



Inês Marques Moreira

Relatórios de Estágio e Monografia intitulada “Análise de Benzodiazepinas em Toxicologia Forense” referentes à Unidade Curricular “Estágio”, sob orientação da Dra. Bruna Alexandra Teixeira Matias, da Dra. Maria Madalena Matias Fonseca Arriegas e do Professor Doutor Nuno Ricardo Esteves Ferreira e apresentados à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, para apreciação na prestação de provas públicas de Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas

Setembro 2018



Inês Marques Moreira

Relatórios de Estágio e Monografia intitulada “Análise de Benzodiazepinas em Toxicologia Forense” referentes à Unidade Curricular “Estágio”, sob a orientação da Dra. Bruna Alexandra Teixeira Matias e da Dra. Maria Madalena Matias Fonseca Arriegas e do Professor Doutor Nuno Ricardo Esteves Ferreira, apresentados à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, para apreciação na prestação de provas públicas de Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas.

Setembro 2018



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Eu, Inês Marques Moreira, estudante do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, com o nº 2014184151, declaro assumir toda a responsabilidade pelo conteúdo do Documento Relatórios de Estágio e Monografia intitulada “Análise de Benzodiazepinas em Toxicologia Forense” apresentados à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, no âmbito da unidade de Estágio Curricular.

Mais declaro que este Documento é um trabalho original e que toda e qualquer afirmação ou expressão, por mim utilizada, está referenciada na bibliografia, segundo os critérios bibliográficos legalmente estabelecidos, salvaguardando sempre os Direitos de Autor, à exceção das minhas opiniões pessoais.

Coimbra, 4 de setembro de 2018.

Inês Marques Moreira

(Inês Marques Moreira)

AGRADECIMENTOS

À Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, a toda a equipa docente e não docente, pela contribuição para o meu percurso académico.

Ao meu orientador interno, o Professor Doutor Nuno Ricardo Esteves Ferreira, por toda a disponibilidade, orientações e ajuda na elaboração desta monografia.

À Dra. Anabela Viegas, por me permitir estagiar na Farmácia Marbel. À Dra. Bruna Matias, pela orientação do estágio em farmácia comunitária.

A toda a equipa da Farmácia Marbel, por todos os conhecimentos transmitidos, pelos bons momentos passados e pela inesgotável paciência.

À Direção de Recursos Humanos, Financeiros e Patrimoniais do INFARMED, I.P., pela oportunidade de realizar este estágio e pelo acolhimento.

À Dra. Madalena Arriegas, pela orientação do estágio no INFARMED, I.P., disponibilidade e simpatia.

Aos meus amigos, por todo o apoio ao longo destes anos, nos bons e nos maus momentos, e por todos os momentos felizes.

À minha irmã, um exemplo. A mais linda!

Aos meus pais, sem os quais o meu percurso académico não seria possível, pelo apoio constante e por todos os conselhos.

“Anything's possible if you've got enough nerve”

- J.K. Rowling

ÍNDICE

PARTE I: RELATÓRIO DE ESTÁGIO – FARMÁCIA COMUNITÁRIA

Lista de Siglas e Abreviaturas.....	8
1. Introdução.....	9
1.1. Farmácia Marbel.....	9
2. Pontos Fortes.....	10
2.1. Recursos Humanos.....	10
2.2. Localização e instalações da farmácia.....	11
2.3. “Back-office”.....	11
2.3.1. Receção e armazenamento de encomendas.....	12
2.3.2. Conferência de <i>stocks</i>	12
2.3.3. Conferência de receituário.....	12
2.4. Atendimento.....	13
2.5. Gestão <i>Kaizen</i>	14
2.6. Serviços farmacêuticos.....	15
2.7. Preparação de manipulados.....	15
2.8. Homeopatia.....	16
2.9. <i>Sifarma2000</i> [®]	17
3. Pontos Fracos.....	17
3.1. Localização da farmácia.....	17
3.2. Pouca preparação prática e lacunas na formação académica.....	18
4. Oportunidades.....	18
4.1. Formações.....	18
5. Ameaças.....	19
5.1. Pedidos de MSRM – Ansiolíticos, sedativos e hipnóticos, anti-inflamatórios não-esteróides (AINE) e antibióticos	19
5.2. Outros locais de venda	19
5.3. Medicamentos esgotados nos fornecedores.....	20
6. Conclusão.....	20
7. Referências Bibliográficas.....	21

PARTE II: RELATÓRIO DE ESTÁGIO – INFARMED – AUTORIDADE NACIONAL DO MEDICAMENTO E PRODUTOS DE SAÚDE, I.P.

Lista de Siglas e Abreviaturas.....	23
1. Introdução.....	24
1.1. INFARMED – Autoridade Nacional do Medicamento e Produtos de Saúde, I.P.....	24
1.1.1. Comissão Nacional de Farmácia e Terapêutica.....	25
2. Pontos Fortes.....	26
2.1. Recursos Humanos.....	26
2.2. Trabalho realizado.....	27
2.3. Reuniões da Comissão Nacional de Farmácia e Terapêutica.....	29
3. Pontos Fracos.....	29
4. Oportunidades.....	29

4.1. Fórum do Cidadão.....	29
4.2. Vista aos laboratórios do INFARMED, I.P.....	30
5. Ameaças.....	30
5.1. Situação de instabilidade vivida no INFARMED, I.P.....	30
6. Conclusão.....	30
7. Referências Bibliográficas.....	31
8. Anexos.....	32

PARTE III: MONOGRAFIA – ANÁLISE DE BENZODIAZEPINAS EM TOXICOLOGIA FORENSE

Resumo.....	34
Abstract.....	35
Lista de Siglas e Abreviaturas.....	36
1. Introdução.....	38
1.1. Benzodiazepinas.....	38
1.2. Toxicologia forense.....	40
2. Benzodiazepinas.....	41
2.1. Contexto histórico.....	41
2.2. Estrutura química, mecanismo de ação e metabolismo.....	43
2.3. Efeitos das benzodiazepinas.....	44
2.3.1. Efeitos benéficos das benzodiazepinas.....	45
2.3.2. Riscos das benzodiazepinas.....	46
2.4. Abuso de benzodiazepinas.....	47
2.5. Importância da análise de benzodiazepinas em toxicologia forense.....	48
3. Análise de benzodiazepinas.....	49
3.1. Amostras biológicas.....	49
3.1.1. Colheita, acondicionamento e armazenamento de amostras.....	50
3.1.2. Sangue, plasma e sêrum.....	51
3.1.3. Urina.....	51
3.1.4. Fígado.....	52
3.1.5. Humor vítreo.....	52
3.1.6. Fluido oral.....	53
3.1.7. Cabelo.....	53
3.2. Preparação de amostras.....	55
3.2.1. Extração líquido – líquido (LLE).....	55
3.2.2. Extração em fase sólida (SPE).....	56
3.3. Métodos de análise.....	58
3.3.1. Imunoensaios.....	59
3.3.2. Cromatografia em Camada Fina (TLC).....	61
3.3.3. Cromatografia Gasosa (GC).....	62
3.3.4. Cromatografia líquida (LC).....	64
4. Conclusão.....	67
5. Referências Bibliográficas.....	69

PARTE I
RELATÓRIO DE ESTÁGIO
FARMÁCIA COMUNITÁRIA

Lista de Siglas e Abreviaturas

AINE – Anti-Inflamatório Não-Esteróide

CTT – Correios, Telégrafos e Telefones

MICF – Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas

MNSRM – Medicamentos Não Sujeitos a Receita Médica

MSRM – Medicamentos Sujeito a Receita Médica

PIC – Preço Impresso na Cartonagem

PVP – Preço de Venda ao Público

SNS – Serviço Nacional de Saúde

SWOT – Pontos Fortes, Pontos Fracos, Oportunidades e Ameaças (do inglês: *Strengths, Weaknesses, Opportunities and Threats*)

I. INTRODUÇÃO

Por ser o local de prestação de serviços de saúde mais facilmente acessível ao cidadão, a farmácia comunitária é muitas vezes o primeiro local onde os utentes se dirigem na presença de doença e na procura da sua prevenção. Assim, é essencial que o farmacêutico esteja preparado não só para fazer uma correta e crítica dispensa de medicamentos, mas também para fazer o aconselhamento de Medicamentos Não Sujeitos a Receita Médica (MNSRM), de produtos de cosmética e de veterinária, de suplementos alimentares, entre outros.

O presente relatório foi redigido no âmbito da Unidade Curricular “Estágio” do 5º ano do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas (MICF). Este estágio cobre-se de extrema importância, pois permite não só pôr em prática os conhecimentos técnicos e científicos dos futuros farmacêuticos, como é muitas vezes a primeira oportunidade de ter contacto com a vertente de atendimento ao público. Além disso, o estágio permite ainda ter noção de como é feita a gestão de uma farmácia comunitária, de todas as tarefas que diariamente são realizadas “atrás do balcão” de maneira a que o atendimento ao público decorra sem percalços e que o utente saia satisfeito da farmácia.

Este relatório é relativo ao meu estágio na Farmácia Marbel realizado entre o dia 2 de novembro de 2017 e 29 de março de 2018 sob a orientação da Dra. Bruna Matias e tomará a forma de uma análise SWOT, sendo feita uma análise dos pontos fortes (*Strengths*), pontos fracos (*Weaknesses*), oportunidades (*Opportunities*) e ameaças (*Threats*). A figura 1 apresenta, esquematicamente, os pontos fortes, pontos fracos, oportunidades e ameaças descritos neste relatório.

I.1. Farmácia Marbel

A Farmácia Marbel localiza-se na Avenida de Roma, pertencente à freguesia de Alvalade e ao concelho de Lisboa.

É uma farmácia com uma grande componente de dermocosmética, bem como de naturopatia e homeopatia. A nível de instalações, é uma farmácia bastante ampla, com um centro de dermocosmética (onde se realiza também a determinação da tensão arterial), seis balcões para atendimento ao público e dois gabinetes, usados para a determinação de parâmetros bioquímicos e para consultas de nutrição, fisioterapia e podologia, bem como para a administração de injetáveis e furo de orelhas. No interior, além de um gabinete e da zona de arrumação de medicamentos, encontra-se um espaço destinado ao trabalho de “back-office” e um laboratório.

De segunda a sexta-feira, a Farmácia Marbel funciona das 8:30h às 24:00h, sendo que aos sábados, domingos e feriados abre às 10:00h, encerrando também às 24:00h.

A farmácia faz entrega de produtos ao domicílio e através dos CTT (Correios, Telégrafos e Telefones), nomeadamente de produtos não sujeitos a receita médica, sendo que é frequente a realização de encomendas de produtos por telefone e correio eletrónico.

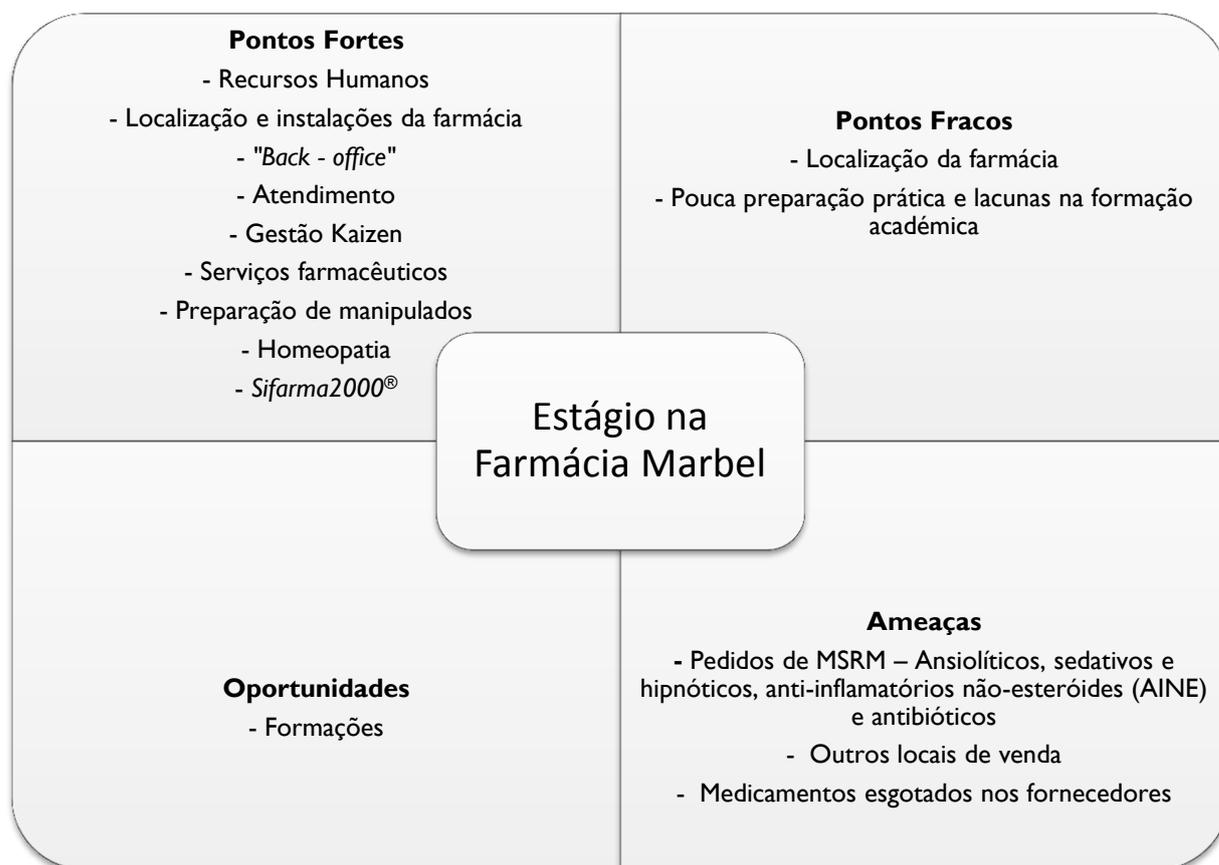


Figura I – Resumo esquemático da análise SWOT relativa ao meu estágio na Farmácia Marbel.

2. PONTOS FORTES

2.1. Recursos Humanos

Durante o meu período de estágio, houve algumas alterações na equipa, sendo que no término do meu estágio, a equipa era constituída pela proprietária e diretora técnica - a Dra. Anabela Viegas - por sete farmacêuticos (duas das quais farmacêuticas adjuntas), por seis técnicos de farmácia (três responsáveis pelo trabalho de "back-office") e por uma técnica de dermocosmética.

Além do atendimento ao público, cada elemento da equipa tem outras tarefas a cumprir, como a gestão das diversas marcas de dermocosmética, a preparação de

manipulados, a realização de encomendas e a preparação de produtos para serem entregues ao domicílio, originando um elevado volume de trabalho. No entanto, e apesar disto, todos os membros da equipa sempre se mostraram disponíveis para me ensinar e para esclarecer todas as minhas dúvidas. Senti-me permanentemente apoiada por todos, não só nos primeiros dias de atendimento ao público (quando havia uma maior insegurança da minha parte), mas também ao longo de todo o estágio: além de me auxiliarem em situações de aconselhamento, davam-me conselhos acerca de como melhor lidar com os utentes e esclareciam-me em relação a aspetos relacionados com a gestão da farmácia e com a profissão farmacêutica em geral. Assim, considero os recursos humanos da farmácia um ponto muito forte, essencial no sucesso do meu estágio.

2.2. Localização e instalações da farmácia

Vários aspetos na localização desta farmácia influenciam o tipo de utentes: o facto de se encontrar no bairro de Alvalade leva a que parte dos utentes sejam pessoas de idade, clientes fidelizados à farmácia; a sua localização numa movimentada avenida de Lisboa, perto de vários serviços, leva a que muitos dos utentes sejam pontuais, muitas vezes à procura de um produto específico, especialmente na área da naturopatia e homeopatia, uma vez que a Farmácia Marbel é uma referência nestas áreas; e a sua proximidade a uma clínica dentária e ao Centro Hospitalar Psiquiátrico de Lisboa faz com que muitos dos utentes destes serviços se dirijam à farmácia para levantar os seus medicamentos. Todos estes fatores levam a que haja então uma grande heterogeneidade de utentes, o que me obrigou a adaptar a minha postura e o meu discurso à idade e posição socioeconómica de cada utente, o que penso que foi sem dúvida uma mais-valia na minha formação.

A nível de instalações, o facto de os balcões serem individuais contribui para a sensação de privacidade por parte do utente, fazendo com que este se sinta mais à vontade. O facto da determinação de parâmetros bioquímicos se realizar dentro do gabinete faz com que o utente se sinta mais confortável. O laboratório está adequadamente equipado para os medicamentos manipulados que aí são preparados.

2.3. “Back-office”

O meu primeiro mês de estágio foi passado no “back-office”, onde tive oportunidade de realizar várias tarefas, sendo de destacar as seguintes.

2.3.1. Receção e armazenamento de encomendas

Uma das primeiras tarefas que realizei no meu estágio foi o armazenamento de encomendas. Esta atividade permitiu-me começar a ter contacto com os medicamentos, a associar princípios ativos às respetivas marcas, bem como a conhecer a localização dos vários produtos na farmácia, o que me foi útil quando comecei no atendimento ao público.

De seguida, comecei a realizar a receção de encomendas, o que me permitiu ir familiarizando com o sistema informático, o *Sifarma2000*[®]. Quando se recebe uma encomenda, é importante confirmar as quantidades de todos os produtos encomendados e faturados bem como a sua validade e preço. Para produtos sem preço impresso na cartonagem (PIC), é preciso verificar que o preço de venda ao público (PVP) a ser praticado é adequado, e é também importante durante a receção da encomenda separar os produtos reservados.

2.3.2. Conferência de stocks

Por vezes, erros na receção dos produtos, na dispensa e na gestão de produtos reservados levam a que haja erros de *stock*. Este tipo de erros pode prejudicar o atendimento ao balcão e criar confusões, pelo que é importante que os *stocks* sejam frequentemente verificados.

2.3.3. Conferência de receituário

Outra atividade que integrou o meu estágio foi a conferência de receituário. Esta atividade, realizada diariamente, tem dois objetivos principais: garantir que o utente recebeu a medicação correta (aquela prescrita pelo médico) e garantir que a farmácia recebe o valor da comparticipação.

Nas receitas manuais, é então necessário conferir se os dados do utente se encontram preenchidos: o seu nome, número de utente do Serviço Nacional de Saúde (SNS) e número de beneficiário da entidade financeira responsável (se aplicável). Os dados do médico devem ser também conferidos: nome, número de cédula profissional, especialidade, e local de prescrição (sendo que nem todos estes dados têm de estar presentes). Deve verificar-se que uma exceção legal foi escolhida e se há regime de comparticipação especial, bem como se a receita ainda se encontra dentro do seu prazo de validade e se a assinatura do médico está presente. Os medicamentos dispensados devem ser comparados com aqueles que foram prescritos, sendo importante ter atenção ao nome do medicamento, dosagem, forma de libertação e número de unidades. Por fim, deve haver uma assinatura do utente em local apropriado, bem como a assinatura do farmacêutico, carimbo da farmácia e

data da dispensa. Na Farmácia Marbel, a conferência de cada receita é feita por duas pessoas separadamente, sendo que as receitas são depois agrupadas em lotes conforme o seu número e o organismo responsável pela participação.

2.4. Atendimento

O atendimento ao público é sem dúvida é ponto alto do estágio em farmácia comunitária. Depois de um mês a trabalhar no “back-office” e de assistir a alguns atendimentos, comecei no atendimento ao balcão. Nos primeiros dias estava muito insegura, mas com o apoio da equipa e com a experiência fui ganhando segurança, e no final do meu estágio já me sentia perfeitamente à-vontade no contacto com o público.

Os atendimentos que passavam pela dispensa de receita eram normalmente aqueles mais simples. Apesar de ao início me surgirem muitas dúvidas devido a questões inerentes a este tipo de atendimentos (tipo de receita, entidade financeira responsável, justificações técnicas, regimes especiais de participação, dispensa de estupefacientes e psicotrópicos) e ao facto de não estar completamente familiarizada com o *Sifarma2000*[®], bastaram algumas semanas para que estas dúvidas já só surgissem pontualmente. Quando dispensava os medicamentos, assegurava-me de que o utente sabia para que era cada medicamento e como o tomar e, no caso de existirem, quais as precauções a ter com cada um.

Quanto aos atendimentos que passavam por aconselhamento farmacêutico, esses foram aqueles em que senti mais dificuldade, mas também aqueles em que notei uma maior evolução da minha parte. Nas primeiras semanas, era raro o atendimento deste tipo em que não tivesse de recorrer à ajuda de um membro da equipa. No final do estágio, já tinha, na maioria dos casos, capacidade para dar resposta às necessidades dos utentes.

Nestas situações, depois de o utente expor o seu problema, tentava perceber se me tinha descrito todos os sinais e sintomas, há quanto tempo estes tinham surgido, se tinha algum problema de saúde e que medicamentos tomava. Se achasse necessário, recomendava então o(s) Medicamento(s) Não Sujeito(s) a Receita Médica (MNSRM) mais indicado(s), explicando também quais as medidas não farmacológicas a ser tomadas (caso 1 e 2). Várias situações exigiam um encaminhamento para o médico (caso 3). Mesmo em casos em que MNSRM me pareciam indicados para a situação do utente, referia que se não houvesse um alívio dos sintomas depois de um certo intervalo de tempo deveria ser consultado um médico.

Caso 1 – dispensa de MNSRM

Uma jovem dirigiu-se à farmácia, com queixas de prurido na zona genital, referindo que tinha começado há uns dias a tomar antibiótico para uma infeção urinária. Expliquei à utente que o antibiótico podia ter potenciado uma infeção fúngica *por Candida albicans* e indiquei, para o tratamento da candidíase, *Gino-Canesten*[®] (cujo princípio ativo é o clotrimazol), explicando como deveria aplicar. Aconselhei também toma de um probiótico – *Ergyphilus*[®] *Intima* - para a reposição da flora e um gel de lavagem íntimo (*Lactacyd*[®]) para ajudar a diminuir o desconforto vaginal.

Caso 2 – Dispensa de MNSRM

A utente dirigiu-se à farmácia dizendo que estava constipada, queixando-se de dores no corpo, tosse com expetoração e o nariz congestionado. Depois de confirmar com a utente que tinha referido todos os sintomas e que não tomava mais nenhuma medicação nem tinha outros problemas de saúde, aconselhei, para as dores no corpo e congestão nasal, *Antigrippine*[®] *Trieffect* (que contém paracetamol e fenilefrina, um descongestionante nasal), recomendando a toma de dois comprimidos em intervalos de 6 horas. Como a utente referia uma congestão nasal forte (sem presença de rinorreia), dispensei *Vibrocil*[®] *Actilong*, cuja substância ativa é a xilometazolina, um descongestionante. Expliquei que deveriam ser aplicadas 2 a 3 gotas em cada narina 3 a 4 vezes ao dia, e que a duração do tratamento não deveria ultrapassar os 7 dias, uma vez que um período de tratamento mais logo podia levar ao surgimento de efeito *rebound*. Para a tosse aconselhei *Fluimucil*[®] (acetilcisteína), comprimido efervescente, explicando que deveria tomar um por dia ao deitar.

Caso 3 – Encaminhamento para o médico

Uma utente dirigiu-se à farmácia, queixando-se de dor num dente que dura há mais de dois dias apesar da toma de um anti-inflamatório não esteróide (*Brufen*[®]). Neste caso, aconselhei a utente a consultar um dentista o mais rapidamente possível, uma vez que possivelmente tinha uma infeção no dente e seria necessário antibiótico. Dispensei uma caixa de *Brufen*[®] de 400 mg (que a utente já não tinha) para alívio dos sintomas até à consulta, informando que a sua toma não deveria exceder sete dias consecutivos.

2.5. Gestão Kaizen

Kaizen é uma filosofia, originada no Japão, que defende a melhoria contínua através de todas as pessoas, todos os dias, em todos os lugares. Apoiando-se em conceitos como organização, produtividade e eficiência operacional, o *Kaizen* aplicado a uma farmácia

permite detetar erros com celeridade, melhorar a qualidade do atendimento ao utente e aumentar a rentabilidade.¹

Seguindo o conceito de organização do método *Kaizen*, na Farmácia Marbel há um lugar para cada objeto, e cada local de arrumação está etiquetado; na área de arrumação de medicamentos, há zonas demarcadas no chão para separação de banheiras que já foram rececionadas e que ainda estão por rececionar. Isto foi para mim uma grande vantagem, especialmente nos primeiros dias, pois permitia-me encontrar facilmente aquilo que procurava ou saber onde arrumar algo. Atrás dos balcões, encontra-se o “*cockpit*”, onde estão alguns dos produtos que a farmácia mais vende, de maneira a que o farmacêutico os tenha rapidamente ao seu alcance.

Tive várias vezes oportunidade de assistir ao *Kaizen* diário, uma reunião rápida onde é feito um ponto de situação das vendas e dos objetivos diários/mensais, onde são relembradas as campanhas em vigor e discutidos outros assuntos pertinentes.

2.6. Serviços farmacêuticos

A Farmácia Marbel oferece vários serviços farmacêuticos, como a determinação da pressão arterial e a medição de parâmetros bioquímicos como o colesterol e a glicémia. O que eu realizava mais frequentemente era a determinação da tensão arterial. Caso os valores medidos estivessem fora do intervalo de referência, tentava perceber com o utente se tinha acontecido alguma situação que pudesse provocar esta alteração, se já era frequente e se tomava alguma medicação, aconselhando-os a consultar um médico se considerasse necessário. A farmácia realiza ainda a administração de vacinas não abrangidas pelo Plano Nacional de Vacinação e de medicamentos injetáveis, bem como o furo de orelhas. Semanalmente, há consultas de nutrição e de fisioterapia, e consultas de podologia cerca de duas vezes por mês.

2.7. Preparação de manipulados

Um medicamento manipulado é “qualquer fórmula magistral ou preparado oficial preparado e dispensado sob a responsabilidade de um farmacêutico”. Uma fórmula magistral é um “medicamento preparado em farmácia de oficina ou nos serviços farmacêuticos hospitalares segundo receita médica que especifica o doente a quem o medicamento se destina” e um preparado oficial é “qualquer medicamento preparado segundo as indicações compendiais, de uma farmacopeia ou de um formulário, em farmácia de oficina ou nos serviços farmacêuticos hospitalares, destinado a ser dispensado diretamente aos doentes assistidos por essa farmácia ou serviço”.²

Na farmácia Marbel surgem frequentemente pedidos de medicamentos manipulados. Assim, tive oportunidade de preparar vários medicamentos manipulados, entre os quais uma suspensão oral de trimetoprim a 1%, uma solução alcoólica de ácido bórico saturada, uma pomada de enxofre em vaselina a 5% e uma suspensão oral de propanolol.

Começava por imprimir a ficha de manipulado, preenchendo-a com a quantidade a utilizar de cada matéria-prima, bem como o fornecedor, o lote e a validade. Depois de arranjar a minha zona de trabalho e de verificar que tinha todas as matérias-primas e materiais necessários, preparava então o manipulado, seguindo os procedimentos descritos na ficha de manipulado e respeitando as normas das boas práticas de preparação de manipulados. Depois do medicamento preparado, analisava e registava as suas características organolépticas e terminava o preenchimento da ficha. Preparava depois o rótulo – onde constavam, entre outros dados, o nome do doente, a identificação do medicamento, o prazo de utilização, a identificação da farmácia e do diretor técnico e o contacto – e fazia o cálculo do preço.

Apesar de medicamentos manipulados serem cada vez menos prescritos, acho muito importante que um farmacêutico saiba como os elaborar (bem como preencher a documentação associada), pelo que considero a oportunidade de os realizar um ponto forte do meu estágio.

2.8. Homeopatia

A homeopatia é um método terapêutico que se baseia no princípio da similitude – “semelhante cura semelhante” – ou seja, que defende o valor terapêutico de substâncias que causariam em pessoas saudáveis sintomas semelhantes aos observados na pessoa doente. Os medicamentos homeopáticos são preparados a partir de substâncias naturais – vegetais, animais e químicas/minerais – através de sucessivas diluições e agitações.^{3 4}

A Farmácia Marbel oferece uma grande variedade de produtos homeopáticos, sendo que muitos dos utentes lá se dirigem à procura de este tipo de medicamentos. Apesar de o estudo de medicamentos homeopáticos não fazer parte do plano curricular do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, estes são cada vez mais procurados por pessoas que procuram uma alternativa à alopatia, pelo que considero um ponto forte o facto de ter trabalhado com este tipo de produtos.

2.9. Sifarma2000®

O *Sifarma2000*® é uma ferramenta de gestão e atendimento das Farmácias Comunitárias desenvolvida pela Glintt.⁵

No que respeita à parte da gestão, é através do *Sifarma2000*® que são realizadas e recebidas as encomendas, que são geradas listas para controlo de *stocks* e validades, que é feito o cálculo do preço de manipulados de medicamentos, que é organizado e gerido o receituário, entre outras tarefas.

No que respeita ao atendimento, o *Sifarma2000*® foi para mim um grande apoio. Para quase todos os Medicamentos Sujeitos a Receita Médica (MSRM) e MNSRM possui informações acerca da indicação terapêutica, posologia habitual, composição, contraindicações, interações, reações adversas e precauções, o que me ajudava muitas vezes a esclarecer possíveis dúvidas. Era frequente os utentes pedirem um produto que já tinham levado anteriormente, mas não se lembrarem do nome, ou não se lembrarem de que laboratório costumavam levar um certo medicamento; neste caso, o *Sifarma2000*® era muitas vezes útil uma vez que, caso o utente tivesse ficha, era possível ter acesso à lista de todos os produtos que tinha adquirido no passado. Achei que era intuitivo e desenhado para evitar erros de dispensa (ao apresentar um ecrã final de verificação através da leitura dos códigos de barras).

3. PONTOS FRACOS

3.1. Localização da farmácia

Referi acima a localização da farmácia como um ponto forte, uma vez que me permitiu ter contacto com uma grande heterogeneidade de utentes. No entanto, o facto de a farmácia se encontrar localizada numa zona movimentada, perto de diversos serviços e com muito pouco estacionamento disponível, leva a que muitas vezes os utentes fiquem rapidamente impacientes. Ao longo do tempo fui aprendendo a lidar melhor com os utentes, mas especialmente nos primeiros tempos de atendimento ao público este tipo de situações deixava-me mais nervosa (especialmente quando se juntavam problemas como erros de *stock* ou produtos esgotados) fazendo com que cometesse erros que provavelmente não cometeria de outra maneira.

3.2. Pouca preparação prática e lacunas na formação académica

Ao longo do curso realizei dois estágios de verão que me permitiram ir ganhando experiência no atendimento ao público, pelo que aquilo em que senti mais dificuldade ao longo do estágio foi sem dúvida a questão do aconselhamento farmacoterapêutico. Na minha opinião, o curso de Ciências Farmacêuticas dá-nos sem dúvida bases teóricas suficientes para podermos desempenhar com sucesso o nosso papel como farmacêuticos, mas falha a nível de preparação prática. As cadeiras que abordam questões mais práticas do atendimento são poucas. Áreas como puericultura e maternidade, ortopedia, higiene oral, patologias oftálmicas, material e cuidado de feridas e suplementação alimentar são pouco abordadas ao longo do curso mas são áreas em que os nossos conhecimentos são frequentemente exigidos. As unidades curriculares “Preparações de Uso Veterinário” e “Dermofarmácia e Cosmética” dão-nos bases nestas áreas, mas não são suficientes e os programas estão desajustados daquilo que é exigido a um profissional de farmácia comunitária nestas áreas.

Reconheço as lacunas que acima referi não sendo preenchidas com a experiência profissional; ainda assim, penso que o curso deveria estar mais virado para a prática, de maneira a preparar melhor os futuros farmacêuticos para aquilo que é a realidade de uma farmácia comunitária.

4. OPORTUNIDADES

4.1. Formações

Ao longo do meu estágio, tive oportunidade de assistir a diversas formações, de entre as quais destaco:

- Omega Pharma, em que foram apresentados vários produtos da linha *Paranix*[®], *NiQuitin*[®] e a *EllaOne*[®];
- PharmaNord, em que foi apresentado o *BioActivo*[®] *Selénio+Zinco*;
- Avène, com exposição de vários produtos de maquilhagem;
- Plantur, com apresentação de vários produtos capilares;
- PharmaOne, como exposição de vários produtos da gama *Spirularin*[®].

Considero estas formações uma oportunidade uma vez me permitiram não só conhecer novos produtos, mas também adquirir conhecimentos para o aconselhamento nestas áreas e bases para a realização de *cross-selling*.

5. AMEAÇAS

5.1. Pedidos de MSRM – Ansiolíticos, sedativos e hipnóticos, anti-inflamatórios não-esteróides (AINE) e antibióticos

Era frequente haver situações de solicitação de ansiolíticos, sedativos e hipnóticos, anti-inflamatórios não-esteróides e antibióticos sem apresentação da receita médica, ou com apresentação de receita em estado dispensado ou com prazo de validade já ultrapassado.

No caso de ansiolíticos, sedativos e hipnóticos, fazia algumas questões ao utente e consultava a sua ficha no *Sifarma2000*[®] (se tivesse), para saber se o medicamento solicitado era realmente medicação habitual e compreender por que razão o utente não tinha receita. Se depois de uma ponderação cuidadosa chegasse à conclusão que devia dispensar o medicamento, fazia uma venda suspensa e explicava ao utente que assim que pudesse devia pedir ao médico uma receita para trazer à farmácia.

Quando um utente solicitava um AINE sujeito a receita médica explicava que não podia dispensar e sugeria um AINE não sujeito a receita médica, sendo que, em situações mais graves, aconselhava também que o utente consultasse um médico. Em situações de pedidos de antibióticos, explicava ao utente que a dispensa destes só pode ser feita com receita médica e, pois só um médico conseguiria determinar qual o melhor antibiótico para cada situação e para cada doente. Se achasse pertinente, dispensava MNSRM para alívio dos sintomas e insistia que o utente consultasse um médico.

Considero estas situações como ameaças porque muitas vezes a recusa em ceder este tipo de medicamentos provoca um sentimento de revolta no utente, acabando por gerar um sentimento de desconfiança em relação à farmácia e ao farmacêutico, pois sentem que o farmacêutico não se preocupa com a sua saúde e bem-estar, quando é precisamente o contrário.

5.2. Outros locais de venda

Esta é uma ameaça direta à venda de MNSRM e outros produtos (suplementos alimentares, produtos de cosmética, puericultura, entre outros), mas que acaba por afetar indiretamente toda a farmácia.

Várias vezes, quando informados sobre o preço de um MNSRM/suplemento alimentar/outras, os utentes respondiam com “encontrei na Internet com um preço mais baixo” ou “comprei mais barato na parafarmácia x”. Locais de venda de medicamentos não sujeitos a receita médica associados a grandes superfícies comerciais e lojas *online* conseguem ter menos gastos, o que lhes permite apresentar preços de venda ao público

(PVPs) mais competitivos que as farmácias. Isto afeta economicamente a farmácia, e pode também afetar a saúde do utente, uma vez que MNSRM, suplementos alimentares e outros produtos não são isentos de reações adversas, contraindicações e precauções a ter em conta, e muitas vezes, ao adquirir estes produtos através dos canais acima referidos, o utente não recebe todas as informações necessárias.

5.3. Medicamentos esgotados nos fornecedores

A quebra frequente no fornecimento de alguns medicamentos é uma situação que não só gera descontentamento no utente como pode pôr em risco a sua saúde. Apesar de existirem algumas estratégias para evitar a falta de medicamentos – como o Projeto Via Verde do Medicamento – estas não são suficientes para garantir o acesso de todos os utentes à medicação necessária. Quando me deparava com a necessidade de um medicamento esgotado que não conseguia encomendar em nenhum dos armazéns de distribuição que fornece a Farmácia Marbel, tentava pedir o medicamento numa das outras quatro farmácias do grupo. No entanto, isto nem sempre resolvia a situação, e restava-me explicar ao doente que se o medicamento não voltasse a estar disponível no tempo necessário, teria de procurar noutra farmácia que ainda tivesse o produto em *stock* ou falar com o médico para alterar a terapêutica.

6. CONCLUSÃO

Ter a experiência de estagiar na Farmácia Marbel foi muito gratificante e sem dúvida que ultrapassou todas as minhas expectativas. Tive oportunidade não só de por em prática os conhecimentos que obtive ao longo do MICEF, mas também de aprender muito mais. Apesar de terem existido alguns momentos de ansiedade e de preocupação, em que duvidei da minha preparação e das minhas capacidades, estes foram uma fonte de aprendizagem e é com satisfação que olho para trás e concluo que foram sem dúvida cinco meses de progresso. Foi indubitavelmente um período de enorme crescimento, não só profissionalmente como também pessoalmente: tornei-me mais confiante nos meus conhecimentos, nas minhas capacidades e na minha relação com os outros.

Sei que, sendo este estágio a fase final do MICEF, não é de todo o final da minha aprendizagem. Espero, ao longo da minha carreira, continuar sempre com um espírito curioso, usando os meus conhecimentos e competências ao serviço de cada utente individualmente e da sociedade em geral.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. COSTA, Maria Jorge - **Kaizen**. Revista Saúde. (2016). [Acedido a 29 de abril de 2018]. Disponível na Internet: <https://www.revistasauda.pt/noticias/Pages/Kaizen.aspx>
2. **Portaria n.º 594/2004, de 2 de Junho: Boas práticas a observar na preparação de medicamentos manipulados em farmácia de oficina e hospitalar**. [Acedido a 24 de abril de 2018]. Disponível na Internet: http://www.infarmed.pt/documents/15786/17838/portaria_594-2004.pdf/d8b8cac3-3250-4d05-b44b-51c5f43b601a
3. **O que é a Homeopatia?** [Acedido a 27 de abril de 2018]. Disponível na Internet: <https://www.farmaciasportuguesas.pt/menu-principal/bem-estar/o-que-e-a-homeopatia.html>
4. **Compreender os medicamentos homeopáticos**. [Acedido a 27 de abril de 2018]. Disponível na Internet: <https://www.farmaciasportuguesas.pt/menu-principal/bem-estar/compreender-os-medicamentos-homeopaticos.html>
5. GLINTT - **Sifarma**. [Acedido a 24 de abril de 2018]. Disponível na Internet: <https://www.glintt.com/pt/o-que-fazemos/ofertas/SoftwareSolutions/Paginas/Sifarma.aspx>

PARTE II
RELATÓRIO DE ESTÁGIO
INFARMED, I.P.

Lista de Siglas e Abreviaturas

AIM – Autorização de Introdução no Mercado

ARS – Administração Regional de Saúde

BPC – Boas Práticas Clínicas

BPD – Boas Práticas de Distribuição

BPF – Boas Práticas de Fabrico

BPFarm – Boas Práticas de Farmácia

CFT – Classificação Farmacoterapêutica

CFT – Comissão de Farmácia e Terapêutica

CHNM – Código Hospitalar Nacional do Medicamento

CNFT – Comissão Nacional de Farmácia e Terapêutica

CNPEM – Código Nacional para a Prescrição Eletrónica de Medicamentos

DCI – Denominação Comum Internacional

FNM – Formulário Nacional do Medicamento

INFARMED – Autoridade Nacional do Medicamento e Produtos de Saúde, I.P.

MICF – Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas

RCM – Resumo das Características do Medicamento

SNS – Serviço Nacional de Saúde

SWOT – Pontos Fortes, Pontos Fracos, Oportunidades e Ameaças (do inglês: *Strengths, Weaknesses, Opportunities and Threats*)

I. INTRODUÇÃO

O presente relatório foi redigido no âmbito da Unidade Curricular “Estágio” do 5º ano do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas (MICF). Este relatório é relativo ao meu estágio no INFARMED – Autoridade Nacional do Medicamento e Produtos de Saúde, I.P., realizado entre o dia 9 de abril de 2018 e 29 de junho de 2018 sob a orientação da Dra. Madalena Arriegas. O estágio foi realizado na área da Comissão Nacional de Farmácia e Terapêutica. O relatório tomará a forma de uma análise SWOT, sendo feita uma análise dos pontos fortes (*Strengths*), pontos fracos (*Weaknesses*), oportunidades (*Opportunities*) e ameaças (*Threats*). A figura I apresenta, esquematicamente, os pontos fortes, pontos fracos, oportunidades e ameaças descritos neste relatório.

I.1. INFARMED – Autoridade Nacional do Medicamento e Produtos de Saúde, I.P.

O INFARMED, I.P. é um instituto público de regime especial, nos termos da lei, integrado na administração direta do Estado, dotado de autonomia administrativa, financeira e património próprio, encontrando-se sob tutela do Ministério da Saúde.¹

O INFARMED, I.P. é a autoridade reguladora nacional que avalia, autoriza, regula e controla os medicamentos de uso humano e os produtos de saúde (designadamente os dispositivos médicos e os produtos cosméticos e de higiene corporal). A sua principal missão é garantir a qualidade, segurança e eficácia dos medicamentos, prevenindo os riscos decorrentes da sua utilização, assegurando os mais elevados padrões de saúde pública e a defesa dos interesses do consumidor.²

São várias as áreas de intervenção do Infarmed. Uma destas áreas está relacionada com a investigação, avaliação e autorização de medicamentos - incluindo a aplicação das Boas Práticas Clínicas (BPC) na realização de ensaios clínicos – bem como com a investigação, avaliação, registo, monitorização e supervisão de produtos de saúde. O Infarmed é também responsável pelo licenciamento, auditoria e inspeção dos fabricantes, distribuidores grossistas e farmácias, assegurando o cumprimento das normas aplicáveis a cada operador, nomeadamente das Boas Práticas de Fabrico (BPF), Boas Práticas de Distribuição (BPD) e Boas Práticas de Farmácia (BPFarm). Através da recolha de amostras de medicamentos e produtos de saúde em todo o circuito da sua vida útil, cabe também ao Infarmed comprovar a sua qualidade. Uma outra área de atuação do Infarmed passa pela monitorização de reações adversas a medicamentos através da farmacovigilância e vigilância e monitorização da utilização de produtos de saúde. A avaliação do mercado e a promoção do uso racional do

medicamento compete também ao Infarmed. Esta área inclui a avaliação dos medicamentos para inclusão no sistema de comparticipação, elaboração de estudos farmacoterapêuticos e de avaliação económica de medicamentos e monitorização do acesso e utilização dos medicamentos e produtos de saúde. O Infarmed é ainda responsável por promover o acesso dos profissionais de saúde e dos cidadãos à informação necessária para o uso racional de medicamentos e de produtos de saúde.²

O INFARMED, I.P. assegura a representação nacional junto da Agência Europeia de Medicamentos, da Comissão Europeia e de outras instituições europeias, bem como em comités e grupos de trabalho. Representa também Portugal na Farmacopeia Europeia e no Órgão Internacional de Controlo de Estupefacientes das Nações Unidas, e integra o sistema de monitorização de medicamentos da Organização Mundial de Saúde. O seu laboratório faz parte da rede europeia de Laboratórios Oficiais de Controlo de Medicamentos.²

O INFARMED, I.P. é constituído por vários órgãos, unidades orgânicas e unidades orgânicas com funções de suporte.³

No final de 2017, o INFARMED, I.P. contava com cerca de 350 colaboradores. Os colaboradores possuem habilitações em diferenciadas áreas de formação, designadamente: Saúde e Ciências; Ciências Sociais, Serviços, Economia e Gestão; Direto; Tecnologias de Comunicação e Informação.⁴

1.1.1. Comissão Nacional de Farmácia e Terapêutica

A Comissão Nacional de Farmácia e Terapêutica (CNFT) é uma comissão técnica especializada que atua como órgão consultivo do INFARMED, I.P.. À CNFT compete: 1 – assegurar a articulação e a partilha de informação entre as Comissões de Farmácia e Terapêutica (CFT) dos hospitais do Serviço Nacional de Saúde (SNS) e das Administrações Regionais de Saúde (ARS); 2 – promover a elaboração e aprovar os critérios de utilização de medicamentos, a incluir no Formulário Nacional do Medicamento (FNM); 3 – elaborar protocolos de utilização de medicamentos; 4 – monitorizar o cumprimento, no âmbito do SNS, dos critérios de utilização dos medicamentos; 5 – elaborar estratégias efetivas de promoção da utilização racional do medicamento, transversais e de integração dos diferentes níveis de cuidados de saúde; 6 – emitir os pareceres que lhe sejam solicitados pelo Conselho Diretivo do Infarmed, em matérias relacionadas com a utilização de medicamentos no SNS.⁵

A CNFT é constituída por elementos provenientes de estabelecimentos e serviços do Serviço Nacional de Saúde e de outras instituições e por personalidades de reconhecido mérito. Assim, entre os membros da CNFT, encontram-se representantes das CFT dos

hospitais do SNS e das ARS, representantes da Direção-Geral de Saúde, da Ordem dos Médicos e da Ordem dos Farmacêuticos.⁵



Figura I – Resumo esquemático da análise SWOT relativa ao meu estágio no INFARMED, I.P..

2. PONTOS FORTES

2.1. Recursos Humanos

Como referido acima, o meu estágio foi realizado sob a orientação da Dra. Madalena Arriegas, e foi sob o seu supervisionamento que realizei todo o meu estágio. A Dra. Madalena desde o início me colocou à vontade, respondendo a todas as minhas questões, algumas relacionadas diretamente com o trabalho a ser realizado e outras mais gerais (acerca da área regulamentar, do trabalho realizado pelo Infarmed, das competências da CNFT). Sempre se mostrou disponível para ouvir as minhas sugestões e a discutir as minhas propostas e questões. Sem dúvida que este foi um dos fatores mais importantes para o sucesso do meu estágio e para que dele pudesse retirar o maior proveito, pelo que considero a orientação um ponto forte deste estágio.

A nível de recursos humanos em geral, considero que a Direção de Recursos Humanos, Financeiros e Patrimoniais do Infarmed faz sem dúvida um ótimo trabalho na receção dos estagiários. É realizada uma sessão de acolhimento com a presidente do Infarmed e também uma reunião individual com um técnico dos recursos humanos. Nesta sessão e nesta reunião, fala-se um pouco sobre a fundação e missão do Infarmed, a equipa e os valores e políticas. São discutidos quais os direitos e deveres dos estagiários e dadas informações da área das tecnologias de informação. Senti-me sempre bem acolhida no Infarmed, o que considero um ponto forte deste estágio.

2.2. Trabalho realizado

O meu estágio foi realizado na área da Comissão Nacional de Farmácia e Terapêutica. Nos últimos meses, o principal trabalho desenvolvido por esta comissão está relacionado com a atualização do Formulário Nacional do Medicamento (FNM).

O Formulário Nacional do Medicamento prevê os critérios de utilização de medicamentos em estabelecimentos, serviços hospitalares e de ambulatório do SNS. É uma ferramenta de apoio à aquisição e utilização de medicamentos nos serviços de saúde do SNS com vista à utilização racional de medicamentos. O FNM é publicado na página eletrónica do INFARMED, I.P..⁵

No FNM, os medicamentos estão representados por substância ativa (DCI, de denominação comum internacional). Nomes comerciais ou de laboratórios não são referidos. Diferentes dosagens ou formas farmacêuticas de uma substância ativa podem ser agrupadas na mesma página ou não, conforme as suas indicações de utilização.

O FNM encontra-se organizado por grupos terapêuticos, sendo que os medicamentos se encontram distribuídos por vinte grandes grupos (Medicamentos anti-infecciosos, Sistema nervoso central, Aparelho cardiovascular, Sangue, Aparelho respiratório, Aparelho digestivo, Aparelho geniturinário, Hormonas e medicamentos usados no tratamento das doenças endócrinas, Aparelho locomotor, Medicação antialérgica, Nutrição e metabolismo, Corretivos da volémia e das alterações eletrolíticas, Medicamentos usados em afeções cutâneas, Medicamentos usados em afeções otorrinolaringológicas, Medicamentos usados em afeções oculares, Medicamentos antineoplásicos e imunomoduladores, Medicamentos usados no tratamento de intoxicações, Vacinas e imunoglobulinas, meios de diagnóstico e Material de penso, hemostáticos locais, gases medicinais e outros produtos).⁶ Conforme as suas indicações, os medicamentos estão também agrupados por patologias. A organização de patologias em grupos tem como base a ICD-10 – *International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems*.

O FNM pode incluir medicamentos que não possuem Autorização de Introdução no Mercado (AIM) em Portugal e medicamentos não comparticipados.

Para cada medicamento são apresentadas várias informações. A nível de informações técnicas, são referidas as formas farmacêuticas e as dosagens existentes, o Código Hospitalar Nacional do Medicamento (CHNM), o Código Nacional para a Prescrição Eletrónica de Medicamentos (CNPEM), a classificação farmacoterapêutica (CFT), a classificação quanto à dispensa, se possui ou não relatório de avaliação prévia hospitalar disponível e se é comparticipado, entre outras informações.

Uma das informações mais importantes referidas para cada medicamento são as indicações de utilização (que podem diferir daquelas presentes no Resumo das Características do Medicamento (RCM)). É também indicada a patologia (ou patologias)/problemas de saúde que aquele medicamento é utilizado para tratar/prevenir. Quando aplicável, é referida a linha de tratamento a que aquela substância pertence. Possíveis alternativas terapêuticas são indicadas – medicamentos com eficácia terapêutica, perfil de segurança e condições de utilização semelhantes – com referência a eventuais considerações a ter em conta; caso existam alternativas, é definida e justificada a possibilidade ou não de *switch* (troca de medicamentos durante o tratamento). As condições de utilização e a necessidade de autorização e monitorização são também apresentadas. Na secção da bibliografia, são indicados artigos, *guidelines*, circulares e outros documentos que apresentem informações relativas àquele medicamento e com base nos quais foi elaborada a sua ficha. Possíveis indicações *off-label* também podem ser referidas. Como exemplo, é apresentada a página do Formulário Nacional do Medicamento respeitante ao valaciclovir, um antivírico.⁷ (Anexo I)

Ao longo do meu estágio no Infarmed, o meu trabalho constituiu essencialmente na recolha e tratamento da informação e da sua inserção na plataforma *online* do FNM.

A atualização do formulário é feita por grupos terapêuticos. Quando iniciava o trabalho de um grupo, começava por listar num documento os medicamentos pertencentes a esse grupo na última versão do FNM, indicando as formas farmacêuticas disponíveis. Depois de anotar aqueles cuja autorização de comercialização tinha caducado ou sido revogada, recolhia e resumia informações dos RCM respeitantes às indicações terapêuticas de todas as substâncias. Este documento era depois enviado para o(s) perito(s) responsável por esse grupo terapêutico. Os peritos são médicos/farmacêuticos, membros da CNFT. O preenchia o documento com o resto da informação não técnica, baseando-se na sua experiência profissional e apoiando-se em *guidelines*, artigos e outros documentos. Depois do perito realizar o seu trabalho, cabia-me organizar e tratar a informação, recolher as informações para a ficha técnica e inserir os dados na plataforma *online*.

O trabalho realizado foi sem dúvida um ponto forte. Tarefas como a consulta e recolha de informação de vários RCM, relatórios de avaliação prévia, artigos e *guidelines* permitiram a integração dos meus conhecimentos de farmacologia, fisiopatologia, bacteriologia, virologia, parasitologia e mais. O facto de tratar cada grupo terapêutico separadamente permitia-me, ao completar o trabalho, ter uma ideia geral dos vários subgrupos em que os medicamentos estão organizados, de quais as principais patologias para as quais esses medicamentos são usados e de que DCI podem ser considerados alternativas

a outras, conhecimento este que penso que vai ser bastante útil no meu futuro profissional. O meu trabalho possibilitou-me também ganhar alguma noção de como é feita a aquisição e gestão de medicamentos em estabelecimentos do SNS, e tive oportunidade de aprender um pouco mais sobre a área regulamentar.

Sinto que a minha aprendizagem teórica foi sem dúvida adequada para a realização deste estágio. Unidades curriculares como a “Farmacologia” e “Assuntos Regulamentares” do Medicamento proporcionaram-me bases que permitiram o sucesso deste estágio.

2.3. Reuniões da Comissão Nacional de Farmácia e Terapêutica

A Comissão Nacional de Farmácia e Terapêutica reúne uma vez por mês. Ao longo do meu estágio, tive oportunidade de assistir a três reuniões. As datas das reuniões são marcadas com alguns meses de antecedência, mas uma convocatória deve ser enviada para todos os membros da CNFT com oito dias úteis de antecedência, preferencialmente por via eletrónica, acompanhada da ordem de trabalhos. De cada reunião é lavrada uma ata.⁸

Considero esta experiência um ponto forte pois permitiu-me acompanhar os procedimentos essenciais à realização deste tipo de reunião. Possibilitou-me ainda ganhar algumas noções de como se processa este tipo de reunião: qual o papel do presidente, como são tomadas e aprovadas decisões e de que maneira a reunião é orientada de maneira a que todos os membros possam opinar.

3. PONTOS FRACOS

Como referido acima, senti-me sempre bem acolhida pelo INFARMED, I.P. e pela minha orientadora. O trabalho realizado permitiu a integração e expansão de conhecimentos adquiridos durante a frequência do MICEF. Aprendi mais sobre o trabalho que é feito pelo Infarmed, nomeadamente pela CNFT, e achei que a minha aprendizagem teórica adequada para a realização deste estágio. Assim, não considero a existência de pontos fracos.

4. OPORTUNIDADES

4.1. Fórum do Cidadão

No dia 22 de maio, o INFARMED, I.P. realizou, no âmbito do seu 25º aniversário, um evento dedicado aos cidadãos, com discussão de vários temas relacionados com a saúde e medicamentos, inclusive um painel acerca dos riscos da compra de medicamentos *online*.

Estando a estagiar no Infarmed aquando deste evento, tive oportunidade de assistir a parte deste fórum. Achei o painel acerca da compra de medicamentos *online* especialmente interessante, com a apresentação de exemplos reais bem como sugestões de como pode o farmacêutico comunitário atuar de maneira a proteger também os utentes dos riscos que a compra de medicamentos através da Internet acarreta.

4.2. Visita aos laboratórios do INFARMED, I.P.

Estando a estagiar no INFARMED, I.P., foi-me oferecida a oportunidade de visitar os laboratórios do controlo de qualidade do Infarmed. Apesar de mais tarde ter sido organizada propositadamente para os estagiários, a minha visita aos laboratórios realizou-se no contexto do Fórum do Cidadão. Nesta visita, tive oportunidade de observar quais os métodos e instrumentos usados para o controlo de qualidade de medicamentos, cosméticos e outros produtos de saúde e aprender um pouco mais acerca de como este laboratório organiza o seu trabalho e quais as suas competências.

5. AMEAÇAS

5.1. Situação de instabilidade vivida no INFARMED, I.P.

Em 2017, foi anunciada a intenção da deslocação do Infarmed de Lisboa para o Porto, o que tem provocado alguma instabilidade neste instituto. Devo realçar que, ao longo dos meus três meses no Infarmed, nunca achei que esta situação tivesse influenciado de alguma forma o meu estágio. No entanto, penso que a intranquilidade causada por esta possível mudança para o Porto pode influenciar o trabalho realizado pelo Infarmed, o que pode provocar consequência a nível da saúde pública.

6. CONCLUSÃO

Poder estagiar no Infarmed foi uma grande oportunidade, e sem dúvida que o estágio superou todas as minhas expectativas. O trabalho realizado permitiu-me adquirir conhecimentos não só na área regulamentar, mas também a nível científico, o que penso que será sem dúvida muito útil para o meu futuro profissional. Além disso, permitiu-me aplicar os conhecimentos adquiridos ao longo da minha frequência do MICEF, bem como desenvolver competências como o espírito crítico e a capacidade de organização.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. **Decreto-Lei N° 46/2012, de 24 de fevereiro.** Diário da República, 1ª Série, N° 40 [Acedido a 8 de agosto de 2018]. Disponível na Internet: <http://www.infarmed.pt/documents/15786/1269448/0088400890.pdf/ffb5b761-ba56-4c76-ab28-12a39aec9b26>
2. INFARMED, I.P.- **Sobre o INFARMED, I.P..** [Acedido a 8 de agosto de 2018]. Disponível na Internet: <http://www.infarmed.pt/documents/15786/1203637/Sobre+o+Infarmed/69a2cb8d-f68a-48d1-bfa3-6c788af81f9f>
3. INFARMED, I. P. - **Organograma - INFARMED, I.P..** [Acedido a 10 de agosto de 2018] Disponível na Internet: <http://www.infarmed.pt/documents/15786/1905196/Organograma+2017/c8343cd0-df7f-490c-84ef-15db7d43dfc2>
4. INFARMED, I.P. - **Balanço Social 2017.** [Acedido a 12 de agosto de 2018]. Disponível na Internet: <http://www.infarmed.pt/documents/15786/1269509/Balan%C3%A7o+Social+2017/ec3e67d6-932c-4413-bbc4-184d4eaa1b74>
5. **Despacho n° 1729/2017, de 23 de fevereiro.** Diário da República, 2ª Série, N° 39. [Acedido a 12 de agosto de 2018]. Disponível na Internet: <https://dre.pt/application/conteudo/106509261>
6. **Formulário Nacional do Medicamento.** [Acedido a 13 de agosto de 2018] Disponível na Internet: <https://extranet.infarmed.pt/fnm-fo/#/>
7. **Formulário Nacional do Medicamento - Valaciclovir.** [Acedido a 13 de agosto de 2018]. Disponível na Internet: <https://extranet.infarmed.pt/fnm-fo/#/FichaMedicamento/Valaciclovir>
8. INFARMED, I.P. - **Deliberação n°23/CD/2017 (Regulamento da Comissão Nacional de Farmácia e Terapêutica).** 2017. [Acedido a 14 de agosto de 2018]. Disponível na Internet: <http://www.infarmed.pt/documents/15786/2157036/Regulamento+da+Comiss%C3%A3o+Nacional+de+Farm%C3%A1cia+e+Terap%C3%AAutica+%28CNFT%29/7fc536b6-7a4c-484f-bd38-21b351e044fd>

8. ANEXOS

Anexo I – Página do FNM respeitante ao valaciclovir.

EK: Paracetamol
→

GRUPOS TERAPÊUTICOS

- PATOLOGIAS
- DINOMÁSTICO

refinar resultados

- Medicamentos anti-infecciosos
- Sistema nervoso central
- Aparelho cardiovascular
- Sangue
- Aparelho Respiratório
- Aparelho Digestivo
- Aparelho Geniturinário
- Hormonas e medicamentos usados no tratamento das doenças endócrinas
- Aparelho locomotor
- Medicação antialérgica
- Nutrição e metabolismo
- Corretivos de volume e das alterações eletrolíticas
- Medicamentos usados em afecções cutâneas
- Medicamentos usados em afecções otorinolaringológicas
- Medicamentos usados em Afecções Oculares
- Medicamentos antineoplásicos e imunomoduladores
- Medicamentos utilizados no tratamento de intoxicações
- Vacinas e Imunoglobulinas
- Meios de diagnóstico (Alergênicos, Meios de contraste em radiologia, Meios de contraste não radiológico e Radiofármacos)
- Material de penso, hemostáticos locais, geles, medicações e outros produtos

VALACICLOVIR

1.3.2 - Outros antiviricos

- Indicado para o tratamento das infeções por VHS-1 e 2 e vírus Varicella-zoster (...)

1.3.2 - Outros antiviricos

Indicação de utilização

Indicado para o tratamento das infeções por VHS-1 e 2 e vírus Varicella-zoster (VVZ). O valaciclovir pode também ser utilizado na prevenção de doença citomegálica em transplantação de órgãos sólidos, só nos casos em que o ganciclovir ou o valganciclovir não possam ser usados.

Ficha técnica

FORMA(S) FARMACÊUTICA(S) Comprimido revestido por película;	COMPOSIÇÃO Valaciclovir, cloridrato/Valaciclovir, cloridrato mono-hidratado;
DOSAGENS 1000 mg/500 mg;	TIPO DE AUTORIZAÇÃO AIM - Autorização de Introdução no Mercado;
CINEM 10010128;10010139;	AVALIAÇÃO CUSTO/EFFECTIVIDADE (AVALIAÇÃO PREVIA) Não aplicável;
CNPEM 50023942;50023950; 50023969;50023977;	AVALIAÇÃO CUSTO/EFFECTIVIDADE (COMPARTICIPAÇÃO) Sim;
CIT 1.3.2 - Outros antiviricos;	ATC J05AB11 valaciclovir;

CLASSIFICAÇÃO QUANDO À DISPENSA

Patologia(n)

B00-B09 Infeções virais caracterizadas por lesões de pele e mucosas
B25-B34 Outras doenças por vírus

Linhas de tratamento	NÍVEL	CONDIÇÕES
1ª Linha		Tratamento das infeções por VHS. Tratamento de infeções pelo VVZ.
2ª linha		Prevenção da doença citomegálica em transplantação de órgãos sólidos.

Alternativas Terapêuticas

DCI	NÍVEL	CONDIÇÕES
Brivudina	1ª Linha	No tratamento de infeções pelo VVZ.
Aciclovir	1ª Linha	No tratamento de infeções pelo VVZ.

Switch
Não

Justificação
Não

Bibliografia

- Informad - Base de dados de medicamentos.

Data Revisão
29-06-2018

PARTE III

MONOGRAFIA

**ANÁLISE DE BENZODIAZEPINAS EM
TOXICOLOGIA FORENSE**

RESUMO

As benzodiazepinas são um grupo de fármacos cujos efeitos benéficos incluem a redução de ansiedade, indução e manutenção do sono, relaxamento muscular e tratamento e prevenção de ataques epiléticos. No entanto, existem alguns riscos associados à sua toma e são fármacos passíveis de abuso e uso indevido, pelo que são uma substância de interesse para a Toxicologia Forense.

A Toxicologia Forense é a aplicação da toxicologia ao serviço da Lei. Envolve várias áreas: toxicologia forense *post-mortem*, *ante-mortem* comportamental e de desempenho humano, e análises para controlo de consumo de determinadas substâncias.

Para realizar análises toxicológicas para a deteção e quantificação de benzodiazepinas podem ser usadas várias amostras biológicas. Como as matrizes biológicas são normalmente complexas, é necessário que as amostras passem primeiro por um processo de extração.

Para a análise de benzodiazepinas podem ser utilizados diversos métodos analíticos, sendo os mais pertinentes os métodos cromatográficos e imunoensaios. Os imunoensaios são úteis para a deteção de benzodiazepinas, cuja presença numa amostra biológica é depois confirmada e quantificada por um método cromatográfico. Dentro dos métodos cromatográficos, destaca-se a cromatografia gasosa e a cromatografia líquida de alta eficiência. A cromatografia líquida de alta eficiência acoplada com espectrometria de massa em tandem é um dos métodos mais representados na literatura, uma vez que permite quantificar as benzodiazepinas com grande sensibilidade e especificidade.

Palavras-chave: benzodiazepinas, toxicologia forense, amostra biológica, extração, imunoensaios, cromatografia.

ABSTRACT

Benzodiazepines are a class of drugs with several beneficial effects, including anxiolytic, hypnotic, muscle relaxant and anticonvulsant effect. However, there are some risks associated to its use and they can be object of abuse and misuse; therefore, they are frequently present in forensic cases.

Forensic Toxicology is the use of toxicology at the service of the Law. It involves several areas: *post-mortem* forensic toxicology, behavioral and related to human performance *ante-mortem* forensic toxicology and drug testing.

To detect and quantify benzodiazepines through toxicologic analyses, several biological samples can be used. Because biological matrices are generally very complex, it's first necessary that they go through an extraction process.

The analysis of benzodiazepines can be performed using several analytical methods. Among them, immunoassays and chromatographic methods are the most relevant. Immunoassays are useful to do an initial screening, followed by confirmation and quantification by a chromatographic method. Gas chromatography and high performance liquid chromatography are the most prominent within chromatographic methods. High performance liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry is one of the most described methods in scientific literature since it allows great sensibility and specificity in the quantification of benzodiazepines.

Keywords: benzodiazepines, forensic toxicology, biological sample, extraction, immunoassays, chromatography.

Lista de Siglas e Abreviaturas

ADS – Alquil-Diol-Sílica

APCI – Ionização Química à Pressão Atmosférica (do inglês *Atmospheric Pressure Chemical Ionization*)

CEDIA – *Cloned Enzyme Donor Immunoassay*

DAD – *Diode Array Detection*

ECD – Detecção por Captura de Eletrões (do inglês *Electron-Capture Detection*)

EI – Impacto Eletrónico (do inglês *Electron Impact*)

EIA – Ensaio imunoenzimático (do inglês *ImmunoAssay*)

ELISA – *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*

EMIT – *Enzyme-Multiplied Immunoassay Technique*

ESI – Ionização por Eletronebulização (do inglês *Electrospray Ionization*)

FID – Detecção por Ionização de Chama (do inglês *Flame Ionization Detection*)

FN – Falsos Negativo

FP – Falsos Positivos

FPIA – Imunoensaios de Fluorescência Polarizada (do inglês *Fluorescence Polarization ImmunoAssay*)

GABA – Ácido Gama-Aminobutírico (do inglês *Gamma-AminoButyric Acid*)

GC – Cromatografia Gasosa (do inglês *Gas Chromatography*)

HIV – Vírus da Imunodeficiência Humana (do inglês *Human Immunodeficiency Virus*)

HPLC – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (do inglês *High Performance Liquid Chromatography*)

HPTLC – Cromatografia em camada fina de alta eficiência (do inglês *High Performance Thin Layer Chromatography*)

IA – Imunoensaios (do inglês *ImmunoAssay*)

IMC – *ImmunoChromatographic Techniques*

INFARMED – Autoridade Nacional do Medicamento e Produtos de Saúde, I. P.

KIMS – *Kinetic Interaction of Microparticles in Solution*

LAI – Ensaio baseado na Inibição da Aglutinação do Látex (do inglês *Inhibition of Latex Agglutination*).

LC – Cromatografia Líquida (do inglês *Liquid Chromatography*)

LLE – Extração Líquido – Líquido (do inglês *Liquid – Liquid Extraction*)

LOD – Limite de Detecção (do inglês *Limit Of Detection*)

LOQ – Limite de Quantificação (do inglês *Limit Of Quantification*)

MRM – Monitorização de Reações Múltiplas (do inglês *Multiple Reaction Monitoring*)
MS – Espectrometria de Massa (do inglês *Mass Spectrometry*)
NCI – Ionização Química Negativa (do inglês *Negative Chemical Ionization*)
NPD – Detecção Azoto-Fósforo (do inglês *Nitrogen-Phosphorus Detection*)
PCI – Ionização Química Positiva (do inglês *Positive Chemical Ionization*)
RIA – Radioimunoensaios (do inglês *RadiolmmunoAssay*)
SIM – Monitorização Seletiva de Iões (do inglês *Selected-Ion Monitoring*)
SPE – Extração em Fase Sólida (do inglês *Solid Phase Extraction*)
SPME – Micro Extração em Fase Sólida (do inglês *Solid-Phase MicroExtraction*)
SSRI – Inibidores Seletivos da Recaptação da Serotonina (do inglês *Selective Serotonin Reuptake Inhibitors*)
TLC – Cromatografia em Camada Fina (TLC, do inglês *Thin-Layer Chromatography*)
UHPLC – Cromatografia Líquida de Ultra Alta Eficiência (do inglês *Ultra High Performance Liquid Chromatography*)
UV – Ultravioleta
VN – Verdadeiros Negativos
VP – Verdadeiros Positivos
VPN – Valor Preditivo Negativo
VPP – Valor Preditivo Positivo

I. INTRODUÇÃO

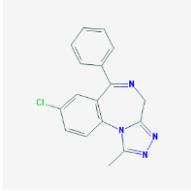
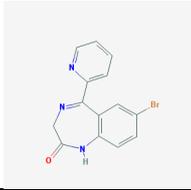
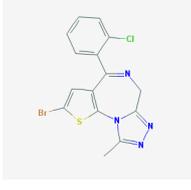
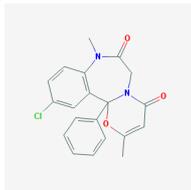
I.1. Benzodiazepinas

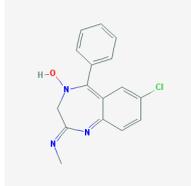
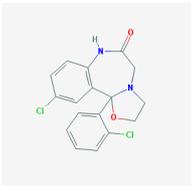
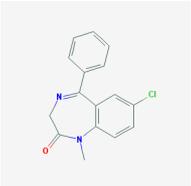
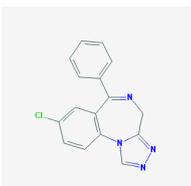
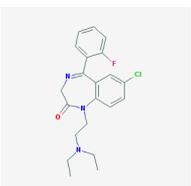
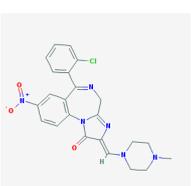
As benzodiazepinas são um grupo de fármacos cujos efeitos benéficos incluem a redução de ansiedade, indução e manutenção do sono, relaxamento muscular e tratamento e prevenção de ataques epiléticos. Estas propriedades são partilhadas pela maioria das benzodiazepinas, se bem que em diferentes graus.¹

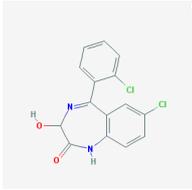
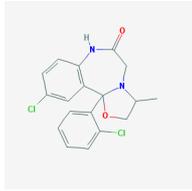
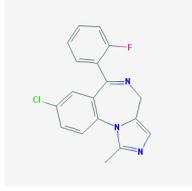
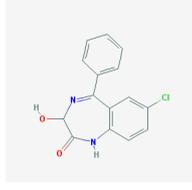
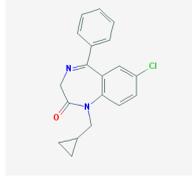
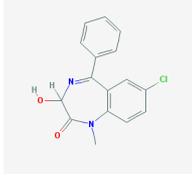
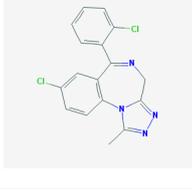
Um estudo realizado em 2016 pelo INFARMED – Autoridade Nacional do Medicamento e Produtos de Saúde, I. P. concluiu que em Portugal, as benzodiazepinas mais utilizadas têm uma ação maioritariamente ansiolítica: alprazolam, lorazepam e diazepam.²

A tabela I apresenta as principais benzodiazepinas com autorização de comercialização em Portugal e a sua principal indicação.

Tabela I - Principais benzodiazepinas com autorização de comercialização em Portugal classificadas como ansiolíticos, sedativos e hipnóticos e a sua principal indicação.

Fármaco	Indicação terapêutica	Molécula
Alprazolam	Ansiolítico ³	 4
Bromazepam	Ansiolítico ⁵	 6
Brotizolam	Hipnótico ⁷	 8
Cetazolam	Ansiolítico, relaxante muscular ⁹	 10

Clobazam	Anticonvulsante ¹¹	 11
Clorazepato dipotássico	Ansiolítico ¹²	 13
Clordiazepóxido	Ansiolítico ¹⁴	 14
Clozazolam	Ansiolítico, hipnótico ¹⁵	 16
Diazepam	Ansiolítico, relaxante muscular ¹⁷	 18
Estazolam	Hipnótico ¹⁹	 19
Flurazepam	Hipnótico ²⁰	 21
Loprazolam	Hipnótico ²²	 23

Lorazepam	Ansiolítico, hipnótico ²⁴	 25
Mexazolam	Ansiolítico ²⁶	 27
Midazolam	Hipnótico ²⁸	 29
Oxazepam	Ansiolítico ³⁰	 31
Prazepam	Ansiolítico ³²	 33
Temazepam	Hipnótico ³⁴	 35
Triazolam	Hipnótico ³⁶	 37

Foram consideradas as benzodiazepinas classificadas como ansiolíticos, sedativos e hipnóticos.³⁸

1.2. Toxicologia forense

Toxicologia forense é a aplicação da toxicologia ao serviço da Lei. Resulta da combinação da Química Analítica moderna com a Toxicologia Fundamental e a sua aplicação

no âmbito de procedimentos judiciais relacionados com intoxicações. Um toxicologista forense deve realizar análises qualitativas e quantitativas e concluir sobre o papel que um xenobiótico ou endobiótico possa ter desempenhado num determinado caso.³⁹ A Toxicologia Forense envolve então dois possíveis níveis de interpretação: qualitativo (deteção do consumo de uma determinada substância pelo indivíduo) e quantitativo (determinação do papel que um xenobiótico possa ter desempenhado).⁴⁰

Nesta área, intoxicação é definida como uma condição médica ou socialmente inaceitável em que um indivíduo se encontra como consequência de estar sob a influência de xenobióticos numa dose demasiado elevada.³⁹

A Toxicologia Forense pode ser dividida em três áreas. Na Toxicologia Forense *post-mortem*, o objetivo é determinar a causa e o modo de intoxicação através da análise de amostras recolhidas durante a autópsia.³⁹ Aquando da morte, o metabolismo de fármacos e outras substâncias pára; se a autópsia for realizada num intervalo de tempo adequado e o corpo não tiver sido submetido a condições extremas, é possível, através de uma análise toxicológica, inferir sobre as substâncias presentes no organismo na altura da morte.⁴¹

A Toxicologia Forense *ante-mortem* comportamental e de desempenho humano diz respeito à análise da influência de certas substâncias no comportamento humano. Isto inclui análise de casos de violência sexual facilitada por drogas, de controlo de *doping* e de segurança rodoviária.^{39, 42}

A terceira área da Toxicologia Forense envolve a análise de fluidos corporais (normalmente urina) para controlo do consumo de determinadas substâncias. Esta análise é normalmente realizada num contexto laboral.³⁹

2. BENZODIAZEPINAS

2.1. Contexto histórico

Até aos anos 1950s, eram muito poucos os fármacos disponíveis para tratar doença mental. Para o tratamento de ansiedade, depressão e insónia, era usado hidrato de cloral, reserpina, barbitúricos e meprobamato. A reserpina provocava vários efeitos secundários, incluindo pesadelos incapacitantes. No que respeita ao hidrato de cloral, havia algumas reservas no seu uso devido à suspeita de que provocava dependência, e devido ao facto de causar frequentemente náuseas, vómitos, confusão, convulsões e arritmia cardíaca que progredia para coma⁴³. Os barbitúricos (muito populares na primeira metade do século XX como sedativos, hipnóticos, anestésicos e anticonvulsionantes) levavam ao aparecimento de

efeitos adversos como ataxia, fala arrastada, tonturas e diminuição da capacidade de discernimento. Como facilmente geravam desenvolvimento de tolerância, o intervalo entre a concentração mínima efetiva e a concentração máxima tolerada tornava-se muito estreito, levando a depressão respiratória ou cardiovascular, e, na primeira metade dos anos 1900, a morte por *overdose* de barbitúricos – acidental ou propositada – era comum.⁴⁴ Além disso, a interrupção abrupta da sua toma levava a uma severa e potencialmente perigosa síndrome de abstinência, com o surgimento de tremores, ansiedade, náuseas e vômitos, aumento da pressão arterial, psicose e convulsões.⁴⁵ A toma de meprobamato provocava o surgimento de vários efeitos indesejados, como sedação, dores de cabeça, reações paradoxais, confusão e diminuição das capacidades cognitivas e psicomotoras. O seu uso a longo termo levava ao desenvolvimento de tolerância, com uma dura síndrome de abstinência.⁴⁶ Assim, encontrar uma alternativa segura e eficaz era uma prioridade para todas as companhias farmacêuticas.⁴³

Em 1955, o químico da Hoffmann – La Roche Leo Sternbach identificou a primeira benzodiazepina, clordiazepóxido, patenteada em 1959 sob o nome de *Librium*[®]. A equipa de investigação continuou o seu trabalho testando alterações moleculares de maneira a aumentar a atividade do composto, e em 1963 o diazepam – sob o nome de *Valium*[®] – foi lançado no mercado, conquistando um enorme sucesso, sendo ainda hoje um fármaco muito utilizado para o tratamento da ansiedade, síndrome de abstinência alcoólica e espasmos musculares.⁴³ A procura por novos compostos continuou, e ao longo dos anos foram descobertas várias benzodiazepinas, como o nitrazepam e alprazolam (*Xanax*[®]).⁴⁷

Inicialmente, as benzodiazepinas pareciam ser menos tóxicas e causar menos dependência que os fármacos anteriormente prescritos, e a probabilidade de levarem a depressão respiratória era menor – esta era a principal preocupação relacionada com o uso de barbitúricos. Os médicos achavam a sua eficácia como relaxantes musculares superior à dos outros fármacos disponíveis, e, no final da década de 1960, era evidente a sua utilidade no tratamento da síndrome de abstinência de álcool e de barbitúricos. As benzodiazepinas começaram a ser prescritas para o tratamento de condições que anteriormente não eram tratadas através de medicação, como *stress*, ansiedade e nervosismo. Muitas vezes, os médicos prescreviam benzodiazepinas durante meses ou anos. Na segunda metade da década de 1970, as benzodiazepinas estavam no topo da lista de medicamentos mais prescritos, com cerca de 40 biliões de doses a serem consumidas anualmente.⁴³

No entanto, no início da década de 1980, algo começava a preocupar os médicos: a possibilidade de abuso e dependência. Começaram a surgir relatos de abuso de benzodiazepinas, isoladamente ou juntamente com outras substâncias ou álcool, e surgiam denúncias da venda ilegal de benzodiazepinas. Na década de 1990, o flunitrazepam –

Rohypnol[®] – tornou-se conhecido por ser usado por criminosos para facilitar situações de violência sexual. Introduzida discretamente e dissolvida numa bebida alcoólica, causa sonolência, reduz as capacidades motoras e causa amnésia anterógrada; a vítima não sabe que foi violada.⁴³

Na década de 1990, eram passadas cerca de 18 milhões de prescrições de benzodiazepinas.⁴³ Nos últimos anos, apesar de terem sido parcialmente substituídas por outros fármacos para tratar a ansiedade e a insónia – como inibidores seletivos da recaptção da serotonina (SSRIs) e melatonina – continuam a fazer parte do grupo de fármacos mais prescritos.¹

2.2. Estrutura química, mecanismo de ação e metabolismo

Tal como o próprio nome indica, os fármacos do grupo das benzodiazepinas são formados pela fusão de um anel de benzeno com um anel de diazepina (Figura 1). O benzeno é um hidrocarboneto aromático com a fórmula molecular C_6H_6 . A diazepina é um composto heterocíclico que possui dois átomos de azoto (que se encontram na posição 1 e 4 do anel de diazepina na maioria das benzodiazepinas). Dependendo das cadeias secundárias ligadas ao esqueleto estrutural central, varia a atividade farmacológica das benzodiazepinas, uma vez que estas cadeias secundárias afetam a afinidade da molécula para os recetores GABA.⁴⁷

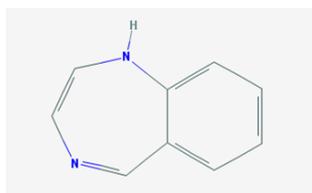


Figura 1 – 1,4 – Benzodiazepina⁴⁸

As benzodiazepinas são moduladores alostéricos dos recetores $GABA_A$. O GABA – ácido gama-aminobutírico, do inglês *Gamma-AminoButyric Acid* – é o principal neurotransmissor inibidor do sistema nervoso central. Um recetor GABA é constituído por cinco subunidades, glicoproteínas transmembranares, arranjadas de modo a que no centro se encontre um canal iónico.¹ Destas cinco subunidades, duas são α , duas são β e uma é γ . As benzodiazepinas ligam-se a um local específico do recetor, diferente daquele a que se liga o GABA. Este local específico do recetor encontra-se entre as subunidades $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$ ou $\alpha 5$ (dependendo do tipo de recetor $GABA_A$) e a subunidade γ .⁴⁹ Os recetores $GABA_A$ apresentam vários sítios de ligação adicionais, não só para benzodiazepinas, mas também locais onde se ligam barbitúricos e neuroesteroides.¹

A ligação de uma benzodiazepina ao recetor aumenta a afinidade deste para o GABA, aumentando a frequência da abertura do canal iónico, permitindo a passagem de iões cloreto

através da membrana. Isto resulta em hiperpolarização do neurónio, reduzindo a excitabilidade da célula alvo. As benzodiazepinas não mimicom o efeito do GABA nem ativam os canais iónicos diretamente.¹

Diferentes combinações dos vários tipos de subunidades levam à existência de vários subtipos de recetores GABA_A. O subtipo da subunidade α presente no recetor está associado com o efeito clínico das benzodiazepinas.⁴⁹

As células onde atuam as benzodiazepinas encontram-se principalmente na espinal medula, no tronco encefálico e cerebelo e nas áreas do sistema límbico e do córtex cerebral envolvidas na gestão de emoções e comportamentos.⁴⁶

Benzodiazepinas com uma estrutura mais lipofílica atravessam mais facilmente a barreira hematoencefálica e, conseqüentemente, o seu efeito inicia-se mais rapidamente comparativamente aquelas que têm uma estrutura mais hidrofílica.⁴⁷

As benzodiazepinas são normalmente bem absorvidas quando administradas por via oral. O seu metabolismo pode dar-se por duas vias: oxidação e glucuronidação. Normalmente, as benzodiazepinas que são sujeitas a reações de oxidação (geralmente por ação do citocromo P450) dão origem a metabolitos ativos, que têm depois de passar por reações de glucuronidação para serem excretados. Estas são benzodiazepinas com uma longa duração de ação. Por outro lado, a glucuronidação direta leva à formação de metabolitos inativos e rapidamente excretados, fazendo com que fármacos diretamente glucuronizados tenham uma curta duração de ação.⁵⁰

2.3. Efeitos das benzodiazepinas

As benzodiazepinas diferem na potência do seu efeito, tempo necessário para o início do efeito e tempo de ação.¹ Normalmente são divididas em três grupos de acordo com a sua duração de ação: aquelas com duração de ação inferior a 12 horas são benzodiazepinas de curta duração, 12 a 24 horas são de ação intermédia e mais de 24 horas são de longa duração. A longa duração de ação de algumas benzodiazepinas é maioritariamente devida à sua transformação em metabolitos ativos. Benzodiazepinas de curta duração de ação são normalmente usadas para tratar insónia e distúrbios do sono, uma vez que fazem efeito rapidamente mas este efeito não se estende para a manhã seguinte. As de duração de ação intermédia e longa são normalmente prescritas para tratamento de ansiedade, permitindo controlar os sintomas apenas com a administração de uma dose diária ou menos.⁵⁰

2.3.1. Efeitos benéficos das benzodiazepinas

A eficácia das benzodiazepinas para tratamento de certos distúrbios de ansiedade foi provada em ensaios clínicos controlados randomizados. Estas são eficazes para tratamento agudo dos sintomas de ansiedade generalizada, ansiedade social e distúrbio de pânico, mas também em tratamentos a longo prazo em pacientes que tiveram uma boa resposta ao tratamento agudo. Não há evidência da eficácia das benzodiazepinas no tratamento de *stress* pós-traumático, e há pouca evidência da sua utilidade em pacientes com distúrbio obsessivo-compulsivo.¹ As benzodiazepinas não têm um efeito antidepressivo, mas a sua toma nas primeiras semanas de um tratamento antidepressivo pode aumentar a adesão à terapêutica e melhorar a resposta ao tratamento. Alprazolam, clordiazepóxido, diazepam, lorazepam e oxazepam são algumas das benzodiazepinas usadas como ansiolíticos.⁴⁶

As benzodiazepinas, juntamente com os “fármacos-z” (um grupo de compostos que atuam ligando-se no sítio de ação das benzodiazepinas nos recetores GABA_A, mas que são estruturalmente diferentes, partilhando algumas das propriedades farmacológicas das benzodiazepinas) são os medicamentos mais eficazes para o tratamento a curto prazo da insónia severa, incapacitante e causadora de *stress*. Estes fármacos reduzem o tempo necessário para adormecer, aumentam a duração do sono e diminuem os despertares noturnos. Como hipnóticos, são preferidas benzodiazepinas com uma curta duração de ação, para que o paciente não experimente sonolência no dia seguinte.¹ Flunitrazepam, triazolam e loprozolam são algumas das benzodiazepinas usadas como hipnóticos.⁴⁶

As benzodiazepinas têm propriedades anticonvulsiantes e de relaxamento muscular. Assim, podem ser úteis no tratamento urgente de convulsões e no controlo de espasmos musculares ou de distúrbios do movimento associadas à toma de medicação antipsicótica.¹ O clonazepam é uma das benzodiazepinas com propriedades anticonvulsiantes mais marcadas.⁴⁶

Apesar de a evidência do seu benefício não ser clara, a toma de algumas benzodiazepinas pode ser benéfica em pacientes agitados, com sintomas psicóticos graves ou no tratamento agudo de episódios maníacos. Nestes casos, a dose e a duração do tratamento devem ser cuidadosamente monitorizados.¹

Algumas benzodiazepinas (como o diazepam e o clordiazepóxido) podem ser úteis também em pacientes com síndrome de dependência alcoólica em abstinência do álcool, especialmente na prevenção de ataques epiléticos e *delirium tremens*.¹

2.3.2. Riscos das benzodiazepinas

Estudos controlados e revisões sistemáticas mostram que a toma de benzodiazepinas pode provocar sonolência, sedação e amnésia anterógrada (dificuldade em formar novas memórias). Todos estes efeitos são dose-dependentes.¹

A nível de efeitos psicomotores, a toma de benzodiazepinas pode afetar negativamente a capacidade de conduzir, sendo que a magnitude do efeito é dependente do fármaco, da dose e de outros fatores. Estudos farmacoepidemiológicos sugerem que a toma de benzodiazepinas está associada com um aumento do risco de acidentes rodoviários. Em pacientes idosos, a eliminação de benzodiazepinas de longa duração de ação dá-se mais lentamente do que em pacientes mais jovens. Estão mais vulneráveis aos efeitos cognitivos e psicomotores das benzodiazepinas, aumentando assim o risco de quedas e consequentes lesões, pelo que a prescrição destes fármacos na população idosa deve ser cuidadosamente ponderada.¹

Há alguma controvérsia quanto à questão do comportamento desinibido e impulsivo poder ser provocado apenas pela toma de benzodiazepinas. Este efeito desinibitório pode traduzir-se em hiperatividade, excitação e ansiedade aumentada. Estas reações paradoxais podem levar a ações criminais como agressões. Teoricamente, entende-se que a toma de benzodiazepinas pode desencadear este tipo de reações em indivíduos com predisposição (pacientes com transtorno da personalidade *borderline*, transtornos do controlo de impulsos, entre outros). A combinação de benzodiazepinas com álcool leva a uma maior probabilidade de ocorrência de reações paradoxais.^{46, 1}

Pode ocorrer tolerância aos efeitos das benzodiazepinas, especialmente para os efeitos sedativos e anticonvulsivos. Tolerância para os efeitos hipnóticos e ansiolíticos também pode ocorrer, mas menos frequentemente e mais lentamente.¹

A dependência de benzodiazepinas manifesta-se pelo aparecimento de sintomas de privação quando o tratamento é descontinuado ou a dose é rapidamente reduzida. Os sintomas de privação podem ser físicos (cefaleias, mialgias, taquicardia, fadiga) e psicológicos (irritabilidade, insónia, pesadelos, despersonalização/desrealização). Geralmente, a duração destes sintomas é inferior a um mês. Benzodiazepinas com um menor tempo de meia-vida estão associadas a um maior risco de desenvolver dependência.¹

Para evitar síndrome de privação e efeito *rebound*, é aconselhável ir diminuindo gradualmente a dosagem. Este período de diminuição deve ser considerado mesmo depois de tratamentos a curto prazo; depois de tratamentos mais prolongados, este período pode ter uma duração de vários meses.¹ A tabela 2 resume os efeitos benéficos e os riscos da toma de benzodiazepinas.

Tabela 2 – Efeitos benéficos e os riscos da toma de benzodiazepinas.

Efeitos benéficos das benzodiazepinas	Riscos das benzodiazepinas
<ul style="list-style-type: none">• Tratamento dos sintomas de ansiedade generalizada, ansiedade social e distúrbio de pânico• Aumento da adesão à terapêutica antidepressiva• Tratamento da insônia severa, incapacitante e causadora de <i>stress</i>• Tratamento de convulsões e controlo de espasmos musculares e distúrbios do movimento• Tratamento agudo de episódios maníacos• Tratamento da síndrome de dependência alcoólica.	<ul style="list-style-type: none">• Sonolência, sedação e amnésia anterógrada• Aumento do risco de quedas e consequentes lesões, especialmente em idosos• Diminuição da capacidade de condução• Ocorrência de reações paradoxais - hiperatividade, excitação e ansiedade aumentada - especialmente em indivíduos com predisposição e quando combinadas com o consumo de álcool• Desenvolvimento de tolerância• Desenvolvimento de dependência, síndrome de privação e possibilidade de efeito <i>rebound</i>.

2.4. Abuso de benzodiazepinas

Entre as várias definições de “abuso”, algo que quase todas têm em comum é o princípio de que a substância é usada para fins não terapêuticos, para obtenção de efeitos psicotrópicos (como, por exemplo, euforia e sedação).⁵¹ Segundo a Associação Americana de Psiquiatria, o abuso de uma substância caracteriza-se por um padrão de uso problemático e continuado apesar do conhecimento de se ter um problema social, ocupacional, psicológico ou físico, que é causado ou cujos efeitos são exacerbados pelo uso recorrente mesmo em situações em que é fisicamente perigoso.⁴⁶

Por uso indevido de uma substância, entende-se que a substância não é tomada de acordo com as indicações médicas ou nas dosagens prescritas. O fármaco é tomado com um intuito terapêutico (ou seja, não com o objetivo de obter efeitos psicoativos ou eufóricos) mas não da maneira como foi prescrito.⁵¹

Existem vários fatores que fazem com que uma substância seja passível de uso indevido e abuso. O mais importante está relacionado com o grau de efeito de reforço que a substância provoca. Uma substância apresenta efeito de reforço quando a sua apresentação produz respostas que provocam de novo a procura da substância. Estudos em humanos mostram que as benzodiazepinas provocam efeito de reforço principalmente em indivíduos com um historial de abuso de álcool ou drogas, com distúrbios de ansiedade ou distúrbios do sono, sendo que este efeito não é muito marcado em indivíduos que não possuem estas características.⁵²

Outro fator que permite prever o uso indevido e abuso de uma substância é a probabilidade de ocorrerem sintomas de privação depois de administração continuada. De notar que o abuso pode ocorrer mesmo quando sintomas físicos de privação estão ausentes; a possibilidade de uma substância causar dependência é um indicador da potencialidade de abuso, mas não necessariamente uma condição. Como já foi referido acima, as benzodiazepinas podem causar sintomas de privação (tanto físicos como psicológicos), o que torna este grupo de fármacos passível de uso indevido.⁵²

O terceiro fator que pode indicar a propensão de uma substância para ser objeto de uso indevido está relacionado com o efeito subjetivo por ela produzido.⁵²

Apesar de as benzodiazepinas terem potencial de abuso, este é muito menor do que para outras substâncias, como a heroína, a cocaína ou barbitúricos. O abuso de benzodiazepinas individualmente não é muito frequente, mas o abuso deste grupo de fármacos juntamente com outras substâncias, como álcool ou outras drogas, é muito mais comum.⁴⁶ Uma percentagem significativa de indivíduos com problemas de álcool também abusa de benzodiazepinas. Quando tomadas juntamente com a heroína, este grupo de fármacos permite intensificar os seus efeitos, e esta combinação pode levar *overdoses* fatais. A combinação com anfetaminas é comum para diminuir os tremores e ansiedade causados pela toma de estimulantes e para induzir o sono.⁴⁶

Em situações de abuso, estes fármacos são normalmente consumidos por via oral, mas também podem ser tomados por via intranasal ou intravenosa. Esta última via de administração pode ser especialmente perigosa, uma vez que pode resultar em abscessos, celulite infecciosa, trombose e gangrena, além da possibilidade de transmissão de Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV) e hepatite.⁴⁶

2.5. Importância da análise de benzodiazepinas em toxicologia forense

O abuso de benzodiazepinas está associado com episódios de amnésia e *blackouts* – o que pode levar a consequências graves a nível de segurança rodoviária.⁴⁶

Devido ao seu efeito desinibitório, agressividade e violência são comuns em indivíduos que abusam destas substâncias. Além disso, as benzodiazepinas também podem ser utilizadas para facilitar situações de agressão sexual e assaltos.⁴⁶

Análises toxicológicas são particularmente importantes em casos de homicídio, em que drogas possam ter sido dadas à vítima para que esta ficasse inconsciente. Em casos de aparente suicídio estas análises são também muito importantes.⁴⁷

A interpretação de resultados de uma análise forense *post-mortem* pode ser muito complicada, e dever ser feita com um conhecimento detalhado do caso, incluindo resultados da autópsia, relatórios da cena do crime e historial médico disponível.⁴⁷

Sendo as benzodiazepinas um grupo de fármacos muitas vezes abusado em concomitância com outras drogas ou álcool, pode ser muito difícil determinar a causa da morte e a responsabilidade relativa de cada substância na morte do indivíduo.⁴⁷

3. ANÁLISE DE BENZODIAZEPINAS

Num laboratório de toxicologia forense, a identificação e quantificação de um xenobiótico são cruciais e estão dependentes do desenvolvimento e da melhoria contínua de técnicas de análise.³⁹

Primeiramente, é feita uma análise de *screening*, para detetar se uma substância está ou não presente numa amostra. Depois, é feita uma análise confirmativa qualitativa e/ou quantitativa. A quantificação é necessária (especialmente em toxicologia *post-mortem*) para perceber qual o papel que xenobiótico possa ter desempenhado na intoxicação.³⁹

Antes da análise, ocorre a fase pré-analítica. Esta fase envolve vários processos: vai desde a recolha da amostra, o seu acondicionamento, transporte e armazenamento até à preparação das alíquotas.³⁹

Algumas substâncias presentes num organismo podem sofrer alterações químicas *post-mortem*. Isto é o caso das nitrobenzodiazepinas, como o nitrazepam, o clonazepam e o flunitrazepam, que são rapidamente convertidas nos seus metabolitos por bactérias anaeróbias. Assim, análises toxicológicas *post-mortem* destas substâncias devem ter como foco os seus metabolitos. Outras benzodiazepinas também podem estar sujeitas a alterações *post-mortem*, mas estas podem ser minimizadas se as amostras forem armazenadas a -20°C ou menos e analisadas o mais rapidamente possível. Alguns dados sugerem que o diazepam e o temazepam se degradam facilmente em organismos em fase de putrefação. Assim, em cadáveres já neste estágio de decomposição e em que se suspeite de exposição a benzodiazepinas, é aconselhável a colheita de amostras como cabelo.³⁹

3.1. Amostras biológicas

Em toxicologia forense, uma amostra biológica é uma porção de fluido corporal, tecido, etc. que tenha estado em contacto com a substância de interesse e cuja colheita é feita sob condições definidas. Embora teoricamente uma análise toxicológica possa ser realizada em quase qualquer amostra, estas normalmente realizam-se em amostras para as

quais existe um método validado ou literatura suficiente para apoiar a interpretação dos resultados obtidos.³⁹

Para deteção e quantificação de benzodiazepinas, várias amostras podem ser analisadas: sangue, sêrum, plasma, urina, fluido oral, cabelo, fezes, líquido cefalorraquidiano e unhas.⁵³ Abaixo, serão discutidas as mais importantes. O tipo de amostra a utilizar depende de vários fatores: se se trata de uma análise *ante-* ou *post-mortem*, se se pretende uma análise quantitativa ou apenas qualitativa, quais os tecidos/fluidos que estão disponíveis para serem colhidos, entre outros.³⁹

3.1.1. Colheita, acondicionamento e armazenamento de amostras

Os resultados de uma análise de uma amostra biológica podem ser fortemente influenciados pelo modo como a colheita é feita. Assim, é essencial assegurar que esta é realizada de maneira adequada e tendo em conta a análise pretendida.⁵⁴

A colheita de amostras deve ser feita de maneira a evitar tanto a perda de analito como a contaminação da amostra por substâncias que possam interferir na análise e na interpretação dos resultados. Aquando da colheita de amostras, devem ser tidas em conta questões relacionadas com segurança. Como regra geral, todas as amostras devem tratadas como se fossem infecciosas, e portanto manuseadas com cuidado. Os principais riscos estão relacionados com tuberculose, hepatite B e HIV.³⁹

No que respeita ao acondicionamento, é essencial assegurar que os recipientes que contêm as amostras estão devidamente identificados, de maneira a que não existam dúvidas quanto à origem da amostra. No mínimo, a seguinte informação deve estar presente: número de identificação do caso, nome da vítima, tipo de amostra e local anatómico de colheita (se aplicável), assinatura do responsável pela colheita, data e hora. Estes recipientes devem ficar bem cheios e ser firmemente fechados.³⁹

O armazenamento de amostras, especialmente se não forem analisadas imediatamente, deve ser feito a temperatura adequada, se necessário em recipientes com conservante apropriado, num ambiente seguro.³⁹ Geralmente, depois de colhidas, as amostras permanecem à temperatura ambiente por umas horas durante o transporte, receção e registo. São depois armazenadas à temperatura de 4°C durante alguns dias, até à análise de deteção e confirmação/quantificação estar concluída e a temperaturas negativas durante vários meses ou anos para efeitos legais e possível reanálise.⁵⁵

Melo *et al.* conduziu em 2012 um estudo para avaliar a estabilidade das benzodiazepinas em amostras *post-mortem* armazenadas a diferentes temperaturas. Este estudo concluiu que a degradação de benzodiazepinas aumentou com o tempo de

armazenamento, e que não houve diferenças entre amostras armazenadas a -20°C e a -80°C; as benzodiazepinas estudadas apresentaram alguma estabilidade durante os seis meses quando armazenadas a temperaturas negativas.⁵⁵

3.1.2. Sangue, plasma e s rum

Apesar da sua complexidade, o sangue   a amostra biológica de excelência para detectar, quantificar e interpretar a presença de benzodiazepinas, especialmente em toxicologia *post-mortem*.⁵⁴   a amostra biológica de referência para determinar se uma substância estava presente num nível terapêutico, subterapêutico ou potencialmente tóxico na altura da morte.⁴⁰

O principal fator que contribui para a complexidade desta amostra e que pode dificultar a interpreta o dos resultados   um fen meno conhecido como redistribui o *post-mortem* – movimento de substâncias entre tecidos,  rgoos e fluidos corporais que ocorre depois da morte. Este   um fen meno complexo, nos quais provavelmente estão envolvidos vários mecanismos. Pensa-se que altera es no pH e na estrutura das proteínas que ocorrem após a morte levem   quebra das liga es entre fármacos e proteínas, e há liberta o e difusão da substância de  rgoos ou tecidos onde a sua concentra o   maior (normalmente fígado e pulmões) para os vasos sanguíneos mais próximos. Fármacos que se concentram nos  rgoos mais importantes através de liga es a proteínas e outras moléculas, como   o caso dos antidepressivos tricíclicos, são mais passíveis de sofrerem redistribui o *post-mortem*. As benzodiazepinas não são muito afetadas por este processo uma vez que a sua concentra o nos principais  rgoos não   muito elevada relativamente   sua concentra o no sangue.⁴⁷ Para análises *ante-mortem*, o sangue   normalmente colhido de uma veia. Neste tipo de análises, a maioria dos ensaios quantitativos são feitos em plasma e/ou s rum.³⁹

3.1.3. Urina

A urina   uma das maiores vias de elimina o de xenobióticos do organismo; nela acumulam-se substâncias tóxicas e respetivos metabolitos, o que pode resultar numa elevada concentra o, tornando mais fácil a dete o destas substâncias. Esta matriz   geralmente desprovida de compostos de elevado peso molecular devido ao processo de filtra o glomerular, o que simplifica a sua prepara o para análise.^{39, 54}

No entanto,   universalmente aceite que, salvo raras exce es, não há uma correla o entre a concentra o de uma substância na urina e a sua concentra o no sangue, e ainda menos entre a concentra o na urina e efeitos farmacológicos ou toxicológicos.

Vários fatores podem afetar a concentração de um xenobiótico na urina, tais como a ingestão de líquidos, taxa metabólica, taxa de filtração glomerular e pH da urina (bases fracas como anfetaminas e metadona são mais eficientemente excretadas em urina ácida, enquanto ácidos fracos como barbitúricos são mais eficientemente excretados em urina básica). Assim, tentar estimar a concentração sanguínea de uma substância a partir da sua concentração na urina é imprudente.³⁹ Amostras de urina são então adequadas para fazer a triagem de substâncias com interesse médico-legal e são especialmente de interesse em análises *ante-mortem* para controlo do consumo de determinadas substâncias.³⁹

Muitas benzodiazepinas são excretadas na urina maioritariamente na forma dos seus metabolitos resultantes de reações de glucuronidação, que são mais polares. A maioria dos métodos convencionais para deteção na urina requer hidrólise enzimática ou ácida, formando benzofenonas.⁵⁶

3.1.4. Fígado

Em toxicologia *post-mortem*, a análise ao fígado pode ser de grande utilidade para complementar os dados obtidos na análise ao sangue ou em casos em que não seja possível obter sangue. Este tecido apresenta diversas vantagens: por ser o principal órgão responsável pelo metabolismo, nele encontram-se normalmente elevadas concentrações da substância de interesse e dos respetivos metabolitos; além disso, é um tecido razoavelmente homogéneo e relativamente pouco afetado por redistribuição *post-mortem*. No entanto, a utilização de amostras deste tecido apresenta também algumas limitações: a necessidade de preparar um homogenato, a presença do efeito de matriz e a ausência de uma base de dados que auxilie na interpretação dos dados obtidos.³⁹

3.1.5. Humor vítreo

O humor vítreo é um líquido transparente e gelatinoso que se encontra entre o cristalino e a retina. Pode ser de uma grande utilidade em análises toxicológicas *post-mortem* (especialmente quando não é possível obter amostras de sangue) devido ao facto de se encontrar no organismo numa quantidade considerável, ser facilmente acessível e manter-se estável após a morte, uma vez que está protegido de putrefação e trauma, é resistente a contaminação microbiológica e é pouco suscetível aos efeitos da redistribuição *post-mortem*.⁵⁷ No entanto, existem poucos estudos que relacionem a concentração em humor vítreo com a concentração no sangue.³⁹

Em 2014, foi publicado um estudo por Bévalot *et al.* que avaliou uso de humor vítreo e biliar como matrizes alternativas ao sangue para determinação qualitativa e quantitativa de

seis substâncias, entre as quais duas benzodiazepinas – diazepam e citalopram. Para isto, foram realizados testes em animais e analisadas amostras recolhidas em autópsias de seres humanos. A nível qualitativo, as amostras de humor vítreo mostraram ser valiosas: quando as moléculas foram detetadas nas amostras de sangue, foram sistematicamente detetadas nas amostras de humor vítreo. Mais: nos testes em animais, demonstrou-se que esta matriz proporcionava geralmente janelas de deteção mais largas que o sangue. A nível quantitativo, foi demonstrada a existência de uma correlação significativa entre a concentração das moléculas analisadas no sangue e no humor vítreo nos testes em animais; no entanto, nas amostras humanas, esta correlação não foi encontrada para o diazepam.⁴⁰

3.1.6. Fluido oral

Nos últimos anos, tem aumentado o interesse em amostras biológicas alternativas como o fluido oral, o cabelo e o suor como matrizes para deteção de xenobióticos e respetivos metabolitos. Em toxicologia forense, o fluido oral pode ter utilidade especialmente em análises *ante-mortem*.⁵³

Apresenta como principal vantagem a facilidade de colheita. Além disso, como é constituído maioritariamente por água (com pequenas quantidades de proteína e lípidos), a sua análise pode ser mais fácil e rápida quando comparada com a de outras substâncias. No entanto, apresenta também algumas desvantagens: vários fatores como o volume de fluido colhido, a recuperação dos analitos do aparelho utilizado e a estabilidade da substância podem influenciar a sua concentração. Normalmente, o período em que xenobióticos são detetáveis no fluido oral é menor do que aquele em que são detetáveis na urina, pelo que métodos de análise mais sensíveis são necessários.⁵³

Usando como método de análise, por exemplo, cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massa em tandem (LC-MS/MS), é possível obter métodos fiáveis e precisos para quantificação de benzodiazepinas em fluido oral.⁵³ Kintz *et al.* publicou em 2005 um método sensível, específico e reproduzível para a deteção e quantificação de dezassete benzodiazepinas e outros hipnóticos no fluido oral.⁵⁸

3.1.7. Cabelo

Tal como acontece com o fluido oral, o interesse no cabelo como matriz biológica tem aumentado nos últimos anos, especialmente com o desenvolvimento de técnicas analíticas cada vez mais sensíveis. Em relação às amostras biológicas clássicas – como o sangue e a urina – oferece a vantagem de permitir uma colheita não invasiva que pode ser realizada sob estreita supervisão para evitar adulteração ou substituição. A janela de deteção

é alargada para semanas, meses ou até anos, e é especialmente útil na construção do histórico de uso (ou não uso) de substâncias. No entanto, ainda há pouca informação no que concerne à interpretação de resultados, e a taxa de incorporação de determinada substância pode ser influenciada por fatores como a etnia do indivíduo, tratamentos cosméticos, contaminação externa e particularidades relacionadas com a própria substância. Para a análise de alguns analitos – como é o caso das benzodiazepinas – são necessários métodos muito sensíveis, especialmente se foi administrada apenas uma dose da substância.⁵⁹

Fernández *et al.* desenvolveu e validou em 2014 um método para a deteção de vinte e nove benzodiazepinas e outros hipnóticos em cabelo, usando como método de análise cromatografia líquida de ultra alta eficiência acoplada a espectrometria de massa em tandem (UHPLC – MS/MS).⁵⁹ A tabela 3 resume as vantagens e desvantagens da utilização das diversas amostras biológicas aqui discutidas.

Tabela 3 – Resumo das vantagens e desvantagens da utilização de cada amostra biológica.

Amostra	Vantagens	Desvantagens
Sangue, plasma e sêrum	<ul style="list-style-type: none"> • Permite determinar se uma substância estava presente num nível terapêutico, subterapêutico ou potencialmente tóxico na altura da morte. 	<ul style="list-style-type: none"> • Redistribuição <i>post-mortem</i>.
Urina	<ul style="list-style-type: none"> • Elevada concentração de xenobióticos. • Ausência de grandes moléculas. 	<ul style="list-style-type: none"> • Ausência de correlação entre a concentração de uma substância na urina e efeitos farmacológicos/toxicológicos.
Fígado	<ul style="list-style-type: none"> • Elevada concentração de benzodiazepinas e metabolitos. • Pouco afetado pela redistribuição <i>post-mortem</i>. 	<ul style="list-style-type: none"> • Necessidade de preparar um homogenato. • Elevado efeito de matriz. • Poucas bases de dados para auxiliar interpretação.
Humor vítreo	<ul style="list-style-type: none"> • Facilidade de colheita. • Mantém-se estável após a morte. 	<ul style="list-style-type: none"> • Pouca literatura.
Fluido oral	<ul style="list-style-type: none"> • Facilidade de colheita. • Pouca presença de proteínas e lípidos. 	<ul style="list-style-type: none"> • Necessidade de métodos mais sensíveis • A concentração pode ser influenciada por vários fatores.
Cabelo	<ul style="list-style-type: none"> • Colheita não invasiva e facilmente supervisionada. • Larga janela de deteção. 	<ul style="list-style-type: none"> • Pouca literatura. • Taxa de incorporação influenciada por vários fatores. • Necessidade de métodos sensíveis.

3.2. Preparação de amostras

A preparação das amostras a serem analisadas é essencial. As matrizes biológicas são muito complexas, com presença de proteínas, lipídios e sais que podem influenciar a sensibilidade e a seletividade do processo. As técnicas mais utilizadas para o pré-tratamento de amostras biológicas são a extração líquido – líquido (LLE) e extração em fase sólida (SPE).⁵³

Técnicas de extração seguidas de cromatografia podem ser realizadas de dois modos: *online* ou *offline*. Quando as técnicas de preparação de amostras são feitas *online*, a etapa de extração é realizada no próprio sistema cromatográfico; em processos *offline*, esta etapa é efetuada separadamente.⁶⁰ Na prática, a maioria dos processos de preparação de amostras são realizados *offline*.⁵³

Na literatura têm sido descritos vários processos para a extração de benzodiazepinas: extração líquido – líquido, extração líquido – líquido dispersiva, extração em fase sólida, micro extração em fase sólida, extração por fluido supercrítico, extração em fase sólida usando polímeros de impressão molecular, e procedimentos de não extração, como a injeção direta.⁶¹ Abaixo serão discutidos os mais pertinentes.

3.2.1. Extração líquido - líquido (LLE)

A extração líquido – líquido – em inglês, *Liquid – Liquid Extraction* (LLE) – é uma técnica de extração que envolve duas fases líquidas imiscíveis, uma orgânica e uma aquosa. A escolha adequada do solvente orgânico e o ajuste do pH é essencial para uma boa recuperação do analito. No final do processo, os analitos estão normalmente presentes no solvente orgânico. Depois de uma etapa de evaporação, o resíduo é reconstituído e concentrado num solvente compatível com a técnica de análise a ser utilizada. Esta técnica apresenta diversas vantagens: é simples e relativamente eficaz, pouco dispendiosa, há uma grande variedade de solventes disponíveis e é uma técnica extensivamente descrita na literatura. No entanto, apresenta também algumas desvantagens: são necessários grandes volumes de solventes e de amostra, pode ocorrer adsorção dos analitos na vidraria e acarreta problemas relacionados com a formação de emulsões.^{53, 60}

Solventes de extração comumente utilizados para extração de benzodiazepinas são benzeno, éter etílico, metanol, acetona, clorofórmio, dicloroetano, tolueno e misturas compostas por clorofórmio : isopropanol (3:1), benzeno : diclorometano (4:1), clorofórmio : etanol (5:1) e tolueno : heptano (4:1).⁶²

Yoshida e Akane estudaram a extração de benzodiazepinas em amostras de sêrum através de um método denominado “extração líquido – líquido a temperatura sub-zero”.

Baseando-se no facto do acetonitrilo hidrofílico se separar da fase aquosa a sensivelmente - 20°C, uma mistura de acetonitrilo com a amostra ou com uma solução aquosa foi sujeita a esta temperatura para que ocorresse separação das duas fases. Depois de repetir este processo três ou quatro vezes, a percentagem de recuperação dos analitos foi de quase 100% e na cromatografia líquida de alta eficiência que se seguiu não foram detetados outros componentes que interferissem na quantificação de benzodiazepinas.⁶³

3.2.2. Extração em fase sólida (SPE)

A extração em fase sólida (SPE, do inglês *Solid Phase Extraction*) é um procedimento baseado nos mesmos princípios que a cromatografia líquida. Nesta técnica, a amostra é introduzida num cartucho que contém a fase estacionária, onde o analito (e possivelmente outros componentes) fica retido. Depois de se limpar a coluna para retirar os interferentes menos retidos que o analito, este é eluído com um solvente apropriado.⁶⁰ Contrariamente à extração líquido – líquido, esta técnica não apresenta o problema da formação de emulsões, e não requer o uso de grandes volumes de solvente. Como estão disponíveis no mercado um grande número de diferentes cartuchos e solventes, está técnica pode ser indicada para vários tipos de analitos. No entanto, esta técnica apresenta também algumas desvantagens: requer o uso de solventes orgânicos e é um processo que envolve várias etapas.⁵³

Solventes de extração comumente utilizados para extração de benzodiazepinas são benzeno, éter etílico, metanol, acetona, clorofórmio, dicloroetano, tolueno e misturas compostas por clorofórmio : isopropanol (3:1), benzeno : diclorometano (4:1), clorofórmio : etanol (5:1) e tolueno : heptano (4:1).⁶²

Para extração de benzodiazepinas, podem ser utilizados diferentes materiais. Têm sido descritos métodos de SPE de fase reversa, em que a fase estacionária é não polar, com o uso de cartuchos C₈ e C₁₈.⁵³ Kuang *et al.* comparou LLE com SPE C₁₈, concluindo que a taxa de recuperação era semelhante para os dois métodos, mas que havia menos impurezas associadas à SPE.⁶⁴

Os cartuchos Oasis[®] HLB possuem uma fase estacionária formada por um copolímero com propriedades tanto hidrofílicas como lipofílicas, capazes de capturar analitos polares; isto apresenta uma vantagem na análise de benzodiazepinas, uma vez que os seus metabolitos são normalmente mais polares (como é o caso do oxazepam, um metabolito do diazepam). Além disso, não há necessidade de manter a fase estacionária húmida.⁵³ He *et al.* estudou as vantagens da utilização deste cartucho para extração de metadona e benzodiazepinas em amostras biológicas em comparação com cartuchos de C₁₈ e com LLE. Os resultados mostraram que as taxas de recuperação de analito eram mais elevadas quando

usado um cartucho Oasis[®] HLB, o tempo de extração era menor e os cromatogramas obtidos eram mais limpos.⁶⁵

Como referido acima, a maioria das técnicas de preparação de amostras são feitas *offline*, o que faz com que sejam necessários volumes relativamente elevados de amostra e de solvente de eluição. Métodos de SPE *online* requerem menores quantidades de amostra, não necessitam de concentração do extrato antes da injeção e são mais rápidos.⁵³ Feng *et al.* desenvolveu um método para a determinação simultânea de várias drogas de abuso e respetivos metabolitos na urina por LC-MS/MS, automatizando o procedimento de SPE e comparando os resultados com aqueles obtidos quando a preparação foi realizada manualmente. O procedimento de SPE utilizado apresentou taxas de recuperação tão boas ou melhores que as resultantes dos procedimentos manuais, com resultados semelhantes a nível de precisão e exatidão.⁶⁶

No início da década de 1990, Pawliszyn desenvolveu uma técnica de preparação de amostras designada microextração em fase sólida (SPME, do inglês *Solid-Phase Microextraction*). Esta técnica apresenta vantagens em relação à SPE clássica: é um processo rápido e não há necessidade da utilização de solventes. Foi especialmente desenvolvida para a análise de analitos voláteis através de cromatografia gasosa, mas tem sido aplicada em análises por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC, do inglês *High Performance Liquid Chromatography*) e eletroforese capilar. O dispositivo básico de SPME consiste, normalmente, numa fibra de sílica fundida com cerca de 10 mm de comprimento e 110 a 160 µm de diâmetro coberta com materiais adsorventes com uma espessura de 7 a 100 µm. A extração pode ser realizada diretamente ou por *headspace*. Esta última é preferível: produz extratos mais limpos e há menos desgaste das fibras por não haver adsorção de proteínas que ocorre na extração direta. No entanto, a maioria dos fármacos são não ou semi-voláteis, tornando a extração por *headspace* de fluidos biológicos difícil.^{67 68}

Mullett e Pawliszyn publicaram em 2002 um artigo que descrevia a determinação direta de benzodiazepinas em fluidos biológicos empregando como técnica de extração SPME utilizando como material de revestimento da fibra alquil-diol-sílica (ADS). As partículas (porosas) deste material de acesso restrito possuem uma camada exterior que impede a adsorção de proteínas, enquanto que a camada interior é responsável pela extração dos analitos de interesse. O uso de ADS permite assim uma extração direta sem contaminação por proteínas.⁶⁸ A tabela 4 resume as vantagens e desvantagens das principais técnicas de preparação de amostras aqui discutidas.

Tabela 4 – Vantagens e desvantagens das várias técnicas de preparação de amostras.

Técnica	Vantagens	Desvantagens
Extração Líquido – Líquido (LLE)	<ul style="list-style-type: none">• Simples e relativamente eficaz• Pouco dispendiosa• Grande variedade de solventes disponíveis• Extensivamente descrita na literatura	<ul style="list-style-type: none">• Necessários grandes volumes de solventes e de amostra• Adsorção dos analitos na vidraria• Formação de emulsões
Extração em Fase Sólida (SPE)	<ul style="list-style-type: none">• Não há formação de emulsões• Não requer uso de grandes volumes de solventes e amostra• Disponibilidade de grande número de diferentes cartuchos e solventes	<ul style="list-style-type: none">• Uso de solventes orgânicos• Processo com várias etapas
Microextração em Fase Sólida (SPME)	<ul style="list-style-type: none">• Processo rápido• Não requer a utilização de solventes	<ul style="list-style-type: none">• Possível desgaste das fibras

3.3. Métodos de análise

Os métodos analíticos para análises de benzodiazepinas podem ser categorizados da seguinte forma:

- 1 – Métodos cromatográficos – cromatografia em camada fina (TLC, do inglês *Thin-Layer Chromatography*), cromatografia gasosa (GC, do inglês *Gas Chromatography*), e cromatografia líquida (cromatografia líquida de alta eficiência, cromatografia líquida de ultra eficiência, cromatografia líquida micelar e separação quiral).
- 2 – Imunoensaios (IA, do inglês *Immunoassay*).
- 3 – Eletro-separação capilar.
- 4 – Fotometria.
- 5 – Métodos eletroanalíticos (potenciometria, voltametria).⁶¹

A figura 2 apresenta uma comparação entre os métodos aplicados nas publicações relativas à análise de benzodiazepinas.

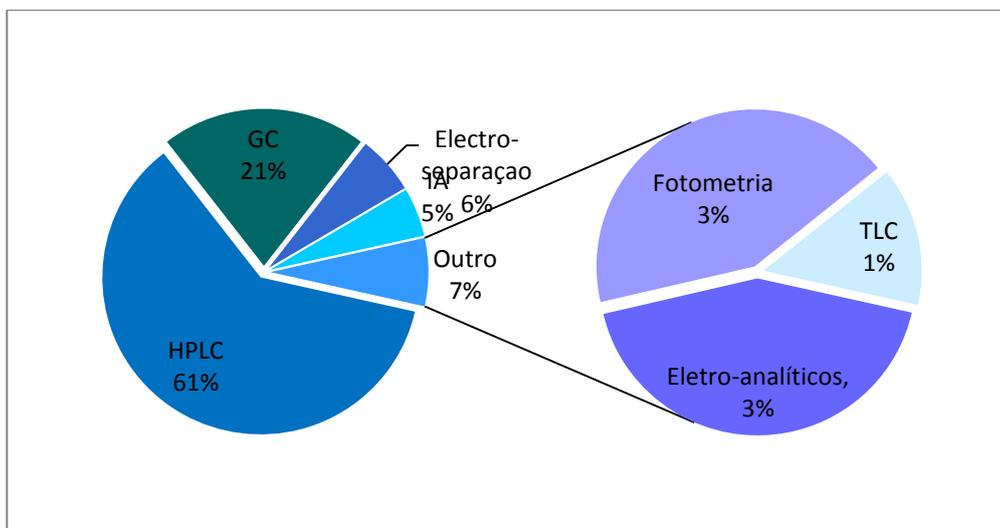


Figura 2 – Comparação entre os métodos aplicados nas publicações relativas à análise de benzodiazepinas.⁶¹

De seguida, serão discutidos os métodos com mais interesse/mais explorados para a análise de benzodiazepinas em toxicologia forense.

3.3.1. Imunoensaios

Imunoensaios são métodos de análise que se baseiam na interação entre antígenos (moléculas alvo) e anticorpos.⁶⁹ Existem vários tipos de imunoensaios: radioimunoensaios (RIA, do inglês *Radioimmunoassay*), ensaios imunoenzimáticos (EIA, do inglês *Enzyme Immunoassay*), imunoensaios de fluorescência polarizada (FPIA, do inglês *Fluorescence Polarization Immunoassay*) e ensaios baseados na inibição da aglutinação do látex (LAI, do inglês *Inhibition of Latex Agglutination*).⁶² Os RIA são normalmente ensaios competitivos, em que a concentração de analito é extrapolada da curva de calibração. Este tipo de ensaios utiliza como marcador isótopos radioativos, como ¹²⁵I, ¹⁴C e ³H. O ELISA (do inglês *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) é o exemplo mais clássico dos EIA. Este ensaio baseia-se nas reações antígeno-anticorpo detetáveis através de reações enzimáticas.⁷⁰ Os FPIA utilizam como marcador fluorocromos.⁷¹

Os imunoensaios são métodos rápidos e flexíveis. No entanto, apresentam algumas dificuldades no que respeita à determinação de benzodiazepinas. Este é um grande grupo de fármacos, do qual fazem parte mais de 50 moléculas (sendo que muitas delas podem ainda ser convertidas a diferentes metabolitos) que apresentam diferenças estruturais, de potência e de vias metabólicas e de eliminação.⁷² Este tipo de ensaios não deteta especificamente uma substância – os anticorpos detetam substâncias que possam ter uma estrutura química semelhante e que sejam imunologicamente reativos, mas que podem não ser a substância de interesse. Imunoensaios para deteção de anfetaminas, por exemplo, podem também detetar

fenilpropanolamina e efedrina. Este fenômeno tem o nome de reatividade cruzada e pode levar à existência de falsos positivos.⁴⁷ Certas benzodiazepinas ou metabolitos podem apresentar uma baixa imunoreatividade (especialmente metabolitos resultantes de reações de glucuronidação), o que pode levar a falsos negativos.⁷²

Em 2013, Bertol *et al.* avaliou a detecção de benzodiazepinas e metabolitos em amostras de urina por imunoenaios e por LC-MS/MS. Neste estudo, comparou os principais imunoenaios utilizados em toxicologia forense - *Cloned Enzyme Donor Immunoassay* (CEDIA); *Enzyme-Multiplied Immunoassay Technique*, (EMIT); *Fluorescent Polarization ImmunoAssay*, (FPIA); *Kinetic Interaction of Microparticles in Solution*, (KIMS) e *Immuno chromatographic Techniques* (IMC) – e LC-MS/MS. Para este estudo, foram avaliados vários parâmetros: verdadeiros positivos (VP), verdadeiros negativos (VN), falsos positivos (FP), falsos negativos (FN), sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo (VPP) – calculado por $VP/(VP+FP)$, valor preditivo negativo (VPN) – calculado por $VN/(VN+FN)$ - e exatidão. No que respeita aos resultados dos imunoenaios, estes mostraram uma alta sensibilidade mas uma baixa especificidade, o que leva a uma elevada incidência de falsos positivos, requerendo assim um grande número de análises de confirmação. Os ensaios de IMC foram os que apresentaram o maior número de falsos positivos. Por outro lado, foram também detetados alguns falsos negativos, especialmente quando o método usado foi o FPIA. Normalmente, falsos negativos não são seguidos de análise de confirmação, pelo que a sua ocorrência pode ter consequências graves quando se trata de uma análise na área da toxicologia forense. Assim, quando as circunstâncias de um caso sugerem fortemente o uso de benzodiazepinas, resultados negativos deverão também ser seguidos por uma análise através de, por exemplo, LC-MS/MS. CEDIA, EMIT e KIMS apresentaram os melhores resultados de exatidão, VPP e VPN. Observando os resultados quantitativos obtidos nos imunoenaios, nota-se uma sobrestimação em relação aos obtidos por LC-MS/MS; KIMS e FPIA mostraram os valores mais próximos aos de LC-MS/MS.⁷²

Assim, imunoenaios são normalmente usados como método de triagem, seguindo-se depois uma análise por outro método (como cromatografia líquida ou cromatografia gasosa) para confirmação/quantificação.⁷² A tabela 5 resume as principais características dos imunoenaios usados para a detecção de benzodiazepinas em toxicologia forense.

Tabela 5 – Resumo das principais características dos imunoenaios usados para a detecção de benzodiazepinas em toxicologia forense aqui discutidos.

Princípio	Tipos	Vantagens	Desvantagens	Utilidade
Interação entre antigénios (moléculas alvo) e anticorpos.	<ul style="list-style-type: none"> • RIA • EIA (ELISA) • FPIA • LAI 	<ul style="list-style-type: none"> • Rápidos • Flexíveis 	<ul style="list-style-type: none"> • Não específicos • Possível baixa imunoreatividade 	Método de triagem

3.3.2. Cromatografia em Camada Fina (TLC)

A cromatografia em camada fina é uma das mais antigas técnicas cromatográficas.⁷³ Relativamente às outras técnicas cromatográficas, é um método simples e rápido.⁷⁴

Na maioria dos procedimentos de TLC para análise toxicológica, as benzodiazepinas e os seus metabolitos são primeiro hidrolisados, dando origem a benzofenonas. Diferentes benzodiazepinas podem dar origem à mesma benzofenona, pelo que estes métodos não são específicos. Certos fármacos, como o alprazolam, o loprazolam e o triazolam não formam benzofenonas. Como solventes, são frequentemente usados acetato de etilo, as misturas clorofórmio : metanol (97:3), clorofórmio : acetona (90:10), clorofórmio : tolueno : metanol (46:50:4), entre outros.⁷⁵ As placas cromatográficas impregnadas com material fluorescente podem ser analisadas sob radiação ultravioleta (UV) a 254 e 246 nm; uso de radiação infravermelha também tem sido descrito.⁶² Como reagentes de visualização podem ser usados ácido sulfúrico, reagentes de iodo e reagente de Dragendorff, entre outros.⁷⁵

Hancu *et al.* desenvolveu um método rápido e sensível para a identificação e separação de oito das mais usadas benzodiazepinas (alprazolam, bromazepam, clorazepato dipotássico, clordiazepóxido, diazepam, nitrazepam, oxazepam). A hidrólise ácida foi feita “*in situ*” – ácido sulfúrico foi colocado sobre cada *spot* na placa cromatográfica. Como fase estacionária foi usada uma placa HPTLC de sílica-gel GF254. Como fase móvel foram testados seis sistemas: 1 – acetato de etilo; 2 – clorofórmio : metanol (9:1); 3 – clorofórmio : acetona (4:1); 4 – acetato de etilo : metanol : amónia (17:2:1); 5 – hexano : clorofórmio : metanol (5:5:1) e 6 – acetona : clorofórmio : isopropanol (8:1:1). As placas foram visualizadas sob radiação ultravioleta (UV) a 254 e a 366 nm e depois pulverizadas com reagente de Dragendorff para medir o fator de retenção (Fr). O alprazolam apresentou o valor mais baixo de Fr – tem uma elevada massa molecular. O oxazepam mostrou um valor de Fr mais baixo que os estruturalmente semelhantes diazepam ou medazepam, pois é mais polar – liga-se mais fortemente à fase estacionária. Os sistemas testados permitiram uma fácil e rápida identificação das benzodiazepinas em teste.⁷⁴

Uma análise quantitativa de benzodiazepinas por TLC pode ser obtida através de densitometria. Cromatografia em camada fina de alta eficiência (HPTLC, do inglês *High Performance Thin Layer Chromatography*) equipada com injetor automático e scanner de densitometria é um método sensível e apropriado para a análise qualitativa e quantitativa de benzodiazepinas.⁶² A tabela 6 resume as principais características dos métodos de TLC usados para a detecção de benzodiazepinas em toxicologia forense.

Tabela 6 – Resumo das principais características dos métodos de TLC usados para a detecção de benzodiazepinas em toxicologia forense aqui discutidos.

Solventes (exemplos)	Análise de placas	Visualização	Vantagens
<ul style="list-style-type: none"> • Acetato de etilo • Clorofórmio: metanol • Clorofórmio: acetona • Clorofórmio: tolueno: metanol 	<ul style="list-style-type: none"> • Radiação UV • Radiação IV 	<ul style="list-style-type: none"> • Ácido sulfúrico • Reagentes de iodo • Reagente de Dragendorff 	<ul style="list-style-type: none"> • Método simples e rápido • Acoplado com densitometria permite quantificação.

3.3.3. Cromatografia Gasosa (GC)

A cromatografia em geral é um processo separativo e a gasosa é uma variante usada para separar componentes de misturas formadas por compostos voláteis. Um aspeto essencial em cromatografia é a coluna cromatográfica, onde vai ocorrer a separação dos diferentes analitos de acordo com o seu grau de interação com a coluna. Em cromatografia gasosa, a coluna cromatográfica é um longo tubo recheado por um material inerte adsorvente, normalmente revestido por um líquido que atua como fase estacionária. A fase móvel é um gás de transporte – normalmente hélio ou azoto. Este gás tem como finalidade forçar a passagem da amostra através da coluna e, de acordo com a afinidade de cada analito presente para a fase estacionária, estes ficarão mais ou menos tempo retidos na coluna, antes de serem canalizados para o detetor. Uma vez que a temperatura influencia a volatilidade dos compostos, a coluna encontra-se dentro de um forno. Numa análise por cromatografia gasosa, a amostra é injetada no fluxo de gás de transporte, e as moléculas de cada substância nela presentes distribuem-se entre a fase móvel e a fase estacionária. O período de tempo que a substância demora a atravessar a coluna é conhecido como tempo de retenção.⁷⁶ A figura 3 apresenta um diagrama de blocos de um sistema GC típico.⁷⁷

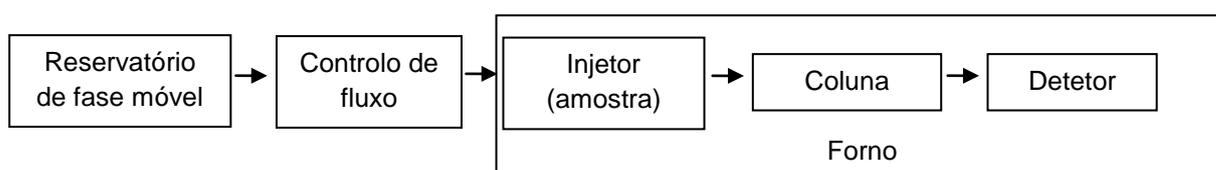


Figura 3 – Diagrama de blocos de um sistema GC típico.

A cromatografia gasosa é um dos melhores métodos para confirmação de benzodiazepinas.⁶¹ A maioria dos procedimentos publicados exige uma derivatização de maneira a tornar as substâncias de interesse voláteis. Em alguns casos, este processo pode não ser necessário, mas permite uma maior estabilidade térmica e produz espectros de massa mais definidos.⁶¹ Papoutsis *et al.* descreveu um processo de derivatização em dois passos – propilação e propinilação.⁷⁸ Para *screening*, detecção e quantificação de 128 substâncias em simultâneo – incluindo benzodiazepinas, Adamowick *et al.* procedeu à sua derivatização por BSTFA + 1%TMCS.⁷⁹

As colunas são geralmente de sílica fundida. Como fase estacionária tem sido descrito frequentemente o uso de 100% dimetil polisiloxano e 5% difenil – 95% dimetil polisiloxano, apresentando bons resultados a nível de separação dos analitos.⁶¹ A maioria dos métodos descritos utilizam programação de temperatura para melhorar a separação, especialmente quando o ensaio envolve a detecção de um grande número de benzodiazepinas.⁷³

Vários métodos têm sido descritos para a detecção: detecção por ionização de chama (FID, do inglês *Flame Ionization Detection*), detecção por captura de eletrões (ECD, do inglês *Electron-Capture Detection*), detecção azoto-fósforo (NPD, do inglês *Nitrogen-Phosphorus Detection*), por espectrometria de massa (MS, do inglês *Mass Spectrometry*) e por espectrometria de massa em tandem (MS/MS). Um detetor ideal deve apresentar várias características: detetar pequenas quantidades, fornecer uma resposta linear aos analitos, apresentar estabilidade e reprodutibilidade, ser resistente a elevadas temperaturas, ser de fácil operação e apresentar um tempo de resposta curto.⁸⁰ A detecção por espectrometria de massa tem sido o mais descrito na literatura para detecção de benzodiazepinas em cromatografia gasosa. Como modo de ionização, é usado impacto eletrónico (EI, do inglês *Electron Impact*), ionização química positiva (PCI, do inglês *Positive Chemical Ionization*), e ionização química negativa (NCI, do inglês *Negative Chemical Ionization*).⁶²

Papoutsis *et al.* desenvolveu e validou um método para a separação, identificação e quantificação de 23 benzodiazepinas e metabolitos no sangue através de EI-GS-MS. A extração dos analitos das amostras foi feita através de LLE, usando clorofórmio. O solvente orgânico foi evaporado e os resíduos foram reconstituídos com acetonitrilo. A derivatização foi feita através de propilação e propinilação. O gás de arraste utilizado foi hélio a uma velocidade de 1 mL/min. A temperatura do forno foi programada para 120°C durante 1 minuto, aumentada para 295°C a 10°C/min com 5 minutos de *hold time*. O modo de ionização utilizado foi EI com SIM (modo de monitorização seletiva de iões, do inglês *Selected-Ion Monitoring*). Foram avaliados vários parâmetros para a validação do método: seletividade, especificidade, linearidade, limites de detecção (LOD, do inglês *Limit Of Detection*)

e de quantificação (LOQ, do inglês *Limit Of Quantification*), taxa de recuperação, precisão e exatidão e estabilidade. O método foi totalmente validado e aplicado em casos de toxicologia clínica e forense com sucesso.⁷⁸ A tabela 7 resume as principais características dos métodos de GC usados para a detecção de benzodiazepinas em toxicologia forense.

Tabela 7 – Resumo das principais características dos métodos de GC usados para a detecção de benzodiazepinas em toxicologia forense aqui discutidos.

Coluna	Condições	Deteção	Vantagens
<ul style="list-style-type: none"> • Geralmente de sílica fundida. • Fases estacionárias: 100% dimetil polisiloxano; 5% difenil – 95% dimetil polisiloxano. 	<ul style="list-style-type: none"> • Programação de temperatura. 	<ul style="list-style-type: none"> • FID • ECD • NPD • MS; MS/MS Modo de ionização: <ul style="list-style-type: none"> • EI • PCI • NCI 	<ul style="list-style-type: none"> • Excelente sensibilidade e especificidade.

3.3.4. Cromatografia Líquida (LC)

A cromatografia gasosa é um método que pode oferecer uma excelente sensibilidade e especificidade. No entanto, esta análise exige a derivatização prévia das benzodiazepinas. O facto de não existir um agente de derivatização universal para todas as benzodiazepinas é uma limitação importante. Além disso, as elevadas temperaturas aplicadas neste método podem levar à decomposição dos analitos.⁸¹

Neste contexto, a cromatografia líquida é uma alternativa adequada. É uma das técnicas cromatográficas mais antigas, e os avanços na área permitiram desenvolver métodos de análise por HPLC e UPLC.⁵³

Em cromatografia líquida, a fase móvel é formada por um líquido. Quando se utilizam técnicas como a cromatografia líquida de alta pressão, este líquido é introduzido na coluna através de uma bomba de forma a aumentar a sua pressão. A cromatografia de fase reversa, o modo cromatográfico mais frequentemente utilizado em HPLC, envolve o uso de uma fase estacionária não polar e uma fase móvel polar.⁸² A figura 4 apresenta um diagrama de blocos de um sistema HPLC típico.⁸³

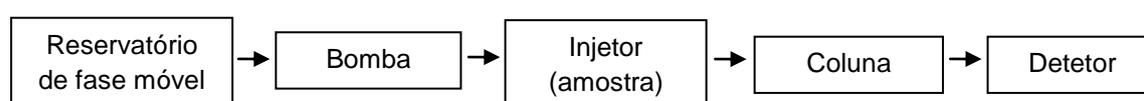


Figura 4 – Diagrama de blocos de um sistema HPLC típico.

A HPLC oferece diversas vantagens: os procedimentos de extração necessários são relativamente simples, normalmente não é necessária derivatização (se o sistema de detecção for espectrofotometria UV) e é um processo realizado à temperatura ambiente, o que permite a análise de substâncias termicamente lábeis que não podem ser analisadas por GC.⁶¹ Assim, métodos que envolvam HPLC são os mais estudados para detecção, separação e identificação de benzodiazepinas.⁶¹

Para análise por HPLC, são frequentemente utilizadas colunas de fase reversa de C₈ e C₁₈. Colunas monolíticas têm sido aplicadas para a detecção de benzodiazepinas em fluidos biológicos.⁸⁴ Estas colunas, formadas por uma fase estacionária unitária, contínua e porosa, permitem uma velocidade de fluxo maior e, conseqüentemente, uma análise mais rápida, sem prejuízo para a eficiência de separação.⁵³

A análise por HPLC é normalmente realizada a temperatura ambiente e em modo isocrático. No entanto, tem sido descrito o uso de temperaturas mais elevadas (na ordem dos 40 – 50°C) e eluição por gradiente. As fases móveis consistem normalmente numa mistura de solventes orgânicos com água ou com soluções tampão. As soluções tampão envolvem normalmente acetato, fosfato e sulfato, entre outros.⁸⁵ Os solventes orgânicos usados são frequentemente acetonitrilo, metanol ou uma mistura de ambos.⁸⁶

A detecção UV é o modo de detecção mais popular devido à forte absorção no intervalo 200 – 240 nm. Há registo da operação deste detetor a vários comprimentos de onda.⁷³ No entanto, falta a este método a sensibilidade e especificidade necessária à toxicologia forense.⁸⁷ Análises com detetores de fotodíodo também têm sido registadas; este traz vantagens a nível de identificação dos picos e permite distinguir substâncias que eluem simultaneamente.⁷³ Mahjoub *et al.* desenvolveu um método para a determinação simultânea de benzodiazepinas em sangue ou sêrum por HPLC com detecção por DAD (*Diode Array Detection*). Utilizando uma coluna de fase reversa C₈ e uma fase móvel de tampão fosfato e acetonitrilo, e extraindo os analitos através de LLE, foi validado o método cujo LOQ permite a detecção de benzodiazepinas no sangue em concentrações terapêuticas e tóxicas.⁸⁸

A hifenização de técnicas de cromatografia líquida com espectrometria de massa representou um avanço significativo na determinação de substâncias em fluidos biológicos, pois permite uma grande especificidade e sensibilidade mesmo quando estas se encontram em baixas concentrações em complexas matrizes biológicas.⁵³ Recentemente tem sido também descrita a análise através de LC – MS/MS.⁶¹ Para ionização das moléculas, os métodos mais frequentemente descritos são ionização por eletronebulização em modo positivo e negativo (ESI+ e ESI-, do inglês *Electrospray Ionization*) e ionização química à pressão atmosférica (APCI, do inglês *Atmospheric Pressure Chemical Ionization*). Para a análise

de benzodiazepinas, ESI+ tem sido a técnica de ionização mais descrita.⁵³ O modo de APCI tem, geralmente, demonstrado uma ionização eficiente de benzodiazepinas; Hegstad *et al.*, no entanto, obteve uma sensibilidade 10 vezes superior com o uso de ESI comparativamente à obtida com o uso de APCI.⁸⁹

Atualmente, a cromatografia líquida acoplada com espectrometria de massa em tandem com ESI ou APCI é considerada o método mais adequado para análise quantitativa de substâncias em matrizes biológicas. Permite uma elevada especificidade e sensibilidade. No entanto, o sucesso deste tipo de análises pode ser condicionado pelo efeito de matriz, pelo que a fase de preparação de amostras é extremamente importante.⁵³

Laloup *et al.* desenvolveu um método para a quantificação simultânea de 26 benzodiazepinas, metabolitos e outros hipnóticos através de cromatografia líquida acoplada com espectrometria de massa em tandem em sangue, urina e cabelo. A extração dos analitos foi feita por LLE. Na cromatografia, o modo de eluição foi por gradiente. A ionização foi obtida por ESI+ e foi aplicada a monitorização de reações múltiplas (MRM, do inglês *Multiple Reaction Monitoring*). O método foi validado e os baixos LOQs obtidos permitiram a sua aplicação a casos reais de toxicologia forense.⁹⁰ A tabela 8 resume as principais características dos métodos de HPLC usados para a deteção de benzodiazepinas em toxicologia forense.

Tabela 8 – Resumo das principais características dos métodos de LC usados para a deteção de benzodiazepinas em toxicologia forense aqui discutidos.

Coluna	Fase móvel	Condições	Deteção	Vantagens
<ul style="list-style-type: none"> • Fase reversa de C₈ e C₁₈ • Colunas monolíticas 	Mistura de solventes orgânicos com água ou soluções tampão.	<ul style="list-style-type: none"> • Temperatura ambiente (geralmente) • Modo isocrático (geralmente) 	<ul style="list-style-type: none"> • UV • DAD • MS; MS/MS Modo de ionização: <ul style="list-style-type: none"> • ESI+ • ESI- • APCI • NCI 	<ul style="list-style-type: none"> • Elevada especificidade e sensibilidade • Não é necessário derivatização • Não são necessárias elevadas temperaturas

4. CONCLUSÃO

As benzodiazepinas, que possuem efeitos sedativos, ansiolíticos e hipnóticos, continuam a ser um dos grupos de fármacos mais prescritos. Apesar de todos os seus efeitos benéficos, apresentam também alguns riscos: podem levar ao desenvolvimento de tolerância e dependência e são fármacos com potencial de abuso (especialmente em conjunto com outras drogas ou álcool). O facto de poderem provocar sedação, amnésia e comportamentos desinibidos, agressivos e violentos torna-os num grupo de interesse na área da toxicologia forense.

O modo como é realizada a colheita, o acondicionamento e o armazenamento de amostras é extremamente importante, uma vez que os resultados de uma análise podem ser fortemente influenciados pelo modo como estes processos são realizados. Na análise toxicológica de benzodiazepinas, o sangue é a amostra biológica de excelência para detetar, quantificar e interpretar a presença de benzodiazepinas, especialmente em toxicologia *post-mortem*, pois permite determinar se uma substância estava presente num nível terapêutico, subterapêutico ou potencialmente tóxico na altura da morte. A urina e o fluido oral apresentam utilidade em análises *ante-mortem*, apresentando como principal vantagem a facilidade de colheita. O fígado, cabelo e humor vítreo também podem ser amostras de interesse.

Para detetar, identificar e quantificar benzodiazepinas em amostras biológicas podem ser usados vários métodos analíticos. Normalmente, é feita primeira uma análise de *screening* por imunoenaios – sendo o ensaio ELISA um exemplo clássico. Depois, para confirmação/quantificação podem ser utilizados vários métodos. A GC e HPLC são os métodos mais representados na literatura, pois são aqueles que permitem análises com maior sensibilidade e especificidade.

Atualmente, cromatografia líquida acoplada com espectrometria de massa em tandem com ESI ou APCI é considerada o método mais adequado para análise quantitativa de substâncias em matrizes biológicas. No entanto esta é uma área em constante desenvolvimento, e os avanços nas técnicas analíticas vão permitindo cada vez mais especificidade e sensibilidade nas análises, o que pode ser extremamente útil na área da toxicologia forense. A figura 5 resume esquematicamente a informação apresentada nesta monografia.

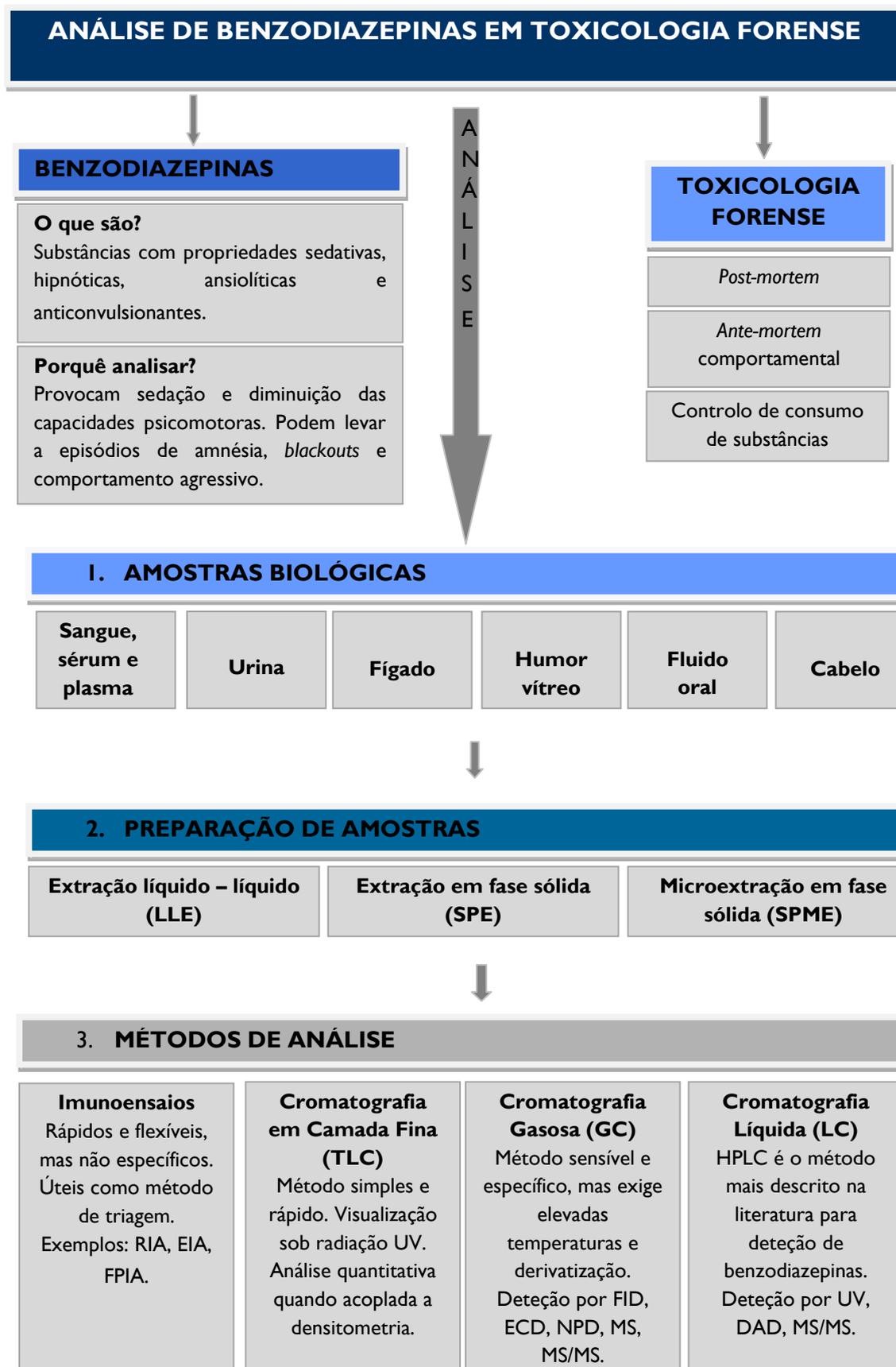


Figura 5 – Resumo esquemático da informação apresentada nesta monografia.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BALDWIN, David S.; AITCHISON, Katherine; BATESON, Alan; CURRAN, H. Valerie; DAVIES, Simon; LEONARD, Brian; NUTT, David J.; STEPHENS, David N.; WILSON, Sue - **Benzodiazepines: Risks and benefits. A reconsideration.** Journal of Psychopharmacology. 27:11 (2013) 967–971.
2. INFARMED, I. P. - **Utilização de Benzodiazepinas e análogos.** 2017. [Acedido a 24 de junho de 2018]. Disponível na Internet: <http://www.infarmed.pt/documents/15786/2219894/Utliliza%C3%A7%C3%A3o+de+Benzodiazepinas+e+an%C3%A1logos/adb100fa-4^a77-4eb7-9e67-99229e13154f>
3. INFARMED I.P. - **Resumo das Características do Medicamento.** [Acedido a 17 de agosto de 2018]. Disponível na Internet: http://app7.infarmed.pt/infomed/download_ficheiro.php?med_id=9314&tipo_doc=rcm
4. National Center for Biotechnology Information - **Alprazolam - PubChem.** [Acedido a 17 de agosto de 2018]. Disponível na Internet: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/2118>
5. INFARMED I.P. - **Resumo das Características do Medicamento.** [Acedido a 17 de agosto de 2018]. Disponível na Internet: http://app7.infarmed.pt/infomed/download_ficheiro.php?med_id=5010&tipo_doc=rcm
6. National Center for Biotechnology Information - **Bromazepam - PubChem.** [Acedido a 17 de agosto de 2018]. Disponível na Internet: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/2441#section=Top>
7. INFARMED I.P. - **Resumo das Características do Medicamento.** [Acedido a 17 de agosto de 2018]. Disponível na Internet: http://app7.infarmed.pt/infomed/download_ficheiro.php?med_id=4954&tipo_doc=rcm
8. National Center for Biotechnology Information - **Brotizolam - PubChem.** [Acedido a 17 de agosto de 2018]. Disponível na Internet: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/2451#section=Top>
9. INFARMED I.P. - **Resumo das Características do Medicamento.** [Acedido a 17 de agosto de 2018]. Disponível na Internet: http://app7.infarmed.pt/infomed/download_ficheiro.php?med_id=8870&tipo_doc=rcm

10. National Center for Biotechnology Information - **Ketazolam - PubChem**. [Acedido a 17 de agosto de 2018]. Disponível na Internet: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/33746#section=Top>
11. National Center for Biotechnology Information - **Clobazam - PubChem**. [Acedido a 17 de agosto de 2018]. Disponível na Internet: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/2789#section=Top>
12. INFARMED I.P. - **Resumo das Características do Medicamento**. [Acedido a 17 de agosto de 2017]. Disponível na Internet: http://app7.infarmed.pt/infomed/download_ficheiro.php?med_id=5392&tipo_doc=rcm
13. National Center for Biotechnology Information - **Clorazepate Dipotassium - PubChem**. [Acedido a 17 de agosto de 2018]. Disponível na Internet: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/167305#section=Top>
14. National Center for Biotechnology Information - **Chlordiazepoxide - PubChem**. [Acedido a 17 de agosto de 2018]. Disponível na Internet: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/2712#section=Top>
15. INFARMED I.P. - **Resumo das Características do Medicamento**. [Acedido a 17 de agosto de 2018]. Disponível na Internet: http://app7.infarmed.pt/infomed/download_ficheiro.php?med_id=6378&tipo_doc=rcm
16. National Center for Biotechnology Information - **Cloazolam - PubChem**. [Acedido a 17 de agosto de 2018]. Disponível na Internet: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/2816#section=Top>
17. INFARMED I.P. - **Resumo das Características do Medicamento**. [Acedido a 17 de agosto de 2018]. Disponível na Internet: http://app7.infarmed.pt/infomed/download_ficheiro.php?med_id=8989&tipo_doc=rcm
18. National Center for Biotechnology Information - **Diazepam - PubChem**. [Acedido a 17 de agosto de 2018]. Disponível na Internet: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/3016#section=Top>
19. National Center for Biotechnology Information - **Estazolam - PubChem**. [Acedido a 17 de agosto de 2018]. Disponível na Internet: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/3261#section=Top>

20. INFARMED I.P. - **Resumo das Características do Medicamento.** [Acedido a 17 de agosto de 2018]. Disponível na Internet: http://app7.infarmed.pt/infomed/download_ficheiro.php?med_id=5731&tipo_doc=rcm
21. National Center for Biotechnology Information - **Flurazepam - PubChem.** [Acedido a 17 de agosto de 2018]. Disponível na Internet: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/3393#section=Top>
22. INFARMED I.P. - **Resumo das Características do Medicamento.** [Acedido a 17 de agosto de 2018]. Disponível na Internet: http://app7.infarmed.pt/infomed/download_ficheiro.php?med_id=2806&tipo_doc=rcm
23. National Center for Biotechnology Information - **Loprazolam - PubChem.** [Acedido a 17 de agosto de 2018]. Disponível na Internet: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/3033860#section=Top>
24. National Center for Biotechnology Information - **Lorazepam - PubChem.** [Acedido a 17 de agosto de 2018]. Disponível na Internet: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/3958#section=Top>
25. INFARMED I.P. - **Resumo das Características do Medicamento.** [Acedido a 17 de agosto de 2018]. Disponível na Internet: http://app7.infarmed.pt/infomed/download_ficheiro.php?med_id=470&tipo_doc=rcm
26. INFARMED I.P. - **Prontuário Terapêutico - Mexazolam.** [Acedido a 17 de agosto de 2018]. Disponível na Internet: <http://app10.infarmed.pt/prontuario/framepesactivos.php?palavra=mexazolam&x=0&y=0&rb1=0>
27. National Center for Biotechnology Information - **Mexazolam - PubChem.** [Acedido a 17 de agosto de 2018]. Disponível na Internet: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/4177#section=Top>
28. INFARMED I.P. - **Resumo das Características do Medicamento.** [Acedido a 17 de agosto de 2018]. Disponível na Internet: http://app7.infarmed.pt/infomed/download_ficheiro.php?med_id=2801&tipo_doc=rcm
29. National Center for Biotechnology Information - **Midazolam - PubChem.** [Acedido a 17 de agosto de 2018]. Disponível na Internet: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/image/imagefly.cgi?cid=4192&width=300&height=300>

30. INFARMED I.P. - **Resumo das Características do Medicamento.** [Acedido a 17 de agosto de 2018]. Disponível na Internet: http://app7.infarmed.pt/infomed/download_ficheiro.php?med_id=7843&tipo_doc=rcm
31. National Center for Biotechnology Information - **Oxazepam - PubChem.** [Acedido a 17 de agosto de 2018]. Disponível na Internet: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/4616#section=Top>
32. INFARMED I.P. - **Resumo das Características do Medicamento.** [Acedido a 18 de agosto de 2018]. Disponível na Internet: http://app7.infarmed.pt/infomed/download_ficheiro.php?med_id=2405&tipo_doc=rcm
33. National Center for Biotechnology Information - **Prazepam - PubChem.** [Acedido a 18 de Agosto de 2018]. Disponível na Internet: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/4890#section=Top>
34. INFARMED I.P. - **Resumo das Características do Medicamento.** [Acedido a 18 de agosto de 2018]. Disponível na Internet: http://app7.infarmed.pt/infomed/download_ficheiro.php?med_id=6231&tipo_doc=rcm
35. National Center for Biotechnology Information - **Temazepam - PubChem.** [Acedido a 18 de agosto de 2018]. Disponível na Internet: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5391#section=Top>
36. INFARMED I.P. - **Resumo das Características do Medicamento.** [Acedido a 18 de agosto de 2018]. Disponível na Internet: http://app7.infarmed.pt/infomed/download_ficheiro.php?med_id=4113&tipo_doc=rcm
37. National Center for Biotechnology Information - **Triazolam - PubChem.** [Acedido a 18 de agosto de 2018]. Disponível na Internet: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5556#section=Top>
38. INFARMED, I. P. - **Infomed.** [Acedido a 20 de junho de 2018]. Disponível na Internet: <http://app7.infarmed.pt/infomed/pesquisa.php>
39. DINIS-OLIVEIRA, R. J.; CARVALHO, F.; DUARTE, J. A.; REMIÃO, F.; MARQUES, A.; SANTOS, A.; MAGALHÃES, T. - **Collection of biological samples in forensic toxicology.** *Toxicology Mechanisms and Methods.* 20:7 (2010) 363–414.

40. BÉVALOT, F.; CARTISER, N.; BOTTINELLI, C.; FANTON, L.; GUITTON, J. - **Correlation of bile and vitreous humor concentrations with blood drug concentrations for forensic interpretation: a comparative study between animal experimental and human postmortem data.** *Forensic Toxicology*. 33:1 (2015) 131–140.
41. SMITH, Michael P.; BLUTH, Martin H. - **Forensic Toxicology: An Introduction.** *Clinics in Laboratory Medicine*. 36:4 (2016) 753–759.
42. WYMAN, John F. - **Principles and procedures in forensic toxicology.** *Clinics in Laboratory Medicine*. 32:3 (2012) 493–507.
43. WICK, Jeannette Y. - **The History of Benzodiazepines.** *The Consultant Pharmacist*. 28:9 (2013) 538–548.
44. FRITCH, Dean; BLUM, Kristen; NONNEMACHER, Sheena; KARDOS, Keith; BUCHHALTER, August R.; CONE, Edward J. - **Barbiturate detection in oral fluid, plasma, and urine.** *Therapeutic Drug Monitoring*. 33:1 (2011) 72–79.
45. ISBELL, Harris; ALTSCHUL, Sol; KORNETSKY, C. H.; EISENMAN, A. J.; FLANARY, H. G.; FRASER, H. F. - **Chronic Barbituric Intoxication.** *Archives of Neurology and Psychiatry*. 64:1 (1950).
46. LADER, Malcolm - **Benzodiazepines revisited - will we ever learn?.** *Addiction*. 106:12 (2011) 2086–2109.
47. ROWSHAN, Hooman - **Postmortem detection of benzodiazepines.** *Open Science Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 2:1 (2014) 1–8.
48. National Center for Biotechnology Information - **1,4 Benzodiazepine - PubChem.** [Acedido a 25 de junho de 2018]. Disponível na Internet: https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/IH-I_4-Benzodiazepine.
49. HOOD, Sean David; NORMAN, Amanda; HINCE, Dana Adelle; MELICHAR, Jan Krzysztof; HULSE, Gary Kenneth - **Benzodiazepine dependence and its treatment with low dose flumazenil.** *British Journal of Clinical Pharmacology*. 77:2 (2014) 285–294.
50. MANDRIOLI, Roberto; MERCOLINI, Laura; RAGGI, Maria - **Benzodiazepine Metabolism: An Analytical Perspective.** *Current Drug Metabolism*. 9:8 (2008) 827–844.

51. SMITH, Shannon M.; DART, Richard C.; KATZ, Nathaniel P.; PAILLARD, Florence; ADAMS, Edgar H.; COMER, Sandra D.; DEGROOT, Aldemar; EDWARDS, Robert R.; HADDOX, J. David; JAFFE, Jerome H.; JONES, Christopher M.; KLEBER, Herbert D.; KOPECKY, Ernest A.; MARKMAN, John D.; MONTOYAN, Ivan D.; O'BRIENO, Charles; ROLANDP, Carl L.; STANTONQ, Marsha; STRAINR, Eric C.; VORSANGERS, Gary; WASANT, Ajay D.; WEISSU, Roger D.; TURKV, Dennis C.; DWORIN, Rober H. - **Classification and definition of misuse, abuse, and related events in clinical trials: ACTION systematic review and recommendations.** *Pain*. 154:11 (2017) 2287–2296.
52. LICATA, Stephanie C.; ROWLETT, James K. - **Abuse and Dependence Liability of Benzodiazepine-Type Drugs: GABA A Receptor Modulation and Beyond.** *Pharmacology Biochemistry and Behaviour*. 90:1 (2008) 74–89.
53. NAKAMURA, Mitsuhiro - **Analyses of benzodiazepines and their metabolites in various biological matrices by LC-MS(/MS).** *Biomedical Chromatography*. 25:12 (2011) 1283–1307.
54. FRANCO, J. Miguel - **Recomendações para a colheita e acondicionamento de amostras em toxicologia forense.** 2013. [Acedido a 5 de julho de 2018]. Disponível na Internet: <http://www.inmlcf.mj.pt/wdinmlWebsite/Data/file/OutrasInformacoes/PareceresOrientacoesServico/Normas/NP-INMLCF-009-Rev01.pdf>
55. MELO, Paula; BASTOS, M. Lourdes; TEIXEIRA, Helena M. - **Benzodiazepine stability in postmortem samples stored at different temperatures.** *Journal of Analytical Toxicology*. 36:1 (2012) 52–60.
56. FRANZELIUSL, Cornelia; ACKERMANN, Ingrid; DEINL, Ingo; ANGERMAIER, Ludwig; MACHBERT, Guenter - **Simultaneous Extraction of Selected Benzodiazepines and Benzodiazepine-Glucuronides from Urine by Immunoabsorption.** *Journal of Analytical Toxicology*. 22:1 (1998) 359–362.
57. BAZMI, Elham; BEHNOUSH, Behnam; AKHGARI, Maryam; BAHMANABADI, Leila - **Quantitative analysis of benzodiazepines in vitreous humor by high-performance liquid chromatography.** *SAGE Open Medicine*. 4:1 (2016) 1–7.
58. KINTZ, Pascal; VILLAIN, Marion; CONCHEIRO, Marta; CIRIMELE, Vincent - **Screening and confirmatory method for benzodiazepines and hypnotics in oral fluid by LC-MS/MS.** *Forensic Science International*. 150:1 (2005) 213–220.

59. RAMIREZ FERNANDEZ, Maria Del Mar; WILLE, Sarah M. R.; FAZIO, Vincent DI; KUMMER, Natalie; HILL, Virginia; SAMYN, Nele - **Detection of Benzodiazepines and z-Drugs in Hair Using an UHPLC-MS/MS Validated Method: Application to Workplace Drug Testing.** *Therapeutic drug monitoring.* 37:5 (2015) 600–608.
60. QUEIROZ, Sonia C. N.; COLLINS, Carol H.; JARDIM, Isabel C. S. F. - **Métodos de extração e/ou concentração de compostos encontrados em fluidos biológicos para posterior determinação cromatográfica.** *Quimica Nova.* 24:1 (2001) 68–76.
61. UDDIN, Mohammad Nasir; SAMANIDOU, Victoria F.; PAPADOYANNIS, Ioannis N. - **An Overview on Total Analytical Methods for the Detection of 1,4-Benzodiazepines.** *Pharmaceutica Analytica Acta.* 5:6 (2014) 1–13.
62. SZATKOWSKA, Paulina; KOBIA, Marcin; KOŚLIŃSKI, Piotr; WANDAS, Jacek; BĄCZEK, Tomasz - **Analytical methods for determination of benzodiazepines. A short review.** *Central European Journal of Chemistry.* 12:10 (2014) 994–1007.
63. YOSHIDA, Manabu; AKANE, Atsushi - **Subzero-Temperature Liquid - Liquid Extraction of Benzodiazepines for High-Performance Liquid Chromatography.** *Analytical Chemistry.* 71:9 (1999) 1918–1921.
64. KUANG, Hua; LI, Qiusheng; SHEN, Chongyu; XU, Jinzhong; YUAN, Yuan; XU, Chuanlai; WANG, Wuyang - **A highly sensitive method for the determination of 7-aminonitrazepam, a metabolite of nitrazepam, in human urine using high-performance electrospray liquid chromatography tandem mass spectrometry.** *Biomedical Chromatography.* 23:7 (2009) 740–744.
65. HE, Hua; SUN, Cheng; WANG, Xiao Rong; PHAM-HUY, Chuong; CHIKHI-CHORFI, Nassima; GALONS, Hervé; THEVENIN, Marc; CLAUDE, Jean Roger; WARNET, Jean Michel - **Solid-phase extraction of methadone enantiomers and benzodiazepines in biological fluids by two polymeric cartridges for liquid chromatographic analysis.** *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences.* 814:2 (2005) 385–391.
66. FENG, June; WANG, Lanqing; DAI, Ingrid; HARMON, Tia; BERNERT, John T. - **Simultaneous determination of multiple drugs of abuse and relevant metabolites in urine by LC-MS-MS.** *Journal of Analytical Toxicology.* 31:7 (2007) 359–368.

67. QUEIROZ, Maria Eugênia C.; LANÇAS, Fernando M. - **Análise de fármacos em material biológico: Acoplamento microextração em fase sólida «no tubo» e cromatografia líquida de alta eficiência.** Quimica Nova. 28:5 (2005) 880–886.
68. MULLETT, Wayne M.; PAWLISZYN, Janusz - **Direct determination of benzodiazepines in biological fluids by restricted-access solid-phase microextraction.** Analytical Chemistry. 74:5 (2002) 1081–1087.
69. FUKUSHIMA, André Rinaldi; BARRETO, Erica Rosa; FERNANDES, Marcos Leilo; FERRARI, Janaina; FRANÇA, Welington; MARCAL, Heloisa; PERERIRA, Alexandre Katafai; RIBEIRO, Juliana; SILVA, Erasmo Soares; CHASIN, Alice Aparecida Matta - **Aplicação de imunoenaios para análise de fármacos e drogas de abuso em sangue total, com finalidade forense.** Revista Intertox de Toxicologia, Risco Ambiental e Sociedade. 2:1 (2015) 49–61.
70. GIL, Eric Souza; KUBOTA, Lauro Tatsuo - **Alguns aspectos de imunoenaios aplicados à química analítica.** Química Nova. 22:6 (1999) 874–881.
71. FREITAS, Elder L.; OLIVEIRA, Zilda N. P.; AOKI, Valéria; SOUSA JR, Joaquim X.; FUKUMORI, Lígia M. I.; PÉRIGO, Alexandre M. - **Imunofluorescência direta e indireta.** Anais Brasileiros de Dermatologia. 85:4 (2010) 490–501.
72. BERTOL, Elisabetta; VAIANO, Fabio; BORSOTTI, Maurizio; QUERCIOLO, Massimo; MARI, Francesco - **Comparison of immunoassay screening tests and LC-MS-MS for urine detection of benzodiazepines and their metabolites: Results of a national proficiency test.** Journal of Analytical Toxicology. 37:9 (2013) 659–664.
73. DRUMMER, Olaf H. - **Methods for the measurement of benzodiazepines in biological samples.** 713:1 (1998) 201–225.
74. HANCU, G.; FULOP, Eiko; RUSU, Aura; MIRCIA, Eleonora; GYÉRESI, Á. - **Thin layer chromatographic separation of benzodiazepin derivates.** 20:2 (2011) 181–188.
75. THANGADURAI, Subbiah; DHANALAKSHMI, Ahilandam; VEERAN, Madurai; KANNAN, Suresh - **Separation and Detection of certain Benzodiazepines by Thin-Layer Chromatography.** Malaysian Journal of Forensic Sciences. 4:1 ([s.d.]) 47–53.
76. AL-BUKHAITI, Wedad Q.; NOMAN, Anwar; QASIM, Aseela Saeed; AL-FARGA, Ammar - **Gas Chromatography: Principles, Advantages and Applications in Food**

Analysis. International Journal of Agriculture Innovations and Research. 6:1 (2017) 2319–1473.

77. SCOTT, Raymond P. W. - **Introduction to Analytical Gas Chromatography.** 2^a ed. New York : Marcel Dekker, Inc., 1998. ISBN 0-8247-0016-3.

78. PAPOUTSIS, Ioannis I.; ATHANASELIS, Sotirios A.; NIKOLAOU, Panagiota D.; PISTOS, Constantinos M.; SPILIOPOULOU, Chara A.; MARAVELIAS, Constantinos P. - **Development and validation of an EI-GC-MS method for the determination of benzodiazepine drugs and their metabolites in blood: Applications in clinical and forensic toxicology.** Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. 52:4 (2010) 609–614.

79. ADAMOWICZ, Piotr; KAŁA, Maria - **Simultaneous screening for and determination of 128 date-rape drugs in urine by gas chromatography – electron ionization-mass spectrometry.** 198:1 (2010) 39–45.

80. PEDROSO, Marcio Pozzobon - **Detecção em cromatografia gasosa rápida e cromatografia gasosa bidimensional abrangente.** Scientia Chromatographica. 3:2 (2011) 125–136.

81. SEGURA, Mireia; BARBOSA, Josep; TORRENS, Marta; FARR, Magi; CASTILLO, Claudio; SEGURA, Jordi; TORRE, Rafael - **Analytical Methodology for the Detection of Benzodiazepine Consumption in Opioid-Dependent Subjects.** 25:1 (2001) 130–136.

82. WESTON, Andrea; BROWN, Phyllis R. - **High Performance Liquid Chromatography and Capillary Electrophoresis: Principles and Practices.** 1^a ed. San Diego : Academic Press, 1997. ISBN 0-12-136640-5.

83. ARDREY, Robert E. - **Liquid Chromatography - Mass Spectrometry: An Introduction.** 1^a ed. Chichester : John Wiley & Sons Ltd, 2003. ISBN 978-0-471-49801-8.

84. ZENG, Hang; DENG, Yuzhong; WU, Jing Tao - **Fast analysis using monolithic columns coupled with high-flow on-line extraction and electrospray mass spectrometric detection for the direct and simultaneous quantitation of multiple components in plasma.** Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences. 788:2 (2003) 331–337.

85. SAMANIDOU, Victoria F.; UDDIN, Mohammad N.; PAPADOYANNIS, Ioannis N. - **Benzodiazepines: sample preparation and HPLC methods for their determination in biological samples.** *Bioanalysis*. 1:4 (2009) 755–784.
86. TAI, Hung-Liang; OSIEWICZ, Robert J.; BOFINGER, Diane P. - **A Salt-Free Isocratic High-Pressure Liquid Chromatographic Method for the Quantitation of Benzodiazepines in Serum.** 26:1 (1993) 165–171.
87. RIVERA, Hazel; WALKER, G. Stewart; STOCKHAM, Peter; SIMS, D. Noel; HUGHES, John M. - **Analysis of benzodiazepines in Blood by LC-MS/MS application.** *Agilent*. 2006) 1–15.
88. MAHJOUN, Anissa El; STAUB, Christian - **Simultaneous determination of benzodiazepines in whole blood or serum by HPLC / DAD with a semi-micro column.** *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 23:1 (2000) 447–458.
89. HEGSTAD, S.; OIESTAD, E. I.; JOHANSEN, U.; CHRISTOPHERSEN, A. S. - **Determination of Benzodiazepines in Human Urine using Solid-Phase Extraction and High-Performance Liquid Chromatography-Electrospray Ionization Tandem Mass Spectrometry.** *Journal of Analytical Toxicology*. 30:1 (2006) 31–37.
90. LALOUP, Marleen; FERNANDEZ, Maria Del Mar Ramirez; BOECK, Gert DE; WOOD, Michelle; MAES, Viviane; SAMYN, Nele - **Validation of a liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for the simultaneous determination of 26 benzodiazepines and metabolites, zolpidem and zopiclone, in blood, urine, and hair.** *Journal of Analytical Toxicology*. 29:7 (2005) 616–626.