

Determinação quantitativa de fenobarbital em plasma por cromatografia líquida de alta eficiência

Quantitative determination of phenobarbital in plasma by high performance liquid chromatography

Antonia Karine Barros Nojosa

Graduanda em Farmácia pela Universidade Federal do Ceará;
E-mail: karinebarrosnojosa@yahoo.com.br

Janete Eliza Soares de Lima

Professora doutora da Disciplina de Toxicologia de Alimentos, Departamento de Farmácia da Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem da Universidade Federal do Ceará;
E-mail: janete@ufc.br

Teresa Maria de Jesus Ponte Carvalho

Professora doutora da Disciplina de Análises Toxicológicas, Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem da Universidade Federal do Ceará. E-mail: tmponte@gmail.com

Resumo

Os medicamentos representam agentes importantes como provocadores de intoxicações, dentre estes estão os anticonvulsivantes e o fenobarbital como um representante desta classe. O fenobarbital é utilizado para o tratamento de epilepsia para prevenir crises convulsivas e apresenta uma margem terapêutica estreita. Pode ocasionar tolerância, o que resulta na ingestão de doses muito maiores que a dose terapêutica, podendo causar toxicidade em concentração sérica elevada. A intoxicação por fenobarbital provoca alteração da consciência, depressão respiratória e vasomotora, podendo resultar em coma. Logo, a determinação quantitativa do fenobarbital juntamente com a detecção dos sintomas clínicos irá contribuir na confirmação do diagnóstico de intoxicação. O presente trabalho teve como objetivo a padronização e validação de método analítico para a quantificação sérica de fenobarbital por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência – CLAE, estabelecendo-se os parâmetros de linearidade, limite de quantificação, curva de calibração, precisão e exatidão. O estudo realizado é do tipo analítico, quantitativo. Foi realizado no Laboratório de Toxicologia da Universidade Federal do Ceará. O princípio do método por CLAE se baseia na separação por fase reversa, em modo isocrático utilizando-se uma mistura de água ultrapura e acetonitrila e detector UV, em comprimento de onda de 215 nm. O método foi linear de 2 a 60 µg/mL com limite de quantificação de 2 µg/mL, mostrando-se preciso e exato e apresentando boa recuperação. Conclui-se que o método desenvolvido demonstrou possuir parâmetros necessários para ser utilizado na quantificação de fenobarbital em amostras de plasma ou soro humano para análise de emergência.

Palavras-chave: Fenobarbital. Toxicologia analítica. Validação.

Abstract

The drugs are agents provocateurs of intoxication. Among these are the anticonvulsants and the phenobarbital is a representative of this class, being utilized for the treatment of epilepsy to prevent seizures. Phenobarbital has a narrow therapeutic window and may cause tolerance resulting in ingesting much larger doses than the therapeutic dose, may cause toxicity at high serum concentrations. Phenobarbital intoxication causes alteration of consciousness, respiratory depression and vasomotor and may result in coma. Therefore, the quantitative determination of phenobarbital, along with the detection of clinical signs will help to confirm the poisoning diagnostic. This study aimed standardization and validation of analytical methods for the quantification of phenobarbital serum by high-performance liquid chromatography - HPLC, establishing the parameters linearity, quantification limit, calibration curve, precision and accuracy. The conducted study is the analytical, quantitative type. It was held at the Toxicology Laboratory of the Federal University of Ceará. The principle of the method is based on HPLC separation by reverse phase in isocratic mode using a mixture of acetonitrile and ultrapure water and UV detector at a wavelength of 215 nm. The method was linear from 2 to 60µg / mL with quantification limit of 2 ug/mL, being precise and accurate and showing good recovery. It follows that the method developed has demonstrated required parameters to be used in the quantification of phenobarbital in plasma samples or human serum for emergency analysis.

Key words: Phenobarbital. Analytical toxicology. Validation.

Introdução

A epilepsia é um distúrbio da função cerebral que atinge milhões de pessoas pelo mundo. Sua principal manifestação clínica é a ocorrência de convulsões, decorrentes da atividade neuronal excessiva ou pela falta de sincronia durante a transmissão do impulso nervoso (RUTECKI; GIDAL, 2002). A farmacoterapia é o tratamento mais comum da epilepsia e dispõe de vários medicamentos para prevenir a ocorrência das crises convulsivas, observando-se uma resposta adequada entre 60 e 70% dos pacientes (BRUM; ELISABETSKY, 2000).

O fenobarbital ($C_{12}H_{12}N_2O_3$) foi o primeiro agente orgânico sintetizado a partir do ácido barbitúrico e apresenta propriedades anticonvulsivantes, hipnóticas e sedativas. É utilizado principalmente no controle de convulsões dos tipos tônico-clônicas e parcial simples, em concentrações que produzem sedação mínima. Atua como depressor não seletivo do sistema nervoso central (SNC) (DALMORA et al., 2010). Apresenta uma margem terapêutica estreita de 10 a 40 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ e o desenvolvimento de tolerância resulta na ingestão de doses muito maiores que a dose terapêutica, e dados na literatura mostram que há toxicidade em concentração sérica acima de 30 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (PASTORE et al., 2007). Logo a monitorização terapêutica é necessária, uma vez que a faixa terapêutica de fármacos utilizados em crises epiléticas deve estar num intervalo seguro para sua administração e a overdose pode levar a intoxicações severas.

Segundo o Sistema Nacional de Informações Tóxico-Farmacológica (SINITOX, 2012), os medicamentos são citados como um dos principais agentes responsáveis por intoxicações, ocasionadas por tentativa de suicídio, acidente individual, uso terapêutico, erros de administração e automedicação (SOARES et al., 2014). Em estudo realizado em um centro de assistência toxicológica no Paraná entre 2007 e 2011, com mulheres em idade fértil, intoxicadas por medicamentos, observou-se que dentre os medicamentos utilizados estão aqueles com atuação no Sistema Nervoso Central, destacando-se os anticonvulsivantes e os antidepressivos (TAKAHAMA et al., 2013).

Em um estudo realizado na cidade de São Paulo, foram avaliados 6535 casos de intoxicação e destas 1028 foram drogas anti-epiléticas e as mais freqüentemente observados foram fenobarbital, carbamazepina, diazepam e clonazepam (BONILHA et al. 2005).

NOJOSA, Antonia Karine Barros; LIMA, Janete Eliza Soares de; CARVALHO, Teresa Maria de Jesus Ponte. Determinação quantitativa de fenobarbital em plasma por cromatografia líquida de alta eficiência. Revista Intertox de Toxicologia Risco Ambiental e Sociedade, v. 9, n. 2, p. 68-78, jun. 2016.

Vários métodos têm sido propostos para quantificar fármacos anticonvulsivantes. A cromatografia é um método físico-químico muito útil, devido à simplicidade no preparo da amostra, para identificar compostos desconhecidos, contribuindo para o diagnóstico de intoxicação por medicamentos nos atendimentos de urgência. A cromatografia se baseia no princípio da migração dos componentes de uma mistura, resultado das diferentes interações entre as fases estacionária e móvel (SKOOG, 2002). Dentre todas as técnicas analíticas de separação, a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com Detector de Arranjo de Diodos (CLAE/DAD) é a mais utilizada, fornecendo resultados em poucos minutos, além de ser uma técnica eficiente na separação com alta resolução e sensibilidade (TORRES, 2009). O fenobarbital presente em amostras de plasma sanguíneo pode ser extraído, separado e identificado conforme as condições cromatográficas estabelecidas (NERY, 2011).

O objetivo deste estudo foi o desenvolvimento e a validação de um método, que possibilite identificar e quantificar o fármaco fenobarbital em amostras de plasma sanguíneo por CLAE/DAD. A validação é uma forma de garantir que o método analítico atende as exigências estabelecidas e assegura confiabilidade dos resultados.

2) Materiais e Métodos

A realização da análise quantitativa de fenobarbital em plasma foi realizada por CLAE/DAD. As análises foram realizadas no Laboratório de Toxicologia do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Universidade Federal do Ceará. O método cromatográfico por CLAE se baseia na separação utilizando-se fase reversa, em modo isocrático utilizando-se uma mistura de água ultrapura e acetonitrila e detector UV, em comprimento de onda de 215 nm.

2.1 Reagentes e soluções

Para o método cromatográfico: éter metil tert-butílico (VETEC®); Metanol (VETEC®); e Acetonitrila grau HPLC (J.T.BAKER®). A fase móvel utilizada para CLAE foi: Água ultrapura/Acetonitrila (70/30).

2.2 Equipamentos

Foram utilizados: balança analítica de precisão RK®-200, banho ultrassom QUIMIS® modelo Q335D, Sistema MilliQ - ELGA®(resistividade 18,2

MΩ.cm), bomba a vácuo GAST®, banho-maria Edulab®, Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) *Accela Thermo Scientific*® com sistema de bombeamento, detector com arranjo de diodos (DAD) e sistema de aquisição de dados ChromQuest 5.0, coluna analítica ODS HYPERSIL C₁₈ (250 x 4,6 mm – 10 μm) da *Thermo Scientific*®.

2.3 Preparo das amostras e procedimento de análise

A curva de calibração foi construída com 6 pontos em triplicatas. Preparou-se uma solução estoque de fenobarbital com concentração de 10 mg/mL, e a partir desta, as soluções de trabalho nas concentrações de 20, 40 80, 200, 400 e 600 μg/mL em metanol. Para o método cromatográfico, retirou-se 25 μL dessas soluções de trabalho e adicionadas a 250 μL de plasma, obtendo-se concentrações de 2, 4, 8, 20, 40 e 60 μg/mL de plasma. Utilizou-se o barbital como padrão interno, preparando uma solução estoque de concentração 1 mg/mL, diluindo-a para uma concentração intermediária de 100 μg/mL em metanol, adotando esta como solução de trabalho para todas as amostras.

O plasma foi descongelado em temperatura ambiente, em seguida, a 250 μL de plasma foram adicionados 25 μL das soluções de trabalho do fenobarbital (2 – 60 μg/mL), 25 μL do padrão interno de barbital (100 μg/mL), 25 μL de solução de HCl 1mol/L e 1mL de éter metil-terc-butilíco. Agita-se por 10 minutos e submetido à centrifugação por 10 minutos a 5000 rpm. Foram retirados 500 μL do sobrenadante e evaporado em concentrador rotacional a 39° C por 25 minutos. O resíduo foi ressuspensão em 100 μL de metanol, em seguida transferiu-se para um *insert* e 20 μL injetado no CLAE.

2.4 Validação

Para garantir que o método analítico forneça informações confiáveis e interpretáveis, ele passa por processos de validação conduzida com base na RDC n° 27 de 17 de maio de 2012, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (BRASIL, 2012). Os principais parâmetros avaliados foram: linearidade, limite quantificação, precisão e exatidão (LEITE, 2002).

2.4.1 Linearidade

A linearidade corresponde à capacidade do método em fornecer resultados, que sejam diretamente proporcionais à concentração da substância analisada numa determinada faixa de aplicação (JARDIM et al., 2004). Foi construída uma curva de calibração para o fármaco de interesse em plasma, onde os coeficientes da curva foram estimados por regressão linear, que

permitem avaliar a qualidade da curva obtida. A faixa de linearidade testada foi de 2 – 60 µg/mL para o fenobarbital.

2.4.2 Limite de quantificação

O Limite de quantificação (LQ) avalia a menor concentração do analito, que pôde ser quantificada com precisão e exatidão aceitáveis, sob as condições experimentais adotadas. O LQ pode ser afetado pelas condições cromatográficas, e picos maiores aumentam a relação sinal-ruído, resultados em valores mais baixos. O erro no cálculo do LQ pode ser evitado ao utilizar o método baseado nos parâmetros da curva analítica, onde esta deverá conter a concentração correspondente ao LQ (JARDIM et al., 2004).

2.4.3 Precisão

A precisão avalia a proximidade entre as várias medidas efetuadas na mesma amostra, e o resultado foi expresso pelo coeficiente de variação (CV %), não sendo admitidos valores de coeficiente de variação inferiores a 15 % (BRASIL, 2012). As amostras foram analisadas no mesmo dia (intra-ensaio) e em três dias consecutivos (inter-corrída), e em sextuplicata, utilizando as três concentrações 4, 30 e 50 µg/mL como as concentrações baixa, média e alta, respectivamente (RIBANI et al., 2004).

2.4.4 Exatidão

A exatidão é o grau de concordância entre o resultado de um ensaio e um valor de referência, calculando-se o erro padrão relativo (EPR). As amostras foram analisadas no mesmo dia (intra-corrída) e em três dias consecutivos (inter-corrída) e em sextuplicata, utilizando as três concentrações 4, 30 e 50 µg/mL como as concentrações baixa, média e alta, respectivamente (RIBANI et al., 2004).

3) Resultados e Discussão

O presente estudo padronizou e validou a metodologia cromatográfica por CLAE com um tempo total de análise em torno de nove minutos, cujo tempo de retenção para o fenobarbital foi de 7,503 e do barbital de 4,155 (Figura 1), mostrando ser uma técnica de análise rápida. Não houve nenhuma interferência de picos de substâncias endógenas do plasma, sugerindo seletividade excelente.

O barbital foi utilizado como padrão interno, levando em consideração que suas propriedades físico-químicas são semelhantes às do fenobarbital, possui solubilidade nas soluções analíticas e não interfere na determinação do analito.

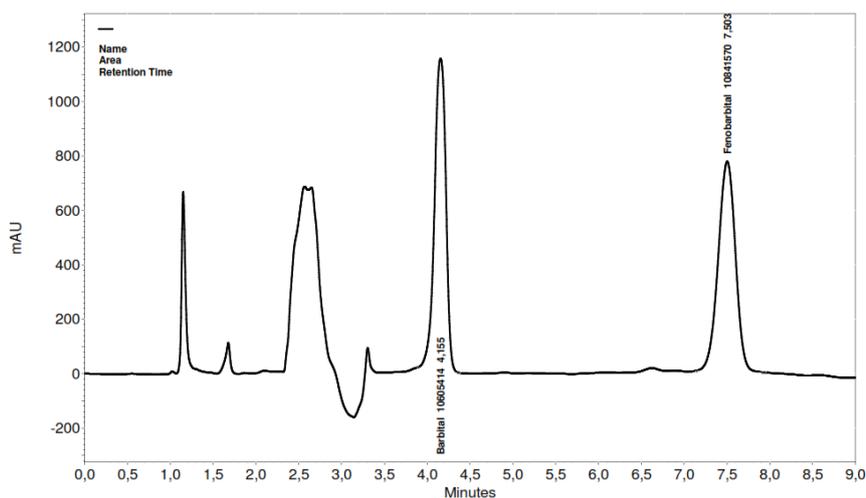


Figura 1: Cromatograma do Fenobarbital por CLAE/DAD. Fase Móvel: Água/Acetonitrila (70/30), coluna C₁₈, fluxo 1 mL/min e 215nm.

A linearidade da curva analítica na faixa de 2 – 60 µg/mL de plasma apresentou coeficiente de correlação (r) igual a 0,9971, coeficiente linear igual a 0,0271 e coeficiente angular igual a 0,0289. Segundo a ANVISA, BRASIL (2012), para a validação de métodos analíticos, o coeficiente de correlação deve ser igual ou superior a 0,98, pois quanto mais próximo esse valor for de 1, menor será a dispersão dos pontos experimentais e menor será a incerteza dos coeficientes de regressão estimados. A recuperação foi em torno de 69 %, realizada comparando-se a área do extraído com a área do adicionado.

O Limite de Quantificação foi de 2 µg/mL com valores de precisão e exatidão de 5,17 % e 14,6 %, respectivamente. Os métodos mostraram que o fenobarbital pode ser quantificado adequadamente, de forma exata e precisa, uma vez que a ANVISA preconiza os valores de precisão e exatidão para o limite até 20 %.

Os resultados de precisão e exatidão estão representados na Tabela 1 e foram realizados de acordo com a metodologia pré-determinadas e com NOJOSA, Antonia Karine Barros; LIMA, Janete Eliza Soares de; CARVALHO, Teresa Maria de Jesus Ponte. Determinação quantitativa de fenobarbital em plasma por cromatografia líquida de alta eficiência. Revista Intertox de Toxicologia Risco Ambiental e Sociedade, v. 9, n. 2, p. 68-78, jun. 2016.

base na RDC nº 27 de 17 de maio de 2012 da ANVISA. Os métodos analisados para a determinação quantitativa de fenobarbital apresentaram precisão e exatidão dentro do intervalo de referência ($\pm 15\%$). Os coeficientes de correlação obtidos foram bem próximos da unidade, logo, as áreas geradas foram diretamente proporcionais à concentração de fenobarbital na matriz.

Tabela 1- Análise de precisão e exatidão intra-ensaio e inter-ensaio do método quantitativo de fenobarbital por CLAE.

Concentração $\mu\text{g/mL}$	Intra-ensaio (n=6)		Inter-ensaio (n=18)	
	Precisão (CV%)	Exatidão (EPR%) ²	Precisão (CV%)	Exatidão (EPR%)
4	4,07	3,37	5,31	0,58
30	3,44	7,35	3,86	6,99
50	4,86	3,51	5,34	4,36

Conclusão

Observou-se que a metodologia proposta tem a capacidade de quantificar o fenobarbital a ser utilizado na monitorização terapêutica do fármaco e no diagnóstico de intoxicações agudas.

Agradecimentos

Os autores agradecem à FUNCAP (Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico) pela bolsa de Iniciação Científica.

Referências bibliográficas

BRASIL. ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 27/2012, de 17 de maio de 2012 – **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 22 mai. 2012.

BRUM, L.F.S; ELISABETSKY, E. Antiepileptogenic properties of phenobarbital: behavior and neurochemical analysis. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, Porto Alegre, v. 67, n. 3, p.411-416, 2000.

NOJOSA, Antonia Karine Barros; LIMA, Janete Eliza Soares de; CARVALHO, Teresa Maria de Jesus Ponte. Determinação quantitativa de fenobarbital em plasma por cromatografia líquida de alta eficiência. *Revista Intertox de Toxicologia Risco Ambiental e Sociedade*, v. 9, n. 2, p. 68-78, jun. 2016.

BONILHA, L.; COLLARES, C.F.; AMARAL, D.A.; BARCIA, S. D.; ALMEIDA OLIVEIRA, A.M.A.; LI, L.M. Antiepileptic drugs: a study of 1028 cases registered by the Sao Paulo Intoxication Control Center. **Seizure**. v.14, n.3, p 170-174, 2005.

DALMORA, S.L. et al. Determination of phenobarbital in human plasma by a specific liquid chromatography method: application to a bioequivalence study. **Química Nova**, Santa Maria, v. 33, n. 1, p.124-129, 2010.

JARDIM, I.C.S.F. et al. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, Campinas, v. 27, n. 5, p.771-780, 2004.

NERY, A.A.P. **Ensaio Cromatográfico para Identificação de Fenobarbital em Urina, para o Diagnóstico Laboratorial de Intoxicações Humanas**. 2011. 27 f. TCC (Graduação) - Curso de Farmácia, Universidade Estadual da Paraíba, Campina Grande, 2011.

RIBANI, M. et al. Validation for chromatographic and electrophoretic methods. **Química Nova**, v. 27, n. 5, p.771-780, 2004.

PASTORE M.E.; OFUCHI, A.S.; NISHIYAMA, P. Monitorização terapêutica de fenobarbital. **Acta Scientiarum Health Sciences**, Maringá, v. 29, n. 2, p.125-131, 2007.

RUTECKI, P.A.; GIDAL, B.E. Antiepileptic drug treatment in the developmentally disabled: treatment considerations with the newer antiepileptic drugs. **Epilepsy & Behavior**, v. 3, p. 24-31, 2002.

SINITOX/FIOCRUZ Fundação Oswaldo Cruz/Centro de Informação Científica e Tecnológica/Sistema Nacional de Informações Tóxico-Farmacológicas. **Estatística Anual de Casos de Intoxicação e Envenenamento**. Brasil, 2015.

SKOOG, D.A.; HOLLER, F.J.; NIEMAN, T.A. **Princípios de Análise Instrumental**, 5ª ed., Bookman: São Paulo, 2002.

NOJOSA, Antonia Karine Barros; LIMA, Janete Eliza Soares de; CARVALHO, Teresa Maria de Jesus Ponte. Determinação quantitativa de fenobarbital em plasma por cromatografia líquida de alta eficiência. *Revista Intertox de Toxicologia Risco Ambiental e Sociedade*, v. 9, n. 2, p. 68-78, jun. 2016.

SOARES, M.V.J.; CUNHA, C.R.M.; OLIVEIRA, S.A.de S. A importância do centro de informações toxicológicas (CIT-Go) na comunidade. **Revista Faculdade Montes Belos**, São Luis Montes Belos, v. 7, n. 2, p.57-70, 2014.

TAKAHAMA, C.H.; TURINI, C.A.; GIROTTO, E. Perfil das exposições a medicamentos por mulheres em idade reprodutiva atendidas por um Centro de Informações Toxicológicas **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 19, n.4, p.1191-1199, 2014.

TÔRRES, A.C.B. **Cromatografia Líquida de Alta Eficiência: Uma Revisão de Literatura**. 2009, p. 36. Seminário (Doutorado em Ciência Animal), Universidade Federal de Goiás, Escola de Veterinária, Goiana, 2009.

NOJOSA, Antonia Karine Barros; LIMA, Janete Eliza Soares de; CARVALHO, Teresa Maria de Jesus Ponte. Determinação quantitativa de fenobarbital em plasma por cromatografia líquida de alta eficiência. **Revista Intertox de Toxicologia Risco Ambiental e Sociedade**, v. 9, n. 2, p. 68-78, jun. 2016.