



Determinação simplificada de carbamazepina, fenitoína, fenobarbital e lamotrigina em plasma e monitoração terapêutica por HPLC/PDA

Fernando Gomes Ferreira Oliveira¹; Cristiane Effting¹; Iram Moreira Mundim¹; Ramias Vieira Calixto Freire¹; Wilsione José Carneiro¹; Caroline Rego Rodrigues²; Luiz Carlos da Cunha^{1*}

¹Núcleo de Estudos e Pesquisas Tóxico-Farmacológicas – UFG – Faculdade de Farmácia - Av. Universitária com 1ª Avenida s/n, Setor Universitário Goiânia - GO, Brasil

²Universidade Estadual de Goiás - UEG - Goiânia - GO, Brasil

RESUMO

Carbamazepina, fenitoína, fenobarbital e lamotrigina são bem conhecidos como fármacos anticonvulsivantes usados para o tratamento da epilepsia. A utilização destes fármacos é associada a várias reações adversas, tornando necessário o controle terapêutico. Os ensaios foram realizados por meio de cromatografia líquida de alta eficiência e o método de extração utilizado foi o líquido-líquido. Os fármacos e o padrão interno de zolpidem foram separados por uma coluna de fase reversa (ACE 5, C18 150 x 4,6 mm d.i.). A fase móvel constituída de acetonitrila (30%) e ácido cítrico/tampão fosfato pH 5,0 (70%) foi utilizada sob gradiente de fluxo de 0,7 a 1,2 mL/min e o comprimento de onda utilizado para a detecção dos analitos foi fixado em 210 nm. A técnica apresentou linearidade ao longo do intervalo de 0,5 a 20,0 µg/mL para carbamazepina/lamotrigina e de 2,0 a 64,0 µg/mL, para fenitoína/ fenobarbital com coeficiente de correlação linear maior que 0,98. As amostras de sangue foram obtidas de pacientes adultos com diagnóstico de epilepsia em acompanhamento no Ambulatório Municipal de Psiquiatria de Goiânia. A média de recuperação obtida foi de 96,8% a 108,5% para carbamazepina/lamotrigina e de 93,8% a 108,8% para a fenitoína/fenobarbital. Os limites de quantificação, precisão (CV < 15,0 %) e exatidão (E > 85,0 %) demonstraram estar em conformidade com as exigências da ANVISA. Nove pacientes foram avaliados para confirmar a validade do método.

Palavras-chave: Anticonvulsivantes. Monitoração terapêutica de fármacos. HPLC.

INTRODUÇÃO

A carbamazepina (CAR), a fenitoína (FEN), o fenobarbital (FNB) e a lamotrigina (LAM) são fármacos anticonvulsivantes utilizados para o tratamento da

epilepsia. O uso destes fármacos, cujas estruturas químicas são mostradas na Figura 1, está associado a diversas reações adversas, tornando a monitoração terapêutica necessária e, às vezes, imprescindível para o bom andamento do tratamento (Patsalos et al., 2002; Patsalos et al., 2008).

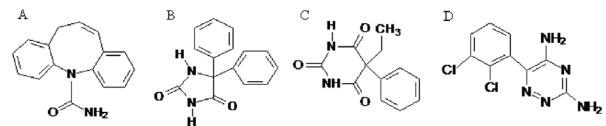


Figura 1. Estruturas químicas: A) carbamazepina B) fenitoína C) fenobarbital D) lamotrigina.

A epilepsia é uma condição neurológica crônica caracterizada por crises recorrentes devido à excessiva atividade descontrolada, quer de uma parte ou de todo o sistema nervoso central (CEP, ILAE, 1993).

Os anticonvulsivantes utilizados no tratamento da epilepsia são frequentemente utilizados em multiterapias. Uma desvantagem da multiterapia farmacológica consiste na possibilidade da interação fármaco-fármaco. A introdução de novos fármacos antiepilépticos no mercado aumenta o número de combinações terapêuticas para o tratamento da epilepsia e, conseqüentemente, o risco desta interação (Chun-Lai et al., 2007). A interação de fármacos pode acarretar diversas reações adversas, tais como: diplopia, ataxia, inativação de outro fármaco, anemia megaloblástica, sedação profunda, depressão respiratória, hipotensão, sonolência, etc (Patsalos et al., 2008; Patsalos et al., 2002; Chollet, 2002).

A justificativa para determinação destes fármacos em tecidos e/ou fluidos corporais surge a partir de sua estreita faixa terapêutica e o seu alto potencial de toxicidade. Sendo assim, estes fármacos devem ter administração e acompanhamento criteriosos, necessitando de avaliação tanto da eficácia, quanto da tolerância e toxicidade. A determinação da concentração plasmática destes fármacos é necessária para o monitoramento dos níveis terapêuticos, seja para estudos de reações adversas, interações medicamentosas, estudos de toxicidade, farmacocinética ou farmacodinâmica adversas (Bodhankar & Patil, 2005; Pucci et al., 2004). Sendo assim, a especificidade das

técnicas analíticas empregadas na determinação destes fármacos é de primordial importância na monitorização terapêutica de fármacos (Queiroz et al., 2008; Vermeij & Edelbroek, 2007; Chun-Lai et al., 2007; Pucci et al., 2004; Chollet, 2002). A monitorização terapêutica de fármacos anticonvulsivantes consiste em individualizar a posologia dos mesmos para obter máxima eficácia do tratamento e melhorar a aderência do paciente, além da diminuição da incidência de reações adversas graves. Neste contexto, a determinação da concentração plasmática de fármacos e a medida das variáveis fisiológicas e bioquímicas decorrentes de sua ação são ferramentas importantes para a monitorização terapêutica (Patsalos et al., 2008; Chun-Lai et al., 2007; Gram, 2001). A faixa terapêutica dos anticonvulsivantes mais comumente utilizados é: carbamazepina (CAR) 4 – 12 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, fenitoína (FEN) 10 – 20 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, fenobarbital (FEB) 10 – 40 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ e lamotrigina (LAM) 2,5 – 15 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (Patsalos et al., 2008).

Vários métodos têm sido propostos para quantificação de anticonvulsivantes em matrizes biológicas, dentre eles os métodos cromatográficos, sendo um dos mais utilizados a cromatografia líquida de alta eficiência com detector de arranjo de diodos (HPLC/PDA do inglês *High Performance Liquid Chromatography – Diode Array Detection*). Dentre as vantagens do HPLC/PDA estão a eficiência na separação, rapidez e simplicidade, além da separação e quantificação de diferentes fármacos em uma única análise (Chun-Lai et al., 2007; Chollet, 2002).

A carbamazepina, fenobarbital, fenitoína e lamotrigina presentes em amostras biológicas podem ser extraídas, separadas e detectadas sob uma variedade de condições cromatográficas. Diversas fases estacionárias e fases móveis podem ser utilizadas além de diferentes técnicas de detecção como: espectrofotometria UV-Vis, fluorimetria, eletroquímica, espectrometria de massas e outras (Queiroz et al. 2008; Vermeij & Edelbroek, 2007).

O presente estudo teve como objetivo desenvolver e validar um método bioanalítico simples, rápido, sensível, preciso e exato para monitorar a terapia com CAR, FEN, FEB e LAM em plasma por HPLC/DAD. É um método atualmente bastante utilizado em laboratórios analíticos, para avaliar se as concentrações destes fármacos encontram-se dentro da faixa terapêutica, possibilitando a otimização da terapia farmacológica, um melhor ajuste da dose.

MATERIAL E MÉTODOS

Soluções padrão, reagentes e solventes

Os padrões de CAR, FEN, FEB, LAM e zolpiden (ZOL) padrão interno (PI) (ZOL) foram adquiridos do laboratório Sigma Aldrich (EUA). As soluções estoque preparadas em metanol e utilizadas durante o estudo foram obtidas a partir de CAR/LAM e FEN/FEB nas concentrações de 2 mg/mL e 4 mg/mL, respectivamente. A solução estoque do PI foi preparada em metanol na concentração de 2 mg/mL. Todas as soluções foram armazenadas à -20°C . O metanol (MOH) e acetonitrila (ACN) grau HPLC, foram obtidos da J.T.Baker (USA). O ácido cítrico e o fosfato

de sódio dibásico foram obtidos da Synth (Brasil) e o éter metil-terc-butilico (MTBE), da Tedia (USA).

Soluções intermediárias contendo CAR, FEN, FEB e LAM foram preparadas a partir das soluções de estoque para construção da curva de calibração. As soluções de estoque foram preparadas 10 vezes mais concentradas que as concentrações utilizadas na curva de calibração numa solução hidroalcoólica (metanol:água ultrapura, 1:1). A curva de calibração foi construída com oito pontos em duplicatas, a saber: branco, amostra zero (branco + PI), e amostras nas concentrações de 0,5; 1,0; 2,0; 5,0; 10; 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de CAR / LAM e branco, zero, 2,0; 4,0; 8,0; 16; 32; 64 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de FEN / FEB.

As concentrações das soluções de controle de qualidade foram 1,5; 8,0 e 15 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de CAR / LAM para os controles de qualidade baixo, médio e alto, respectivamente. Já para FEN / FEB as concentrações das soluções de controle de qualidade baixo, médio e alto foram 6,0; 27 e 48 $\mu\text{g}/\text{mL}$, respectivamente.

Para cada ponto da curva de calibração e dos controles foi preparado um *pool* de padrões de CAR, FEN, FEB e LAM nas concentrações referidas anteriormente.

A solução estoque contendo padrão primário do ZOL foi diluída para concentração intermediária de 320 $\mu\text{g}/\text{mL}$, e esta para 32 $\mu\text{g}/\text{mL}$, sendo a última adotada como solução de trabalho para todas as amostras.

Sistema cromatográfico

Foi utilizado o sistema de HPLC Shimadzu LC - 20AT Prominence® equipado com detector UV-PDA SPD M20A operando a 210 nm, coluna Ace® C18 (5 μm , 4,6 x 150 mm) a temperatura ambiente. A fase móvel foi constituída por mistura de ácido cítrico/tampão fosfato de sódio dibásico 50 mM pH 5,0 (70%) e ACN (30%) com fluxo variando 0,7 a 1,2 mL/min (0,0 min a 6,5 min, fluxo 1,2 ml/min; 6,5 a 13,0 min, fluxo 1,2 ml/min; 13,0 a 13,5, fluxo 1,0 ml/min e 13,5 a 16,0, fluxo de 0,7 ml/min). O volume de injeção foi de 20 μL .

Obtenção e preparo das amostras

Os critérios de inclusão utilizados para coleta das amostras foram: (i) pacientes maiores de 18 anos com diagnóstico de epilepsia, (ii) pacientes de ambos os sexos, (iii) pacientes sob o uso de medicamentos anticonvulsivantes CAR, FEN, FEB e LAM há pelo menos dois meses, (iv) paciente alfabetizado ou sob o cuidado de algum responsável alfabetizado e, (v) paciente que retornasse periodicamente ao Ambulatório Municipal de Psiquiatria. Foram excluídos do estudo pacientes em uso dos anticonvulsivantes com tempo de tratamento inferior a dois meses assim como aqueles que, apesar do consentimento, não tiveram disponibilidade em comparecer para a coleta de sangue.

As amostras de sangue venoso (5 mL) foram coletadas dos pacientes em terapia com os anticonvulsivantes, no Ambulatório Municipal de Psiquiatria de Goiânia, de manhã (aproximadamente 10h), momento em que os pacientes, logo após o atendimento médico, encontravam-se em jejum e eram encaminhados

pelo corpo clínico. Utilizaram-se seringas convencionais e em seguida o sangue foi transferido para tubos contendo anticoagulante ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) e acondicionado em embalagem de isopor contendo gelo. Após 60 minutos o plasma foi separado dos elementos figurados do sangue na Central Analítica do Núcleo de Estudos e Pesquisas Tóxico-Farmacológicas (NEPET) por centrifugação a 3.500 rpm por 15 minutos e em seguida armazenado a -20°C para posterior análise.

Para o preparo da curva de calibração em plasma foi utilizado o plasma branco isento de CAR, FEN, FEB e LAM). O plasma foi descongelado e centrifugado a 3000 rpm por 5 minutos. Em seguida, a 500 μL de plasma foram adicionados 50 μL de solução padrão de CAR/LAM (0,5 – 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$) e FEN/FEB (2,0 – 64 $\mu\text{g}/\text{mL}$) e 50 μL de padrão interno de ZOL (32 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Após 5 segundos de homogeneização em vórtex, adicionou-se 1000 μL de MTBE. A solução foi novamente homogeneizada por mais 60 segundos. Após centrifugação por 6 minutos a 6000 rpm, transferiram-se 800 μL para um tubo de vidro (5 mL). O extrato orgânico foi evaporado até *secura* sob fluxo de ar a 50°C . Posteriormente, o extrato foi reconstituído com 100 μL de fase móvel e homogeneizado por 60 segundos. Transferiu-se 100 μL para um *insert* e 20 μL foram injetados no HPLC-PDA. As amostras dos pacientes foram processadas da mesma forma como descrito anteriormente.

Desenvolvimento do método analítico

Foram determinados os parâmetros de adequação do sistema cromatográfico para avaliar a aplicação do método durante os ensaios analíticos e verificar a repetibilidade e a resolução entre os picos. Os parâmetros avaliados foram o número de pratos teóricos (N), o fator de capacidade (K), a resolução (R), a simetria (S) e o desvio padrão relativo (DPR) entre as injeções (ICH, 1996). Analisaram-se concentrações de CAR/LAM a 1,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ e para FEN/FEB a 6,0 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

Validação do método analítico

Os limites de confiança do método analítico foram determinados de acordo com a resolução RE nº 899, de 29 de maio de 2003 da ANVISA para a validação de métodos bioanalíticos (Brasil, 2003).

Linearidade

Foi construída uma curva de calibração para cada fármaco de interesse na mesma matriz biológica proposta para o estudo (plasma).

A faixa de linearidade testada foi entre 0,5 – 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para CAR/LAM e 2,0 – 64 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para FEN/FEB. A concentração da solução de padrão interno de ZOL das amostras foi de 32 $\mu\text{g}/\text{mL}$. As soluções de padrão foram injetadas em duplicata em cada um das seis concentrações testadas. O limite de detecção (LD) e o limite de quantificação (LQ) foram determinados por meio da análise de soluções de concentrações conhecidas e decrescentes do analito, até o menor nível detectável e quantificável, respectivamente.

Seletividade

A interferência de outros fármacos no método analítico desenvolvido foi avaliada pelo teste de seletividade. Foram testados os seguintes fármacos: nitrazepam, paracetamol, diazepam, dipirona, fluconazol, imipramina e fluoxetina. Foi analisada amostra de plasma normal, lipêmico e hemolisado com a finalidade de verificar a interferência destas matrizes biológicas no método analítico desenvolvido (Brasil, 2003).

Precisão

Para avaliar a precisão intra e inter corrida da técnica, analisaram-se três concentrações (baixa, média e alta) de cada fármaco em sextuplicata contemplando a faixa de linearidade do método. As amostras foram analisadas no mesmo dia (precisão intra-corrida) e em três dias consecutivos (inter-corrida).

A precisão da técnica foi expressa como o desvio padrão relativo (coeficiente de variação) de uma série de medidas realizadas no mesmo dia e em dias distintos, de acordo com a equação 1:

$$\text{DPR} = \text{DP} / \text{CMD} \times 100 \quad (1)$$

em que, DPR é o desvio padrão relativo, DP é o desvio padrão e CMD a concentração média determinada (Brasil, 2003).

O desvio padrão relativo deve ser menor ou igual a 20% para o limite inferior de quantificação (LIQ) e menor ou igual a 15% para as demais concentrações para que o mesmo seja considerado preciso (Brasil, 2003). Para esse parâmetro foram analisadas as concentrações de CAR/LAM em 1,5; 8,0 e 15 $\mu\text{g}/\text{mL}$ e para FEN/FEB em 6,0; 27 e 48 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

Exatidão

A exatidão é a proximidade dos resultados obtidos pela técnica em estudo em relação ao valor verdadeiro do analito presente na amostra, devendo ser determinada após o estabelecimento da linearidade, do intervalo linear e da especificidade da técnica.

Para avaliar a exatidão da técnica desenvolvida, foram analisadas em sextuplicata três concentrações (baixa, média e alta) dos fármacos em estudo, contemplando a faixa de linearidade do método no mesmo dia (exatidão intra-corrida) e em três dias consecutivos (inter-corrida) (Brasil, 2003).

A exatidão é expressa pela relação entre a concentração média determinada experimentalmente e a concentração teórica correspondente, como mostra a equação 2:

$$\text{Exatidão} = \text{CME} / \text{CT} \times 100 \quad (2)$$

em que, CME = concentração média experimental e CT = concentração teórica.

A faixa de exatidão deve compreender entre 85 – 115% para que o mesmo seja considerado exato, exceto

para o LIQ, para o qual se admite faixa de 80 – 120% (Brasil, 2003). Este parâmetro foi obtido a partir da análise das amostras adicionadas de CAR/LAM (1,5; 8,0 e 15 µg/mL) e FEN/FEB (6,0; 27 e 48 µg/mL).

Limite de detecção

O limite de detecção é um parâmetro de capacidade de detecção da técnica analítica e corresponde à menor concentração do fármaco presente em uma amostra, porém não necessariamente quantificada, sob condições experimentais estabelecidas. Este parâmetro foi estabelecido por meio da análise de soluções de concentrações decrescentes conhecidas do analito, até o menor nível detectável de CAR/LAM e FEN/FEB (Brasil, 2003).

Limite de quantificação

É o parâmetro que corresponde à menor concentração analisada do fármaco, com precisão e exatidão aceitáveis sob condições estabelecidas. Este parâmetro foi estabelecido por meio da análise de soluções decrescentes de concentrações conhecidas do analito, até o menor nível determinável com precisão e exatidão de CAR/LAM e FEN/FEB (Brasil, 2003).

Estudo de estabilidade de curta e longa duração

O estudo de estabilidade visa determinar se o analito permanece quimicamente inalterado em uma determinada matriz, sob condições específicas por determinado intervalo de tempo. Desta forma, a estabilidade depende das propriedades químicas dos fármacos, da matriz biológica e do material de acondicionamento utilizado (Brasil, 2003).

Para realizar o teste de estabilidade de curta duração, utilizaram-se cinco amostras branco adicionadas de padrão fresco em duas concentrações CAR/LAM: 1,5 e 15 µg/mL e FEN/FEB 6,0 e 48 µg/mL, respectivamente. (Brasil, 2003). As amostras foram mantidas por quinze horas à temperatura ambiente (tempo estimado no qual as amostras dos pacientes foram mantidas nestas condições até serem analisadas). Posteriormente, o coeficiente de variação obtido da análise das amostras foi comparado com o coeficiente de variação obtido da análise das amostras recém-preparadas (Brasil, 2003).

A estabilidade de longa duração teve a finalidade de comprovar que a CAR, FEN, FEB e LAM mantiveram-se estáveis em plasma humano congelado, em *freezer* (-20°C), durante todo o intervalo de tempo que compreendeu a coleta das amostras, preparação e análise das mesmas. Para avaliação dessa estabilidade, cinco amostras nas mesmas concentrações do teste de estabilidade curto foram preparadas a partir de uma solução estoque recente do fármaco em análise, adicionado à matriz biológica isenta de interferência. As amostras preparadas permaneceram por quatro semanas em *freezer* (-20°C). Após a análise comparou-se o coeficiente de variação das concentrações das amostras do teste de estabilidade de longa duração com a média das amostras recém-preparadas (Brasil, 2003).

Recuperação

A recuperação é definida como a proporção da quantidade da substância de interesse, presente ou adicionada na porção analítica do material teste que é extraída e passível de ser quantificada (Ribani et al., 2004; Brasil, 2003).

A percentagem de recuperação da extração do fármaco adicionado à matriz biológica foi realizada em três concentrações (alta, média e baixa) diferentes.

Para o teste de recuperação de amostras de plasma foram adicionadas com três diferentes concentrações dos fármacos em estudo (CAR/FEN/FEB/LAM). Cada concentração foi preparada em sextuplicata.

O cálculo da recuperação foi realizado em função da relação de área do padrão extraído e não extraído, tanto para o analito quanto para o padrão interno separadamente conforme equação 3:

$$\text{Recuperação} = C_{\text{ext}} / C_{\text{Não-ext}} \times 100 \quad (3)$$

em que, C_{ext} é a concentração do analito extraído e $C_{\text{Não-Ext}}$ a concentração do analito não extraído (Ribani et al., 2004; Brasil, 2003).

Aplicação do método

O método foi aplicado para monitorização terapêutica de CAR, FEB, FEN e LAM em nove pacientes que faziam uso de pelo menos um destes medicamentos antiepilépticos, conforme procedimento aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Goiás (protocolo nº 241/09). As amostras de sangue foram coletadas em tubos contendo EDTA, no Ambulatório Municipal de Psiquiatria de Goiânia. Em seguida, o plasma foi separado dos elementos figurados do sangue por centrifugação a 3500 rpm por 15 minutos e armazenado a -20°C para posterior extração e análise em HPLC/DAD.

RESULTADOS

O sistema cromatográfico utilizado no presente trabalho proporcionou a obtenção de cromatogramas com adequada resolução entre os picos de interesse e com boa sensibilidade e recuperação, conforme mostra a Figura 2. O método desenvolvido contemplou os parâmetros de adequação de sistema dentro dos limites aceitáveis preconizados pela Conferência Harmônica Internacional (ICH, 1996). Na Tabela 1 estão demonstrados os resultados relativos ao estudo de adequação de sistema e seletividade do método analítico.

O gradiente de fluxo utilizado não comprometeu a reprodutibilidade dos cromatogramas, uma vez que o intervalo de tempo entre as corridas cromatográficas foi suficiente para reestabelecer o equilíbrio entre as injeções.

O perfil cromatográfico obtido em plasma branco, lipêmico e hemolisado durante a verificação da seletividade encontram-se representados pela Figura 3.

A linearidade da curva analítica na faixa de 0,5 a 20,0 µg/mL para CAR/LAM e 2,0 a 64 µg/mL para FEN/FEB foi obtida a partir do ajuste de regressão linear ($r_{\text{CAR}} = 0,99904$, $r_{\text{LAM}} = 0,99350$, $r_{\text{FEN}} = 0,99974$ e $r_{\text{FEB}} = 0,99979$).

Comparando com outros métodos disponíveis na literatura, para análise de múltiplos anticonvulsivantes por HPLC-DAD (Queiroz et al., 2008; Edlbroek & Vermeij,

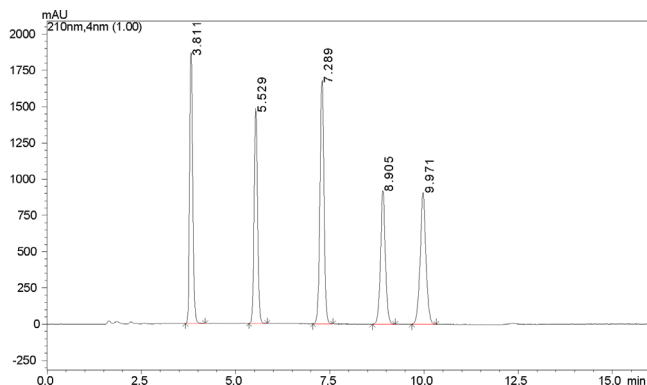


Figura 2. Cromatograma dos padrões de carbamazepina (8,9 min; 8,0 mg/mL), lamotrigina (3,8 min; 8,0 mg/mL), fenitoína (5,5 min; 27,0 mg/mL), fenobarbital (10,0 min; 27,0 mg/mL) e zolpidem (7,3 min; 32 mg/mL) obtido por HPLC/PDA a 210 nm.

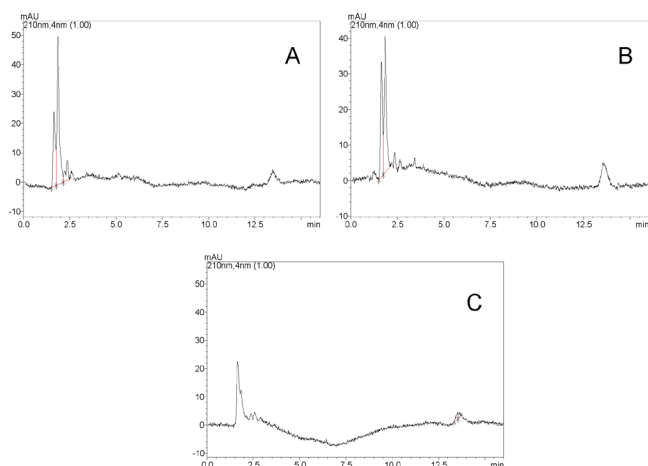


Figura 3. Cromatogramas obtidos por HPLC/PDA a 210 nm: A) Plasma branco; B) Plasma lipêmico e C) Plasma hemolisado.

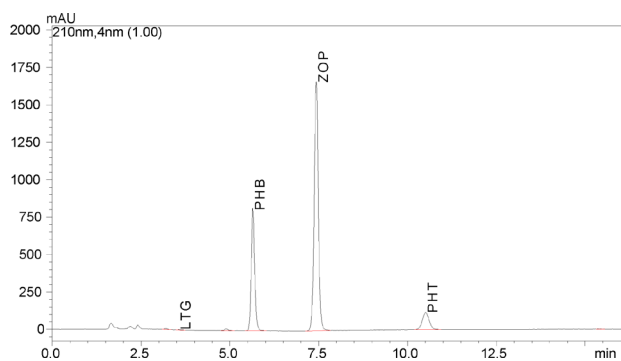


Figura 4. Cromatograma da monitoração terapêutica de fenitoína (5,5 min; 32,29 mg/mL), fenobarbital (10,5 min; 9,42 mg/mL) e zolpidem (7,3 min; 32 mg/mL) obtido por HPLC/PDA a 210 nm a partir de amostra de plasma do paciente 5.

Tabela 1. Gradiente de fluxo utilizado no sistema cromatográfico para análise de CAR/LAM e FEN/FEB.

| Tempo (min.) | Fluxo(ml/min.) |
|--------------|----------------|
| 0,0 - 6,5 | 0,7 |
| 6,5 - 13,0 | 1,2 |
| 13,0 - 13,5 | 1,0 |
| 13,5 - 16,0 | 0,7 |

Legenda: LAM = lamotrigina; FEB = fenobarbital; ZOL = zolpidem; CAR = carbamazepina e FEN = fenitoína.

Tabela 2. Teste de adequação de sistema e seletividade do método analítico para fármacos antiepiléticos

| Parâmetros | ICH* | LAM | FEB | ZOL | CAR | FEN |
|----------------------------|--------|------|-------|-------|-------|-------|
| Fator de capacidade | > 2,0 | 2,1 | 2,4 | 3,3 | 4,6 | 5,3 |
| Número de pratos teóricos | ≥ 2000 | 7980 | 14755 | 18716 | 17170 | 14831 |
| Resolução | ≥ 2,0 | - | 5,0 | 4,3 | 4,1 | 2,21 |
| Simetria | ≤ 2,0 | 1,2 | 1,1 | 1,0 | 1,0 | 1,0 |
| Desvio padrão relativo (%) | ≤ 2,0 | 0,35 | 0,65 | 0,44 | 0,73 | 0,71 |

Legenda: LAM = lamotrigina; FEB = fenobarbital; ZOL = zolpidem; CAR = carbamazepina e FEN = fenitoína.

*Valores preconizadas pelo ICH.

Tabela 3. Estudo de precisão e exatidão intra e interensaio para fármacos antiepiléticos.

| Concentração de CAR/LAM (µg/mL) | Carbamazepina | | Lamotrigina | |
|---------------------------------|---------------|--------------|--------------|--------------|
| | Precisão (%) | Exatidão (%) | Precisão (%) | Exatidão (%) |
| | Intra | Inter | Intra | Inter |
| 8,7 | 8,7 | 105,3 | 3,0 | 107,7 |
| | 1,5 | 4,0 | 6,7 | 104,2 |
| | 7,3 | 3,7 | 109,2 | 99,3 |
| | 3,7 | 2,8 | 3,1 | 91,8 |
| 8,0 | 2,7 | 89,4 | 4,0 | 91,2 |
| | 9,8 | 102,3 | 8,7 | 103,8 |
| | 15,0 | 5,6 | 6,1 | 98,1 |
| | 2,8 | 94,2 | 2,5 | 96,1 |

Os resultados obtidos para os parâmetros de precisão e exatidão inter e intra-corrida estão demonstrados na Tabela 2.

Os resultados do estudo de estabilidade de CAR/FEN/FEB/LAM de curta duração (15 h) e os de longa duração (4 semanas) são apresentados na Tabela 3.

Os valores médios da recuperação para os analitos estão representados na Tabela 4.

As concentrações de CAR, FEB, FEN e LAM obtidas na monitorização terapêutica dos pacientes com epilepsia estão demonstradas na Tabela 5.

O cromatograma de CAR, FEB e FEN obtido na monitorização terapêutica dos pacientes com epilepsia está demonstrado na Figura 4.

Tabela 4. Estudo de precisão e exatidão intra e inter ensaio para fármacos antiepilépticos.

| Concentração de FEN/FEB (µg/mL) | Fenitoina | | Fenobarbital | | | | | |
|---------------------------------|--------------|-------|--------------|-------|--------------|-------|--------------|-------|
| | Precisão (%) | | Exatidão (%) | | Precisão (%) | | Exatidão (%) | |
| | Intra | Inter | Intra | Inter | Intra | Inter | Intra | Inter |
| 6,0 | 2,1 | | 112,1 | | 9,0 | | 101,8 | |
| | 3,3 | 2,9 | 106,3 | 108,8 | 3,3 | 5,0 | 109,8 | 107,8 |
| | 3,3 | | 108,0 | | 2,6 | | 111,7 | |
| 27,0 | 1,8 | | 107,1 | | 5,9 | | 103,8 | |
| | 2,5 | 2,7 | 100,5 | 102,3 | 2,2 | 4,2 | 89,4 | 93,8 |
| | 3,8 | | 99,3 | | 4,5 | | 88,1 | |
| 48,0 | 8,6 | | 105,6 | | 9,9 | | 101,4 | |
| | 5,9 | 5,7 | 101,5 | 102,3 | 5,0 | 5,9 | 95,4 | 96,9 |
| | 2,8 | | 99,7 | | 2,9 | | 94,0 | |

Tabela 5. Monitoração terapêutica dos pacientes com epilepsia

| Paciente | CAR | FEB | FEN | LAM |
|----------|-------|-------|-------|-----|
| | µg/mL | | | |
| 1 | 8,25 | - | 14,64 | - |
| 2 | 8,80 | - | 11,47 | - |
| 3 | 6,84 | - | 10,51 | - |
| 4 | 10,40 | - | - | - |
| 5 | - | 9,42 | 32,29 | - |
| 6 | - | 29,34 | - | - |
| 7 | - | - | 16,34 | - |
| 8 | - | - | 10,18 | - |
| 9 | 10,58 | - | - | - |

Legenda: (-) = Não detectado

DISCUSSÃO

Para o desenvolvimento da metodologia analítica foi utilizada uma coluna C18 que contribuiu para a obtenção de picos cromatográficos simétricos e com tempos de retenção de 8,9 minutos para a CAR, 5,5 minutos para a FEN, 10,0 minutos para FEB, 3,8 minutos para LAM e 7,3 minutos para ZOL. A resolução entre os picos foi adequada para a realização das análises, conforme mostra a Figura 2. Os valores encontrados na Tabela 2 para os parâmetros de adequação de sistema estão de acordo com os limites aceitáveis pelo guia Q2B de validação de métodos analíticos da ICH (ICH, 1996).

Segundo a ANVISA (Brasil, 2003), o coeficiente de correlação linear deve ser igual ou superior a 0,98 para validação de métodos bioanalíticos, porque quanto mais próximo de 1,0 for, menor será a dispersão do conjunto de pontos experimentais e, conseqüentemente, menor será a incerteza dos coeficientes de regressão estimados (Brasil, 2003; Ribani et al., 2004).

2007; Chun-Lai et al., 2007; Matar et al., 1999), observou-se que o tempo da corrida analítica descrito nesses trabalhos foi de 20 a 40 minutos, enquanto no método desenvolvido neste trabalho o tempo de corrida foi de 15 minutos, mostrando-se uma técnica de análise rápida. Esta redução de tempo foi possível com o uso de gradiente de fluxo que promoveu uma melhor resolução entre os picos e diminuiu o tempo de corrida. Esse comportamento deve-se ao fato de que as moléculas estudadas possuem diferentes características físico-químicas, especialmente a solubilidade.

Durante o desenvolvimento do método, estudou-se o processo de extração dos analitos da matriz biológica. Dois tipos de métodos de extração foram testados: precipitação proteica e extração líquido-líquido por ambos serem mais acessíveis. A técnica de extração líquido-líquido permitiu obter melhores resultados com o solvente extrator MTBE.

Por outro lado, Chun-Lai et al. (2007) e Pucci et al. (2004) utilizaram a técnica de extração em fase sólida (SPE) e obtiveram LIQ de 1 µg/mL para CAR/LAM/FEN, 5 µg/mL para FEB e 2 µg/mL para CAR/FEN/FEB, respectivamente. O LIQ obtido neste trabalho foi de 0,5 µg/mL para CAR/LAM e 1 µg/mL para FEN/FEB com extração líquido-líquido, mostrando-se eficiente para extrair pequenas quantidades dos anticonvulsivantes.

No estudo de especificidade não foi detectada interferência do plasma normal, hemolisado e lipêmico durante a corrida cromatográfica no comprimento de onda utilizado (Figura 3). Os fármacos diazepam, dipirona sódica, fluconazol, fluoxetina, imipramina, nitrazepam e paracetamol tiveram sua interferência analisada pelo método e foi observado que nenhum deles apresenta o mesmo tempo de retenção da CAR/LAM e FEN/FEB.

A precisão intra e inter-corrida apresentou variação menor que 9,80%, 8,55%, 9,91% e 9,00% para os controles de qualidade de CAR, FEN, FEB e LAM. Quando comparado com os dados da literatura, verificou-se que o coeficiente de variação obtido na maioria dos trabalhos está na faixa de 0,6 a 9,8% (Queiroz et al., 2008; Edlbroek & Vermeij, 2007; Chun-Lai et al., 2007; Bodhankar & Patil, 2005; Pucci et al., 2004; Brasil, 2003; Matar et al., 1999). Portanto, os resultados de precisão obtidos neste trabalho são satisfatórios, segundo a ANVISA, e estão dentro dos valores de coeficiente de variação descritos na literatura. Sendo assim, o método mostrou-se preciso dentro do intervalo de concentrações avaliado para quantificação dos anticonvulsivantes de interesse em plasma humano.

Os resultados de exatidão obtidos estão em concordância com os descritos pela ANVISA, que preconiza faixa de 85 a 115% para as amostras de controle de qualidade e 80 a 120% para o LIQ, assim como os dados encontrados na literatura, que variam de 90% a 110% (Queiroz et al., 2008; Edlbroek & Vermeij, 2007; Chun-Lai et al., 2007; Bodhankar & Patil, 2005; Pucci et al., 2004; Brasil, 2003; Matar et al., 1999).

Os valores de limites de detecção para CAR/LAM (0,1 µg/mL) e FEN/FEB (0,4 µg/mL) e limites de quantificação para CAR/LAM (0,5 µg/mL) e FEN/FEB (2,0 µg/mL) foram igualmente considerados satisfatórios para a aplicação do método em estudos bioanalíticos.

A estabilidade de curta duração teve a finalidade de comprovar que a CAR, FEN, FEB e LAM se mantiveram

estáveis em plasma humano à temperatura ambiente ($\pm 25^{\circ}\text{C}$) durante todo o intervalo de tempo que compreendeu o descongelamento das amostras, preparação e análise das mesmas (aproximadamente quinze horas). Os resultados das análises foram consideradas estáveis por não se observar desvio superior a 15% quando comparadas as amostras recém-preparadas (Tabela 5).

Bodhankar & Patil (2005) e Matar et al. (1999) demonstraram em seus trabalhos que os anticonvulsivantes estudados apresentaram-se estáveis a 25°C por 24 horas com valores de CV% de 1,07 – 2,91 e 0,55 – 2,78, respectivamente. No presente estudo, a estabilidade avaliada em 15 horas na mesma temperatura apresentou CV% de 2,55 – 7,42. Apesar dos valores de CV obtidos neste trabalho estarem acima dos valores descritos na literatura, eles ainda foram menores que os 15% preconizados pela ANVISA (Brasil, 2003).

No estudo de estabilidade de longa duração do CAR, FEN, FEB e LAM, eles apresentaram estabilidade em plasma humano quando congelado em temperatura de -20°C por um período de 4 semanas. A partir desse resultado inferiu-se que os fármacos presentes no plasma dos pacientes estudados também se mantiveram estáveis durante todo o intervalo de tempo entre a coleta, a preparação e a análise no período de 2 semanas.

Segundo a ANVISA (Brasil, 2003), as amostras são consideradas estáveis por não se observar um desvio superior a 15% quando comparadas as amostras recém-preparadas (Tabela 6).

Chun-Lai et al. (2007) já haviam demonstrado em seu trabalho que os anticonvulsivantes estudados em plasma apresentavam estabilidade sob condições de congelamento a -20°C de 3 semanas. Bodhankar & Patil (2005) e Matar et al. (1999) demonstraram que os anticonvulsivantes estudados em plasma apresentaram estabilidade de 4 semanas a -20°C , dados que foram confirmados no presente trabalho.

A recuperação foi obtida pelo quociente das áreas de amostras extraídas e amostras não submetidas ao processo de extração. Os valores de recuperação para CAR, FNT, FNB e LAM (Tabela 7) condizem com os achados da literatura, que variam geralmente de 63-113% (Queiroz et al., 2008; Edlbroek & Vermeij, 2007; Chun-Lai et al., 2007; Bodhankar & Patil, 2005; Ribani et al., 2004; Pucci et al., 2004; Matar et al., 1999).

Observou-se que, com o método proposto, é possível detectar e quantificar os fármacos utilizados pelos pacientes em farmacoterapia com pelo menos um dos fármacos testados (CAR, FEB e FEN), como mostra a Figura 4. Três pacientes deste estudo faziam terapia com ácido valproico, fluoxetina e clonazepam sendo observado que estes fármacos não interferiram na análise cromatográfica, confirmando a seletividade e especificidade do método desenvolvido e validado. Chun-Lai et al. (2007) quantificaram CAR e FEN em 20 minutos, enquanto Queiroz et al. (2008) quantificaram CAR, FEN e FEB em 40 minutos. O método proposto é capaz de detectar CAR, FEB, FEN e LAM em 15 minutos, sendo por isso quando comparado com os métodos descritos acima um método mais abrangente e rápido.

Todas as coletas de sangue dos pacientes foram realizadas no período matutino, correspondendo, em

média, 2,5 h (1 -4 h) após a administração da CAR, FEN e FEB. O horário da coleta foi escolhido de forma em que os pacientes passassem previamente pela consulta clínica e, também, a coleta não atrapalhasse a rotina posológica deles, já que boa parte dos pacientes tomava os medicamentos bem cedo, antes de se dirigirem ao Ambulatório Municipal de Psiquiatria de Goiânia. Segundo Patsalos et al., 2008, o ideal seria coletar o sangue imediatamente antes da dose do medicamento e outra coleta no tempo estimado para o pico de concentração (T_{max}). Entretanto, como os pacientes estudados neste trabalho foram pacientes ambulatoriais, tal procedimento não foi possível e assumiu-se o T_{max} estimado para cada fármaco, como sendo o momento ideal para a coleta de sangue (Hardman & Limbird, 2003). Dessa forma, foi possível avaliar os dados de adesão ao tratamento farmacológico e estimar o grau de controle terapêutico dos pacientes.

Nenhuma das amostras de sangue coletada apresentou níveis plasmáticos de lamotrigina, porque este fármaco no momento do estudo não era fornecido pelo Sistema Único de Saúde (SUS) para pacientes epiléticos.

O método foi aplicado para analisar a concentração plasmática de CAR, FEB, FEN e LAM dos pacientes que fazem farmacoterapia com estes medicamentos e comparar os valores encontrados com as faixas de concentração terapêutica descritas na literatura. Das amostras analisadas foi possível observar que a concentração plasmática de FEB (9,42 $\mu\text{g/mL}$) e FEN (32,29 $\mu\text{g/mL}$) do paciente 5 não está dentro da faixa terapêutica estabelecida pela literatura que é de 10,0 $\mu\text{g/mL}$ a 40,0 $\mu\text{g/mL}$, para FEB e 10,0 $\mu\text{g/mL}$ a 20,0 $\mu\text{g/mL}$ para FEN, possibilitando a otimização da terapia farmacológica e um melhor ajuste da dose para garantir a eficácia do tratamento para este paciente (Bodhankar & Patil, 2005; Pucci et al., 2004). As demais amostras analisadas encontram-se dentro das faixas terapêuticas que são 4 – 12 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ para CAR, 10 – 20 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ para FEN e 10 – 40 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ para FEB, o que possibilita a redução de reações adversas e maior adesão ao tratamento com os anticonvulsivantes, na Tabela 8 (Patsalos et al., 2008).

O método bioanalítico desenvolvido apresenta limites de confiança adequados para a aplicação em estudos com amostras biológicas contendo CAR, FEN, FEB e LAM, tempo de corrida relativamente curto quando comparado com os da literatura. Além de não sofrer interferência de outros fármacos de uso comum dos pacientes, comprovando sua seletividade, precisão, exatidão e estabilidade em análises de amostras biológicas.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Goiás (FAPEG) e à Fundação de Apoio à Pesquisa da Universidade Federal de Goiás (FUNAPE).

ABSTRACT

Simplified determination of carbamazepine, phenytoin, phenobarbital and lamotrigine in plasma and therapeutic monitoring by HPLC/PDA

Carbamazepine, phenytoin, phenobarbital and lamotrigine are well known anticonvulsant drugs used in the treatment of epilepsy. However, these medications are associated with side effects and therefore require therapeutic monitoring. Blood samples of adult outpatients diagnosed with epilepsy at the Goiânia Municipal Psychiatry Clinic (Brazil) were collected and analyzed using high-performance liquid chromatography. The analytes and internal standard (zolpidem) were extracted by liquid-liquid extraction. A reversed phase column (ACE 5, C18, 150 x 4.6 mm i.d.) was used. The mobile phase was composed of acetonitrile (30%) and citric acid/phosphate buffer, pH 5.0 (70%). The gradient flow rate was from 0.7 to 1.2 mL/min and the detection wavelength was set at 210 nm for all analytes. The analysis revealed a linear range from 0.5 to 20.0 µg/mL for carbamazepine/lamotrigine and 2.0 to 64.0 µg/mL for phenytoin/phenobarbital. Mean recovery ranged from 96.8% to 108.5% for carbamazepine/lamotrigine and 93.8% to 108.8% for phenytoin/phenobarbital. The quantification limit, precision (CV < 15%) and accuracy (A > 85%) proved to be in accordance with the requirements stipulated by the Brazilian National Health Surveillance Agency (ANVISA). Nine outpatients were evaluated to confirm the validity of the method.

Keywords: Anticonvulsant. Therapeutic drug monitoring. HPLC.

REFERÊNCIAS

- Brasil. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Guia para Validação de Métodos Analíticos e Bioanalíticos. Resolução RE n 899. Brasília, Diário Oficial da União, 29 de maio de 2003.
- Bodhankar, SL, Patil, KM. High-performance thin-layer chromatographic determination of lamotrigine in serum. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2005;823(2):152-7.
- Chollet DF. Determination of antiepileptic drugs in biological material. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2002;767(2):191-233.
- Chun-Lai M, Jiao Z, Jie Y, Shi XJ. Chromatographic method development: computer simulated statistical design approach. *Chromatographia.* 2007;65(5/6):267-75.
- Commission on Epidemiology and Prognosis, International League Against Epilepsy. Guidelines for epidemiologic studies on epilepsy. *Epilepsia.* 1993;34(4):592-6.
- Vermeij TAC, Edelbroek PM. Robust isocratic high performance liquid chromatographic method for simultaneous determination of seven antiepileptic drugs including lamotrigine, oxcarbazepine and zonisamide in serum after solid-phase extraction. *J Chromatogr B.* 2007;857:40-6.
- Gram LF. The dose-concentration-effect relationships—the basis for TDM. A critical appraisal. *International Congress Series,* 2001;1220:117–123.
- Hardman JG, Limbird LE. Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics. 10th ed. Ed. New York: McGraw Hill; 2003.
- International Conference on Harmonisation – ICH. Harmonized Tripartite Guidelines. Validation of analytical methodology. Q2(R1). 1996. Disponível em <http://www.ich.org/products/guidelines/quality/article/quality-guidelines.html>.
- Matar KM, Nicholls PJ, Tekle A, Bawazir AS, Al-Hassan MI. Liquid chromatographic determination of six antiepileptic drugs and two metabolites in microsamples of human plasma. *Ther Drug Monit.* 1999;21(5):559–66.
- Patsalos PN, Berry DJ, Bourgeois BFD, Cloyd JC, Glauser TA, Johanssen SI, Leppik IE, Tomson T, Perucca E. Antiepileptic drugs—best practice guidelines for therapeutic drug monitoring: a position paper by the subcommission on therapeutic drug monitoring, ILAE Commission on Therapeutic Strategies. *Epilepsia.* 2008;49(7):1239-76. DOI: 10.1111/j.1528-1167.2008.01561.x.
- Patsalos PN, Frosher W, Pisani F, Rijn, CMV. The importance of drug interactions in epilepsy therapy. *Epilepsia.* 2002;43(4):365-85.
- Queiroz RHC, Bertucci C, Malfará WR, Dreossi SAC, Chaves AR, Valério DAR, Queiroz MEC. Quantification of carbamazepine, carbamazepine-10,11-epoxide, phenytoin and phenobarbital in plasma samples by stir bar-sorptive extraction and liquid chromatography. *J Pharm Biomed Anal.* 2008;48(2):428-34. DOI: 10.1016/j.jpba.2008.03.020.
- Pucci V, Bugamelli F, Mandrioli R, Ferranti A, Kenndler E, Raggi MA. High-performance liquid chromatographic determination of Levetiracetam in human plasma: comparison of different sample clean-up procedures. *Biomed Chromatogr.* 2004;18(1):37-44.
- Ribani M, Bottoli CBG, Collins CH, Jardim ICSF, Melo LFC. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. *Quim Nova.* 2004;27(5):771-80.

Recebido em 16 de agosto de 2012

Aceito para publicação em 05 de março de 2013