



# Comparação de métodos analíticos para quantificação de ácido valproico

Haas, S.E.<sup>1</sup>, Mariotti, K.C.<sup>1</sup>, Krahn, A.L.<sup>1</sup>, Freddo, R.J.<sup>1</sup>, Dalla Costa, T.<sup>1</sup>, Limberger, R.P.<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, Brasil.

Recebido 12/11/2010 / Aceito 02/03/2011

## RESUMO

As intoxicações por medicamentos são predominantes no Brasil e frequentes na faixa etária de 0 a 14 anos. O ácido valproico (AV) vem se destacando em virtude do aumento do seu espectro de utilização na terapêutica clínica, porém, a hepatotoxicidade pode ser desencadeada por altas concentrações desse fármaco, apresentando alta incidência em crianças. Logo, tornam-se importantes métodos rápidos de quantificação desse fármaco, a fim de auxiliar o clínico no tratamento da intoxicação. Diante desse cenário, os objetivos deste trabalho foram comparar metodologias analíticas para quantificação de AV por CLAE-F (fluorescência) e CG/DIC (detecção por ionização de chama) em relação à sua potencial aplicação em toxicologia clínico-laboratorial de urgência. Para quantificação de AV por fluorescência, realizou-se a derivatização do AV com 4-(Bromometil)-7-metoxicumarina, sendo o produto da reação analisado em  $\lambda$  de emissão de 325 e detecção de 398 nm, na faixa de calibração de 1-300  $\mu\text{g/mL}$ . Com relação à CG/DIC, esta apresentou-se linear na faixa de 100-2000  $\mu\text{g/mL}$ , sem necessidade de derivatização prévia. A técnica de CG/DIC mostrou-se mais apropriada para análises toxicológicas de urgência em casos de intoxicação com AV, tendo em vista o menor tempo de corrida, a linearidade obtida, menor custo, rapidez e praticidade, além de utilizar um equipamento robusto, disponível na grande maioria dos laboratórios de toxicologia de pequeno e médio porte.

**Palavras-chave:** Ácido valproico. Intoxicações. CG/DIC. CLAE-F.

## INTRODUÇÃO

No Brasil, as intoxicações foram responsáveis pelo atendimento de mais de 85.925 registros nos centros de

informações toxicológicas em 2008. Cerca de 30% desses casos envolveram medicamentos (SINITOX, 2011). As intoxicações são causadas pela ingestão, aspiração ou introdução no organismo, acidental ou não, de substâncias exógenas, como os medicamentos. Elas podem ser subdivididas de acordo com o tempo de ocorrência, sendo agudas (até 24 horas após exposição) ou crônicas, que resultam do acúmulo do agente no organismo devido à utilização prolongada.

A ingestão de doses excessivas de fármacos está frequentemente associada a intoxicações pediátricas, podendo apresentar danos graves à saúde ou até provocar a morte da criança (Barros & Davino, 2003). Levantamentos mostram que menores de cinco anos são responsáveis por 57% da ingestão de doses excessivas de medicamentos, sendo que 14% dos casos acontecem mesmo com o uso de doses terapêuticas (Amaral & Barcia, 2003). As intoxicações pediátricas constituem-se em uma das mais frequentes emergências toxicológicas, o que pode ser atribuído ao fato de que as crianças são mais suscetíveis a reações adversas, uma vez que o processo de maturação orgânica pode não estar concluído (Bauer, 2008).

No ano de 2008, o Sistema Nacional de Informações Tóxico-Farmacológicas (SINITOX), vinculado à Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), registrou mais de 11.000 casos de intoxicações por medicamentos em crianças com até 14 anos de idade, representando aproximadamente 14% do total de casos de intoxicações registrados pelo centro no ano analisado (SINITOX, 2011). As exposições a psicofármacos podem representar até 39% dos medicamentos associados a casos agudos de intoxicação (Amaral & Barcia, 2003). Estudo realizado no Reino Unido, no período de 2000-2007, mostrou que 3,4% dos casos de intoxicação relatados foram atribuídos a antiepiléticos. Destes, 25% referem-se a casos relacionados ao ácido valproico (AV) (Nixon et al., 2009), que é atualmente o fármaco de escolha para tratamento de epilepsia, transtornos de humor e prevenção a crises convulsivas em crianças. As intoxicações causadas por esse fármaco têm aumentado na última década (Isbister et al., 2003) e manifestam-se como taquicardia, vômitos, trombocitopenia e até morte (Isbister et al., 2003; Bauer 2008). Edema cerebral e hiperamonemia também têm sido relatados em intoxicações por AV, sendo que esses efeitos se manifestam em concentrações do fármaco na faixa de

*Autor correspondente:* Renata Pereira Limberger - Laboratório de Análises e Pesquisas Toxicológicas - Departamento de Análises - Faculdade de Farmácia - Universidade Federal do Rio Grande do Sul - Av. Ipiranga, 2752 CEP.90610-000 - Porto Alegre - RS, Brasil - tel.: +55 51 3308 5297 - fax: +55 51 3308 5437 - e-mail: renata@ufrgs.br

520 a 1700  $\mu\text{g/mL}$  com concentrações médias de 1127  $\mu\text{g/mL}$  (Eyer *et al.*, 2005).

No caso de crianças, uma das principais manifestações às concentrações elevadas e prolongadas do AV é a hepatotoxicidade, sendo os principais fatores predisponentes a idade (crianças), a politerapia e os níveis elevados de AV (Kondo *et al.*, 1992). A incidência é de uma para cada 500 crianças com menos de dois anos que fazem tratamento com o fármaco. O AV é extensamente metabolizado no fígado e, em crianças, a atividade do

citocromo P450 está aumentada, e as enzimas uridina-difosfato e glicosiltransferase, responsáveis por reações de Fase II, também têm sua atividade modificada. Dessa forma, a patogênese da hepatotoxicidade pode ser atribuída a doenças mitocondriais, a erros inatos associados ao metabolismo ou, principalmente, a inibição da via do  $\beta$ -oxidação pelo AV e a toxicidade dos metabólitos denominados de VPA, 4-ene-VPA, e 2,4-diene-VPA (Figura 1) (Jankovic *et al.*, 2010; Neumann *et al.*, 2001).

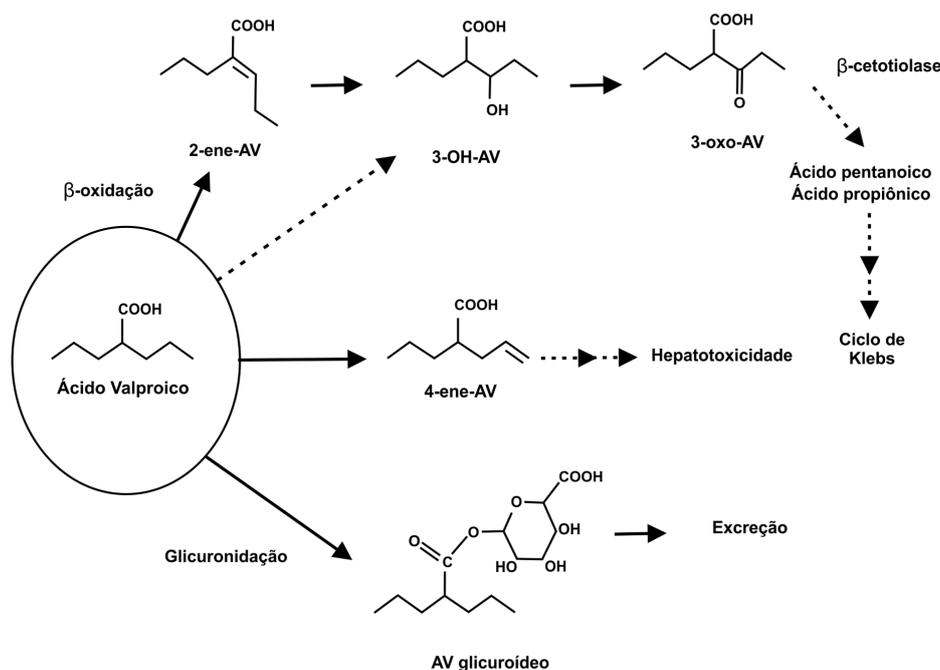


Figura 1. Ácido valproico e vias de metabolização por glicuronidação,  $\beta$ -oxidação e dessaturação (McLaughlin *et al.*, 2000)

As concentrações terapêuticas de AV estão na faixa de 50-100  $\mu\text{g/mL}$ , embora alguns pacientes possam apresentar efeitos adversos dose-dependentes a partir de 75  $\mu\text{g/mL}$  como ataxia, sedação, letargia e cansaço (Bauer, 2008). Por ser um fármaco com baixo índice terapêutico e amplamente utilizado em pediatria, o monitoramento das concentrações sanguíneas de pacientes que fazem uso do AV é fundamental. Essas análises são requeridas sempre que se torna necessário identificar ou confirmar uma intoxicação aguda ou, ainda, dar subsídios ao tratamento do paciente intoxicado ou monitorar níveis plasmáticos do fármaco, para assegurar uma terapia com o máximo de eficácia e o mínimo de efeitos adversos.

Entretanto, contrapondo o aumento do número de casos de intoxicação por AV registrados nos Centros de Informações Toxicológicas, poucos são os Laboratórios de Urgência nacionais capacitados para realizar análises rápidas de confirmação de diagnóstico, evidenciando a necessidade de desenvolvimento de metodologias analíticas que sejam capazes de fornecer subsídios ao corpo médico para que possam definir o prognóstico do tratamento e evitar que esses eventos possam ser fatais. Além disso, embora a análise do fármaco faça parte da rotina de laboratórios hospitalares, que utilizam kits de imunoenensaio para detecção de AV, essa é uma técnica de

alto custo, além do período restrito de validade dos kits reagentes. Adicionalmente, a técnica proporciona inúmeras reações cruzadas com outros anticonvulsivantes, tendo em vista que os pacientes frequentemente fazem uso de vários fármacos dessa classe, caracterizando a politerapia. Nesse sentido, a cromatografia apresenta-se como um método de escolha para a determinação do fármaco minimizando a ocorrência de reações cruzadas.

Cabe ressaltar que o emprego de estratégia analítica apropriada em toxicologia clínico-laboratorial pode ser fundamental para a conduta médica. A rapidez, confiança e versatilidade dos métodos analíticos são características imprescindíveis para viabilizar seu uso em laboratórios de urgência. Um método ideal deve permitir caracterização e quantificação simultânea dos toxicantes no menor tempo possível. Atualmente, técnicas como imunoenensaio, cromatografia em fase líquida e gasosa são as mais empregadas. Apesar do baixo custo e da praticidade, a aplicabilidade dos imunoenensaio depende da rotina e demanda diária do laboratório e a possibilidade de reações cruzadas pode induzir o médico a erros no manejo da intoxicação, que podem ser fatais. Por outro lado, as técnicas cromatográficas podem oferecer resultados irrefutáveis, mas dependem das capacidades técnicas disponíveis nos laboratórios, especialmente infraestrutura

e pessoal especializado, além de métodos otimizados, validados e adequadamente documentados.

Considerando o amplo espectro terapêutico do AV e o crescimento da sua utilização na clínica, paralelamente ao aumento de casos de intoxicações com esse fármaco, esse trabalho visa comparar a cromatografia em fase líquida de alta eficiência com detector de fluorescência (CLAE-F) e a cromatografia em fase gasosa com detector de ionização de chama (CG/DIC), para a quantificação de AV em relação à sua potencial aplicação em toxicologia clínico-laboratorial de urgência.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Análise do ácido valproico (AV) por CLAE-F

Para quantificação de AV por CLAE, utilizou-se Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência (Shimadzu SCL 10Avp sistema controlador/ LC10ADvp cromatógrafo líquido/ SIL 10ADvp Auto Injetor) (CLAE) com Detector

de Fluorescência (Shimadzu RF10AXL) acoplado e as separações cromatográficas foram conduzidas em coluna cromatográfica  $\mu$ Bondapak® C18 (125 Å 10  $\mu$ m) 3,9 x 300 mm (Waters®) e pré-coluna com material de enchimento  $\mu$ Bondapak® C18/Corasil (37-50  $\mu$ m, Waters®).

A fase móvel consistiu-se de uma mistura de acetonitrila:tampão acetato sódico 30 mM (70:30 v/v) com pH ajustado a 4,8 com ácido acético glacial. A velocidade de fluxo da fase móvel foi de 1,0 mL/min e o volume de injeção da amostra de 50  $\mu$ L. O detector de fluorescência teve o comprimento de onda ( $\lambda$ ) de excitação fixado em 325 nm e o  $\lambda$  de emissão em 398 nm (Zhong et al., 2006). As condições do detector foram de ganho, resposta e sensibilidade baixa. Para a derivatização, adicionou-se a 100  $\mu$ L de solução contendo AV, 30  $\mu$ L de solução de trietilamina 10% e 20  $\mu$ L do derivatizante 4-(Bromometil)-7-metoxicumarina (BrMMc), seguido de agitação durante 15 segundos e permanência em estufa a 40 – 50°C durante 20 minutos. Após esse período, 50  $\mu$ L da solução derivatizada foram injetados no cromatógrafo (Figura 2).

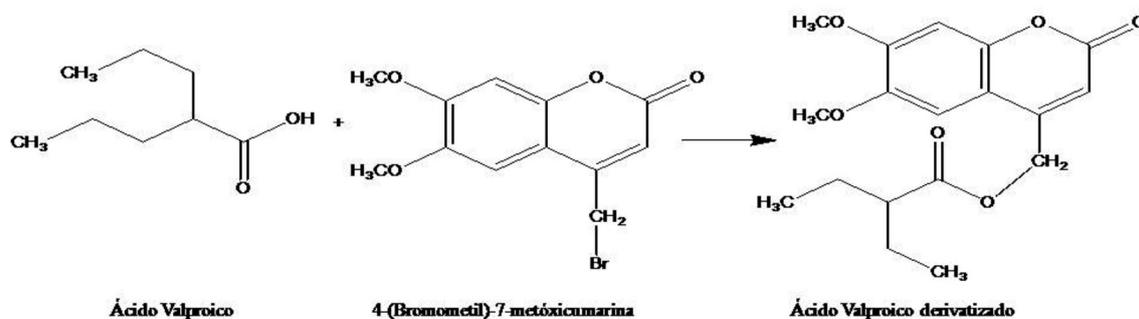


Figura 2. Esquema para a reação de derivatização do AV (A) com BrMMc (B) formando o derivado fluorescente (C) (Zhong et al., 2006).

As concentrações de AV avaliadas foram de 1; 10; 25; 50; 100; 200 e 300  $\mu$ g/mL, sendo que essas soluções foram preparadas a partir de uma solução-estoque de 500  $\mu$ g/mL de AV em acetonitrila. A curva para calibração do método foi preparada em triplicata contendo os pontos descritos anteriormente. Os resultados foram avaliados utilizando programa Excel®.

### Análise do ácido valproico (AV) por CG/DIC

As análises de AV por CG/DIC foram realizadas seguindo método descrito por Shahdousti e col. (2007), empregando cromatógrafo a gás Shimadzu GC 2010, com injetor automático AOC-20i (Tokio, Japão), equipado com detector de ionização de chama e coluna capilar de sílica fundida (DB-1, 100% dimetilpolisiloxano, 30 m x 0,25 mm de diâmetro interno x 0,25  $\mu$ m espessura, J & W Scientific). Nitrogênio (fluxo de 1,0 mL min<sup>-1</sup>) foi utilizado como gás de arraste. As temperaturas de injeção e detecção foram ajustadas para 250 e 280°C, respectivamente. A temperatura do forno foi programada inicialmente para 80°C, durante dois minutos subindo até 140°C, em uma taxa de 15°C/min e permanecendo em 140°C por 1 min. Posteriormente, a temperatura foi aumentada rapidamente em uma taxa de 40°C/min até 280°C, permanecendo nesse estágio por 2

min. O injetor foi programado no modo *split* em uma taxa de 1:20.

As concentrações de AV avaliadas foram de 100; 250; 500; 1000; 1500 e 2000  $\mu$ g/mL. Essas concentrações foram preparadas a partir de uma solução-estoque de 5 mg/mL de AV em metanol. As diluições foram realizadas utilizando o mesmo solvente. A curva para calibração do método foi preparada em triplicata. Os resultados foram avaliados utilizando programa Excel®.

## RESULTADOS

Em relação ao método de CLAE-F, na figura 3 pode-se observar os cromatogramas de uma solução, contendo apenas acetonitrila e os reagentes para derivatização (trielamina e BrMMc) (A), e AV na concentração de 100  $\mu$ g/mL (B). O tempo de retenção do fármaco no método avaliado foi em torno de 14 minutos.

O coeficiente de correlação linear ( $r^2$ ) encontrado foi de  $r^2 = 0,9980$  (Figura 3, C). Valores próximos a 1,0 demonstram excelente linearidade para a metodologia adaptada. O limite inferior de quantificação para esse método foi de 1  $\mu$ g/mL.

A figura 4 mostra, respectivamente, os cromatogramas de metanol (A), AV na menor concentração

avaliada (100 µg/mL) (B) e na concentração de 2000 µg/mL (C), através de CG/DIC, em que pode-se observar o pico de AV no tempo de retenção de 6,3 minutos.

O coeficiente de correlação linear ( $r^2$ ) obtido na análise de AV por CG foi de  $r^2 = 0,9989$  (Figura 4, D).

O valor para o coeficiente de correlação próximo a 1,0, demonstrando excelente linearidade para a metodologia adaptada a partir de Shahdousti et al. (2007), e o limite inferior de quantificação foi de 100 µg/mL.

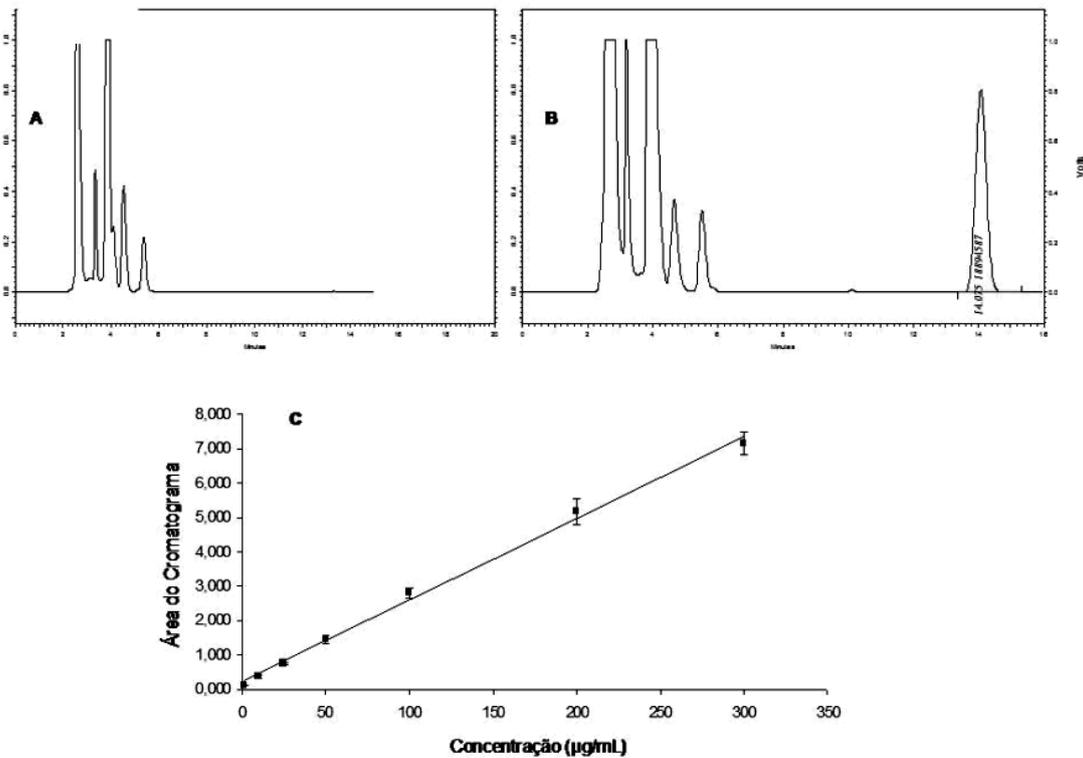


Figura 3. Cromatograma obtido para: a) solução em acetonitrila (branco) contendo os reagentes para derivatização (trietilamina e BrMMc); b) solução em acetonitrila do gráfico de calibração contendo AV na concentração de 100 µg/mL e os reagentes para derivatização (trietilamina e 4-(Bromometil)-7-metoxicumarina); c) curva de calibração.

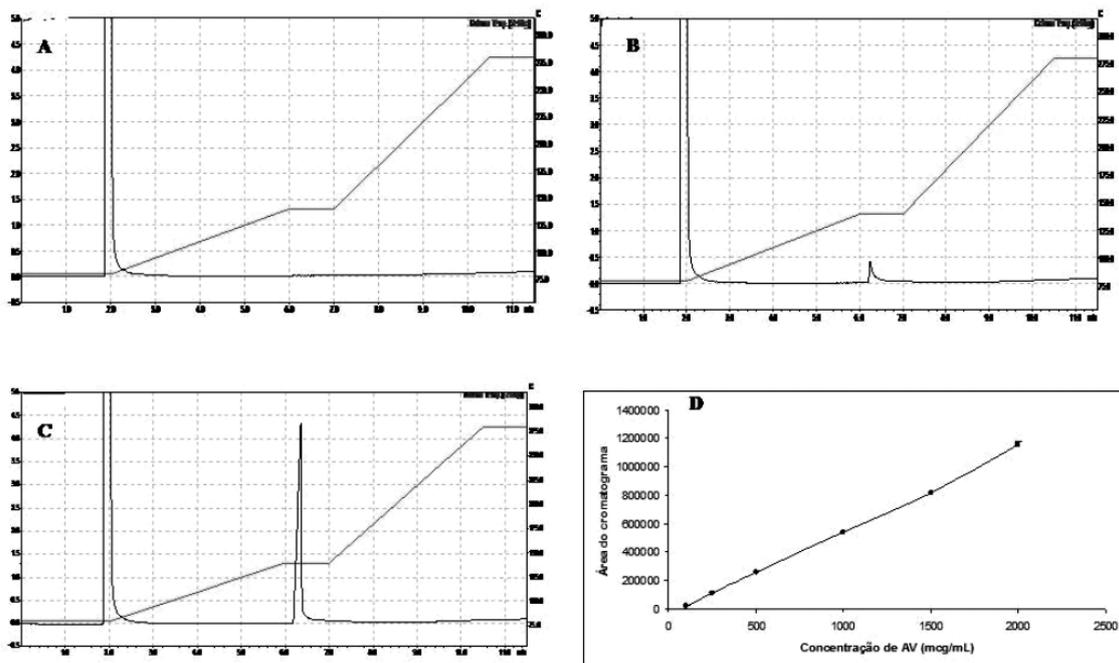


Figura 4. Cromatograma obtido por CG-DIC para a) solvente metanol; b) solução em metanol contendo AV na concentração de 100 µg/mL; c) solução em metanol contendo AV na concentração de 2000 µg/mL; d) curvas de calibração.

## DISCUSSÃO

O AV é um fármaco extremamente eficaz no tratamento da epilepsia e também vem sendo amplamente utilizado no tratamento de enxaqueca e transtornos de humor, bem como em convulsão febril em crianças com menos de cinco anos, como terapia de substituição ao uso de barbitúricos. Acompanhado dessa ampliação de utilização terapêutica, também aumentam os casos de intoxicação associados à ingestão excessiva desse fármaco. A detecção de níveis sanguíneos condizentes com situações de intoxicações é importante para que se possa auxiliar o médico na conduta clínica da intoxicação, podendo definir o prognóstico correto para o caso clínico.

No que tange a intoxicações pediátricas por AV, a interpretação conjunta e adequada das informações clínicas e laboratoriais consiste em uma ferramenta valiosa que, quando trabalhada de forma cooperativa entre médicos e analistas toxicologistas, pode ser decisiva no sucesso da abordagem terapêutica que, na maioria dos casos, não traz a referência do agente tóxico envolvido, além de ser frequente a necessidade de diagnóstico diferencial com outras patologias. Nesse contexto, a utilização de CLAE-F é descrita na literatura como uma técnica adequada para quantificação do AV (Lin *et al.*, 2004; Zhong *et al.*, 2006). Entretanto, há a potencial interferência da matriz biológica, que não pode ser descartada. Essa limitação pode ser minimizada pela utilização de CG que apresenta vantagens frente ao CLAE-F, tais como menor custo operacional, simplicidade e rapidez de execução. Além disso, para viabilizar a análise por CLAE-F, etapa adicional de derivatização do analito é indispensável. Essa etapa aumenta o custo e o tempo de análise, o que pode ser decisivo ao prognóstico do paciente intoxicado, além de diminuir a resolução, exatidão, robustez, sensibilidade e linearidade do método, tornando vantajosa a aplicação da CG.

Em relação à aplicabilidade dos métodos, a técnica por CLAE-F pode ser utilizada principalmente para no monitoramento terapêutico do AV, tendo em vista a sua maior sensibilidade, apresentando limite de quantificação de 1 µg/mL. Porém, considerando-se a etapa de derivatização e o tempo de análise de no mínimo 15 minutos, este é um método mais demorado quando comparado à análise por CG. A utilização de CG/DIC mostrou-se adequada para o monitoramento de situações associadas a intoxicações com AV. Apesar do maior limite de quantificação, como não exige tratamento prévio das amostras e possui um tempo menor de análise, apresenta-se mais compatível com as análises toxicológicas de urgência. É importante salientar que a obtenção de concentrações passíveis de monitoramento terapêutico (menores de 100 µg/mL) utilizando-se CG pode ser alcançada através da hifenização do equipamento a detector de massas (CG-EM) e da possibilidade de automação da preparação da amostra por microextração em fase sólida (SPME), o que amplia de duas a três casas decimais os limites de detecção e quantificação, diminuindo consideravelmente os efeitos de matriz, bem como reduzindo ainda mais custos e tempo de análise e aumentando a confiabilidade do método.

Face aos resultados obtidos neste trabalho, consideramos a CG a técnica mais apropriada para análises

toxicológicas de urgência em casos de intoxicação com AV. A aplicabilidade da CG/DIC está demonstrada pela excelente linearidade obtida, menor custo, rapidez e praticidade e uso de equipamento robusto, disponível na grande maioria dos laboratórios de toxicologia de pequeno e médio porte. Entretanto, otimizações podem ser realizadas visando o aumento da sensibilidade da técnica para possibilitar sua aplicação em análises forenses e monitoração terapêutica; para tanto, a transposição do método para SPME-CG-EM e a aplicação em diferentes matrizes biológicas podem ser consideradas perspectivas promissoras. Em relação ao imunoensaio, a técnica cromatográfica é adequada para quantificação do AV, uma vez que evita o monitoramento errôneo do fármaco em virtude de reações cruzadas com outras substâncias devido a politerapia.

## ABSTRACT

*Comparison of analytical methods for determination of valproic acid*

**Poisoning by drugs is rather frequent in Brazil in the age range of 0 to 14 years. Intoxication by valproic acid (VA) stands out because of an increase in its spectrum of clinical use; hepatotoxicity is an important reaction that can be triggered by high concentrations of this drug and there is a high incidence of toxic events in children. Therefore, fast methods of analysing this drug are essential, in order to help the clinician to treat the intoxication. Given this scenario, the objective of this study was to compare analytical methods to determine VA, by HPLC-F (fluorescence) and GC/FID (flame ionization detection), assessing their potential application in the urgent toxicology clinic. For the fluorometric analysis, the VA was first derivatized with 4-bromomethyl-6, 7-dimethoxycoumarin, and the resulting compound was excited at  $\lambda = 325$  nm and detected by the emission at 398 nm. The calibration range was 1-300 µg/mL. The GC/FID method showed a linear response in the range 100-2000 µg/mL, without requiring prior derivatization. The technique of GC/FID proved more appropriate for the urgent toxicological analysis of VA, in view of the shorter time of analysis, linearity, lower cost, speed, efficiency and the use of robust equipment that is already available in the great majority of small and medium-sized toxicological clinics.**

*Keywords:* Valproic acid, intoxication, GC/FID, HPLC-F.

## REFERÊNCIAS

- Amaral DA, Barcia SAD. In: Zanini - OGA, Farmacologia- Editora Atheneu-4ª edição Intoxicações por medicamentos. 2003
- Barros S.B, Davino SC. In: Zanini - OGA, Farmacologia- Editora Atheneu-4ª edição Avaliação da toxicidade, 2003.
- Bauer LA. Applied Clinical Pharmacokinetics. 2<sup>nd</sup>. ed. New York: The McGraw-Hill Companies; 2008.

- Eyer F, Felgenhauser N, Gempel K, Gerbitz KD, Zilker T. Acute Valproate Poisoning Pharmacokinetics, Alteration in Fatty Acid Metabolism, and Changes During Therapy. *J Clin Psychopharmacol*. 2005;25(4):376-80.
- Isbister G, Balit CR, Whyte IM, Dawson WA. Valproate overdose: a comparative cohort study of self poisonings, *J Clin Pharmacol*. 2005;55(4):398-404.
- Jankovic SM, Milanovic JR, Jankovic S. Factors influencing valproate pharmacokinetics in children and adults. *Int J Clin Pharmacol Ther*. 2010; 48 (11):767-75
- Kondo T, Kaneko S, Otani K, Ishida M, Hirano T, Fukushima Y, Muranaka H, Koide N, Yokoyama M. Associations Between Risk Factors for Valproate Hepatotoxicity and Altered Valproate Metabolism, *Epilepsia*. 1992;33(1):172-7.
- Lin MC, Kou HS, Chen CC, Wu SM, Wu HL. Simple and sensitive fluorimetric liquid chromatography method for the determination of valproic acid in plasma. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. 2004;810(1):169-72.
- Mclaughlin DB, Eadie MJ, Parker-Scott SL, Addison RS, Henderson RD, Hooper WD, Dickinson RG. Valproate metabolism during valproate-associated hepatotoxicity in a surviving adult patient, *Epilepsy Res*. 2000;41(3):259-68.
- Neuman NG, Sheara NH, Jacobson-Browna PM. CYP2E1-mediated modulation of valproic acid-induced hepatocytotoxicity. *Clin Biochem*. 2001; 34(3):211-8.
- Nixon AC, Doak MW, Crozier H, Crooks DP, Waring WS. Patterns of antiepileptic drug overdose differ between men and women: admissions to the Edinburgh Poisons Unit, 2000–2007. *QJM*. 2009;102(1):51–6–56.
- Shahdousti P, Mohammadi A, Alizadeh M. Determination of valproic acid in human serum and pharmaceutical preparations by headspace liquid-phase microextraction gas chromatography-flame ionization detection without prior derivatization. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. 2008;850(1-2):128-33.
- Sistema Nacional de Informações Tóxico-Farmacológicas, Centro de Informação Científica e Tecnológica, Fundação Oswaldo Cruz. Casos Registrados de Intoxicação Humana por Agente Tóxico e Faixa Etária. Brasil, 2008. Rio de Janeiro: Sistema Nacional de Informações Tóxico-Farmacológicas, Centro de Informação Científica e Tecnológica, Fundação Oswaldo Cruz; 2008. Acesso em 16/02/2011.
- Zhong Y, Jiao Z, Yu Y. Simultaneous determination of mycphenolic acid and valproic acid based on derivatization by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *Biomed Chromatogr*. 2006;20(4):319-326.