

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS

ALINE ALVES SWERTS

**SÍNTESE DE UM POLÍMERO DE IMPRESSÃO MOLECULAR
RESTRITO A LIGAÇÃO COM MACROMOLÉCULAS POR MEIO DE
REVESTIMENTO COM ALBUMINA PARA EXTRAÇÃO DE
BENZODIAZEPÍNICOS SEGUIDO DE ANÁLISE POR HPLC**

Alfenas/MG

2014

ALINE ALVES SWERTS

**SÍNTESE DE UM POLÍMERO DE IMPRESSÃO MOLECULAR
RESTRITO A LIGAÇÃO COM MACROMOLÉCULAS POR MEIO DE
REVESTIMENTO COM ALBUMINA PARA EXTRAÇÃO DE
BENZODIAZEPÍNICOS SEGUIDO DE ANÁLISE POR HPLC**

Dissertação apresentada ao curso de Pós graduação em Ciências farmacêuticas da Universidade Federal de Alfenas, como requisito para obtenção do Título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Área de concentração: Ciências Farmacêuticas

Orientadora: Profa. Dra. Vanessa Bergamin Boralli Marques.

Alfenas/MG

2014

Swerts, Aline Alves.

Síntese de um polímero de impressão molecular restrito a ligação com macromoléculas por meio de revestimento com albumina para extração de Benzodiazepínicos seguido de análise por HPLC. / Aline Alves Swerts. - 2014.

101 f. -

Orientadora: Vanessa Bergamin Boralli Marques.
Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) -
Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, MG, 2014.
Bibliografia.

1. Receptores Benzodiazepínicos. 2. Extração em fase sólida.
I. Marques, Vanessa Bergamin Boralli. II. Título.

CDD: 543.84

ALINE ALVES SWERTS

**SÍNTESE DE UM POLÍMERO DE IMPRESSÃO MOLECULAR
RESTRITO A LIGAÇÃO COM MACROMOLÉCULAS POR MEIO DE
REVESTIMENTO COM ALBUMINA PARA EXTRAÇÃO DE
BENZODIAZEPÍNICOS SEGUIDOS DE ANÁLISE POR HPLC**

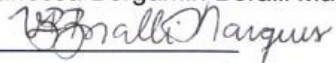
À Banca examinadora abaixo-assinada aprova a Dissertação apresentada ao curso de Pós-graduação em Ciências farmacêuticas da Universidade Federal de Alfenas, como requisito para obtenção do Título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Área de concentração: Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Profa. Dra. Vanessa Bergamin Boralli Marques.

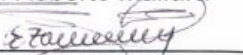
Aprovada em: 28 / 07 / 2014

Profa. Dra. Vanessa Bergamin Boralli Marques

Assinatura: 

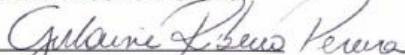
Instituição: Universidade Federal de Alfenas (UNIFAL-MG)

Nome: Wilson Roberto Malfará

Assinatura: 

Instituição: Universidade Paulista - Campus Ribeirão Preto

Nome: Gislaine Ribeiro Pereira

Assinatura 

Instituição: Universidade Federal de Alfenas (UNIFAL-MG)

ALFENAS/MG

2014

AGRADECIMENTOS

Trilhar essa jornada e conquistar o título de mestre foi um grande desafio. E como não se vence sozinho, eu tenho muito a agradecer a Deus pelas pessoas maravilhosas colocadas no meu caminho.

À minha querida orientadora, professora Vanessa Bergamin Boralli Marques, por ter me recebido e me acolhido sem nem me conhecer. Apoio, conhecimento, incentivo e amizade estiveram sempre presente na nossa relação. Se eu tivesse que recomeçar, com certeza iria escolher você novamente.

Ao meu co-orientador, professor Eduardo Costa de Figueiredo, pela disponibilidade, boa vontade e atenção, meu agradecimento e minha admiração.

À professora Isarita Martins, pelo convívio agradável, conselhos e conversas que tanto ajudaram.

À Patricia Penido Maia, pela ajuda diária no laboratório e pela oportunidade de conhecer uma pessoa incrível, com a qual tanto me identifiquei.

À Ana Carolina Tresinari que esteve comigo no dia a dia vivenciando todas as dificuldades de se realizar uma pesquisa.

À Mariane Santos pelo conhecimento compartilhado.

À Márcia, pela sua ajuda inestimada, pelo carinho e alegria dedicados a todos do laboratório.

À Lailah, Taila, Juliana e Mônica, divido essa conquista com vocês de todo o coração. Não existem palavras no mundo capazes de expressar a minha alegria por ter conhecido vocês e minha gratidão pelo que cada uma fez por mim. Nossa amizade será imortal.

A todos os colegas do LATF pela convivência harmoniosa.

A minha mãe, meu irmão e meus amigos que sempre torceram por mim e compreenderam meus momentos de ausência.

MUITO OBRIGADA!

RESUMO

Os benzodiazepínicos (BZD) são uma das classes de medicamentos mais consumidas mundialmente e sua utilização deve ser norteada pela administração das menores doses terapêuticas e pelo menor período de tempo possível devido aos riscos de dependência e abuso. Diante disso se faz necessário o acompanhamento farmacoterapêutico de pacientes para mensurar as concentrações plasmáticas dos fármacos e observar a sua efetividade e sua segurança. Para isso foi utilizado uma técnica de polímero de impressão molecular restrito a ligação com macromoléculas (RAM-MIP-BSA). O RAM-MIP-BSA, é um polímero sintetizado pelos métodos tradicionais e posteriormente revestido com uma camada hidrofílica que elimina as macromoléculas das amostras tornando o preparo de amostra mais simples e sendo aplicado diretamente na extração em fase sólida. Este estudo teve como objetivo a síntese de um RAM-MIP-BSA para uma classe farmacêutica (benzodiazepínicos) para fins de monitorização terapêutica. O diazepam foi utilizado como molécula modelo na síntese do polímero que foi acondicionado em cartucho para extração em fase sólida, sendo esta extração SPE-RAM-MIP-BSA a única etapa de preparo de amostra. O eluato da SPE foi levado à secura e ressuspendido para injeção em sistema cromatográfico com fase móvel de tampão fosfato 0,01 M pH 3,0 e acetonitrila (65:35, v/v); fluxo de 1 mL/min; detecção em UV a 220 nm; coluna C8; volume de injeção de 200 µL e tempo de análise cromatográfica de 20 minutos.

O método foi validado segundo normas vigentes da ANVISA, demonstrando ser preciso, exato e estável e linear na faixa de 10 a 800 ng/mL. O RAM-MIP-BSA eliminou 100% das proteínas do plasma, sendo o processo de extração rápido, e pequena utilização de solventes orgânicos. Dos 18 voluntários incluídos no estudo em uso de BZD, 66,6% apresentaram níveis muito acima do intervalo terapêutico para cada fármaco. Este dado, que pode contribuir eventos adversos ou tóxicos, pode ser causado por interações entre medicamentos, desde que os pacientes estão em politerapia ou por alterações fisiológicas ocasionadas pelo envelhecimento, uma vez que 62% dos pacientes incluídos apresentam idade acima de 60 anos.

Palavras-chave: Benzodiazepínicos. Extração em fase sólida. RAM-MIP-BSA.

ABSTRACT

The Benzodiazepines (BZD) are a drugs class of most used worldwide and their use should be guided by administration of smaller doses and for the shortest period of time because due to dependence and abuse situations. Therefore, it is necessary pharmacokinetic and pharmacodynamic patients monitoring in order to determine plasma concentration of drugs and observe its effectiveness and safety. For this purpose a technique of molecular imprinting polymer restricted binding to macromolecules (RAM-MIP-BSA) was used. The RAM-MIP-BSA is a polymer synthesized by traditional methods and subsequently coated with a hydrophilic layer that eliminates the macromolecules of samples by making sample preparation simple in solid phase extraction. This study aims to synthesis of a RAM-MIP-BSA to a pharmaceutical class (benzodiazepines) for therapeutic drug monitoring. Diazepam was used as a model molecule in polymer synthesis; after synthesis, the polymer was packed into a cartridge for solid phase extraction, and extraction single step sample preparation. The eluate from SPE was evaporated to the dryness and resuspended for injection into the chromatographic system with mobile phase of 0.01 M phosphate buffer pH 3.0 and acetonitrile (65:35, v / v), flow rate 1 mL/min, UV detection at 220 nm; C8 column , injection volume of 200 μ L and chromatographic analysis time of 20 minutes.

The method was validated according to the current standards of ANVISA, proving to be precise, accurate and stable and linear in the range 10-800 ng / mL. The RAM-MIP-BSA eliminated 100% of the plasma proteins, with the rapid extraction process, and little use of organic solvents. The 18 subjects included in the study on the use of BZD, 66.6% presented levels above the therapeutic range for each drug. This data, which may contribute toxic or adverse events may be caused by drug interactions, since patients are on polytherapy or physiological changes caused by aging, since 62% of patients have included age over 60 years..

Keyword: Benzodiazepines. Solid phase extraction. RAM-MIP-BSA.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1 - Esquema geral da síntese de MIP	33
FIGURA 2 - Esquema de um RAM com mecanismo de exclusão por barreira física (A) e química (B)	34
FIGURA 3 - Esquema da síntese de RAM-MIP	36
FIGURA 4 - Etapas envolvidas na SPE: condicionamento do sorvente, adição da amostra, remoção dos interferentes e eluição do analito.....	38
FIGURA 5 - Estrutura química das moléculas de benzodiazepínicos	47
FIGURA 6 - Esquema da síntese de RAM-MIP	48
FIGURA 7 - Esquema utilizado por Moraes (2012) para teste de eliminação de BSA nos polímeros sintetizados.	51
FIGURA 8 - Fluxograma das etapas da extração da amostra e injeção em HPLC	52
FIGURA 9 - Espectros de infravermelho do RAM-MIP (9A), RAM-MIP-BSA (9B), RAM-NIP (9C) e RAM-NIP-BSA (9D).....	60
FIGURA 10 - Micrografia eletrônica de varredura do RAM-MIP (A) e do RAM-MIP-BSA (B).....	61
FIGURA 11 - Análise cromatográfica dos analitos. Bromazepam (1), lorazepam (2), clonazepam (3), diazepam (4).....	66
FIGURA 12 - Curva analítica do lorazepam em plasma humano.....	68
FIGURA 13 - Curva analítica do clonazepam em plasma humano	69

FIGURA 14 - Curva analítica do diazepam em plasma humano70

FIGURA 15 - Análise cromatográfica da amostra branco (15A) após duas
injeções do LSQ (15B) de contendo PI, lorazepam,
clonazepam, diazepam, respectivamente identificados pelas
letras A, B, C e D.....72

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - Características dos pacientes participantes do protocolo de estudo. Os valores representados correspondem à média. (n=18).....	42
TABELA 2 - Dados referentes a gênero, dose diária, medicamentos associados e patologias dos pacientes participantes do protocolo de estudo.....	43
TABELA 3 - Resposta dos analitos em função da quantidade de RAM-MIP-BSA na extração em fase sólida	62
TABELA 4 - Condições cromatográficas do método bioanalítico desenvolvido para quantificação de benzodiazepínicos em plasma humano por HPLC/UV	63
TABELA 5 - Eliminação de proteína dos polímeros	65
TABELA 6 - Parâmetros relativos à curva analítica do método analítico para quantificação de lorazepam em plasma humano por HPLC-UV na faixa de concentração de 10 a 800 ng/mL.....	67
TABELA 7- Parâmetros relativos à curva analítica do método analítico para quantificação de clonazepam em plasma humano por HPLC-UV na faixa de concentração de 10 a 800 ng/mL.....	68
TABELA 8 - Parâmetros relativos à curva analítica do método analítico para quantificação de diazepam em plasma humano por HPLC-UV na faixa de concentração de 10 a 800 ng/mL.....	69

TABELA 9 - Limite de quantificação para lorazepam, clonazepam e diazepam.....	71
TABELA 10 - Limite de detecção para lorazepam, clonazepam e diazepam.....	71
TABELA 11 - Precisão e exatidão intra-dias e interdias referente ao método analítico para quantificação de lorazepam, clonazepam e diazepam em plasma.....	73
TABELA 12 - Estabilidade após ciclos de congelamento e descongelamento referente ao método analítico para quantificação de lorazepam, clonazepam e diazepam	74
TABELA 13 - Estabilidade de curta duração referente ao método analítico para quantificação de lorazepam, clonazepam e diazepam.....	75
TABELA 14 - Estabilidade pós-processamento referente ao método analítico para quantificação de lorazepam, clonazepam e diazepam.....	76
TABELA 15 - Número de usuários de medicamentos em estudo x usuários com sobredose	78
TABELA 16 - Concentração do fármaco no plasma dos pacientes participantes do estudo.	79

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AIBN –	Azo-bis-iso-butironitrila
ALC -	Agente de ligação cruzada
ANVISA –	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
BSA -	Albumina bovina sérica
BDZ -	Benzodiazepínicos
CEP-CONEP -	Comissão de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Alfenas
CQ -	Controles de qualidade
CQA -	Controle de qualidade de alta concentração
CQB -	Controle de qualidade de baixa concentração
CQD -	Controle de qualidade de diluição
CQM -	Controle de qualidade de média concentração
CV -	Coeficiente de variação
CYP -	Citocromo P450
DPR -	Desvio padrão relativo
EGDMA -	Etileno glicol dimetacrilato
EPR -	Erro Padrão Relativo
FDA -	Food and Drug Administration
GABA -	Ácido Gama Aminobutírico
GDMA -	Glicerol dimetacrilato
HEMA -	2-hidroxietil metacrilato
HPLC -	Cromatografia líquida de alta eficiência
ISRS –	Inibidor seletivo da recaptação de serotonina
LIQ -	Limite inferior de quantificação
MAA -	Ácido metacrílico
MF -	Monômero funcional
MIP -	Polímero de impressão molecular
MISPE -	Extração em fase sólida com impressão molecular
MM -	Molécula modelo
NIP -	Polímeros não impressos

PI -	Padrão interno
RAM -	Materiais de Acesso Restrito
RAM-MIP-BSA	-Polímero de impressão molecular restritos a ligação com macromoléculas recoberto com albumina bovina sérica
RAM-NIP –	Polímero não impresso restrito à ligação com macromoléculas
RAM-NIP-BSA -	Polímero não impresso restrito à ligação com macromoléculas por meio de revestimento com albumina bovina sérica
RDC –	Resolução Diretoria Colegiada
SNC -	Sistema Nervoso Central
SPE -	Extração em fase sólida
TCLE -	Termo de consentimento livre e esclarecido
UV –	Ultra violeta

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
2	REVISÃO DE LITERATURA	17
2.1	BENZODIAZEPÍNICOS – ASPECTOS HISTÓRICOS	17
2.2	PROPRIEDADES DOS BENZODIAZEPÍNICOS	18
2.2.1	Diazepam	19
2.2.2	Clonazepam	20
2.2.3	Lorazepam	21
2.2.4	Bromazepam	22
2.3	INDICAÇÕES CLÍNICAS E RESTRIÇÕES	23
2.4	USO IRRACIONAL DOS BENZODIAZEPÍNICOS	23
2.5	MONITORIZAÇÃO TERAPÊUTICA/ACOMPANHAMENTO TERAPÊUTICO	25
2.6	POLÍMEROS DE IMPRESSÃO MOLECULAR (MIP)	27
2.6.1	Molécula Modelo	28
2.6.2	Monômero Funcional	29
2.6.3	Agente de Ligação Cruzada	30
2.6.4	Solventes	31
2.6.5	Tipos de Ligações	32
2.7	MATERIAIS DE ACESSO RESTRITO	33
2.8	POLÍMEROS DE IMPRESSÃO MOLECULAR RESTRITOS À LIGAÇÃO COM MACROMOLÉCULAS (RAM-MIP)	35
2.9	EXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA	37

3	OBJETIVOS	41
3.1	OBJETIVOS GERAIS	41
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	41
4	MATERIAIS E MÉTODOS	42
4.1	CASUÍSTICA	42
4.2	PROTOCOLO CLÍNICO	45
4.3	REAGENTES E EQUIPAMENTOS	45
4.4	SÍNTESE DO RAM-MIP	46
4.5	CARACTERIZAÇÃO DOS POLÍMEROS	49
4.6	CAPACIDADE DE ELIMINAÇÃO DE PROTEÍNAS.....	50
4.7	EXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA	51
4.8	CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS PARA ANÁLISE DE BENZODIAZEPÍNICOS	53
4.9	VALIDAÇÃO DOS MÉTODOS BIOANALÍTICOS	52
4.9.1	Linearidade	52
4.9.2	Limite Inferior de Quantificação (LIQ)	53
4.9.3	Limite de Detecção	53
4.9.4	Efeito Residual	53
4.9.5	Precisão e Exatidão intra e intercorridas	54
4.9.6	Estabilidade	54
4.9.6.1	Estabilidade após ciclo de congelamento e descongelamento	55
4.9.6.2	Estabilidade de curta duração	55
4.9.6.3	Estabilidade das amostras pós-processamento	56
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	57
5.1	SÍNTESE DO RAM-MIP	57

5.2	CARACTERIZAÇÃO DOS POLÍMEROS	57
5.3	EXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA	60
5.4	CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS	63
5.5	CAPACIDADE DE ELIMINAÇÃO DE PROTEÍNAS	64
5.6	VALIDAÇÃO DOS MÉTODOS BIOANALÍTICOS	65
5.6.1	Linearidade	65
5.6.2	Limite de Quantificação (LIQ)	69
5.6.3	Limite de detecção (LD)	69
5.6.4	Efeito Residual	70
5.6.5	Precisão e Exatidão	71
5.6.6	Estabilidade	72
5.6.6.1	Estabilidade após ciclo de congelamento e descongelamento	72
5.6.6.2	Estabilidade de curta duração	73
5.6.6.3	Estabilidade das amostras pós-processamento	73
5.7	CONSIDERAÇÕES SOBRE A METODOLOGIA BIOANALÍTICA DESENVOLVIDA PARA QUANTIFICAÇÃO DE BENZODIAZEPÍNICOS.....	74
5.8	ANÁLISES DAS AMOSTRAS DOS PACIENTES INCLUÍDOS NO ESTUDO	75
6	CONCLUSÕES	81
	REFERÊNCIAS	82
	ANEXO	96

1 INTRODUÇÃO

Os Benzodiazepínicos (BDZ), fármacos depressores do Sistema Nervoso Central (SNC), são relatados como o maior grupo de medicamentos sedativos e uma das classes de medicamentos mais consumidas mundialmente. De acordo com o Centro Brasileiro de Informações sobre Drogas Psicotrópicas (CEBRID), em 2001 foram prescritas 6,96 milhões de doses de BDZ como hipnóticos no mundo (CEBRID, 2003). Na Grã-Bretanha em um estudo com cerca de 4.000 indivíduos, observou-se que 7,7% destes utilizaram BDZ no ano anterior e que 80% dos pacientes que receberam a primeira prescrição no período do estudo, 30% utilizavam altas doses. (POYARES et al., 2005).

A utilização destes medicamentos deve ser norteada pela administração das menores doses terapêuticas e pelo menor período de tempo possível devido aos riscos de dependência e abuso (SWETTMAN, 2005). O potencial de abuso dos BDZ foi relatado a partir de meados dos anos 70, quando estudos evidenciaram o desenvolvimento de dependência e sintomas de abstinência em doses terapêuticas de diazepam (MELO ; STORPIRTIS, 2006).

Embora a literatura preconize que os BDZ devam ser utilizados por um curto período de tempo, o que se observa, mundialmente, é a continuidade do uso que vai além de uma indicação clínica bem definida e por um tempo de tratamento indeterminado. A necessidade de racionalizar o uso de medicamentos psicotrópicos ultrapassa a área clínica e vem se transformando em um problema de saúde pública (GALLEGUILLLOS et al., 2003)

Diante disso se faz necessário o acompanhamento farmacoterapêutico de pacientes em tratamento com benzodiazepínicos onde será possível mensurar as concentrações plasmáticas dos fármacos e observar a sua efetividade e sua segurança. Dentre as várias técnicas analíticas disponíveis, os polímeros de impressão molecular foram escolhidos para este estudo. Estes são materiais sintéticos dotados de sítios específicos de reconhecimento. São obtidos por reações de polimerização que fixam, estrategicamente, monômeros funcionais ao redor de uma molécula modelo de acordo com os grupos ligantes e com a estereoquímica de ambas as moléculas (FIGUEIREDO et al.,2011).

Nesse sentido, a utilização de polímero de impressão molecular restrito a ligação com macromoléculas (RAM-MIP-BSA) para análise de uma classe de medicamentos se faz bastante promissora.

2 REVISÃO DE LITERATURA

Segue abaixo a revisão de literatura sobre o tema dessa dissertação.

2.1 BENZODIAZEPÍNICOS – ASPECTOS HISTÓRICOS

Os primeiros benzodiazepínicos (BDZ) foram sintetizados pelo Dr. Leo Sternbach em New Jersey – EUA – em meados da década de 1950. Como ocorre em muitas descobertas científicas, um composto foi sintetizado acidentalmente, o clordiazepóxido. Nas primeiras experiências clínicas com pacientes esquizofrênicos, não demonstrou ação antipsicótica, mas pôde-se observar que o mesmo reduzia a ansiedade. Em 1960, foi lançado no mercado o clordiazepóxido que causou grande impacto no tratamento dos distúrbios de ansiedade devido à sua eficácia e segurança (BERNIK, 1999). Por terem caráter menos sedativo e causarem menos dependência, os BDZ vieram a substituir os barbitúricos e o meprobamato, medicamentos até então utilizadas no tratamento da ansiedade (STAHL, 2006).

Em 2001 foi realizado o primeiro levantamento domiciliar sobre o consumo de drogas psicotrópicas no Brasil, envolvendo as 107 maiores cidades do país. Dos 8.589 entrevistados na pesquisa, 283 (3,3%) relataram já ter utilizado BDZ alguma vez na vida (CARLINI et al., 2002). A realização de um segundo levantamento, em 2005, revelou aumento deste número para 445 usuários (5,6%) (CARLINI et al., 2005). Estes dados são preocupantes, uma vez que os medicamentos são os responsáveis pelo maior número de intoxicações em humanos no país (FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ, 2008).

A eficácia ansiolítica e hipnótica dos BDZ e a ausência de efeitos adversos que representassem risco de morte ou de toxicidade na superdosagem conferiram a esta classe de medicamentos grande aceitabilidade no meio médico (DOBLE, 1998). No final da década de 70, medicamentos como o diazepam (Valium®) tornaram-se um dos mais prescritos no mundo inteiro para o tratamento das doenças que afetavam o Sistema Nervoso Central (SNC). A aceitação imediata pela comunidade médica levou a indústria farmacêutica a desenvolver novos medicamentos com perfil

farmacológico similar aos BDZ. Três décadas depois da descoberta destes fármacos, mais de cinquenta novas substâncias químicas relacionadas foram introduzidas na terapêutica (BERNIK, 1999).

2.2 PROPRIEDADES DOS BENZODIAZEPÍNICOS

Os benzodiazepínicos são genericamente classificados como depressores do Sistema Nervoso Central (USP-DI, 2003). Além das propriedades sedativo-hipnóticas, os BDZ apresentam propriedades anticonvulsivantes, relaxante muscular e amnésica. Essas ações são mediadas pela potencialização da atividade do Ácido Gama Aminobutírico (GABA), um potente neurotransmissor inibitório, no cérebro (SWEETMAN, 2005). Toda a classe de benzodiazepínicos compartilha o mecanismo de ação e as propriedades terapêuticas, diferindo quanto ao início, intensidade e duração de seus efeitos, o que pode ser explicado na maioria dos casos pelas propriedades farmacocinéticas de cada medicamento dessa classe (BERNIK, 1999).

A absorção da maioria dos BDZ é quase completa após a administração oral, embora o início da ação varie, de acordo com a taxa de absorção (KAPLAN; SADOCK, 1999). Após a absorção, os benzodiazepínicos passam por intensa transformação metabólica gerando, em alguns casos, metabólitos farmacologicamente ativos e com meias-vidas prolongadas. A formação destes metabólitos ativos tem complicado os estudos de farmacocinética em seres humanos, pois a meia-vida do medicamento original pode ter pouca relação com a sequência dos efeitos farmacológicos (KATZUNG, 2005).

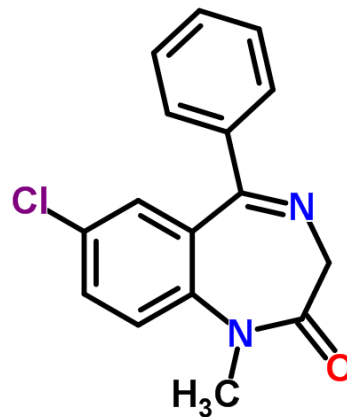
Fármacos com metabólitos ativos e meia-vida prolongada, como o diazepam, têm tendência a produzir efeitos cumulativos com o uso de doses múltiplas levando ao aparecimento de reações adversas (KATZUNG, 2005). Sonolência, sedação e ataxia são os efeitos adversos mais frequentes. Outros efeitos menos frequentes incluem vertigem, cefaleia, confusão, depressão mental, sendo que pacientes que utilizam altas doses e por longo período de tempo tem um desempenho pobre envolvendo habilidades visuais/espaciais e atenção. Outros efeitos a serem considerados são a disartria, alteração da libido, tremor, distúrbios visuais, retenção ou incontinência urinária, distúrbios gastrointestinais, salivação e amnésia. Alguns

pacientes podem experimentar uma excitação paradoxal apresentado hostilidade, agressão e desinibição. Raramente observam-se desordens sanguíneas e hipersensibilidade. A depressão respiratória e hipotensão, comuns a outros hipnóticos, ocorrem raramente e estão associadas à administração parenteral e uso de altas doses do medicamento (SWEETMAN, 2005).

Dentre os BDZ, os mais utilizados entre a população brasileira, são os abaixo citados, distribuídos pelo Sistema Único de Saúde.

2.2.1 Diazepam

- Fórmula estrutural:



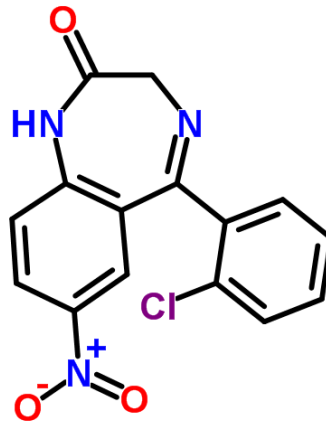
- Nome IUPAC: 7-Chloro-1-methyl-5-phenyl-1,3-dihydro-2H-1,4-benzodiazepin-2-one
- Fórmula Molecular: $C_{16}H_{13}ClN_2O$
- Massa Molar: $284,73 \text{ g mol}^{-1}$
- pKa: 3,4
- Dose diária: 10 a 30 mg /dia
- Via (s) de administração: oral, intramuscular, intravenoso, supositório
- Intervalo terapêutico: 200 a 800 ng/mL
- Biodisponibilidade: 93%
- Ligação as proteínas: 98,7%
- Metabolismo: Hepático (CYP2C19)
- Meia via: $43 \text{ h} \pm 13$

- Excreção: renal

(MANDRIOLI et al.,2008; GOODMAN et al., 2010)

2.2.2 Clonazepam

- Fórmula estrutural:

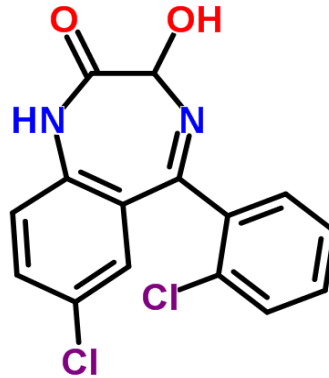


- Nome IUPAC: 5-(2-Chlorophenyl)-7-nitro-1,3-dihydro-2H-1,4-benzodiazepin-2-one
- Fórmula Molecular: C₁₅H₁₀ClN₃O₃
- Massa Molar: 315,7 g mol⁻¹
- pKa: 1,5
- Dose diária: 1,5 mg/dia
- Via (s) de administração: oral, intramuscular, intravenoso, sublingual
- Intervalo terapêutico: 10 a 50 ng/mL
- Biodisponibilidade: 90%
- Ligação às proteínas: 85%
- Metabolismo: Hepático (CYP3A4)
- Meia via: 23 h ± 5
- Excreção: renal

(MANDRIOLI et al.,2008; GOODMAN et al., 2010)

2.2.3 Lorazepam

- Fórmula estrutural:

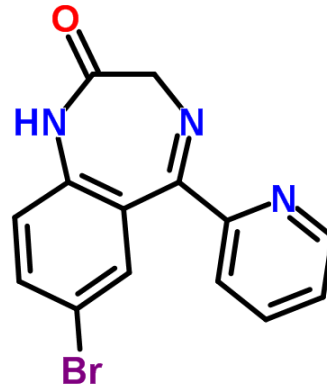


- Nome IUPAC: 7-Chloro-5-(2-chlorophenyl)-3-hydroxy-1,3-dihydro-2H-1,4-benzodiazepin-2-one
- Fórmula Molecular: $C_{15}H_{10}Cl_2N_2O_2$
- Massa Molar: $321,15 \text{ g mol}^{-1}$
- pKa: 1,3
- Dose diária: 2 a 3 mg/dia
- Via (s) de administração: oral, intramuscular, intravenoso, sublingual
- Intervalo terapêutico: 20 a 250 ng/mL
- Biodisponibilidade: 97%
- Ligação às proteínas: 85%
- Metabolismo: Hepático (CYP 3A4)
- Meia via: $14 \text{ h} \pm 5$
- Excreção: renal

(MANDRIOLI et al.,2008; GOODMAN et al., 2010)

2.2.4 Bromazepam

- Fórmula estrutural:



- Nome IUPAC: 7-Bromo-5-(2-pyridinyl)-1,3-dihydro-2H-1,4-benzodiazepin-2-one
- Fórmula Molecular: $C_{14}H_{10}BrN_3O$
- Massa Molar: $316,15 \text{ g mol}^{-1}$
- pKa: 2,9
- Dose diária: 12 mg/dia
- Via (s) de administração: oral
- Intervalo terapêutico: 80 a 200 ng/mL
- Biodisponibilidade: 84%
- Ligação às proteínas: 85%
- Metabolismo: Hepático (CYP3A4)
- Meia via: 12 a 20h
- Excreção: renal

(MANDRIOLI et al.,2008; GOODMAN et al., 2010)

2.3 INDICAÇÕES CLÍNICAS E RESTRIÇÕES

Embora os BDZ sejam utilizados em uma diversidade de situações clínicas pouco definidas, segundo Sweetman (2005) os BDZ são indicados no tratamento da ansiedade severa, insônia, anestesia, epilepsia, espasmos musculares, síndrome de abstinência alcoólica, náusea e vômito em pacientes com tratamento quimioterápico e como adjuvante no tratamento da esquizofrenia. Além disso, podem ser utilizados em crianças nos casos de terror noturno e sonambulismo.

Entre as restrições ao uso de benzodiazepínicos destacam-se os alcoolistas, usuários de outros depressores do SNC e os idosos. Nos dois primeiros casos, efeitos depressores aditivos com o álcool ou com outras substâncias depressoras do SNC justificam a restrição. No caso de idosos, o critério de Beers publicado em 1997, um critério de utilização de medicamentos por pacientes com idade superior a 65 anos, considera o uso de BDZ de meia-vida longa (ex. diazepam) potencialmente inapropriado para idosos, independente do diagnóstico. Estes medicamentos têm a meia-vida aumentada em pacientes idosos, produzindo sedação prolongada e aumento dos riscos de quedas e fraturas. Se o uso for necessário, deve-se preferir um BDZ de meia-vida curta a intermediária (ex. clonazepam). Em pacientes idosos com quadro depressivo o uso de BDZ com meia-vida longa deve ser evitado, pois pode produzir ou exacerbar a depressão (BEERS et al., 2003).

2.4 USO NÃO RACIONAL DOS BENZODIAZEPÍNICOS

Estes medicamentos interagem sinergicamente com demais depressores do Sistema Nervoso Central (SNC). Quando utilizados concomitantemente com outros hipnóticos, sedativos, antidepressivos, neurolépticos, anticonvulsivantes e anti-histamínicos a ação depressora destes fármacos é potencializada. Apesar disto, são fármacos relativamente seguros, uma vez que raramente promovem overdose fatal, a qual ocorre, na maioria das vezes, em combinação com álcool, com ou sem opióides (LONGO; JOHNSON, 2000).

Em um estudo envolvendo análise de prontuários numa clínica de Psicologia, as interações farmacológicas mais frequentes foram a combinação de fluoxetina com BDZ, amplamente prescrita para auxiliar no emagrecimento. Esta interação farmacocinética pode resultar em elevação da concentração sanguínea do ansiolítico, exacerbando, assim, seus efeitos adversos, além da possibilidade de intoxicação (NASCIMENTO ; GUARIDO, 2008).

O clonazepam é prescrito para crianças como droga anticonvulsivante há décadas, e mais recentemente seu emprego tem se estendido a quadros psiquiátricos. A administração de BDZ por indivíduos desta faixa etária pode promover alterações cognitivas e sedação, podendo resultar em prejuízos ao aprendizado escolar (BRASIL ; BELISÁRIO FILHO, 2000).

A utilização destes medicamentos, mesmo em doses terapêuticas, é contraindicada em indivíduos com doença pulmonar obstrutiva crônica, ou apneia obstrutiva do sono, pois podem prejudicar a respiração (GARCIA; VIÑA; MACHADO, 2003).

Um estudo realizado por Nordon (2009) em Sorocaba, no Estado de São Paulo, foi desenvolvido a partir de entrevistas com 350 mulheres, das quais 46 (13%) eram usuárias de BDZ, e dentre estas, 41 (89%) faziam uso prolongado desses fármacos (mais de seis meses). Estes valores refletem a ampla utilização continuada destes medicamentos, podendo desenvolver tolerância, dependência, bem como efeitos da retirada (efeito rebote) nos usuários (ASHTON, 1994; LONGO; JOHNSON, 2000).

É possível mencionar que a dependência a alguns BDZ pode ocorrer em dias ou semanas. Ela se dá mais rapidamente na utilização destes fármacos com meia-vida curta, como o alprazolam e o lorazepam, em relação aos de meia-vida longa, como o diazepam e o clonazepam. A partir disso, quando houver descontinuação do uso, ocorrerão sintomas opostos ao efeito terapêutico esperado do medicamento, ou intensificação da recorrência dos sintomas originais, bem como efeito rebote, caracterizado como retorno do sintoma original, porém mais intenso, mas com caráter transitório (LONGO; JOHNSON, 2000).

Relatos de usuários de BDZ, bem como dados do Programa de Ansiedade e Depressão da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), evidenciam que doses elevadas destes fármacos de alta potência, como a administração de 4 a 10

mg/dia de alprazolam, ou 4 a 6 mg/dia de clonazepam, estão associadas a uma maior ocorrência de disfunções sexuais (POSSIDENTE et al., 1997).

Outra problemática referente a estes medicamentos está relacionada à gestação. Uma pesquisa realizada por Mengue et al. (2001) foi desenvolvida a partir de entrevistas com 5.564 gestantes em seis grandes cidades brasileiras, dentre as quais 32 (0,6%) relataram administrar BDZ durante o período gestacional. Suspeita-se, porém, que estes fármacos, quando empregados por tempo prolongado durante a gravidez, podem afetar adversamente o neonato devido ao seu potencial teratogêno neurocomportamental (PERES et al., 2002), bem como promover sintomas de abstinência no recém-nascido (GARCIA; VIÑA; MACHADO, 2003).

Relacionado ao exposto, Carvalho et al. (2009) observam que estudos de caso-controle relatam risco para lábio leporino ou fenda palatina em crianças expostas a BDZ durante a gestação de 11:10.000 nascimentos, havendo um aumento de 80% em comparação com o risco de 6:10.000 na população geral.

Garcia, Viña e Machado (2003) referem ainda que elevadas doses ingeridas pela mãe antes ou durante o parto promovem hipotermia, hipotonia e depressão respiratória leve no recém-nascido.

Há 20 fármacos potencialmente contraindicados para os idosos, estando entre estes os de meia vida longa (ROZENFELD, 2003), uma vez que se associa a um aumento no risco de quedas por estes indivíduos (COUTINHO e SILVA, 2002), as quais se atribuem às propriedades destes medicamentos, como atividade sedativa, responsável por alterações psicomotoras, e/ ou bloqueio α -adrenérgico, aumentando a probabilidade de hipotensão postural (RAY et al., 1987).

2.5 MONITORIZAÇÃO TERAPÊUTICA / ACOMPANHAMENTO FARMACOTERAPÊUTICO

A monitorização terapêutica tem sido descrita como importante recurso clínico, na individualização do regime de dosagem, de acordo com a concentração do fármaco e/ou de seus produtos de biotransformação, em amostras de plasma ou soro, coletadas com base no contexto clínico e nos princípios da farmacocinética (SILVA, 2007).

Após a administração de um medicamento num mesmo esquema de dose a uma população de pacientes, a concentração plasmática de vale depende da variabilidade disposicional do fármaco em questão. Para muitos fármacos, a alta variabilidade interindividuos resulta de larga diferença nas concentrações plasmática para o regime posológico usual (MOREAU, 2008).

Os benzodiazepínicos (BDZ) estão entre os medicamentos mais prescritos no mundo. É bem reconhecido que as respostas clínicas para BDZ variam amplamente entre os indivíduos. Nos últimos anos, foram identificadas várias enzimas do CYP que catalisam o metabolismo do BDZ. Há vários relatos sobre as implicações da CYPs polimórficas sobre a farmacocinética do BDZ.

Dado que as taxas de absorção, o volume de distribuição e as taxas de eliminação diferem grandemente entre os BDZ, cada fármaco produz uma curva de concentração plasmática-diferente. O tempo para o pico de concentração plasmática não é equivalente ao tempo para o início do efeito clínico. Com a dose diária repetida, altas concentrações podem acumular-se no corpo. A maioria dos BDZ é altamente lipofílico e sofre um metabolismo extensivo por enzimas CYP para aumentar a eliminação. Existem grandes variações interindividuais nas biotransformações de BDZ resultando em diferenças acentuadas nas concentrações plasmáticas tanto após a administração de dose única quanto a administração de doses múltiplas e, possivelmente, em efeitos terapêuticos e efeitos adversos, quando a mesma dose foi utilizada (FUKASAWA, et al., 2007).

O controle da variabilidade interindividual na resposta aos fármacos disponíveis na clínica representa na atualidade um dos maiores desafios da Farmacologia Clínica. Os estudos de metabolismo de fármacos têm permitido a identificação das principais enzimas de fase I e II responsáveis pelas conversões metabólicas. Porém, a grande variabilidade individual no metabolismo destes fármacos representa um obstáculo importante porque pode levar a resultados indesejáveis e difíceis de prever, como a variação no intervalo terapêutico e a manifestação de efeitos tóxicos em sub-populações específicas. Entre as causas da variação estão o polimorfismo genético, os estados fisiológicos e as doenças, além da interação entre fármacos (BROCKS, 2006).

Os fármacos administrados para controle de uma patologia são metabolizados pelo organismo por um conjunto de enzimas e proteínas. Uma das proteínas envolvidas na rota metabólica é o citocromo P450 (CYP450). Este possui

uma família composta por diversas isoformas, as quais são capazes de metabolizar substâncias endógenas e exógenas, sendo responsáveis pelo metabolismo de 80% dos fármacos. Os BDZ são metabolizados por diferentes enzimas do CYP, todos sujeitas a expressão polimórfica, indução, inibição e ou interação em situações de politerapia. Por esses motivos o acompanhamento farmacoterapêutico se faz tão necessário na utilização prolongada desses fármacos. Para estudos de monitorização terapêutica são necessários o empregos de técnicas analíticas seletivas, capazes de mensurar as concentrações plasmáticas do fármaco em baixas concentrações além de técnicas de preparo de amostras que eliminem as interferências da matriz biológica. Diante disso, a utilização dos polímeros de impressão molecular se mostra bastante pertinente.

2.6 POLÍMEROS DE IMPRESSÃO MOLECULAR (MIP)

Os polímeros de impressão molecular (MIP) são polímeros sintéticos amplamente utilizados, principalmente na extração seletiva de diferentes substâncias contidas em matrizes relativamente complexas (LORENZO et al.;2004)

São formados pela polimerização de unidades monoméricas na presença de uma molécula modelo (MM) que é posteriormente removida resultando em cavidades cuja forma, funcionalidade, tamanho e arranjo espacial são complementares à molécula impressa. Isso torna o polímero seletivo à molécula-alvo. Além disso, os MIPs são estáveis e extremamente robustos. Sua capacidade de reconhecer a MM pode permanecer inalterada após tratamento com ácidos, bases, solventes orgânicos e temperaturas altas. (LAVIGNAC et al.; 2004).Os principais componentes envolvidos na produção do MIP são a molécula modelo (MM), o monômero funcional (MF) e o agente de ligação cruzada (ALC) (AZODI-DEILAMI et al., 2010).

De acordo com Beltran et al. (2010), a escolha correta do MF é muito importante, porque isso irá determinar a estabilidade do complexo formado antes e durante o processo de polimerização e a capacidade subsequente do MIP para interagir seletivamente com a MM.

Para aumentar a seletividade do MIP, o monômero funcional deverá ser selecionado de acordo os grupos funcionais presentes na MM. Para isto, deverá haver vários pontos de interação do MF com a MM. O terceiro componente envolvido na síntese de um MIP é o agente de ligação cruzada, cuja função é conferir estabilidade mecânica, estabilizar o local de reconhecimento molecular e controlar a porosidade do polímero. Além disso, a escolha adequada do agente de ligação cruzada pode afetar a hidrofobicidade, especialmente quando a amostra de interesse é uma matriz a base de água (BELTRAN et al.;2010)

A síntese de MIPs é um procedimento relativamente simples e barato. O polímero de impressão molecular é preparado pela dissolução da molécula alvo, dos monômeros funcionais, dos agentes de entrelaçamento e do catalisador num solvente (também conhecido como agente porogênico) (YAN ; HOW, 2006). Apesar de o procedimento de impressão molecular ser relativamente simples, é necessário otimizar uma série de parâmetros experimentais inerentes ao processo. A seguir serão descritas as características e funções de cada um destes parâmetros.

2.6.1 Molécula modelo

A molécula modelo é de central importância nos sistemas de impressão molecular, pois é a sua volta que se dará a organização dos grupos funcionais dos monômeros funcionais. É esta organização, que vai levar à formação das cavidades seletivas do polímero. Idealmente, em termos de compatibilidade, a molécula molde deve ser quimicamente inerte nas condições de polimerização, não possuir grupos polimerizáveis, não apresentar qualquer funcionalidade que iniba ou retarde a polimerização e ser estável a temperaturas relativamente elevadas (CORMACK ; ELORZA, 2004).

O método de impressão molecular pode ser aplicado a uma diversificada gama de analitos, no entanto, nem todas as moléculas molde são passíveis de impressão molecular. A impressão de pequenas moléculas orgânicas em matriz acrílica (por exemplo, fármacos, pesticidas, aminoácidos e peptídeos, nucleotídeos, esteroides, e açúcares) está bem estabelecida e é considerada quase rotina. No entanto, a impressão molecular de maiores dimensões (como proteínas) e células

podem apresentar desafios. A principal razão é o fato, deste tipo de moléculas/estruturas serem menos rígidas dificultando a criação de cavidades bem definidas durante o processo de impressão (YAN ; HOW, 2006).

Em alguns casos, a molécula molde a ser utilizada é demasiado tóxica e perigosa para ser utilizada em laboratórios, sendo possível utilizar um substituto apropriado (molécula análoga) que tem uma estrutura similar à da molécula molde e cuja utilização acarreta menos perigo (CARVALHO, 2012).

2.6.2 Monômero funcional

A seletividade do MIP surge, em grande parte, da interação entre a molécula molde e os monômeros funcionais. Como tal, a escolha dos monômeros funcionais é de grande importância para a obtenção de materiais de impressão molecular (MINGDI YAN, 2005).

Geralmente, a escolha do monômero funcional é feita em função dos seus grupos funcionais e, de forma a que estes sejam complementares aos grupos funcionais da molécula molde. Na escolha do monômero funcional, deve-se ainda levar em conta a aplicação do MIP, e o ambiente químico em este que vai ser usado (SILVA, 2010). Uma ampla variedade de monômeros funcionais, incluindo ácidos, básicos, neutros e hidrofóbicos, tem sido testada na síntese de MIPs (PUCHE, 2008).

Quando dois ou mais monômeros funcionais são utilizados simultaneamente na mistura de polimerização é importante considerar as proporções de cada um dos monômeros e a sua reatividade para assegurar que a copolimerização seja viável. Além disso, a complexação de uma molécula molde com o monômero funcional pode afetar a reatividade dos monômeros como resultado de perturbações eletrônicas ou estéricas dos mesmos (CORMACK ; ELORZA, 2004).

Na impressão covalente a razão entre a molécula molde e o monômero funcional não é de grande importância, pois é o número de moléculas molde que dita o número de moléculas de monômero funcional que a elas se ligam covalentemente. O monômero funcional está ligado à molécula molde covalentemente de forma estequiométrica (YAN ; HOW, 2006).

2.6.3 Agente de ligação cruzada

Várias moléculas contendo dois ou mais grupos polarizáveis, têm sido utilizadas como agentes de ligação cruzada (ou precursor) na impressão molecular. O agente de ligação cruzada desempenha funções importantes na impressão molecular, confere ao polímero estabilidade nos locais de ligação, transmite estabilidade mecânica, é importante no controle da morfologia do polímero e torna o polímero insolúvel em determinados solventes, aumentando assim, a sua gama de aplicação. O precursor é escolhido de forma a que este não interaja com a molécula molde, mas existem algumas exceções (PUCHE, 2008).

Considerando a eficiência da polimerização utilizam-se, geralmente, elevadas razões de agentes de ligação cruzada (na ordem dos 80%) de modo a obter materiais porosos e com estabilidade mecânica (CARVALHO, 2012).

Para que a impressão seja eficiente, a reatividade do agente de ligação cruzada deve ser semelhante a do(s) monômero(s) funcional (ais) utilizado(s), caso contrário pode ocorrer a polimerização predominante de um deles impedindo que a co-polimerização ocorra em extensão suficiente. Ao escolher um precursor adequado, a co-polimerização ocorrerá de forma aleatória, e os resíduos funcionais (derivados dos monômeros funcionais) serão uniformemente distribuídos na rede polimérica (KOMIYAMA ; ASANUMA, 2003)

A proporção molar entre o agente de ligação cruzada e o monômero funcional também é de grande importância. De acordo com Komiyama e Asanuma (2003), se esta proporção for muito pequena, os locais de impressão molecular estão tão próximos que não conseguem funcionar independentemente (uma cavidade pode inibir o funcionamento das que lhe estão mais próximas). Se, por outro lado, a proporção for muito grande, a eficiência da impressão molecular diminui, principalmente quando os agentes de entrelaçamento estabelecem ligações não-covalentes com os monômeros funcionais e, ou a molécula modelo.

2.6.4 Solventes

O solvente ou agente porogênico tem como função a dissolução dos componentes da polimerização. Tem também um papel fundamental na formação das estruturas porosas dos MIPs, e no aumento da eficiência dos locais de impressão, facilitando ainda a remoção das moléculas molde. A remoção da molécula alvo do polímero também é facilitada pela porosidade (SILVA, 2010).

Ainda de acordo com Silva (2010), na polimerização, as moléculas de solvente são incorporadas dentro dos polímeros e são removidas no pós-tratamento. Durante estes processos, o espaço originalmente ocupado pelas moléculas de solvente é deixado como poros nos polímeros. Os polímeros preparados na ausência de solventes são consistentemente muito firmes e densos, e dificilmente as moléculas alvo se religam. Assim, a natureza e a quantidade de solvente adicionado podem ser usadas para controlar a morfologia e o volume total de poros no material de impressão.

A escolha do solvente depende do tipo de impressão. Na impressão covalente, podem ser usados diversos solventes desde que estes dissolvam todos os componentes da mistura de polimerização. No entanto, na impressão não-covalente, a escolha do solvente influencia a formação dos adutos não-covalentes entre o monômero funcional e a molécula molde uma vez que a extensão do pré-polímero não-covalente depende da polaridade do solvente. De fato, solventes menos polares aumentam a formação do complexo facilitando interações não-covalentes polares, tais como, pontes de hidrogênio. Enquanto, solventes mais polares tendem a quebrar as interações não-covalentes no complexo do pré-polímero, que proporcionam um elevado grau de ruptura das ligações de hidrogênio (CORMACK ; ELORZA, 2004). Outro papel do solvente é dispersar o calor gerado na reação de polimerização, caso contrário, a temperatura da reação é elevada a nível local, efeitos secundários como reações indesejáveis podem ocorrer. Além disso, a formação do complexo monômero funcional – molécula alvo, que é exigida para a impressão não-covalente eficiente, poderia ser suprimida (CARVALHO, 2012).

2.6.5 Tipos de ligações

A retenção seletiva dos analitos no polímero pode ser estabelecida por ligações covalentes, não covalentes ou semicovalentes. Devido à estabilidade das ligações covalentes, este tipo de síntese leva à formação de sítios de ligação mais homogêneos, no entanto o processo de remoção da MM é mais difícil, podendo limitar seu uso. Uma alternativa para este problema é então estabelecer a síntese por ligações não-covalentes (ligação de hidrogênio, interações iônicas, forças de van der Waals). Entretanto, devido ao excesso de MF utilizado neste tipo de síntese, formam-se também sítios de ligação não específicos, o que compromete a seletividade do polímero (TURIEL ; ESTEBAN, 2010).

Outra opção consiste na síntese semicovalente onde a ligação ocorre por ligação covalente e a religação por ligação não covalente (ALENDER, 2005).

O principal mecanismo de formação dos MIPs é a polimerização pela formação de radicais livres. Dentre as técnicas de síntese a polimerização em *Bulk* é a mais utilizada devido a sua simplicidade e rapidez (THURMAN ; SNAVELY, 2000).

Entretanto, esta técnica apresenta baixo rendimento além de resultar em polímeros heterogêneos. Para superar esses inconvenientes, várias estratégias têm sido propostas como a polimerização por suspensão, polimerização por enxerto e polimerização por precipitação, sendo esta última a mais promissora dentre elas por apresentar um bom rendimento e formar partículas mais homogêneas (JING,et. al, 2009).

A Figura 1 mostra um esquema geral da síntese dos MIPs.

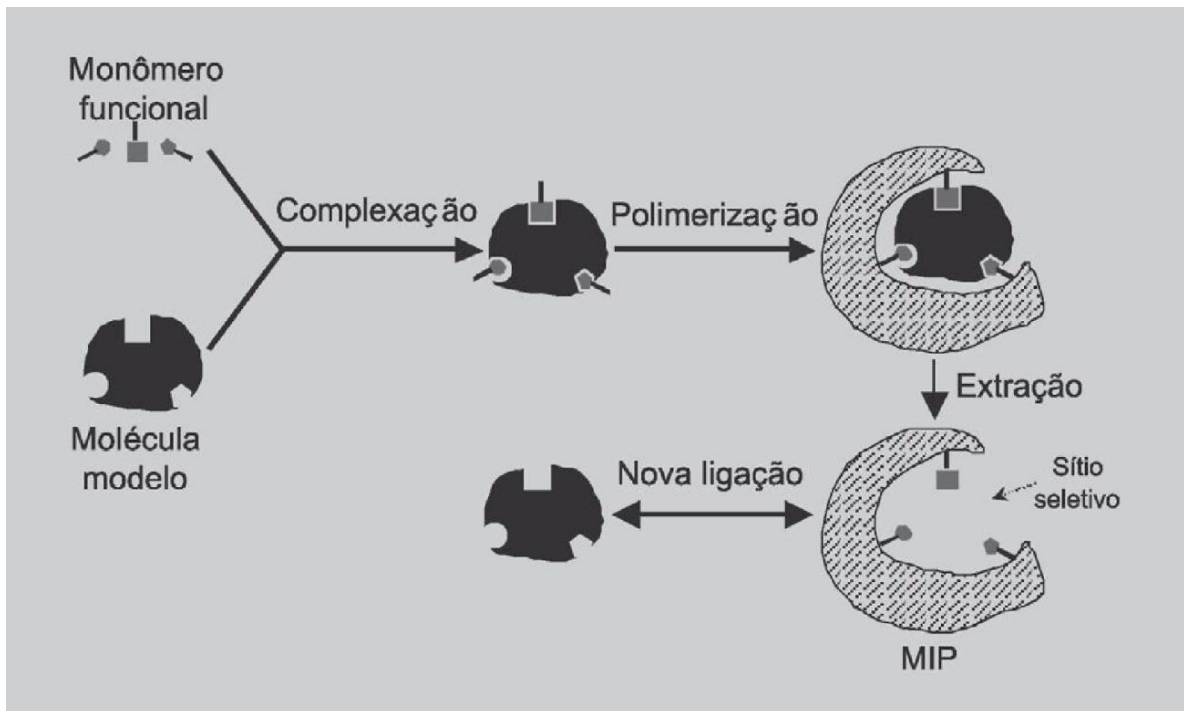


Figura 1 - Esquema geral de síntese de MIP.
Fonte: FIGUEIREDO, DIAS, ARRUDA (2008).

Os MIP's tem sido aplicados para a separação de isômeros e enantiômeros, (WU et al.;2009) como sensores bioquímicos (PRASAD et.al, 2009) e para a análise de fármaco (FIGUEIREDO et al.; 2011). São mais utilizados na extração em fase sólida (SPE), para o tratamento de amostras ambientais, de alimentos e para amostras biológicas diversas, como plasma, saliva e urina (FIGUEIREDO et al.; 2012). Além disso, a utilização destes polímeros como fase estacionária na cromatografia líquida foi descrita e o emprego do MIP na liberação controlada de fármacos também foi utilizados (SELLERGREN ; LANZA, 2003; RUELA et.al. 2014)

2.7 MATERIAIS DE ACESSO RESTRITO

A análise por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) é amplamente utilizada devido à excelente capacidade de separação, identificação e quantificação deste método. Entretanto, quando se trabalha com amostras biológicas, o pré-tratamento da amostra é muitas vezes necessário para remoção de proteínas que podem danificar a coluna cromatográfica. Nesse sentido, os Materiais de Acesso

Restrito tem sido amplamente utilizados por serem capazes de extrair os analitos de baixo peso molecular eliminando simultaneamente macromoléculas indesejadas (XU et al.; 2010).

O termo “Materiais de Acesso Restrito” (RAMs) foi proposto pela primeira vez por Desilets et al., em 1991, em referência a um sorvente especificamente desenhado para permitir a extração em fase sólida de pequenas moléculas limitando assim o acesso de moléculas maiores, como as proteínas (GONZALO et.al, 2010).

As moléculas pequenas são retidas no interior dos poros, enquanto que as maiores são eluidas com o solvente. A eliminação das macromoléculas na camada externa pode ocorrer por um processo físico, devido à barreira criada pelo menor diâmetro dos poros, por um processo químico, pela interação das macromoléculas com grupos hidrofóbicos presentes na camada externa ou pela combinação de ambos (CHAVES et al.; 2011).

A Figura 2 mostra um RAM (com exclusão por barreira física) denominado de suporte de alquildiol sílica - ADS (A) e um RAM (com exclusão por barreira química) denominado de superfície coberta por proteína - PCS (B).

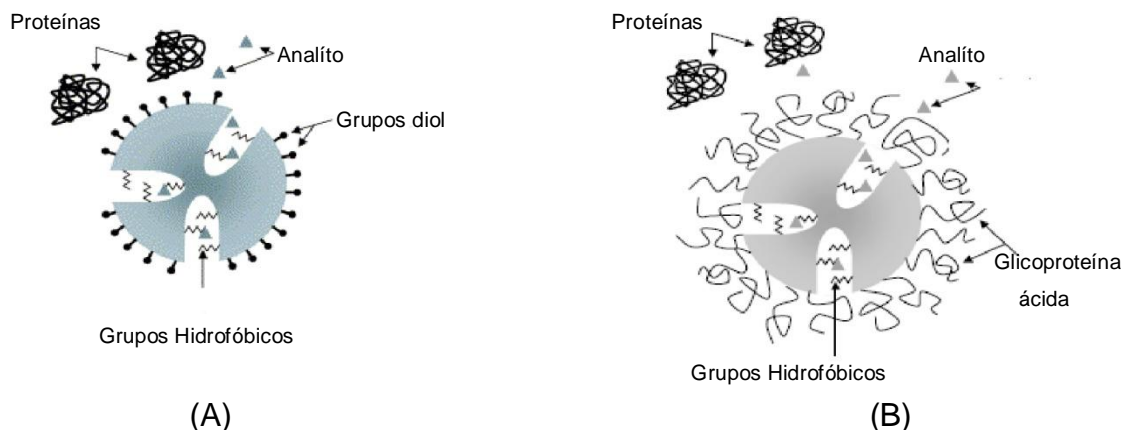


Figura 2 - Esquema de um RAM com mecanismo de exclusão por barreira física (A) e química (B).

Fonte: FIGUEIREDO, DIAS, ARRUDA (2008).

Devido à sua alta capacidade de eliminar as proteínas, os RAMs são frequentemente utilizados como pré-coluna no sistema de comutação, permitindo a

injeção direta da amostra no HPLC (MARAZUELA e BOGIALLI, 2009).

Eles são usados na análise de amostras biológicas, principalmente plasma, urina e leite (OLIVEIRA ; CASS, 2006).

As fases do tipo RAM-BSA (material de acesso restrito revestido com albumina sérica bovina) têm se destacado quanto à capacidade de exclusão das proteínas de matrizes complexas e de retenção de uma série de fármacos ácidos, básicos e neutros. A BSA é suficientemente hidrofílica e, através de interações repulsivas, exclui com eficiência as proteínas do plasma sem perda dos analitos de interesse (CASSIANO et.al, 2006).

Moraes et al. (2013) foi propuseram um conceito de RAM-MIP denominado polímeros de impressão molecular restritos á ligação de macromoléculas por meio de revestimento com albumina (RAM-MIP-BSA). Trata-se de um RAM-MIP revestido com albumina sérica bovina (BSA) e foi empregado com sucesso na extração direta de compostos fenotiazínicos em plasma humano.

2.8 POLÍMEROS DE IMPRESSÃO MOLECULAR RESTRITOS À LIGAÇÃO COM MACROMOLÉCULAS (RAM – MIP)

A tecnologia de impressão molecular tem atraído atenção devido ao seu alto potencial de seletividade. Entretanto, componentes presentes nas amostras, como proteínas e lipídeos, são fortemente adsorvidos nas superfícies poliméricas interferindo negativamente nas propriedades de reconhecimento. (CHAVES et.al, 2011)

Por outro lado, os RAMs apresentam uma excelente capacidade de eliminar macromoléculas presentes nas amostras, mas em contrapartida, não apresentam seletividade quando se avalia moléculas de baixo peso molecular. (KOEBER et.al, 2001)

Neste contexto, um material que associa as vantagens de ambos os métodos tem sido proposto. São os chamados RAM-MIPs, onde os polímeros são sintetizados pelos métodos tradicionais e posteriormente revestidos com uma camada hidrofílica que elimina as macromoléculas das amostras.

A Figura 3 apresenta um esquema genérico da síntese de um RAM- MIP.

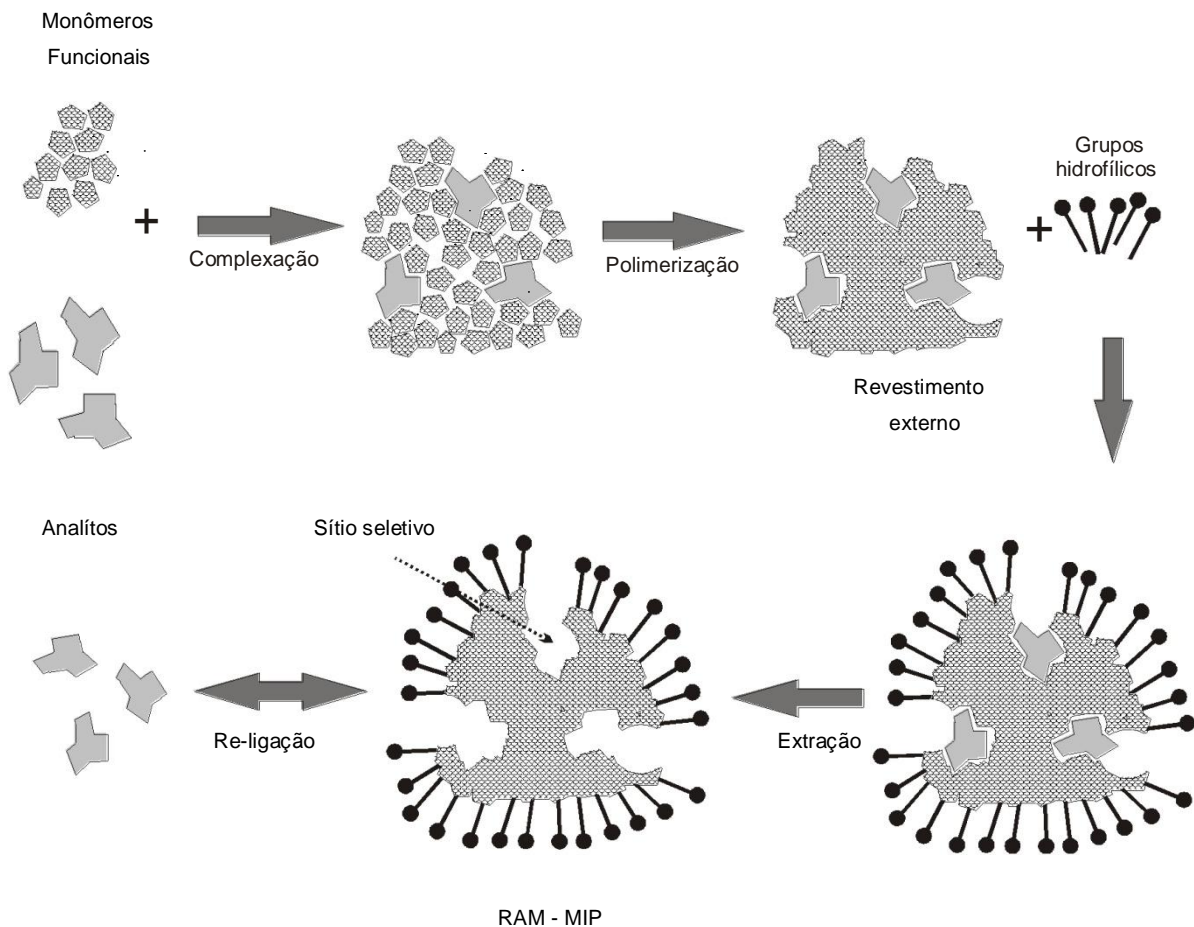


Figura 3 - Esquema da síntese de um RAM – MIP
 Fonte: FIGUEIREDO, DIAS, ARRUDA (2008).

Esses materiais têm sido utilizados na extração sequencial de diversas amostras sendo que normalmente não há modificação no desempenho da mesma. (KOEBER et.al, 2001).

Poucos trabalhos relatam a utilização dos RAM-MIPs devido à precocidade deste método. O principal emprego destes polímeros tem sido no preparo de amostra para análise por cromatografia líquida. Haginaka e Sanbe (2000) empregaram este material na análise de β -bloqueadores, ibuprofeno e naproxeno em amostras de soro e na análise de triazinas em água. Xu et al.,(2010), testaram o uso do RAM-MIP para análise de sulfonamidas em leite. Figueiredo et al.,(2007) utilizaram polímeros na extração em fase sólida para determinação de catecol e também usou MIP para separação de clorpromazina na urina Figueiredo et al.,(2010).

Além disso, Puoci et al.,(2009), testaram as propriedades destes polímeros em sistemas de liberação controlada de fármacos. Nos trabalhos que utilizaram os

RAM-MIPs no preparo de amostras, os autores relataram que estes materiais são eficientes na extração seletiva dos analitos, bem como na eliminação de macromoléculas incompatíveis com a maioria das técnicas de análise.

2.9 EXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA

A determinação de fármacos em amostras biológicas, principalmente no plasma de pacientes, coletadas com base no contexto clínico e nos princípios da farmacocinética, tem sido um procedimento usual na área clínica, para assegurar a eficácia terapêutica e minimizar os efeitos adversos (sintomas de toxicidade) dos fármacos prescritos (QUEIROZ, 2005).

O pré-tratamento de amostras biológicas, que abrange as etapas de extração, pré-concentração e purificação, tem sido requerido nas análises cromatográficas de fármacos, para eliminar interferentes (compostos endógenos ou outros fármacos administrados concomitantemente com os analitos) e aumentar a sensibilidade e seletividade analítica (GENTILI, et al., 2004)

Um dos métodos convencionais, empregados em análises de rotina no tratamento de amostras biológicas, é a extração em fase sólida (SPE).

A SPE foi introduzida no início dos anos 70 e passou a estar disponível comercialmente em 1978, na forma de cartuchos descartáveis. É uma técnica de separação líquido-sólido baseada nos mecanismos de separação da cromatografia líquida de baixa pressão e é usualmente empregada com o propósito de isolar analitos presentes em uma matriz complexa (CALDAS et al., 2011).

As etapas envolvidas na SPE estão ilustradas na Figura 4.

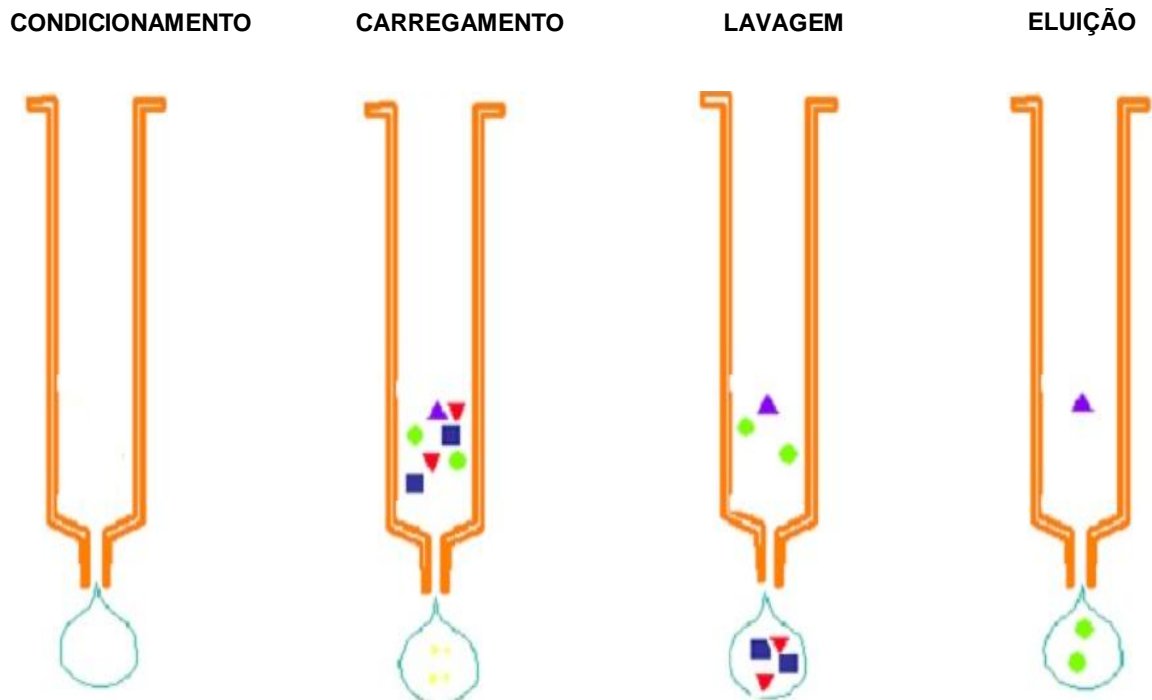


Figura 4 - Etapas envolvidas na SPE: condicionamento do sorvente, adição da amostra, remoção dos interferentes e eluição do analito.

Fonte: CALDAS et.al (2011)

A instrumentação básica empregada em SPE é extremamente simples, podendo, porém, ser sofisticada, dependendo do problema a ser resolvido e do grau de automação desejado (LANÇAS, 2004).

A etapa de condicionamento do cartucho destina-se a ativar o sorvente, e o solvente a ser utilizado nessa etapa dependerá principalmente do material a ser ativado. O condicionamento pode servir também para eluir alguma impureza presente no cartucho (FRITZ ; MACKA, 2000). A concentração dos analitos tem como objetivo principal reter o analito no sorvente através da passagem de grande volume de amostra, deixando passar os interferentes. A velocidade de aplicação da amostra é importante e pode ser ajustada, controlando-se o vácuo ou a pressão aplicada no processo. A etapa de limpeza (*clean up*) é fundamental para eliminar compostos provenientes da matriz, que podem interferir no método analítico. Podem-se utilizar solventes com força de eluição intermediária para eluição de impurezas antes do analito de interesse ser eluído. Esses solventes são denominados “solventes de lavagem” e são utilizados solventes que não possuam força suficiente para remover do sorvente o analito de interesse. Diversos solventes

de lavagem podem ser usados, mas quando se trata da extração de fármacos em amostras biológicas, usa-se principalmente água ultrapura (SILVA, 2010; GATIDOU, 2005; IBANEZ, 2005) ou uma mistura de uma pequena porcentagem de metanol com água ultrapura (D'ARCHIVIO et.al, 2007).

Uma vez que os analitos são retidos nos cartuchos são, então, eluídos com um pequeno volume de solvente adequado para a análise. É importante a escolha do eluente, pois ele deve eluir os analitos e minimizar a eluição de interferentes que não tenham sido eliminados na etapa anterior, por estarem muito retidos no sorvente (LANÇAS, 2004).

A escolha do solvente de eluição é um parâmetro importante e está diretamente relacionada com a polaridade do composto e o sorvente usado na SPE. A escolha do tipo e quantidade de sorvente, volume de amostra e de solvente para ativação dos cartuchos e para a eluição dos analitos são alguns parâmetros que devem ser considerados (CALDAS et al., 2011).

Na escolha do sorvente, deve-se levar em conta as informações a respeito dos analitos de interesse, a natureza da matriz e das impurezas a serem eliminadas (LANÇAS, 2004).

Segundo Tarley et.al, (2005) o emprego de MIP como material adsorvente na técnica de extração em fase sólida (SPE) vem se destacando, pois oferece alto grau de seletividade e estabilidade química e térmica quando comparados a outros materiais, como a sílica modificada (C18), resinas de troca iônica e imunosorventes, além de reprodutibilidade no preparo do polímero. A técnica recebe a designação de extração em fase sólida com impressão molecular (*Molecular Imprinting Solid-Phase Extraction, MISPE*).

Além das propriedades da SPE, a MISPE acrescenta um aumento na seletividade na extração do analito de interesse frente a outros compostos presentes na amostra, devido ao efeito de impressão molecular, além de reduzir os efeitos dos interferentes da matriz e eliminar a fase de preparo de amostra (PEÇANHA et al, 2013).

Sendo assim, dado o grande número de indivíduos em utilização dos BDZ, principalmente em populações especiais, como idosos ou até mesmo indivíduos com polimorfismo no CYP, se faz necessária a monitorização terapêutica, para individualização da dose e sucesso terapêutico. A utilização da extração em fase sólida associada ao RAM-MIP-BSA pode ser aplicada neste contexto, desde que um

preparo refinado e específico, possa ser associado à análise simples, em HPLC com detecção por ultravioleta e ser utilizado na monitorização por diversos laboratórios, para uma classe terapêutica, ao invés de analisar um só fármaco.

3 OBJETIVOS

Os objetivos dessa dissertação são:

3.1 OBJETIVOS GERAIS

- Sintetizar e caracterizar um polímero de impressão molecular restrito a ligação com macromoléculas e revestido com albumina para utilização em monitorização terapêutica de pacientes em terapia farmacológica com benzodiazepínicos.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Sintetizar RAM-MIP para um grupo terapêutico (benzodiazepínicos).
- Investigar seu potencial de eliminação de macromoléculas.
- Aperfeiçoar as condições experimentais para a extração do fármaco.
- Validar a metodologia de acordo com as recomendações da ANVISA.
- Aplicar o RAM-MIP desenvolvido à amostras reais de pacientes em acompanhamento na Farmácia-Escola e na Liga de Farmacologia da UNIFAL-MG

4. MATERIAIS E MÉTODOS

Segue abaixo a descrição dos materiais e métodos utilizados nessa dissertação.

4.1 CASUÍSTICA

Foram investigados 18 pacientes em seguimento farmacoterpêutico na Farmácia-Escola e na Liga de Farmacologia da UNIFAL-MG (Alfenas, MG), que já utilizavam benzodiazepínicos. Os critérios de inclusão dos pacientes são: maiores de 18 anos admitidos no projeto: Intervenção Farmacêutica em Pacientes Usuários de Benzodiazepínicos, já aprovado sob o número 226/2011 da Farmácia -Escola da UNIFAL- MG (Alfenas, MG); e pacientes assistidos pela Liga e que assinassem o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) (ANEXO I).

As características dos pacientes em estudo encontram-se descritas na Tabela 1 e os fármacos associados aos tratamentos dos pacientes estão na Tabela 2.

Tabela 1 - Características dos pacientes participantes do protocolo de estudo. Os valores representados correspondem à média. (n=18)

Fonte: O autor

Grupo de estudo	
Idade (anos)	61,33
Gênero (Homem: Mulher)	3:15
IMC (kg/m²)	21,52

Tabela 2 - Dados referentes a gênero, dose diária, medicamentos associados e patologias dos pacientes participantes do protocolo de estudo.

Fonte: O autor

PACIENTE/ IDADE (anos)	GÊNERO	BDZ/DOSE DIÁRIA	MEDICAMENTOS ASSOCIADOS	PATOLOGIAS
P1 / 31	M	Clonazepam 2 mg	Ácido valpróico, sertralina, carbamazepina	Transtorno bipolar
P2 / 68	M	Clonazepam 2,5mg/mL (10 gotas/dia)	Mirtazapina, metformina, sinvastatina, glibenclamida, losartan, hidroclorotiazida, omeprazol	Diabetes, hipertensão
P3 / 74	M	Clonazepam 2mg	Fluoxetina, atenolol, fenitoína	Depressão, hipertensão
P4 / 74	F	Lorazepam 2mg	Losartan, venlafaxina	Hipertensão
P5 / 58	F	Lorazepam 2mg	Atenolol, levotiroxina, citalopram	Hipertensão, hipotireoidismo, depressão
P6 / 68	F	Lorazepam 1 mg	Clorpromazina, sulpirida, venlafaxina	Depressão
P7 / 73	F	Lorazepam 2mg	Atenolol, losartan, clonidina, omeprazol, metformina, glibenclamida, sinvastatina, nortriptilina, citalopram	Diabetes, hipertensão, artrite e artrose
P8 / 74	F	Clonazepam 2mg	Omeprazol, fluoxetina, propranolol, furosemida	Hipertensão

P9 / 55	F	Clonazepam 2mg	Varfarina, fluoxetina	
P10 / 53	F	Clonazepam 2mg	Fenobarbital, ácido valpróico, sertralina, omeprazol	Epilepsia, depressão
P11 / 66	F	Clonazepam 2mg	Rivaroxabano, clopidogrel, ácido acetilsalicílico, venlafaxina	Depressão, problemas vasculares
P12 / 40	F	Clonazepam 0,5mg	Amitriptilina	
P13 / 69	F	Clonazepam 2,5mg/mL (8 gotas/dia)	Hidroclorotiazida, anlodipino, metformina,omeprazol	Diabetes, hipertensão
P14 / 54	F	Clonazepam 2mg	Fluoxetina, acitrelina, omeprazol	Psoríase
P15 / 75	F	Clonazepam 2mg	Losartan, hidroclorotiazida, sinvastatina, metformina, venlafaxina, omeprazol	Hipertensão, depressão, diabetes,hipercolesterolemia
P16 / 33	F	Clonazepam 2mg	Sertralina, omeprazol	Depressão
P17 / 71	F	Diazepam 5mg	Hidroclorotiazida, losartan, glibenclamida, nifedipino, metformina, fenobarbital, propranolol	Diabetes, hipertensão
P18 / 74	F	Diazepam 10mg	Deflazacort, citalopram, losartan, hidroclorotiazida, ranitidina	Depressão, reumatismo, hipertensão

4.2 PROTOCOLO CLÍNICO

O estudo foi submetido à Comissão de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Alfenas e após submissão ao sistema CEP-CONEP na plataforma Brasil. Após a obtenção, por escrito, do Consentimento Livre e Esclarecido (ANEXO I), foi realizada a colheita de uma amostra de sangue de cada paciente para análise das concentrações plasmáticas dos fármacos em questão. Foi coletada apenas uma amostra de sangue, aproximadamente 5 mL, de uma veia periférica com seringa heparinizada. Não foi necessário jejum para esta colheita, sendo as amostras colhidas antes da próxima dose a ser utilizada pelo paciente (vale). O sangue foi centrifugado para separação do plasma e foi armazenado protegido da luz no ultrafreezer (-78°C) até o momento da análise. Ressalta-se que este processo foi submetido à análise do Comitê de Ética em pesquisa, (registro CAAE 10364512.9.0000.5142) através da Plataforma Brasil em 05/11/2012 e aprovado segundo parecer de número 538.472. (ANEXO II)

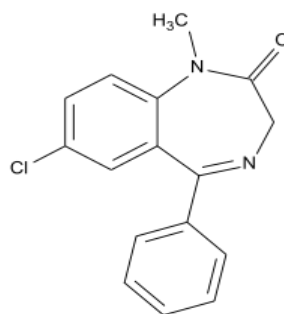
4.3 REAGENTES E EQUIPAMENTOS

- Padrões: diazepam (teor 99,2%), clonazepam (teor 99,8%), lorazepam (teor 99,3%), e bromazepam (teor 99,7%) - Sigma-Aldrich® (Steinheim, Alemanha).
- Soluções estoque contendo os padrões diazepam, clonazepam, e lorazepam na concentração de 1 mg/mL foi preparada em metanol e armazenada em frasco âmbar sob refrigeração e empregadas para o preparo das soluções padrão da curva analítica nas concentrações de 10, 50, 100, 200, 400 e 800 ng/mL
- Bromazepam - utilizado como padrão interno (PI) na concentração de 400 ng/mL em metanol e também armazenado nas mesmas condições citadas acima.
- Metanol e acetonitrila (grau HPLC) e ácido clorídrico e hidróxido de sódio - Vetec® (Rio de Janeiro, Brasil).

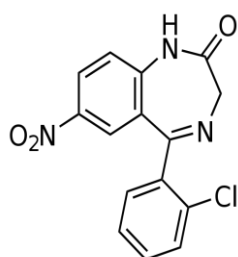
- Ácido metacrílico, etileno glicol dimetacrilato, 2,2'-azo-bis-iso-butironitrila, 2-hidroxietil metacrilato e glicerol dimetacrilato – utilizados na síntese dos polímeros –Sigma-Aldrich[®] (Steinheim, Alemanha).
- Água ultra-pura obtida através de um sistema de purificação Milli-Q[®] (Millipore[®], Bedford, MA, USA), resistividade de 18,2 MΩcm.
- Albumina de soro bovino (BSA), BD[®] (Becton, Dickinson and Company Sparks, USA).
- Glutaraldeído 25% e borohidreto de sódio 98% - Vetec[®] (Rio de Janeiro, Brasil).
- Balança analítica Kern[®] (Balingen, Alemanha).
- Banho de ultrassom Unique[®] (Indaiatuba, Brasil)
- pHmetro Tecnopon[®] (Piracicaba, Brasil)
- Agitador magnético com aquecimento Novatecnica[®] (Piracicaba, Brasil).
- Cromatógrafo líquido Shimadzu[®] (Tóquio, Japão) com bomba LC-AT VP e injetor automático SIL 10 AF, acoplado a detector de arranjo de diodos SPD-M10A VP (HPLC-DAD)
- Coluna analítica Analítica[®] C8 (150mm x 4,60mm x 5µm)
- Cartucho vazio de SPE
- Sistema à vácuo do tipo Manifold PrepSep Fisher[®] (Bedford, MA, USA).

4.4 SÍNTESE DO RAM – MIP

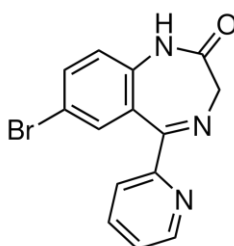
O diazepam foi escolhido como molécula modelo por manter similaridade estrutural com os medicamentos a serem analisados, utilizados pelos pacientes incluídos. (FIGURA 5)



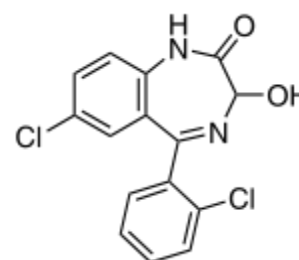
Diazepam



Clonazepam



Bromazepam



Lorazepam

Figura 5 - Estrutura química das moléculas de benzodiazepínicos.
 Fonte: GOODMAN et al., (2010).

O RAM-MIP foi sintetizado pelo método de polimerização por precipitação (FIGURA 6) que consiste de duas etapas. Num primeiro momento, 2 mmol de diazepam (molécula-modelo) foi dissolvido aos poucos em 30 mL de clorofórmio com o auxílio de um bastão de vidro em um béquer de 100 mL. Em seguida, foram adicionados 8 mmol de ácido metacrílico (MAA) como monômero funcional, 1,5mmol de 2,2'-azo-bis-iso-butironitrila (AIBN) como iniciador radicalar e 20 mmol de etileno glicol dimetacrilato (EGDMA) como agente de ligação cruzada. Transferiu-se a mistura para um balão de três saídas, que foi então colocado em ultrassom por 10 minutos e, posteriormente, mantido sob fluxo de nitrogênio por 20 minutos, para que fosse criada uma atmosfera livre de oxigênio. Este sistema foi colocado em banho de glicerina a 60°C sob refluxo por 1 hora.

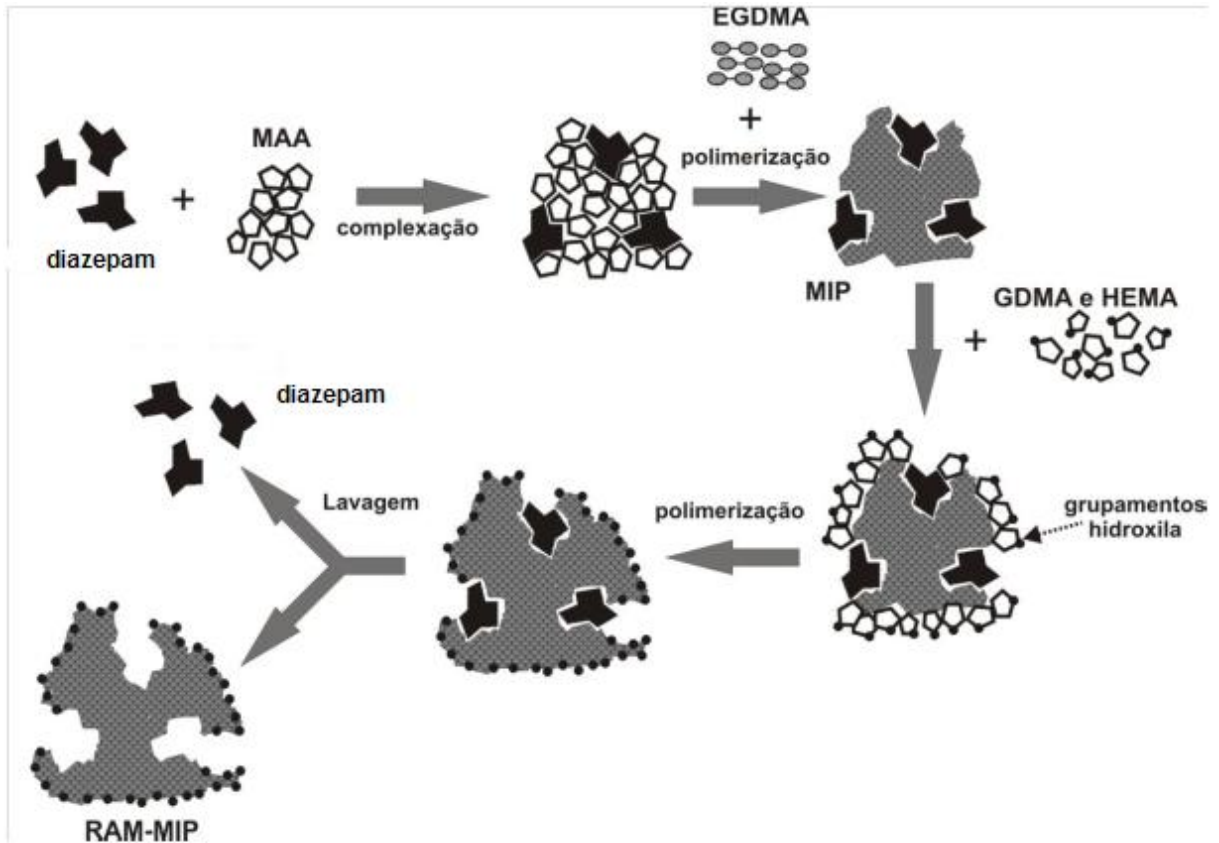


Figura 6 - Esquema de síntese do RAM-MIP.
Fonte: FIGUEIREDO, et al. (2007).

Numa segunda etapa, 15 mmol de 2-hidroxietil metacrilato (HEMA) e 1,0 mmol de glicerol dimetacrilato (GDMA) foram solubilizados em 50 mL de clorofórmio em um béquer de 100 mL. Esta mistura foi colocada sob fluxo de nitrogênio por 20 minutos e transferida para o balão de síntese ao final da primeira etapa (após uma hora). O sistema foi mantido a 60 °C sob refluxo por mais 23 horas.

O polímero resultante foi lavado em funil de Büchner com metanol (cinco alíquotas de 100 mL) para a retirada dos resíduos de síntese. O material foi seco em estufa a 45 °C por 24 horas. Depois de seco, o polímero foi tamisado e foram selecionadas partículas menores que 106 µm e maiores que 75 µm.

Além do RAM-MIP, foi sintetizado um MIP no mesmo modelo de síntese, exceto pela ausência da segunda etapa. Os dois polímeros foram comparados em termos de adsorção. Foram sintetizadas também versões não impressas (NIP) dos polímeros (RAM-NIP e NIP), da mesma forma que os polímeros impressos, porém sem a molécula-modelo.

Antes de serem utilizados como sorvente, tanto o RAM-MIP quanto o MIP passaram por lavagem com 200 mL de solução de etanol e ácido acético (9:1 v/v) e 200 mL de água, realizada no próprio sistema de extração.

Para melhorar a capacidade de eliminação de macromoléculas, o RAM-MIP foi recoberto com BSA. O mesmo foi colocado em um cartucho vazio de SPE e acoplado ao *Manifold*. A reação ocorreu percolando-se inicialmente 20 mL de uma solução BSA 1% (m/v) preparada em tampão fosfato 0,05 mol/L com pH 6,0, a uma vazão de 1 mL/min. Em seguida, adicionou 5 mL de glutaraldeído 25% (v/v) deixando o cartucho em repouso por 5 horas a temperatura ambiente e depois o líquido foi percolado. Finalmente, 10 mL de borohidreto de sódio 1% (m/v) foram percolados pelo cartucho no intuito de eliminar qualquer futura possibilidade de ligação.

O polímero de impressão molecular restrito à ligação de macromoléculas por superfície recoberta com albumina (RAM-MIP-BSA) foi então lavado com água em abundância para a retirada de resíduos da etapa de recobrimento e armazenado em frasco âmbar com água sob refrigeração.

4.5 CARACTERIZAÇÃO DOS POLÍMEROS

O polímero sintetizado foi caracterizado antes e após o revestimento com BSA, através de microscopia eletrônica de varredura (MEV) após metalização com uma camada de 10 nm de ouro. As análises foram executadas em voltagem de 15 keV.

A espectroscopia de absorção do infravermelho com transformada de Fourier foi empregada para comparar os grupos funcionais presentes nos polímeros. Esta determinação foi possível devido à presença de ligações covalentes que absorvem várias frequências de radiação eletromagnética na região do infravermelho no espectro eletromagnético.

4.6 CAPACIDADE DE ELIMINAÇÃO DE PROTEÍNAS

Os polímeros foram estudados quanto às suas capacidades de eliminar macromoléculas. Esse estudo foi conduzido injetando-se inicialmente 25 μL de um padrão aquoso de BSA de 44 mg mL^{-1} (mesma concentração de albumina encontrada no plasma humano) em um cromatógrafo sem a presença de nenhuma coluna, e operando com detector UV a 245 nm e com água deionizada como fase móvel (FIGURA 7A). O pico obtido corresponde a 100% de BSA, ou seja, toda BSA injetada foi direcionada ao detector.

Para preparo da coluna, os polímeros obtidos (RAM-MIP; RAM-NIP; RAM-MIP-BSA e RAM-NIP-BSA) foram acondicionados em uma pré-coluna de aço inoxidável, pelo método “slurry” de empacotamento, utilizando partículas em suspensão utilizando água como solvente (SILVA, 2012). A coluna empregada teve o protetor da entrada do fluxo retirado, fazendo com que as partículas de polímero depositassem-se do final para o início da coluna (no sentido do fluxo). A suspensão empregada foi preparada adicionando 100 mg de polímero em 5 mL de água. As colunas foram então avaliadas quanto às suas capacidades de eliminar macromoléculas.

Para isso, as colunas foram colocadas no percurso analítico (FIGURA 7B) e 25 μL do mesmo padrão aquoso de BSA de 44 mg/mL foi injetado. A solução de BSA fluiu através do polímero empacotado e o pico obtido foi empregado para se avaliar o percentual de BSA eluído de cada polímero por meio de comparação com o pico correspondente a 100% de eluição.

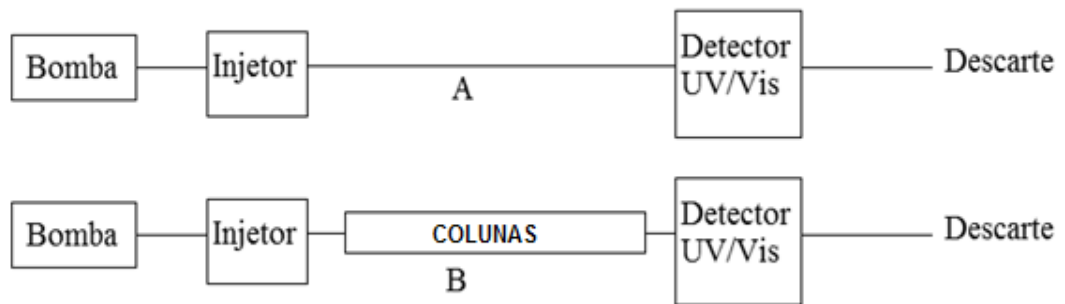


Figura 7- Esquema utilizado por Moraes (2012) para teste de eliminação de BSA nos polímeros sintetizados. O detector foi ajustado para 245 nm.

4.7 EXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA

Após testes de otimização das condições de extração, 40 mg de RAM-MIP-BSA foram pesados e acondicionados em um cartucho vazio próprio para a extração em fase sólida. Este cartucho foi acoplado a um sistema a vácuo do tipo *Manifold* e utilizado para o processamento das amostras.

O condicionamento do cartucho contendo o polímero foi realizado com 2 mL de metanol seguidos de 2 mL de água. A amostra constituída de 1 mL de plasma humano, adicionado de 50 μ L de solução de padrão interno (bromazepam, 400ng/mL) foi percolada e na sequência ocorreu a lavagem do cartucho com 4 mL de água e finalizou-se o procedimento com a eluição de 1 mL de metanol e a injeção cromatográfica. O fluxograma do processo encontra-se representado na Figura 8.

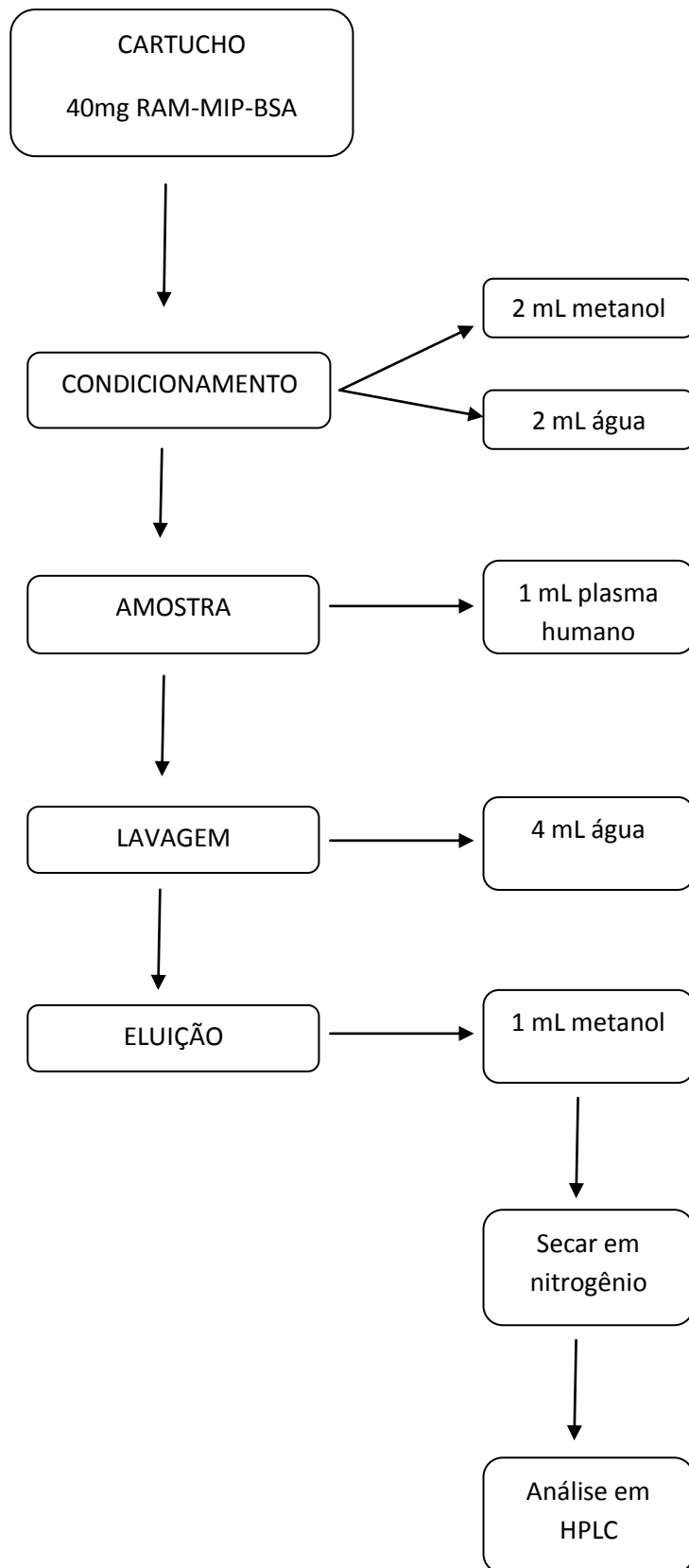


Figura 8- Fluxograma das etapas da extração da amostra e injeção em HPLC.

Fonte: O autor

4.8 CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS PARA ANÁLISE DE BENZODIAZEPÍNICOS

Após a otimização final do processo cromatográfico, a fase móvel mais adequada foi composta de tampão fosfato 0,01M pH 3,0 e acetonitrila grau HPLC (65:35, v/v) com fluxo de 1 mL/min e comprimento de onda 220 nm. Empregou-se coluna analítica Analítica® C8 (150 mm x 4,60 mm x 5µm) com temperatura do forno a 25°C. O volume de injeção foi de 200 µL e o tempo total de análise cromatográfica foi de 20 minutos.

4.9 VALIDAÇÃO DOS MÉTODOS BIOANALÍTICOS

Com a finalidade de demonstrar que o método desenvolvido é adequado para a análise proposta foi realizada a validação analítica. Os métodos foram validados de acordo com a resolução RDC N.º 27, de 17 de maio de 2012 e os parâmetros analíticos avaliados foram: linearidade, limite inferior de quantificação (LIQ), efeito residual, precisão, exatidão e estabilidade.

4.9.1 Linearidade

Na confecção da curva analítica, adicionou-se 50 µL de padrão de clonazepam, diazepam e lorazepam a 1 mL de plasma branco em seis concentrações distintas (10, 50, 100, 200, 400 e 800 ng/mL) e 50 µL PI na concentração de 400 ng/mL. Processou-se a amostra através da SPE com cartucho preenchido por RAM-MIP-BSA e o eluato foi levado à secura sob fluxo de nitrogênio e aquecimento (35°C), ressuspensas em 500 µL de fase móvel para posterior injeção no HPLC/ UV.

Na análise da curva analítica, também foram incluídas amostras de plasma branco e plasma branco adicionadas de PI (amostra zero).

4.9.2 Limite Inferior de Quantificação (LIQ)

O limite de quantificação foi determinado através da aplicação do método de extração desenvolvido de tal forma que o analito fosse quantificado na menor concentração possível com coeficiente de variação (CV) $\leq 20\%$. Sua determinação foi realizada por meio de 6 replicatas, considerando sua adequada visualização cromatográfica.

4.9.3 Limite de detecção (LD)

O limite de detecção é a menor quantidade de analito presente em uma amostra que pode ser detectado, porém não necessariamente quantificado, sob as condições experimentais estabelecidas (BRASIL, 2012).

Este parâmetro pode ser calculado segundo a fórmula:

Onde,

DPa = desvio padrão do intercepto com o eixo do Y da curva analítica

IC = inclinação da curva analítica

4.9.4 Efeito residual

O efeito residual (*carryover*) é o efeito causado por contaminação proveniente de análises anteriores às quais podem levar ao aparecimento ou aumento do sinal do fármaco ou PI. Para essa análise realizou-se três injeções de amostra branco,

sendo uma antes e duas após a injeção do limite superior de quantificação (LSQ) de cada analito.

4.9.5 Precisão e exatidão intra e intercorridas

A precisão avalia, em idênticas condições de ensaio, o grau de repetibilidade entre os resultados individuais de análises quando um processo é aplicado diversas vezes numa mesma amostra homogênea. A precisão intracorrida foi avaliada em um mesmo dia e a intercorridas em três dias diferentes. Este parâmetro é expresso como coeficiente de variação (CV) ou desvio padrão relativo (DPR).

$$CV (\%) = \frac{\text{Desvio padrão} \times 100}{\text{Média}}$$

Para este estudo foi realizado a injeção de amostras nas concentrações de 20 ng/mL correspondente ao controle de qualidade de baixa concentração (CQB), 320 ng/mL correspondente ao controle de qualidade de média concentração (CQM) e 600ng/mL correspondente ao controle de qualidade de alta concentração (CQA).

A exatidão representa a proximidade dos resultados obtidos pelo método em estudo em relação ao valor nominal, da mesma forma que a precisão, estabelecendo condições idênticas de ensaio, em uma amostra homogênea. A exatidão intracorridas e a exatidão intercorridas foi avaliada por meio do cálculo do Erro Padrão Relativo (EPR) conforme fórmula abaixo. A exatidão intracorrida foi avaliada em um mesmo dia e a intercorridas em três dias diferentes. Não se admite valores acima de 15 % do valor nominal, com exceção do LIQ para o qual o valor estabelecido é de 20 %.

$$\text{Exatidão (\%)} = \frac{(\text{concentração média determinada} - \text{concentração teórica}) \times 100}{\text{Concentração teórica}}$$

Para avaliação dos parâmetros precisão e exatidão, foram analisadas amostras fortificadas com padrões diazepam, clonazepam e lorazepam (n=6) em concentrações de 20, 320, 600 ng/mL plasma após passarem pelo processo de extração no cartucho de SPE.

4.9.6 Estabilidade

Para assegurar que a estabilidade do analito foi mantida nas condições de preparo, análise e estocagem das amostras, foram realizados os testes de estabilidade após ciclos de congelamento e descongelamento, estabilidade de curta duração, estabilidade das amostras processadas.

A estabilidade é demonstrada quando não se observar desvio superior a 15% (quinze por cento) da média das concentrações obtidas com relação ao valor nominal. (BRASIL, 2012).

4.9.6.1 Estabilidade após ciclos de congelamento e descongelamento

Frequentemente, as amostras do estudo são congeladas e descongeladas para re-análises. Por esse motivo, deve ser avaliada a estabilidade do analito na matriz biológica após, no mínimo, três ciclos de congelamento e descongelamento. Amostras de plasma (1 mL) fortificadas nas concentrações de 20 e 600 ng/mL (n=5, para cada concentração) foram congeladas por 24 horas. Após esse período, foram descongeladas em temperatura ambiente e novamente congeladas por 12 horas. O processo foi repetido por mais 12 horas de congelamento e após o descongelamento total das amostras, procedeu-se à extração e análise em HPLC/UV. Os resultados obtidos foram comparados com amostras recém-preparadas.

4.9.6.2 Estabilidade de curta duração

Amostras fortificadas com padrões (n=6, para cada concentração) nas concentrações de 20 e 600ng/mL foram deixadas em repouso nas condições normais do laboratório (temperatura, umidade e luminosidade) e durante o processo de preparo das amostras (3h). Em seguida, foram submetidas à extração SPE e

analisadas em HPLC/UV. Os resultados obtidos foram comparados com amostras recém-preparadas.

4.9.6.3 Estabilidade das amostras processadas

Alíquotas de plasma branco foram fortificadas com padrões (n=6, para cada concentração) nas concentrações de 20 e 600ng/mL foram processadas por SPE e mantidas sob as mesmas condições de análise das amostras em estudo. O período foi superior ao intervalo de tempo compreendido entre o término de preparo das amostras e o final da corrida analítica mais longa. Na sequência, ocorreu a análise em HPLC/UV. Os resultados obtidos foram comparados com amostras recém-preparadas.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Segue abaixo os resultados e a discussão encontrados nesse estudo.

5.1 SÍNTESE DO RAM-MIP-BSA

A síntese do RAM-MIP foi realizada pelo método de precipitação, utilizando proporções molares de 1:4:10 de molécula modelo (diazepam), monômero funcional (ácido metacrílico) e agente de ligação cruzada (EGDMA), como proposto por Moraes *et al* (2013). A adição dos monômeros hidrofílicos HEMA e GDMA sessenta minutos após o início da síntese recobriram o polímero para tornar este um material de acesso restrito (RAM), onde o molde para a classe de fármaco em questão já teria sido formada, ficando este recobrimento superficial.

O rendimento obtido foi de 4,25 g. Essa quantidade foi tamisada, sendo selecionadas partículas menores que 106 e maiores 75 μm e dividida em duas partes sendo apenas uma parte revestida por albumina.

Após esta etapa, o RAM-MIP foi dividido em porções de 500 mg em tubos de ensaios para realização de procedimento de lavagem. Foi adicionado primeiramente 10 mL de solução de etanol e ácido acético (9:1 v/v). Os tubos foram levados ao ultrassom por 1 hora. Esse processo foi realizado cinco vezes. Posteriormente, o RAM-MIP foi transferido para um cartucho de SPE acoplado a um *Manifold* e lavado com água ultrapura em abundância e analisado em HPLC até que nenhum sinal de molécula modelo fosse detectado, provando que toda a molécula molde havia sido removida e não havia resíduos de síntese. Após a lavagem completa, parte do RAM-MIP foi revestido com albumina bovina e armazenado em água sob-refrigeração.

A escolha da molécula modelo diazepam justifica-se para utilização deste material para utilização no preparo de amostras e aplicação de monitorização terapêutica de uma classe de fármacos, os benzodiazepínicos, amplamente utilizados pela população para tratamento de transtornos diversos e não somente do diazepam. Desta maneira, os processos de otimização da extração em fase sólida com o RAM-MIP-BSA bem como todo desenvolvimento e validação da análise

cromatográfica foram realizados utilizando outros fármacos desta classe: bromazepam, clonazepam e lorazepam. Pode ser percebido na Figura 5, a similaridade estrutural que os compostos supracitados possuem, permitindo a aplicação deste polímero a uma classe, e não somente a um único fármaco.

5.2 CARACTERIZAÇÃO DOS POLÍMEROS

Dois testes foram feitos para a caracterização dos polímeros, a espectroscopia de infravermelho (IV) e a microscopia de varredura (MEV).

A Figura 9 mostra os espectros de infravermelho do RAM-MIP (9A), RAM-MIP-BSA (9B) bem como do RAM-NIP (9C) e do RAM-NIP-BSA (9D), respectivamente. Como pode ser observado, os espectros foram muito semelhantes, o que demonstra que não houve diferença significativa no polímero antes e após o revestimento com BSA e nem em relação ao polímero impresso e não impresso. No entanto, os picos correspondentes às vibrações de estiramento das ligações C-O (1145 cm^{-1}) e C=O (1720 cm^{-1}) foram menores no RAM-MIP-BSA e RAM-NIP-BSA, em relação aos demais picos. Isto se deve provavelmente à obstrução dos grupos hidroxila e carbonila, presentes principalmente no HEMA e no GDMA, causada pelo revestimento com BSA.

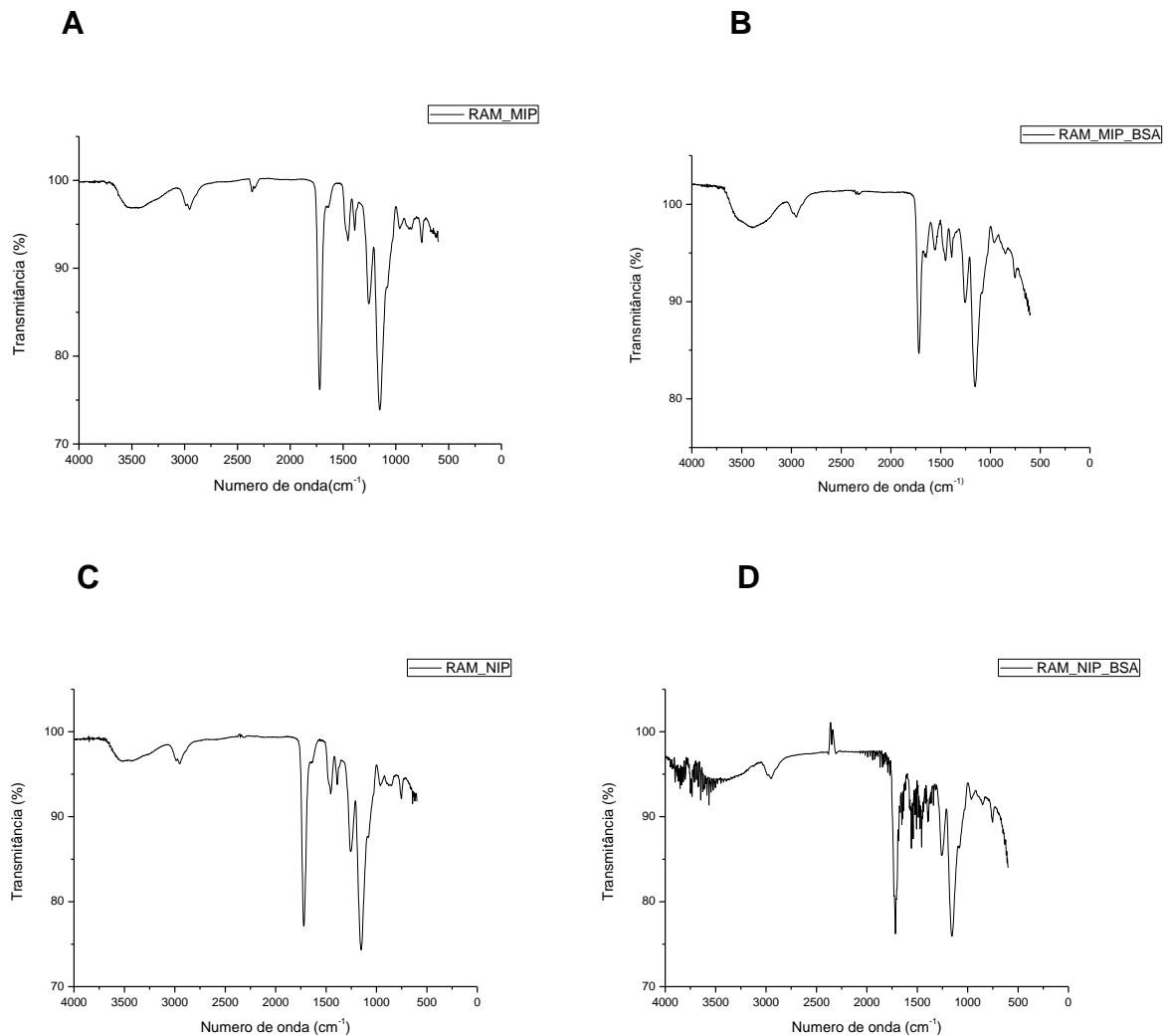


Figura 9- Espectros de infravermelho do RAM-MIP(9A), RAM-MIP-BSA (9B), RAM-NIP (9C) e RAM-NIP-BSA (9D). Fonte: O autor

A caracterização dos materiais obtidos por MEV está representada na Figura 10 onde as imagens do RAM-MIP (A) e do RAM-MIP-BSA (obtido após o revestimento com BSA) (B). É visível o aumento do tamanho das partículas, o que provavelmente pode ser explicado pela formação de uma cápsula proteica ao redor do polímero.

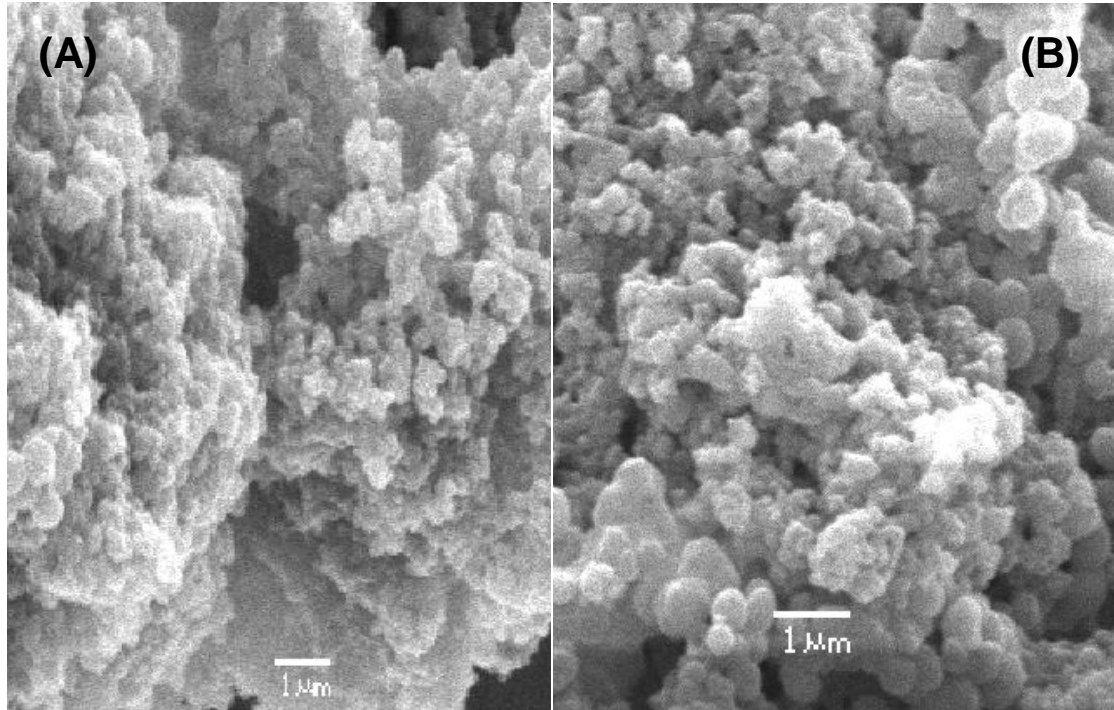


Figura 10 - Micrografia eletrônica de varredura do RAMIP (A) e do RAMIP-BSA (B).

Fonte: O autor

5.3 CAPACIDADE DE ELIMINAÇÃO DE PROTEÍNAS

Os diferentes polímeros acondicionados em pré-colunas e tendo água como fase móvel em HPLC foram avaliados quanto à capacidade de retenção de macromoléculas. A Tabela 3 apresenta a porcentagem de eliminação de proteínas obtidas após a injeção do padrão de BSA em um sistema sem coluna e no sistema com as colunas RAM-MIP e RAM-NIP revestidas ou não com BSA. Como pode ser observado, a eliminação de proteínas foi máxima para o RAM-MIP-BSA e RAM-NIP-BSA com variação dos valores dentro do erro experimental. Esses valores são ideais e asseguram que estes materiais podem ser utilizados na extração direta de fármacos em fluidos biológicos e mostram que apesar do revestimento com monômeros hidrofílicos em teoria ter o efeito de eliminação de macromoléculas, somente revestimento posterior com BSA atinge o efeito desejado.

Tabela 3 - Eliminação de proteínas dos polímeros.

Fonte: O autor

% Polímero	RAM-MIP	RAM-MIP-BSA	RAM-NIP	RAM-NIP-BSA
% Eliminação das proteínas	25,22	101,28	38,97	105,92

5.4 EXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA

As principais técnicas usadas na preparação de amostras biológicas para a análise cromatográfica de fármacos são a extração líquido-líquido (LLE) e a extração em fase sólida (SPE).

O uso dos polímeros impressos molecularmente na extração em fase sólida requer as mesmas etapas do método tradicional de SPE, ou seja, o condicionamento, carregamento da amostra, lavagem e eluição dos analitos (FREITAS et al., 2009).

O condicionamento do polímero é necessário, pois a exposição do MIP seco aos solventes polares provoca aumento substancial de seu volume. Este efeito provavelmente é devido à solvatação de grupos funcionais insaturados, localizados nas cavidades seletivas do material. A expansão prévia do polímero contribui para tornar a estrutura menos compactada, com poros maiores e mais acessíveis que aumentam a capacidade de carregamento do material, além disso, esse condicionamento é uma etapa importante para preparar os sítios seletivos para a ligação com o analito (FRANQUI et al., 2012).

Alguns parâmetros foram testados para otimizar a extração dos benzodiazepínicos em RAM-MIP-BSA.

Com base nos estudos de Freitas et al., (2009), iniciou-se o condicionamento com 1 mL de metanol seguido 1 mL de água, que é um dos mais simples utilizados

em SPE. Como um mesmo cartucho era utilizado para todas as análises, percebeu-se que a fase inicial de condicionamento servia como etapa de lavagem de uma última extração. Desta maneira, modificou-se o condicionamento para 2 mL de metanol seguidos de 2 mL de água sendo essa a quantidade a apresentar melhores resultados, não apresentando efeitos residuais (*carryover*).

Para o processo de lavagem, posterior ao carregamento da amostra (1mL), iniciou-se com 1 mL de água após a passagem da amostra. Foi observado que essa quantidade não era suficiente para a total remoção do plasma deixando o eluato viscoso e incompatível com injeção em sistema cromatográfico. Foram então testados novos volumes de água para a lavagem: 2 mL, 3 mL e 4 mL. O último volume foi o que apresentou eluato compatível com injeção no sistema. Também foi testado um tampão fosfato 0,01M pH=7,4 para a lavagem do cartucho, mas ele não apresentou nenhum benefício em relação à água.

Um estudo realizado por Freitas et. al.,(2005) comparou métodos de extração líquido-líquido (ELL) e em fase sólida no pré-tratamento de amostras biológicas contendo BDZ e concluíram que ambas as técnicas são aplicáveis na determinação desses fármacos, entretanto a SPE ocorreu com maior segurança e menor gasto de solvente.

Outro parâmetro avaliado foi a quantidade (em gramas) de RAM-MIP-BSA ideal para uma melhor extração. Os dados se encontram na Tabela 4.

Tabela 4 - Resposta dos analitos em função da quantidade de RAM-MIP-BSA na extração em fase sólida.

Fonte: O autor

Área do Pico	Massa RAM-MIP-BSA (mg)		
	20	40	50
Bromazepam	13106	25166	37968
Lorazepam	15060	21754	32341
Clonazepam	16148	22641	33362
Diazepam	39128	59383	67307

Como se observa na tabela acima, o cartucho preenchido com 50 mg de RAM-MIP-BSA apresentou a maior resposta para todos os analitos, porém não

possuía difusibilidade adequada. Desta maneira, optou-se por utilizar cartucho preenchido com 40mg de adsorvente.

Vários estudos têm utilizado a SPE como preparo de amostras, mas em sua maioria utilizam técnicas como a detecção por espectrometria de massas. Kukoshi et.al., (2012) defendem que a extração em fase sólida e a cromatografia líquida acoplada a detecção por espectrometria de massa são técnicas de valor inestimável para a determinação de benzodiazepínicos em matrizes biológicas. A razão para a utilização de espectrometria de massa é diminuir os limites de detecção sem necessidade de derivatização química que seria aplicada na cromatografia gasosa. Uddin et. al., (2008) desenvolveram metodologia para determinação de BDZ e antidepressivos tricíclicos em fluidos biológicos utilizando SPE para o preparo de amostra com as mesmas condições de condicionamento do cartucho que foram utilizadas nesta dissertação, porém como foi usada a SPE comum, foi necessário realizar a precipitação de proteínas, fato que não ocorreu no presente trabalho, uma vez que o revestimento do MIP com BSA tem a função de eliminar as proteínas presentes na amostra através da interação dos grupos hidrofílicos presentes na albumina.

Utilizar como adsorvente na SPE materiais como RAM-MIP é um tipo de preparo de amostra relativamente recente (Barros et. al., 2010, Vitor et. al., 2011, Franqui et. al., 2012). A utilização de RAM-MIP-BSA como adsorvente em SPE ainda não foi reportada na literatura.

5.5 CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS

A determinação de benzodiazepínicos em plasma foi realizada baseando-se no trabalho de Mercolini et al., (2010), utilizando extração em fase sólida para preparo das amostras e quantificação por HPLC. O método bioanalítico desenvolvido que melhor se enquadrou nos parâmetros de validação, está descrito na Tabela 5.

Tabela 5 - Condições cromatográficas do método bioanalítico desenvolvido para quantificação de benzodiazepínicos em plasma humano por HPLC/UV.

Fonte: O autor

Parâmetros	Descrição
Técnica bioanalítica	HPLC/UV
Detecção	Bromazepam, Clonazepam, Diazepam, Lorazepam
Coluna analítica	Analítica [®] C8 (150 mm x 4,60 mm x 5µm)
Temperatura da coluna	25°C
Fase móvel	Tampão fosfato 0,05M pH=3,0 e acetonitrila (65:35 v/v)
Vazão da fase móvel	1 mL/min
Volume de injeção	200 µL
Linearidade	10 a 800 ng/mL
Tempo de corrida	20 min
Tempos de retenção	Bromazepam 4,8 min
	Lorazepam 8,9 min
	Clonazepam 9,2 min
	Diazepam 16,0 min
Equação da curva	$y = a + bx$

O bromazepam foi utilizado como PI, pois tinha o mesmo padrão de interação da molécula modelo, por similaridade estrutural. O processo de SPE possui muitas variáveis como, por exemplo, vazão e velocidade de eluição e torna muito difícil a realização do mesmo sem adição de PI.

Na Figura 11 é possível observar a análise cromatográfica dos fármacos injetados diretamente no sistema cromatográfico sem passar pelo processo de extração (25 µL dos padrões na concentração de 1 mg/mL, submetidos à secura, ressuspensos em 1 mL fase móvel e 50 µL injetados em sistema cromatográfico).

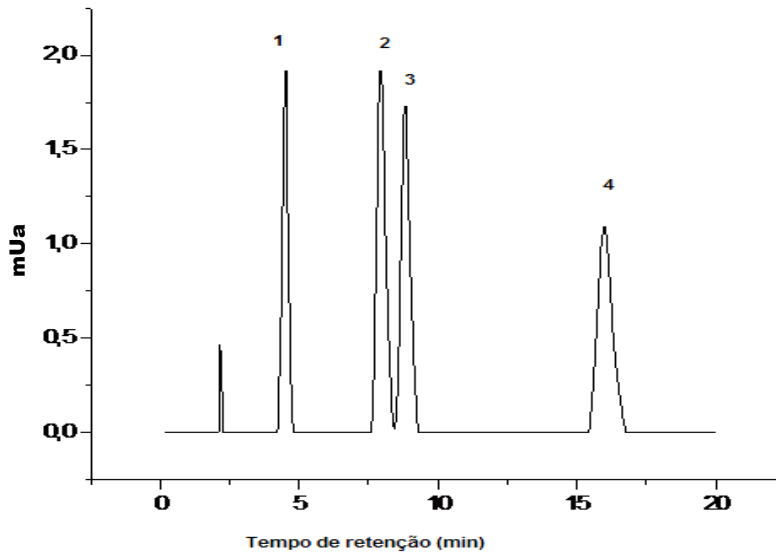


Figura 11 - Análise cromatográfica dos analitos. Bromazepam (1), lorazepam (2), clonazepam (3), diazepam (4).

Fonte: O autor

5.6 VALIDAÇÃO DOS MÉTODOS BIOANALÍTICOS

5.6.1 Linearidade

De acordo com a RDC 27/2012, alguns critérios devem ser considerados para análise e aceitação dos pontos da curva analítica, a menor concentração nominal deve ter desvio menor ou igual a 20%, as demais concentrações não devem ter desvio superior a 15% em relação ao valor nominal. Além disso, é necessário que no mínimo 75% dos padrões de calibração sejam aprovados nas exigências acima e que no mínimo seis padrões de concentrações distintas, assim como o limite inferior de detecção (LIQ) e o limite superior de quantificação (LSQ) também atendam as exigências anteriores. A relação entre concentração e resposta foi definida por meio de uma curva analítica contendo seis concentrações distintas, variando de 10 a 800 ng/mL em plasma.

Os parâmetros relativos à curva analítica do método para quantificação de lorazepam, clonazepam e diazepam em plasma humano por HPLC-UV na faixa de concentração de 10 a 800 ng/mL são demonstrados nas Tabelas 6, 7 e 8 respectivamente. As Figuras 12, 13 e 14 representam as curvas analíticas resultante da análise de três curvas de calibração realizadas em dias distintos, para cada ponto foram feitas seis réplicas. O valor do coeficiente de correlação linear foi superior a 0,99 para todos os fármacos avaliados, indicando adequada linearidade na faixa de concentração de trabalho.

Tabela 6 - Parâmetros relativos à curva analítica do método analítico para quantificação de lorazepam em plasma humano por HPLC-UV na faixa de concentração de 10 a 800 ng/mL.

Fonte: O autor

Parâmetro	Valor
Coeficiente angular (a)	0,0805
Coeficiente linear (b)	0,0008
Coeficiente de correlação linear (r)	0,9966

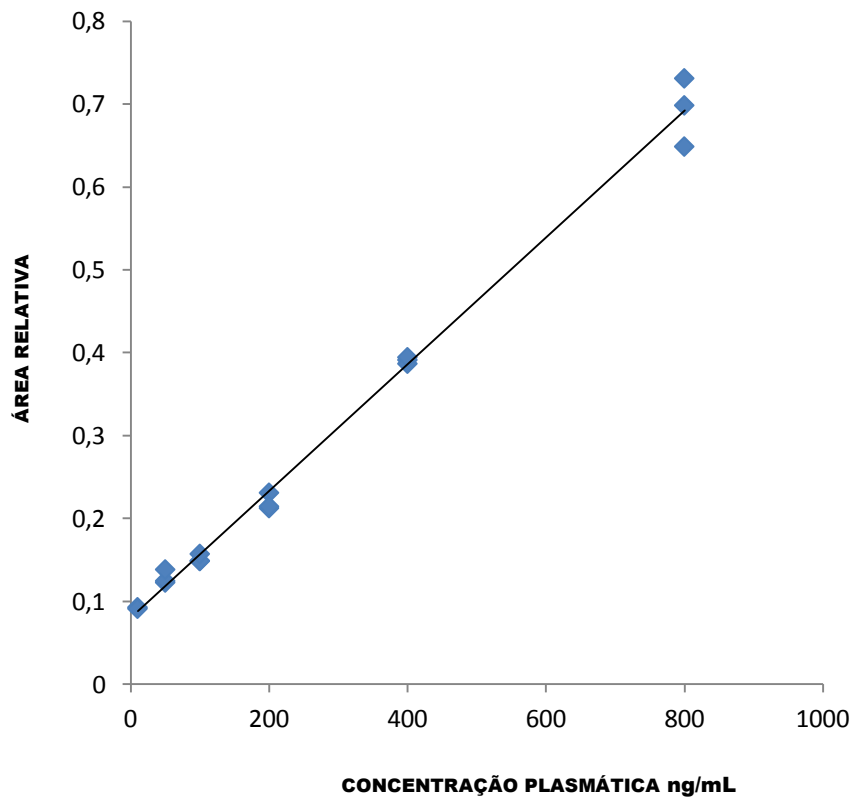


Figura 12 - Curva analítica do lorazepam em plasma humano.

Fonte: O autor

Tabela 7 - Parâmetros relativos à curva analítica do método analítico para quantificação de clonazepam em plasma humano por HPLC-UV na faixa de concentração de 10 a 800 ng/mL.

Fonte: O autor

Parâmetro	Valor
Coefficiente angular (a)	0,1130
Coefficiente linear (b)	0,0010
Coefficiente de correlação linear (r)	0,9960

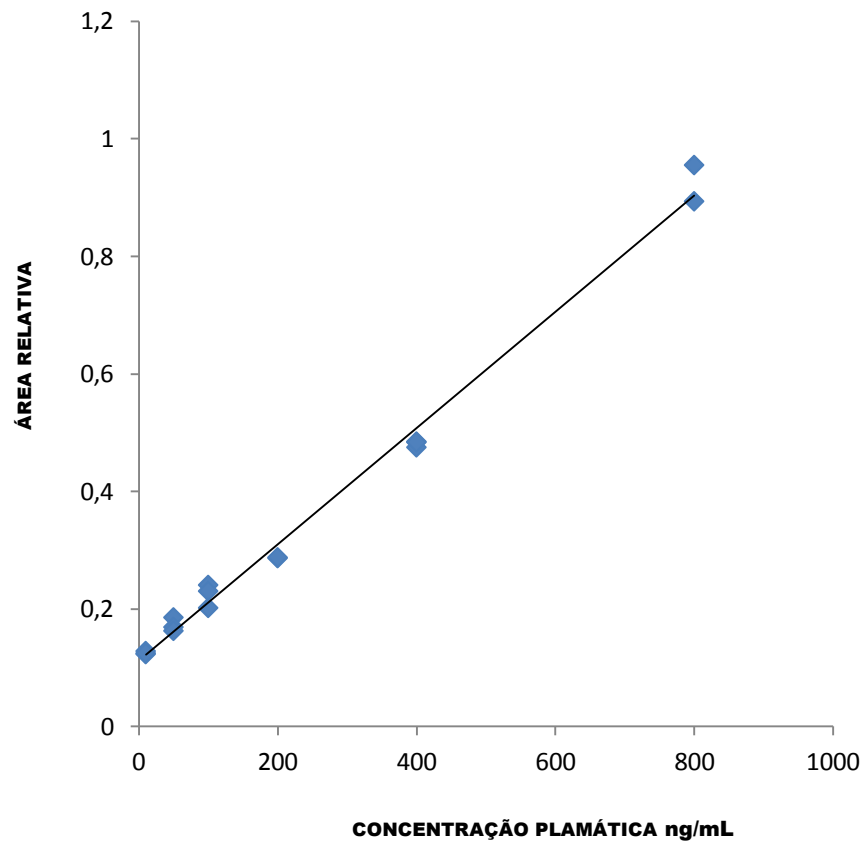


Figura 13 - Curva analítica do clonazepam em plasma humano.

Fonte: O autor

Tabela 8 - Parâmetros relativos à curva analítica do método analítico para quantificação de diazepam em plasma humano por HPLC-UV na faixa de concentração de 10 a 800 ng/mL.

Fonte: O autor

Parâmetro	Valor
Coeficiente angular (a)	0,1574
Coeficiente linear (b)	0,0013
Coeficiente de correlação linear (r)	0,9951

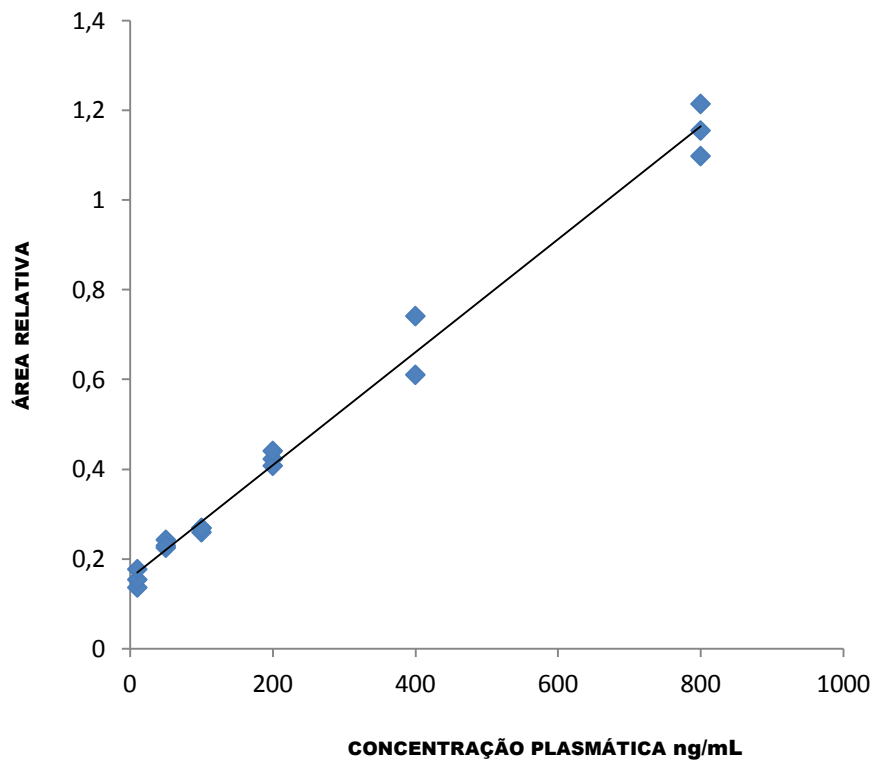


Figura 14 - Curva analítica do diazepam em plasma humano.

Fonte: O autor

5.6.2 Limite de quantificação (LIQ)

O limite de quantificação obtido na metodologia desenvolvida foi de 10 ng/mL, com coeficiente de variação $\leq 20\%$, e apresentou precisão e exatidão satisfatórias, conforme Tabela 9.

Tabela 9 - Limite de quantificação para lorazepam, clonazepam e diazepam.

Fonte: O autor

		LORAZEPAM	CLONAZEPAM	DIAZEPAM	
LIQ(10ng/mL)	Intracorrída n=6	Precisão (CV%)	8,38	4,58	12,68
		Exatidão (Inexatidão%)	-0,93	-0,20	1,26
	Intercorrída n=3	Precisão (CV%)	2,61	4,28	1,23
		Exatidão (Inexatidão%)	-0,93	2,53	1,27

CV = coeficiente de variação [(SD/ média) x 100];

% Inexatidão = [(C_{obs}-C_{adicionada})/C_{adicionada}] \times 100

5.6.3 Limite de detecção (LD)

O limite de detecção estimado está representado na Tabela 10 e foi calculado de acordo com o descrito em 4.8.3, sendo os valores adequados aos intervalos terapêuticos.

Tabela 10 - Limite de detecção para lorazepam, clonazepam e diazepam.

Fonte: O autor

Lorazepam	Clonazepam	Diazepam
3,8 ng/mL	2,2 ng/mL	7,5 ng/mL

5.6.4 Efeito residual

O efeito residual foi testado fazendo-se uma injeção da amostra branco, duas injeções do LSQ e em seguida uma injeção da amostra branco. A Figura 15A demonstra uma análise cromatográfica do branco após duas injeções do LSQ, sendo A, B, C e D do PI (bromazepam), lorazepam, clonazepam, diazepam respectivamente. Observa-se que não ocorreu efeito residual nos tempos de retenção dos analitos (FIGURA 15B).

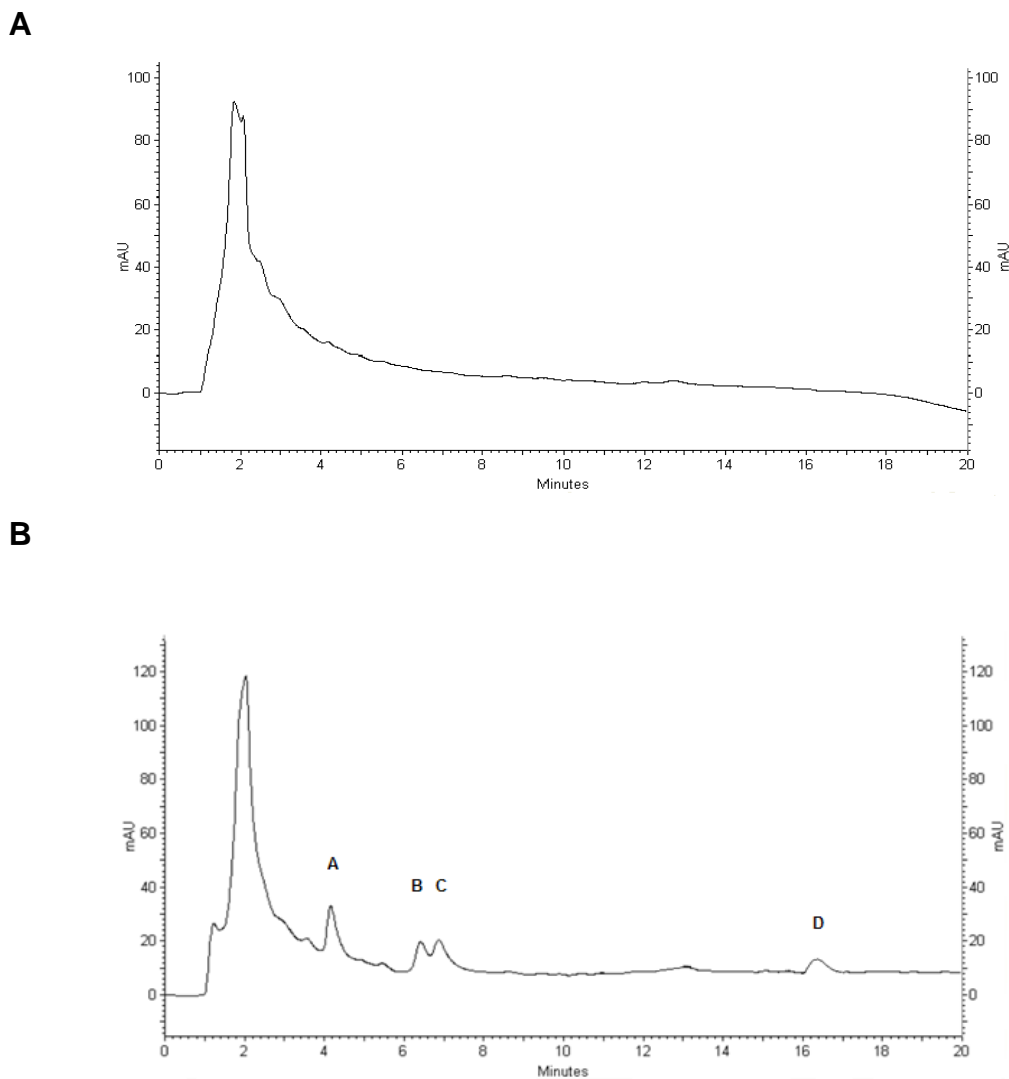


Figura 15 - Análise cromatográfica da amostra branco (15A) e após duas injeções do limite superior de quantificação (15B) contendo PI, lorazepam, clonazepam, diazepam, respectivamente identificados pelas letras A, B, C e D.

Fonte: O autor

5.6.5 Precisão e exatidão

Foi determinada a precisão e exatidão intracorridas e intercorridas (Tabela 11) para os controles. Os resultados de precisão e exatidão estão de acordo com os desvios aceitos pela RDC 27/2012.

Tabela 11 - Precisão e exatidão intracorridas e intercorridas referente ao método analítico para quantificação de lorazepam, clonazepam e diazepam em plasma.

Fonte: O autor

		CQB (20ng/mL)	CQM (320ng/mL)	CQA (600ng/mL)		
LORAZEPAM	Intracorrida n=6	Precisão (CV%)	4,56	4,66	5,43	
		Exatidão (Inexatidão%)	5,81	-0,31	0,84	
	Intercorrida n=3	Precisão (CV%)	3,56	3,43	3,99	
		Exatidão (Inexatidão%)	5,8	-0,61	-1,06	
	CLONAZEPAM	Intracorrida n=6	Precisão (CV%)	3,51	5,21	3,84
			Exatidão (Inexatidão%)	4,74	7,61	0,09
Intercorrida n=3		Precisão (CV%)	2,29	3,37	3,65	
		Exatidão (Inexatidão%)	4,75	9,50	0,99	
DIAZEPAM		Intracorrida n=6	Precisão (CV%)	2,18	4,09	6,32
			Exatidão (Inexatidão%)	6,02	4,65	0,55
	Intercorrida n=3	Precisão (CV%)	1,86	3,59	3,62	
		Exatidão (Inexatidão%)	6,02	4,65	3,13	

CV = coeficiente de variação $[(SD/ \text{média}) \times 100]$;

% Inexatidão = $[(C_{\text{obs}} - C_{\text{adicionada}})/C_{\text{adicionada}}] \times 100$

5.6.6 Estabilidade

A estabilidade é o parâmetro que visa determinar se um analito mantém-se quimicamente inalterado numa dada matriz sob condições específicas, em determinados intervalos de tempo.

A estabilidade do fármaco em líquidos biológicos depende de suas propriedades químicas, da matriz biológica e do material de acondicionamento utilizado. Deve ser avaliada a estabilidade do analito durante o manuseio da amostra, após armazenagem de longa duração (congelamento) e curta duração (à temperatura ambiente), após ciclos de congelamento e descongelamento e nas condições de análise (BRASIL, 2012).

5.6.6.1 Estabilidade após ciclos de congelamento e descongelamento

As amostras submetidas aos ciclos de congelamento e descongelamento mantiveram-se estáveis. Os resultados obtidos foram comparados com as amostras de controle de qualidade recém preparadas, nas concentrações baixa e alta e estão representados na Tabela 12.

Tabela 12 - Estabilidade após ciclos de congelamento e descongelamento referente ao método analítico para quantificação de lorazepam, clonazepam e diazepam.
Fonte: O autor

	LORAZEPAM		CLONAZEPAM		DIAZEPAM	
	Média	CV (%)	Média	CV (%)	Média	CV (%)
CQB (20 ng/mL)	21,61	7,52	20,60	7,49	20,63	7,88
CQA (600 ng/mL)	597,59	2,26	604,17	1,10	604,72	2,35

CV = coeficiente de variação [(SD/ média) x 100]

5.6.6.2 Estabilidade de curta duração

A estabilidade de curta duração foi determinada em duas concentrações, baixa e alta, em triplicata para lorazepam, clonazepam e diazepam. As amostras foram mantidas a temperatura ambiente (24°C) por 5 horas. Após este período as amostras foram processadas e analisadas. Os resultados foram comparados com aqueles obtidos de amostras recém-preparadas (RP) e analisadas imediatamente.

As amostras mostraram-se estáveis em ambas as concentrações, baixa e alta, com desvios de 2,0% e 3,3%, respectivamente (Tabela 13).

Tabela 13 - Estabilidade de curta duração referente ao método analítico para quantificação de lorazepam, clonazepam e diazepam.
Fonte: O autor

	LORAZEPAM		CLONAZEPAM		DIAZEPAM	
	Média	CV (%)	Média	CV (%)	Média	CV (%)
CQB (20 ng/mL)	19,62	8,76	19,41	9,85	21,5	611,89
CQA (600 ng/mL)	605,42	0,47	610,81	1,75	9,68	0,48

CV = coeficiente de variação $[(SD/ \text{média}) \times 100]$

5.6.6.3 Estabilidade das amostras pós-processamento

As amostras avaliadas no teste de estabilidade pós-processamento foram preparadas e extraídas, ficando acondicionadas em temperatura ambiente (24°C) por 5 horas. Como se pode observar na Tabela 14, as amostras apresentaram-se estáveis, com desvios abaixo de 15%.

Tabela 14 - Estabilidade pós-processamento referente ao método analítico para quantificação de lorazepam, clonazepam e diazepam.

Fonte: O autor

	LORAZEPAM		CLONAZEPAM		DIAZEPAM	
	Média	CV (%)	Média	CV (%)	Média	CV (%)
CQB (20 ng/mL)	20,26	9,28	19,62	8,76	21,00	9,08
CQA (600 ng/mL)	609,33	0,58	605,42	0,47	606,99	1,96

CV = coeficiente de variação $[(SD/ média) \times 100]$

5.7 CONSIDERAÇÕES SOBRE A METODOLOGIA BIOANALÍTICA DESENVOLVIDA PARA QUANTIFICAÇÃO DE BENZODIAZEPÍNICOS

O método de quantificação por cromatografia líquida de alta ou ultra performance com detecção por espectrometria de massas bem como a cromatografia gasosa são muito utilizados para a determinação de BDZ em amostras de matriz biológica (CAVEDAL et. al., 2006; MANDRIOLI et. al., 2008; UDDIN, et.al., 2013). No entanto, a metodologia desenvolvida neste trabalho, por cromatografia líquida de alta eficiência com detecção em ultravioleta, também utilizada por Mercolini et.al., (2010), demonstrou ser eficiente na detecção e quantificação do lorazepam, clonazepam e diazepam, apresentando limites de detecção de 3,8; 2,2; e 7,5 ng/mL respectivamente e de quantificação de 10 ng/mL, adequados para estudos com a finalidade de monitorização terapêutica. Os limites adequados obtidos podem ser resultados da associação da técnica cromatográfica não acoplada a espectrometria de massas ao preparo de amostra com adsorvente molecularmente impresso utilizado na SPE.

Na otimização das condições cromatográficas, foram testadas diferentes condições cromatográficas como comprimento de onda de 245nm e fase móvel composta por solução tampão fosfato de potássio monobásico 0,5 mol/L pH 6.0, metanol e éter dietílico (55: 40:5, v / v / v), vazão 0,8 mL/min., temperatura de forno

25 °C e coluna analítica LC-18 DB (250 mm x 4,6 mm, 5 µm) como sugerido por Borges et. al.,(2008). Também foram aplicados diferentes comprimentos de onda e fase móvel constituída por tampão fosfato de potássio monobásico 0,01 mol/L, pH 3,5 e acetonitrila (69:31, v/v), vazão de 1,5 mL/ min. , temperatura do forno de 35 °C e coluna analítica de fase reversa C18 (15 cm x 4,6 mm ID x 5 µm) conforme estudos de Freire et. al., (2005). Não houve resolução cromatográfica dos analitos nestes métodos testados.

As condições escolhidas neste estudo utilizaram como guia os dados publicados por Mercolini et. al, 2010, utilizando o comprimento de onda de 220 nm, fase móvel composta por tampão fosfato 0,01M pH 3,0 e acetonitrila (65:35, v/v), fluxo de 1 mL/min., temperatura de forno de 25 °C e coluna analítica Analítica® C8 (150 mm x 4,60 mm x 5µm) onde se obteve melhor separação cromatográfica dos fármacos analisados.

Foi utilizada solução de bromazepam 400ng/mL como padrão interno, uma vez que o uso de padrão interno é necessário em cromatografia e SPE. Tal substância deve possuir propriedades físico-químicas semelhantes as do analito de interesse para que não haja interferência na sua eluição (GERHARDS et al, 2000).

A metodologia foi validada e todos os resultados encontrados foram satisfatórios e estão de acordo com a RDC 27/ 2012 da ANVISA.

5.8 ANÁLISES DAS AMOSTRAS DOS PACIENTES INCLUÍDOS NO ESTUDO

As amostras dos pacientes incluídos no estudo foram processadas utilizando extração em fase sólida como sorvente molecularmente impresso, com posterior análise cromatográfica e detecção ultravioleta. Os resultados das concentrações plasmáticas dos BDZ estão descritos na Tabela15.

Tabela 15 - Concentração do fármaco no plasma dos pacientes participantes do estudo.

Fonte: O autor

Pacientes	Fármaco	[] fármaco ng/mL sangue
P1	Clonazepam	24,6
P2	Clonazepam	223,8
P3	Clonazepam	776,9
P4	Lorazepam	686,4
P5	Lorazepam	267,4
P6	Lorazepam	162,3
P7	Lorazepam	376,1
P8	Clonazepam	265,3
P9	Clonazepam	18,5
P10	Clonazepam	784,5
P11	Clonazepam	336,1
P12	Clonazepam	29,2
P13	Clonazepam	125,4
P14	Clonazepam	128,5
P15	Clonazepam	183,1
P16	Clonazepam	165,4
P17	Diazepam	309,6
P18	Diazepam	318,3

Dados: Intervalo terapêutico lorazepam: 20 a 250 ng/mL; clonazepam: 10 a 50 ng/mL; diazepam: 200 a 800 ng/mL.

Baseado nos dados obtidos após a análise das amostras dos pacientes e de acordo com o intervalo terapêutico de cada fármaco pode-se observar na Tabela 16, o número de indivíduos em utilização de um determinado fármaco e quantitativamente os que estavam acima do intervalo.

Tabela 16 - Número de usuários dos medicamentos em estudo x número de usuários com sobredose.
Fonte: O autor

Fármaco	Nº usuários	Nº sobredose
Clonazepam	12	9
Lorazepam	4	3
Diazepam	2	0

Sendo assim, pode-se observar que 66,6% dos pacientes apresentam concentrações elevadas em plasma dos fármacos avaliados. As diferenças na resposta que podem ser observada na terapêutica podem ser causadas principalmente por fatores diretamente relacionados ao paciente ou á fármacos que estejam associados no tratamento com BDZ. Devido as suas várias indicações clínicas, os BDZ são amplamente utilizados. Na população incluída neste estudo, estes fármacos não foram utilizados em monoterapia e sim administrados em combinação com outros fármacos. Quaisquer associações podem levar ao aparecimento de efeitos colaterais e tóxicos ao organismo, advindo de interações farmacocinéticas e ou farmacodinâmicas.

Estudos realizados por Tanaka (1999) alertam para os cuidados de associações de BDZ e inibidores da recaptação de serotonina, cimetidina, antiepiléticos, antibióticos macrolídeos e antimicóticos. Esse mesmo estudo relata que existem algumas interações bem elucidadas entre BDZ e antidepressivos inibidores seletivos da recaptação de serotonina (ISRS), omeprazol e alguns fármacos de ação cardiovascular, como o propranolol.

Dessa maneira, os valores acima do intervalo terapêutico determinados nas amostras dos pacientes, colhidas em vale, são devidos às interações medicamentosas, uma vez que 83,3% dos voluntários relataram fazer uso de um ISRS, como pode ser observado na Tabela 2.

Alguns BDZ são metabolizados por reação de fase 1; pela isoforma CYP2C19, como é o caso do diazepam e podem potencialmente interagir com ISRS, enquanto outros que são diretamente conjugados (lorazepam), ou com redução de nitro (clonazepam) e metabolizados pela isoforma CYP3A4, também estão propensos a sofrer interações farmacocinéticas com ISRS (TANAKA, 1999).

A fluoxetina inibe principalmente as vias metabólicas do CYP3A e CYP2C19, aumentando os níveis de BDZ na corrente sanguínea (LASHER et.al., 1991) e aumentando as concentrações de diazepam por interação metabólica (LEVY, 1995). Estas interações farmacocinéticas podem justificar as elevadas concentrações observadas para os pacientes P3, P8 e P14, uma vez que os mesmo utilizam a fluoxetina associada a um BDZ. Para estes pacientes é necessário ajuste de dose dos BDZ.

Sertralina, citalopram e venlafaxina também inibem as vias do CYP3A e CYP2C19, porém de forma menos intensa do que a fluoxetina, sendo que em doses terapêuticas não interagem com os BDZ (MOLTKE et.al, 1994). Ainda assim, Ketter, (1995) sugere atenção à administração simultânea dos BDZs e ISRS, uma vez que o metabolismo de BDZ é inibido por alguns ISRS.

O omeprazol, utilizado na inibição da bomba de prótons através do bloqueio da ATPase da célula parietal, é um dos dez fármacos mais prescritos do mundo (INÁCIO,2012). O omeprazol é um inibidor irreversível desta enzima e consegue reduzir a produção diária de ácido em mais de 95% (Hardman, 1996).

Wedemeyer e Blume, (2014) ressaltaram o potencial do omeprazol para interações com outros fármacos, devido à sua elevada afinidade pelas via metabólica do CYP2C19 e afinidade moderada CYP3A4, mesmas vias dos BDZ.

Por mecanismo de inibição competitiva na isoforma CYP2C19, vários estudos relatam a interação de omeprazol com diazepam (Gugler ; Jensen, 1985; Ishizaki et. al., 1995; Magoni e Jackson, 2004) e antidepressivos como a moclobemida (YU, et.al., 2001). Scholler-Gyure et. al. (2008) observaram redução de 50% no clearance oral do S-(+)-citalopram e aumento de biodisponibilidade em torno de 120%.

As elevadas concentrações encontradas na análise do plasma dos pacientes P2, P7, P8, P10, P13, P14, P15 e P16 podem ser explicadas, portanto pela inibição competitiva da omeprazol de enzimas metabolizadoras dos fármacos em estudo. O paciente 10 apresentou valores de concentração de clonazepam superiores 15 vezes ao intervalo terapêutico. Sendo assim, mesmo que achados de alterações em

farmacocinética não reflitam em alterações na farmacodinâmica, valores tão elevados devem ser monitorados, e as doses reajustadas, pois em longo prazo, podem causar efeitos tóxicos.

A idade é uma variável preditora no uso de medicamentos, e seu efeito se produz mesmo antes dos 60 anos, pois a chance de usar medicamentos aumenta desde a quarta década de vida (BARDEL, et. al., 2000). O idoso geralmente faz uso simultâneo de muitos medicamentos para o controle das alterações fisiológicas impostas pela idade e das patologias que o acometem, aumentando o risco de interações fármaco-fármaco e fármaco-doença. A frequência de eventos adversos relacionados aos medicamentos é maior entre eles, aumentando expressivamente de acordo com a complexidade da terapia. O risco de ocorrência aumenta em 13% com o uso de dois agentes, de 58% quando este número aumenta para cinco, elevando-se para 82% nos casos em que são consumidos sete ou mais medicamentos (CASSIANI, 2005).

Alterações fisiológicas causadas pela idade também poderiam estar relacionadas com os resultados encontrados, uma vez que 62% dos voluntários desse estudo estão acima de 60 anos.

Em estudo realizado por Rozenfeld (2003) com 634 idosos participantes de um centro cultural do Rio de Janeiro, a prevalência do uso de BDZ por 12 meses ou mais é de 7,4% e cerca 20% dos usuários consome fármacos de meia-vida longa. Como consequência do uso de BDZ de meia vida longa está o aumento do risco de quedas e de fraturas e segundo Trifiró e Spina (2011) isso se deve aos efeitos secundários dessa classe farmacológica que afetam a cognição e o equilíbrio. Dois dos pacientes incluídos no estudo, em tratamento longo com BDZ relataram episódios recentes de quedas, que poderiam, segundo a literatura, ser relacionados ao uso prolongado dos mesmos. Portanto, é necessário considerar todos estes fatores quando se faz uso de medicamentos nestes pacientes.

O processo de envelhecimento é causado por alterações tanto estruturais quanto funcionais que afetam todos os sistemas do organismo e resultam em capacidade homeostática reduzida. Alterações na composição corporal, e na função renal e hepática são responsáveis por aumento do volume de distribuição de e redução no clearance de fármacos lipossolúveis, como os BZDs. Essas alterações levam ao prolongamento da meia-vida, podendo ser associadas a ou não a

alterações farmacodinâmicas, dependendo da extensão destas alterações (MANGONI ; JACKSON, 2004).

Ainda assim, os pacientes P6, P17 e P18 são idosos e apresentaram valores dentro do intervalo terapêutico, sendo que nenhum deste utilizava omeprazol em associação, somente outros medicamentos. Ressalta-se também que os pacientes P1, P9 e P12 não são considerados idosos, e apresentaram valores dentro do intervalo terapêutico, além de não utilizar omeprazol.

O controle da variabilidade interindividual na resposta aos fármacos disponíveis na clínica representa na atualidade um dos maiores desafios da Farmacologia Clínica. A grande variabilidade individual no metabolismo destes fármacos estudados representa um obstáculo importante porque pode levar a resultados indesejáveis e difíceis de prever, como a variação no intervalo terapêutico e a manifestação de efeitos tóxicos em populações específicas. Diante deste contexto, e dos resultados observados, fica evidente a necessidade de monitorização terapêutica em indivíduos tratados com BDZs em politerapia, principalmente quando fatores que alteram a resposta como: o polimorfismo genético, os estados fisiológicos e as doenças, além da interação entre fármacos estão envolvidos.

6 CONCLUSÕES

- O polímero sintetizado e utilizado como adsorvente em coluna de extração em fase sólida se mostrou eficiente no preparo de amostra para a classe terapêutica dos benzodiazepínicos, podendo ser reutilizado pelo menos 100 vezes na extração.
- O polímero sintetizado apresentou capacidade alta de eliminação de proteínas, e a extração proposta é de fácil execução.
- A metodologia desenvolvida e validada segundo a ANVISA (RDC 27/2012) utiliza um cromatógrafo líquido e detector em ultravioleta, possibilita a análise simultânea de três analitos e pode ser empregada em monitorização terapêutica.
- A maioria dos pacientes incluídos no estudo (66%) apresentou concentrações muito superiores aos limites terapêuticos de cada fármaco, provavelmente causadas por interações medicamentosas.

REFERÊNCIAS

ALLENDER, C.J. Molecularly imprinted polymers: technology and applications.. **Adv. Drug. Deliver. Rev.**, v.57, n.12, p. 1731– 1732, 2005.

ANDERSSON, T.; CEDERBERG, C.; EDVARDSSON, G. Effect of omeprazole treatment on diazepam plasma levels in slow versus normal rapid metabolizers of omeprazole. **Clin.Pharmacol.Ther.**, v.47, p.79-85, 1990

ANDERSSON, T., et al. Diazepam metabolism by human liver microsomes is mediated by both S-mephenytoin hydroxylase and CYP3A isoforms. **Br. J. Clin. Pharmacol.**, v.38, n.2, p.131-137, 1994.

ASHTON, H. Guidelines for the rational use of benzodiazepines. When and what to use. **Drugs**, v.48, n.1, p. 25-40, 1994.

AZODI-DEILAMI, S.; ABDOUSS, M.; HASANI, S. A. Preparation and utilization of a molecularly imprinted polymer for solid phase extraction of tramadol. **Cent. Eur. J. Chem.**, v.8, n.7, p 861-869, 2010.

BARDE, A.; WAHLANDER, M.; SVARDSUDD, K. Reported current use of prescription drugs and some of its determinants among 35 to 65 years old women in mid Sweden: A population based study. **J. Clin. Epidemiol.**, v. 53, p.637-643, 2000.

BARROS, L.A.; MARTINS, I.; RATH, S. A selective molecularly imprinted polymer-solid phase extraction for the determination of fenitrothion in tomatoes. **Anal. Bioanal. Chem.**, v.397, p.1355-1361, 2010.

BEERS, M.H., et al. Updating the Beers Criteria for Potentially Inappropriate medication use in older adults. **Arch. Intern. Med.**, v.163, p. 2716 – 2724, 2003.

BELTRAN, F.A.; BORRULL, P.A.G.; CORMACK, R.M. **Trends Anal. Chem.**, v.29, n.11, p.1363– 1375, 2010.

BERNIK, M. A. **Benzodiazepínicos: quatro décadas de experiência**; São Paulo: EDUSP, 1999. 242 p.

BORGES, K.B.; FREIRE, E.F.; MARTINS, I.; SIQUEIRA, M.E.

Simultaneous determination of multibenzodiazepines by HPLC/UV: investigation of liquid-liquid and solid-phase extractions in human plasma. **Talanta**, v.78, n.1, p.233-241, 2009.

BRASIL, H. H. A.; BELISÁRIO FILHO, J. F. Psicofarmacoterapia. **Rev. Bras. Psiquiatr.**, v. 22, n. 2, p.135-137, 2000.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução RDC27, de 17 de maio de 2012. Guia para validação de métodos bioanalíticos.**

2012. Disponível em:

http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2012/rdc0027_17_05_2012.html.

Acesso em: 7 dez. 2013.

BROCKS, D.R. Drug disposition in three dimensions: an update on stereoselectivity and pharmacokinetics. **Biopharm. Drug. Disp.**, v.158, n. 27, p. 387, 2006.

CADEVAL, L. E., et al. Clonazepam quantification in human plasma by high-performance liquid chromatography coupled with electrospray tandem mass spectrometry in a bioequivalence study. **J.Mass Spectrom.**, v.42, p.81-88, 2006

CALDAS, S.S.; GONÇALVES, F. F.; PRIMEL, E.G. Principais técnicas de preparo de amostra para a determinação de resíduos de agrotóxicos em água por cromatografia líquida com detecção por arranjo de diodos e por espectrometria de massas. **Quím. Nova**, v.34, n.9, 2011.

CARLINI, E. A., et al. **I levantamento domiciliar sobre o uso de drogas psicotrópicas no Brasil**. São Paulo: CEBRID, 2002.

CARLINI, E. A., et al. **I levantamento domiciliar sobre o uso de drogas psicotrópicas no Brasil**. São Paulo: CEBRID, 2005.

CARVALHO, A. de C. A. O uso de drogas psicotrópicas na gestação. **Femina**, v. 37, n. 6, p. 331-338, 2009.

CARVALHO, M. T. B. R. S. **Preparação de materiais de impressão molecular para fármacos e a sua aplicação em técnicas de extração miniaturizada lab-on-valve**. 2012. 106 f. Dissertação (Mestrado em Química) Departamento de Química e Bioquímica Faculdade de Ciências da Universidade do Porto, Cidade do Porto, 2012.

CASSIANI, A.H.B. A segurança do paciente e o paradoxo no uso de medicamentos. **Rev. Bras. Enferm.**; v.58, n.1, p. 95-99, 2005.

CASSIANO, N. M., et al. Development of restricted-access media supports biological fluid sample via high-performance liquid chromatography **Anal. Bioanal. Chem.**, v.20, n.384, p.1462–1469, 2006.

CENTRO BRASILEIRO DE INFORMAÇÃO SOBRE DROGAS PSICOTRÓPICAS (**CEBRID**). Boletim CEBRID, São Paulo, v.47, n. 11, 2003. Disponível em: <<http://www.unifesp.br/boletim>> Acesso em: 20 out. 2012.

CHAVES, A.R., et al. Biocompatible in-tube solid phase microextraction coupled with liquid chromatography-fluorescence detection for determination of interferon α in plasma samples **J. Chromatogr. A**, v.1218, n.21, p.3376–3381, 2011.

CORMACK, P.A.G.; ELORZA, A.Z. Molecularly imprinted polymers: synthesis and characterization. **J. Chromatogr., B: Anal.** , v.804, n.1, p.173-182, 2004.

COUTINHO, E. S. F.; SILVA, S. D. Uso de medicamentos como fator de risco para fratura grave decorrente de queda em idosos. **Cad. Saúde Pública**, v. 18, n. 5, p. 1.359- 1.366, 2002.

D'ARCHIVIO, A. A., et al. Comparison of different sorbents for multiresidue solid-phase extraction of 16 pesticides from groundwater coupled with high-performance liquid chromatography. **Talanta**, v.71, n.1, p.25-30, 2007.

DOBLE, A. **The GABAA/Benzodiazepine Receptor as a Target for Psychoactive Drugs**. Georgetown: RG Landes, 1998.

FIGUEIREDO, E. C., et al. Extração em fase sólida on-line imprimido molecular para a determinação espectrofotométrica seletiva de catecol. **Microchem. J.**, v.85, p. 290–296, 2007.

FIGUEIREDO, E. C.; DIAS, A. C. B.; ARRUDA, M. A. Z. Impressão molecular: uma estratégia promissora na elaboração de matrizes para a liberação controlada de fármacos. **Rev. Bras. Cienc. Farm.**, v. 44, n. 3, p. 361-375, 2008.

FIGUEIREDO, E. C.; ARRUDA, M. A. Z. On-line molecularly imprinted solid phase extraction using a fast low-pressure separation of chlorpromazine and perphenazine from urine. **Br. J. Ana.I Chem.**, v. 1, p. 36-41, 2010.

FIGUEIREDO, E. C.; SPARRAPAN. R.; SANVIDO, G.B. Quantitation of drugs via molecularly imprinted polymer solid phase extraction and electrospray ionization mass spectrometry: benzodiazepines in human plasma. **Analyst**, v.136, n.18, p.3753-3757, 2011.

FIGUEIREDO, E.C.; SANVIDO, G.C.; ARRUDA, M.A.Z. Evaluating Atmospheric pressure Solids Analysis Probe (ASAP) mass spectrometry for the analysis of low molecular weight synthetic polymers **Analyst**, v.137, n.19, p.4524-4530, 2012.

FORLENZA, O. V. Antidepressivos tricíclicos no tratamento farmacológico dos transtornos depressivos em idosos. **Rev. Psiquiatr. Clin.**, v.26, n.4, p.200-203, 1999.

FRANQUI, L. S., et al. Extração de ácido trans-trans mucônico urinário com polímeros de impressão molecular e análise por cromatografia gasosa - espectrometria de massas. **Quim. Nova**, v.35, n.8, p.1577-1581, 2012.

FREIRE, E. F., et al. Diazepam e nordiazepam em plasma: métodos de extração líquido-líquido e em fase sólida no pré-tratamento de amostras para análise cromatográfica em fase líquida. **Quim. Nova**, v.28, n.5, p.773-776, 2005

FREITAS, M. B., et al. Amitriptilina e Nortriptilina em Plasma: Extração em Fase Sólida por Polímeros de Impressão Molecular e Sílica Octadecila para Análise Cromatográfica em Fase Líquida de Alta Resolução. **Lat. Am. J. Pharm.**, v.28, n.1, p.70-79, 2009.

FRITZ, J. S.; MACKA, M.; Solid phase trapping of solutes for further chromatographic or eletrophoretic analysis. **J. Chromatogr., A**, v.902, p.137-166, 2000.

FUKASAWA, T.; SUZUKI, A.; OTANI, K. Effects of genetic polymorphism of cytochrome P450 enzymes on the pharmacokinetics of benzodiazepines. **J. Clin. Pharm. Ther.** v.32, p.333–341, 2007.

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ. Centro de Informação Científica e Tecnológica. Sistema Nacional de Informações Tóxico-Farmacológicas. **Evolução dos casos registrados de intoxicação humana por agente tóxico**. Rio de Janeiro, 2008.

GALLEGUILLOS, T., et al. Tendencia del uso de benzodiazepinas em una muestra de consultantes em atención primaria. **Rev. Med. Chile**, v.131, n.5, p. 535-540, 2003.

GARCÍA, A. F.; VIÑA, A. G.; MACHADO, M. de los A. P. Bases científicas para el uso de las benzodiazepinas. **Rev. Cubana Med. Gen. Integ.**, v. 19, n. 1, 2003.

GATIDOU, G., et al. Determination of the antifouling booster biocides irgarol 1051 and diuron and their metabolites in seawater by high performance liquid chromatography–diode array detector. **Anal. Chim. Acta.**, v.528, n.1 ,p. 89, 2005.

GENTILI, S.; CORNETTA, M.; MACCHIA, T. Analysis of drugs in biological samples: automated "in-tube" solid-phase microextraction and high performance liquid chromatography **J. Chromatogr., B: Biomed. Sci. Appl.**, v.801, p. 289-296. 2004.

GERHARDS, P., et al. GC/MS in clinical chemistry. **Clin. Chem.**, v. 46, n.9, p.1446-1447, 2000.

GONZALO, E.R.; GARCIA-GOMES, D.; MARTINEZ, E. R., A confirmatory method for the determination of phenolic endocrine disruptors in honey using restricted-access material-liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Anal. Bioanal. Chem.**, v.398, p.1239-1247, 2010.

GOODMAN, L. S.; GILMAN, A. G., BRUNTON, L. L. **As bases farmacológicas da terapêutica**. 11. ed. Porto Alegre: AMGH, 2010.

GUGLER, R.; JENSEN, J.C.; Omeprazole inhibits oxidative drug metabolism. Studies with diazepam and phenytoin in vivo and 7-ethoxycoumarin in vitro. **Gastroenterology.**, v.89, n.6, p.1235-1241, 1985

HAGINAKA, J.; SANBE, H. Monodispersed, molecularly imprinted polymers as affinity-based chromatography media. **Anal. Chem.**, v.72, p. 5206-5210, 2000.

IBANEZ, M.; POZO, O. J.; SANCHO, J. V.; LOPEZ, F. J.; HERNÁNDEZ, F., Residue determination of glyphosate, glufosinate and aminomethylphosphonic acid in water and soil samples by liquid chromatography coupled to electrospray tandem mass spectrometry. **J. Chromatogr.A.**, v.1081, p.145-155, 2005.

INÁCIO, A. F. F. C. P. **A terapêutica com o omeprazol: avaliação da potencial relação com a suscetibilidade ao cancro**. 2012, f.110. (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade do Algarve – Faro, Portugal. 2012

JING, T., et al. Preparation of high selective molecularly imprinted polymers for tetracycline by precipitation polymerization. **Chem. Lett. Chinese**, v. 18, p. 1535-1538, 2009.

ISHIZAKI, T.; CHIBA, K.; MANABE, K. Comparison of the interaction potential of a new proton pump inhibitor, E3810, versus omeprazole with diazepam in extensive and poor metabolizers of S-mephenytoin 40-hydroxylation. **Clin. Pharmacol. Ther.**, v. 58, n.2, p.155-164, 1995.

KAPLAN, H. I.; SADOCK, B. J.; GREBB, J. A., **Emergency psychiatry: contemporary practices in managing acutely violent patients in 20 psychiatric emergency rooms. Synopsis of psychiatry**. 7th ed. Baltimore: Williams and Wilkins, 1999.

KATZUNG, B. G. **Farmacologia básica e clínica**. 9.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005.

KETTER, T.A.; FLOCKHART, D.A.; POST, R.M. The emerging role of cytochrome P450, 3A in psycho-pharmacology. **J. Clin. Pharm. Ther.**, v.15 ,n.47, p.387-398, 1995.

KOEBER, R., et al. Evaluation of a Multidimensional Solid-Phase Extraction Platform for Highly Selective On-Line Cleanup and High-Throughput LC-MS Analysis of Triazines in River Water Samples Using Molecularly Imprinted Polymers **Anal. Chem.**, v.73, n.20, p.2437-2444, 2001.

KOMIYAMA, T. T.; M.H. ASANUMA. **Molecular Imprinting: From Fundamentals to Applications**, Germany, Wiley-VCH: 2003.

KUKOSHI, C.L.M.; SCHAFF, J.E.; REDA, L.J. Benzodiazepines and metabolites from biological fluids by liquid chromatography electrospray tandem mass spectrometry. **Methods. Mol. Biol.**, v.902, p. 43-52, 2012.

LANÇAS, F. M. **Extração em fase sólida (SPE)**. São Carlos: RiMa, 2004.

LASHER, T.A., et al. Pharmacokinetic pharmacodynamic evaluation of the combined administration of alprazolam and fluoxetine. **Psychopharmacology**, v.104, p.323–327, 1991.

LAVIGNAC,N.; ALLENDER,C.J.; BRAIN,K.R. Imprinted Polymer Inclusion Membrane Based Potentiometric Sensor for Determination and Quantification of Diethyl Chlorophosphate in Natural Waters. **Anal. Chim. Acta.**, v.510, n.3, p.139-145. 2004.

LEVY, R. H. - Cytochrome P450 Isozymes and Antiepileptic Drug Interactions. **J. Clin. Psychiatry**. v.55, p.543-4, 1995.

LONGO, L. P.; JOHNSON, B. Addiction: Part. I. Benzodiazepines-side effects, abuse risk and alternatives. **Am. Fam. Physician.**, v. 61, n. 7, p. 2121-2128, 2000.

LORENZO,C. A.; CONCHEIRO,A. Molecularly imprinted polymers: A new tool for separation of steroid isomers **J. Chromatogr. B.**, v.804, .1n, p.231–245, 2004.

MANDRIOLI, R.; MERCOLINI, L.; RAGGI, M.A. Benzodiazepine Metabolism: An Analytical Perspective. **Curr. Drug. Metab.**, v. 9, n.8, p.827-844, 2008.

MANGONI, A. A.; JACKSON, S.H.D. Age-related changes in pharmacokinetics and pharmacodynamics: basic principles and practical applications. **Br. J. Clin. Pharmacol.**, v. 57, n.1, p.6-14, 2004

MARAZUELA, M. D.; BOGIALLI, S. A review of novel strategies of sample preparation for the determination of antibacterial residues in foodstuffs using liquid chromatography-based analytical methods **Anal. Chim. Acta**, v.645, p.5–17, 2009.

MELO, D. O.; RIBEIRO, E.; STORPIRTIS, S. A importância e a história dos estudos de utilização de medicamentos. **Rev. Bras. Cienc. Farm.** v.42, n.4, p.475-478, 2006.

MENGUE, S. S. Uso de medicamentos por gestantes em seis cidades brasileiras. **Rev. Saúde Públ.**, São Paulo, v. 35, n. 5, p. 415-420, 2001.

MERCOLINI, L., e at. Separation and HPLC analysis of 15 benzodiazepines in human plasma. **J. Sep. Sci.**, v.31, p.2619-2626, 2010.

MINGDI YAN. **Molecularly imprinted material: science and technology**. New York: Marcel Dekker, 2005.

MOLTKE, L.L., et al. Inhibitors of alprazolam metabolism in vitro: effect of serotonin-reuptake-inhibitor anti-depressants, ketoconazole and quinidine. **Br. J. Clin. Pharmacol.**, v.38, p.21-23, 1994.

MORAES, G. O. I. **Desenvolvimento de um novo polímero de impressão molecular restrito à ligação de macromoléculas por meio de revestimento com albumina para a extração direta de clorpromazina em plasma humano**.2012. f.72 (Mestrado em Química) - Universidade Federal de Alfenas, UNIFAL, Alfenas, 2012.

MORAES, G. O. I., et al. A new restricted access molecularly imprinted polymer capped with albumin for direct extraction of drugs from biological matrices: the case of chlorpromazine in human plasma. **Anal. Bioanal. Chem**, v. 405, p. 7687-7696, 2013.

MOREAU, R. L. M.; SIQUEIRA, M. E. P. B., **Toxicologia analítica**.-Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 2008.

NASCIMENTO, A. A. A. S.; GUARIDO, C. F. Perfil farmacoterapêutico de pacientes atendidos na Clínica de Psicologia da Unimar no ano de 2005. **Rev. Cienc. Farm. Básica Apl.**, v. 29, n. 3, p. 291-296, 2008.

NORDON, D. G. Características do uso de benzodiazepínicos por mulheres que buscavam tratamento na atenção primária. **Rev. Psiquiatr. Rio Gd. Sul.**, v. 31, n. 3, p.152-158, 2009.

OLIVEIRA, R.V.; CASS, Q.B. Evaluation of Liquid Chromatographic Behavior of Cephalosporin Antibiotics Using Restricted Access Medium Columns for On-line Sample Cleanup of Bovine Milk. **J. Agric. Food. Chem.**, v.54, n.14, p.1180–1187, 2006.

PEÇANHA, B.R.B., et al. Polímeros de Impressão Molecular Obtidos Através de Polimerização por Precipitação e sua Aplicação na Técnica de Extração em Fase Sólida. **Polímeros**, v. 23, n. 4, p. 509-513, 2013

PERES, R. M. Riscos para a saúde fetal associados com o uso de benzodiazepínicos na gestação: uma revisão. **J. Bras. Psiquiatr.**, v. 51, n. 3, p. 145-151, 2002.

POSSIDENTE, E., et al. Efeitos sexuais indesejáveis dos benzodiazepínicos. **J. Bras. Psiquiatr.**, v. 46, n. 10, p. 557-561, 1997.

POYARES ,D., et al. Hipnoindutores e insônia. **Rev. Bras. Psiquiatr.**, v.27, p.2-7, 2005.

PRASAD,B.B., et al. Molecularly imprinted polymer-based solid-phase extraction combined with molecularly imprinted polymer-based sensor for detection of uric acid. **Biochem. Eng. J.**, v.44, p.232–239, 2009.

PUCHE, J. T.F. A. The Power of functional resins in organic synthesis, Weinheim. **Quim. Nova**, v.34, n. 9, p.1604 - 1617, 2008.

PUOCI, F., et al. Recent advances in molecular imprinting technology: current status, challenges and highlighted applications **Euro. Polym. J.**, v.45, p. 1634–1640, 2000.

QUEIROZ, M.E.C. Análise de fármacos em material biológico: acoplamento microextração em fase sólida “no tubo” e cromatografia líquida de alta eficiência. **Quim. Nova**, v. 28, n. 5, p.880-886, 2005.

RAY, W. A. Psychotropic drug use and the risk of hip fracture. **New Engl. J. Med.**, v. 12, n. 316, p. 363-369, 1987.

ROZENFELD, S. Prevalência, fatores associados e mau uso de medicamentos entre os idosos: uma revisão. **Cad. Saúde Pública**, v. 19, n. 3, p.717-723, 2003.

RUELA, A. L. M. ; FIGUEIREDO, E.C. ; PEREIRA, G. R. . Molecularly imprinted polymers as nicotine transdermal delivery systems. **Chem. Eng. J.**, v. 248, p. 1-8, 2014.

SELLERGREN, B.; ESTEBAN, A. M. **The use of molecularly imprinted polymers for sampling and sample preparation. Handbook of sample preparation.** New Jersey: John Wiley & Sons , 2010.

SILVA, B. J. G. **Avaliação da técnica SPME/LC na análise de antidepressivos em amostra de plasma para fins de monitorização terapêutica.** 2007. 126 f. (Mestrado em Química) - Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, USP, Ribeirão Preto, 2007

SILVA, D. L. **Preparação de partículas esféricas de sílica de impressão molecular.** 2010. 89 f. (Mestrado em Química) - Faculdade de Ciências da Universidade do Porto, Cidade do Porto,2010.

SILVA, M. R. **Desenvolvimento, avaliação e aplicação de um sistema de cromatografia gasosa de alta pressão.** 2012. 102 f. (Mestrado em Química Analítica) - Universidade de São Carlos, São Carlos, 2012.

STAHL, S. M. **Psicofarmacologia – base neurocientífica e aplicações práticas.** 2.ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 2006.

SWEETMAN, Sean C. **Martindale: the complete drug reference.** 34th ed London: Pharmaceutical Press, 2005.

TANAKA, E. Clinically significant pharmacokinetic drug interactions: with benzodiazepines **J. Clin. Pharm. Ther.**, v.24, p.347-355, 1999.

TARLEY, C. R. T.; SOTOMAYOR, M. D. P. T.; KUBOTA, L. T. Polímeros biomiméticos em química analítica. Parte 1: preparo e aplicações de MIP (—molecularly imprinted polymers) em técnicas de extração e separação. **Quím. Nova**, v. 28, n. 6, p. 1076-1086, 2005.

THURMAN, E. M.; SNAVELY, K. Advances in solid-phase extraction disks for environmental chemistry. **Trends Anal. Chem.**, v. 19, n. 1, p. 18-26, 2000.

TRIFIRÒ, G.L.; SPINA, E. Age-related Changes in Pharmacodynamics: Focus on Drugs Acting on Central Nervous and Cardiovascular Systems. **Curr. Drug. Metab.**, v.12, n.7, p. 611-620, 2011.

TURIEL, E.; ESTEBAN, A.M. Molecularly imprinted polymers for sample preparation: A review. **Anal. Chim. Acta.**, v.668, p.87–99, 2010.

UDDIN, M.N.; SAMANIDOU, V.F.; PAPADOYANNIS, I.N. Development and validation of an HPLC method for the determination of benzodiazepines and tricyclic antidepressants in biological fluids after sequential SPE. **J. Sep. Sci.**, v.31, p.2358 – 2370, 2008.

UDDIN, M.N.; SAMANIDOU, V.F.; PAPADOYANNIS, I.N. Bio-sample preparation and gas chromatographic determination of benzodiazepines – A review. **J. Chromatogr. Sci.**, v.51, p. 587-598, 2013.

UNITED STATES PHARMACOPEIAL DISPENSING INFORMATION. USP-DI **Advice for the Patient Drug Information in Lay Language**. 23rd ed. Massachusetts: Micromedex, 2003.

VITOR, R.V., et al. Application of molecularly imprinted polymer solid-phase extraction for salivary cotinine. **Anal. Bioanal. Chem.**, v.400, p.2109-2117, 2011.

XU, Z.; FANG, G.; WANG, S., Molecularly imprinted solid phase extraction coupled to high-performance liquid chromatography for determination of trace dichlorvos residues in vegetables, **Food Chem.**, v.119, p. 845-850, 2010.

YAN, H.; ROW, K., Characteristic and Synthetic Approach of Molecularly Imprinted Polymer. **Int. J. Mol. Sci.**, v.7, p.155-178, 2006.

YU, K.S.; YIM, D.S.; CHO, J.Y. Effect of omeprazole on the pharmacokinetics of moclobemide according to the genetic polymorphism of CYP2C19. **Clin. Pharmacol. Ther.**, v. 69, n.4, p.266-273, 2001

WEDERMEYER, R.T.; BLUME, H. Pharmacokinetic Drug Interaction Profiles of Proton Pump Inhibitors: An Update. **Drug Saf.**,v.37, p.201-211, 2014

WU, H., et al. Molecularly imprinted organic–inorganic hybrid membranes for selective separation of phenylalanine isomers and its analogue. **Sep. Purif. Technol.**, v.68, p.97-104, 2009.

ANEXO

ANEXO I

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARCIDO

Convidamos o (a) Sr (a) para participar da pesquisa **SÍNTESE DE UM POLÍMERO DE IMPRESSÃO MOLECULAR RESTRITO A LIGAÇÃO COM MACROMOLÉCULAS POR MEIO DE REVESTIMENTO COM ALBUMINA PARA EXTRAÇÃO DE BENZODIAZEPÍNICOS SEGUIDO DE ANÁLISE POR HPLC**. Este estudo tem como objetivo monitorar o uso dos benzodiazepínicos para garantir a efetividade e segurança para o usuário.

CONSENTIMENTO PÓS-INFORMAÇÃO

Eu, _____,

declaro que em ___/___/___ concordei voluntariamente em participar do projeto de pesquisa acima referido. Fui informado sobre o que o pesquisador quer fazer e porque precisa da minha colaboração, e entendi a explicação.

Os detalhes de que fui informado são:

1. O estudo implica em que eu me submeta a entrevistas e colheita de uma amostra de sangue, de 5mL, quantidade uma colher de sopa, de uma veia do meu braço com seringa, para entender como o remédio que eu tomo para ansiedade ou insônia se comporta no meu corpo.
2. O remédio que vai ser estudado já é o remédio que eu tomo há algum tempo e não foi dado por este grupo. Foi dado por meu médico que me atende pelo SUS. Este grupo não vai mudar meu remédio nem a quantidade que eu tomo.
3. Não sou obrigado a participar do projeto e posso sair do mesmo a qualquer momento sem qualquer prejuízo
4. A pesquisa não será feita se houver grandes riscos para mim.
5. Será garantido que não serei identificado e que será mantido o caráter confidencial da informação relacionada à minha privacidade.

6. Será garantido que receberei respostas a qualquer pergunta ou esclarecimento em qualquer fase da pesquisa.
7. Que não receberei nenhuma forma de remuneração pela participação no estudo e que terei direito a ressarcimento dos meus gastos com alimentação e transporte decorrentes da pesquisa.

Por isso, eu concordo em participar do projeto, sabendo que não vou ganhar nada e que posso sair quando quiser. Este documento é emitido em duas vias que serão ambas assinadas por mim e pelo pesquisador, ficando uma via com cada um de nós.

Assinatura do participante

Assinatura do Pesquisador Responsável

Alfenas, ___/ ___/ _____

ANEXO II

Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
ALFENAS



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Síntese de um polímero de impressão molecular restrito a ligação com macromoléculas por meio de revestimento com albumina para extração de benzodiazepínicos seguidos de análise por HPLC

Pesquisador: Aline Alves Swerts

Área Temática:

Versão: 3

CAAE: 10364512.9.0000.5142

Instituição Proponente: UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS - UNIFAL-MG

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 538.472

Data da Relatoria: 04/11/2013

Apresentação do Projeto:

O projeto em questão coloca como objetivo monitorar o uso de benzodiazepínicos para garantir a efetividade e segurança do paciente. Busca-se desenvolver um método de análise mais rápida das concentrações dos medicamentos no sangue. Pretende-se trabalhar com pacientes que foram submetidos às drogas: diazepam, clonagem, bromazepam e cloxazolam. Para isso será utilizado uma técnica de polímero de impressão molecular restritos à ligação com macromoléculas. Os sujeitos da pesquisa serão os pacientes em seguimento na Farmácia-Escola da Unifal que já utilizam o medicamento.

Objetivo da Pesquisa:

Introduzir a técnica RAM-MIP com estudos referentes à síntese, caracterização e aplicações em amostras reais. Estabelecer uma linha de pesquisa na área de preparo de amostras biológicas para análise de fármacos. Ampliar a aplicação da tecnologia de impressão molecular na área de Análises Toxicológicas. Sintetizar RAM-MIP para um grupo terapêutico (benzodiazepínicos). Investigar sua seletividade e seu potencial de eliminação de macromoléculas. Aperfeiçoar as condições experimentais para a extração do fármaco. Validar a metodologia de acordo com as recomendações do FDA. Aplicar o

Endereço: Rua Gabriel Monteiro da Silva, 700

Bairro: centro

CEP: 37.130-000

UF: MG

Município: ALFENAS

Telefone: (35)3299-1318

Fax: (35)3299-1318

E-mail: comite.etica@unifal-mg.edu.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
ALFENAS



Continuação do Parecer: 538.472

RAM-MIP desenvolvido as amostras reais de paciente em acompanhamento na Farmácia-Escola da Unifal-MG.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Descreve que o risco é mínimo, apenas a punção venosa e que esta será realizada com profissional treinado e competente.

E como benefícios: as orientações que receberão sobre os medicamentos que usam e sobre seus efeitos no organismo e o retorno da análise realizada no material coletado.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

O estudo apresenta relevância para o sujeito de pesquisa.

Serão investigadas pacientes em seguimento na Farmácia-Escola da UNIFAL-MG, que já utilizam benzodiazepínicos. Utilizam como critérios de inclusão os pacientes maiores de 18 anos admitidos no projeto Intervenção Farmacêutica em Pacientes Usuários de benzodiazepínicos, já aprovado sob o número 226/2011 da Farmácia-Escola da UNIFAL-MG

Após a obtenção, por escrito, do Consentimento Livre e Esclarecido, os participantes contribuirão com uma amostra de sangue para análise das concentrações plasmáticas dos fármacos em questão. Será coletada apenas uma amostra de sangue, aproximadamente 5 ml, de uma veia periférica com seringa heparinizada.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

TCLE adequado.

Recomendações:

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

As pendências foram respondidas pelo pesquisador, e estão adequadas a Resolução.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

O CEP acata o parecer do relator.

Endereço: Rua Gabriel Monteiro da Silva, 700

Bairro: centro

CEP: 37.130-000

UF: MG

Município: ALFENAS

Telefone: (35)3299-1318

Fax: (35)3299-1318

E-mail: comite.etica@unifal-mg.edu.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
ALFENAS



Continuação do Parecer: 538.472

ALFENAS, 24 de Fevereiro de 2014

Assinador por:
Maria Betânia Tinti de Andrade
(Coordenador)

Endereço: Rua Gabriel Monteiro da Silva, 700

Bairro: centro

CEP: 37.130-000

UF: MG

Município: ALFENAS

Telefone: (35)3299-1318

Fax: (35)3299-1318

E-mail: comite.etica@unifal-mg.edu.br