



Desenvolvimento de dispositivo colorimétrico para a detecção do benzodiazepínico midazolam visando aplicações forenses

Palavras-Chave: DISPOSITIVOS ANALÍTICOS EM PAPEL, SENSORES COLORIMÉTRICOS, BENZODIAZEPÍNICOS

Autores(as):

NATHÁLIA VILAS BOAS MESTANZA, IQ – UNICAMP

Ma. GUIDA HELLEN MOTA DO NASCIMENTO (coorientadora), IQ - UNICAMP

Prof. Dr. WILLIAM REIS DE ARAUJO (orientador), IQ - UNICAMP

INTRODUÇÃO:

Benzodiazepínicos são amplamente utilizados como psicotrópicos em todo mundo, trata-se de uma classe de medicamentos com uma ampla gama de efeitos terapêuticos, incluindo propriedades sedativas, hipnóticas, ansiolíticas, amnésicas e anticonvulsivantes (GOLAN, 2014). No entanto, o uso inadequado de benzodiazepínicos pode acarretar riscos significativos à saúde do usuário. Altas doses destas substâncias podem resultar em hipnose e estupor, tornando necessário um cuidado em sua administração (HOOD et al., 2014).

A detecção precisa dessas substâncias em amostras é fundamental em aplicações forenses e controle de abuso de drogas. Embora existam métodos analíticos disponíveis, como espectrofotometria, espectroscopia Raman, cromatografia e espectrometria de massas, essas técnicas tradicionais possuem limitações, como o preparo complexo de amostras e o alto custo de equipamentos (PRATIWI, AMALIA e HASANAH, 2021).

Nesse contexto, o uso da colorimetria se mostra uma abordagem de interesse. A detecção colorimétrica, baseada em reações químicas que resultam em alterações visíveis de cor, apresenta vantagens de rapidez, economia e facilidade de uso, sem comprometer a seletividade e a sensibilidade necessárias para a detecção acurada de benzodiazepínicos. Dessa forma, o presente trabalho visa desenvolver um método analítico colorimétrico para a detecção do benzodiazepínico midazolam. A obtenção de um sinal analítico rápido, juntamente com a simplicidade e acessibilidade do método colorimétrico, pode facilitar o rastreamento inicial e o diagnóstico rápido em casos de crimes facilitados pelo uso de substâncias, fornecendo informações valiosas às equipes forenses e autoridades competentes.

METODOLOGIA:

Inicialmente, para a fabricação das plataformas analíticas foram avaliados diferentes tipos de fabricação de dispositivos, visando a aplicação nas matrizes de interesse. Dentre os dispositivos analíticos estudou-se o uso de microdispositivos de papel filtro fabricados por corte bidimensional, em que círculos foram recortados por laser. Além disso, também estudou-se o uso de dispositivos fabricados em papel filtro (PADS) com layout de *spots*

padronizados por impressão em cera (*wax printing*) utilizando uma impressora Xerox ColorQube 8570, delimitando uma região hidrofílica e hidrofóbica.

Para a preparação dos dispositivos analíticos, foram utilizadas ferramentas de edição de imagens do pacote Office® e do CorelDraw®, a fim de criar o layout e os padrões necessários para cada dispositivo. No caso dos dispositivos PADs impressos com cera, foi desenvolvido um layout contendo múltiplas zonas reacionais (*spot test*) em forma circular com diâmetro de 5 mm. A permeação da cera no papel filtro (80 g/m²) de espessura 0,2 mm foi realizada por meio de aquecimento, utilizando uma prensa térmica a 100°C por 30 segundos. A fim de evitar vazamentos entre as superfícies, foi realizada uma etapa de laminação com Parafilm® em prensa térmica a 100° C por 25 segundos, em que foi possível tornar impermeável uma das faces do dispositivo (Figura 1).

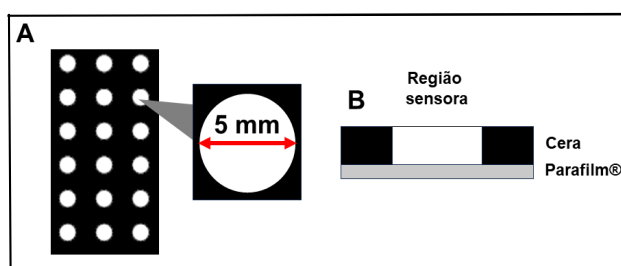


Figura 1. Representação esquemática do (A) layout do dispositivo e (B) processo de laminação – fonte: Próprios autores.

Para os ensaios colorimétricos, a metodologia do teste de Scott foi adaptada, permitindo a detecção do Midazolam. O teste de Scott gera uma reação evidente nos dispositivos de papel, em que a solução de tiocianato de cobalto, inicialmente rosa, sofre uma mudança de coloração para roxa/azul quando em contato com a droga suspeita. A partir da mudança de cor visível e distintiva é possível realizar análise qualitativa, semi-quantitativa e/ou quantitativa, devido ao aparecimento de uma coloração mais intensa nas concentrações mais altas.

As soluções dos reagentes e do composto em estudo foram preparadas individualmente. Para o preparo do tiocianato de cobalto foram utilizados os sais de tiocianato de potássio (KSCN) e cloreto de cobalto (CoCl₂). O tiocianato de cobalto foi preparado em concentração de 3,5% (m/v) em água deionizada. Para o preparo do midazolam (MDZ), o composto puro foi solubilizado em dimetilsulfóxido (DMSO) em concentração de 30 mg mL⁻¹. Posteriormente, foi diluído em meio aquoso alcoólico a fim de mimetizar as condições de aplicabilidade do dispositivo, isto é, a contaminação de bebidas alcoólicas.

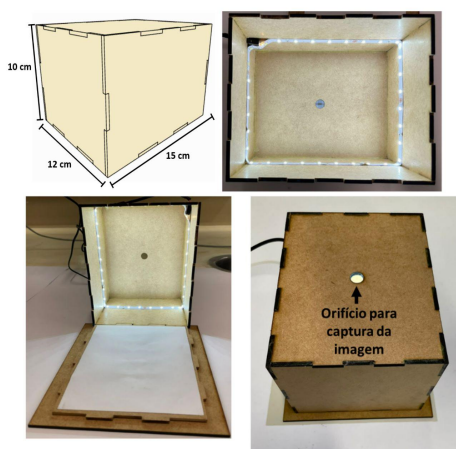


Figura 2. Simulação e imagem da caixa com iluminação de leds brancos fixados – fonte: Laboratório de Sensores Químicos Portáteis (IQ-UNICAMP).

Para os ensaios colorimétricos, foram utilizados 2 µL do reagente e 2 µL do composto em estudo em cada *spot test*. Como supracitado, visando a aplicação do dispositivo, foram realizados estudos de solubilidade do composto em teores alcoólicos de 25% a 50%, com base nas matrizes de interesse visando a aplicação dos dispositivos em matrizes com teor alcoólico mais elevado.

É fundamental padronizar antecipadamente as condições ambientais de aquisição das imagens digitais, assim, para uniformizar as condições ambientais de aquisição das imagens digitais, um aparato instrumental foi construído para todos os testes receberem a mesma taxa de luminosidade. O aparato instrumental (10 x 12 x 15 cm) foi desenvolvido em madeira MDF de 2 mm com uma fita de LEDs brancos RGB fixada em seu interior e com um orifício na tampa superior da caixa, permitindo posicionar o

aparelho celular de forma padronizada (Figura 2). Essas condições minimizam variações de brilho ou quaisquer alterações durante a captura das fotos, o que poderia interferir nos valores dos padrões de cor obtidos.

As imagens digitais dos testes colorimétricos foram submetidas ao software GIMP®, no qual a região central dos *spots* foi selecionada por uma área circular. A partir dessa seleção, foram obtidos os valores médios de pixels para cada parâmetro de cor, RGB e CMYK. Esses dados permitiram verificar os parâmetros de cor que apresentavam melhor correlação com a quantidade da droga para fins quantitativos. Foram considerados a correlação entre a intensidade de cor do teste e a concentração da droga, a dispersão de valores, o coeficiente de correlação quadrático e a inclinação da curva.

Após o estabelecimento da metodologia foram realizados estudos de otimização de parâmetros experimentais, tais como concentrações ideais dos reagentes, tempo de incubação da amostra até a captura de imagem e curva de calibração externa.

RESULTADOS E DISCUSSÃO:

Optou-se pelo uso de dispositivos em impressão de cera com o intuito de posteriormente desenvolver filipetas (similares a fitas de pH) para o uso do dispositivo analítico *in situ*. Assim, o layout dos dispositivos foi desenvolvido em PowerPoint® com três zonas sensores dispostas para cada concentração para análise em triplicata.

Como descrito na metodologia, foi avaliado diferentes concentrações de etanol (% v/v) para avaliar a solubilidade do composto em estudo (MDZ). Após o preparo da solução estoque de 30,0 mg mL⁻¹ em DMSO, foram realizadas diluições do MDZ em proporção de solução alcoólica e DMSO (5:1) para concentração final de 5,0 mg mL⁻¹. As porcentagens de etanol estudadas foram 50% (1:1), 33% (2:1), 25% (3:1) e 20% (4:1). Na proporção 2:1 foi observado qualitativamente a solubilização do MDZ. Assim, foi escolhida uma faixa de proporção para avaliar a solubilidade no intervalo de 33% a 50%. O teste foi estendido para o estudo em porcentagens de 30%, 35%, 40% e 45%, e em todas as porcentagens observou-se a solubilidade do composto. Com esses ensaios foi possível delimitar uma faixa de porcentagem de teor alcoólico em que o composto puro era solúvel.

Posteriormente, foi realizado um teste inicial da aplicabilidade do método colorimétrico em papel adaptado do teste de Scott para avaliar uma mudança de coloração e/ou intensidade com a concentração de MDZ. Para isso, foram aplicados 2 µL de tiocianato de potássio 2% (m/v) e 2 µL de concentrações padrão de MDZ (1,25 mg mL⁻¹, 2,5 mg mL⁻¹ e 5,0 mg mL⁻¹). A metodologia respondeu de forma satisfatória, foi possível observar que à medida que a concentração de MDZ aumentava, a coloração roxo/azul ficava mais intensa. Após a captura da imagem digital, os valores de pixels foram extraídos para os modelos de cores RGB e CMYK, os valores de branco foram subtraídos e os gráficos obtidos. Os valores

do parâmetro magenta (% M) apresentaram melhor coeficiente de correlação quando comparado aos demais. Assim, escolheu-se o parâmetro magenta para extração dos valores de pixels para a colorimetria digital (Figura 3).

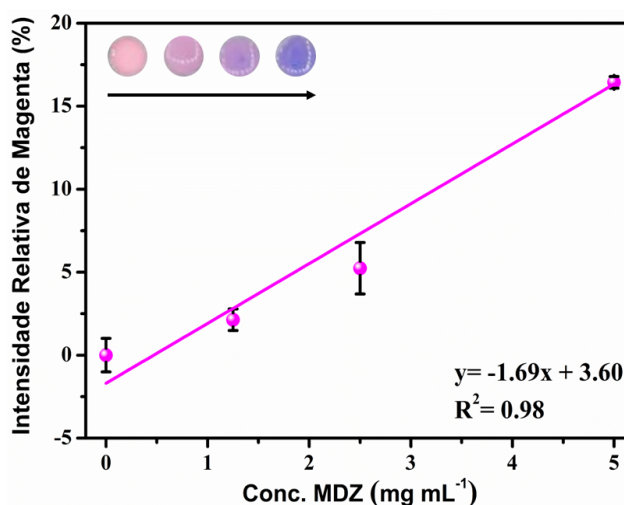


Figura 3. Gráfico e intensidade relativa de magenta por concentração de MDZ. Inserção: recortes das imagens digitais do teste colorimétrico – fonte: Próprios autores.

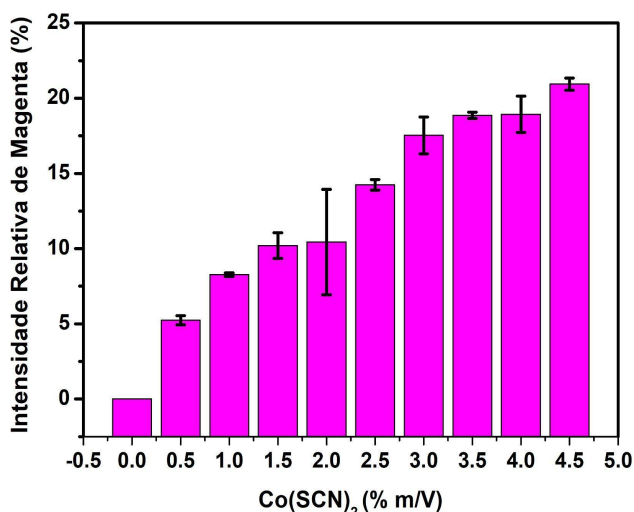


Figura 4. Gráfico de otimização de porcentagem tiocianato de Cobalto – fonte: Próprios autores.

A otimização da porcentagem de tiocianato de cobalto necessária para uma melhor intensidade da coloração do teste foi realizada em uma faixa de concentração de 0,5% a 4,5%. Pode-se observar que a partir de 3,0% não há diferença estatística, no entanto, a concentração de 3,5% apresenta uma melhor reprodutibilidade, sinalizada pelo baixo desvio padrão. Assim, optou-se por utilizar a concentração de 3,5% (Figura 4).

Após a otimização do tiocianato de cobalto, foi realizado um teste de otimização do tempo de incubação da amostra no *spot* de papel até a captura da imagem digital do teste colorimétrico. Assim, foram avaliados os tempos

de 3 a 20 min e podemos observar que a partir de 3 min não há diferença no tempo de aquisição da imagem. Isso pode ser explicado pela própria reação colorimétrica, pois já é possível observar mudança de coloração imediatamente após a aplicação do analito (Figura 5).

Com as otimizações realizadas, a curva de calibração foi obtida numa faixa de concentração de 0,05 mg mL⁻¹ a 1,0 mg mL⁻¹, compreendendo a concentração de um comprimido de 15 mg (quantidade comercial típica do medicamento) adicionado em 200 mL de bebida. As soluções padrão para a curva de calibração foram preparadas em solução aquosa alcoólica 30%. Foi possível observar qualitativamente uma correlação da concentração de MDZ com a intensidade de coloração. No entanto, ao se obter os dados de intensidade relativa de magenta, não foi possível fazer uma correlação quantitativa. Uma solução encontrada foi o uso de distância euclidiana (D.E.) através da Equação 1 para o ajuste ao dado experimental, onde R, G e B é o valor de pixel para cada parâmetro correspondente e R₀, G₀ e B₀ são os valores para o branco analítico.

$$D.E = \sqrt{(R - R_0)^2} + \sqrt{(G - G_0)^2} + \sqrt{(B - B_0)^2}$$

Equação (1)

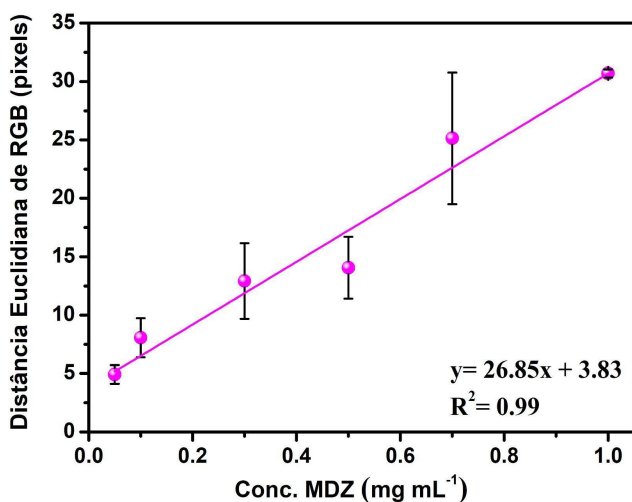


Figura 5. Curva de calibração de 0.05 mg.mL⁻¹ a 1.0 mg.mL⁻¹ - fonte: Próprios autores.

A partir do uso de distância euclidiana, foi possível fazer o ajuste dos dados experimentais com os dados extraídos das imagens digitais. Assim, pode-se observar uma correlação linear da concentração de MDZ com a distância euclidiana, apresentando um coeficiente de correlação satisfatório (R²=0.995) (Figura 5). Essa correlação a partir da distância euclidiana pode ser compreendida pela transição de coloração que ocorre. O branco analítico possui coloração rosa (cor característica do Co(SCN)₂), na presença do MDZ ocorre uma mudança de coloração para roxo/azul. Essa mudança pode ser entendida como uma mudança de matiz (ou seja,

comprimento de onda específico para determinada cor) da coloração rosa para o roxo/azul, que não pode ser verificada com uso somente do canal de cor magenta.

Com isso, o uso de tratamento matemático dos dados permite que o dado visual seja quantificado através da distância euclidiana dos valores de concentração, com subtração do branco analítico para cada ponto. O limite de detecção (LD) e quantificação (LQ) foram calculados utilizando $LD = 3s/S$ e $LQ = 10 s/S$, resultando em valores de $0,07 \text{ mg mL}^{-1}$ e $0,23 \text{ mg mL}^{-1}$, respectivamente.

Testes preliminares para a avaliar o efeito do pH e teor alcóolico foram avaliados. Estes testes foram realizados com o intuito de compreender a possibilidade de uma resposta colorimétrica frente a diferentes condições de pH. Não foi possível observar de forma qualitativa uma variação de coloração na faixa de pH estudada. No entanto, foi possível observar uma variação de coloração em pH 10 (Figura 6). Essa resposta colorimétrica poderia surgir como limitação do método, entretanto, considerando as matrizes alvo e o pH convencional de cada, essa condição não acarretaria em falso positivo.

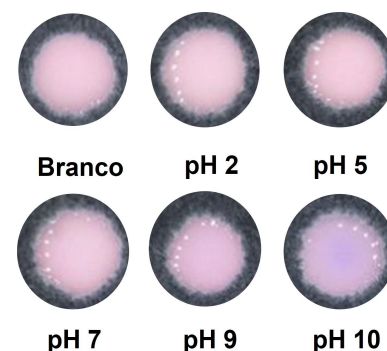


Figura 6. Variação de coloração em diferentes pH - fonte: Próprios autores.

CONCLUSÕES PARCIAIS:

Neste trabalho, foi desenvolvido um possível método para a identificação de midazolam em matrizes alcoólicas (30% - 45%) por meio da detecção colorimétrica, que pode ser facilmente calibrado com o uso de um aparelho celular. A metodologia adotada permitiu a quantificação do MDZ por meio da adaptação do teste de Scott, comumente utilizado na detecção colorimétrica de cocaína. Estudos complementares ainda são necessários para avaliar a estabilidade de resposta do sensor, as respostas colorimétricas nos modelos de cores RGB e CMYK das curvas de calibração para outras porcentagens de etanol e curvas com adição de padrão para diferentes amostras a fim de avaliar o efeito matriz. Com os resultados até o momento, é possível inferir que o sistema de detecção desenvolvido oferece uma provável solução miniaturizada, descartável e acessível com grande potencial para aplicação *in situ* de rápida triagem de drogas em bebidas. O método apresenta resultados promissores, contribuindo consideravelmente para a área de análises forenses e segurança pública.

AGRADECIMENTOS

CNPq (Processo: 405620/2021-7), CAPES e Fapesp (Processos: 2022/03250-7 e 2018/08782-1) pelo suporte direto ou indireto a este projeto.

BIBLIOGRAFIA:

- GOLAN, D. E. et al. **Princípios de farmacologia: a base fisiopatológica da farmacoterapia**. Rio de Janeiro, Koogan, 2014.
- HOOD, S. D., et al. **Benzodiazepine dependence and its treatment with low dose flumazenil**. British Journal of Clinical Pharmacology, v. 77, p. 285-294, 2014.
- MAHMOOD, Z., et al. **A New Colorimetric Identification of Benzodiazepines: Using Cobalt Thiocyanate as Reagent**. Journal of Applied Pharmacy, v. 10, p. 265, 2018.
- PRATIWI, R., et al. **Development of paper-based analytical device for detecting diazepam in urine**. International Journal of Applied Pharmaceutics, v. 13, p. 223–227, 2021.