

Monitorização terapêutica de anticonvulsivantes

Silvia de Oliveira Santos Cazenave¹

Cristiane Leslie Correa²

Paula Cristiane Soubhia³

Nádia Barbosa Rezende³

Yara Araújo⁴

RESUMO

Refere-se a monitorização de níveis plasmáticos de fármacos como um instrumento valioso para assegurar uma terapia com o máximo de eficácia e o mínimo de efeitos tóxicos, de maneira individual, uma vez que os efeitos terapêuticos e tóxicos são melhores relacionados à concentração plasmática do que à dose administrada. Os métodos analíticos freqüentemente utilizados na determinação e quantificação dos anticonvulsivantes são a cromatografia em fase gasosa (CG), a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e as técnicas de imunoensaio (IFP). Realizou-se a determinação de primidona (PRD); fenobarbital (FNB); fenitoína (FNT); carbamazepina (CBZ) e carbamazepina epóxido (CBZe) nas amostras de plasma liofilizado através de CG, CLAE e IFP e comparou-se os resultados obtidos pelos métodos utilizados a fim de verificar se há concordância entre os mesmos. A comparação foi realizada frente aos resultados enviados pelo Health Control - Cardiff.

Unitermos: anticonvulsivos, cromatografia gasosa, cromatografia líquida.

INTRODUÇÃO

A monitorização de níveis plasmáticos de fármacos tem sido um instrumento valioso para assegurar uma terapia com o máximo de eficácia e o mínimo de efeitos tóxicos, de maneira individual, uma vez que os efeitos terapêuticos e tóxicos são melhores relacionados à concentração plasmática do que à dose administrada.

Desta forma, o controle terapêutico deve ser instituído em terapias a longo prazo, quando a razão terapêutica é baixa, quando a correlação dose/resposta não é previsível, em politerapias, quando não há correlação entre a concentração plasmática do fármaco e eficácia e/ou toxicidade, além de outras indicações clínicas¹.

Devido ao fato dos anticonvulsivantes estarem relacionados com algumas das condições clínicas citadas, verifica-se a importância da monitorização terapêutica para estes fármacos².

Os métodos analíticos freqüentemente utilizados na determinação e quantificação dos anticonvulsivantes são a cromatografia em fase gasosa, a cromatografia líquida de alta eficiência e as técnicas de imunoensaio³.

Neste trabalho realizou-se a determinação de primidona (PRD), fenobarbital (FNB), fenitoína (FNT), carbamazepina (CBZ) e carbamazepina epóxido (CBZe) nas amostras de plasma liofilizado através de cromatografia a gás (CG), cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e imuno fluorescência polarizada (IFP), comparando-se os resultados obtidos pelos métodos utilizados a fim de verificar se há concordância entre os mesmos.

MATERIAL E MÉTODOS

Analizou-se amostras de plasma liofilizado enviadas pelo Health Control - Cardiff, as quais foram ressuspensas

(¹) Professora Adjunta de Toxicologia e Coordenadora do Curso de Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Ciências Médicas da PUCAMP.

(²) Professora de Toxicologia do Curso de Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Ciências Médicas da PUCAMP.

(³) Graduandas do Curso de Pós-Graduação em Análises Toxicológicas da USP.

(⁴) Professora de Toxicologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP.

com 5mL de água miliQ e a seguir submetidas aos métodos analíticos IFP, CG e CLAE. As oito amostras enviadas, H80292; H80592; H80692; H80792; H80992; H81192; H91292 e H80193 foram preparadas com a adição de fármacos puros em um plasma isento dos mesmos, onde os valores adicionados foram calculados a partir do peso das alíquotas e da gravidade específica do plasma. Todas as amostras foram preparadas usando-se plasma de novilho.

Além das amostras também foram processados calibradores e controles (baixo, médio e alto). No método

IFP os seis calibradores e controles de concentrações conhecidos foram fornecidos pelo próprio fabricante. Os quatro calibradores usados em CG e CLAE, aos quais adicionaram-se concentrações conhecidas dos fármacos, foram preparados em solução metanólica, evaporados e ressuspensos com 1mL de "pool" de plasma humano.

Para realização das curvas de calibração nos métodos de CG e CLAE, soluções estoque foram preparadas para cada um dos fármacos e a partir das quais foram feitas diluições adequadas para a monitorização terapêutica (Tabela 1).

Tabela 1. Diluições dos fármacos utilizados nas análises.

Fármacos	Solução estoque µg / mL	Diluição 1 µg / mL	Diluição 2 µg / mL	Diluição 3 µg / mL	Diluição 4 µg / mL
CBZ	500	25	20	10	0,5
CBZe	100	5	2	1	0,05
FNT	600	30	24	12	3
FNB	100	50	40	20	1
PRM	100	25	20	10	2

CBZ = carbamazepina
 CBZe = carbamazepina epóxido
 FNT = fenitoína
 FNB = fenobarbital
 PRM = primidona

Os três métodos propostos para a comparação têm sido amplamente citados na literatura, indicados à monitorização terapêutica de diversos fármacos¹:

1. Imunofluorescência polarizada (IFP): é um imunoenensaio do tipo homogêneo, sem necessidade de uma fase de separação, empregado no controle de fármacos e do uso abusivo de drogas. Nesta pesquisa utilizou-se o equipamento VitalabEclair®, Merck. Seu fundamento está baseado na monitorização da fluorescência em função da reação antígeno-anticorpo. A substância fluorescente utilizada, Fluoresceína, é geralmente ligada ao antígeno, sendo o produto desta ligação chamado de traçador. A intensidade de fluorescência emitida pode ser polarizada. Quando uma amostra sem antígeno é colocada em contato com o reagente observamos um alto valor de polarização. No entanto, se na amostra existirem antígenos, estes vão competir pelos sítios de ligação do anticorpo, e antígenos marcados ficarão livres em solução, gerando uma diminuição na polarização³ (Figura 1).

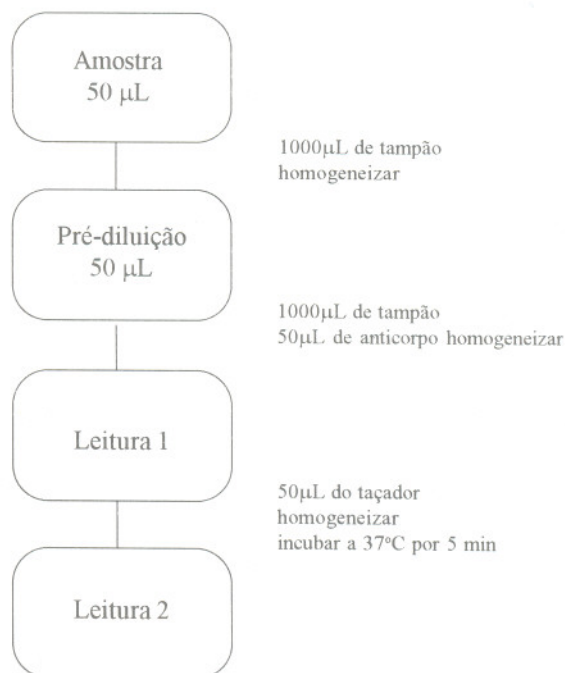


Figura 1. Fluxograma da técnica de Imunofluorescência polarizada (IFP) - Eclair®

2. **Método cromatográfico por CLAE:** foi utilizada como fase móvel a solução de acetonitrila: água (3:7), com velocidade de fluxo de 1mL/min; coluna supelcosil

LC-ABZ, detector UV; 5(p-metilfenil) 5-fenilhidantoína como padrão interno e equipamento LKB Bromma (Figura 2).

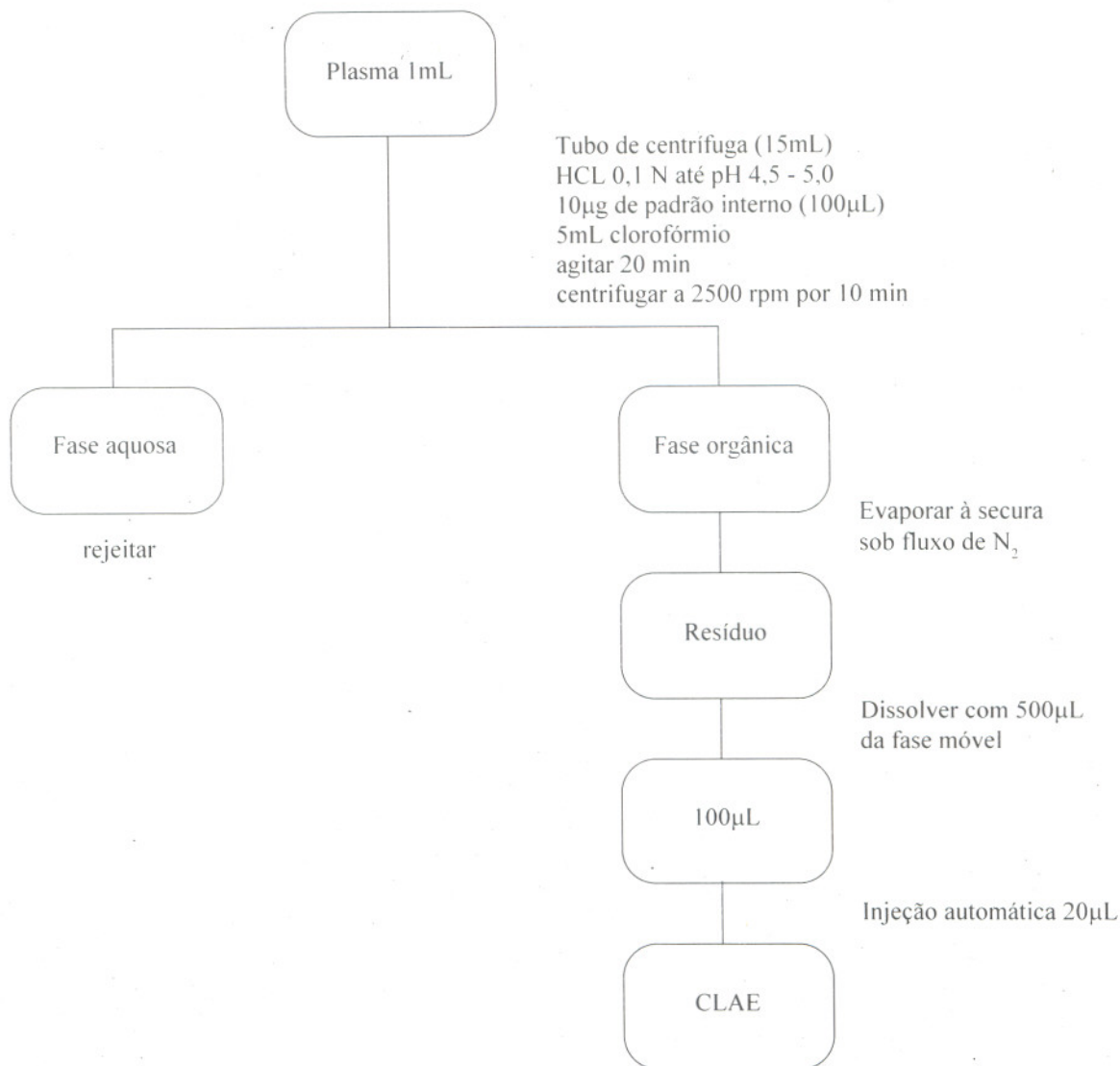


Figura 2. Fluxograma da técnica de Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

3. **Cromatografia em fase gasosa:** o equipamento utilizado foi um CG modelo 370 da Instrumentos Científicos CG Ltda, com detector de ionização de chama e temperaturas de 210° C para

coluna e 280°C para vaporizador e detector (Figura 3). O padrão interno utilizado foi 5(p-metilfenil)-5-fenilhidantoína e como agente metilante o hidróxido de trimetilfenilamônio.

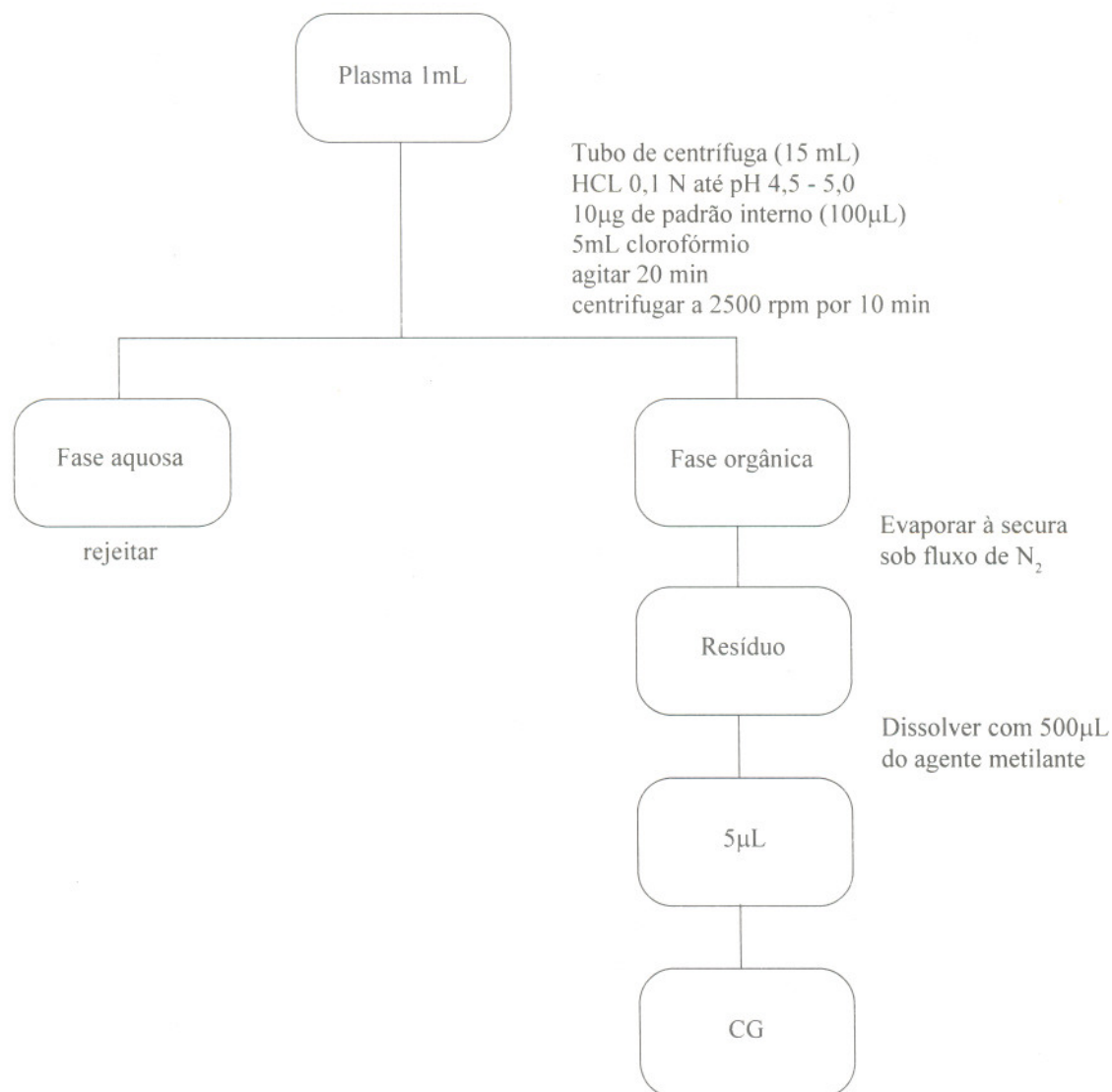


Figura 3. Fluxograma da técnica de Cromatografia em fase gasosa (CG).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos nas análises podem ser observados através das Tabelas 2, 3, 4 e 5.

Através dos dados obtidos pela relação de área dos calibradores analisados foram realizadas as regressões lineares simples, obtendo-se para cada fármaco a seguinte equação da reta:

$$\text{CBZ: } y = 0,0057911x + 0,1392057$$

$$r = 0,999$$

$$\text{FNT: } y = 0,0217729x + 0,0799191$$

$$r = 0,989$$

$$\text{PRM: } y = 0,0102473x + 0,2162038$$

$$r = 1,095$$

Tabela 2. Análise através de imunoenensaio.

Amostras	PRM	FNT	FNB	CBZ
Controle 1	16,04	32,90	62,44	11,00
Controle 2	65,52	51,53	121,00	23,70
Controle 3	95,76	126,06	186,02	64,34
0292	70,56	27,35	186,02	20,74
0592	10,99	49,95	176,11	9,74
0692	60,94	64,22	46,94	35,98
0792	19,70	34,88	152,87	5,50
0992	106,30	94,34	86,12	46,14
1192	103,55	21,41	210,99	60,95
1292	39,86	61,84	129,18	46,98
0193	52,69	50,34	113,25	37,67
Calibrador 1	0	0	0	0
Calibrador 2	9,17	9,91	21,53	8,47
Calibrador 3	18,32	19,82	43,06	16,93
Calibrador 4	36,65	39,64	86,12	33,86
Calibrador 5	73,31	79,28	172,24	50,79
Calibrador 6	109,97	158,57	344,49	84,65

CBZ= carbamazepina

FNT = fenitoína

FNB = fenobarbital

PRM = primidona

Tabela 3. Análise através de CG.

Amostras	PRM	FNB	FNT	CBZ
0292	75,98	-	25,58	-
0592	0,67	-	47,40	-
0692	51,54	-	69,56	1,73
0792	3,04	-	37,24	0,78
0992	112,40	-	113,29	92,47
1192	119,57	-	20,00	178,57
1292	41,22	-	86,50	156,06
0193	43,03	-	58,65	87,60
Calibrador 1	9,16	-	11,89	2,12
Calibrador 2	45,82	-	47,57	-
Calibrador 3	91,64	-	95,13	84,65
Calibrador 4	114,55	-	118,92	105,82

CBZ= carbamazepina

FNT = fenitoína

FNB = fenobarbital

PRM = primidona

Tabela 4. Análise através de CLAE.

Amostras	PRM	FNB	FNT	CBZ	CBZe
0292	71,28	327,51	34,70	19,08	7,66
0592	199,54	187,12	44,45	0,65	2,94
0692	128,81	6,11	60,54	25,03	3,80
0792	253,57	167,22	35,87	-	6,02
0992	108,24	62,17	95,16	34,92	3,40
1192	301,09	247,57	19,37	46,39	6,70
1292	129,21	131,95	69,57	36,56	4,73
0193	165,36	100,29	40,93	19,90	2,36
Calibrador 1	9,16	4,31	11,89	2,12	0,20
Calibrador 2	45,82	86,12	47,57	42,33	3,96
Calibrador 3	91,64	172,24	95,13	84,65	7,93
Calibrador 4	114,55	215,30	118,92	105,82	19,82

CBZ = carbamazepina

CBZe = carbamazepina epóxido

FNT = fenitoína

FNB = fenobarbital

PRM = primidona

Também para esta metodologia foi realizada a regressão linear simples, obtendo-se as seguintes equações da reta:

$$\text{CBZ: } y = 0,0154686x + 0,1503367$$

$$r = 1,003$$

$$\text{CBZe: } y = 0,050359x - 0,1093946$$

$$r = 0,991$$

$$\text{FNT: } y = 0,0262126x - 0,0432925$$

$$r = 0,997$$

$$\text{FNB: } y = 0,0104625x + 0,5602907$$

$$r = 1,077$$

$$\text{PRM: } y = 0,008588x + 0,0514395$$

$$r = 0,995$$

A partir destas equações foram calculadas as concentrações das amostras, assim como a realização das curvas de calibração para cada um dos fármacos.

Várias observações podem ser feitas quando comparamos os métodos utilizados, no entanto um maior número de análises deveria ter sido efetuado para cada uma das amostras a fim de que pudéssemos verificar precisão, exatidão, reprodutibilidade, repetibilidade dos três métodos. A comparação foi realizada frente aos resultados enviados pelo Health Control - Cardiff.

Devido a insuficiência de dados não foi possível realizar um tratamento estatístico adequado. Através do valor médio dos fármacos, enviados por Cardiff, foram considerados os valores dentro de $3 \pm \text{DP}$ (desvio-padrão) refletindo em índices de rejeição especificados na Tabela 5.

Tabela 5. Índices de rejeição nas análises efetuadas.

Métodos	Análises realizadas	Análises rejeitadas	Porcentagem de rejeição
CG	22	11	50,0
CLAE	40	13	32,5
IFP	32	5	15,6

CG = cromatografia a gás

CLAE = cromatografia líquida de alta eficiência

IFP = imunofluorescência polarizada.

CONCLUSÃO

- O método de CG mostrou-se inadequado para análise de fenobarbital, carbamazepina e carbamazepina epóxido;

- A IFP é inadequada para determinação de carbamazepina epóxido;

- Das análises rejeitadas pela IFP, todas estavam relacionadas à primidona, com valores superestimados;

- Todos os métodos podem ser utilizados na análise de fenitoína com resultados satisfatórios;

- O método de CLAE apresentou porcentagem de rejeição elevada, provavelmente, em função de problemas técnicos;

- Nas condições laboratoriais nas quais foram desenvolvidas as análises, a imunofluorescência polarizada mostrou-se como metodologia mais adequada, devido a sua simplicidade e rapidez de execução .

SUMMARY

Therapeutic monitoring of anticonvulsant drugs

The therapeutic monitoring of drugs in plasma has been an important instrument to assure a therapy with the maximum efficacy and the minimum toxic effects, in an individual manner, since therapeutic and toxic effects are better related to plasmatic concentration than to the administered dose. Analytical techniques frequently used for the determination of anticonvulsant drugs are

gas-liquid chromatography (GLC), high performance liquid chromatography (HPLC) and immunologic techniques (polarisation fluoroimmuno assay - PFLA). Primidone, phenobarbital, phenytoin, carbamazepine and 10,11 carbamazepine-epoxide were determined in freeze-dried samples of plasma and GLC, HPLC and PFLA techniques were used. The results were compared according to data reported the Health Control External Quality Assessment Scheme in Cardiff.

Keywords: *anticonvulsants, chromatography, gas, chromatography, liquid.*

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. CRETILLA, Y. A. Controle terapêutico de fenobarbital, fenitoína e carbamazepina. *Revista Brasileira de Toxicologia*, São Paulo, v.3, n.2, p.49, 1990.
2. GOODMAN, L.S., GILMAN, A.G. *The pharmacological basis of therapeutics*. New York : McMillan, 1986. 1200p.
3. SPINELLI, E., SILVA, O.A. Imunoensaio de fluorescência polarizada e sua aplicação na detecção de usuários de cannabis. *Revista Brasileira de Toxicologia*, São Paulo, v.7, n.1/2, p.37-43, 1994.
4. WILSON, J.F., TSANACLIS, L.M., PERRETT, J.E., WILLIAMS, J., WICKS, J.F.C., RICHENS, A. Performance of techniques for measurement of therapeutic drugs in serum. A comparison based on external quality assessment data. *Therapeutic Drug Monitoring*, New York, v.14, n.2, p.98-105, 1992.

Trabalho recebido para publicação em 9 de maio e aceito em 19 de agosto de 1996.