

Virgínia Sofia Geraldés

Determinação de antiepilépticos em amostras de
plasma humano por cromatografia líquida
acoplada a um detector de fotodiodos

Covilhã

2010

Universidade da Beira Interior
Faculdade de Ciências

Determinação de antiepilépticos em amostras de
plasma humano por cromatografia líquida
acoplada a um detector de fotodiodos

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências da
Universidade da Beira Interior para a obtenção do
Grau de Mestre em Bioquímica

Virgínia Sofia Geraudes

Covilhã, 2010

ORIENTADORES:

MARÍA EUGENIA GALLARDO ALBA, Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade da Beira Interior

MÁRIO JORGE DINIS BARROSO, Serviço de Toxicologia Forense, Instituto Nacional de Medicina Legal - Delegação do Sul

Trabalho experimental efectuado no
Centro de Investigação em Ciências
da Saúde, Universidade da Beira
Interior

AGRADECIMENTOS

Queria agradecer primeiro que tudo àquelas pessoas que por estarem muito perto aturam o pior e o melhor do dia-a-dia, por isso, agradeço aos meus Pais, por estarem comigo, mesmo quando não era muito agradável com eles. À minha irmã pela capa deste trabalho; por me fazer companhia nos fins-de-semana de trabalho no CICS.

Queria agradecer aos meus orientadores, Professora Doutora Eugénia Gallardo que foi mais do que uma orientadora, teve sempre uma atitude muito positiva relativamente ao meu trabalho e com isso me ajudou a superar todas as dificuldades. Dificilmente encontrarei melhor orientador que me apoie pela compreensão, optimismo e pela amizade que sempre demonstrou para comigo. Ao meu orientador, Mestre Mário Barroso, que apesar da distância foi incansável e esteve sempre presente.

Ao Luís, que ao logo dos anos me transmitiu confiança e sempre acreditou em mim.

*“Agir, eis a inteligência verdadeira. Serei o que quiser.
Mas tenho que querer o que for. O êxito está em ter êxito,
e não em ter condições de êxito.
Condições de palácio tem qualquer terra larga,
mas onde estará o palácio se não o fizerem ali?”*

Fernando Pessoa

ÍNDICE

Índice de Figuras	17
Índice de Tabelas	21
Lista de Abreviaturas	23
Resumo	25
Abstract	27
Justificação do tema e objectivos	29
I. REVISÃO DA LITERATURA	35
1. A Epilepsia	37
1.1. Enquadramento histórico	37
1.2. Classificação da epilepsia	38
2. Controlo dos episódios epilépticos	40
2.1. Evolução dos antiepilépticos	42
2.2. Classificação – características químicas	43
2.3. Mecanismo de acção dos antiepilépticos	44
2.4. Carbamazepina (características físico-químicas, farmacocinética, mecanismo de acção, intoxicação por carbamazepina, sinais/ diagnóstico de uma intoxicação e tratamento)	48-52
2.5. Fenitoína (características físico-químicas, farmacocinética, mecanismo de acção, intoxicação por carbamazepina, sinais/ diagnóstico de uma intoxicação e tratamento)	52-56
2.6. Fenobarbital (características físico-químicas, farmacocinética, mecanismo de acção, intoxicação por carbamazepina, sinais/ diagnóstico de uma intoxicação e tratamento)	57-60

2.7. Primidona (características físico-químicas, farmacocinética, mecanismo de acção, intoxicação por carbamazepina, sinais/ diagnóstico de uma intoxicação e tratamento)	60-63
3. Métodos de preparação de amostras	65
3.1. A extracção em fase sólida - características	65
3.1.1. O processo de extracção em fase sólida	67
3.1.2. Acondicionamento dos adsorventes de sílica	71
3.1.3. Escolha do eluente	73
3.2. Adsorventes e modos de interacção	73
3.2.1. Colunas Oasis [®] HLB	74
3.2.2. Colunas Oasis [®] MCX	76
4. Determinação de antiepilépticos em amostras biológicas	79
II. PARTE EXPERIMENTAL	88
1. Material e Métodos	90
1.1. Instrumentação	90
1.1.1. Sistema cromatográfico e de detecção	90
1.2. Reagentes	91
1.3. Padrões	91
1.4. Amostra biológica	92
1.5. Preparação de soluções	92
1.5.1. Soluções Padrão	92
1.5.2. Outras soluções	93
1.6. Condições cromatográficas	93

	Índice
1.7. Procedimento de extracção	94
2. Resultados e Discussão	96
2.1. Optimização da Fase Móvel	96
2.2. Identificação das substâncias	98
2.3. Padronização externa	100
2.4. Optimização do procedimento de extracção	102
2.4.1. Colunas HLB	102
2.4.2. Colunas MCX	110
2.5. Validação do método	113
2.5.1. Selectividade	113
2.5.2. Especificidade	114
2.5.3. Curva de calibração e linearidade	115
2.5.4. Limites de detecção e quantificação	121
2.5.5. Precisão e Exactidão	123
2.5.6. Estabilidade	127
2.5.6.1. Estabilidade a ciclos de congelação/descongelação	127
2.5.6.2. Estabilidade de amostras processadas	128
2.5.7. Recuperação	128
2.6. Aplicação do método a amostras reais	130
3. Conclusões	132
Bibliografia	136

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Classificação das crises generalizadas segundo a ILAE	39
Figura 2. Principais mecanismos de acção dos antiepilépticos	45
Figura 3. Estrutura química da carbamazepina	48
Figura 4. Estrutura química da fenitoína	53
Figura 5. Estrutura química do fenobarbital	57
Figura 6. Estrutura química da primidona	60
Figura 7. Etapas do processo de extracção em fase sólida	67
Figura 8. Silanol isolado	68
Figura 9. Silanol geminal	68
Figura 10. Silanol associado	69
Figura 11. Estrutura de um local <i>unencapped</i> (A) e <i>encapped</i> (B)	70
Figura 12. Três modelos para uma fase sólida C ₁₈ ligada a sílica: (A) sem acondicionamento, (B) parcialmente acondicionada, (C) completamente acondicionada	71
Figura 13. Diversos tipos de adsorventes e suas características gerais	74
Figura 14. O monómero lipofílico, divenílbenzeno, encontra-se assinalado a amarelo. O monómero hidrofílico, N-vinilpirrolidona, encontra-se assinalado a azul	75
Figura 15. Estrutura química das Oasis [®] MCX	75
Figura 16. Cromatograma dos antiepilépticos de estudo utilizando uma fase móvel de acetonitrilo: fosfato de sódio (40:60; v:v)	95
Figura 17. Cromatograma dos antiepilépticos de estudo utilizando uma fase móvel água: acetonitrilo: ácido acético (66,5:33,9:0,1; v:v:v)	96

Figura 18. Cromatograma dos antiepilépticos de estudo utilizando uma fase móvel água: acetonitrilo: ácido acético (59,5:40:0,5; v:v:v)	96
Figura 19. Cromatograma de uma mistura padrão dos antiepilépticos de estudo a 5 µg/mL.	97
Figura 20. Representação esquemática da preparação da amostra	103
Figura 21. Esquematização dos procedimentos de SPE de acondicionamento da coluna, lavagem, secagem e eluição	104
Figura 22. Cromatogramas obtidos a partir de amostras de plasma branco e quantidade de analito extraída para cada uma das diferentes condições testadas efectuando a eluição com metanol	105
Figura 23. Cromatogramas obtidos a partir de amostras de plasma branco e quantidade de analito extraída para cada uma das diferentes condições testadas efectuando a eluição com acetonitrilo	106
Figura 24. Cromatogramas obtidos a partir de amostras de plasma branco e quantidade de analito extraída para cada uma das diferentes condições testadas efectuando a eluição com acetato de etilo	107
Figura 25. Cromatogramas obtidos após análise de amostras brancas (diluição com PBS)	109
Figura 26. Representação esquemática da preparação da amostra	110
Figura 27. Esquematização dos procedimentos SPE de acondicionamento da coluna, lavagem, secagem e eluição utilizando colunas Oasis [®] MCX	111
Figura 28. Cromatogramas obtidos após análise de amostras brancas	112
Figura 29. Cromatogramas obtidos após análise de amostras brancas (lavagem de n-hexano)	112
Figura 30. Cromatograma de um plasma branco	114
Figura 31. Curva de calibração da primidona	117
Figura 32. Curva de calibração da 10,11-epoxicarbamazepina	118

Figura 33. Curva de calibração do fenobarbital	119
Figura 34. Curva de calibração da carbamazepina	120
Figura 35. Curva de calibração da fenitoína	121
Figura 36. Cromatograma da amostra real #2 (concentração de carbamazepina 8,75 µg/mL)	130

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Classificação dos antiepilépticos, via de administração e concentrações terapêuticas encontradas no plasma	44
Tabela 2. Revisão das metodologias analíticas que visam a determinação de fármacos antiepilépticos em fluidos biológicos (2007 – 2010).	81
Tabela 3. Compostos testados, tempo de retenção e $\lambda_{\text{máx}}$ e justificação da sua não utilização neste trabalho	98
Tabela 4. Tempo de retenção e comprimento de onda máximo para alguns compostos mais comumente usados e que podem ser usados com uma terapia com antiepilépticos.	100
Tabela 5. Dados de linearidade para a primidona	114
Tabela 6. Dados de linearidade para a 10,11-epoxi-carbamazepina	115
Tabela 7. Dados de linearidade para o fenobarbital	116
Tabela 8. Dados de linearidade da carbamazepina	117
Tabela 9. Dados de linearidade para a fenitoína	118
Tabela 10. Valores de LOD ($\mu\text{g/mL}$) para os antiepilépticos em estudo	119
Tabela 11. Valores obtidos para a precisão intradia e exactidão do método para a primidona a baixas, médias e altas concentrações	121
Tabela 12. Valores obtidos para a precisão do método para a 10,11-epoxi-carbamazepina a baixas, médias e altas concentrações	122
Tabela 13. Valores obtidos para a precisão do método para fenobarbital a baixas, médias e altas concentrações	123
Tabela 14. Valores obtidos para a precisão do método para a carbamazepina a baixas, médias e altas concentrações	123
Tabela 15. Valores obtidos para a precisão do método para a fenitoína a baixas, médias e altas concentrações	123
Tabela 16. Valores obtidos para a precisão e exactidão interdia do método para a primidona a baixas e altas concentrações	124

Tabela 17. Valores obtidos para a precisão e exactidão interdia do método para a carbamazepina a baixas e altas concentrações	124
Tabela 18. Valores obtidos para a precisão e exactidão interdia do método para a 10,11-epoxi-carbamazepina a baixas e altas concentrações	125
Tabela 19. Valores obtidos para a precisão e exactidão interdia do método para o fenobarbital a baixas e altas concentrações.	125
Tabela 20. Valores obtidos para a precisão e exactidão interdia do método para a fenitoína a baixas e altas concentrações	125
Tabela 21. Valores de recuperação para os analitos em estudo	126
Tabela 22. Compostos identificados nas amostras reais e respectiva quantificação	128

LISTA DE ABREVIATURAS

CE (*Capillary electrophoresis* – electroforese capilar);

DAD (*Diode array detector* – detector de fotodiodos);

ELISA (*Enzyme linked immuno sorbent assay*);

FDA – Food and Drug Administration

GC (*Gas chromatography* – cromatografia gasosa);

HLB – Hydrophilic/Lipophilic balance (balanço hidrofílico/lipofílico).

HPLC – High Performance Liquid Chromatography (Cromatografia líquida de alta eficiência)

HPTLC (*High performance thin-layer chromatography* – cromatografia de camada fina de alta eficiência);

ILAE – International League Against Epilepsy

LC (*Liquid chromatography* – cromatografia líquida);

LC-MS - Liquid chromatography–mass spectrometry (cromatografia líquida com espectrometria de massa)

LCR – Líquido cefalorraquidiano

LLE – Liquid-liquid extraction (extração líquido-líquido)

LLOQ - Lower Limit of Quantification – (limite inferior de quantificação)

LOD - Limit of Detection – (limite de detecção)

MCX - Mixed-mode Cation-eXchange (modo misto com troca catiónica)

Lista de Abreviaturas

MEPS (*Microextraction by packed sorbent* – microextração em seringa empacotada);

MS (*Mass spectrometry* – espectrometria de massa);

MS-MS (*Tandem mass spectrometry* – espectrometria de massa em tandem);

PDA – Photodiode array (detector de fotodiodos)

PEMA – Phenylethylmalonamide (feniletilmalonamida)

SBSE (*Stir bar sorptive extraction* – extração em barra de agitação);

SNC – Sistema Nervoso Central

SPE – Solid-phase extraction (extração em fase sólida)

SPME – Solid-phase microextraction (microextração em fase sólida)

UPLC (*Ultra performance liquid chromatography* – cromatografia líquida de ultra eficiência);

UV – Ultravioleta

RESUMO

A taxa de incidência de epilepsia na maioria dos países desenvolvidos é, hoje em dia, de cerca de 40-70 por 100 000 indivíduos. As crises epiléticas são normalmente controladas com auxílio dos fármacos antiepiléticos, estando disponível um grande número de agentes terapêuticos. A possibilidade real de ocorrerem interações entre estes fármacos, o advento da internet e o problema crescente da automedicação podem levar a um aumento considerável do número de intoxicações devidas a estes compostos.

Deste modo, são necessários métodos analíticos rápidos e sensíveis para a quantificação fidedigna destes compostos em amostras biológicas humanas, para dar auxílio e assistência aos serviços de emergência no tratamento de indivíduos intoxicados.

O objectivo deste trabalho foi então o desenvolvimento e validação de um método para a determinação quantitativa de quatro fármacos antiepiléticos (primidona, carbamazepina, fenitoína e fenobarbital) e o metabolito da carbamazepina (10,11-epoxi-carbamazepina) em plasma humano, utilizando extracção em fase sólida e cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a um detector de fotodiodos (HPLC-DAD).

Utilizando um volume de amostra de apenas 0,2 mL, o método foi completamente validado de acordo com normas internacionalmente aceites para a validação de métodos bioanalíticos. Os parâmetros estudados foram selectividade, linearidade, limites de detecção (LOD) e de quantificação (LOQ), precisão e exactidão, estabilidade em amostras processadas e em ciclos de congelação/descongelação, e eficiência de extracção.

Resumo

O método foi selectivo, já que não foram detectados interferentes após análise de amostras brancas de plasma de 20 origens diferentes, tendo sido obtida uma resposta linear entre 0.25 e 25 µg/mL para todos os compostos, excepto para a carbamazepina (0.1-25 µg/mL), primidona (1-25 µg/mL) e fenitoína (0,5-25 µg/mL). Os valores obtidos para a precisão e exactidão intra- e interdia estavam em conformidade com os critérios de validação mencionados, i.e., coeficientes de variação inferiores a 15% e *bias* dentro de um intervalo de $\pm 15\%$ da concentração teórica (excepto no limite inferior de quantificação, para o qual 20% foi considerado adequado). A eficiência de extracção foi superior a 90% para todos os compostos.

Finalmente, o método foi aplicado a quatro casos de intoxicação, nos quais alguns destes fármacos estavam presentes.

Em conclusão, o método desenvolvido provou ser útil para a determinação destes fármacos antiepilépticos em situações de intoxicação clínica ou forense.

ABSTRACT

Nowadays, in most developed countries, epilepsy's incidence rate is of about 40-70 in 100000. Epileptic seizures are controlled by means of antiepileptic drugs, and a number of therapeutic agents are available. The possibility of drug interactions between these agents, the advent of internet and the growing problem of self-medication may lead to an increased number of intoxications.

Therefore, there is the need of rapid and sensitive analytical methods for the reliable quantitation of these compounds in human biological samples to help and assist emergency services in the treatment of intoxicated individuals.

The goal of this work was the development and validation of a method for the quantitative determination of four selected antiepileptic drugs (primidone, carbamazepine, phenytoin and phenobarbital) and metabolite (10,11-epoxycarbamazepine) in human plasma, using solid-phase extraction and liquid-chromatography-diode array detector (HPLC-DAD).

The method used a sample amount as low as 0.2 mL, and was fully validated according to internationally accepted guidelines for bioanalytical method validation. The studied parameters were selectivity, linearity, limits of detection (LOD) and quantitation (LLOQ), precision and accuracy, bench top and freeze/thaw stability, and extraction efficiency.

The method was selective, as no interfering compounds were detected by analysis of blank plasma samples of 20 different origins, and linear from 0.5-25 µg/mL for all compounds, except for carbamazepine (0.25-25 µg/mL) and primidone (1-25 µg/mL). Intra- and interday precision and accuracy were in conformity with the above mentioned criteria, i.e., coefficients of variation of less than 15% and bias within a $\pm 15\%$ interval from the nominal value (excepted at

Abstract

the LLOQ, for which 20% was accepted). Extraction efficiency was higher than 90% for all compounds.

Finally, the method was successfully applied to four cases of intoxication with some of these compounds.

In conclusion, the developed method was proven useful for the determination of these antiepileptic drugs, both in clinical and forensic toxicology scenarios.

JUSTIFICAÇÃO DO TEMA E OBJECTIVOS

Segundo dados da Liga portuguesa contra a epilepsia, em Portugal, estima-se que 500.000 pessoas sejam atingidas pela epilepsia, cuja manifestação mais frequente são as crises epilépticas recorrentes (Pinto 2010).

A epilepsia é uma doença crónica do sistema nervoso. Esta doença manifesta-se por crises que se verificam ao longo do tempo, tendo sintomatologia variada. A maioria das vezes é, ela própria, um sintoma de que algo se passa no interior do cérebro; com efeito, uma crise epiléptica não é mais do que uma descarga eléctrica anormal no cérebro, afectando toda a rede de neurónios do órgão ou apenas uma parte. Esta patologia pode desenvolver-se em qualquer idade, mas o seu aparecimento é mais comum nas idades extremas da vida. De facto, os traumatismos durante o parto, as encefalites e as doenças infecciosas que ocorrem nos primeiros anos de vida podem ser causas de epilepsia, enquanto em anos mais avançados esta doença tem origem nos acidentes vasculares cerebrais (AVC). No entanto, quando a epilepsia é sintomática, isto é, quando a sua origem reside num problema de saúde primário, o tratamento é direccionado para a resolução deste problema. Por outro lado, quando não há uma causa concreta identificada, ou seja, a sua origem é idiopática, a terapia passa apenas pela administração de medicamentos antiepilépticos, podendo estes tratar 70 a 80% dos casos.

A descoberta e utilização dos fármacos antiepilépticos constituiu um marco no tratamento da epilepsia, já que até então apenas era possível efectuar o diagnóstico ou utilizar meios invasivos, como a lobotomia ou as terapias de choque, sendo estes últimos responsáveis por um elevado número de mortes. Desde a utilização do brometo de potássio em 1857 até actualidade foram desenvolvidos vários fármacos, como os barbitúricos, fenitoína, benzodiazepinas, carbamazepina ou antiepilépticos de “terceira geração”, pelo que hoje em dia cerca de 80% dos doentes epilépticos está livre de convulsões, ou estas encontram-se consideravelmente diminuídas.

Segundo uma estatística recente da Delegação Sul do Instituto Nacional de Medicina Legal, o nº de casos de intoxicação com antiepilépticos em 2008 foi de 2.6%, tendo havido um total de 167 intoxicações produzidas por medicamentos. Deste modo, estes fármacos passaram a ser o 7º grupo fármaco-terapêutico que mais intoxicações origina.

Este importante número de intoxicações pode ser devido em parte ao problema crescente da automedicação e à facilidade de aquisição destes fármacos pela internet. No entanto, para além destes dois factores há que ter conta também a existência de reacções medicamentosas, devidas principalmente a polimedicação, mas também a factores de risco relacionados com o doente, como por exemplo polimorfismos genéticos nas enzimas metabolizadoras e transportadores de fármacos. Concretamente este último factor ganha particular importância para a carbamazepina, fenitoína e os derivados do ácido barbitúrico (fenobarbital e primidona), já que o seu metabolismo está relacionado com as isoformas CYP 2C19 e CYP3A4 do citocromo P450, pelo que são numerosas as interacções com outras substâncias; a título de exemplo citam-se interacções com inibidores da bomba de protões, benzodiazepinas, antidepressivos, antiarrítmicos, antibióticos, álcool, etc (Monteiro 2007).

Deste modo, estes quatro fármacos antiepilépticos (bem como o principal metabolito da carbamazepina, a 10, 11-epoxicarbamazepina) foram as substâncias seleccionadas para este estudo.

Devido à possibilidade de intoxicação, torna-se necessária a existência de métodos analíticos rápidos e sensíveis para a determinação deste tipo de compostos em amostras biológicas, para deste modo dar auxílio e assistência aos serviços de emergência no tratamento de indivíduos intoxicados, permitindo também o diagnóstico precoce da intoxicação. Assim, o principal objectivo do presente trabalho foi o desenvolvimento de uma metodologia analítica rápida e sensível para a detecção e quantificação de 4 fármacos antiepilépticos em

amostras de plasma humano. Para tal, comparar-se-ão vários procedimentos extractivos por intermédio da extracção em fase sólida com diferentes tipos de adsorventes, sendo os analitos posteriormente detectados e quantificados utilizando a cromatografia líquida acoplada a um detector de fotodiodos. Uma vez optimizado o procedimento de extracção, a metodologia será então validada de acordo com critérios de validação internacionalmente aceites, de forma a garantir a fiabilidade dos resultados e uma eventual actuação atempada e eficaz por parte dos serviços de urgência.

I. REVISÃO DA LITERATURA

1. A EPILEPSIA

A propriedade mais importante da célula nervosa é a sua excitabilidade. Ela responde à excitação gerando um potencial de acção que pode conduzir a descargas repetidas. As epilepsias, um dos mais frequentes grupos de desordens neurológicas, caracterizam-se, e podem ocorrer em qualquer idade. Apesar do mecanismo que desencadeia a crise epiléptica ser ainda pouco entendido, as causas de uma descarga anormal parecem envolver canais iónicos neuronais e um desequilíbrio entre as funções excitatória e inibitória da função sináptica (Nadendla 2005; Lemke 2008).

1.1. Enquadramento histórico

Na maioria dos países desenvolvidos, as taxas de incidência da doença variam entre 40-70 casos por cada 100 000 habitantes, ao passo que nos países em vias de desenvolvimento, estas podem ser substancialmente mais altas (100-190 casos por cada 100 000 habitantes). Similarmente, a prevalência da epilepsia activa, que é definida com base no número de indivíduos que tomam ou tomaram medicamentos antiepilépticos nos últimos 5 anos, varia entre 4-10 casos por 10 000 nos países desenvolvidos e sobe para 57 por 10 000 nos países em vias de desenvolvimento (Bradley 2004).

O termo epilepsia, baseado na palavra grega *epilambanein* (que significa “descontrolar-se”, “apoderar-se de”) foi mencionado pela primeira vez por Hipócrates, que descreveu a doença como sendo uma enfermidade do cérebro e que podia ser tratada pela dieta, desmistificando assim a crença de que a sua origem era mágica ou sobrenatural. Também fez a primeira classificação da doença, que continua ainda hoje a ser usada. Distinguiu a epilepsia idiopática (cuja causa é desconhecida) da epilepsia sintomática (orgânica, que resulta de

A epilepsia

uma anomalia fisiológica, tais como danos no cérebro, tumor, infecção, intoxicação ou distúrbios metabólicos) (Lemke 2008).

A origem dos episódios de epilepsia foi estabelecida no século XIX por Jackson, que estipulou que os episódios convulsivos eram iniciados por uma intensa descarga na massa cinzenta em diversas regiões do cérebro. Têm sido publicadas várias classificações para estes episódios ao longo do século passado, tendo ainda surgido mais tentativas durante os anos 50 e 60. Em 1981, a *Commission on Classification and Terminology of the International League Against Epilepsy* (ILAE) fez uma nova proposta, baseada no tipo clínico do episódio.

1.2. Classificação da epilepsia

O termo *epilepsia* é utilizado quando os episódios de epilepsia são recorrentes e espontâneos. A ILAE tem vindo a desenvolver classificações para as múltiplas causas e manifestações da epilepsia, tendo a primeira sido introduzida em 1989 e a última em 2009. Os episódios/epilepsias são diferenciados em crises parciais e crises generalizadas. As crises parciais são definidas como episódios cujo início está limitado a um dos hemisférios cerebrais, enquanto as crises generalizadas têm um início seguido de uma distribuição rápida bilateral (H. Stefan 2007; Epilepsy 2010).

As transmissões bilaterais, que são observadas nas crises generalizadas, podem incluir estruturas corticais e subcorticais, mas não incluem necessariamente todo o córtex. As crises parciais, por sua vez, podem ter origem em estruturas subcorticais (Epilepsy 2010).

De acordo com a última classificação da ILAE, as crises generalizadas subdividem-se ainda em crises de ausência, crises mioclónicas, clónicas, atónicas e tónicas (Figura 1).

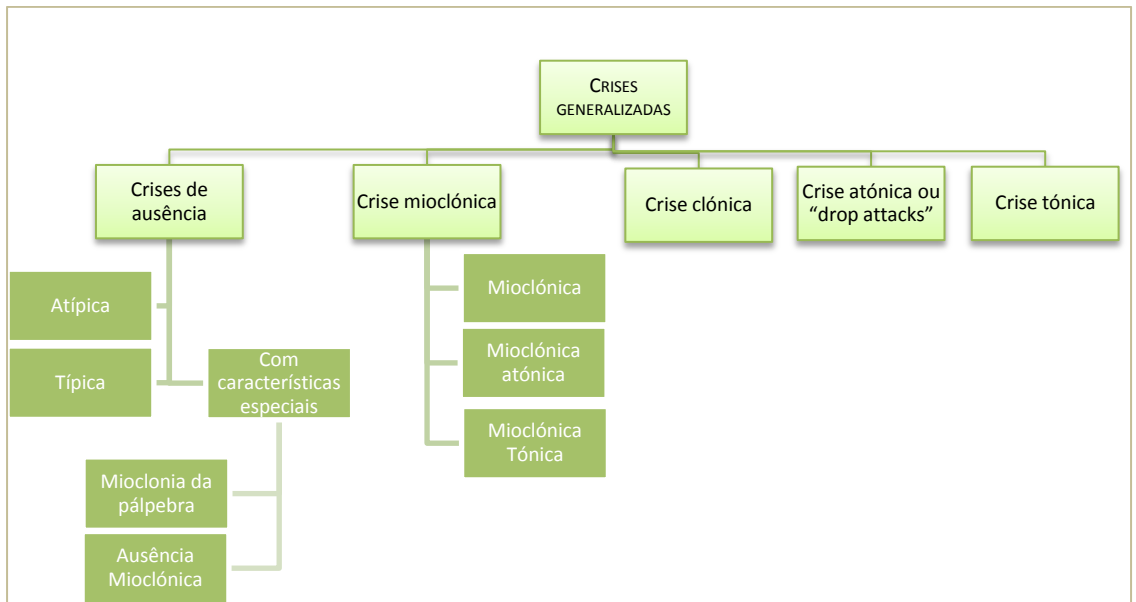


Figura 1. Classificação das crises generalizadas segundo a ILAE (Epilepsy 2010).

2. CONTROLO DOS EPISÓDIOS EPILÉPTICOS

O controlo das crises epiléticas é efectuado terapêuticamente com recurso aos agentes antiepiléticos. Um fármaco antiepilético ideal é aquele que permite suprimir completamente as convulsões em doses que não provoquem simultaneamente sedação ou qualquer outro tipo de acção tóxica sobre o Sistema Nervoso Central (SNC). Deve ser bem tolerado, altamente eficiente nos diferentes tipos de episódios e os seus efeitos laterais não devem ocorrer em órgãos vitais. Após administração parenteral, a sua acção deve ser rápida de forma a controlar as convulsões. Por outro lado, deve possuir uma longa duração de acção após administração oral, de modo a prevenir episódios recorrentes (Lemke 2008).

O conceito de concentração plasmática de um fármaco antiepilético correlaciona-se melhor com os efeitos clínicos do que com a sua dose diária (tanto em termos de eficácia como de toxicidade), falando-se então de *intervalo terapêutico*. Segundo este conceito, já em desuso, os níveis sanguíneos do fármaco são atingidos, sendo mantidos nesse intervalo durante o tratamento continuado. Actualmente, o controlo dos episódios de epilepsia, bem como os sinais de toxicidade observados, podem variar entre os pacientes. Isto é, para os mesmos níveis sanguíneos, dependendo do tipo e severidade dos episódios e da síndrome epilética, a maioria dos pacientes está adequadamente controlada com concentrações subterapêuticas dos fármacos, não havendo necessidade de aumento da dose. Por outro lado, pacientes com síndromes epiléticas que precisam de doses mais altas de antiepiléticos para controlo dos episódios, podem tolerar concentrações sobreterapêuticas sem que se verifiquem sinais de toxicidade. Assim, o intervalo óptimo de concentração é considerado o intervalo de concentrações para o qual a maioria dos pacientes atinge o efeito farmacodinâmico desejado com um mínimo de efeitos secundários (Striano 2008).

2.1. Evolução dos antiepilépticos

O primeiro medicamento antiepiléptico utilizado foi o brometo de potássio, introduzido por Locock em 1857, sendo actualmente considerado obsoleto. Posteriormente foram introduzidos o fenobarbital, em 1912, e a fenitoína, em 1938, que é estruturalmente relacionada com os barbitúricos. O tratamento das convulsões usando todos estes fármacos constituiu um importante avanço na terapia clínica (Laurence 1997; Lemke 2008). Mais tarde, fenobarbital, primidona, benzodiazepinas, etosuxinamida, sulfonamida e valproato passaram a ser considerados os anticonvulsivantes de primeira geração (Stefan 2007). Apesar de terem a vantagem da familiaridade e de também se demonstrarem eficazes, muitos pacientes mostraram convulsões refractárias bem como efeitos adversos intoleráveis (LaRoche 2004).

A partir de 1993, surgiram oito novos medicamentos aprovados pela *Food and Drug Administration* (FDA) nos Estados Unidos, expandindo desta forma as opções de tratamento. Estes novos medicamentos antiepilépticos oferecem a vantagem de possuir escassas interações medicamentosas, um mecanismo de acção único e um amplo espectro de actividade (LaRoche 2004).

Desde então, têm vindo a ser descobertos cada vez mais fármacos, continuando no entanto a fenitoína a ser um medicamento de eleição no tratamento da maioria das epilepsias.

A procura de compostos antiepilépticos com uma actividade selectiva crescente e baixa toxicidade continua a ser uma promissora área de investigação em química biomédica.

2.2. Classificação – características químicas

Os fármacos antiepilépticos são um grupo de substâncias com diversas propriedades químicas, tais como lipofilicidade, ionização e quiralidade. Têm diferentes estruturas químicas e podem afectar diferentes proteínas alvo (receptores, enzimas, transportadores ou canais iónicos dependentes da voltagem). A maioria dos fármacos antiepilépticos tem estruturas em comum várias moléculas alvo, como neurotransmissores endógenos (receptores, enzimas); por exemplo, a pregabalina e a gabapentina estão estruturalmente relacionadas com o neurotransmissor GABA (Landmark 2008).

Existem diferentes classificações que categorizam este tipo de fármacos. A tabela 1 apresenta a classificação mais utilizada, classificação esta que tem em conta a estrutura química dos compostos (Malawska 2005; Infarmed 2010).

Tabela 1. Classificação dos antiepilépticos, via de administração e concentrações terapêuticas encontradas no plasma (Baselt 2004; Malawska 2005; Uges 2009; Infarmed 2010)

CLASSE	EXEMPLOS DO GRUPO	VIA DE ADMINISTRAÇÃO	DOSE DIÁRIA (mg/mL)	CONCENTRAÇÕES TERAPÊUTICAS EM PLASMA (µg/mL)
Fenitoínas	Fenitoína	Via oral	300-400	8-20 (em adultos) 6-14 (em crianças)
Barbitúricos	Fenobarbital Primidona	Via oral, parentérica (intra- muscular ou intravenosa)	60-200 250-1500	2-30 (40)* 5-12
Iminostilbenos	Carbamazepina, Oxcarbazepina	Via oral Via oral	200-1600 1200-1400	4-15 12-35
Succinimidas	Etosuximida	-	1000	4-100
Ácido valpróico/valproato de sódio, Oxazolidimedionas	Ácido valpróico Trimetadiona	Via oral parentérica (intravenosa) -	250-2500 --	50-100 (150) 20-40
Benzodiazepinas	Diazepam Clonazepam	Via oral, parentérica ou rectal – diazepam. Via oral – clonazepam	2-40 1,5-20	0,25-0,5 0,02-0,07
Outros	Gabapentina, Lamotrigina, Vigabatrina, Acetozolamida, Felbamato	Via oral	900-1800 100-700 250-500 250-1000 1200-1600	2-20 2-15 (1) 5-25 10-20 30-60

* Normalmente entre 2-30 µg/mL, mas alguns autores ou clínicos ampliam esta gama até aos 40 µg/mL.

(-) não detectado

2.3. Mecanismo de acção dos antiepilépticos

A maior parte dos fármacos antiepilépticos exerce pouco efeito sobre o foco epiléptico em si; ao invés, impedem a propagação da descarga eléctrica às estruturas normais vizinhas (Flórez 1997).

Os iões sódio e cloro estão presentes em maior concentração fora da célula, enquanto o ião potássio, catiões orgânicos e proteínas carregadas estão em maior número dentro da célula. Como a membrana celular é permeável apenas a pequenos iões ou proteínas, as membranas do neurónio mantêm uma

separação de cargas, que variam entre os -50 mV e os -80 mV, resultando no chamado potencial de repouso.

Um aumento na negatividade no interior celular (hiperpolarização) diminui o potencial de repouso (para -90 mV). Por outro lado, a negatividade interior (despolarização) é suficiente para alcançar o limiar (aproximadamente -40 mV) (Lemke 2008).

Depois de cada despolarização, os canais de sódio dependentes da voltagem, adoptam um estado inactivo e permanecem refractários a uma nova abertura durante um determinado período de tempo. Enquanto estes canais estão impedidos de reabrir, descargas sucessivas estão diminuídas e a difusão da actividade eléctrica para regiões adjacentes do cérebro é suprimida. A estabilização e prolongamento deste estado inactivo parece ser o mecanismo de acção primário da fenitoína, carbamazepina e lamotrigina, sendo também o mecanismo de acção antiepiléptica do fenobarbital, oxcarbazepina, valproato, topiramato e zonisamida. Alguns medicamentos antiepilépticos aumentam a inibição mediada pelo GABA (neurotransmissor inibitório) ou afectam a sua concentração. O GABA liga-se a dois tipos de receptor, o GABA_A e o GABA_B. O receptor GABA_A está presente nos canais iónicos cloreto e a ligação do neurotransmissor provoca um influxo de iões cloro e consequente hiperpolarização neuronal. As benzodiazepinas, barbitúricos e talvez o topiramato acentuem a acção do GABA neste receptor. A tiagabina diminui a reabsorção do GABA e a gabapentina parece diminuir o seu metabolismo (Lemke 2008).

O glutamato, neurotransmissor ionotrópico, provoca neurotransmissão excitatória através de três tipos de receptor: NMDA (N-metil-D-aspartato), AMPA (α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol-propionato) e KA (kainato) (Mc Namara 1996).

A activação destes receptores por ligandos abre os canais celulares, promovendo o influxo de cálcio e o efluxo de potássio, facilitando deste modo a

despolarização. O bloqueio do receptor NMDA pelo felbamato ou do receptor AMPA/KA pelo fenobarbital e topiramato inibem a despolarização (Lemke 2008).

Os antiepilépticos podem ser classificados em quatro categorias, segundo o seu mecanismo de acção:

- 1) Aqueles cuja principal acção está relacionada com a inibição das descargas repetidas continuadas, por bloqueio dos canais de sódio ou cálcio dependentes de voltagem e consequente inibição da libertação dos neurotransmissores excitatórios. Neste grupo incluem-se a fenitoína, a carbamazepina, a oxcarbazepina. Estes compostos são efectivos contra as crises epilépticas generalizadas (tónico-clónicas) ou parciais;
- 2) Aqueles que acentuam a transmissão GABAérgica, onde se incluem as benzodiazepinas, os barbitúricos, a vigabatrina e a tiagabina;
- 3) Aqueles que estabilizam os neurónios talâmicos através da inibição dos canais de cálcio do tipo T, onde se inclui a etosuximida;
- 4) Aqueles que reduzem eventos mediados por aminoácidos excitatórios. Nesta categoria são incluídos o felbamato, o fenobarbital e o topiramato (Malawska 2005; Piotr Czapinski 2005).

A Figura 2 resume os principais mecanismos de acção dos antiepilépticos.

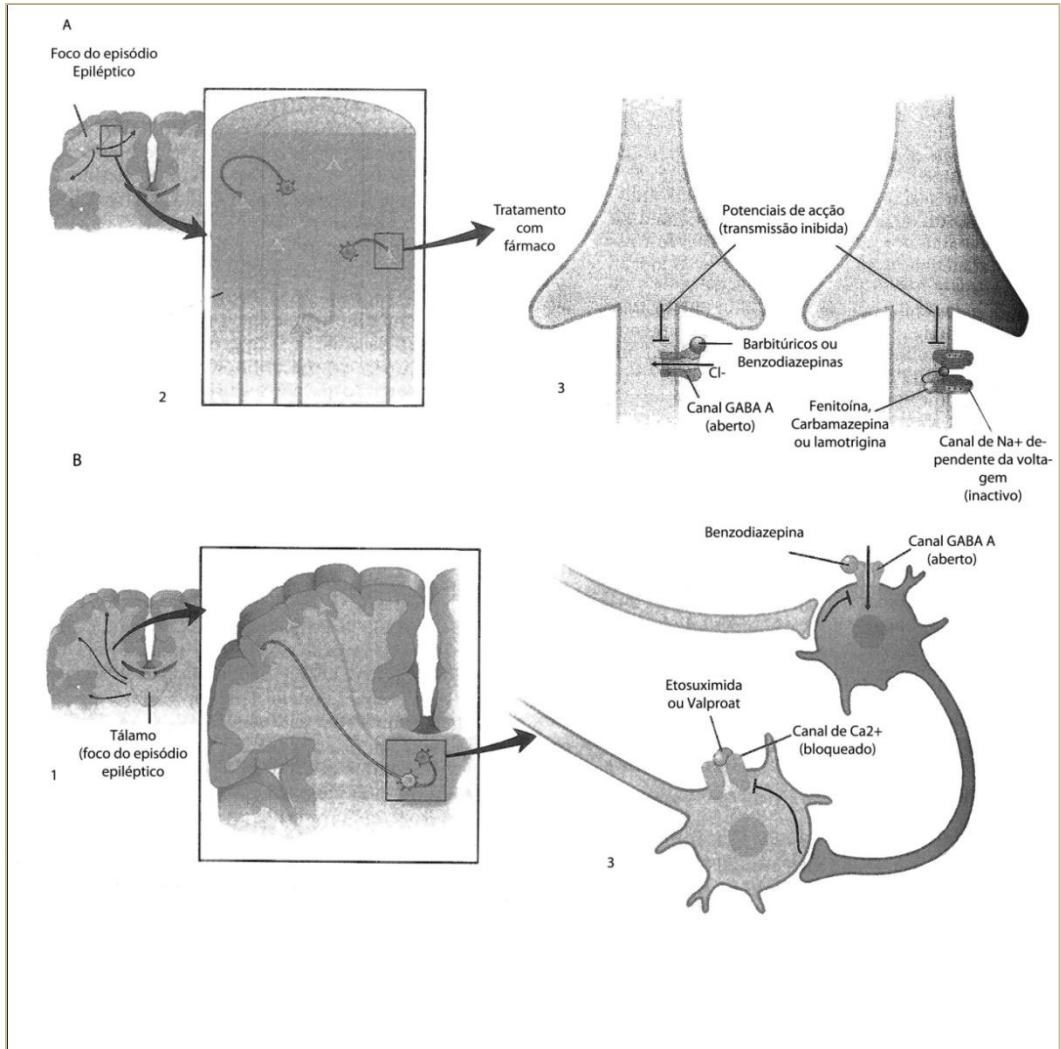


Figura 2. Principais mecanismos de acção dos antiepiléticos (Lemke 2008).

Os antiepiléticos produzem uma grande variedade de efeitos directos, indirectos e compensatórios, situação que faz com que seja difícil saber com segurança qual deles é o responsável pela sua acção antiepilética. Este tipo de fármaco tem provavelmente mais do que um mecanismo de acção, podendo contribuir cada qual para a eficácia terapêutica (Flórez 1997; Landmark 2008)

Os fármacos antiepilépticos são um grupo heterogéneo de compostos, sendo também utilizados hoje em dia para o tratamento de várias desordens psiquiátricas e neurológicas (LandMark 2006).

Apresentam-se de seguida as características físico-químicas, farmacocinética, mecanismo de acção, intoxicações e sinais de intoxicação, diagnóstico de intoxicação e respectivo tratamento, caso exista, dos fármacos que fizeram parte deste estudo.

2.4. Carbamazepina

Este fármaco foi sintetizado a princípios da década de 50, e tem sido considerado um medicamento efectivo e bem tolerado no tratamento de vários tipos de alterações convulsivas, incluindo crises generalizadas tónico-clónicas, simples parciais ou convulsões parciais complexas (Gil 2005).

2.4.1. Características físico-químicas

É um antiepiléptico que pertence ao grupo dos iminostilbenos (composto químico com a estrutura de uma amina secundária tricíclica) e relaciona-se estruturalmente com a fenitoína (Figura 3).

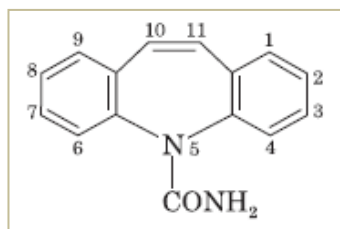


Figura 3. Estrutura química da carbamazepina

Apresenta-se sob a forma de cristal de cor branca amarelada. Quase sem cheiro e pouco amarga. É praticamente insolúvel em água, éter, mas é solúvel em acetona, álcool, tetracloreto de carbono, clorofórmio, dimetilformamida e propileno glicol (CCOHS 1996). O seu pKa é de 7.

Quanto à estabilidade, é necessário armazená-la abaixo dos 40°C (preferencialmente entre os 15 e os 30°C e protegido da luz) (CCOHS 1996).

2.4.2. Farmacocinética

A absorção da carbamazepina pelo tracto gastrointestinal é feita lentamente e com grande variabilidade individual sendo mais rápida com o estômago cheio e mais lenta em comprimidos do que em solução.

A concentração plasmática máxima alcança-se entre as 4 e as 12 horas após administração oral. Contudo, pode demorar até 24h após administração de uma dose elevada.

A carbamazepina une-se às proteínas plasmáticas em 75%, sendo metabolizada extensivamente no fígado a 10,11-epoxi-carbamazepina e posteriormente a 10,11-diol-carbamazepina. A formação do primeiro metabolito é mediada via CYP3A4 numa primeira instância, com alguma participação da CYP2C8, enquanto o seu metabolismo é efectuado pela epóxido hidrolase. A 10,11-epoxi-carbamazepina, um dos oito metabolitos resultantes da biotransformação da carbamazepina, é tão activo como o composto original. Este metabolito fixa-se às proteínas numa extensão de 50%, acumula-se no plasma e tem actividade anticonvulsivante, sendo também responsável pela maior parte dos efeitos secundários associados à terapêutica. As suas concentrações no plasma podem

chegar a ser 50% da concentração da carbamazepina (CCOHS 1996; Gil 2005; Majkowski 2005; Striano 2008).

Uma parte importante da avaliação dos pacientes é determinar quantitativamente os níveis plasmáticos de carbamazepina e de 10,11-epoxi-carbamazepina. Usando a relação de carbamazepina e do metabolito, pode obter-se um índice que reflecte a rapidez de absorção gastrointestinal da carbamazepina. Assim, por exemplo no caso de se observar uma deterioração súbita no estado de saúde dos pacientes, este episódio poderá dever-se a um aumento agudo da absorção, que pode ocorrer até 48 horas após a ingestão inicial (CCOHS 1996; Gil 2005).

As concentrações plasmáticas terapêuticas variam de 4 a 12 µg/mL (em adultos) (Uges 2009), podendo decorrer um mês até que se atinja uma concentração terapêutica estável para o efeito antiepiléptico desejado, devido à indução das enzimas metabolizadoras hepáticas.

A carbamazepina e os seus metabolitos são eliminados pela urina. Após administração oral, 72% da dose é excretada na urina e 28% nas fezes. A fracção de carbamazepina que não se fixa às proteínas é filtrada no glomérulo e praticamente toda reabsorvida. Apenas 3% é excretada de forma inalterada através da urina. A sua semi-vida de eliminação é de 18-65 horas para os adultos e de 8-19 horas para as crianças (CCOHS 1996; Baselt 2004; Gil 2005).

2.4.3. Mecanismo de acção

Quanto ao mecanismo de acção, a carbamazepina inibe a entrada de sódio por bloqueio selectivo das descargas de alta frequência. É mais eficaz nas convulsões que se iniciam no sistema límbico do que naquelas que se iniciam no córtex. Afecta mais os neurónios “normais” que propagam a descarga do que os neurónios do foco epiléptico, e por sua vez inibe as descargas paroxísticas mais

do que a transmissão fisiológica. Por este motivo, não interfere com as funções cognitivas nem tem acção sedante. Em doses elevadas, é possível que a sua acção pré-sináptica reduza a entrada de cálcio e iniba a libertação de neurotransmissores. É o tratamento de primeira linha para as crises epiléticas parciais e generalizadas primárias, mas é ineficaz e pode ter efeito exacerbado nas ausências típicas e mioclónicas (Schachter 2007).

2.4.4. Intoxicação por carbamazepina

A maioria dos casos descritos por intoxicação aguda são voluntários, sendo que a intoxicação propriamente dita não é, por si só, grave. Mesmo após ingestão de doses elevadas, os pacientes recuperam geralmente em 48h, excepto se ocorrerem complicações de outra natureza. Nos casos descritos de evolução fatal é costume aparecerem complicações respiratórias, sendo a mais frequente a insuficiência respiratória aguda por aspiração do conteúdo gástrico (CCOHS 1996; Baselt 2004).

2.4.5. Sinais/Diagnóstico de uma intoxicação

Para concentrações plasmáticas acima do limite superior dos níveis terapêuticos (12 mg/L) e a par com os efeitos no SNC, observam-se irritação gastrointestinal, propriedades arritmogénicas e acção anti-diurética, por redução das concentrações da hormona anti-diurética no plasma.

O diagnóstico diferencial da intoxicação por este fármaco não é fácil, já que o quadro clínico inicial pode ser similar a intoxicações por fármacos hipnótico-sedantes, anticolinérgicos e/ou outros anticolvulsivantes. Em pacientes em tratamento com carbamazepina para um quadro convulsivo é difícil distinguir entre uma exacerbação da sua doença de base e um quadro tóxico por sobredosagem. O diagnóstico definitivo de uma intoxicação demonstra-se

através da quantificação dos níveis elevados de carbamazepina e do seu metabolito 10,11-epoxi-carbamazepina no soro (CCOHS 1996).

2.4.6. Tratamento

O método mais eficaz para diminuir a absorção da carbamazepina é a lavagem gástrica com prévia protecção da via aérea, para evitar a possibilidade de aspiração do conteúdo gástrico. De seguida administra-se carvão activado por sonda nasogástrica até estabilização dos níveis plasmáticos na gama terapêutica. O intoxicado deverá ficar sob observação até que os níveis de carbamazepina se encontrem dentro dos limites terapêuticos e se tenha eliminado a possibilidade de acumulação.

Uma diurese forçada não tem utilidade devido à baixa hidrossolubilidade e à grande fixação às proteínas plasmáticas. A diálise peritoneal também é ineficaz para eliminar quantidades importantes do fármaco ou seus metabolitos. A hemodiálise também não ajuda à sua eliminação (Gil 2005).

Deve efectuar-se uma monitorização electrocardiográfica contínua para a detecção de problemas cardíacos, nomeadamente arritmias (CCOHS 1996; Flórez 1997).

2.5. Fenitoína

A fenitoína foi sintetizada em 1908 por Bilz, mas a sua actividade anticonvulsivante não foi descoberta até 1938. Desde então, é o fármaco mais utilizado no tratamento das convulsões, estando indicado para as crises tónico-clónicas generalizadas, crises parciais, convulsões focais, e nevralgia do trigémio (Gil 2005).

2.5.1. Características físico-químicas

Apesar de estar quimicamente relacionada com os barbitúricos, não pertence a essa classe de fármacos. É um antiepiléptico derivado das fenitoínas (compostos orgânicos heterocíclicos, que possuem grupos carbonilos nas posições 2 e 4 do anel – Figura 4). A fenitoína tem dois grupos fenílicos no carbono 5 da molécula.

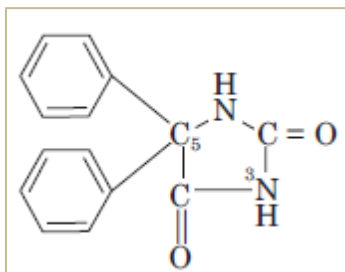


Figura 4. Estrutura química da fenitoína

É um composto branco que pode apresentar-se sob a forma de pó ou cristal. É muito pouco solúvel em água, em clorofórmio e éter, sendo solúvel 1:60 (v:v) em etanol.

Deve ser armazenada a 20 °C de maneira a mantê-la na forma anidra, sendo que desta forma é estável por um período até cinco anos.

Trata-se de um ácido fraco, com um pKa de 8,3 e é solúvel apenas em meio alcalino. As formas solúveis precipitam em meio ácido, mas podem ser diluídas em soro fisiológico (pH 5) (CCOHS 1996; Baselt 2004; Gil 2005)

2.5.2. Farmacocinética

Os efeitos anticonvulsivantes da fenitoína conseguem-se com níveis plasmáticos de 10-20 µg/mL, que são alcançados 45-60 minutos após a administração intravenosa de uma dose entre 15-20 mg/Kg (Gil 2005).

Como a fenitoína é solúvel em meio alcalino, a sua absorção no meio ácido do estômago é muito baixa, sendo principalmente absorvida no duodeno. Os níveis máximos são alcançados 2 a 8 horas após a administração de uma dose oral.

A maior parte (90%) da fenitoína absorvida liga-se às proteínas plasmáticas, principalmente albumina. No entanto, esta percentagem pode ser muito variável, pelo que se observa uma grande variabilidade interindividual nas concentrações plasmáticas de fármaco livre. O volume de distribuição é de 0,6 L/Kg, e uma vez absorvida encontra-se em grande parte na forma não ionizada. É um composto, muito lipossolúvel, pelo que se difunde facilmente por todos os tecidos, incluindo o SNC.

Sofre extensos processos de biotransformação, com cerca de 90% da dose a sofrer metabolização ao nível do sistema microsomal hepático. O principal metabolito é inactivo, a 5-(4-hidroxifenil)-5-fenil-hidantoína. Esta *p*-hidroxilação da fenitoína é realizada pela isoforma P450 2C9 do citocromo P450. Esta enzima é também responsável pela hidroxilação da warfarina, o que explica a interacção que existe entre ambos os compostos. Os metabolitos sofrem um processo de conjugação com o ácido glucurónico, o que lhes permite adquirir maior hidrossolubilidade, para serem excretados pela bÍlis e posteriormente pela urina.

Existe uma grande variabilidade genética na taxa de metabolização deste fármaco. Geralmente as crianças metabolizam-no mais rapidamente, pelo que a sua vida média neste grupo etário é mais curta que no dos adultos, em que a vida média é de 22 horas, podendo variar entre as 4h e os vários dias. As causas para tal variação podem dever-se a disfunção hepática, indução enzimática ou factores genéticos. Quando os níveis séricos da fenitoína se aproximam de valores tóxicos a sua vida média aumenta, o que se deve ao facto do mecanismo de eliminação da fenitoína sofrer alterações.

É principalmente eliminada na urina sob a forma do seu metabolito hidroxilado (23 a 70%), livre ou na forma conjugada (5%). Cerca de 4% são eliminadas de

forma inalterada na urina e 5% nas fezes. Pequenas quantidades são excretadas também no leite materno (CCOHS 1996; Baselt 2004).

2.5.3. Mecanismo de acção

Liga-se a locais específicos dos canais de sódio dependentes da voltagem e considera-se que exerce o seu efeito anticonvulsivante por bloqueio selectivo das descargas de alta frequência. A fenitoína estabiliza membranas, protegendo as bombas de sódio situadas no cérebro e no coração. Restabelece também o equilíbrio iónico provocado por um excesso de despolarização. A altas concentrações inibe tanto a entrada de cálcio durante a fase de despolarização como a sua mobilização intracelular, interferindo com os sistemas dependentes da calmodulina e nucleótidos cíclicos e inibindo a libertação de neurotransmissores excitatórios e inibitórios. Também prolonga o período refractário efectivo relativamente à duração do potencial de acção (Flórez 1997; Gil 2005).

2.5.4. Intoxicação por fenitoína

A intoxicação é considerada grave para doses acima dos 90 µg/Kg, originando depressão respiratória e coma. De uma forma geral, os pacientes recuperam completamente, excepto nos casos em que tenha havido complicações secundárias à hipoxia (Gil 2005).

2.5.5. Sinais/ Diagnóstico de uma intoxicação

O quadro clínico de uma intoxicação aguda ou crónica é similar. Inicialmente, a fenitoína afecta as funções vestibular e do cerebello, mas com o aumento da concentração a função cerebral fica comprometida. Para concentrações entre 20

e 40 µg/mL a intoxicação é considerada leve, podendo observar-se sintomas como tonturas, visão turva, diplopia e náuseas; por outro lado, pode ocorrer também ataxia, tremor, letargia, vômitos, dificuldade em falar e nistagmo. Para níveis mais altos observa-se confusão, alucinações, comportamento psicótico, progredindo até à depressão do SNC.

No diagnóstico diferencial da intoxicação por fenitoína deve ter-se em conta a possibilidade de intoxicação por outras substâncias, tais como fármacos hipnótico-sedantes, anticonvulsivantes, neurolépticos e outras substâncias depressoras do SNC. Devem também ter-se em consideração quadros clínicos como sépsis, infecções do SNC, tumores e traumatismos, entre outros, já que podem comprometer o adequado diagnóstico de intoxicação por fenitoína (CCOHS 1996; Flórez 1997).

2.5.6. Tratamento

Em pacientes intoxicados com fenitoína deve ter-se em especial atenção a situação respiratória, devendo ser entubados em caso hipóxia ou se há risco de broncoaspiração. Deve ter-se igualmente em conta a função cardíaca. Por outro lado, se houver diminuição do estado de consciência deve administrar-se glicose a 50%, tiamina e naloxona.

A descontaminação gastrointestinal inclui lavagem gástrica e administração de carvão activado. Como a fenitoína sofre processos de circulação enterohepática, a administração de doses múltiplas de carvão activado aumentará a taxa de eliminação.

Por outro lado, como a fenitoína tem um elevado grau de união a proteínas plasmáticas e se metaboliza a nível hepático, os processos de diurese forçada, hemodiálise e hemoperfusão não têm qualquer utilidade (CCOHS 1996; Gil 2005).

2.6. Fenobarbital

Este composto (Figura 5) pertence à família dos barbitúricos. Tem acção prolongada, e é utilizado actualmente de forma quase exclusiva como anticonvulsivo. Possui actividade sedante, hipnótica e anestésica, mas com a particularidade da sua actividade antiepiléptica ser acompanhada de um grau clinicamente tolerável de sedação ou sono, o que o diferencia de outros barbitúricos em que não é possível separar a actividade antiepiléptica da sedante e hipnótica (CCOHS 1996; Mc Namara 1996).

É eficaz nas convulsões tónico-clónicas generalizadas e nas crises parciais, convulsões febris e em alguns casos de mioclonias. Não é eficaz em ausências típicas (Bradley 2004).

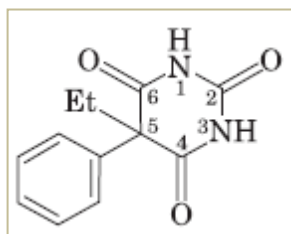


Figura 5. Estrutura química do fenobarbital

2.6.1. Características físico-químicas

É um pó cristalino branco ou um cristal transparente, ligeiramente solúvel em água, álcool e éter. Forma derivados solúveis em água por reacção com compostos alcalinos, como carbonatos e amónia (Nadendla 2005).

2.6.2. Farmacocinética

A sua absorção oral é lenta, mas quase completa, com uma biodisponibilidade oral de 80-100%. Liga-se moderadamente às proteínas (40 a 60%) e possui um tempo de meia vida plasmático entre 2 e 6 dias, o que leva a que as suas concentrações plasmáticas sejam extremamente estáveis.

É um potente indutor da enzima hepática CYP3A4, aumentando a capacidade do fígado em metabolizar muitos fármacos. Também induz as UGT, UDP-glucuronosiltransferase (enzimas catalisadoras da reacção de conjugação) e aumenta a formação de conjugados glucurónicos.

Devido ao seu efeito indutor sobre as enzimas hepáticas, o fenobarbital tem muitas interacções com outros fármacos; por exemplo, diminui os níveis plasmáticos de carbamazepina, valproato e warfarina, entre outros (Lemke 2008).

O intervalo terapêutico de níveis séricos é de 15 a 25 mg/L, mas há pacientes que respondem a 10 mg/L e casos resistentes que requerem concentrações superiores (35 mg/L). No início de um tratamento pode observar-se sonolência para concentrações de 25 mg/L, sobretudo se foi iniciado bruscamente, enquanto num tratamento crónico são aceites níveis entre os 40-50 mg/L sem aparentes efeitos secundários. Concentrações de 100 mg/L podem produzir depressão respiratória e coma em pacientes aos quais nunca foi administrado fenobarbital (Flórez 1997).

É um ácido fraco (pKa 7,4) e lipofílico, pelo que se distribui bem a nível central (Lemke 2008).

Aproximadamente 25 a 50% de uma dose de fenobarbital é excretada de forma inalterada por via urinária. O restante é metabolizado primeiramente por hidroxilação para originar o seu metabolito inactivo, o ácido 5-p-hidroxifenil-5-etilbarbitúrico, que é então conjugado com o glutatião ou com o sulfato de forma a

tornar a molécula mais polar e hidrofílica, podendo assim ser excretado na urina. Alguns dos metabolitos conjugados podem aparecer nas fezes, provindo do ciclo enterohepático (Flórez 1997; Lemke 2008).

2.6.3. Mecanismo de acção

O mecanismo de acção nos episódios de epilepsia é desconhecido, mas parece envolver o bloqueio dos canais de sódio e a intensificação da transmissão inibitória mediada pelo GABA (Mc Namara 1996).

2.6.4. Intoxicação por fenobarbital

Em doses muito altas, provoca sedação intensa e ataxia. A nível crónico é aparentemente bem tolerado, mas produz numerosos efeitos secundários, tais como alterações cognitivas e atraso psicomotor, que costumam passar despercebidos especialmente quando acompanhados de sonolência. Pode provocar excitação em crianças (Flórez 1997).

2.6.5. Sinais/ Diagnóstico de uma intoxicação

Em doses altas afecta o SNC, produzindo sedação, sonolência, incapacidade de concentração e atrasos na resposta, o que no caso de crianças em idade escolar pode ser responsável por um fraco rendimento, e no adulto pode repercutir-se na sua vida profissional. Também pode produzir hiperexcitabilidade e depressão. Doses muito altas provocam sedação intensa e ataxia (Flórez 1997).

A administração de barbitúricos tem vindo a ser associada a um número significativo de mortes. Clinicamente, doses excessivas de fenobarbital produzem numa primeira fase ataxia, nistagmos, descoordenação e sono

incontrolável. Com o aumento dos níveis séricos, estes efeitos progridem para coma. A morte está relacionada com depressão da função cardio-respiratória. Os pacientes não habituados a tratamento com este fármaco são mais sensíveis aos seus efeitos, mas concentrações acima dos 70 µg/mL produzem coma na maioria dos indivíduos, incluindo os que se encontram em terapia de longa duração (Shorvon 2004).

2.6.6. Tratamento

Em caso de overdose, a terapia inclui a manutenção das funções vitais com ventilação assistida, bem como a promoção da eliminação do fenobarbital por alcalinização e diurese forçada. A administração de carvão activado e de resinas de troca iónica também têm vindo a ser utilizados (Shorvon 2004).

2.7. Primidona

A primidona (Figura 6) é um derivado do fenobarbital que é usado para o tratamento inicial, mas também juntamente com outros medicamentos para o tratamento de epilepsias parciais simples, parciais complexas e tónico-clónicas. É menos efectiva neste tipo de epilepsias do que outros fármacos antiepilépticos como a carbamazepina ou a fenitoína. Partilha a acção antiepiléptica e sedativa do fenobarbital.

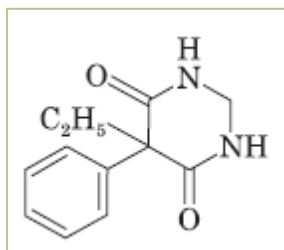


Figura 6. Estrutura química da primidona

2.7.1. Características físico-químicas

É um pó cristalino branco ou quase branco, ligeiramente solúvel em água, álcool e praticamente insolúvel em éter (Nadendla 2005). O seu pKa é de 13 (Baselt 2004)

2.7.2. Farmacocinética

A primidona é totalmente absorvida por via oral (biodisponibilidade de 100%) e metabolizada lentamente pelo fígado, originando primeiramente o fenobarbital e posteriormente a feniletilmalonamida (PEMA) por hidroxilação (Baselt 2004). Estas três moléculas têm efeito antiepiléptico, mas a PEMA parece ser um metabolito mais fraco e mais tóxico. Em humanos, o seu efeito antiepiléptico deve-se à soma dos três compostos, mas principalmente ao fenobarbital.

O pico dos níveis plasmáticos para a primidona é alcançado em aproximadamente 4 horas após administração oral, com um tempo de meia vida de 10 a 12 horas. Liga-se fracamente às proteínas plasmáticas (<30%) e a sua concentração no cérebro, líquido cefalorraquidiano (LCR), saliva e leite é similar à plasmática (70-100%).

Aproximadamente 15 a 25% da dose oral são excretados na urina de forma inalterada, entre 15 a 25% são transformados em a fenobarbital e entre 50 a 70% são excretados como PEMA (o tempo de meia vida é de 24-48 horas). O fenobarbital (metabolito) pode ser excretado na urina de forma inalterada, como o seu metabolito *p*-hidroxi ou como conjugados glucurónicos ou sulfatos (Flórez 1997; Shorvon 2004; Lemke 2008).

2.7.3. Mecanismo de acção

O mecanismo de acção da primidona não é de fácil estudo, devido à sua rápida conversão a fenobarbital (um dos seus metabolitos activos). Estudos em animais, sugerem que uma única dose deste fármaco protege contra episódios epilépticos induzidos, mesmo antes de serem detectados os metabolitos (Shorvon 2004).

2.7.4. Intoxicação por primidona

É difícil separar os efeitos secundários da terapia com primidona dos efeitos da terapia com fenobarbital. É sabido que a primidona partilha todos os efeitos secundários do fenobarbital, tanto nos adultos como nas crianças (Shorvon 2004).

2.7.5. Sinais/ Diagnóstico de uma intoxicação

Os efeitos secundários são muito pronunciados, destacando-se a sonolência, tonturas, ataxia, náuseas e vómitos que podem manifestar-se mesmo depois da administração de uma pequena dose inicial. Este episódio pode ser suficiente para a suspensão prematura do tratamento.

Em casos de overdose observa-se depressão do SNC, hipotonia, diminuição profunda dos reflexos dos tendões e cristalúria. Os sintomas de depressão do SNC parecem correlacionar-se melhor com os níveis de primidona no plasma e LCR do que com os níveis de metabolitos (Shorvon 2004).

2.7.6. Tratamento

Em casos de intoxicação é aconselhada a lavagem gástrica, e a realização de processos de diálise acelera a eliminação do composto (Flórez 1997; Shorvon 2004).

3. MÉTODOS DE PREPARAÇÃO DE AMOSTRAS

A análise de amostras biológicas por técnicas cromatográficas requer um tratamento prévio devido à complexidade das matrizes envolvidas, à sua incompatibilidade com os sistemas cromatográficos e ao facto de que muitas das substâncias a analisar se encontram em concentrações vestigiais (Queiroz SCN 2001; Moffat AC 2004).

O objectivo final de qualquer pré-tratamento da amostra é a obtenção do(s) composto(s) de interesse de forma a que possa(m) ser introduzido(s) e separado(s) por um com selectividade e sensibilidade adequadas (Wang 1997; Van Hout MWJ 2003).

De forma geral, a preparação da amostra permite aumentar a sensibilidade do método por concentração dos analitos no extracto obtido.

Os principais métodos descritos para o isolamento e concentração dos analitos em amostras biológicas são a extracção líquido-líquido (LLE), a extracção em fase sólida (SPE) e a microextracção em fase sólida (SPME) (E.Gallardo 2009).

Para a realização deste trabalho, optou-se pela extracção em fase sólida devido às características que esta técnica possui e que serão discutidas nos pontos seguintes.

3.1. A extracção em fase sólida – características

Tal como o nome indica, a extracção de fase sólida é uma técnica baseada na partição selectiva de um ou mais componentes entre duas fases, sendo uma delas um adsorvente sólido. A segunda fase é normalmente um líquido (por isso também denominada extracção sólido-líquido), mas também pode ser uma emulsão, um gás, ou um fluído supercrítico. Os compostos de interesse vão

preferencialmente ligar-se à fase sólida ou então podem ficar na segunda fase, a fase não sólida (McDonald 2001).

O objectivo da extracção de fase sólida é remover quantitativamente o analito da solução ou matriz em que se encontra e recuperá-lo totalmente num solvente apropriado (Thurman 1998) e compatível com os sistemas cromatográficos.

A SPE permite usar pequenas quantidades de amostra e de solvente, utilizando para o efeito colunas com pequenos volumes. O desenvolvimento desta técnica de preparação de amostras tem vindo a aumentar devido à sua versatilidade (isolamento e concentração dos analitos, remoção dos interferentes da matriz, utilização de diferentes suportes sólidos, troca de solventes) (Masqué 1998; Nishida M 2003), bem como pela sua aplicabilidade nas mais diversas áreas, tais como alimentar (Alzola 2009; Hayward 2010; Kamel 2010; Serra 2010), clínica (de Castro 2008; Concheiro 2010; Lim 2010; Martín 2010; van den Broek 2010; Wu 2010), meio ambiente (Hao 2010; Jiménez-Díaz 2010; Krupadam 2010; Momplaisir 2010; Qi 2010) e toxicologia (Margalho 2007; Barroso 2008; Barroso 2010; Cheong 2010), entre outros.

Esta técnica possui várias vantagens quando comparada com a LLE. Com efeito, trata-se de uma técnica mais rápida, selectiva, de fácil automatização, com elevadas recuperações do analito, que utiliza menores volumes de solventes orgânicos, com as repercussões que este facto acarreta tanto do ponto de vista económico como meio ambiental (Thurman 1998; Fritz JS 2000).

Com este tipo de extracção a amostra é concentrada na coluna, permitindo e resultados reprodutíveis para baixas concentrações de analito. É aplicável a uma vasta gama de compostos com alta selectividade (Telepchak 2004).

3.1.1. O processo de extracção em fase sólida

Num processo de SPE convencional a amostra deve estar num estado que facilite a adsorção do analito na coluna.

Após a retenção do analito na fase estacionária, ficando este isolado da matriz, os interferentes são eliminados da coluna por um processo de lavagem. Posteriormente, e por intermédio de um solvente orgânico, o composto de interesse é eluído selectivamente da coluna.

Na Figura 7 encontram-se resumidas as várias etapas do processo de SPE, bem como a importância de cada uma delas.

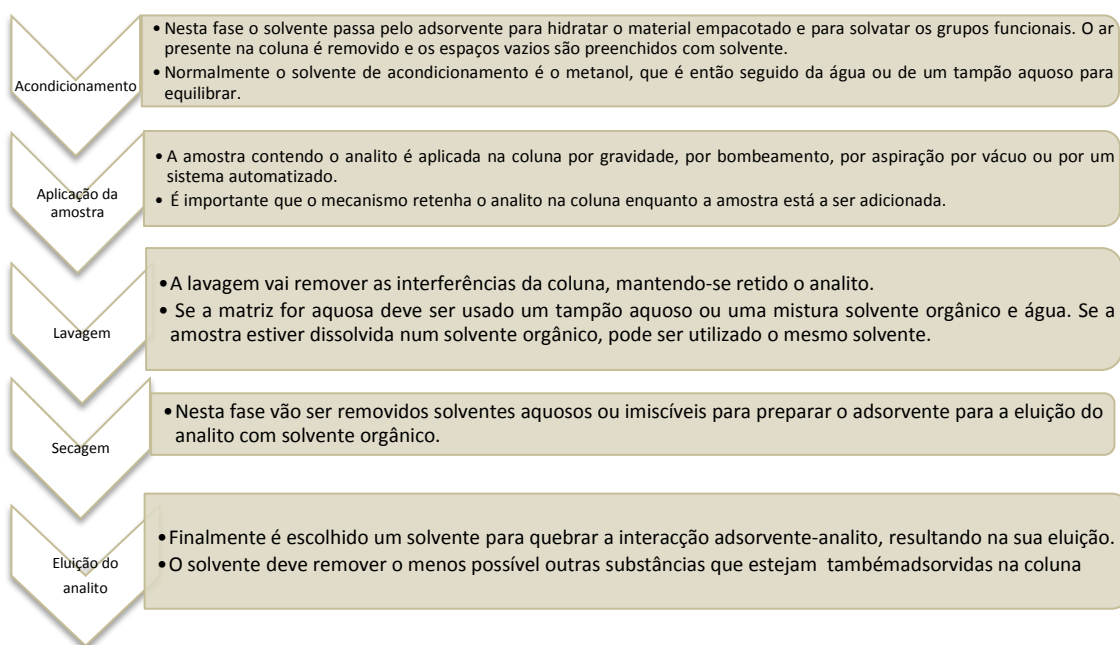


Figura 7. Etapas do processo de extracção em fase sólida (Thurman 1998; Telepchak 2004)

A SPE é uma técnica que se baseia nos mesmos princípios da cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). De facto, os materiais adsorventes usados na SPE são na maioria dos casos muito similares aos normalmente encontrados em colunas típicas de HPLC (Masqué N 1998; Queiroz SCN 2001).

A maioria dos adsorventes usados neste tipo de extração, é constituída por sílica. A sílica usada na maioria das aplicações cromatográficas e em procedimentos típicos de SPE, é um material sólido, amorfo e poroso.

A superfície química da sílica é dominada pela presença de grupos hidroxilo, normalmente denominados de silanol (Figura 8).

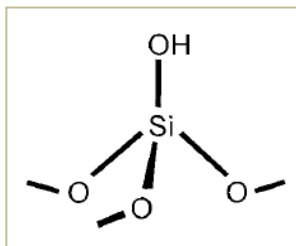


Figura 8. Silanol isolado

A sílica é um polímero inorgânico com uma fórmula estrutural geral $(\text{SiO}_2)_x$. A partir do seu processo de formação chega-se ao polímero desejado, controlando as condições experimentais, que determinam o tamanho da partícula, do poro e a área de superfície (Simpson 2000). Os grupos hidroxilo que aparecem à superfície encontram-se no final da cadeia do polímero e são os responsáveis pelas propriedades químicas associadas à sílica e também pelos pontos de união na ligação dos vários compostos à sílica (Simpson 2000; Telepchak 2004). Em algumas condições a polimerização deixa dois grupos hidroxilo no mesmo átomo de sílica (*geminal silanol* – Figura 9). Os átomos de sílica que têm ligado um único grupo hidroxilo são encontrados na superfície de dois tipos diferentes de estruturas.

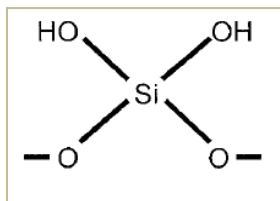


Figura 9. Silanol geminal

A primeira estrutura é um silanol isolado em que mais nenhum grupo hidroxilo se encontra na vizinhança, Figura 8. A outra possibilidade ocorre quando dois grupos hidroxilo estão ligados a átomos de sílica adjacentes de forma a facilitar a formação de pontes de hidrogénio, Figura 10.

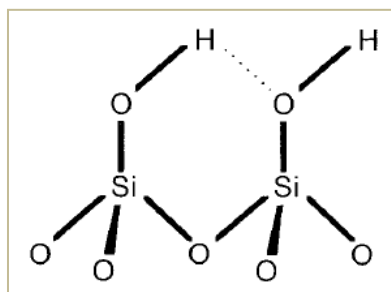


Figura 10. Silanol associado

Devido à natureza altamente polar da superfície, a sílica tem uma grande tendência para adsorver água, pelo que a estrutura completa da superfície é uma mistura complexa de grupos silanol isolados, geminais e associados, bem como uma quantidade variável de água adsorvida. A proporção exacta de cada um dos vários grupos silanol depende do método e condições do processo de polimerização (Simpson 2000).

Fazendo reagir a superfície da sílica com outras espécies químicas consegue-se, por exemplo, a selectividade desejada em SPE, num processo designado de *bonding*; é esta parte orgânica (R) que determina as propriedades do adsorvente para uma determinada extracção em SPE ou separação em HPLC. Deste modo, o material adsorvente pode ser hidrofóbico (R é constituído unicamente por grupos alquilo), hidrofílico (R contém grupos funcionais polares, tais como hidroxilo, cianeto ou amino) ou iónico (R contém ácido sulfónico, ácido carboxílico ou amino). Assim, entre as fases estacionárias apolares mais utilizadas destacam-se as octasilano (C_8), octadecilsilano (C_{18}), etilsilano (C_2), butilsilano (C_4), fenilsilano e ciclohexilsilano, sendo a C_{18} a fase mais popular.

No que diz respeito à SPE, os grupos silanol isolados, Figura 8, são de longe os responsáveis pela maior parte dos processos de adsorção, conseguindo reter fortemente compostos com grupos funcionais polares e fazer com que a sua eluição seja muito mais difícil. As bases, em particular, são mais fortemente retidas, já que o silanol é um grupo ácido e as interações ácido/base são similares às reacções de troca iónica. Enquanto, o número absoluto de grupos silanol que não reagem é um factor primário na determinação da retenção dos compostos, o tipo de silanol também tem um papel importante. Como a razão entre os grupos silanol isolados e associados varia com as diferentes origens, um material com poucos grupos isolados antes da modificação vai ver este número reduzido ainda mais, depois da ligação da fase orgânica e *endcapping*. Isto é conseguido com determinadas técnicas que asseguram que estes locais hidroxilo estejam 100% activados. Estas colunas tornam-se muito mais hidrofóbicas do que as *unendcapped* (Figura 11). (Simpson 2000; Telepchak 2004).

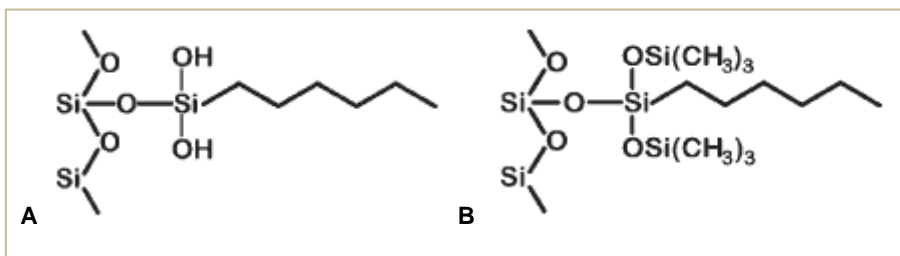


Figura 11. Estrutura de um local *unendcapped* (A) e *endcapped* (B). (Telepchak 2004)

3.1.2. Acondicionamento dos adsorventes de sílica

A presença de um material apropriado com uma densidade suficiente de fase orgânica ligada à superfície da sílica é o primeiro requisito para proporcionar um eficiente processo de SPE. Contudo, é necessário um tratamento adicional do material por parte do analista, de modo a obter maior eficiência de extração. O adsorvente deve ser previamente acondicionado ante da passagem da amostra, dado que, quando seco, o material com uma fase C_{18} ligada está orientado de forma completamente aleatória para a superfície. Se, nestas condições, o adsorvente é colocado em contacto com uma amostra completamente aquosa, a parte orgânica vai transformar-se numa molécula altamente polar, o que é incompatível com uma fase C_{18} ligada (seria como tentar misturar um

hidrocarboneto com água, o que seria impossível). O ambiente à volta da fase com hidrocarbonetos é polar, pelo que o grupo orgânico vai tentar minimizar a sua exposição ao meio que é altamente polar, Figura 12 A. Vão formar-se agregados entre os grupos ligados que estão perto uns dos outros. Nesta configuração, a superfície orgânica que está exposta ao soluto e que entra em contacto com o adsorvente é muito pequena. Esta configuração dos grupos orgânicos ligados irá diminuir enormemente a eficiência do processo de

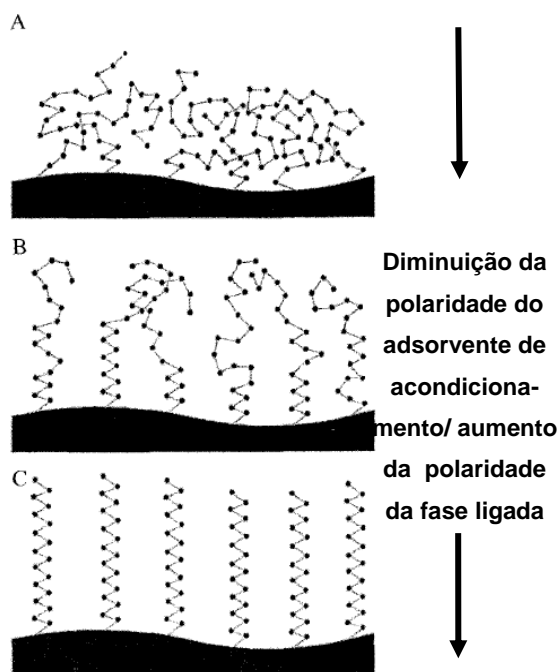


Figura 12. Três modelos para uma fase C_{18} ligada à sílica: (A) Sem acondicionamento, (B) Parcialmente acondicionada, (C) Completamente acondicionada (Simpson 2000)

extracção.

O passo de acondicionamento previamente ao contacto do adsorvente com a amostra é essencial. Com um meio com metanol a rodear a fase orgânica, a necessidade de minimizar a área de superfície com grupos apolares é menor e a configuração vai assemelhar-se mais com o observado em **B** da Figura 12. Nestas condições, o adsorvente está mais exposto à interacção com o soluto.

A extensão do acondicionamento é a combinação da polaridade do solvente de acondicionamento e do grupo orgânico ligado. A situação ideal (Figura 12 **C**) ocorre quando o adsorvente está completamente exposto, permitindo a interacção máxima entre o soluto e a fase orgânica ligada. Esta configuração pode resultar quando se utiliza um solvente de acondicionamento menos polar que o metanol, como o acetonitrilo ou até o tetrahidrofurano. Contudo, a miscibilidade em água é um requisito crítico do solvente de acondicionamento quando a amostra a aplicar é aquosa. Bons solventes de acondicionamento serão a acetona, o isopropanol e em alguns casos raros até o acetato de etilo, que limitam a miscibilidade em água e permitem a penetração da amostra na estrutura do poro (Simpson 2000).

Os compostos a analisar são retidos por interacções apolares de solventes polares ou ambientes da matriz, ligando-se por forças de dispersão/Van der Waals. A eluição ou ruptura das interacções apolares é conseguida através de solventes ou mistura de solventes com um carácter suficientemente apolar. Alguns solventes polares, tais como o acetonitrilo, têm características suficientemente apolares de forma a romper a ligação apolar e provocar a eluição do composto do adsorvente. O metanol também pode ser usado, mas remove igualmente muitas interferências (Telepchak 2004).

3.1.3. Escolha do eluente

O solvente de eluição deve ser escolhido tendo em conta a solubilidade dos analitos em estudo. Também deve possuir como característica o facto de ser compatível com o método cromatográfico de análise. Se for usada cromatografia líquida, o metanol ou a acetonitrilo serão uma boa escolha.

É necessário ter em consideração que uma boa eluição com um solvente orgânico necessita que a água tenha sido removida do adsorvente C_{18} . Para remover esta água, pode ser usado ar ou vácuo. Contudo, não é possível remover toda esta água. Com efeito, a água retida nos poros mais pequenos da coluna e aquela adsorvida na superfície da sílica vai estar fortemente retida ou ligada, afectando a recuperação dos analitos da fase ligada, especialmente se o solvente de eluição não é miscível com água

3.2. Adsorventes e modos de interacção

Já foi referida a semelhança que existe entre a SPE e a cromatografia líquida. Tal como na cromatografia líquida, também na SPE se podem encontrar adsorventes de fase normal, fase reversa, de exclusão molecular e troca iónica. No esquema seguinte (Figura 13), observam-se os vários tipos de adsorventes que podem ser escolhidos, dependendo do tipo de amostra (Thurman 1998).

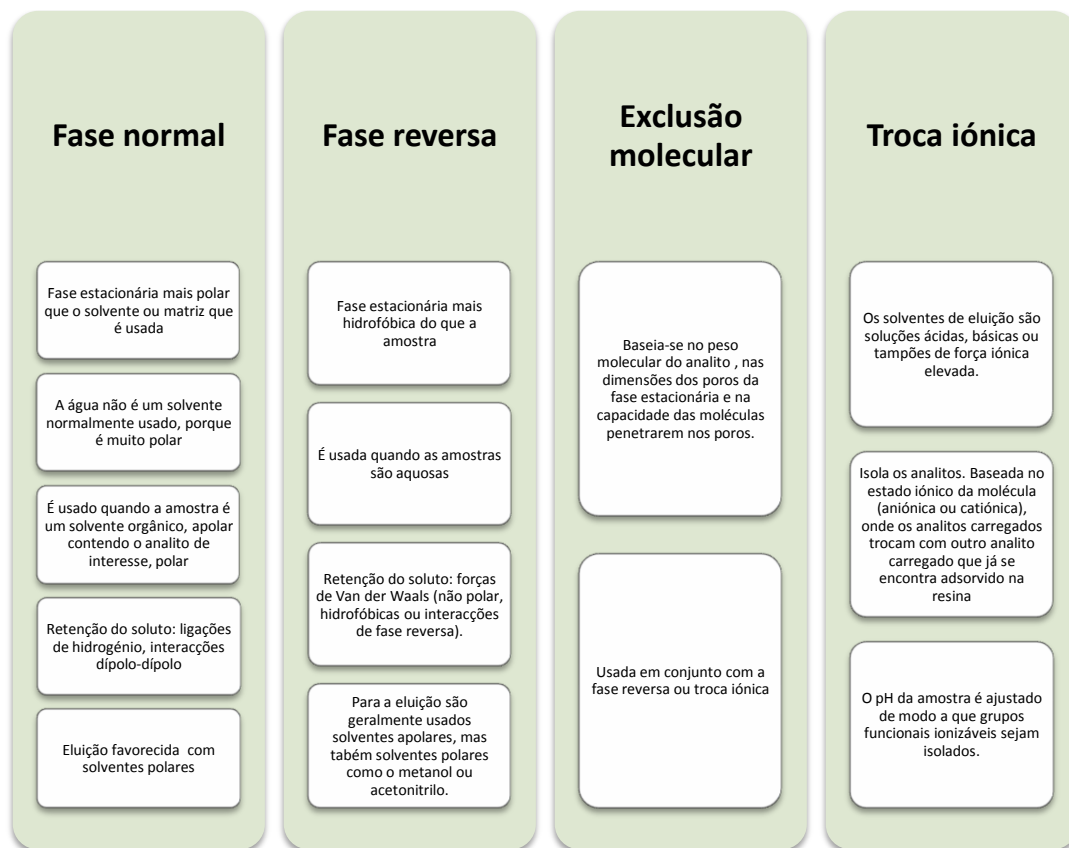


Figura 13. Diversos tipos de adsorventes e suas características gerais (Thurman 1998; H-J. 2001; Telepchak 2004).

Para a realização da parte experimental que visa a determinação de antiepilépticos em amostras de plasma, escolheram-se dois tipos de colunas: colunas de balanço hidrofílico-lipofílico (Oasis[®] HLB) e de troca catiónica (Oasis[®] MCX). As características destes dois tipos de colunas são indicadas, de forma resumida, nos próximos pontos.

3.2.1. Colunas Oasis[®] HLB

Estas colunas são constituídas por adsorventes de sílica ligada a co-polímeros HLB. Estes co-polímeros são macroporosos, tendo na sua composição dois

monómeros em proporção equilibrada, o divinilbenzeno, lipofílico, responsável pela retenção do analito (fase reversa) e a N-vinilpirrolidona, hidrofílico, que possibilita também a retenção dos compostos mais polares (Figura 14) (Waters 2003).

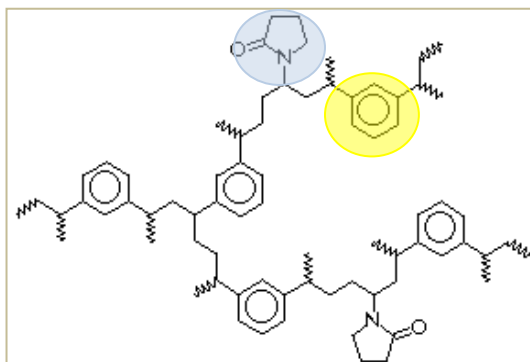


Figura 14. O monómero lipofílico, divinilbenzeno, encontra-se assinalado a amarelo. O monómero hidrofílico, N-vinilpirrolidona, encontra-se assinalado a azul (Waters 2010).

Os adsorventes das colunas são de fase reversa e são materiais mais hidrofóbicos do que a amostra. Este tipo de adsorvente é normalmente utilizado quando se pretende analisar amostras aquosas, sendo o mecanismo de interacção as forças de Van der Waals (também chamadas de apolares, hidrofóbicas ou interacções de fase reversa) e ocasionalmente interacções secundárias, tais como pontes de hidrogénio ou interacções dipolo-dipolo (Thurman 1998).

As fases ligadas são preparadas por reacção de organosilanos (ligações entre carbonos e sílica) com sílica activada. As colunas *unendcapped* (Figura 11) permitem aos locais com hidroxilos estarem disponíveis, o que as torna ligeiramente hidrofílicas. Para diminuir esta pequena polaridade, estes locais hidroxilo são desactivados. As técnicas de ligação asseguram que estes locais são 100% reactivados levando a um *endcapping* completo (Figura 11). Como não

sobram locais hidroxilo, as colunas *endcapped* são mais hidrofóbicas que as colunas *unendcapped*.

Um adsorvente hidrofílico é composto por uma estrutura de sílica ligada a cadeias de carbono contendo grupos funcionais polares, como por exemplo aminas, grupos hidroxilo e grupos carbonilo.

Os compostos são retidos em adsorventes hidrofílicos através de interações polares, que incluem ligações de hidrogénio, π - π ou interação dipolo-dipolo. Este tipo de interação ocorre quando a distribuição de electrões entre átomos individuais em grupos funcionais não é igual, provocando uma polaridade negativa e positiva. Compostos tipicamente extraídos numa coluna hidrofílica incluem analitos que têm grupos polares, como aminas, hidroxilos e carbonilos. A eluição é conseguida por solventes fortemente polares (Telepchak 2004).

A retenção dos analitos é influenciada pela concentração orgânica e pH; a retenção do analito diminui com o aumento desta. Quando o pH é alterado, a retenção do analito vai depender da natureza dos compostos; por exemplo, os analitos básicos serão melhor retidos a um valor de pH alto (Waters 2003).

3.2.2. Colunas Oasis[®] MCX

Este tipo de coluna é constituída por um adsorvente de troca iónica, preparado a partir da fase reversa do co-polímero das colunas HLB. Por este motivo, a retenção dos analitos ocorre por dois mecanismos distintos: troca catiónica e fase reversa (Figura 16), denominando-se o processo por SPE de modo misto.

Os grupos de de troca catiónica (ácido sulfónico) encontram-se à superfície dos co-polímeros HLB. A maior diferença entre os adsorventes HLB e MCX é a alta selectividade deste último para os compostos básicos (Waters 2003), já que permite uma remoção mais eficaz dos interferentes da matriz (Barroso M. 2010).

Através de mudanças no pH, o grupo sulfonato encontrar-se-á ionizado, interagindo fortemente com analitos básicos ionizados (Iraneta 1999) .

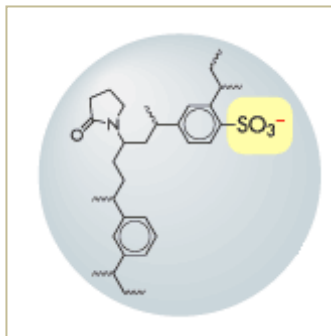


Figura 15. Estrutura química das Oasis[®] MCX (Waters 2010)

4. DETERMINAÇÃO DE ANTIEPILÉPTICOS EM AMOSTRAS BIOLÓGICAS

Vários métodos têm sido publicados para a determinação deste tipo de compostos em amostras biológicas de complexidade variável. Com vista à obtenção de adequada sensibilidade e selectividade na detecção destas substâncias, esta análise necessita geralmente que os analitos sejam convenientemente extraídos da matriz em que se encontram para posterior análise cromatográfica, por intermédio da cromatografia líquida ou gasosa.

Foi efectuada uma revisão bibliográfica dos artigos publicados na literatura científica entre os anos 2007 e 2010 acerca do tipo de técnicas e procedimentos de extracção utilizados para a determinação qualitativa e quantitativa destes compostos em plasma, já que esta foi a matriz estudada ao longo deste trabalho. Para o efeito foi usada a base de dados de artigos científicos, *Pubmed*, com a palavra-chave “*determination of antiepileptics in plasma*”. Várias técnicas têm sido utilizadas para esta determinação analítica, nomeadamente LLE (Jalalizadeh 2007; Oliveira-Silva 2009; Johnson 2010), SPE (Musenga 2007; Matar 2008; Matsuura 2008) e SPME (Gallardo 2009), recorrendo tanto à cromatografia líquida (Brunetto 2009; Contin 2010) como à cromatografia gasosa (Johnson 2010), acopladas a vários tipos de detectores.

A Tabela 2 resume as principais características analíticas das metodologias utilizadas para a determinação destas substâncias em plasma humano.

Determinação de Antiepiléticos em amostras biológicas

Tabela 2. Revisão das metodologias analíticas que visam a determinação de fármacos antiepilépticos em fluidos biológicos (2007 – 2010).

REFERÊNCIA	ANALITOS	AMOSTRA (VOLUME)	MÉTODO DE EXTRACÇÃO	ANÁLISE	LOQ/LOD
McMillin, 2010	Carbamazepina, 10,11-epoxi- carbamazepina	Plasma (--)	Sem extracção	Imunoensaios por turbidimetria Imunoensaios por ELISA LC-MS-MS	Carbamazepina – 2,2 µg/mL 10,11-epoxi-carbamazepina – 0,6 µg/mL
Blonk, 2010	Levetiracetam	Plasma (50 µL)	Sem extracção	UPLC-MS-MS	0.15 µg/mL / 0.06 µg/mL
Fortuna, 2010	Carbamazepina, oxcarbazepina, acetato eslicarbazepina e metabolitos	Plasma (500 µL)	SPE	HPLC-UV	0.05 µg/mL / 0.005 µg/mL carbamazepina e oxcarbazepina 0.15 µg/mL / 0.02 µg/mL para o acetato eslicarbazepina
Saracino, 2010	Oxcarbamazepina e metabolitos (10,11-dihidro-10-hidroxicarbamazepina,	Sangue (50 µL) Saliva (50 µL)	MEPS	HPLC-DAD	0.05 – 0.125 µg/mL / 0.015-0.037 µg/mL

Determinação de Antiepilépticos em amostras biológicas

	trans-10,11-dihidro-10,11-dihidroxicarbamazepina e 3-hidroxicarbamazepina)				
Johnson, 2010	Amobarbital, Butalbital, Pentobarbital, Fenobarbital e Secobarbital	Urina, soro, plasma (--)	LLE	GC-MS	--- / ---
Heideloff, 2010	Carbamazepina, 10,11-epoxido- carbamazepina, felbamato, lamotrigina, 10,11-dihidro-10-hidroxi-carbamazepina (active metabolite of oxcarbazepine), pentobarbital, phenobarbital, phenytoin, primidone, and zonisamide	Soro (100 µL)	Sem extracção	HPLC- UV	0,4-4,9µg/mL / ---
Contin, 2010	Rufinamida e zonisamida lamotrigina, monohidroxicarbamazepina (metabolito activo da oxcarbazepine) e felbamato	Plasma (250 µL)	Sem extracção	HPLC - UV	2 µg/mL /0.5 µg/mL para a rufinamida e zonizamida

Zufia, 2010	Levetiracetam	Plasma (200 µL)	SPE	HPLC - DAD	0,53 µg/mL / 0, 16 µg/mL
Mendu, 2010	Levetiracetam e o seu metabolito ácido	Soro/plasma (50 µL)	Sem extracção	LC-MS - MS	0,01 – 0,03 µg/ mL / 0,005 – 0,015 µg/mL
Mercolini, 2010	Gabapentina, vigabatrina e topiramato	Plasma (500 µL)	SPE	HPLC- detector de fluorescência	0,2 – 1,0 µg/mL / 0,1-0,3 µg/mL
Oliveira-Silva, 2009	Clordesmetildiazepam	Plasma (500 µL)	LLE	LC-MS-MS	0.50 ng/mL / 0,14 ng/mL
Wattananat , 2009	Gabapentina	Plasma(200µL)	Sem extracção	LC-MS-MS	50 ng/mL / --
Nirogi, 2009	Pregabalina	Plasma (100µL)	LLE	LC-MS-MS	1ng/mL / --
Goswami, 2009	Topiramato	Plasma (300 µL)	SPE	LC-MS-MS	10.4 ng/mL / --
Brunetto, 2009	Lamotrigina	Soro (50 µL)	SPE	HPLC - UV	--- / 0.002 µg/mL
Mennickent, 2009	Carbamazepina	Soro (1000 µL)	LLE	HPTLC – detector de fluorescência	0,57 ng/mL / 0,19 ng/mL
Zufia, 2009	Lamotrigina	Plasma (200 µL)	SPE	HPLC - DAD	0,5 µg/mL / 0,015 µg/mL

Determinação de Antiepilépticos em amostras biológicas

Zhang, 2008	Fenitoína, acetaminofeno, cafeína, ranitidina, e teofilina	Plasma (50 µL)	Sem extracção	LC-MS-MS	12,2 ng/mL / ---
Hunek, 2008	Oxcarbamazepina e 10,11-dihidro-10-hidroxi-carbamazepina	Plasma (100 µL)	Sem extracção	HPLC - UV	1,0 µg/mL / ---
Contin, 2008	Levetiracetam	Plasma (500 µL)	Sem extracção	HPLC - UV	2 µg/mL / 1 µg/mL
Matar, 2008	Levetiracetam	Plasma (100 µL)	SPE	LC-MS-MS	1.0 µg/mL / ---
Subramanian, 2008	Zonisamida, lamotrigina, topiramato, fenobarbital, fenitoína, carbamazepina, - 10,11-diol-carbamazepina, 10-hidroxicarbamazepina, e -10,11-epoxi-carbamazepina	Plasma (100 µL)	SPE	LC-MS	0,31-0,62 ng/mL / 0,16-0,78 ng/mL
Queiroz, 2008	Carbamazepina, 10,11-epoxi- carbamazepina, fenitoína e fenobarbital	Plasma (1000 µL)	SBSE LLE	HPLC- UV	0,08-0,125 µL / -- com SBSE 0,06-0,08 µg/mL / -- com LLE
Srinubabu, 2008	Oxcarbazepina	Plasma (180 µL)	LLE	LC-MS-MS	0,5 µg/mL / 35 ng/mL

Park, 2008	Topiramato	Plasma (100 µL)	Sem extracção	LC-MS-MS	20 ng/mL / ---
Saracino, 2007	Olanzapina e lamotrigina	Plasma (150 µL)	SPE	HPLC-DAD	0,25 µg/mL / 0,08 µg/mL
Matsuura, 2007	Ácido valpróico	Plasma (200 µL)	SPE	LC-MS-MS	0.5 µg/mL / 0.17 µg/mL
Maia, 2007	Oxcarbazepina e 10,11-dihidro-10-hidroxicarbamazepina	Plasma (100 µL)	LLE	LC-MS-MS	20 ng/mL / ---oxcarbamazepina 40 ng/mL / -- 10,11-dihidroxicarbamazepina
Gupta, 2007	Lamotrigina, felbamato, e primidona	Plasma (5000 µL) Urina (5000 µL)	Sem extracção	Eléctrodos	--- / $1 \cdot 10^{-7}$ – $3,6 \cdot 10^{-5}$ Molar
Musenga, 2007	Vigabatrina	Plasma (100 µL)	SPE	CE-UV	5,0 µg/mL / 2,0 µg/mL
Saracino, 2007	Lamotrigina, e metabolitos (lamotrigine 2-N-glucuronide e 2-N-metilato)	Plasma (150 µL)	Sem extracção	HPLC-DAD	0,1 µg/mL / 0,05 µg/mL
Alves, 2007	Oxcarbazepina, acetato de eslicarbazepina e metabolitos (S-licarbazepina	Plasma (250 µL)	SPE	HPLC-UV	0,4 µg/mL / 0, 1 µg/mL (eslicarbazepine acetato) - 0,04 µg/mL (restantes)

Determinação de Antiepilépticos em amostras biológicas

	e R-licarbazepina)				compostos)
Alves, 2007	Oxcarbazepina, acetato de eslicarbazepina e metabolitos (S-licarbazepina e R-licarbazepina)	Plasma (250 µL), rim, fígado e cérebro (1 mL sobrenadante)	SPE	HPLC-UV	0,4 µg/mL / 0, 1 µg/mL (eslicarbazepine acetato) - 0,04 µg/mL (restantes compostos) (estes valores são para o plasma)
Mazzucchelli, 2007	Oxcarbazepina e monohidroxicarbazepina	Plasma (200 µL)	LLE	HPLC-UV	0,1 µg/mL / 0,05 µg/mL
Jalalizadeh, 2007	Gabapentina	Plasma (500 µL)	LLE	HPLC-UV	10 µg/mL / 3 µg/mL
Mennickent, 2007	Carbamazepina	Plasma (--) Saliva (--)	Sem extracção	Imunoensaios	1,01 ng/mL / --
Franco, 2007	R-(-)- e S-(+)- Vigabatrina	Plasma (200 µL)	SPE	HPLC-UV	0.5 µg/mL / --

* **Abreviaturas:** CE (*Capillary electrophoresis* – electroforese capilar); DAD (*Diode array detector* – detector de fotodiodos); ELISA (*Enzyme linked immuno sorbent assay*); GC (*Gas chromatography* – cromatografia gasosa); HPLC (*High performance liquid chromatography* – cromatografia líquida de alta eficiência); HPTLC (*High performance thin-layer chromatography* – cromatografia de camada fina de alta eficiência); LC (*Liquid chromatography* – cromatografia líquida); LLE (*Liquid-liquid extraction* – extracção líquido-líquido); MEPS (*Microextraction by packed sorbent* – microextracção em seringa empacotada); MS (*Mass spectrometry* – espectrometria de massa); MS-MS (*Tandem mass spectrometry* – espectrometria de massa em tandem); SBSE (*Stir bar sorptive extraction* – extracção em barra de agitação); SPE (*Solid phase extraction* – extracção em fase sólida); UPLC (*Ultra performance liquid chromatography* – cromatografia líquida de ultra eficiência); UV (Ultravioleta).

II. PARTE EXPERIMENTAL

1. Material e Métodos

1.1. Instrumentação

- Sistema de purificação de água Mili-Q Advantage A10[®] system da Millipore;
- Balança analítica da Sartorius - modelo CP225;
- Vórtex Mixer da Labnet International - modelo 230V;
- Placa de agitação magnética da Selecta - modelo ASINCRO, J.P.;
- Câmara frigorífica da Dagard – refrigeração a 4 °C;
- Medidor de pH da Metrohm – modelo 744;
- Micropipetas automáticas da Gilson de 10, 100 e 1000 µL;
- Bomba de vácuo da GAST – modelo DOA-P505-BN (EUA);
- Câmara de congelação da Electrolux – modelo Inspire;
- Sistema de extracção da Waters - WAT200683 (EUA);
- Sistema de ultrasons da Elma – Transonic 460/H (Alemanha);
- Colunas de extracção Oasis[®] HLB 30 mg e Oasis[®] MCX 30 mg da Waters (EUA).

1.1.2. Sistema cromatográfico e de detecção

Foi usado um sistema de HPLC modelo 600 acoplado a um detector de fotodiodos (PDA) modelo 2996 da Waters (Mildford, MA, EUA).

Material e Métodos

A separação cromatográfica foi efectuada com uma coluna de fase reversa Xterra[®] MS C₁₈ de dimensões 150x0,5 µm x 4,6 mm i.d., da Waters (Mildford, MA, EUA). Utilizou-se um injector manual com uma válvula *rheodyne* modelo 7725i e com um loop de 20 µL da Waters (Mildford, MA, EUA).

1.2. Reagentes

- Metanol LiChrosolv[®], Merck;
- Acetonitrilo LiChrosolv[®], Merck;
- Água desionizada Milli-Q;
- Ácido Clorídrico 36,5% *pro analysi*, Carlo Erba;
- n-Hexano *pro analysi*, J.T. Baker;
- Isopropanol *pro analysi*, Sigma Aldrich;
- Cloreto de Potássio (KCl), Merck
- Cloreto de Sódio (NaCl), Merck
- Dihidrogenofosfato de potássio (KH₂PO₄), Sigma Aldrich;
- Fosfato de potássio dibásico (K₂HPO₄), Pancreac;

1.3. Padrões

Os antiepilépticos objecto de estudo foram os seguintes:

- Primidona - (pureza ≥ 99%), Fluka;
- 10,11–epoxi-carbamazepina - (pureza ≥ 98%), Fluka;

- Fenobarbital - (pureza \geq 99%), Fluka;
- Carbamazepina - (pureza \geq 99,9%), Sigma Aldrich;
- Fenitoína - (pureza \geq 99%), Sigma Aldrich.

1.4. Amostra biológica

A amostra biológica utilizada para a realização deste trabalho foi o plasma humano, tendo sido preparadas *pools* com amostras pertencendo a vários indivíduos a partir de excedentes do Instituto Português do Sangue (Coimbra) e conservadas a 4 °C.

1.5. Preparação de soluções

1.5.1. Soluções Padrão

As soluções padrão dos antiepilépticos em estudo foram preparadas em metanol da seguinte forma:

Foram pesados 5 mg de cada um dos padrões (primidona, fenobarbital, carbamazepina e fenitoína) e diluídos com metanol em balões aferidos de 5 mL. Obtiveram-se desta forma soluções com uma concentração final de 1 mg/mL para cada uma das substâncias. A solução padrão de 10,11-epoxi-carbamazepina foi preparado por pesagem de 1 mg do padrão puro e diluição com metanol para um volume final de 5 mL (200 µg/mL). A partir destas soluções foram preparadas misturas padrão contendo todos os analitos, por diluição com metanol de forma a obter as soluções de trabalho a 50 e 5 µg/mL.

As soluções mãe e as soluções de trabalho foram protegidas da luz e armazenadas a 4 °C.

1.5.2. Outras soluções

TAMPÃO FOSFATO

Foram preparadas duas soluções:

Solução A - para um balão aferido de 100 mL foram pesados 0,9073 g de KH_2PO_4 , tendo sido adicionada água desionizada até perfazer um volume final de 100 mL.

Solução B - para um balão aferido de 100 mL foram pesados 1,187 g de $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, tendo sido adicionada água desionizada até perfazer um volume final de 100 mL.

Esta segunda solução foi usada para ajustar o pH da primeira a cerca de 7.

TAMPÃO FOSFATO SALINO (PBS)

Para um balão volumétrico de 1000 mL foram pesados 200 mg de KH_2PO_4 , 200 mg de KCl, 8 g de NaCl e 1,15 g de K_2HPO_4 , que foi aferido com água Milli-Q. O pH desta solução foi de aproximadamente 7.

ÁCIDO CLORÍDRICO 0,1 M

Para um balão de 250 mL foram medidos 2,1 mL de HCl 36,5% e aferiu-se com água Mili-Q.

1.6. Condições cromatográficas

As condições cromatográficas foram optimizadas previamente, e as condições finais são as que a seguir se apresentam. Para fase móvel foi efectuada uma

mistura com 59,5 partes de acetonitrilo, 40 de água Milli-Q e 0,5 de Ácido Acético, que correu em modo isocrático e a um fluxo constante de 0,5 mL/min.

O tempo total de cada corrida foi de 10 minutos. A detecção dos analitos foi efectuada a um comprimento de onda de 211 nm, excepto a carbamazepina, cujo máximo de absorção ocorre a 289 nm. Foram injectados 20 µL.

1.7. Procedimento de extracção

O procedimento de extracção foi optimizado previamente, descrevendo-se de seguida as condições finais.

A 200 µL de plasma adicionaram-se 3 mL de tampão PBS e homogeneizou-se por movimentos de inversão/rotação durante 15 minutos. As amostras foram então adicionadas às colunas de extracção Oasis[®] HLB previamente acondicionadas com 2 mL de metanol e 2 mL de água. Após passagem da totalidade de amostra por gravidade através das colunas, a lavagem foi efectuada com 2 mL de uma solução aquosa de metanol a 5%. As colunas foram então secas sob vácuo total durante 15 minutos e os analitos eluídos com 2 mL de acetonitrilo. Os extractos foram evaporados à secura a 30 °C sob uma corrente de azoto, dissolvidos em 100 µL de fase móvel e uma alíquota de 20 µL foi injectada no sistema cromatográfico.

2. Resultados e Discussão

2.1. Optimização da Fase Móvel

Como referido anteriormente, foi necessário otimizar a composição da fase móvel com o objectivo de se melhorar a separação cromatográfica dos vários analitos estudados. Deste modo, foram estudadas várias composições de fase móvel sempre em modo isocrático e a um fluxo constante de 0,5 mL/minuto.

Numa primeira fase, as substâncias em estudo foram injectadas isoladamente a uma concentração de 5 µg/mL, de forma a conhecer o seu espectro de absorção no ultravioleta (UV). Nesta fase, o conhecimento dos tempos de retenção dos analitos não era uma prioridade, já que com a variação da composição das fases móveis testadas eles iriam variar.

Inicialmente foi testada uma fase móvel composta de acetonitrilo e fosfato de sódio (40:60) a um pH de 3,20. Usando esta fase móvel, não foi possível separar a carbamazepina do fenobarbital, sendo os seus tempos de retenção de 8,14 minutos. O tempo de retenção da primidona foi de 5,99 e o da fenitoína de 10,21. Nesta fase do estudo não foi estudado o metabolito da carbamazepina (Figura 16).

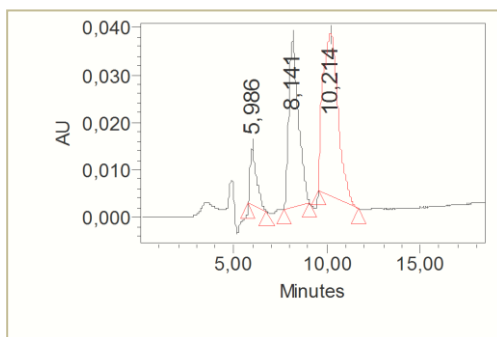


Figura 16. Cromatograma dos antiepilépticos de estudo utilizando uma fase móvel de acetonitrilo: fosfato de sódio (40:60; v:v)

Resultados e Discussão

Em seguida, tentou-se utilizar uma combinação de água, acetonitrilo e ácido acético (66,5:33,9:0,1; v:v:v), que se mostrou ineficaz, uma vez que não foi possível separar adequadamente, como documentado na Figura 17.

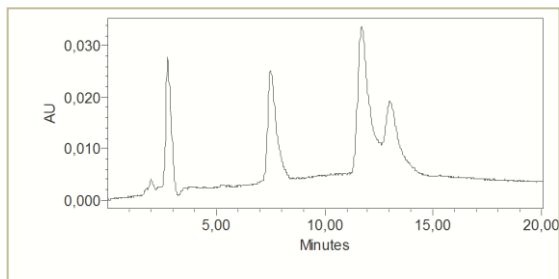


Figura 17. Cromatograma dos antiepilépticos de estudo utilizando uma fase móvel água: acetonitrilo: ácido acético (66,5:33,9:0,1; v:v:v)

Esta separação foi conseguida usando uma fase móvel constituída por água, acetonitrilo e ácido acético (59,5:40:0,5, v:v:v) com um pH de 3,34. No seguinte cromatograma (Figura 18), podem observar-se os picos da primidona, que sai aos 6,37 minutos, o fenobarbital aos 9,70 minutos, a carbamazepina aos 12,61 minutos e a fenitoína aos 13,82 minutos.

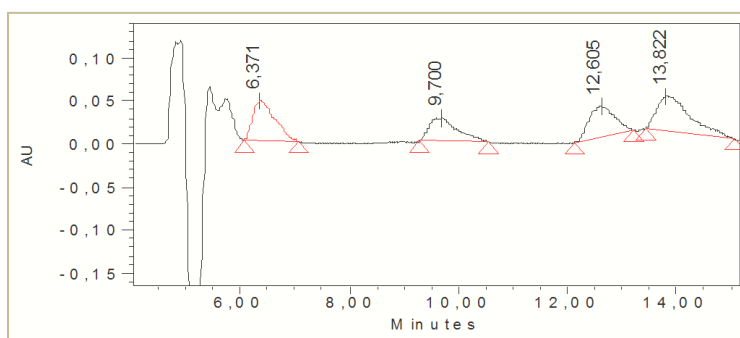


Figura 18. Cromatograma dos antiepilépticos (15 µg/mL) de estudo utilizando uma fase móvel água: acetonitrilo: ácido acético (59,5:40:0,5; v:v:v)

2.2. Identificação das substâncias

Uma vez otimizada a fase móvel, as substâncias foram identificadas com base no seu tempo de retenção e espectro de absorção no UV. O seguinte cromatograma (Figura 19) foi obtido por injeção de 20 μL de uma mistura padrão de todos os analitos a uma concentração de 5 $\mu\text{g/mL}$.

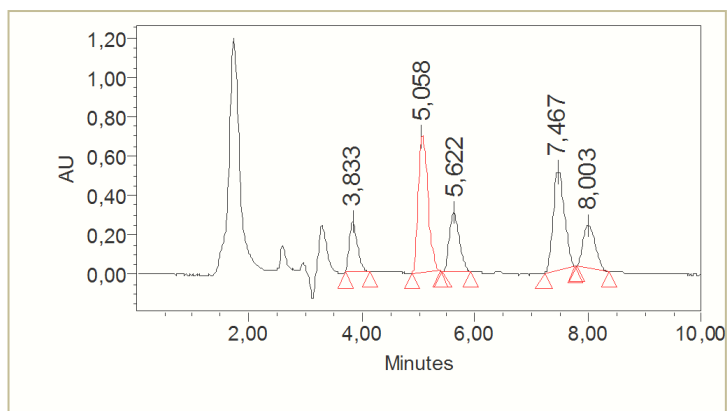
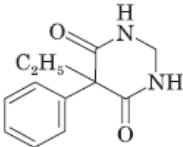
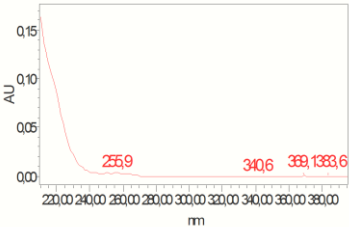
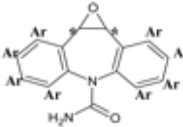
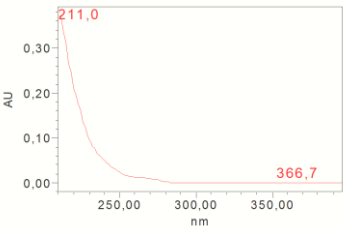
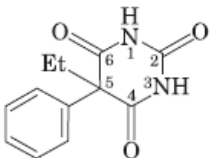
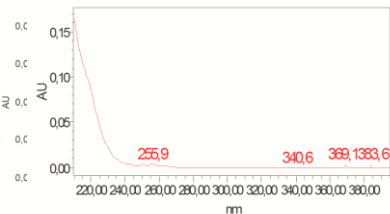
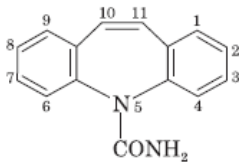
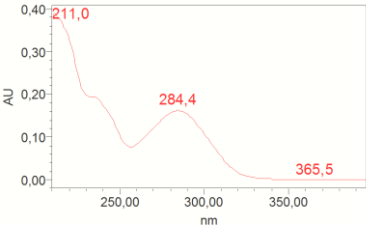


Figura 19. Cromatograma de uma mistura padrão dos antiepilépticos de estudo a 15 $\mu\text{g/mL}$.

Na tabela seguinte (Tabela 2) são apresentados os tempos de retenção, o espectro de absorção no UV e o comprimento de onda máximo para cada um dos antiepilépticos estudados.

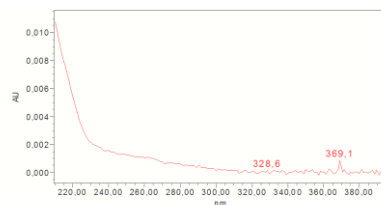
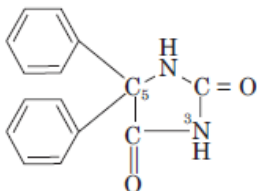
Resultados e Discussão

Tabela 3. Antiepilépticos em estudo e respectivos tempos de retenção e comprimento de onda máximo.

ANTIEPIILÉPTICO	TEMPO DE RETENÇÃO (min)	ESPECTRO DE ABSORÇÃO NO UV
<p>Primidona</p> 	3,83	 <p>$\lambda_{\text{máx}} = 211 \text{ nm}$</p>
<p>10,11-epoxi-carbamazepina</p> 	5,06	 <p>$\lambda_{\text{máx}} = 211 \text{ nm}$</p>
<p>Fenobarbital</p> 	5,62	 <p>$\lambda_{\text{máx}} = 211 \text{ nm}$</p>
<p>Carbamazepina</p> 	7,47	 <p>$\lambda_{\text{máx}} = 289 \text{ nm}$</p>

Fenitoína

8,00

 $\lambda_{\text{máx}} = 211 \text{ nm}$

2.3. Padronização externa

Na determinação de substâncias em amostras biológicas é comum recorrer-se à adição de uma substância conhecida a uma concentração constante – padrão interno – à amostra, com o objectivo de minimizar as perdas de analito durante o processo extractivo. Esta substância deverá ter características físico-químicas o mais próximas possível dos analitos que se pretendem analisar, para que o seu comportamento durante todo o processo seja semelhante. Deste modo, e sabendo de antemão a quantidade de padrão interno adicionada, pode ter-se uma ideia acerca da recuperação do método. Por outro lado, na construção de curvas de calibração é comum usar-se como resposta a razão de áreas cromatográficas entre o(s) analito(s) e o padrão interno, minimizando assim o efeito de eventuais perdas de analito na precisão e exactidão do método.

Durante o desenvolvimento do método analítico descrito neste estudo foram testados alguns compostos como possíveis padrões internos, para assim controlar o processo de análise. Para tal, foram testados compostos que, pelas suas características terapêuticas, não fossem susceptíveis de ser utilizados pela população, ou em alternativa que não fossem comercializados no nosso país.

Na Tabela 4, encontram-se os compostos estudados, bem como a justificação da sua não inclusão no estudo.

Resultados e Discussão

Tabela 4. Compostos testados, tempo de retenção e $\lambda_{\text{máx}}$ e justificação da sua não utilização neste trabalho.

COMPOSTO	TEMPO DE RETENÇÃO (MIN)/ λ_{MAX} (nm)	JUSTIFICAÇÃO DA NÃO UTILIZAÇÃO COMO PADRÃO INTERNO
Protriptilina	5,88/ 289	Tempo de retenção muito próximo do fenobarbital
10,11-dihidro-carbamazepina	7,58/ 211	Sai entre a carbamazepina e a fenitoína, não permitindo a correcta resolução de picos
Cloranfenicol	5,72/ 274	Co-elui com o fenobarbital
Promazina	1,85/ 252	Co-elui com interferente
Narceína	4,38/ 274	Co-elui com a primidona
Papaverina	7,55/ 254	Tempo de retenção muito próximo do da carbamazepina
Estricnina	0,88/ 254	Sai antes da frente de solvente, não tendo afinidade para a coluna utilizada

Como se pode verificar, nenhum dos compostos estudados foi considerado adequado para utilização como padrão interno. Deste modo, e para que o tema desta dissertação não passasse a ser a busca de um padrão interno adequado, foi decidido trabalhar com padronização externa, apesar de menos utilizada neste tipo de análise. Tal facto não significa que não possam ser obtidos resultados quantitativos perfeitamente válidos, precisos e exactos; pelo contrário, existem inclusivamente métodos publicados na literatura científica para a determinação de estimulantes que utilizam este tipo de calibração (Concheiro 2005).

De facto, e como se verá mais adiante, foram obtidos excelentes resultados para a precisão, exactidão e recuperação do método desenvolvido, como pode ser

observado pelos coeficientes de variação e valores de *bias*. Por outro lado, a perda de analitos durante o processo extractivo não é significativa – foram obtidos consistentemente valores de recuperação absoluta superiores a 90% para todos os compostos estudados – demonstrando que a escolha deste tipo de padronização foi uma opção acertada.

No entanto, foi decidido estabelecer premissas para análise de amostras reais, para minimizar a possibilidade de erros não controlados afectarem a sua correcta análise e enviarem a adequada interpretação dos resultados. Assim, a análise de amostras será sempre feita em duplicado, através de uma curva de calibração e amostras controlo preparadas e analisadas contemporaneamente. Além disso, e no mesmo dia da análise, será igualmente avaliada a recuperação do método às mesmas concentrações das amostras controlo.

2.4. Optimização do procedimento de extracção

Neste estudo optou-se pela SPE devido às vantagens que possui em relação à LLE, nomeadamente o menor gasto de solventes orgânicos, fácil automatização e melhor reprodutibilidade. Para isso, e devido às características dos analitos em estudo, foram testados dois tipos de coluna, Oasis[®] HLB e Oasis[®] MCX. As variações ao método foram feitas na parte da preparação da amostra, acondicionamento da coluna e no solvente de eluição. Todas as experiências de optimização foram efectuadas em triplicado, e a eficiências dos vários procedimentos foram comparadas através da comparação das áreas obtidas.

Com vista à melhor compreensão de todo o processo de optimização, começar-se-á pela explicação do processo com as colunas HLB.

2.4.1. Colunas HLB

Para uma melhor compreensão da otimização, e para facilitar a leitura desta dissertação, optou-se por esquematizar todos os passos do processo de otimização.

O primeiro parâmetro otimizado foi a diluição da amostra (para facilitar a passagem pelas colunas e assegurar a sua melhor homogeneização) e o acondicionamento das colunas (Figura 20). Deste modo, foram testados três solventes de diluição (água, tampão PBS e tampão fosfato).

As amostras de plasma, foram fortificadas com uma mistura padrão contendo primidona, fenobarbital e carbamazepina a uma concentração de 100 µg/mL. Para facilitar esta otimização, o metabolito da carbamazepina e a fenitoína foram excluídos, pois apresentam tempos de retenção muito próximos do fenobarbital e carbamazepina, respectivamente. Para avaliar a presença de interferentes da matriz foram também analisadas amostras às quais não foi adicionado qualquer dos analitos estudados.

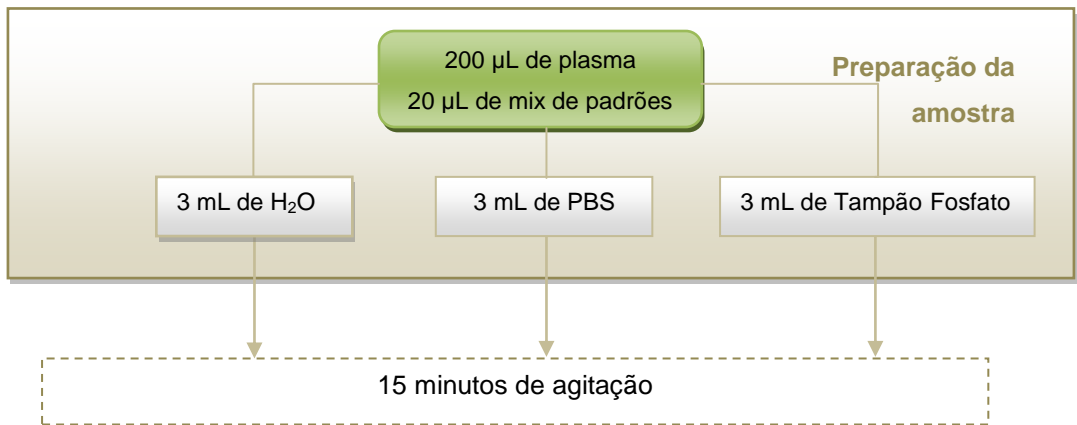


Figura 20. Representação esquemática da preparação da amostra.

O protocolo de extração utilizado encontra-se esquematizado na Figura 21. O acondicionamento da coluna foi efectuado com metanol e com o mesmo solvente usado na diluição.

Resultados e Discussão

Para a eliminação de interferentes da matriz, as colunas foram lavadas com uma solução a 5% de metanol, tendo sido os analitos eluídos com diferentes solventes: metanol, acetonitrilo, acetato de etilo, etanol e isopropanol (Figura 21).



Figura 21. Esquematização dos procedimentos SPE de acondicionamento da coluna, lavagem, secagem e eluição.

II. PARTE EXPERIMENTAL

Os cromatogramas obtidos foram comparados para verificar a eficiência da remoção dos interferentes, e foi calculada a taxa de recuperação por comparação de áreas de pico para cada uma das condições testadas.

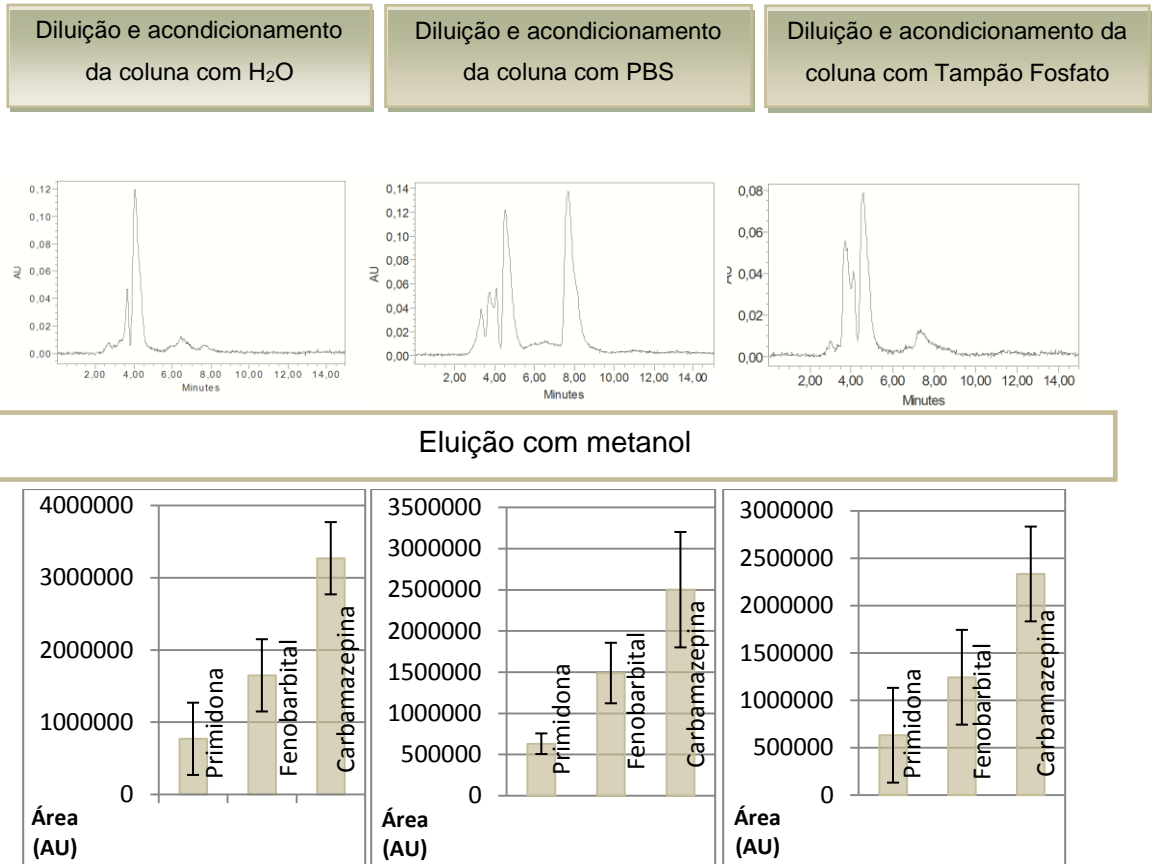


Figura 22. Cromatogramas obtidos a partir de amostras de plasma branco e quantidade de analito extraída para cada uma das diferentes condições testadas efectuando a eluição com metanol.

Resultados e Discussão

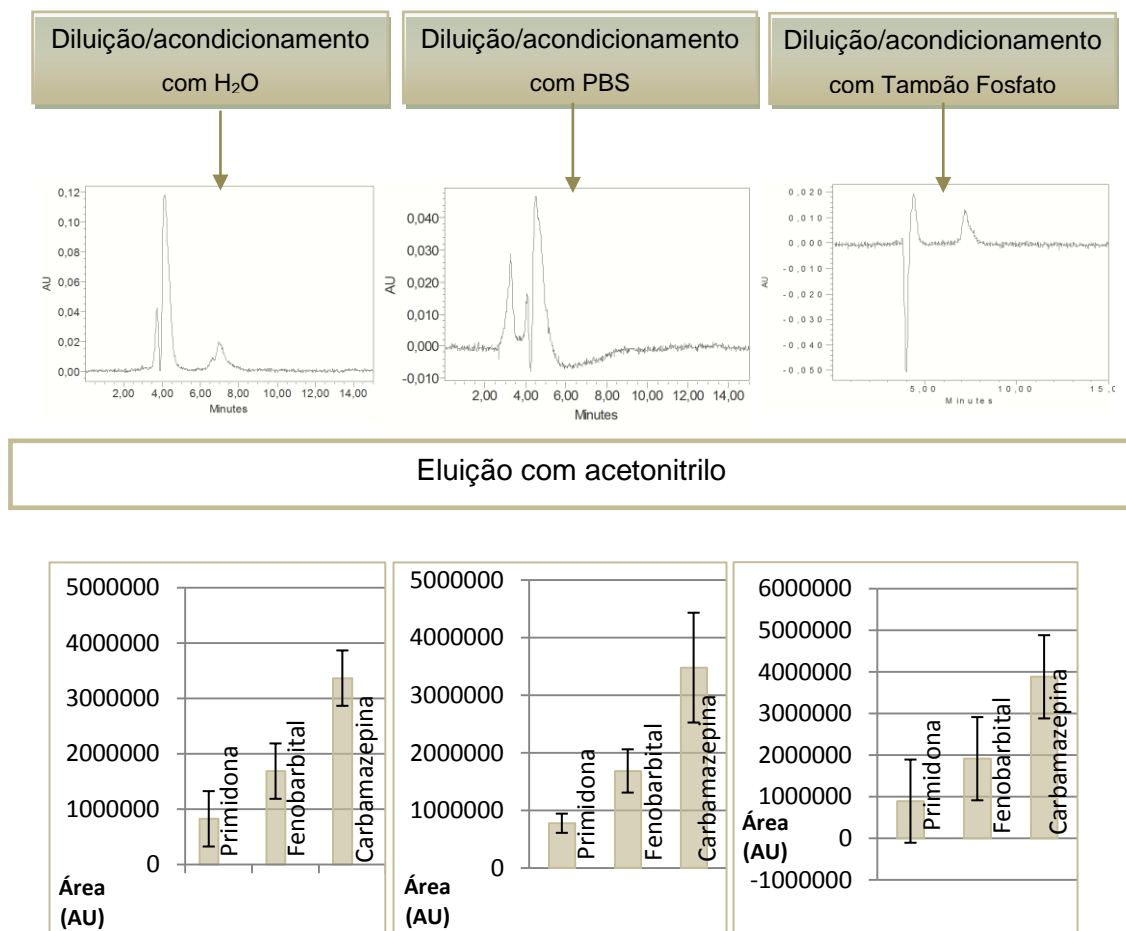


Figura 23. Cromatogramas obtidos a partir de amostras de plasma branco e quantidade de analito extraída para cada uma das diferentes condições testadas efectuando a eluição com acetonitrilo.

II. PARTE EXPERIMENTAL

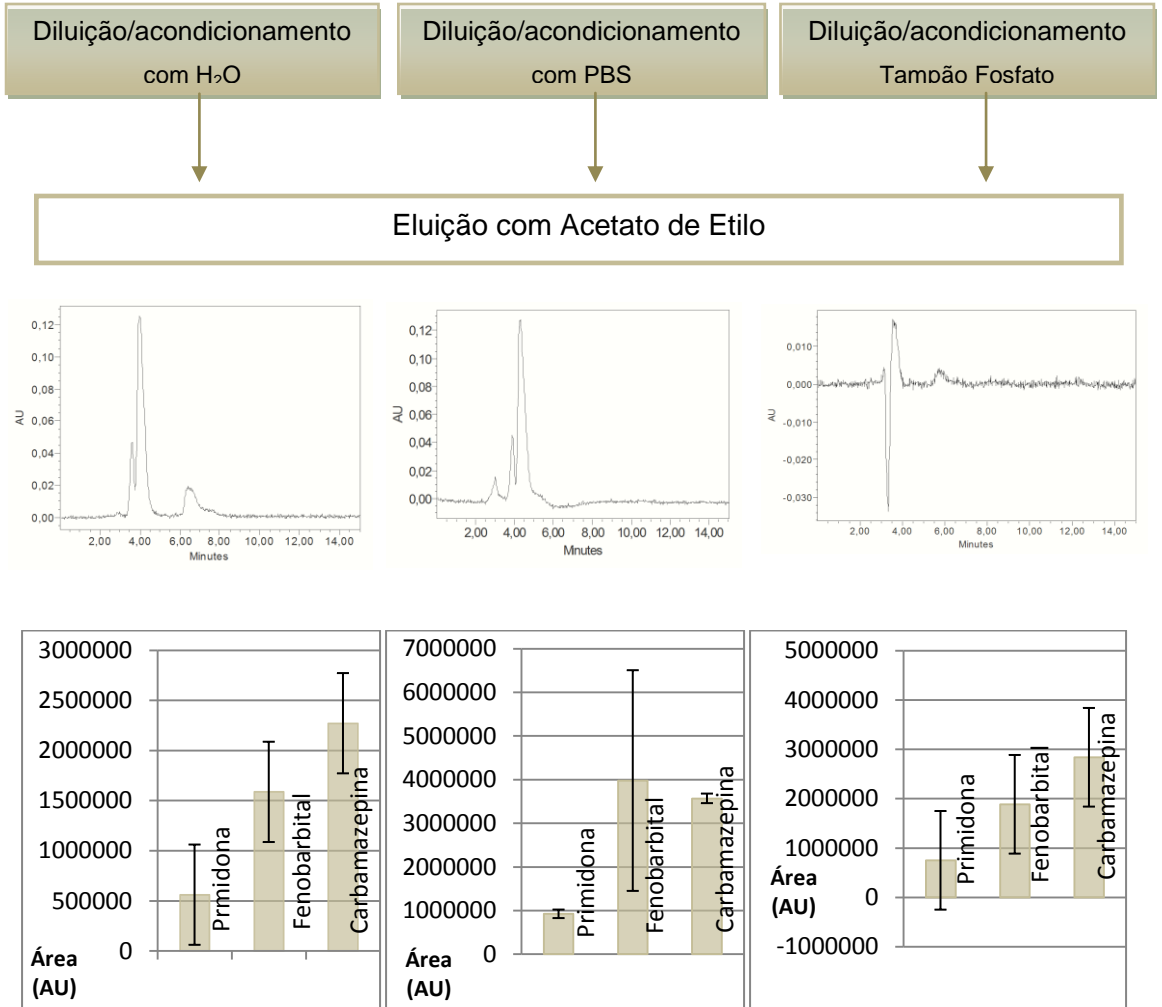


Figura 24. Cromatogramas obtidos a partir de amostras de plasma branco e quantidade de analito extraída para cada uma das diferentes condições testadas efectuando a eluição com acetato de etilo.

Analisando a recuperação de cada um dos analitos para os dois últimos métodos acima descritos tem-se que a recuperação da primidona não varia muito de método para método, mas é ligeiramente superior com diluição em tampão fosfato e eluição com acetonitrilo. A recuperação do fenobarbital é maior com

Resultados e Discussão

PBS quando a eluição é efectuada com acetato de etilo. Quanto à carbamazepina, e fazendo o mesmo tipo de análise, o melhor método é aquele que emprega tampão fosfato e eluição com acetonitrilo.

A análise dos cromatogramas obtidos por análise de amostras de plasma não fortificadas com nenhum dos analitos (brancos) revelou que eram obtidos menos interferentes diluindo com PBS e fazendo a eluição com acetato de etilo ou acetonitrilo, originando mesmo cromatogramas mais limpos que os obtidos com metanol.

Por outro lado, quando foram utilizados o etanol e o isopropanol como solventes de eluição, a quantidade de interferentes nos cromatogramas era muito elevada (Figura 25), pelo que estas duas últimas hipóteses não foram consideradas.

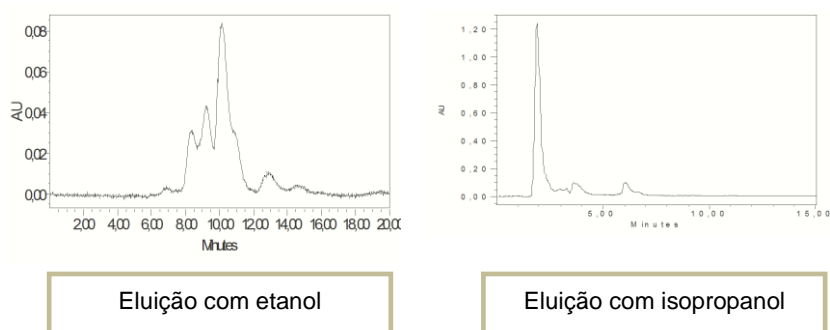


Figura 25. Cromatogramas obtidos após análise de amostras brancas (diluição com PBS)

A partir dos resultados obtidos com os dois tipos de eluição – com acetonitrilo e acetato de etilo – e pela análise atenta dos cromatogramas que dizem respeito aos brancos e dos gráficos representativos das médias das áreas dos picos dos três antiepilépticos submetidos aos testes, chegou-se à conclusão que, apesar de os resultados obtidos serem muito semelhantes, observava-se uma grande variabilidade nas áreas relativas ao pico do fenobarbital com acetato de etilo, pelo que se optou por fazer a eluição de todos os analitos com acetonitrilo.

2.4.2. Colunas MCX

Foram ainda testadas outras colunas de extracção, com mecanismo misto de retenção. O esquema que se segue (Figura 26) mostra o procedimento de preparação da amostra.

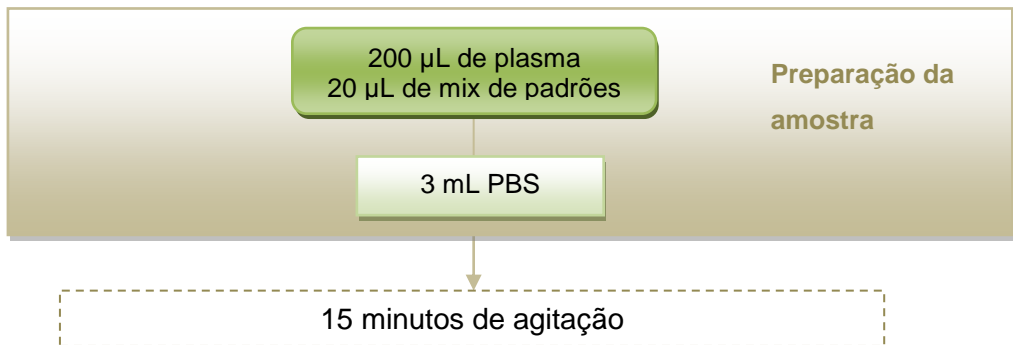


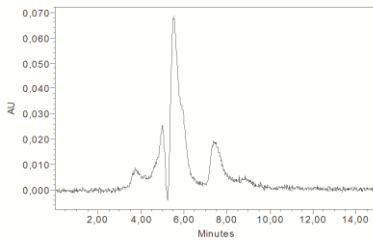
Figura 26. Representação esquemática da preparação da amostra

Resultados e Discussão

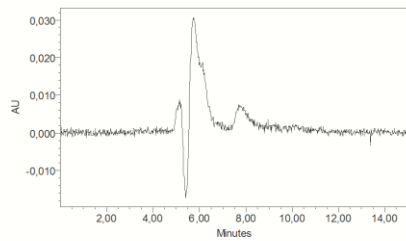


Figura 27. Esquematização dos procedimentos SPE de acondicionamento da coluna, lavagem, secagem e eluição utilizando colunas Oasis[®] MCX.

Os resultados obtidos utilizando deste tipo de lavagem e eluição apresentam-se na Figura 28.



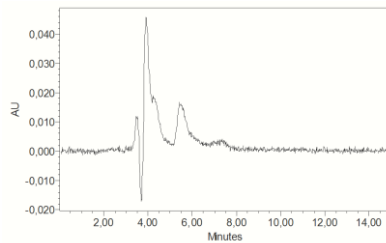
Eluição com Etanol



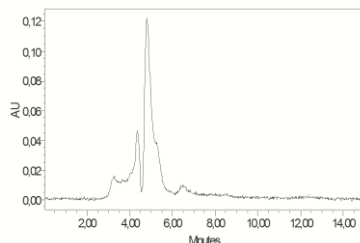
Eluição com Isopropanol:
diclorometano:amónia 20:78:2

Figura 28. Cromatogramas obtidos após análise de amostras brancas.

Experimentou-se ainda um outro tipo de lavagem da coluna, em que se efectuou uma lavagem adicional com n-hexano após o ácido clorídrico. Neste caso foram obtidos os seguintes cromatogramas (Figura 29) após análise de amostras brancas.



Eluição com Etanol



Eluição com isopropanol:
diclorometano:amónia (20:78:2)

Figura 29. Cromatogramas obtidos após análise de amostras brancas (lavagem com n-hexano) .

Tendo em conta os resultados obtidos, podemos afirmar que nenhum dos métodos testados melhorou a qualidade da extracção relativamente às colunas HLB, pelo que, as colunas MCX foram excluídas do estudo.

2.5. Validação do método

A validação de um método é o processo sistemático de demonstração que os processos analíticos se adequam ao fim a que se destinam.

Sendo assim, para garantir a fiabilidade dos resultados por aplicação do método desenvolvido, este foi completamente validado em termos de selectividade, linearidade, precisão, exactidão, limites de detecção e quantificação e recuperação. Para tal, foram seguidas as normas aceites internacionalmente para a validação de métodos bioanalíticos, concretamente da *Food and Drug Administration* (FDA) (FDA 2001) e da *International Conference on Harmonization* (ICH 2005).

2.5.1. Selectividade

A selectividade consiste na capacidade de um método distinguir o(s) analito(s) de forma inequívoca numa matriz complexa e na presença de outras componentes da amostra (FDA 2001).

Para avaliar este parâmetro foram analisadas amostras de plasma branco (amostras às quais não foi adicionado nenhum dos compostos em estudo) de cinco origens diferentes, e foram pesquisados interferentes nas quais foram procurados interferentes nos tempos de retenção de cada uma das substâncias em estudo (Figura 30).

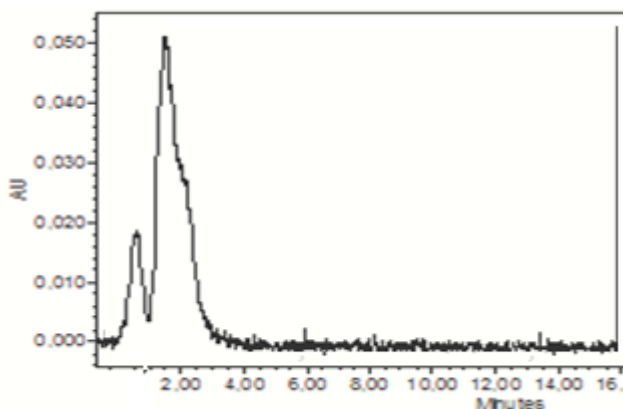


Figura 30. Cromatograma de um plasma branco.

Como se pode observar neste cromatograma, os constituintes da matriz não interferem significativamente com os analitos de interesse, podendo então afirmar-se que o método descrito é selectivo.

2.5.2. Especificidade

Foi avaliada também a possível interferência de outros compostos susceptíveis de ser utilizados concomitantemente em terapia antiepiléptica. Para tal, procedeu-se à análise cromatográfica de várias substâncias, e os respectivos tempos de retenção com as condições do método (e comprimentos de onda máximos de absorção) desenvolvido são descritos na tabela 5.

Tabela 5. Tempo de retenção e comprimento de onda máximo para alguns compostos mais comumente usados e que podem ser usados com uma terapia com antiepilépticos.

COMPOSTO	TEMPO DE RETENÇÃO (min)	λ MÁX
atropina	2,82	212
piracetam	3,52	211
Cetoprofeno	19,56	211
promazina	3,84	252
medazepam	3,56	253
trazodona	2,74	211
amitriptilina	4,40	238
clomipramina	4,40	224
dotiepina	-	-
fluoxetina	4,65	221
nortriptilina	3,91	241
venlafaxina	3,00	224
trimipramina	8,75	254
mirtazapina	3,23	211
maprotitilina	-	-
mianserina	3,93	211
olanzapina	2,72	260
ciamemazina	-	-
sertralina	4,58	211
caféina	4,58	272

(-) - não detectado

2.5.3. Curva de calibração e linearidade

A curva de calibração foi estabelecida utilizando amostras de plasma fortificadas com concentrações crescentes de cada um dos antiepilépticos em estudo, que foram extraídas e analisadas de acordo com a metodologia descrita

anteriormente. Para a 10,11-epoxicarbamazepina, fenobarbital e fenitoína foram preparados oito calibradores distribuídos de forma equidistante entre 0,5 e 25 µg/mL. Por outro lado, para a primidona foram usados sete calibradores distribuídos de forma equidistante entre 1 e 25 µg/mL, enquanto para a carbamazepina foram preparados nove pontos, para uma gama de trabalho a entre 0,25 e 25 µg/mL. A concentração de cada calibrador foi calculada a partir da curva de calibração obtida para cada um dos antiepilépticos em estudo. Simultaneamente com cada curva de calibração foram preparados dois controlos, um na gama média (7,5 µg/mL) e outro na gama alta (17,5 µg/mL). Os valores obtidos para cada um dos analitos em estudo e a respectiva curva de calibração apresentam-se de seguida (Tabelas 6-10; Figuras 31-35).

Tabela 6. Dados de linearidade para a primidona.

CONCENTRAÇÃO (µg/mL)	ÁREA DE PICO	CONCENTRAÇÃO CALCULADA (µg/mL)	BIAS ¹
1	105088	0,99	-0,81
2,5	404672	2,70	7,94
5	777141	4,82	-3,59
10	1628574	9,67	-3,29
15	2597272	15,19	1,26
20	3379697	19,65	-1,77
25	4374104	25,31	1,24
7,5	1267320	7,61	1,50
17,5	2718747	15,88	-9,25

¹ BIAS = [(Concentração calculada – Concentração teórica)/Concentração teórica] × 100

Resultados e Discussão

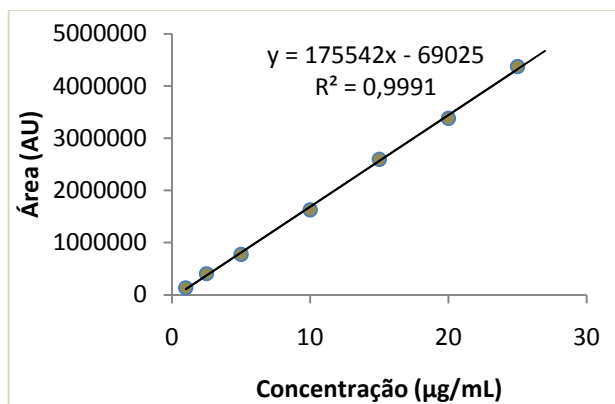


Figura 31. Curva de calibração da primidona.

Tabela 7. Dados de linearidade para a 10,11 epoxi-carbamazepina.

CONCENTRAÇÃO (µg/mL)	ÁREA DE PICO	CONCENTRAÇÃO CALCULADA (µg/mL)	BIAS
0,5	796172	0,47	-5,02
1	995202	0,85	-14,62
2,5	1728140	2,25	-10,03
5	3124536	4,91	-1,85
10	5695530	9,80	-1,98
15	9107804	16,30	8,66
20	11219940	20,32	1,60
25	13202783	24,09	-3,62
7,5	4280897	7,11	-5,21
17,5	9880944	17,77	1,54

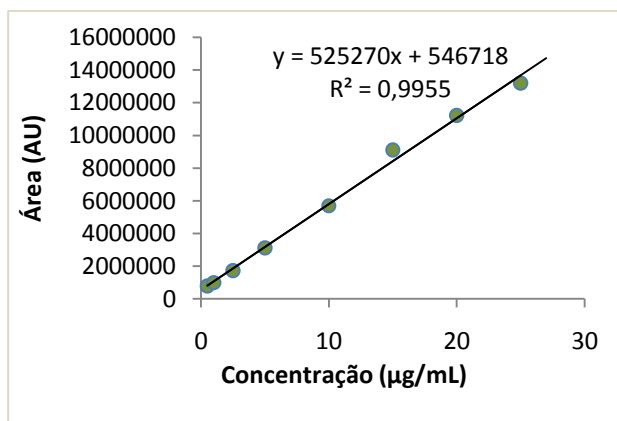


Figura 32. Curva de calibração da 10,11 epoxi-carbamazepina.

Tabela 8. Dados de linearidade para o fenobarbital.

CONCENTRAÇÃO (µg/mL)	ÁREA DE PICO	CONCENTRAÇÃO CALCULADA (µg/mL)	BIAS
0,5	166970	0,43	-14,98
1	271899	0,85	-15,04
2,5	694776	2,56	2,41
5	1330298	5,13	2,63
10	2432156	9,59	-4,11
15	4035718	16,08	7,17
20	4851039	19,37	-3,13
25	6240394	24,99	-0,02
7,5	1713480	6,68	-10,91
17,5	4275202	17,04	-2,60

Resultados e Discussão

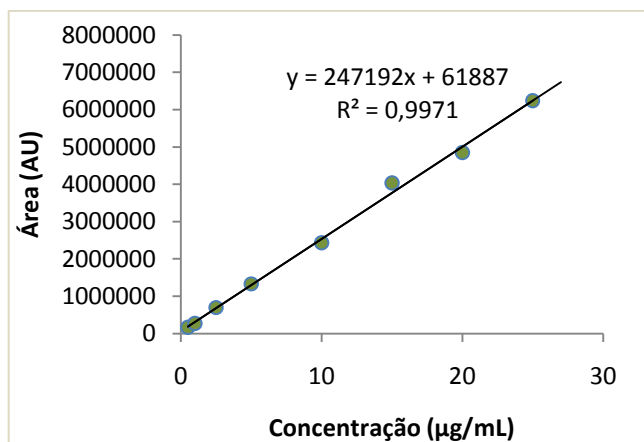


Figura 33. Curva de calibração do fenobarbital.

Tabela 9. Dados de linearidade da carbamazepina.

CONCENTRAÇÃO (µg/mL)	ÁREA DE PICO	CONCENTRAÇÃO CALCULADA (µg/mL)	BIAS
0,1	6876	0,12	16,67
0,25	32022	0,22	-10,55
0,5	102887	0,53	5,01
1	215186	1,00	0,27
2,5	610670	2,68	7,40
5	1133723	4,91	-1,80
10	2182153	9,37	-6,31
15	3695902	15,81	5,39
20	4603084	19,67	-1,66
25	5864416	25,03	0,13
7,5	1565978	6,75	-10,02
17,5	900284	19,12	9,27

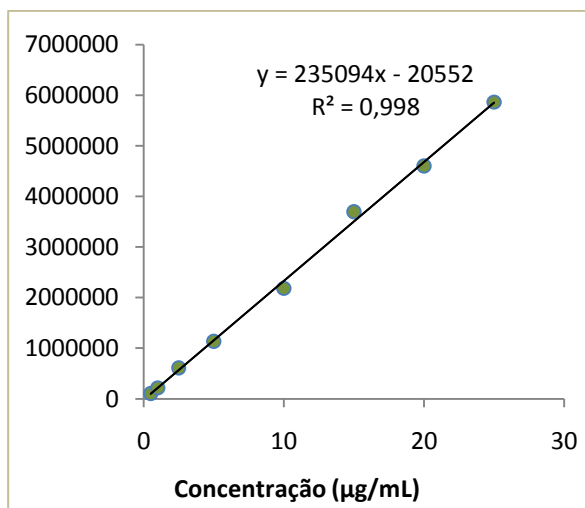


Figura 34. Curva de calibração da carbamazepina.

Tabela 10. Dados de linearidade para a fenitoína.

CONCENTRAÇÃO (µg/mL)	ÁREA DE PICO	CONCENTRAÇÃO CALCULADA (µg/mL)	BIAS
0,5	36062	0,56	11,28
1	169894	1,10	9,51
2,5	557032	2,65	6,14
5	1032118	4,57	-8,69
10	2293178	9,64	-3,58
15	3756291	15,53	3,54
20	4805568	19,75	-1,23
25	6130011	25,09	0,34
7,5	1544738	6,63	-11,61
17,5	4158015	17,15	-2,01

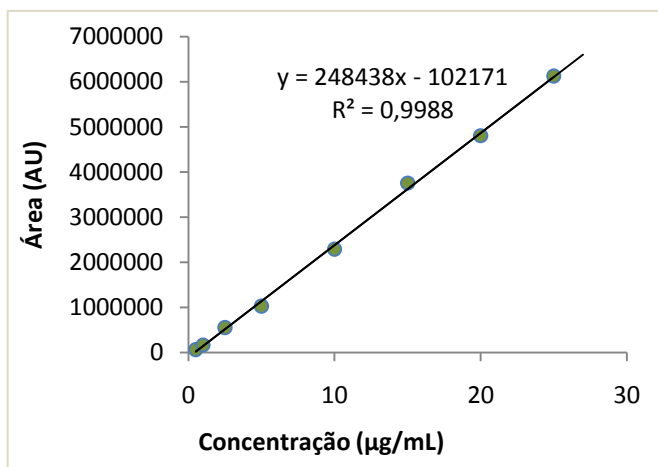


Figura 35. Curva de calibração da fenitoína.

Da análise destas tabelas e figuras, podemos concluir que o método descrito se mostrou linear dentro da gama de trabalho adoptada para cada um dos analitos estudados, já que se obteve um valor de R^2 superior a 0,99 e os valores de *bias* para todos os calibradores se situaram num intervalo de $\pm 20\%$, como estipulado nas normas de validação que seguimos neste trabalho.

2.5.4. Limites de detecção e quantificação

O limite de detecção (LOD) foi definido como a mais baixa concentração de analito testada, claramente distinguível do branco, que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada. Por outro lado, o limite de quantificação foi definido como a mais baixa concentração de analito que pode ser medida com precisão e exactidão adequadas, isto é, com um coeficiente de variação inferior a 20% e *bias* num intervalo de $\pm 20\%$ da concentração nominal (FDA 2001), (ICH 2005).

Para a determinação do LOD, e tendo em consideração o comportamento cromatográfico de cada um dos analitos, foram analisadas cinco réplicas para as concentrações de 0,25 e 0,10 $\mu\text{g/mL}$, verificando-se para qual destas concentrações a identificação dos analitos era ainda possível.

Quanto aos LOQ, estes foram considerados a concentração mais baixa da curva de calibração, de acordo com os critérios anteriormente referidos. No caso da primidona não foi possível identificar a substância para concentrações inferiores ao respectivo LOQ, pelo que este foi também o seu LOD.

Os valores de LOD e LOQ obtidos para cada um dos analitos são indicados na tabela 10.

Tabela 11. Valores de LOD e LOQ ($\mu\text{g/mL}$) para os antiepilépticos em estudo.

ANTIEPILÉPTICO	INTERVALO DE CALIBRAÇÃO ($\mu\text{g/mL}$)	LOD ($\mu\text{g/mL}$)	LOQ ($\mu\text{g/mL}$)
Primidona	1 - 25	1	1
10,11-epoxi-carbamazepina	0,5 - 25	0,1	0,5
fenobarbital	0,5 - 25	0,1	0,5
carbamazepina	0,1 - 25	0,05	0,1
fenitoína	0,5 - 25	0,25	0,5

Estes valores de limites de detecção são aceitáveis, tendo em consideração que se utilizou um detector de fotodiodos (menos sensível que a espectrometria de massa). Por outro lado, esta sensibilidade é perfeitamente adequada às concentrações terapêuticas destes compostos, ainda para mais tendo em conta o reduzido volume de amostra utilizado (200 μL).

2.5.5. Precisão e Exactidão

Em múltiplas alíquotas de uma amostra biológica, a precisão representa a variabilidade das medidas efectuadas em várias ocasiões, sendo normalmente expressa em termos de coeficiente de variação (CV) (FDA 2001).

Foram analisadas amostras de plasma fortificadas com todos os analitos alvo de estudo a duas concentrações (baixa e alta), e foi avaliada a precisão das medidas efectuadas no mesmo dia - precisão intradia - e em dias diferentes – precisão interdia.

De forma a determinar a precisão intradia, foram preparadas e analisadas no mesmo dia cinco réplicas de amostras de plasma fortificadas com concentrações de 2,5 e 15 µg/mL. Estas amostras foram analisadas de acordo com o método descrito, tendo sido calculados os coeficientes de variação e os valores de *bias* para cada uma delas (Tabelas 12-16).

Tabela 12. Valores obtidos para a precisão intradia e exactidão do método para a primidona a baixas e altas concentrações.

CONCENTRAÇÃO (µg/mL)	CONCENTRAÇÃO CALCULADA (µg/mL)	C.V.	BIAS
2,5	2,69	6,86	7,72
15	15,11	16,33	0,72

Tabela 13. Valores obtidos para a precisão intradia e exactidão do método para a 10,11-epoxi-carbamazepina a baixas e altas concentrações.

CONCENTRAÇÃO (µg/mL)	CONCENTRAÇÃO CALCULADA (µg/mL)	C.V.	BIAS
2,5	2,21	16,86	-11,74
15	14,31	10,49	-4,57

Tabela 14. Valores obtidos para a precisão intradia e exactidão do método para o fenobarbital a baixas e altas concentrações.

CONCENTRAÇÃO (µg/mL)	CONCENTRAÇÃO CALCULADA (µg/mL)	C.V.	BIAS
2,5	2,52	6,33	0,79
15	14,88	9,73	-0,78

Tabela 15. Valores obtidos para a precisão intradia e exactidão do método para a carbamazepina a baixas e altas concentrações.

CONCENTRAÇÃO (µg/mL)	CONCENTRAÇÃO CALCULADA (µg/mL)	C.V.	BIAS
2,5	2,67	2,76	6,83
15	15,05	10,28	0,33

Resultados e Discussão

Tabela 16. Valores obtidos para a precisão intradia e exactidão do método para a fenitoína a baixas e altas concentrações.

CONCENTRAÇÃO (µg/mL)	CONCENTRAÇÃO CALCULADA (µg/mL)	C.V.	BIAS
2,5	2,65	0,12	5,96
15	15,86	17,5	5,71

Para determinar a precisão e exactidão interdia foram preparadas e analisadas em nove dias diferentes amostras de plasma fortificadas a 7,5 e 17,5 µg/mL. As tabelas seguintes (Tabelas 17-21) mostram os valores obtidos para este parâmetro relativamente a cada um dos analitos.

Tabela 17. Valores obtidos para a precisão interdia e exactidão do método para a primidona a baixas e altas concentrações.

CONCENTRAÇÃO (µg/mL)	CONCENTRAÇÃO CALCULADA (µg/mL)	C.V.	BIAS
7,5	7,39	9,51	-1,45
17,5	16,98	16,90	-3,00

Foram obtidos valores de CV ligeiramente superiores aos preconizados nas normas seguidas. Esta situação pode dever-se ao facto de não ter sido utilizado padrão interno, pelo que pequenas variações durante o processo extractivo poderão ter provocado esta situação. Mesmo assim, tal facto não constitui um verdadeiro problema na análise quantitativa, tendo em consideração os valores obtidos para a precisão intradia. Deste modo, a solução do problema passará

forçosamente pela preparação de uma curva de calibração nova de cada vez que se aplicar a metodologia a amostras reais.

Tabela 18. Valores obtidos para a precisão interdia e exactidão do método para a carbamazepina a baixas e altas concentrações.

CONCENTRAÇÃO ($\mu\text{g/mL}$)	CONCENTRAÇÃO CALCULADA ($\mu\text{g/mL}$)	C.V.	BIAS
7,5	7,32	8,81	-2,4
17,5	18,51	14,65	5,75

Tabela 19. Valores obtidos para a precisão interdia e exactidão do método para a 10,11-epoxi-carbamazepina a baixas e altas concentrações.

CONCENTRAÇÃO ($\mu\text{g/mL}$)	CONCENTRAÇÃO CALCULADA ($\mu\text{g/mL}$)	C.V.	BIAS
7,5	7,35	7,23	-2,00
17,5	18,22	14,31	4,09

Tabela 20. Valores obtidos para a precisão interdia e exactidão do método para a fenobarbital a baixas e altas concentrações.

CONCENTRAÇÃO ($\mu\text{g/mL}$)	CONCENTRAÇÃO CALCULADA ($\mu\text{g/mL}$)	C.V.	BIAS
7,5	7,30	14,10	-2,68
17,5	18,19	11,66	3,95

Tabela 21. Valores obtidos para a precisão e exactidão interdia do método para a fenitoína a baixas e altas concentrações.

CONCENTRAÇÃO (µg/mL)	CONCENTRAÇÃO CALCULADA (µg/mL)	C.V.	BIAS
7,5	7,06	10,83	-5,89
17,5	17,22	14,18	-1,62

2.5.6. Estabilidade

A estabilidade de uma substância num fluido biológico varia em função das condições de armazenamento, das propriedades da substância em questão, da matriz em que se encontra e do tipo de embalagem. Foi avaliada em ciclos de congelação/descongelação e em amostras processadas.

2.5.6.1. Estabilidade a ciclos de congelação/descongelação

Foi testada a estabilidade dos analitos depois de submetidos a ciclos de congelação/descongelação a três níveis de concentração (2,5, 15 e 25 µg/mL). Para isso, as amostras de plasma fortificadas com os antiepilépticos foram congeladas por um período de 24 h e posteriormente descongeladas e mantidas à temperatura do laboratório durante 2 h. Este processo foi repetido mais duas vezes. Depois dos três ciclos, as amostras foram extraídas e analisadas de acordo com método anteriormente descrito. Os resultados obtidos foram comparados com os de amostras preparadas e analisadas no mesmo dia. Os valores não se desviaram acima dos 6%, pelo que se pode afirmar que os analitos não são afectados negativamente pelos processos de armazenamento das amostras utilizados no laboratório, sendo estáveis pelo menos durante três ciclos de congelação/descongelação.

2.5.6.2. Estabilidade de amostras processadas

A estabilidade dos analitos em amostras processadas foi estudada a três níveis de concentração (2,5, 15 e 25 µg/mL). Os extractos obtidos após aplicação do procedimento de extracção descrito foram mantidos à temperatura ambiente. Após 24 horas a esta temperatura foram analisados, e os resultados comparados com os obtidos por análise de amostras preparadas e analisadas no mesmo dia. Obteve-se uma variação inferior a 15% para todos os analitos às três concentrações, pelo que se pode afirmar que os analitos são estáveis nas amostras processadas à temperatura ambiente por um período de pelo menos 24 horas.

2.5.7. Recuperação

A recuperação do método foi avaliada por comparação das áreas de pico obtidas após extracção com as obtidas por análise de extractos brancos fortificados com os analitos. A recuperação do analito não é um dos parâmetros mais importantes na validação de métodos bioanalíticos, desde que a sua precisão e exactidão sejam adequadas. A recuperação de um método não necessita de ser de 100%, mas sim consistente, precisa e reprodutível, especialmente no presente caso, em que não é utilizado um padrão interno para compensar as perdas durante a extracção.

Para calcular a recuperação do método, foram fortificadas amostras de plasma a três concentrações com todos os analitos (2,5, 15 e 25 µg/mL) As áreas dos picos referentes aos analitos foram comparadas com as obtidas após adição das substâncias aos extractos de amostras de plasma branco (correspondendo a uma recuperação de analito de 100%).

Resultados e Discussão

Os valores da recuperação² para os analitos em estudo encontram-se na tabela que se segue (Tabela 22).

Tabela 22. Valores de recuperação para os vários analitos em estudo.

CONCENTRAÇÕES (µg/mL)	RECUPERAÇÃO, % (MÉDIA ±SD)				
	PRIMIDONA	10,11-EPOXI-CARBAMAZEPINA	FENOBARBITAL	CARBAMAZEPINA	FENITOÍNA
2,5	92,58± 2,12	92,30±6,51	112,01± 5,10	85,84±7,74	92,05± 3,48
15	101,8± 3,10	95,84±3,36	90,44±5,72	94,60±3,41	94,08± 4,94
25	92,20± 7,18	96,41±1,2	91,26± 6,70	95,70± 6,21	91,82± 3,71

Foram obtidas recuperações acima dos 90% para todos os analitos e para as três concentrações, excepto a 2,5 µg/mL para a carbamazepina (86%). Apesar disso, acredita-se que as recuperações são excelentes, não diferindo de 100% em alguns casos. Este facto assume extrema importância, especialmente se tivermos em consideração que não foi utilizado padrão interno. Por causa disso, as amostras reais terão de ser analisadas de acordo com as premissas anteriormente referidas.

² Recuperação (%) = $\frac{\text{área do pico do analito sujeito a extracção}}{\text{área do pico do analito não sujeito a extracção}} \times 100$

2.6. Aplicação do método a amostras reais

Como parte do processo de validação, o método foi aplicado a amostras reais, pertencendo a indivíduos intoxicados com antiepilépticos (Tabela 23, Figura 36).

Tabela 23. Compostos identificados nas amostras reais e respectiva quantificação

AMOSTRA	COMPOSTO	CONCENTRAÇÃO ($\mu\text{g/mL}$)	OUTROS FÁRMACOS DETECTADOS (GC/MS)
#1	carbamazepina	5,97	
#2	carbamazepina	8,75	
#3	carbamazepina	1,48	
#4	fenobarbital	43,58	

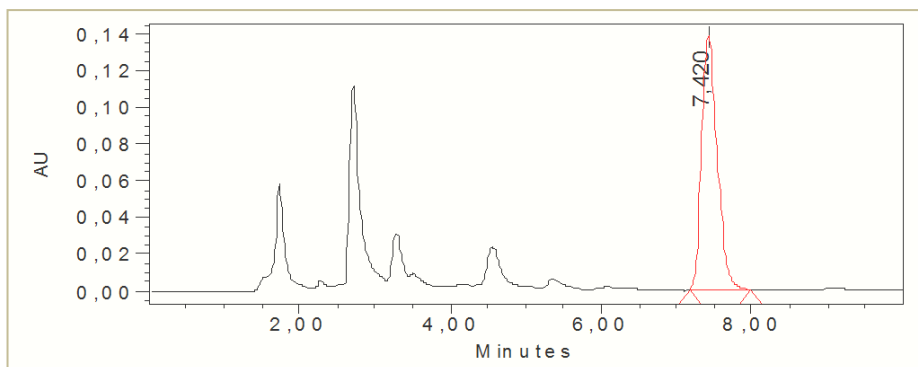


Figura 36. Cromatograma de amostra real #2 (concentração de carbamazepina 8,75 $\mu\text{g/mL}$)

CONCLUSÕES

1. É proposto um método analítico baseado na extração em fase sólida e análise por cromatografia líquida acoplada a um detector de fotodiodos para a determinação de quatro fármacos antiepilépticos e um metabolito activo em amostras de plasma.
2. Este método demonstrou ser selectivo, linear, preciso e exacto, segundo critérios internacionalmente aceites para a validação de métodos bioanalíticos.
3. Utilizando apenas um volume de amostra de 200 μL , a sensibilidade do método foi adequada para detectar as concentrações normalmente associadas a intoxicações por este tipo de substâncias, bem como valores subterapêuticos em metabolizadores lentos.
4. Os principais parâmetros que influenciam o processo de extração foram otimizados previamente com o objectivo de maximizar a recuperação e obter baixos limites de detecção e quantificação. Deste modo, obtiveram-se valores consistentes de recuperação superiores a 90% para todos os compostos estudados, e limites de detecção e quantificação comparáveis aos publicados por outros autores mas utilizando um menor volume de amostra.
5. Por tudo o exposto anteriormente, a metodologia descrita constitui um processo adequado para a determinação destes compostos no âmbito da Toxicologia Clínica e Forense, tanto na monitorização terapêutica, como em intoxicações mortais.

Bibliografia

- Alves, G., Figueiredo I, Castel-Branco M, Loureiro A, Falcão A, Caramona M. (2007). "Simultaneous and enantioselective liquid chromatographic determination of eslicarbazepine acetate, S-licarbazepine, R-licarbazepine and oxcarbazepine in mouse tissue samples using ultraviolet detection." Anal Chim Acta. **596(1)**: 8.
- Alzola, R., Pons B, Bravo D, Arranz A. (2009). "Determination of linear alkylbenzenesulfonates (LASs) in sewage sludge and carrots by capillary electrophoresis--UV detection." Environ Technol. **30(5)**: 5.
- Barroso, M., Dias M, Vieira DN, López-Rivadulla M, Queiroz JA (2010). "Simultaneous quantification of methadone, cocaine, opiates, and metabolites in human placenta by liquid chromatography-mass spectrometry." Anal Bioanal Chem. **396(8)**: 10.
- Barroso, M., Dias M, Vieira DN, Queiroz JA, López-Rivadulla M. (2008). "Development and validation of an analytical method for the simultaneous determination of cocaine and its main metabolite, benzoylecgonine, in human hair by gas chromatography/mass spectrometry." Rapid Commun Mass Spectrom. **22(20)**: 6.
- Barroso M., D. M., Vieira D.N., López-Rivadulla M., Queiroz J.A. (2010). "Mixed-mode solid-phase extraction for sample cleanup in hair analysis for methadone and its main metabolite." Biomedical Chromatography
- Baselt, R. (2004). Disposition of Toxic drugs and chemicals in man. Foster City, Biomedical Publication.
- Blonk, M. I., van der Nagel BC, Smit LS, Mathot RA (2010). "Quantification of levetiracetam in plasma of neonates by ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry." J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci. **878 (7-8)**: 6.
- Bradley, W. G. R. B. D. G. M. F. J. J. (2004). Neurology in Clinical Practice.
- Brunetto, M. R., Contreras Y, Delgado Y, Gallignani M, Estela JM, Martin VC. (2009). "Development and validation of a rapid column-switching high-performance liquid chromatographic method for the determination of Lamotrigine in human serum." J Chromatogr Sci. **47(6)**: 6.
- CCOHS, C. C. f. O. H. a. S.-. (1996). "INCHEM - Chemical Safety Information from Intergovernmental Organizations." Retrieved 14-12-2009, from <http://www.inchem.org/documents/pims/pharm/pim100.htm>.
- Cheong, J. C., Suh SI, Ko BJ, Kim JY, In MK, Cheong WJ. (2010). "Gas chromatography-mass spectrometric method for the screening and quantification of illicit drugs and their metabolites in human urine using solid-phase extraction and trimethylsilyl derivatization." J Sep Sci. **33(12)**: 11.
- Concheiro, M., de Castro A, Quintela O, López-Rivadulla M, Cruz A. (2005). "Determination of MDMA, MDA, MDEA and MBDB in oral fluid using high

- performance liquid chromatography with native fluorescence detection." Forensic Sci Int. **150 (2-3)**: 5.
- Concheiro, M., Jones HE, Johnson RE, Choo R, Shakleya DM, Huestis MA. (2010). "Maternal buprenorphine dose, placenta buprenorphine, and metabolite concentrations and neonatal outcomes." Ther Drug Monit **32(2)**: 9.
- Contin, M., Mohamed S, Albani F, Riva R, Baruzzi A (2008). "Simple and validated HPLC-UV analysis of levetiracetam in deproteinized plasma of patients with epilepsy." J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci. **873(1)**: 3.
- Contin, M., Mohamed S, Candela C, Albani F, Riva R, Baruzzi A. (2010). "Simultaneous HPLC-UV analysis of rufinamide, zonisamide, lamotrigine, oxcarbazepine monohydroxy derivative and felbamate in deproteinized plasma of patients with epilepsy." J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci. **878(3-4)**: 4.
- de Castro, A., Concheiro M, Quintela O, Cruz A, López-Rivadulla M. (2008). "LC-MS/MS method for the determination of nine antidepressants and some of their main metabolites in oral fluid and plasma. Study of correlation between venlafaxine concentrations in both matrices." J Pharm Biomed Anal. **48(1)**: 10.
- E.Gallardo, M. B., S. Costa (2009). "Solid-phase microextraction as a sample preparation technique in analytical chemistry and toxicology: theory and applications." Revista Lusófona de Ciências e Tecnologias da Saúde **6**: 19.
- Epilepsy, I. L. A. (2010). "Revised terminology and concepts for organization of the epilepsies: Report of the Commission on Classification and Terminology." Retrieved 2.04.2010, from <http://www.ilae-epilepsy.org/Visitors/Documents/ClassificationSummaryReportwebAug2009.pdf>.
- FDA. (2001). "Guidance for Industry - Bioanalytical Method Validation." Retrieved 20/09/2010, from <http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/UCM070107.pdf>.
- Flórez, J. J. A. A., África Mediavilla (1997). Farmacología humana. Barcelona, Masson, S.A.
- Fortuna, A., Sousa J, Alves G, Falcão A, Soares-da-Silva P. (2010). "Development and validation of an HPLC-UV method for the simultaneous quantification of carbamazepine, oxcarbazepine, eslicarbazepine acetate and their main metabolites in human plasma." Anal Bioanal Chem. **397(4)**: 10.
- Franco, V., Mazzucchelli I, Fattore C, Marchiselli R, Gatti G, Perucca E. (2007). "Stereoselective determination of vigabatrin enantiomers in human plasma by high performance liquid chromatography using UV detection." J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci. **854(1-2)**: 5.

- Fritz JS, M. M. (2000). "Solid-phase trapping of solutes for further chromatographic or electrophoretic analysis." J Chromatogr A **902(1)**: 29.
- Gallardo, E., M. Barroso, S. Costa (2009). "Solid-phase microextraction as a sample preparation technique in analytical chemistry and toxicology: theory and applications." Revista Lusófona de Ciências e Tecnologias da Saúde **6**: 19.
- Gil, J. e. a. (2005). "Principios de Urgencias, Emergencias y cuidados críticos." Retrieved 25-03-2010, from <http://tratado.uninet.edu/c040202.html#2.7.2>.
- Goswami, D., Kumar A, Khuroo AH, Monif T, Rab S. (2009). "Bioanalytical LC-MS/MS method validation for plasma determination of topiramate in healthy Indian volunteers." Biomed Chromatogr **23(11)**: 14.
- Gupta, V. K., Singh AK, Gupta B. (2007). "Development of membrane electrodes for selective determination of some antiepileptic drugs in pharmaceuticals, plasma and urine." Anal Bioanal Chem. **389(6)**: 9.
- H-J., H. (2001). Handbook of GS/MS - Fundamentals and applications.
- H. Stefan, T. J. F. (2007). "Novel anticonvulsant drugs." Pharmacology & Therapeutics **113**: 19.
- Hao, C., Nguyen B, Zhiao X, Chen E, Yang P. (2010). "Determination of residual carbamate, organophosphate, and phenyl urea pesticides in drinking and surface water by high-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry." J AOAC Int. **2010** **93(2)**: 10.
- Hayward, D. G., Pisano TS, Wong JW, Scudder RJ. (2010). "Multiresidue method for pesticides and persistent organic pollutants (POPs) in milk and cream using comprehensive two-dimensional capillary gas chromatography-time-of-flight mass spectrometry." J Agric Food Chem. **2010** **58(9)**: 8.
- Heideloff C, B. D., Wang S. (2010). "A novel HPLC method for quantification of 10 antiepileptic drugs or metabolites in serum/plasma using a monolithic column." Ther Drug Monit **32 (1)**: 4.
- ICH (2005). "ICH Harmonised Tripartite Guideline - Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2(R1)."
- Infarmed (2010) "Prontuário Terapêutico." **Antiepilépticos e anticonvulsivantes.**
- Iraneta, P. C. E. S. P. B. D. J. L., Elizabeth K. Brown, Dorothy J. Phillips, Jeng-Jong Lee, Henry Cheng, Robert A. Collamati, Daniel P. Walsh (1999). Variables influencing retention and recovery on a new mixed-mode SPE sorbent Waters Corporation: 26.
- Jalalizadeh, H., Souri E, Tehrani MB, Jahangiri A (2007). "Validated HPLC method for the determination of gabapentin in human plasma using pre-column derivatization with 1-fluoro-2,4-dinitrobenzene and its application to a pharmacokinetic study." J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci. **854(1-2)**: 5.
- Jiménez-Díaz, I., Ballesteros O, Zafra-Gómez A, Crovetto G, Vílchez JL, Navalón A, Verge C, de Ferrer JA (2010). "New sample treatment for the determination of alkylphenols and alkylphenol ethoxylates in agricultural soils." Chemosphere. **80(3)**: 7.

- Johnson, L. L. a. U. G. (2010). "Quantitation of amobarbital, butalbital, pentobarbital, phenobarbital, and secobarbital in urine, serum, and plasma using gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS)." Methods Mol Biol. **603**: 9.
- Kamel, A., Qian Y, Kolbe E, Stafford C. (2010). "Development and validation of a multiresidue method for the determination of neonicotinoid and macrocyclic lactone pesticide residues in milk, fruits, and vegetables by ultra-performance liquid chromatography/MS/MS." 2010 **93(2)**: 10.
- Krupadam, R. J., Bhagat B, Khan MS. (2010). "Highly sensitive determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in ambient air dust by gas chromatography-mass spectrometry after molecularly imprinted polymer extraction." Anal Bioanal Chem. [Epub ahead of print].
- LandMark, C. J. (2006). "Targets for antiepileptic drugs in the synapse." Med Sci Monit **13 (1)**: 7.
- Landmark, C. J. a. S. I. J. (2008). "Modifications of Antiepileptic Drugs for Improved Tolerability and Efficacy." Perspectives in Medicinal Chemistry **2**: 21-39.
- LaRoche, S. M. M. S. L. H., MD (2004). "The New Antiepileptic Drugs." JAMA - The Journal of the American Medical Association **291**: 9.
- Laurence, D. R., Bennet, P.N., Brown, M.J, Ed. (1997). Clinical Pharmacology, Churchill Livingstone.
- Lemke, T. L. D. A. W., Victoria F. Roche, S. William Zito, Ed. (2008). Foye's Principles of Medicinal Chemistry, Lippincott, Williams & Wilkins.
- Lim, K. B., Ozbal CC, Kassel DB. (2010). "Development of a high-throughput online solid-phase extraction/tandem mass spectrometry method for cytochrome P450 inhibition screening." J Biomol Screen. **15(4)**: 5.
- Majkowski, J. B. B. P. P. R. M. (2005). Antiepileptic Drugs. Combination therapy and interactions. C. U. Press. New York.
- Malawska, B. (2005). "New Anticonvulsant Agents." Current Topics in Medicinal Chemistry **2005** **5(1)**.
- Margalho, C., Barroso M, Gallardo E, Monsanto P, Vieira DN. (2007). "Massive intoxication involving unusual high concentration of amitriptyline." Hum Exp Toxicol. **26(8)**: 3.
- Marin, S. J., McMillin GA. (2010). "LC-MS/MS analysis of 13 benzodiazepines and metabolites in urine, serum, plasma, and meconium." Methods Mol Biol. **603**: 6.
- Martín, J., Santos JL, Aparicio I, Alonso E (2010). "Multi-residue method for the analysis of pharmaceutical compounds in sewage sludge, compost and sediments by sonication-assisted extraction and LC determination." J Sep Sci. **33(12)**: 6.
- Masqué N, M. R., Borrull F. (1998). "New polymeric and other types of sorbents for solid-phase extraction of polar organic micropollutants from environmental water." Trends in Analytical Chemistry **17(6)**: 10.

- Masqué, N. M. R., Borrull F. (1998). "New polymeric and other types of sorbents for solid-phase extraction of polar organic micropollutants from environmental water." Trends in Analytical Chemistry **17(6)**: 10.
- Matar, K. M. (2008). "Quantification of levetiracetam in human plasma by liquid chromatography-tandem mass spectrometry: application to therapeutic drug monitoring." J Pharm Biomed Anal. **48(3)**: 822.
- Matsuura, K., Ohmori T, Nakamura M, Itoh Y, Hirano K. (2008). "A simple and rapid determination of valproic acid in human plasma using a non-porous silica column and liquid chromatography with tandem mass spectrometric detection." Biomed Chromatogr. **22(4)**: 6.
- Mazzucchelli, I., Franco V, Fattore C, Marchiselli R, Perucca E, Gatti G. (2007). "A novel enantioselective microassay for the high-performance liquid chromatography determination of oxcarbazepine and its active metabolite monohydroxycarbazepine in human plasma." Ther Drug Monit. **29(3)**: 5.
- Mc Namara, J. O. (1996). Drugs effective in the therapy of the epilepsies, Mc Graw-Hill
- McDonald, P. D., Edouard S.P. Bouvier (2001). A Sample Preparation Primer and Guide to Solid Phase Extraction Methods Development, Waters: 83.
- McMillin GA, J. J., Tso G, Dasgupta A. (2010). "Estimation of carbamazepine and carbamazepine-10,11-epoxide concentrations in plasma using mathematical equations generated with two carbamazepine immunoassays." Am J Clin Pathol. **133 (5)**: 8.
- Mendu, D. R., Soldin SJ. (Março 2010). "Simultaneous determination of levetiracetam and its acid metabolite (ucb L057) in serum/plasma by liquid chromatography tandem mass spectrometry." Clin Biochem. **43 (4-5)**: 4.
- Mennickent S, F. R., Vega M, de Diego M, Godoy CG (2009). "INSTRUMENTAL PLANAR CHROMATOGRAPHIC METHOD FOR DETERMINATION OF CARBAMAZEPINE IN HUMAN SERUM." J Sep Sci. **32(9)**: 4.
- Mennickent, S., Vega M, Godoy CG, León MD (2007). "[Saliva and plasma levels of carbamazepine have a poor correlation: a pilot study]." Rev Med Chil. **135(3)**: 5.
- Mercolini, L., Mandrioli R, Amore M, Raggi MA. (2010). "Simultaneous HPLC-F analysis of three recent antiepileptic drugs in human plasma." J Pharm Biomed Anal. **53(1)**: 5.
- Moffat AC, O. M., Widdop B, (2004). Clarke's Analysis of Drugs and Poisons, London: Pharmaceutical Press.
- Momplaisir, G. M., Rosal CG, Heithmar EM, Varner KE, Riddick LA, Bradford DF, Tallent-Halsell NG. (2010). "Development of a solid phase extraction method for agricultural pesticides in large-volume water samples." Talanta. **81(4-5)**: 6.
- Monteiro, C., Batel Marques F., Fontes Ribeiro C. (2007). "Interacções medicamentosas como causa de iatrogenia evitável. ." Rev Port Clin Geral **23**: 10.

- Musenga, A., Mandrioli R, Comin I, Kenndler E, Raggi MA. (2007). "Determination of vigabatrin in human plasma by means of CE with LIF detection." Electrophoresis. **28(19)**: 6.
- Musenga A, S. M., Sani G, Raggi MA (2009). "Antipsychotic and antiepileptic drugs in bipolar disorder: the importance of therapeutic drug monitoring." Curr Med Chem. **16 (12)**: 18.
- Nadendla, R. R. (2005). Principles of Organic Medicinal Chemistry
P. New Age International (P) Limited.
- Nishida M, N. A., Yashiki M, Kojima T. (2003). "Routine analysis of amphetamine and methamphetamine in biological materials by gas chromatography-mass spectrometry and on-column derivatization." J Chromatogr B Analyt technol Biomed Life Sci. **789 (1)**: 6.
- Oliveira-Silva, D., Oliveira CH, Mendes GD, Galvinas PA, Barrientos-Astigarraga RE, De Nucci G. (2009). "Quantification of chlordesmethyldiazepam by liquid chromatography-tandem mass spectrometry: application to a cloxazolam bioequivalence study." Biomed Chromatogr. **23(12)**: 9.
- Park, J. H., Park YS, Lee MH, Rhim SY, Song JC, Lee SJ, Kim JM, Shaw LM, Kang JS (2008). "Determination of plasma topiramate concentration using LC-MS/MS for pharmacokinetic and bioequivalence studies in healthy Korean volunteers." Biomed Chromatogr. **22(8)**: 8.
- Pinto, C. (2010). "Vários golos pela Epilepsia." Jornal do Centro de Saúde.
- Piotr Czapinski, B. B., Stanislaw J. Czuczwar (2005). "Mechanisms of Action of Antiepileptic Drugs." Current Topics in Medicinal Chemistry 2005 **5**: 11.
- Qi, P., Wang J, Jin J, Su F, Chen J. (2010). "2,4-Dimethylphenol imprinted polymers as a solid-phase extraction sorbent for class-selective extraction of phenolic compounds from environmental water." Talanta. **81(4-5)**: 5.
- Queiroz SCN, C. C., Jardim ICSF (2001). "Métodos de extracção e/ou concentração de ompostos encontrados em fluidos biológicos para posterior determinação cromatográfica." Quí Nova **24(1)**: 8.
- Saracino, M. A., Koukopoulos A, Sani G, Amore M, Raggi MA. (2007). "Simultaneous high-performance liquid chromatographic determination of olanzapine and lamotrigine in plasma of bipolar patients." Ther Drug Monit. **29(6)**: 7.
- Saracino, M. A., Tallarico K, Raggi MA (2010). "Liquid chromatographic analysis of oxcarbazepine and its metabolites in plasma and saliva after a novel microextraction by packed sorbent procedure." Anal Chim Acta **661(2)**: 6.
- Schachter, S. C. (2007). "Currently Available Antiepileptic Drugs." Neurotherapeutics: The Journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics **4**: 8.
- Serra, A. M., Estela JM, Coulomb B, Boudenne JL, Cerdà V. (2010). "Solid phase extraction--multisyringe flow injection system for the spectrophotometric determination of selenium with 2,3-diaminonaphthalene." Talanta. **81(1-2)**: 6.
- Shakya G, M. S., Shakya KN, Shrestha R. (2008). "Therapeutic drug monitoring of antiepileptic drugs." JNMA J Nepal Med Assoc. **47 (171)**: 4.

- Shorvon, S. E. P., David Fish and Edwin Dodson (2004). The treatment of Epilepsy. B. Publishing.
- Simpson, N. J. K. a. P. M. W. (2000). Solid-Phase extraction, Principles, Techniques and Applications. N. J. K. Simpson. Harbor City, California, Marcel Dekker.
- Stefan, H. T. J. F. (2007). "Novel anticonvulsant drugs." Pharmacology & Therapeutics **113**: 19.
- Striano, S. P. S., Domenico Capone, Francesco Pisani (2008). "Limited place for plasma monitoring of new aniepileptic drugs in clinical practice." Med Sci Monit **14**: 6.
- Telepchak, M. J. T. F. A., Glynn Chaney (2004). Forensic and Clinical Applications of Solid Phase Extraction. H. Press. Totowa, New Jersey.
- Thurman, E. M. a. M. S. M. (1998). Solid-Phase Extraction - Principles and Practice, Wiley-Interscience.
- Uges, D. (2009). "The international Association of Forensic Toxicologist. Reference blood level list of therapeutic and toxic substances ", from http://www.tiaft.org/tmembers/ttv/ttv_el.php.
- van den Broek, I., Sparidans RW, Schellens JH, Beijnen JH. (2010). "Sensitive liquid chromatography/tandem mass spectrometry assay for absolute quantification of ITIH4-derived putative biomarker peptides in clinical serum samples." Rapid Commun Mass Spectrom **24(13)**: 8.
- Van Hout MWJ, N. d. H., de Zeeuw RA, Jong GJ. (2003). Handbook of Analytical Separations: Pharmaceuticals/Veterinary - Toxicology/Metabolism. New developments in integrated sample preparation fr bioanalysis.
- Wang, Y. (1997). Sample preparation/concentration for trace analysis in GC/MS (A study of solid phase microextraction and headspace sampling). V. Virginia Polytechnic, Institute and State University.
- Waters (2003) "Oasis Applications Notebook." **Section2: Oasis reversed-phase (HLB) optimized methodology**
16-17.
- Waters (2003) "Oasis MCX Product and Generic Method Information [Excerpt from Oasis Applications Notebook]." 1.
- Waters (2003). "Waters Information Center SPE Sorbents."
- Waters (2010). "Oasis sample extraction products."
- Waters (2010). "Oasis SPE."
- Wattananat, T., Akarawut W. (2009). "Validated LC-MS-MS method for the determination of gabapentin in human plasma: application to a bioequivalence study." J Chromatogr Sci. **47(10)**: 4.
- Wu, X., Liu L, Zhang M, Wu D, Wang Y, Sun Y, Fawcett JP, Gu J, Zhang J. (2010). "Simultaneous analysis of isomers of escin saponins in human plasma by liquid chromatography-tandem mass spectrometry: application to a pharmacokinetic study after oral administration." J Chromatogr B Analyt technol Biomed Life Sci. **878(11-12)**: 6.

- Zhang, Y., Mehrotra N, Budha NR, Christensen ML, Meibohm B. (2008). "A tandem mass spectrometry assay for the simultaneous determination of acetaminophen, caffeine, phenytoin, ranitidine, and theophylline in small volume pediatric plasma specimens." Clin Chim Acta. **398(1-2)**: 7.
- Zufía, L., Aldaz A, Ibáñez N, Giráldez J, Viteri C. (2010). "LC method for therapeutic drug monitoring of levetiracetam: Evaluation of the assay performance and validation of its application in the routine area." Clin Biochem. **43(4-5)**: 9.
- Zufía, L., Aldaz A, Ibáñez N, Viteri C. (2009). "LC method for the therapeutic drug monitoring of lamotrigine: evaluation of the assay performance and validation of its application in the routine area." J Pharm Biomed Anal. **49(2)**: 6.