-um;
Ro-5-4200; Rohypnol; Roipnol; Narcozep; Primun.

Peso molecular: 313,28

Fórmula molecular: C₁₆H₁₂FN₃O₃

C 61,34%, H 3,86%, F 6,06%, N 13,41%, O 15,32%

Número do CAS: 1622-62-4

Ponto de fusão: 166-167°C

Solubilidade em água: 72,8 mg/L

O FN é um BDZ usado no tratamento da insônia, como sedativo hipnótico e na indução da anestesia. Apresenta efeitos psicológicos semelhantes ao diazepam, embora seja aproximadamente 10 vezes mais potente (STEVE, 1998).

O FN não foi aprovado pelo FDA, não sendo manufaturado nem vendido licitamente nos EUA. É produzido e vendido legalmente sob prescrição na Europa e

países da América Latina, principalmente Colômbia, México, Argentina, Brasil, Peru Uruguai e Venezuela. Embora não esteja disponível legalmente nos EUA, tem aparecido como droga de rua em casos da “*date-rape drugs*” ou “*club drugs*” (HUF, et al., 2000).

Existe uma outra grande preocupação quanto ao uso, devido ao baixo custo do fármaco. Um tablete, ou comprimido de FN, ou Rohypnol, nome comercial do fármaco (figura 4), pode ser comprado por aproximadamente U\$5,00 nos EUA (DARIUS & BANDITT, 2000).

Figura 5 – Comprimidos de FN, Rohypnol - Roche®

Em 1983, de acordo com a “Convenção de Substâncias Psicotrópicas de 1971, das Nações Unidas, o FN estava enquadrado na *Schedule IV*, que descreve substâncias considerados especialidades farmacêuticas. Em 1995, através da Organização Mundial de Saúde, o FN foi movido para *Schedule III*, sendo o 1º BDZ a requerer um controle mais rígido. Devido ao aumento das apreensões da droga, o *U. S. Drug Enforcement Administration (DEA)* está revendo a possibilidade de colocar o FN na *Schedule I*, que significa a sua presença na lista de substâncias

controladas, consideradas de alto potencial de abuso, sem benefício terapêutico/médico e cujo uso apresenta riscos mesmo sob supervisão médica”.

No Brasil a ANVISA classifica o FN na lista B1 – substâncias psicotrópicas sujeitas à notificação de receita “B” .

Vários são os “nomes de rua”, ou seja, nomes populares pela qual o fármaco fica conhecido pelos seus usuários, dentre eles destacam-se: *circles, Mexican valium, rib, roach-2, roofies, roopies, rope, ropies, ruffies, R-2, roaches*, entre outros.

Supostamente, o nome de rua *roofies* (telhado, em inglês) se deve ao fato trabalhadores mexicanos que foram para os EUA reparar os telhados, após o furacão Andrew e trouxeram o fármaco, onde roof significa telhado, em inglês (CLINICAL & FORENSIC, 2001).

A descrição de um usuário (*“Rohypnol will calm you down quite like nothing you’ve ever experienced. The result is a warm, vago, very comfortable feeling, free from anxiety, allowing you to drift away in a boat of bizarre and vivid dreams”*) elucida o fato de que estas substâncias constituem verdadeiros “paraísos artificiais” que encontram terreno fértil no enfrentamento do cotidiano a que a sociedade moderna está submetida (CLINICAL & FORENSIC, 2001).

2.3. Toxicocinética

Após administração oral, o FN, à semelhança de outros BDZ são bem absorvidos pelo trato gastrointestinal, onde a concentração plasmática de pico (C_{max}) ocorre cerca de 30 minutos a 2 horas. É rapidamente absorvido após administração retal, podendo a C_{max} plasmática ocorrer de 10 a 30 minutos. A absorção intramuscular é lenta e irregular o que diminui as concentrações do pico plasmático quando comparado com a absorção oral (GOODMAN & GILMAN, 1996; ELLENHORN & BARCELOUX, 1988; MARTINDALE, 1996).

Todos os BDZ são essencialmente absorvidos de forma completa, com exceção do clorazepato que é rapidamente descarboxilado em N-desmetildiazepam (nordiazepam), que é subsequente absorvido por completo. Alguns BDZ (flurazepam) alcançam a circulação sistêmica apenas na forma de metabólitos ativos (GOODMAN & GILMAN, 1996).

São altamente ligados às proteínas plasmáticas (85%-98%), o que se deve ao fato da solubilidade lipídica, sendo que a fração livre varia de 2% (diazepam) a 15% (clonazepam) (OGA, 2003; ELLENHORN & BARCELOUX, 1988).

As concentrações plasmáticas da maioria dos BDZ exibem padrões compatíveis com modelos bicomportimentais, mas os modelos com três compartimentos parecem ser mais adequados para os compostos com solubilidade lipídica mais alta. Desta forma, ocorre rápida captação de BDZ no cérebro e em outros órgãos perfundidos após administração intravenosa; a captação rápida é seguida por uma fase de redistribuição aos tecidos menos perfundidos, em especial músculos, órgãos e tecidos. Atravessam facilmente a barreira placentária e são

secretados no leite materno (GOODMAN & GILMAN, 1996; MARTINDALE, 1996; OGA, 2003;).

A absorção pode ser influenciada por alimentos, terapia associada e o uso de outros fármacos, principalmente aqueles que alteram o pH gástrico (OGA, 2003).

O volume de distribuição depende da lipossolubilidade, que varia muito no grupo dos BDZ, sendo o diazepam o que apresenta maior volume de distribuição, 0,95-2 L/Kg, clordiazepóxido 0,26-0,58 L/Kg, aprazolam 0,97-1,17 L/Kg (ELLENHORN & BARCELOUX, 1988).

A meia-vida plasmática, dos BDZ e seus metabólitos, são aumentadas em neonatos, idosos e pacientes com doenças hepáticas. A meia-vida do diazepam e metabólitos, por exemplo, pode se aumentada de 3 a 4 vezes nestes casos (OGA, 2003; GOODMAN & GILMAN, 1996; MARTINDALE, 1996).

São extensivamente metabolizados através de vários sistemas enzimáticos microsossomais diferentes no fígado, envolvendo vias oxidativas, n-desmetilação e/ou hidroxilação e, não oxidativas – nitroredução e conjugação glicurônica, etc (GOODMAN & GILMAN, 1996).

O FN sofre uma biotransformação hepática não oxidativa de nitroredução. Os principais metabólitos são o 7-aminoflunitrazepam (7-AF) e o 3-hidroxiflunitrazepam (3-OHF), como descrito na figura 6.

No sangue, soro ou plasma, o FN e o 7-AF são os principais produtos de biotransformação encontrados. O N-desmetilflunitrazepam (N-DMF) pode ser

detectado no sangue, mas é considerado metabólito de menor importância, quando se trata de verificação de uso, devido a baixa concentração. Tanto o 7-AF como o N-DMF, são metabólitos ativos. Na urina estão presentes os seguintes metabólitos: 7-acetamidoflunitrazepam (7-ACF), o 3-OHF e o 7-aminodesmetilflunitrazepam (7-ADMF). O N-DMF também pode ser encontrado na urina, mas em concentrações muito baixas (MAHJOUB & STAUB, 2001; CLINICAL & FORENSIC, 2001; JOURDIL et al., 2003).

Figura 6. Biotransformação do flunitrazepam (MAHJOUB; STAUB, 2001)

Os BDZ não apresentam grandes interações farmacocinéticas com outros fármacos, embora seus metabolismos oxidativos possam ser inibidos pela cimetidina, dissulfiram, isoniazida e contraceptivos orais, que são inibidores enzimáticos e, parece ser aumentado pelos indutores enzimáticos como os barbitúricos e a rifampicina (OGA, 2003; GOODMAN & GILMAN, 1996).

Os metabólitos ativos gerados são mais lentamente metabolizados que os compostos originais, assim sendo, a duração da ação de muitos BDZ apresenta pouca relação com a meia-vida de eliminação do agente que foi administrado. A meia-vida plasmática do flurazepam, por exemplo é de 2 a 3 horas, mas o principal metabólito ativo, o N-desalquilflurazepam pode chegar a 50 horas ou mais (GOODMAN & GILMAN, 1996).

São excretados preferencialmente pelas vias urinárias, como metabólitos oxidados e glicuronídeo-conjugado e, em menor concentração pela via fecal. Uma porcentagem muito pequena é excretada inalterado na urina (THORNTON & LIMA, 2003, 2003).

2.4. Toxicodinâmica

Os principais alvos moleculares dos BDZ são os receptores de neurotransmissores inibitórios diretamente ativados pelo aminoácido ácido γ -aminobutírico (GABA), amplamente distribuídos no córtex, cerebelo e estruturas límbicas, áreas envolvidas em processos emocional e cognitivo e também na produção da convulsão (GOODMAN & GILMAN, 1996).

O principal tipo de receptor GABA no cérebro, denominado receptor $GABA_A$, é um canal de cloreto que faz parte da membrana e que medeia a maior parte da neurotransmissão inibitória do sistema nervoso central. Na ausência de GABA este canal de cloreto se encontra na sua conformação fechada, ou seja, impermeável a íons. Quando o GABA se liga ao receptor, a estrutura tridimensional do complexo é alterada, resultando na conformação aberta do canal de cloreto, permitindo o fluxo de ânions. A direção do fluxo é determinada pelo gradiente de concentração e pelo potencial da membrana (LIMA, 1984).

Benzodiazepínicos radiomarcados e análogos ao GABA, ligam-se às membranas cerebrais com alta afinidade. Estes estudos demonstram que há um acoplamento funcional e estrutural dos receptores de BDZ com receptores $GABA_A$, formando um complexo macromolecular, o que explica a potencialização desses fármacos sobre os efeitos neurotransmissores GABA nos sítios pré e pós-sinápticos, levando ao aumento da transmissão de GABAérgica (GOODMAN & GILMAN, 1996; THORNTON & LIMA, 2003).

Dada a hipótese do receptor $GABA_A$ para ação benzodiazepínica, os BDZ ligam-se diretamente ao complexo receptor/canal iônico e modulam de forma

alostérica a sua atividade, ou seja, a presença de dois diferentes sítios de ligação no mesmo complexo fica evidenciada pela observação de que GABA aumenta a ligação dos BDZ e que estes aumentam a ligação do GABA nos sítios de ligação. A interação dos sítios de ligação nem mesmo complexo é denominada interação alostérica (GOODMAN & GILMAN, 1996; THORNTON & LIMA, 2003).

Ao contrário dos barbitúricos, os BDZ não controlam diretamente os diretamente os receptores GABA_A, mas exigem GABA para expressar seus efeitos. Isto explica por que estes fármacos são mais seguros que os barbitúricos, que ativam diretamente o canal de cloreto e podem causar depressão respiratória (GOODMAN & GILMAN, 1996; ELLENHORN, et al. 1997; THORNTON & LIMA, 2003).

2.5. Aspectos analíticos

2.5.1. Técnicas de separação e identificação

Imunoensaio

Os imunoensaios são usados geralmente como testes de triagem (radioimunoensaio, imunoensaio de fluorescência polarizada, enzima imunoensaio), identificando a presença de compostos BDZ com boa especificidade, porém pode ser questionável devido à falta de sensibilidade para alguns BDZ, especialmente aqueles empregados em de baixas doses, como o flunitrazepam (JOURDIL et al., 2003).

Cromatografia a gás - GC

Os benzodiazepínicos são estruturas polares e termolábeis, o que dificulta sua determinação através da técnica de separação por cromatografia gasosa. Um recurso empregado para contornar esta questão é a derivação dos compostos. Desta forma, analisa-se o composto obtido na derivação, melhorando-se as condições cromatográficas e aumenta-se a sensibilidade (MACDOWALL, 1989).

Os BZD podem ser facilmente convertidos a benzofenonas através de uma simples hidrólise ácida. As benzofenonas são estáveis termicamente, podendo ser analisadas por cromatografia gasosa sem necessidade de derivação. Deve-se porém ter o conhecimento de que alguns BZD não formam benzofenonas, que é o caso dos triazolobenzodiazepínicos - alprazolam, triazolam, estazolam e midazolam. Ocorre também que diversos BZD formam a mesma benzofenona, o que dificulta a interpretação dos resultados, não permitindo a identificação do composto precursor (BLACK, et al., 1994).

Na técnica descrita, Seno H. 1991 utilizou dois tipos de detectores, FID (detector de ionização de chama) e ECD (detector de captura de elétrons). O ECD, como esperado, apresentou uma sensibilidade 10 vezes maior que o FID.

O método de hidrólise ácida, faz com que muitas impurezas sejam detectadas, o que dificulta a interpretação dos cromatogramas, podendo inclusive haver a co-eluição dos picos de interesse com as impurezas. Desta forma, Seno H. 1991 realiza uma extração em fase sólida, que também é uma fase de *cleanup* das benzofenonas formadas.

A conversão dos BZD a benzofenonas mostrou uma recuperação de 100% para maioria das benzofenonas, com exceção da 2-amino-5-bromobenzofenona no plasma e em sangue total, o que não correu em amostra de urina. A determinação de BZD, através da formação das benzofenonas, obtidas a partir da hidrólise fortemente ácida da amostra, é um método simples, de fácil execução e, dependendo do objetivo que se propõe, pode ser suficientemente eficiente (Seno et al. 1991).

Cromatografia líquida de alta performance - HPLC

Uma das principais vantagens do uso da técnica de HPLC em relação à cromatografia gasosa, é que os compostos analisados podem ser polares, termolábeis e apresentar pouca volatilidade, pois se trabalha à temperatura ambiente, ou seja, ideal no caso dos BZD (KLEINSCHNITZ, et al., 1996). Desta forma, elimina-se a derivação, que é uma das etapas mais críticas no preparo da amostra. Na cromatografia líquida os métodos de extração são bem mais simples, em alguns casos, pode-se fazer apenas uma diluição da amostra (BOECK, et al., may/nov 2002).

Cromatografia a gás acoplada ao espectrômetro de massas – GC-MS

Nos trabalhos descritos por WEST& RITZ, 1993; BLACK, et al., 1994; LESLIE & POLKLIS, 1994 e MEATHERALL, 1994, utiliza-se cromatografia gasosa acoplada ao detector de massas (GC-MS). Na fase de extração, os autores referem

à hidrólise enzimática para que os metabólitos conjugados retornem a forma livre e depois é realizada a extração em fase sólida.

A hidrólise enzimática, processo bem mais brando, que evita degradação de certos analitos, como ocorre na hidrólise ácida. Apresenta porém um custo bem mais elevado e maior tempo de reação. Necessita um rigoroso controle das condições analíticas, onde é indicada a utilização de controles para certificar-se de que a hidrólise foi eficaz. Em certos casos, as enzimas podem ser inibidas por substâncias presentes na amostra (MACDOWALL , 1989).

Os analitos assim extraídos devem ser então derivatizados e antes de serem analisados por GC-MS, quer no modo *full scan* ou no modo SIM (*Selected Ion Monitoring*).

A técnica de detecção por MS baseia-se na ionização e subsequente fragmentação das moléculas. As razões massa/carga (m/z) e as abundâncias dos íons produzidos são posteriormente determinados. Os grupos funcionais presentes na molécula orientam a fragmentação de tal forma que, conhecendo-se a estrutura da molécula é possível prever o padrão de fragmentação. De forma inversa, conhecendo-se o padrão de fragmentação, uma estrutura compatível pode ser freqüentemente sugerida.

No modo *full scan* se faz a varredura de uma determinada faixa de massa, sendo analisada sob determinadas condições. O filtro de massas faz uma varredura de voltagens, de alta para baixa, selecionando massas altas e baixas onde se obtém o espectro total da molécula, o qual fornece a estrutura para identificação da substância. No modo *full scan* a caracterização da substância

utiliza-se o tempo de retenção, o índice de similaridade do espectro de massas obtido com o constante da biblioteca enfocada e a relação de abundâncias dos íons qualificadores.

No modo SIM são selecionados fragmentos de massa característicos da molécula em estudo. São estabelecidas apenas determinadas massas, ou seja, voltagens nas quais o filtro de massas operará. Para análise quantitativa o modo SIM é mais utilizado, uma vez que diminui a presença de interferentes e diminui o Limite de Detecção (maior sensibilidade).

No estudo de BORREY, et al. 2001, 15 benzodiazepínicos e seu metabólitos são analisados no modo *full scan* e no modo SIM. Os resultados obtidos confirmam a maior sensibilidade do método no modo SIM. No modo *full scan* a linearidade foi de 50 a 1000 ng/mL, o LD e LQ foram de 13 a 30 ng/mL e ≤ 50 ng/mL, respectivamente. No modo SIM a linearidade foi de 5 a 100 ng/mL, o LD e LQ foram de 1 a 1,7 ng/mL e ≤ 5 ng/mL, respectivamente.

2.5.2. Espectrometria de massas

A espectrometria de massas (MS) é atualmente uma das técnicas mais eficientes na identificação molecular o que a torna extremamente seletiva. O acoplamento dessa técnica com métodos de separação como a cromatografia gasosa e o HPLC e mais recentemente, o desenvolvimento de sistemas que permitem a análise de massa em *tandem* tornaram essa técnica altamente sensível.

A análise por espectrometria de massa consiste em: (i) gerar íons através de perda ou ganho de carga (p. ex.: ejeção de elétrons, protonação ou desprotonação), (ii) separar os íons de acordo com suas relações massa/carga (m/z) e (iii) determinar as intensidades relativas de cada um desses íons.

Do ponto de vista instrumental, um espectrômetro de massa é composto de três partes principais: uma fonte de ionização, um analisador responsável pela separação dos íons em tempo no espaço e um detector. Um sistema adequado de introdução de amostras é ligado à fonte de ionização como, por exemplo, o interfaceamento com um sistema cromatográfico (GC ou HPLC). O percurso dos íons entre a fonte de ionização e o detector deve se dar sob pressões muito baixas (da ordem de 10^{-6} Torr) caso contrário, as colisões dos íons com outras moléculas gasosas reduziriam a resolução e a sensibilidade do instrumento pelo aumento da distribuição das energias cinéticas dos íons, pela indução de fragmentação ou simplesmente bloqueando os íons e impedindo-os de alcançar o detector. Tais pressões reduzidas são obtidas através da combinação de bombas de vácuo mecânicas com bombas turbomoleculares, de difusão ou criogênicas. Finalmente, uma interface computacional é necessária para o controle dos diversos componentes do espectrômetro e para o processamento dos dados obtidos (figura 7).

Figura 7: Componentes de um espectrômetro de massa.

Atualmente, dispõem-se de uma grande variedade de métodos de ionização, entretanto, os métodos clássicos como o impacto eletrônico e a ionização química vêm perdendo espaço para métodos recentes, mais suaves de ionização que permitem a análise de moléculas polares (maioria das biomoléculas). Dentre os últimos, destacam-se o *electrospray* (ES) e o MALDI (Tomer & Moseley, 1994).

Um dos principais desafios da espectrometria de massa é o interfaceamento com a cromatografia líquida, pois a amostra está em meio líquido e precisa entrar em alto vácuo para que ocorra a fragmentação.

A ionização a pressão atmosférica (API - *Atmospheric Pressure Ionization*) é a interface entre a cromatografia líquida e o espectrômetro de massa, onde a ionização da amostra ocorre à pressão atmosférica (figura 8).

API - Atmospheric Pressure Ionization

Figura 8. Esquema da interface entre a cromatografia líquida e o espectrômetro de massa pela técnica de ionização a pressão atmosférica.

As principais versões da interface API são a Ionização Química a Pressão Atmosférica (APCI) e o *Electrospray* (ES). Como características comuns destas interfaces podemos descrever: a combinação de um dispositivo de introdução da amostra em solução, fonte de ionização a pressão atmosférica, orifício de amostragem de íons, sistema ótico de monitoramento dos íons e, interface entre pressão atmosférica e alto vácuo.

Espectrometria de massa com Ionização Química a Pressão Atmosférica

No sistema de Ionização Química a Pressão Atmosférica (APCI), representado na figura 9, a amostra é aquecida na saída do capilar, assim a mistura de líquido aquecido e vapor se expande dentro da interface a pressão atmosférica, onde é ionizada através de uma descarga elétrica. O processo de interfaceamento é muito semelhante ao ES, porém, o fluxo da amostra não sofre a ação de um campo elétrico, como no ES, ocorre o processo de desolvatação das gotículas, onde também ocorre a eliminação dos íons *clusters*, através de uma contra-corrente de nitrogênio.

Ionização Química a Pressão Atmosférica – APCI

Figura 9. Esquema da interface entre a cromatografia líquida e o espectrômetro de massa por ionização química a pressão atmosférica - APCI.

Um menor número de aplicações utilizando-se APCI são reportadas, principalmente no campo da toxicologia clínica e forense. Uma das razões para tal fato provavelmente se deve à limitada faixa de polaridade dos analitos (exige baixa polaridade, como no GC/MS), relativa incompatibilidade com compostos termolábeis, devido ao aquecimento do capilar e, elevado “background” produzido, se comparado ao ES (MARQUET, 2002).

Espectrometria de massa em tandem com ionização por electrospray

Embora exista atualmente uma grande variedade de métodos de ionização para espectrometria de massa, a ionização por *electrospray* (ESI) tem revolucionado a análise de biomoléculas. Essa tecnologia tem sido única no aspecto de fornecer simultaneamente um interfaceamento eficiente entre métodos de separação em solução (HPLC, eletroforese capilar e variações) e a facilidade na ionização de compostos altamente polares e não voláteis (GASKELL, 1997; FRELON et al, 2000).

Na ESI (figura 10), uma solução contendo um analito atravessa um capilar mantido em um alto potencial. O alto campo elétrico na extremidade do capilar (~4000 V) provoca o desprendimento de gotículas altamente carregadas em direção à entrada do analisador. A dispersão da coluna de solvente do interior do capilar em microgotículas (*spray*), é auxiliada pela nebulização por fluxo de nitrogênio. Além do gradiente de potencial, as pressões reduzidas no analisador também atraem as gotículas. Durante a travessia entre a *probe* e o analisador, as gotículas reduzem em tamanho devido à evaporação do solvente promovido pelo fluxo de nitrogênio perpendicular ao fluxo do *spray* e também pelas “explosões de *Coulomb*” (subdivisão das gotículas resultante da alta densidade de carga).

Esses processos se repetem até que os íons encontrem-se completamente dessolvatados (GASKELL, 1997).

Figura 10: Representação esquemática do mecanismo de ionização por *electrospray*.

O analisador mais comumente utilizado em equipamentos do tipo ESI é o do tipo quadrupolar que é constituído por quatro bastões de aço inoxidável dispostos simetricamente em relação ao eixo do sistema. Os bastões são conectados dois a dois a um gerador de tensão contínua sobreposto a uma tensão senoidal (radiofrequência). A combinação ESI/quadrupolos é bastante interessante, pois como descrito anteriormente a ionização ocorre à pressão atmosférica, e esse tipo de analisador é relativamente tolerante a altas pressões ($\sim 5 \times 10^{-5}$ Torr). Além disso, o analisador quadrupolar é capaz de analisar m/z de até 3000, o que é bastante útil, pois a ionização de biomoléculas por ESI produz uma distribuição de carga abaixo de m/z 3000. Outra vantagem adicional é o custo reduzido desse tipo de analisador.

Embora de alto custo, os analisadores do tipo triplo quadrupolo ou MS/MS ou ainda *tandem MS*, vem se popularizando devido a possibilidade de obter informações estruturais e um enorme incremento de sensibilidade. Uma análise por *tandem MS* pode ser definida como a seleção de um íon precursor no primeiro analisador, seguido pela detecção do íon produto no terceiro analisador, formado na câmara de colisão (segundo analisador). A fragmentação dos íons precursores em íons produtos é obtida através da conversão da energia translacional dos íons precursores em energia interna após a colisão com moléculas de gás (argônio) energizadas (GASKELL, 1997).

O MS/MS apresenta duas grandes vantagens em relação à espectrometria de massa clássica que são o aumento da sensibilidade e da seletividade da técnica. O aumento da sensibilidade está relacionado à diminuição do ruído químico que é provocado por outros componentes da amostra analisada. A filtragem dos íons reduz bastante tal ruído, conseqüentemente, outras filtrações o reduzem ainda mais, levando a um ganho na relação sinal/ruído. O ganho de seletividade é resultado da baixa probabilidade de duas moléculas gerarem íons precursores e produtos idênticos em MS/MS.

O equipamento utilizado no presente trabalho, um espectrômetro triplo quadrupolar com ionização por *electrospray* está esquematizado na figura 11.

Figura 11: Representação esquemática de ESI-MS/MS.

O princípio de separação por MS/MS pode ser expresso pela seguinte equação:

Onde, m_p é o íon precursor ou o íon parental (que pode ser o íon molecular ou outro íon fragmento), m_f é o íon produto e m_n é o fragmento neutro produzido durante a reação de dissociação. O m_n não pode ser detectado, pois um espectrômetro de massa pode detectar apenas partículas carregadas.

Como as três variáveis m_p , m_f e m_n são independentes, elas podem ser mantidas fixas ou ser variadas, resultando em diferentes modos de aquisição por MS/MS:

Tabela 1 - Tipos de varredura em MS/MS.

Modo de aquisição	m_p	m_f	m_n
Íons filhos	Fixa	Variável	Variável
Íons parentais	Variável	Fixa	Variável
Perda neutra constante	Variável	Variável	Fixa
Monitoramento de reações múltiplas	Fixa	Fixa	Variável

Um espectro de íons produto (figura 12) é obtido através da seleção de um íon precursor representativo da molécula no primeiro analisador seguido de sua passagem pela câmara de colisão onde as reações de dissociação são produzidas. O segundo analisador efetua uma varredura dos íons produtos gerados. Esse tipo de análise é utilizada freqüentemente para obter informações estruturais sobre o íon precursor selecionado.

Figura 12: Esquema da monitoração de íons produtos.

Um espectro de íons precursores (figura 13), é obtido pela seleção de um íon fragmentado no segundo analisador. É realizada uma varredura no primeiro analisador com o intuito de se determinar os íons precursores que se fragmentam, gerando aquele íon produto. A aquisição de um espectro desse tipo

tem por objetivo identificar dentro de uma mistura os diferentes componentes que se fragmentam em uma estrutura idêntica.

Figura 13: Esquema da monitoração de íons precursores.

Na aquisição de um espectro por perda neutra constante (figura 14), são realizadas varreduras simultâneas nos dois analisadores mantendo-se entre eles uma diferença de massa constante que corresponde ao fragmento neutro considerado. Esse tipo de análise é muito versátil e permite detectar as famílias de compostos que se caracterizam pela perda do mesmo grupamento químico.

Figura 14: Esquema da monitoração por varredura de perda neutra constante.

O modo de aquisição que responde pela excelente sensibilidade e seletividade do MS/MS é a monitoramento de reações múltiplas (MRM), ou SRM - *select reaction monitoring*) (figura 15). A aquisição é efetuada pela seleção do

seleção do íon precursor no primeiro analisador e detecção de um ou mais íons produtos conhecidos provenientes da fragmentação do precursor na câmara de colisão. O segundo analisador não efetua uma varredura como no caso da aquisição de espectros produtos, mas focaliza-se em um ou mais fragmentos característicos.

Figura 15: Esquema do monitoramento de reações múltiplas.

A seguir, na tabela 2, são descritos os diferentes modos de varredura em MS/MS.

Tabela 2 - Diferentes modos de varredura em MS/MS.

	MS1	Câmara de colisão	MS2
Espectro de íons filhos	Fixa (massa do íon parental)	<i>rf only</i> (todas as massas passam)	Varredura
Espectro de íons parentais	Varredura	<i>rf only</i> (todas as massas passam)	Fixa (massa do íon filho)
Perda neutra constante	Varredura (sincronizada com o MS2)	<i>rf only</i> (todas as massas passam)	Varredura (sincronizada com o MS1)
Monitoramento de reações múltiplas	Fixa (massa do íon parental)	<i>rf only</i> (todas as massas passam)	Fixa (massa do íon filho)

2.5.3. Técnicas de extração

Extração *on-line*

O preparo de uma amostra para análise por HPLC, assim como o requerido em qualquer técnica de identificação, tem como requisito principal, um bom método de extração. Os métodos convencionais de análise de pequenas moléculas como aminas, marcadores patológicos ou drogas, na presença de proteínas, sempre inclui um complexo passo de desproteinização e extração da amostra, que nem sempre são 100% efetivos, implica em custo e tempo.

Em HPLC, a preservação da coluna cromatográfica é algo de fundamental importância, visto que estas colunas têm um custo muito elevado. Em um processo de extração pouco eficiente, macromoléculas, como as proteínas, são adsorvidas ou precipitam na superfície da coluna causando danos irreversíveis, tais como: aumento da pressão de fundo, perda da capacidade de separação dos analitos e seletividade. Desta forma é necessário eliminar os interferentes de forma a compatibilizar o extrato com o método cromatográfico enfocado.

O método ideal é aquele onde se obtém uma recuperação $\geq$ a 99%, rápido, com um número mínimo de etapas e ainda, se possível, ser automatizável.

Na extração líquido-líquido, o processo é lento, manual, pouco reprodutivo se o analista não estiver suficientemente treinado, insalubre se não se dispor de adequado sistema de exaustão e pouco ecológico, onde grandes volumes de solventes orgânicos são empregados.

Novos sistemas de preparo de amostras, integrados ao HPLC, permitem direta e repetidas injeções de amostras biológicas sem pré-tratamento. Primeiro a amostra é fracionada por meio de uma pré-coluna de extração, onde proteínas e outros interferentes da amostra podem ser descartados. A fração dos analitos de interesse, é seletivamente extraída na fase estacionária da coluna. Após esta primeira etapa de *cleanup*, a fração do analito é transferida *on-line* para a coluna do HPLC onde é separada e quantificada de forma convencional (OERTEL, et al., 1998; BAEYENS, et al., 2000; BRUNETTO et al., 2003).

Esta pré-coluna, onde ocorre o fracionamento da amostra, é denominada de RAM – *Restricted Access Material*, que combina a técnica de cromatografia em fase reversa (RPC), extração em fase sólida (SPE) e cromatografia de exclusão por tamanho de partícula, resultando em uma técnica automatizada *on-line*, portanto muito reprodutiva e rápida, para análise de amostras que contenham analitos de baixo peso molecular, como drogas por exemplo, ricas em proteínas (MERCK, 2003).

Um tipo de RAM é a coluna ADS - alquil-diol-sílica (Lichrospher®), figura 16. São partículas de sílica, esféricas, de 5µm, com porosidade de 60Å (6nm). Esta porosidade não permite a passagem de macromoléculas com peso molecular $\geq$ a 15000 daltons, ou seja, exclui a fração protéica da amostra. O interior da esfera, os poros utilizam um sistema de fase reversa como uma coluna de SPE C18, C8 ou C4, de cadeia longa, para disponibilizar um range mais amplo de seletividade das amostras (MERCK, 2003).

Figura 16. Esquema ilustrativo da coluna ADS

Existem outros sistemas RAM, que utilizam basicamente o mesmo princípio de separação de macromoléculas, conforme ilustram as figuras 17 e 18.

Figura 17. Coluna de superfície semi-permeável - SPS (Semi-Permeable Surface)

Figura 18. Coluna de superfície interna de fase reversa - ISRF (Internal Surface Reverse) Phase

2.5.4. Matrizes biológicas de interesse forense

Devido às pequenas doses administradas (cerca de 1 a 2mg oral e/ou intravenosa) e a extensiva metabolização através de diversos caminhos, a identificação do flunitrazepam (FN) e seus metabólitos é dificultada (JOURDIL, et al.,2003). Outro fato que se constitui em um complicador analítico é o alto poder de sedação, onde a concentração de efeito no soro é um tanto baixa (1 a 15ng/mL), sendo assim, um método de elevada sensibilidade é portanto necessário na identificação e quantificação do flunitrazepam (DARIUS & BANDITT, 2000)

Dose oral em adultos: 1 a 2 mg

Dose letal: 7 a 14 comprimidos (28 mg)

A tabela 3 demonstra os valores de referência em soro (níveis terapêuticos e tóxicos) de alguns BZD e, como se pode observar, o flunitrazepam apresenta níveis bem mais baixos, tanto da dose terapêutica como da dose tóxica.

Tabela 3- Valores de referência de alguns BDZ

BNZ	Nível Terapêutico (ng/mL)	Nível Tóxico superior a: (ng/mL)
Diazepam	200 a 2000	3000
Oxazepam	200 a 1500	2000
Bromazepam	50 a 200	300
Nitrazepam	40 a 100	200
Clonazepam	15 a 60	80
Flunitrazepam	5 a 40	50

Conforme descrito anteriormente, os principais produtos de biotransformação do FN são: o 7-aminoflunitrazepam (7-AF), encontrado no sangue e na urina, o 3-hidroxiflunitrazepam (3-OHF), encontrado na urina e o N-desmetilflunitrazepam (N-DMF), de menor importância devido a baixa concentração no sangue e a pequena taxa de excreção na urina. O FN e os produtos de biotransformação N-DMF e 3-OHF, desaparecem dos fluidos biológicos em poucos dias a temperatura ambiente ou quando a amostra é exposta a luz. (JOURDIL, et al., 2003).

O 7-AF e o 3-OHF são os produtos de biotransformação predominantes na urina, enquanto o FN somente pode ser detectado na urina em casos da ingestão de elevadas doses.

A janela de detecção do 7-AF pode se estender, no mínimo, a 72 horas da ingestão (ELSOHLY, et al., 1999; NEGRUZ, et al., 2001). Sua concentração em amostras de sangue pode exceder a concentração do próprio FN devido à redução *in vitro* do grupo 7-nitro a 7-amino (ELSOHLY, et al., 1999). O que é observado principalmente em amostras de sangue *post-mortem* devido a ação das bactérias (KLEINSCHNITZ, et al., 1996).

O estudo realizado por Elsohly, et al 1999, traz importantes informações quanto à determinação do FN e do produto de biotransformação 7-AF em sangue total e em plasma. Após a administração oral de 2 mg de FN em voluntários, foram realizadas coletas de sangue imediatamente após a ingestão da droga (0h), 15 minutos, 30 minutos, 1, 2, 4, 8, e 12 horas. As determinações foram realizadas utilizando-se GC/MS, no modo *full scan*. O FN foi encontrado somente em amostras de sangue total, em amostras colhidas entre 15 minutos e

4 horas após a ingestão da droga, com um pico de concentração após 1 hora. O FN não foi detectado em nenhuma amostra de plasma, este fato porém, pode ser atribuído a baixa sensibilidade do método empregado (LD – 5 ng/mL em sangue total). O produto de biotransformação 7-AF, foi encontrado tanto nas amostras de plasma como de sangue total, a partir dos primeiros 15 minutos até as 12 horas após a ingestão. O pico da concentração foi a partir das 4 horas, com concentrações entre 1,70 e 6,53 ng/mL (LD – 1 ng/mL em plasma).

Nos últimos 5 anos, tem sido investigado o uso de fluido oral como uma matriz alternativa, especialmente quando o procedimento de coleta deve ser rápido e não invasivo, como por exemplo para triagem de drogas de abuso em motoristas à beira da estrada, ou mesmo para triagem de drogas de abuso no ambiente de trabalho.

Em um estudo realizado por Samyn, et al. 2002, foi administrado Rohypnol® em 4 indivíduos sadios e, amostras de saliva foram coletadas entre 0 e 6 horas após a ingestão de um tablete de 1mg da droga. As amostras foram armazenadas a 4°C. Utilizou-se SPE para extração das amostras e a técnica empregada foi GC/MS, com ionização química negativa com gás metano. Como padrão interno foi utilizado o FN-D₇. Os respectivos LD e LQ foram de 0,05 e 0,1 ng/mL para o FN e, 0,1 e 0,15 ng/mL para o 7-AF. O FN só pode ser detectado entre 12 e 24h após a coleta da amostra de saliva e quando NaF a 2% foi adicionado ao tubo de coleta. O FN é muito instável na amostra e deve haver necessariamente a preservação com NaF. Em nenhum caso as concentrações foram inferiores a 1ng/mL. O produto de biotransformação 7-AF, foi detectado em concentrações ligeiramente altas, com ou sem a presença de NaF a 2% ,

alcançando concentrações máximas (pico de concentração) de 1 a 3 ng/mL, 2 a 4 h após a ingestão da droga. Em todas as coletas o metabólito foi detectado, mas em concentrações mais baixas.

O trabalho descrito por Negruz, et al, 2001, traz importantes considerações sobre amostras de cabelo. O principal objetivo deste estudo foi determinar se o FN e o seu maior produto de biotransformação, o 7-AF podem ser detectados em amostras de cabelo de 10 voluntários, após a ingestão de 2mg de Rohypnol®.

Uma amostra de cabelo foi coletada durante a administração da droga (tempo 0), 24h (1dia) após a ingestão da droga, 3, 5, 14, 21 e 28 dias. As amostras foram mantidas a temperatura ambiente até a realização das análises. As amostras foram digeridas com HCl (50 mg de cabelo pulverizado) e após extraídas em fase sólida. Utilizou-se a técnica de GC/MS com ionização química negativa com gás metano no modo SIM. O padrão interno utilizado foi o diazepam-D₅. O LD do método foi de 0,5 pg/mg para o FN e 0,2 pg/mg para o 7-AF. O LQ foi de 2,5 e 0,5 pg/mg para o FN e 7-AF, respectivamente. Como controle, foram utilizadas amostras adicionadas em dois níveis, baixo e alto.

Em 5 dos voluntários, o 7-AF foi detectado a partir das primeiras 24h após a administração da droga e continuou sendo detectado até o final do estudo (28 dias). Em dois casos, o 7-AF foi detectado somente após 21 dias da ingestão da droga. Outros dois casos, após 14 dias da ingestão da droga. Em um único voluntário, o 7-AF foi detectado entre os dias 14 e 21 mas em concentrações abaixo do LQ. O FN foi detectado em algumas amostras, mas todas as concentrações estavam abaixo do LQ (0,5-2,3 pg/mg).

As concentrações do produto de biotransformação 7-AF, detectadas nas amostras dos voluntários, foram bem maiores do que as de FN, em cada dia do estudo. Isto pode ser explicado devido ao fato de que o 7-AF é mais básico e pode ligar-se mais facilmente a melanina do que a droga pai, o FN.

Neste estudo, não foi possível fazer nenhuma correlação entre a quantia da droga administrada e a concentração da droga detectada no cabelo, visto que os resultados variaram muito em cada voluntário. Baseando-se nestes achados, pode-se sugerir que as variações individuais das secreções ou do tipo de cabelo, podem esclarecer, em parte, tais discrepâncias.

No caso do FN, não existe a contaminação externa da amostra, pois a droga só se apresenta em forma de tabletes, não podendo ser fumada. Questões relacionadas às diferenças raciais, também não devem ser levadas em consideração neste caso, pois qualquer quantia de FN ou 7-AF detectada no cabelo de uma vítima caracteriza a ingestão de Rohypnol® e pode ser usada como evidência em casos de estupro (*“drug-facilitated sexual assault”*). Se a vítima fez uso da droga conscientemente, ou se foi desavisada da ingestão, da mesma forma, pode-se caracterizar como uma evidência em casos criminais (Negruz, et al., 2001).

3. OBJETIVO E PLANO DE TRABALHO

O presente trabalho tem por objetivo o desenvolvimento de metodologia analítica adequada para determinação de FN e seu principal produto de biotransformação, 7-AF, em soro, com vistas ao estabelecimento de eficiente diagnóstico laboratorial, possibilitando desta forma a inferência sobre a realidade dos casos onde não se utiliza este fármaco com finalidade terapêutica.

Para cumprir tal objetivo, foi elaborado o seguinte plano de trabalho:

- Revisão bibliográfica de métodos analíticos, que utilizem a técnica de LC_MS/MS para identificação e quantificação de FN e 7-AF;
- Desenvolvimento e validação de um método para análise destas substâncias em soro, empregando o método de extração on-line e interfaceamento com LC-MS/MS.

4. MATERIALS

4.1. Equipamentos

- Sistema de manipulação de líquidos Gilson 215 com módulo de injeção 819 equipados com seringa de 1 mL e *loop* de 500 µL, controlados pelo software Gilson 735;
- Sistema de HPLC Shimadzu, composto por duas bombas LC-10Atvp, controladas pelo módulo SCL-10A;
- Espectrômetro de massas Quattro Micro Waters/Micromass, equipado com probe de *electrospray*.

4.2. Reagentes

- Formiato de amônia P.A., Sigma®;
- Sulfato de Zinco (ZnSO₄) P.A., Nuclear®;
- Acetonitrila grau cromatográfico, Tedia®;
- Metanol grau cromatográfico, Tedia®;
- Extran, Merck®;
- Dimetil sulfóxido (DMSO), Riedel®.

4.3. Padrões

4.3.1. Analitos

- Alprazolam 99,8%, lote 20894/2002, Eurofarma®;
- Bromazepam 99,8%, lote 20547/2002, Eurofarma®;
- Clobazam 1 mg/mL em metanol, lote 61145592, CIL®, Massachusetts, USA;
- Clonazepam 1 mg/mL em metanol, lote 11921053, CIL®, Massachusetts, USA;
- Cloxazolam 98,2%, lote 22217/2002, Eurofarma®;
- Diazepam 1 mg/mL em metanol, lote 45102172, CIL®, Massachusetts, USA;
- Flunitrazepam 1 mg/mL em metanol, lote 11335743, CIL®, Massachusetts, USA;
- Midazolam 99,2%, lote 22479, Eurofarma®;

4.3.2. Padrões Internos Isotópicos

- Alprazolam D₅, 98% 100 µg/mL em metanol, lote 55044542, CIL®,
Massachusetts, USA;
- Clonazepam D₄, 98% 100 µg/mL em metanol, lote 11107053, CIL®,
Massachusetts, USA;
- Diazepam D₅, 98% 100 µg/mL em metanol, lote 119069632, CIL®,
Massachusetts, USA;
- Flunitrazepam D₇, 98% 100 µg/mL em metanol, lote 119277856, CIL®,
Massachusetts, USA;

4.4. Acessórios

- Coluna cromatográfica Luna 5µ C₁₈ 50x2 mm, Phenomenex®;
- Coluna cromatográfica Luna 3µ C₁₈ 100x2mm , Phenomenex®;
- Coluna cromatográfica Luna 3µ C₁₈ 150x2mm, Phenomenex®;
- Coluna cromatográfica Synergi 4µ C₁₈ 150x2mm , Phenomenex®;
- Coluna cromatográfica Phenosphere-NEXT 5µ C₁₈ 150x2mm,
Phenomenex®;

- Coluna cromatográfica 50x2 mm, empacotada *in house*, com fase reversa polimérica de estireno-divinilbenzeno, strata-X Phenomenex®, como coluna extratora;
- Microplacas de polietileno tereftalato de 96 poços, Wallac®;
- Micropipetadores de volumes variáveis (5 a 1000 µL), Eppendorf® e Finnpipette®;
- Ponteiras de plástico descartáveis, Labtip Yellow (5-200µL) e Labtip Blue (200-1000µL);
- Balões volumétricos de 5, 10 e 25 mL;
- Tubos de polipropileno (Falcon) de 15 mL;
- Tubos tipo *eppendorf* de 2 mL;
- Micro centrífuga para tubos tipo *eppendorf*, , Abbott® ;
- Centrífuga para microplacas, Sigma® ;
- Sistema de purificação de água Milli-Q Plus, Millipore®;
- Banho de ultra-som, Microsonic®;
- Balança analítica Sartorius® *research* R200D;
- Agitador mecânico tipo vortex Fanem® 251;

- Peagâmetro digital, Fisher Scientific®;
- Freezer doméstico -20°C.
- Freezer -80°C.

4.5. Preparo das soluções e reagentes

4.5.1. Soluções-estoque primárias

Foram pesadas 10 mg dos padrões de alprazolam, bromazepam, cloxazolam e midazolam - Eurofarma®, sendo transferidos para balão volumétrico onde se adicionou 10 mL de metanol, obtendo-se uma concentração de 1,0 mg/mL.

Os padrões de clobazam, clonazepam, diazepam e flunitrazepam CIL®, que se encontravam em solução, foram diluídos em metanol e transferidos para tubos de polietileno (Falcon) 15mL, obtendo-se uma concentração final de 100 µg/mL.

Os padrões isotópicos alprazolam D₅, clonazepam D₄, diazepam D₅ e flunitrazepam D₇ CIL® foram diluídos em metanol e transferidos para tubos de polietileno (Falcon) 15mL, obtendo-se uma concentração final de 10 µg/mL.

Todas as soluções-estoque foram identificadas e armazenadas a -80°C.

4.5.2. Soluções de trabalho (ST)

Foram preparadas soluções de trabalho dos padrões de BDZ e seus padrões isotópicos referidos em 4.5.1, a partir de diluições das soluções-estoque com acetonitrila/água 50% (v/v) com 0,1% de formiato de amônia, obtendo-se uma concentração final de 10 e 1 µg/ml respectivamente. Também foram preparadas soluções de trabalho nas mesmas concentrações, em metanol.

Todas as soluções-estoque foram identificadas e armazenadas a -20°C.

4.5.3. Fases móveis

Fase móvel de extração - Solução de acetonitrila/água 5%.

50 mL de acetonitrila e volume suficiente de água Tipo I para completar 1000 mL;

Fase móvel cromatográfica - Solução de acetonitrila/formiato de amônio 55:45.

550 mL de acetonitrila e suficiente volume de formiato de amônio 5mM a pH3 para completar 1000 mL;

A fase móvel foi degaseificada em banho de ultra som por 15 minutos antes do uso.

4.5.4. Outros reagentes:

Formiato de amônio 5 mM a pH 3: 157,65g de formiato em 500 mL de água Tipo I. O pH desta solução foi ajustado a 3,0 em peagâmetro, utilizando-se ácido fórmico.

Sulfato de Zinco 0,2M: pesar 0,66g de ZnSO_4 e dissolver em 100 mL de água Tipo I.

Sulfato de Zinco 0,2M em metanol 80%: pesar 0,66g de ZnSO_4 e dissolver em 20 mL de água Tipo I e adicionar 80mL de metanol.

Sulfato de Zinco 0,5M: pesar 1,65g de ZnSO_4 e dissolver em 100 mL de água Tipo I.

Sulfato de Zinco 0,5M em metanol 80%: pesar 1,65g de ZnSO_4 e dissolver em 20 mL de água Tipo I e adicionar 80mL de metanol.

4.6. Amostras de soro

Coleção amostras de soro provenientes da soroteca do Laboratório Fleury - Centro de Medicina Diagnóstica, sem indicação de uso de benzodiazepínicos.

4.7. Tratamento estatístico

O tratamento estatístico dos resultados serão realizados através dos softwares de computador Microsoft® Excel 2000 e EP Evaluator 4.0

5. MÉTODOS

5.1. Espectrometria de massas

5.1.1. Sistema de detecção

Foi utilizado espectrômetro de massas com ionização por electrospray em modo positivo (ES+). O modo operante do espectrômetro de massas foi por SRM - *select reaction monitoring*.

5.1.2. Otimização dos parâmetros de aquisição por espectrometria de massas

Para a otimização das condições de análise por espectrometria de massa com electrospray positivo (ES⁺), foram realizados experimentos de infusão direta das soluções de trabalho (10 µg/ml acetonitrila/água 1:1 com 0,1% de formiato de amônia) de FN, 7-AF e dos demais padrões de benzodiazepínicos, aqui tratados como possíveis interferentes, em separado. Os sinais correspondentes aos íons de interesse foram monitorados, selecionando-se o espectrômetro no modo operante SRM, nos canais de calibração de massa do método (*Tune do MassLynx*), onde os parâmetros foram ajustados de forma a aumentar o sinal dos íons monitorados. Como critério de positividade (aceitabilidade) e seletividade, utilizou-se a monitorização de dois canais de massas para cada analito, onde a razão entre os íons mostrou-se dentro do intervalo de 25%, conforme preconiza o CAP – *College of American Patthologists*.

A seqüência de otimização foi sempre iniciada por uma análise *full scan* no MS1, utilizando valores de *Entrance e Collision* de 25, com energia de colisão ajustada em 0 eV. Os parâmetros *potencial do capilar* e voltagens do *cone*, do

extrator e das *lentes RF* foram ajustadas procurando maximizar a intensidade do íon-pseudomolecular $[M+H]^+$.

Em seqüência, o gás de colisão (argônio) foi ligado, iniciando-se o processo de fragmentação na segunda câmara, MS2, os valores de *Entrance* e *Collision* foram ajustados para -1 e 1, respectivamente. A energia de colisão foi gradativamente aumentada e os fragmentos mais importantes foram analisados

Os demais parâmetros de afinação do equipamento para detecção de FN, de 7-AF e dos demais BDZ, foram determinados por monitorização do sinal em tempo real e buscaram-se valores intermediários de voltagens da fonte (capilar, extrator e RF lens) que permitissem a aquisição conjunta de todos os benzodiazepínicos com boa sensibilidade. Os parâmetros de detecção foram refinados através da aquisição simultânea de canais de transição idênticos, porém ajustados com diferentes valores de voltagem do cone e energia de colisão.

Os resultados advindos desta otimização, configuraram os parâmetros de aquisição do método (critérios de positividade).

5.2. Sistema Cromatográfico

5.2.1. Otimização das condições cromatográficas

No desenvolvimento do método cromatográfico foram testadas várias combinações de colunas e fases móveis que resultassem em uma boa simetria do

pico, fator de separação (α), resolução (R_s), tempo de aquisição reduzidos e compatibilidade com a espectrometria de massas.

As colunas analíticas testadas foram do tipo *narrow-bore*, isto é, com diâmetros de 2 mm, que permitem a utilização de fluxos cromatográficos de 0,1 a 0,5 mL/min.

Como fases móveis, foram testadas várias proporções de água e metanol ou acetonitrila. Como a detecção é feita no modo positivo, analisou-se a adição do tamponante formiato de amônio em diferentes concentrações, como agente de protonação, conforme descrito na tabela 4.

Tabela 4 - Colunas, fases móveis e concentração de formiato de amônio testados na otimização do método cromatográfico

Colunas	Fases móveis	Formiato de amônio
Luna 3 μ C ₁₈ 100x2mm	ACN	
Luna 3 μ C ₁₈ 150x2mm	80, 70, 60, 55, 50 e 40%	5,0 mM
Luna 5 μ C ₁₈ 50x2mm		2,5 mM
Synergi 4 μ C ₁₈ 150x2mm	MeOH	1,0 mM
Phenosphere-NEXT 5 μ C ₁₈ 150x2mm	70 e 60%	0,5 mM

Fator de separação (α)

O fator de separação, obtido através da razão entre os fatores de retenção de dois compostos de eluições adjacentes, conforme a equação:

$$\alpha = \frac{k_2}{k_1}$$

Onde k_1 e k_2 representam o fator de retenção de dois picos avaliados.

Resolução (R_s)

A resolução mede a separação e a largura do pico cromatográfico. O numerador consta da diferença na retenção dos compostos enquanto que o denominador reflete a média da largura dos diferentes picos, conforme a equação:

$$R_s = \frac{2 (dr_2 - dr_1)}{wb_1 + wb_2}$$

Onde dr_1 e dr_2 representam a distância ou tempo de retenção dos dois picos avaliados e wb_1 e wb_2 a largura da base dos picos.

Simetria (s)

A simetria do pico é obtida através da razão das áreas de cada lado do pico, quando se traça uma reta perpendicular à linha de base, no ápice do pico, conforme a equação:

$$s = A / B$$

Onde A representa a área do lado esquerdo e B a área do lado direito do pico avaliado.

5.3. Extração *online*

Para possibilitar a realização da extração *online*, foi realizada uma modificação na válvula *diverter Rheodyne* integrada ao espectrômetro. Aos terminais de acionamento das posições *load* (concentração da amostra) e *inject* (eluição da amostra), foram adaptados dois cabos que foram interfaceados com a controladora das bombas SCL-10A. Isto permitiu o controle da válvula pelo módulo *inlet* do *MassLynx* (software que gerencia o espectrômetro), figura 19.

Figura 19: Válvula seletora eletrônica, *diverter Rheodyne* integrada ao sistema de LC/MS/MS

Como coluna de extração, realizou-se o empacotamento *in house* de uma coluna 50x2 mm com fase reversa polimérica de estireno-divinilbenzeno, strata-X Phenomenex®.

Este procedimento de extração *online* bem como o funcionamento da válvula *diverter Rheodyne* integrada ao espectrômetro está ilustrado na figura 20.

No desenvolvimento das condições de extração, procurou-se encontrar a concentração de acetonitrila que não permitisse a eluição dos analitos de interesse da coluna de extração. Desta forma, várias concentrações de acetonitrila foram testadas, a saber 50, 40, 30, 20, 10 e 5%.

Além da composição da fase de extração, foi testado também o tempo ideal de extração, ou seja, o maior tempo no qual os analitos não são eluídos da coluna de extração.

Os fluxos das colunas de extração e de separação cromatográficas, neste sistema, foram controlados a partir do método *inlet* do *MassLunx*.

SISTEMA ANALÍTICO

1- Injeção e fragmentação da amostra - posição *load*:

Uma válvula elétrica, *diverter Rheodyne*, de seis portas, é usada para fazer a junção da coluna de extração com a coluna analítica em série. A porta de entrada 6 está aberta. A amostra é injetada diretamente na coluna de extração. Somente o extrato e o(s) analito(s) ficam retidos, enquanto todos os outros componentes indesejáveis da matriz são desprezados, através do eluente da bomba 1.

2- Transferência do(s) analito(s) - posição *inject*:

A válvula faz um giro no sentido anti-horário, fecha a porta 6 e abre a porta 3. O eluente da bomba 2 (fase móvel) chega até a coluna de extração com um fluxo na direção inversa (back-flush). Através da força deste contra-fluxo, o eluente da bomba 2 faz com que o(s) analito(s) sejam desorvidos da coluna de extração, sendo transferidos para o início da coluna analítica.

3- Separação analítica - posição *load*:

A válvula volta a posição inicial e se inicia o processo normal de separação dos analitos através da coluna cromatográfica. Enquanto ocorre a separação e a detecção dos analitos no LC/MS/MS, a coluna de extração é estabilizada com o eluente da bomba 1, para estar pronta para o recebimento da nova amostra.

Figura 20: procedimento de extração *online*

5.3.1. Otimização do procedimento de extração – precipitação protéica

Estes estudos foram conduzidos em amostras de soro, referência negativa enriquecidas, em triplicata, com soluções de trabalho de FN e 7-AF de tal forma que a concentração final foi de 50 ng/ml. Em 500 μ L de amostra foram adicionados 500 μ L de sulfato de zinco. O sulfato de zinco foi testado nas concentrações de 0,2 e 0,5M, em solução aquosa e metanólica.

Com a finalidade de melhorar ainda mais a condição de precipitação protéica, foi testado o efeito da temperatura sobre o rendimento da extração, onde as amostras de soro foram aquecidas a 100°C por 30 segundos.

Verificou-se também a quantidade de proteínas totais no sobrenadante dos extratos obtidos após a precipitação das proteínas.

5.3.2. Método proposto para pré-extração de FN e 7-AF em soro.

Foram transferidos 500 μ L de soro enriquecidos com 20 μ l de solução metanólica do padrão interno isotópico flunitrazepam D₇ (concentração final no material biológico igual a 50 ng/ml), para tubos eppendorf, com capacidade para 2 mL. Foram adicionados 500 μ L de solução de sulfato de zinco 0,5M em metanol 80%. Após breve homogeneização em vortex (30 segundos), os tubos foram centrifugados por 6 minutos a 13.000 rpm.

Do sobrenadante obtido neste processo, 300 μ L foram pipetados para os pocinhos da microplaca de polietileno tereftalato, sendo injetados 200 μ L no sistema de extração *online* através do injetor automático Gilson 215, controlado pelo software 735.

O método de injeção inclui etapas de mergulho da agulha em extran, água e DMSO antes do posicionamento na porta de injeção para eliminar o risco de contaminação por arraste entre amostras (*carryover*).

5.4. Validação do método proposto

5.4.1. Especificidade e Seletividade

A especificidade, definida como a capacidade do método analítico em detectar os analitos de interesse presentes numa amostra na presença dos demais componentes inerentes à matriz biológica (CAUSON, 1997; CHASIN et al., 1998) foi realizada para os interferentes endógenos e exógenos.

Interferentes endógenos

A fim de avaliar se tais condições da amostra poderiam interferir nas análises, um *pool* de soros normais, um *pool* de soros lipêmicos e um *pool* de soros hemolisados (todos de referência negativa) foram divididos em duas alíquotas, conforme demonstrado na tabela 5. A uma das alíquotas foi adicionado solução padrão de FN e 7-AF, obtendo concentração final de 15 ng/mL (amostra). Na outra alíquota (controle), foi adicionado apenas o volume de solvente utilizado no preparo

do padrão (metanol). Estas amostras foram submetidas em triplicata aos procedimentos analíticos propostos e adotou-se como critério norteador o tempo de retenção.

Tabela 5 - Preparo das amostras e controles para teste de seletividade e especificidade do método

AMOSTRA (soro referência negativa sem adição de FN e 7-AF)		
	Pool soro	MeOH
Normal	900 µL	100 µL
Lipêmica	900 µL	100 µL
Hemolizada	900 µL	100 µL
AMOSTRA (soro referência negativa com adição de FN e 7-AF)		
	Pool soro	Padrão de FN e 7-AF em MeOH
Normal	900 µL	100 µL
Lipêmica	900 µL	100 µL
Hemolizada	900 µL	100 µL

Interferentes exógenos

Além de possíveis interferentes endógenos, foram avaliados os possíveis interferentes exógenos, relacionados no item 4.5.1, pela análise dos padrões de fragmentação dos demais BDZ, através da monitorização dos canais de massa destes BDZ, como descrito no item 5.1.2 .

5.4.2. Preparação das curvas analíticas - Linearidade

A curva analítica foi feita através da análise de um *pool* de soro (referência negativa), ao qual foram adicionadas diferentes quantidades de solução padrão de FN e 7-AF 1µg/mL, a fim de se obter as seguintes concentrações de calibradores, descritas na tabela 6.

Tabela 6 - Preparo da curva de calibração de FN e 7-AF.

Concentração final ng/mL	Solução padrão FN (µL)	Solução padrão 7-AF (µL)	Soro (µL)
0	-	-	5000
0,5	2,5	2,5	4595
1	5	5	4590
2,5	10	10	4990
5	20	20	4960
10	50	50	4900
25	100	100	3800
50	200	200	3600
100	500	500	4000
200	1000	1000	3000

Os calibradores foram submetidos aos procedimentos analíticos propostos e dosados em triplicata. A quantificação foi realizada de forma totalmente automatizada pelo módulo *QuanLynx* do software *MassLynx*. O método utilizado foi o de padronização interna com diluição isotópica. Os valores obtidos na integração das áreas do pico do FN e do 7-AF, no cromatograma gerado por SRM, através da soma das transições de massa correspondentes aos analitos -314 > 268 e 314>239 para o FN e 284>226 e 284>135 para o 7-AF - foram multiplicados pela razão entre a concentração do padrão interno e a área obtida na integração do pico

que corresponde ao flunitrazepam d_7 , através da soma das transições de massa $321 > 275$ e $321 > 246$.

A curva analítica foi obtida pela projeção das concentrações de cada um dos analitos (FN e 7-AF) no eixo das abscissas e dos fatores de resposta referentes a cada um dos analitos, bem como o padrão interno (FN d_7) no eixo das ordenadas, utilizando-se a regressão linear pelo método dos mínimos quadrados para a obtenção da equação da reta.

A linearidade, definida como a capacidade do método gerar resultados proporcionais da espécie em estudo (CHASIN et al., 1998), foi avaliada através do coeficiente de determinação (r^2) da curva. Como cada ponto da curva foi determinado em triplicata e nesta etapa já foi possível se estabelecer dados de recuperação do método.

5.4.3. Parâmetros de confiança analítica ou figuras analíticas de mérito

Para determinação dos parâmetros de confiança analítica ou figuras analíticas de mérito as amostras de referência negativa de soro foram enriquecidas com soluções de trabalho diferentes daquelas utilizadas para enriquecimento das amostras referencia negativa, utilizadas na preparação das curvas analíticas, constituindo desta forma os “controles”.

Limite de detecção e limite de quantificação

O limite de detecção (LD) é considerado como sendo aquele referente à menor concentração na qual foi possível obter picos integrados pelo

equipamento (CHASIN et al., 1998), gerados através do monitoramento de reações múltiplas das transições de massas correspondentes aos analitos de interesse.

O LD foi determinado a partir de um *pool* soro, referência negativa, enriquecido com 5 ng/mL de FN e 7-AFN, onde foram feitas diluições seriadas de 2, 5 e 10 vezes. As amostras foram então submetidas aos procedimentos analíticos propostos e dosados em triplicata.

A estabilidade dos analitos foi determinada através do enriquecimento de um pool de soro, referência negativa, com

O limite de quantificação (LQ) é determinado como sendo a menor concentração que pôde ser determinada com precisão e exatidão adequada (coeficiente de variação $\leq 20\%$) (CHASIN et al., 1998).

Para determinação do LQ, as mesmas diluições realizadas para determinação do LD, foram determinadas em triplicata, durante 5 dias .

Imprecisão intra-ensaio e interensaio

A precisão de um método bioanalítico é uma medida do erro aleatório e é definida como a concordância de resultados obtidos durante as análises de replicatas de amostras. Este parâmetro avalia a proximidade entre várias medidas efetuadas em uma mesma amostra (CAUSON, 1997; CHASIN et al., 1998).

A precisão intra-ensaio foi determinada utilizando-se dois níveis de concentração para FN e para o 7-AF (baixo e alto). Um *pool* de soro, referência

negativa, foi dividido em duas alíquotas. Uma das alíquotas foi enriquecida com 5ng/mL de FN e 7-AFN (nível baixo) e a outra com 25 ng/mL de FN e 7-AFN (nível alto). As amostras foram submetidas aos procedimentos analíticos propostos e dosadas em 8 replicatas na mesma corrida cromatográfica (mesmo dia).

Para determinação da precisão interensaio também foram utilizados dois níveis de concentração para FN e para o 7-AF (baixo – 5 ng/mL e alto – 25 ng/mL), sendo estas amostras dosadas em 8 replicatas, na mesma corrida cromatográfica, durante cinco dias.

A precisão é expressa pela imprecisão e em ambos os casos a imprecisão foi calculada através do coeficiente de variação (CV) do método, a partir de um desvio padrão de 2,5%.

Exatidão

A exatidão de um método bioanalítico é a medida do erro sistemático do processo analítico. Pode ser definido como a proximidade entre a concentração do analito determinado pela metodologia proposta e a real concentração desta substância na material analisado. (CAUSON, 1997; CHASIN et al., 1998).

O estudo da exatidão foi determinado a partir de um *pool* soro, referência negativa, enriquecido com 1,5; 3; 6; 15; 20; 30 e 60 ng/mL de FN e 6; 15 20, 30 e 60 ng/mL de 7-AF. As amostras foram submetidas aos procedimentos analíticos propostos e dosadas em triplicata na mesma corrida cromatográfica.

As concentrações obtidas, foram comparadas com a concentração real adicionada a cada amostra, obtendo-se a exatidão do método através da equação, dada pela inexatidão:

$$\% \text{ Inexatidão} = \frac{(\text{concentração obtida} - \text{concentração real}) \times 100}{\text{concentração real}}$$

Recuperação

A eficiência dos procedimentos de extração foram verificados através do estudo da recuperação do método proposto. A recuperação dos analitos das amostras de soro foi avaliada por comparação da concentração obtida em relação à concentração real, onde os dados foram tratados no software EP Evaluator 4.0.

O estudo da recuperação foi determinado através da análise de amostras de soro, referência negativa, enriquecidas com concentrações de 0,5; 1,0; 2,5; 5; 10; 25; 50; 100 e 200 ng/mL de FN e 7-AF . As amostras foram submetidas aos procedimentos analíticos propostos e dosadas em triplicata na mesma corrida cromatográfica.

Contaminação por arraste entre amostras - CARRYOVER

Com a finalidade de avaliar possíveis contaminações entre uma amostra e outra, foi realizado um estudo sobre o efeito da contaminação por arraste entre amostras no método proposto – *carryover*.

O estudo sobre o efeito *carryover* foi realizado da seguinte forma:

Um pool de soro de, referência negativa, foi dividido em duas alíquotas. Uma das alíquotas foi enriquecida com 10 ng/mL de FN e 7-AF (*pool* baixo - B) e a outra alíquota enriquecida com 100 ng/mL de FN e 7-AF (*pool* alto - A). Para aquisição dos dados, as amostras foram submetidas aos procedimentos analíticos propostos, onde o *pool* baixo - B, foi dosado em onze replicatas e o *pool* alto - A, foi dosado em dez replicatas, na mesma corrida, na seguinte ordem:

**B1, B2, B3, A1, A2, B4, A3, A4, B5, B6, B7, B8, A5, A6, B9, A7, A8, B10, A9,
A10, B11.**

A partir dos dados obtidos foram determinados: a média e o desvio padrão (DP) das replicatas B2, B3, B6, B7 e B8, denominados média e DP “baixo-baixo”; a média e o DP das replicatas B4, B5, B9, B10 e B11, denominados média e DP “alto-baixo”.

O valor do *carryover* é dado pela diferença entre a média “alto-baixo” e a média “baixo-baixo” .

O erro total do método, para uso em laboratório é definido com um limite de 3 DP, ou seja, o *bias* de uma amostra que foi determinada na corrida cromatográfica após uma amostra de concentração alta deve ser menor que 3 DP. Da mesma forma, não deve haver diferença entre o resultado obtido para uma amostra que durante a rotina do laboratório correu após uma amostra de concentração alta em relação a uma amostra que correu após outra de concentração baixa. Se os valores obtidos forem maiores que 3 DP, deve ser

estabelecido se esta diferença é clinicamente significativa (PETER & WESTGARD, 1986).

5.4.4. Estudo da estabilidade

Estabilidade dos analitos na matriz biológica

A estabilidade dos analitos foi determinada através do enriquecimento de um pool de soro, referência negativa, com FN e 7-AFN, obtendo-se concentração final de 25 ng/mL. As amostras foram submetidas aos procedimentos analíticos propostos, onde estes resultados foram considerados como sendo relativos ao tempo zero do experimento. As amostras foram separadas em alíquotas, para cada nível de concentração e foram realizados os procedimentos descritos a seguir:

(a) Estabilidade após três ciclos de congelamento/ descongelamento

Das amostras, 3 alíquotas de cada nível de concentração foram armazenadas em freezer a -20°C . As alíquotas foram descongeladas e dosadas 24 horas após o tempo zero, sendo estas mesmas alíquotas novamente congeladas a -20°C . 48 horas após o tempo zero, foram novamente descongeladas e dosadas, sendo novamente congeladas. Completando o último ciclo de congelamento/descongelamento, foram novamente descongeladas e dosadas 72 horas após o tempo zero. Os resultados foram então comparados com os obtidos nas análises relativas ao tempo zero.

(b) Estabilidade após armazenamento em freezer a -20°C

Das amostras, 9 alíquotas de cada nível de concentração foram armazenadas em freezer a -20°C , sendo analisadas em triplicata 1, 7 e 14 dias após seu preparo, onde os resultados foram comparados com os obtidos nas análises relativas ao tempo zero.

(c) Estabilidade após armazenamento sob refrigeração

Das amostras, 9 alíquotadas de cada nível de concentração foram armazenadas sob refrigeração, entre 2 e 8°C , sendo analisadas em triplicata 1, 4 e 7 dias após seu preparo, onde os resultados foram comparados com os obtidos nas análises relativas ao tempo zero.

7. DISCUSSÃO

6.1. Espectrometria de massas

6.1.1. Análise dos padrões de fragmentação do FN e do 7-AF

Flunitrazepam

A análise do FN por ES^+ no modo *full scan* (MS1) mostrou a presença de um intenso íon de m/z 314,2 que corresponde ao íon-pseudomolecular, gerado por protonação $[M+H]^+$ (figura 21). Da mesma forma, a figura 22 mostra a presença do íon m/z 321,0 correspondente ao íon-pseudomolecular do padrão isotópico do flunitrazepam d_7 .

Figura 21: Espectro de massa obtido por ES^+ no modo *full scan* de flunitrazepam

Figura 22: Espectro de massa obtido por ES^+ no modo *full scan* de flunitrazepam d_7

Através da análise dos produtos gerados pela fragmentação do íon-pseudomolecular do FN, na segunda câmara MS2, *daughter scan*, por dissociação induzida por colisão (CID), observa-se a presença de um fragmento

m/z 268,1, que aumenta sua intensidade com o aumento da energia de colisão (collision). Aumentando-se um pouco mais a energia de colisão para 40eV, diminui-se a intensidade do canal de massa m/z 268,1 e observa-se o fragmento m/z 239,1, também bastante intenso que será o segundo canal de massa de escolha a ser monitorado (figura 23). Neste caso, a melhor condição para monitorização dos dois íons m/z 268,1 e m/z 239,1, com maior intensidade de sinal, se dá com energia de colisão igual a 30 eV .

Figura 23: Espectros de massa obtido por ES+ no modo *daughter scan* dos fragmentos gerados a partir do flunitrazepam, por CID colisão em diferentes energias de colisão.

A figura 24 demonstra o padrão de fragmentação do padrão interno isotópico, flunitrazepam d_7 , com energia de colisão igual a 35eV onde se pode observar a presença dos fragmentos m/z 275 e m/z 246.

Figura 24: Espectro de massa obtido por ES+ no modo *daughter scan* dos fragmentos gerados a partir do flunitrazepam d₇, com energia de colisão em 35eV.

7-aminoflunitrazepam

O íon-pseudomolecular (m/z 314,2) do 7-AF, gerado por protonação $[M+H]^+$ no modo *full scan* (MS1) por ES⁺ é mostrado na figura 25.

Figura 25: Espectro de massa obtido por ES+ no modo *full scan* de 7-AF.

A seguir, na figura 26, pode-se observar os íons produtos gerados pela fragmentação do íon-pseudomolecular do 7-AF na segunda câmara MS2, *daughter scan*, por dissociação induzida por colisão (CID). Com energia de colisão ajustada em 35eV, obteve-se a maior intensidade de sinal para monitoração dos íons m/z 135 e m/z 226.

Figura 26: Espectros de massa obtido por ES+ no modo *daughter scan* dos fragmentos gerados a partir do 7-AF, por CID com energia de colisão de 35 eV.

A partir das condições determinadas pelos experimentos descritos acima, foram obtidos os parâmetros instrumentais principais para aquisição, na análise do FN , do 7-AF e do padrão interno isotópico FN d₇.

Os parâmetros de monitorização dos canais de massa, utilizando-se SRM - *select reaction monitoring*., a voltagem do cone e a energia de colisão são descritos na tabela 7.

Os demais parâmetros de afinação do equipamento, para detecção dos analitos, foram determinados por monitoramento do sinal em tempo real e buscaram-se valores intermediários que permitissem a aquisição conjunta dos analitos com boa sensibilidade. Os valores encontrados são descritos na tabela 8.

Tabela 7 - Monitorização dos canais de massa (MRM), voltagem do cone, energia de colisão, obtidos para os analitos e seu padrão isotópico.

Analito (eV)	Canais de massa - SRM (padrão de fragmentação)	Cone (V)	Energia de colisão
Flunitrazepam	MRM do 314>268	45	30
	MRM do 314>239		
Flunitrazepam d ₇	MRM do 321>275	45	35
	MRM do 321>246		
7-Aminoflunitrazepam	MRM do 284>135	45	35
	MRM do 284>226		

Tabela 8 - Parâmetros de afinação do equipamento obtidos para os analitos e seu padrão isotópico.

Analito	Capilar (kV)	Extrator (V)	RF Lens (V)	Íon Energy 1	Entran.	Exit	Ion Energy 2
Flunitrazepam	3,5	2	0	0	-1	1	1
Flunitrazepam d ₇	3,5	2	0	0	1	1	1
7-Aminoflunitrazepam	4,0	4	1	0,5	1	1	1

6.2. Método Cromatográfico

6.2.1. Otimização das condições cromatográficas

A melhor condição de análise foi obtida utilizando-se a coluna Luna 5 μ C₁₈ 50x2mm, eluída em modo isocrático com a fase móvel composta de 55% acetonitrila e 45% formiato de amônio 5mM em pH3. Os parâmetros cromatográficos encontram-se expressos na tabela 9.

Tabela 9 - Tempo de retenção, e simetria dos picos cromatográficos.

Analito	Tempo de retenção (min)	Simetria
Flunitrazepam	3,96	1,3
7-Aminoflunitrazepam	3,44	1,3

A seletividade do FN em relação ao 7-AF foi de 1,15 e a resolução foi de 0,65.

A figura 27 mostra cromatograma de amostra de soro referência negativa, submetida ao procedimento de extração proposto, enriquecida com FN e 7-AF na concentração de 25 ng/ml e o padrão interno isotópico FN d₇ na concentração de 50 ng/ml.

Figura 27: cromatograma de amostra de soro referência negativa, enriquecida com FN, padrão isotópico FNd₇ e 7-AF.

A seguir, a figura 28 mostra os cromatogramas de amostra de soro referência negativa, submetida ao procedimento de extração proposto, enriquecida com FN e 7-AF na concentração de 25 ng/ml e o padrão interno isotópico FN d₇ na concentração de 50 ng/ml, com suas respectivas transições de massa.

Figura 28: cromatogramas de amostra de soro referência negativa, enriquecida com FN, padrão isotópico FNd₇, 7-AF com suas respectivas transições de massa.

Formiato de amônio

Ao se testar as diferentes concentrações do agente de protonação, tampão formiato de amônio em pH 3, foi observado que a intensidade do sinal dos analitos (dado em relação às áreas dos picos) apresenta um leve aumento com o aumento da concentração do formiato para a maioria dos analitos, como mostra a figura 29.

Figura 29: Efeito da concentração do formiato de amônio em relação à intensidade do sinal dos analitos (área do pico), em solução aquosa de 50 ng/mL.

6.3. Extração *online*

Para se estabelecer a concentração de acetonitrila que mantinha os analitos retidos na coluna de extração, fazendo com que fossem eluídos o maior número possível de interferentes, soluções aquosas de FN e 7-AF, na concentração de 50 ng/mL, foram injetadas através do sistema Gilson de injeção automática, passando pela coluna de extração através do fluxo de solvente de extração (acetonitrila) da bomba 1. A amostra eluída foi desviada do sistema cromatográfico (não passou pela coluna cromatográfica) sendo injetada diretamente no espectrômetro.

A composição ideal da fase de extração foi de acetonitrila 5%, onde a partir desta concentração o espectrômetro não detectou sinal dos analitos, ou seja, estes ficaram retidos na coluna de extração, como mostra a figura 30.

Figura 30. Concentração de acetonitrila (ACN) em relação à retenção dos analitos de interesse na coluna de extração .

Após estabelecer-se a composição da fase de extração, foi testado o tempo ideal de extração, ou seja, os tempos da válvula na posição *load*, posição onde ocorre a concentração dos analitos e remoção dos interferentes e, na posição *injet*, onde os analitos são desorvidos da coluna de extração, sendo transferidos para o início da coluna cromatográfica. Estes dados são demonstrados na tabela 10.

Tabela 10 – Tempo da válvula *diverter Rheodyne* na posição *load* e na posição *inject*, para otimização da condição de extração.

Tempo (min.)	Evento	Ação da válvula
2	Lavagem dos interferentes	LOAD
2	Eluição dos analitos	INJECT
2	Equilíbrio do sistema	LOAD
6	Tempo total de corrida de cada amostra	

6.3.1. Otimização do procedimento de extração – precipitação protéica

No processo de otimização da extração em soro, através da precipitação protéica, pode-se observar que o efeito da concentração do ZnSO_4 , não apresentou alterações importantes na intensidade do sinal do FN e do 7-AF (verificado em relação à área absoluta do pico). Ao passo que a adição de metanol e metanol seguido de aquecimento, mostrou um aumento na intensidade do sinal, como pode ser observado na figura 31.

Na figura 32 é nítido o descaimento de proteínas totais, determinada no sobrenadante dos extratos, quando o ZnSO_4 está mais concentrado, assim como quando foi adicionado metanol, diminuindo ainda mais quando a adição metanol é seguida de aquecimento.

Figura 31. Efeito da adição de sulfato de zinco (ZnSO_4) e as variáveis temperatura e adição de metanol, sobre o processo de precipitação protéica na extração de flunitrazepam em soro.

Figura 32. Proteínas totais, medidas no extrato obtido após diferentes condições de precipitação protéica na extração de flunitrazepam em soro.

6.4. Validação do método proposto

6.4.1. Especificidade e Seletividade

Interferentes endógenos

A figura 33 ilustra o resultado obtido no estudo dos possíveis interferentes endógenos dos analitos em amostras de soros lipêmicos e hemolizados, quando comparados a uma amostra de soro normal.

Figura 33: Representação gráfica dos resultados obtidos nos estudos dos interferentes endógenos, comparando-se amostras de soro normais, lipêmicas e hemolisadas.

Não houve variação superior a 20 % (coeficiente de variação) entre as áreas dos picos dos analitos obtidas nas amostras de soro lipêmico e soro hemolisado, quando comparados a uma amostra de soro normal.

Interferentes exógenos

Análise dos padrões de fragmentação dos demais BDZ, tratados com possíveis interferentes

As figuras 34 a 43 representam os espectros de massa obtidos por ES⁺ no modo *full scan* dos BDZ, mostrando a presença dos correspondes íons-pseudomoleculares, gerados por protonação [M+H]⁺.

Figura 34: Espectro de massa obtido por ES⁺ no modo *full scan* de **alprazolam** e a presença do íon-pseudomolecular m/z 309,3.

Figura 35: Espectro de massa obtido por ES⁺ no modo *full scan* do padrão interno isotópico de **alprazolam d₅** e a presença do íon-pseudomolecular m/z 314,2.

Figura 36: Espectro de massa obtido por ES+ no modo *full scan* de bromazepam e a presença do íon-pseudomolecular m/z 316,1.

Figura 37: Espectro de massa obtido por ES+ no modo *full scan* de clobazam e a presença do íon-pseudomolecular m/z 301,0.

Figura 38: Espectros de massa obtidos por ES+ no modo *full scan* de clonazepam, variando a voltagem no cone e a presença do íon-pseudomolecular m/z 315,9.

Figura 39: Espectro de massa obtido por ES+ no modo *full scan* do padrão isotópico de **clonazepam d₄** e a presença do íon-pseudomolecular m/z 320,1.

Figura 40: Espectro de massa obtido por ES+ no modo *full scan* de **cloxazolam** e a presença do íon-pseudomolecular m/z 349,1.

Figura 41: Espectro de massa obtido por ES+ no modo *full scan* de **diazepam** e a presença do íon-pseudomolecular m/z 285,0.

Figura 42: Espectro de massa obtido por ES+ no modo *full scan* do padrão isotópico de **diazepam d₅** e a presença do íon-pseudomolecular m/z 290,2.

Figura 43: Espectro de massa obtido por ES+ no modo *full scan* de midazolam e a presença do íon-pseudomolecular m/z 326,0.

As figuras 44 a 52 representam os íons produtos gerados pela fragmentação dos íons-pseudomoleculares dos BDZ na segunda câmera (MS2) no modo *daughter scan*, variando-se a energia de colisão.

Figura 44: Espectros de massa obtidos por ES+ no modo *daughter scan* dos fragmentos gerados a partir do **alprazolam**, por CID em diferentes energias de colisão.

Figura 45: Espectros de massa obtidos por ES+, no modo *daughter scan*, dos fragmentos gerados a partir do padrão isotópico de **alprazolam d₅**, com o aumento da energia de colisão.

Figura 46: Espectros de massa obtidos por ES+ no modo *daughter scan* dos fragmentos gerados a partir do **bromazepam**, por CID em diferentes energias de colisão.

Figura 47: Espectros de massa obtidos por ES+ no modo *daughter scan* dos fragmentos gerados a partir do **clobazam**, por CID em diferentes energias de colisão.

Figura 48: Espectros de massa obtidos por ES+ no modo *daughter scan* dos fragmentos gerados a partir do **clonazepam**, por CID em diferentes energias de colisão.

Figura 49: Espectro de massa obtido por ES+ no modo *daughter scan* dos fragmentos gerados a partir do padrão isotópico de clonazepam d_4 .

Figura 50: Espectros de massa obtidos por ES+ no modo *daughter scan* dos fragmentos gerados a partir do cloxazolam, por CID em diferentes energias de colisão.

Figura 51: Espectros de massa obtidos por ES+ no modo *daughter scan* dos fragmentos gerados a partir do **diazepam**, por CID em diferentes energias de colisão.

Figura 52: Espectros de massa obtido por ES+, no modo *daughter scan*, dos fragmentos gerados a partir do **midazolam**, por CID colisão em diferentes energias de colisão.

A partir das condições determinadas pelos experimentos descritos acima, foram obtidos os parâmetros instrumentais principais para identificação dos demais BDZ.

Os parâmetros de monitorização dos canais de massa, utilizando-se SRM, a voltagem do cone, a energia de colisão , assim como os demais parâmetros de afinação do equipamento, para detecção dos analitos, foram determinados por monitorização do sinal em tempo real e buscaram-se valores intermediários que permitissem a aquisição conjunta dos analitos com boa sensibilidade. Tais valores encontram-se descritos na tabela 11.

Tabela 11 - Monitorização dos canais de massa (SRM), voltagem do cone, energia de colisão e demais parâmetros de afinação do equipamento, obtidos para os analitos e seus padrões isotópicos.

Analitos	Canais de Massa - SRM (padrão de fragmentação)	Cone (V)	Energia de colisão (eV)	Capilar	Extractor	RF Lens	Íon Energy 1	Entran.	Exit	Íon Energy 2
Alprazolam	SRM do 309>205	38	35	4,5	2	0,8	0,1	1	5	1,2
Alprazolam d ₅	SRM do 314>210	40	40	4,0	4	1,0	1	-1	1	1,2
Bromazepam	SRM do 316>182	34	30	4,6	1	1,2	0,1	-1	1	2
Clobazam	SRM do 301>259	48	10	3	1	0	0,5	0	1	0,5
Clonazepam	SRM do 316>214	45	30	3,8	2	0,6	1,6	2	3	2
Clonazepam d ₄	SRM do 320>218	40	25	4,8	1	0,6	1,5	2	1	2
Cloxacolam	SRM do 349>305	45	30	3,5	2	0	0,5	-1	1	1
Diazepam	SRM do 285>193	48	30	2,5	2	0,2	0	0	1	2
Diazepam d ₅	SRM do 290>154	48	30	2,5	2	0,2	0	0	1	2
Midazolam	SRM do 326>291	45	30	4,5	2	0	1,2	-1	1	1
Valores Médios	-	-	-	4,0	2	0,5	1	-1	1	1

6.4.2. Linearidade

As curvas analíticas (figuras 53 e 54) foram obtidas através dos dados apresentados na tabela 12. A equação de regressão linear foi estabelecida pelo método dos mínimos quadrados e será utilizada na quantificação do FN e do 7- em amostras de soro.

Tabela 12 – Fatores de resposta obtidos para a elaboração das curvas analíticas dos analitos em soro e respectivos coeficientes de variação (CV%).

Concentração (ng/mL)	Fatores de resposta			
	FN	CV(%)	7-AF	CV(%)
0,5	0,491	10,74	0,193	5,13
1,0	1,172	5,96	0,295	2,77
2,5	2,736	0,88	0,872	9,81
5,0	5,157	3,31	1,682	5,53
10,0	11,227	3,26	4,086	9,58
25,0	27,264	3,42	9,340	5,64
50,0	56,337	3,35	20,265	2,45
100,0	117,339	5,09	40,364	8,18
200,0	222,712	6,58	71,781	5,25

Figura 53. Representação da curva analítica para a determinação de FN em soro nas concentrações de 0,5 a 200 ng/ml.

Figura 54. Representação da curva analítica para a determinação de 7-AF em oro nas concentrações de 0,5 a 200 ng/ml.

6.4.3. Parâmetros de confiança analítica ou figuras analíticas d mérito

Limite de detecção e limite de quantificação

O limite de detecção da técnica de extração proposta neste estudo, para as análises de FN e 7-AF em soro foi de respectivamente 0,5 ng/mL e 1,0 ng/mL.

O limite de quantificação da técnica proposta para as análises de FN e 7-AF em soro foi de 1,0 e 2,5 ng/mL, respectivamente.

Imprecisão intra-ensaio e interensaio

Os coeficientes de variação obtidos nas análises das amostras de soro enriquecidas com FN e 7-AF são apresentados na tabela 13. As figuras 55 a 58 ilustram a dispersão dos dados, obtidos nos estudos de precisão interensaio, durante os cinco dias, com desvio padrão de 2,5.

Tabela 13 - Coeficientes de variação das concentrações em soro de FN e 7-AF obtidos nos ensaios de precisão intra e interensaio.

	Concentrações no soro	
	5 g/mL	25 ng/mL
<i>Imprecisão intra-ensaio CV (%)</i>		
Flunitrazepam	7,5	4,6
7-aminoflunitrazepam	14,7	9,5
<i>Imprecisão interensaio CV (%)</i>		
Flunitrazepam	5,4	6,5
7-aminoflunitrazepam	7,7	7,3

Figura 55: Dispersão dos pontos no estudo da precisão inter-ensaio para o FN com concentração de 5 ng/mL.

Figura 56: Dispersão dos pontos no estudo da precisão inter-ensaio para o FN com concentração de 25 ng/mL.

Figura 57: Dispersão dos pontos no estudo da precisão inter-ensaio para o 7-AF com concentração de 5 ng/mL.

Figura 58: Dispersão dos pontos no estudo da precisão inter-ensaio para o 7-AF com concentração de 25 ng/mL.

Exatidão

A exatidão obtida através da inexatidão em diferentes concentrações sanguíneas e urinárias estão expressos na tabela 14.

Recuperação

A recuperação dos analitos obtidos em diferentes concentrações sanguíneas e urinárias estão expressos na tabela 14.

Tabela 14 – Exatidão e recuperação dos métodos propostos para análise de FN e 7-AF em amostras de soro, avaliados em diferentes concentrações.

	Concentrações no soro (ng/mL)									
	1,5	3	6	15	20	30	60			
Inexatidão (%)										
Flunitrazepam	-13,3	0	-4,4	-1,8	0,7	7,8	1,3			
7-aminoflunitrazepam	-	-	-11,7	-14,3	-4,8	-5,2	7,7			
Recuperação (%)										
Flunitrazepam	140	126,7	108,0	97,3	102,3	98,1	100,7	104,7	99,2	
7-aminoflunitrazepam	-	120	106,7	93,9	106,3	94,9	101,9	101,0	89,6	

As figuras 59 e 60 ilustram os percentuais de recuperação obtidos nas amostras de soro enriquecidas com FN e 7-AF avaliadas em diferentes concentrações.

Figura 59: Percentuais de recuperação obtidos nas amostras de soro enriquecidas com FN em diferentes concentrações

Figura 60: Percentuais de recuperação obtidos nas amostras de soro enriquecidas com 7-AF em diferentes concentrações.

Contaminação por arraste entre amostras - CARRYOVER

A partir dos resultados obtidos na avaliação da contaminação por arraste entre amostras e segundo PETER & WESTGARD, 1986, o método não apresentou *carryover*. Onde o erro total limite foi de 2,25 e 4,26 ng/mL para o FN e 7-AF, respectivamente.

6.4.4. Estudo da estabilidade

Estabilidade dos analitos na matriz biológica

As Figuras 61, 62 e 63 ilustram os resultados obtidos durante o estudo de estabilidade dos analitos em amostras de soro enriquecidas, sob diferentes condições de armazenamento.

Figura 61: Estabilidade após três ciclos de congelamento/ descongelamento.

Contaminação por arraste entre amostras - CARRYOVER

A partir dos resultados obtidos na avaliação da contaminação por arraste entre amostras e segundo PETER & WESTGARD, 1986, o método não apresentou *carryover*. Onde o erro total limite foi de 2,25 e 4,26 ng/mL para o FN e 7-AF, respectivamente.

6.4.4. Estudo da estabilidade

Estabilidade dos analitos na matriz biológica

As Figuras 54, 55 e 56 ilustram os resultados obtidos durante o estudo de estabilidade dos analitos em amostras de soro enriquecidas, sob diferentes condições de armazenamento.

Figura 54: Estabilidade após três ciclos de congelamento/ descongelamento.

Figura 62: Estabilidade após armazenamento em freezer a -20°C .

Figura 63: Estabilidade após armazenamento sob refrigeração.

7. DISCUSSÃO

Como já foi descrito anteriormente este trabalho teve por objetivo o desenvolvimento de metodologia analítica adequada para determinação de flunitrazepam e seu principal metabólito o 7-aminoflunitrazepam em soro, procurando-se reduzir ao máximo as etapas de trabalho manual, visando a completa automação do processo, possibilitando desta forma a inferência sobre a realidade dos casos onde não se utiliza estes fármacos com fins terapêuticos.

O flunitrazepam é um dos mais potentes BDZ hipnóticos e devido às pequenas doses administradas e a extensiva metabolização através de diversos caminhos, a identificação do flunitrazepam e seus metabólitos é dificultada em relação a outros BDZ.

Dado o alto potencial de sedação, a concentração de efeito no soro é um tanto baixa (1 – 15 ng/ml) o que constitui um complicador analítico (HACKEETT & MARRAFFA, 2004), onde a metodologia para caracterização do uso deste fármaco deve ser tal que concentrações sub-terapêuticas possam ser detectadas através de um método de elevada sensibilidade para se evitar resultados ambíguos na identificação e quantificação do flunitrazepam (DARIUS & BANDITT, 2000).

No desenvolvimento da metodologia, vários pontos foram observados e serão a seguir discutidos:

Espectrometria de massas

No método de LC_MS/MS, primeiramente realiza-se o *Tune* do equipamento, ou seja, o ajuste dos canais de calibração de massa do método referentes a cada analito. Desta forma, é comum utilizar-se o termo “afinação” do equipamento, pois para cada analito o equipamento irá operar de determinada forma, que deve ser otimizada. Uma vez estabelecida esta calibração, ou seja, os parâmetros de afinação, o método ganha em seletividade, pois o padrão de fragmentação de determinado analito irá responder apenas dentro de tais condições, o que pode ser observado nas tabelas 07, 08 e 11 para cada analito.

Um uma vez identificado o íon-pseudomolecular, para que ocorra a fragmentação, na segunda câmara MS2, por dissociação induzida por colisão (CID) os valores de *Entrance* e *Collision* foram ajustados para -1 e 1, respectivamente. A energia de colisão é gradativamente aumentada e os fragmentos mais importantes são analisados.

O termo intensidade do sinal, foi usado como parâmetro de quantificação de espectro, segundo literatura (SPARKMAN, 2000)

Aumentando-se um pouco mais a energia de colisão para 40eV, diminui-se a intensidade do canal de massa m/z 268,1 e observa-se o fragmento m/z 239,1, também bastante intenso que é o segundo canal de massa de escolha a ser monitorado.

Íon pseudomolecular do flunitrazepam m/z 314,2 é o mesmo íon pseudomolecular do alprazolam d_5 , mas os íons produtos monitorados são diferentes. Para m/z 268 e m/z 239 para alprazolam d_5 é o íon produto m/z 210.

Método Cromatográfico

No desenvolvimento do método cromatográfico foram testadas várias colunas cromatográficas onde optou-se pela escolha da coluna Luna 5μ C₁₈ 50x2 mm, Phenomenex®, a qual apresentou bons resultados de simetria do pico, fator de separação, resolução, reduzido tempo aquisição uma vez que trata-se de uma coluna curta (50mm) e compatibilidade com a espectrometria de massas, além de apresentar baixo custo quando comparada a outras colunas cromatográficas.

Analizou-se a adição do tamponante formiato de amônio em diferentes concentrações, como agente de protonação a fim de melhorarmos a sensibilidade do método. Não foi possível observar diferenças significativas, mas houve um leve ganho na intensidade do sinal quando trabalhamos com formiato na concentração de 5mM.

Extração *online*

Inicialmente, estávamos utilizando como coluna extratora no sistema *online* a coluna ADS - alquil-diol-sílica - Lichrospher® para validação do método proposto, com bons resultados, porém tínhamos a questão do custo. A possibilidade de confeccionar a coluna de extração através do empacotamento de uma coluna cromatográfica de aço inox com dimensões de 50x2 mm, empacotada *in house*,

com fase reversa polimérica de estireno-divinilbenzeno, strata-X Phenomenex®, mostrou-se excelente artifício analítico uma vez que constitui processo significativamente econômico quando comparada à aquisição de colunas extratoras disponíveis no mercado, como a coluna ADS que vinha sendo utilizada. O procedimento de confecção é bastante simples e pode ser efetuado em qualquer laboratório de porte médio como é o caso de Laboratórios forenses.

No desenvolvimento das condições de extração, procurou-se encontrar a concentração de acetonitrila que não permitisse a eluição dos analitos de interesse na pré-coluna de extração. Desta forma, o maior número possível de interferentes seria removido da coluna pela fase eluente. Esta etapa caracteriza a concentração da amostra na coluna de extração.

Além da composição da fase de extração, foi testado também o tempo ideal de extração, ou seja, após a otimização da fase de extração (concentração de acetonitrila), procurou-se estabelecer o maior tempo no qual os analitos não eram eluídos da pré-coluna. Com estas informações, foi possível estabelecer os tempos na válvula na posição *load*, posição onde ocorre a etapa de concentração dos analitos e remoção dos interferentes e, na posição *injet*, onde através da força do contra fluxo da fase móvel (bomba 2), faz com que os analitos sejam desorvidos da pré-coluna, sendo transferidos para o início da coluna cromatográfica.

Otimização do procedimento de extração – precipitação protéica

Graças à extração *online*, não seria necessário nenhum tratamento prévio da amostra. Porém, em se tratando de amostras de soro, o elevado conteúdo protéico das amostras pode comprometer a vida útil da coluna de extração, assim como da coluna cromatográfica. Desta forma, avaliou-se o efeito da precipitação protéica das amostras para estabelecer-se a melhor condição de extração utilizando-se ZnSO_4 em metanol.

Conforme é ilustrado na figura 31, a melhor condição seria aquela onde foi utilizado ZnSO_4 , em adição de metanol e aquecimento. A concentração do sulfato não apresentou diferença importante. O mesmo podendo ser observado na figura 32, ou seja não há grande diferença de precipitação protéica com relação a concentração do sulfato de zinco

Verificou-se também a quantidade de proteínas totais no sobrenadante dos extratos obtidos após a precipitação das proteínas.

Para determinar o LD optou-se por metodologia baseada na positividade da amostra e esta determinação foi feita de forma empírica onde os critérios de positividade foram estabelecidos a priori e, desta forma, o encontro do analito foi efetuado por algoritmo do equipamento. Nestas concentrações (0,5 ng/ml de FN e 1 ng/ml para o 7-AF) as imprecisões associadas às medidas estão acima de 20%. O LQ, por sua vez, respectivamente de 1,0 e 2,5 ng/ml, para o FN e 7-AF representam as concentrações onde a imprecisão associada à medida está abaixo de 20%.

A dispersão aceita ao redor da média foi estabelecida como sendo de 2,5 DP, valor este que configurou critério de rejeição para as variações acima deste limite de intervalo ($\alpha = 0,05$)

Com base no exposto, fica claro que o tipo de amostra (urina, sangue, plasma, cabelo, saliva) e o tempo (após a ingestão, após a coleta) são de fundamental importância para a interpretação de qualquer resultado. O comportamento dos analitos é extremamente diferente em cada um destes materiais com o decorrer do tempo.

Com relação às metodologias e técnicas disponíveis, é claro que o ideal é se disporem das técnicas mais sensíveis e seletivas, mas isto envolve custo, tempo e pessoal técnico especializado. Desta forma, a melhor técnica é aquela que se dispõe no laboratório, quando validada e, o conhecimento técnico e científico do analista, que irá realizar tais procedimentos, é que realmente farão diferença nas inferências e interpretação dos resultados.

8. CONCLUSÕES

A metodologia proposta para análise de FN e 7-AF em soro:

1. Apresenta excelente especificidade e sensibilidade, boa linearidade, precisão, exatidão, rendimento e capacidade de detectar os analitos mesmo em baixas concentrações, permitindo desta forma a inferência sobre a realidade dos casos onde se utiliza este fármaco sem fins terapêuticos.
2. Se presta a constituir metodologia inequívoca e que, portanto, pode constituir método confirmatório e integrar Laudo Toxicológico.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BAEYENS, W.R.; WEKEN, V.G.; HAUSTRAETE, J.; SMET, E. Application of the ADS precolumn-switching technique to the separation of some drugs from plasma. **Biomedical Chromatography**. 2000 feb;14(1):61-63.

BLACK, D.A.; CLARK, G.D.; HAVER, V.M.; GARBIN, J.A.; SAXON, A.J.; Analysis of Urinary Benzodiazepines Using Solid-Phase Extraction and Gas Chromatography-Mass Spectrometry. **Journal Analytical Toxicology**. 1994 jul/aug;18:185-188.

BOECK, G.; SAMYN, N.; MORRIS, M.; WOOD, M. Development of a Rapid and Sensitive Method for the Quantification of Benzodiazepines in Human Plasma by LC-MS/MS. **Micromass uk Limited**. 2002 may.

BOECK, G.; SAMYN, N.; PIEN, K.; GROOTAERT, P.; WOOD, M. Development of a Rapid and Sensitive Method for the Quantification of Benzodiazepines in Plasma and Larvae by LC-MS/MS. **Micromass uk Limited**. 2002 nov.

BORREY D.; MEYER, E.; LAMBERT, W.; PETEGHEM, C.V.; LEENHEER, A.P. Simultaneous determination of fifteen low-dosed benzodiazepines in human urine by solid-phase extration and gas chromatography-mass spectrometry. **Journal of Chromatography B**. 2001;765:187-197.

BRUNETTO, r.; GUTIERREZ, L.; DELGADO, Y.; GALLIGNANI, M.; BURGUERA, J.L. High-performance liquid chromatographic determination of cocaine and benzoylecgonine by direct injection of human blood plasma sample into an alkyl-diol-silica (ADS) precolumn. **Analical and Bioanalytical Chemistry**. 2003 jan;375(4):534-538.

CAUSON, R. Validation of chromatographic methods in biomedical analysis. Viewpoint and discussion. **J. Chromatogr. B: Biomed. Sci. Appl.**, Amsterdam, v.689, n.1, Feb 7, p.175-80, 1997.

CHASIN, A. A. M. **Diagnóstico laboratorial da intoxicação aguda por cocaína: aspecto forense**. São Paulo, 1990. 109 p. Dissertação de Mestrado - Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Universidade de São Paulo.

CHASIN, A. A. M., NASCIMENTO, E. S., RIBEIRO-NETO, L. M., SIQUEIRA, M. E. P. B., ANDRAUS, M. H., C., S. M., FERNÍCOLA, N. A. G., GORDI, R., SALCEDO, S. Validação de métodos em análises toxicológicas: uma abordagem geral. **Rev. Bras. Toxicol.**, São Paulo, v.11, n.1, p.1-6, 1998.

CLINICAL & FORENSIC. GHB and Precursors (Part I): Use, Effects, Pharmacology. **Toxicology News** an AACC/CAP Educational Newsletter for Toxicology. 2001 mar.

CLINICAL & FORENSIC. "Club or "Rave" Drugs Offer Challenges to Laboratories. **Toxicology News** an AACC/CAP Educational Newsletter for Toxicology. 2001set.

DARIUS, J & BANDITT, P. Validated method for the therapeutic drug monitoring of flunitrazepam in human serum using liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization tandem mass spectrometry with ion trap detector. **Journal of Chromatography B**. 2000;738:437-441.

ELLENHORN, Matthew J. & BARCELOUX, Donald G. **Medical Toxicology diagnosis and treatment of human poisoning**. 1988. 2 v.Elsevier. New York.

ELLENHORN, M. J.; SCHONWALD, S.; ORDOG, G.; WASSERBERGER, J. **Ellenhorn's Medical Toxicology: Diagnosis and Treatment of Human Poisoning**, 2. ed. 1997. Williams & Wilkins. Baltimore.

ELSOHLY, M. A.; SALAMONE, S.J.; BRENNEISEN, R. GC-MS Determination of Flunitrazepam and its Major Metabolite in Blood and Plasma. **Journal of Analytical Toxicology**. 1999 oct; 23: 486-489.

FRELON, S.; DOUKI, T.; RAVANAT, J. L.; POUGET, J. P.; TORNABENE, C.; CADET, J. High-Performance Liquid Chromatography -Tandem Mass Spectrometry Measurement of Radiation-Induced Base Damage to Isolated and Cellular DNA. **Chemical Research in Toxicology**. 2000. 13: 1002-1010.

GASKELL, S. J. Electrospray: Principles and Practice. **Journal of Mass Spectrometry**. 1997; 32: 677-688.

GOODMAN & GILMAN. **As bases farmacológicas da terapêutica**. 9 ed. Rio de Janeiro: Mc Graw – Hill, 1996. pág. 429.

HACKEETT, J. & MARRAFFA , J. M. The Extraction and analysis of Flunitrazepam from whole blood/urine using a novel solid phase extraction procedure and high performance liquid chromatography-photodiode array detection. **Proceedings of FBI Laboratory Symposium on Forensic Toxicology and Joint Meeting of the Society of Forensic Toxicologists (SOFT) &The International Association of Forensic Toxicologists (TIAFT)**. 28 de Agosto a 3 de setembro de 2004, em Washington DC, EU, p.137.

HUF, G.; LOPES, C. S.; ROZENFELD, S. O uso prolongado de benzodiazepínicos em ulheres de um centro de convivência para idosos. **Caderno de Saúde Pública**. 2000 abr/jun; 16(2):351-362.

JOURDIL, N.; BESSARD J.; VICENTE, F.; EYSSERIC, H.; BESSARD, G. Automated solid-phase extration and liquid chromatography-electrospray ionization-mass spectrometry for the determination of flunitrazepam and its metabolites in human urine and plasma. **Journal of Chromatography B**. 2003;788:207-219.

JOURDIL, N.; BESSARD, J.; VINCENT, F.; EYSSERIC, H.; BESSARD, G. Automated solid-phase extration and liquid chromatography-electrospray ionization-mass spectrometry for the determination of flunitrazepam and its metabolites in

human urine and plasma samples. **Journal of Chromatography B**. 2003;788:207-219.

KEBARLE, P. & TANG, L. From Ions in Solution to Ions in the Gas-Phase - The Mechanism of Electrospray Mass-Spectrometry. **Analytical Chemistry**. 1993. 65:

KLEINSCHNITZ, M.; HERDERICH, M.; SCHREIER. Determination of 1,4-benzodiazepines by high-performance liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography B**. 1996;676:61-67.

KOLLROSER, M. & SCHOBER, C. Simultaneous analysis of flunitrazepam and major metabolites in human plasma by high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry. **Journal Pharmaceutical and Biomedical Analysis**. 2002;28:1173-1182.

LESLIE E.E. & POLKLIS A. Detection of Benzodiazepines and Triabenzazolams by TRIAGE^{TM}: Confirmation by Solis-Phase Extration Utilizing SPEC®.3MI.mp3 Microcolumns and GC-MS. **Journal Analytical Toxicology**. 1994 oct;18:312-316.

LIMA, I.V. **Determinação dos níveis sanguíneos de diazepam e N-desmetildiazepam por cromatografia em fase gasosa para fins forenses**. São Paulo, 1984. 73 p. Dissertação de Mestrado - Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Universidade de São Paulo.

MACDOWALL, R.D. Sample preparation for biomedical analysis. **Journal of Chromatography B**. 1989; 492:3-58.

MAHJOUB, A.; STAUB C. Stability of benzodiazepines in whole blood samples stored at varying temperatures. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**. 2000;23: 1057- 1063.

MAHJOUR, A. & STAUB C. High-performance liquid chromatographic determination of flunitrazepam and its metabolites in plasma by use of column-switching technique: comparison of two extraction columns. **Journal of Chromatography B**. 2001;754:271-283.

MARQUET, P. Progress of Liquid Chromatography-Mass Spectrometry in Clinical and Forensic Toxicology. **Therapeutic Drug Monitoring**. 2002;24:255-276.

MARTINDALE: **The Extra Pharmacopoeia** - 31^a ed. London: Royal Pharmaceutical Society, 1996. 2739 p.

MEATHERALL R. GC/MS Confirmation of Urinary Benzodiazepine Metabolites. **Journal Analytical Toxicology** . 1994 nov/dec;18:312-316.

MERCK. LC-Integrated Sample Preparation with LiChrospher® RP-ADSD. Disponível em: <http://www.chromatography.co.uk/products/hplc/consbles/ADS.htm>. Acesso em: 25 set. 2003.

NEGRUZ, A.; MOORE, C.M.; HINKEL, K.B.; STOCKMAN, T.L.; VRMA, M.; STRONG, M.J.; JANICAK, P.G. Deposition of 7-Aminoflunitrazepam and Flunitrazepam in Hair After a Single Dose of Rohypnol®. **Journal of Forensic Sciences**. 2001;45(5):1143-1151.

PETER, T, Jr . & WESTGARD, J.A. **Evaluation of Methods in Textbook of Clinical Chemistry**. Teitz NW (ed), WB Saunders Co., Philadelphia, 1986, 421 p.

OERTEL, R.; RICHTER, K.; GRAMATTÉ, T.; KIRCH, W. Determination of drugs in biological fluids by high-performance liquid chromatography with on-line sample processing. **Journal of Chromatography B**. 1998;797:203-209.

OGA, S. Barbitúricos e benzodiazepínicos. In: Seizi Oga. **Fundamentos de Toxicologia**, 2. ed. 2003. Atheneu Editora, São Paulo.

OLSON, Kent. (Ed.) **Poisoning & Drug Overdose**, 3. ed. 1999. Appleton e Lange, Stamford, Connecticut.

RITTNER, M.; PRAGST, F.; BORK, W.; NEUMANN, J. Screening Method for Seventy Psychoactive Drugs or Drug Metabolites in Serum Based on High-Performance Liquid Chromatography-Electrospray Ionization Mass Spectrometry. **Journal Analytical Toxicology**. 2001 mar;25:115-124.

ROBERTSON, M.D. & DRUMMER, O.H. High-performance liquid chromatographic procedure for the measurement of nitrobenzodiazepines and their 7-amino metabolites in blood. **Journal of Chromatography B**. 1995;667:179-184.

SAMYN, N.; BOECK, G.; CIRIMELE, V.; VERSTRAETE, A.; KINTZ, P. Detection of flunitrazepam and 7-amino-flunitrazepam in oral fluid after controlled administration of Roypnol. **Journal Analytical Toxicology**. 2002 may/jun;26(4):211-215.

SENO H. SUZUKI, O. ; KUMAZAWA, T. Rapid Isolation with Sep-Pak C18 Cartridges and Wide-bore Capillary Gas Chromatography of Benzofenones, the Acid-Hydrolysis Products of Benzodiazepines. **Journal Analytical Toxicology**. 1991 jan/fev;15:21-24.

SOARES, C. N.; SOARES M. B. M.; ASBAHR F. R.; BERNIK M. A. Perfil de uso e abuso de benzodiazepínicos em pacientes psiquiátricos e não psiquiátricos. **Jornal Brasileiro de Psiquiatria**. 1991 maio ;40(4): p.191-198.

SPARKMAN O. D. **Mass Spec Desk Reference**. 1 ed. 200. Global View Publish. Pttisburg

STEVEN B. KORCH. **Drug Abuse Handbook**. CRC Press. 1998 San Francisco, Califórnia.

THE DAWN REPORT. Club Drugs. **Drug Abuse Warning Network** – published by the Office of Applied Studies, Substance Abuse and Mental Health Services Administration (SAMHSA). 2000 dec.

THORNTON, M. G. A. & LIMA, I. V. Barbitúricos e benzodiazepínicos. In: Seizi Oga. **Fundamentos de Toxicologia**, 2. ed. 2003. Atheneu Editora, São Paulo.

TOMER, K. B.; MOSELEY, M. A.; DETERDING, L. J.; PARKER, C. E. Capillary Liquid-Chromatography Mass-Spectrometry. **Mass Spectrometry Reviews**. 1994 13: 431-457.

WEST R.E. & RITZ D.P. GC/MS Analysis of Five Common Benzodiazepine Metabolites in Urine as tert-Butyl-dimethylsilyl Derivatives. **Journal Analytical Toxicology**. 1993 mar/apr;17:114-116.

YUAN, H.; MESTER, Z.; LORD, H.; PAWLISZYN, J. Automated In-Tube Solid-Phase Microextraction Coupled with Liquid Chromatography-Electrospray Ionization Mass Spectrometry for the Determination of Selected Benzodiazepines. **Journal Analytical Toxicology**. 2000 nov/dec;24:718-725.