

CAPÍTULO 2

TÉCNICA ANALÍTICA

DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE UMA TÉCNICA ANALÍTICA PARA A QUANTIFICAÇÃO DE LAMOTRIGINA EM PLASMA HUMANO

2.1. INTRODUÇÃO

A crescente dependência criada entre países nos últimos anos está na origem da vigente necessidade dos resultados dos métodos analíticos serem internacionalmente aceites. Consequentemente, a validação das metodologias analíticas é cada vez mais importante, procurando assegurar um nível comum (mínimo) de qualidade. A determinação de fármacos em matrizes biológicas é uma das áreas que depende da validação dos métodos, pois, por exemplo, um ensaio de bioequivalência só será oficialmente reconhecido pelas autoridades competentes se demonstrar que foi realizado com base numa metodologia validada (Hartmann *et al.*, 1998). Por este motivo, a validação dos métodos analíticos tem sido alvo de crescente interesse por parte das agências reguladoras, o que se tornou particularmente evidente, a partir da década de 90.

A primeira conferência sobre o tema “*Analytical Methods Validation: Bioavailability, Bioequivalence and Pharmacokinetic Studies*” foi realizada em Washington em 1990. Esta conferência, que reuniu pela primeira vez cerca de 500 cientistas de todo o mundo (provenientes de várias áreas, nomeadamente, personalidades do ramo da indústria, das agências reguladoras e do meio académico) resultou na elaboração de um relatório onde se sistematizaram os princípios orientadores e recomendações a aplicar na validação dos métodos analíticos (Shah *et al.*, 1991; 1992a; 1992b). A publicação deste relatório foi feita em vários jornais (*Pharmaceutical Research; Journal of Pharmaceutical Sciences; International Journal of Pharmaceutics; European Journal of Drug Metabolism and Pharmacokinetics; Journal Association of Official Analytical Chemists*), com o objectivo de obter uma vasta disseminação da informação pela comunidade científica. Esta conferência foi ainda considerada como a pedra basilar para o

posterior desenvolvimento de orientações formais nesta matéria pelas agências reguladoras. Após essa data, foi constatada uma melhoria na qualidade dos dados submetidos às agências reguladoras (Shah e Midha, 1995). Porém, subsistiu alguma controvérsia nas conclusões retiradas da Conferência de Washington de 1990, que foram posteriormente analisadas por alguns autores (Hartmann *et al.*, 1994) e apontadas numa conferência realizada em Munich, em 1994 (Hartmann *et al.*, 1995). Algumas das conclusões resultantes desta conferência são a confirmação do trabalho realizado por Kringle (1994). Por outro lado, Hooper (1995) chamou a atenção para a necessidade de se fundamentar os critérios de aceitação em considerações estatísticas, pois só assim é possível retirar conclusões fiáveis quanto à conformidade ou não conformidade dos métodos. Dez anos passados sobre a Conferência de Washington de 1990, o tema foi novamente discutido em reunião (Shah *et al.*, 2000). A este propósito, interessa referir que as orientações dadas actualmente pela FDA (Guidance for Industry, 2001) são baseadas nas deliberações proferidas nestas duas conferências (Shah *et al.*, 1992b; Shah *et al.*, 2000).

Actualmente o registo de novos medicamentos exige a validação da metodologia analítica, e por isso, algumas entidades reguladoras estabeleceram documentos oficiais que funcionam como directrizes a adoptar no processo de validação (EMA, 1995a; EMA, 1995b; EMA, 1998; Guidance for Industry, 2001). Só um processo de validação bem definido e documentado fornecerá evidências objectivas de que o método está adequado ao objectivo a que se propõe.

2.1.1. Conceitos gerais, terminologia e legislação

Para garantir que um método analítico gera informação fiável sobre uma amostra, este deve sofrer uma avaliação que se designa por *validação*. A validação é um processo contínuo que tem início no planeamento da estratégia analítica, e continua ao longo do desenvolvimento do método. Na verdade, muitas vezes é impossível determinar exactamente onde é que acaba o desenvolvimento do método e começa sua validação, pois os dois andam intimamente ligados (Eurachem Guide, 1998).

A validação pode ser definida como “a avaliação sistemática de um procedimento analítico para demonstrar que está sob as condições nas quais deve ser aplicado” (WHO, 1992). Trata-se pois de “definir requisitos do método e confirmar que este possui capacidade de desempenho consistente com o que se pretende da sua aplicação” (Eurachem Guide, 1998).

Dentro do âmbito geral, é possível distinguir dois tipos de validação: (1) a validação laboratorial (“*in house validation*”) e (2) a validação total ou completa (“*full validation*”). A primeira

consiste em validar um novo método que está a ser desenvolvido, ou verificar se um método adoptado de outras fontes está a ser bem aplicado. Nesta abordagem são avaliadas todas as características de desempenho, porém sem analisar a reprodutibilidade. A segunda avalia a reprodutibilidade da metodologia através de um estudo inter-laboratorial, utilizado para averiguar como se comporta a metodologia com determinada matriz em diferentes laboratórios. Interessa referir a este propósito, que uma metodologia só será aceite como oficial para determinada aplicação se tiver sido sujeita a um processo de *validação total ou completa*. Por vezes estabelece-se alguma confusão na terminologia, no entanto, o termo *robustez* (“*robustness*” ou “*ruggedness*”) refere-se à avaliação da capacidade que um método possui de resistir a pequenas variações nas condições do método (ex: pH ou composição da fase móvel), enquanto que o termo *reprodutibilidade* está normalmente reservado para os estudos entre laboratórios (Hartmann *et al.*, 1998).

Por outro lado, podemos definir diferentes níveis de validação; o termo *validação parcial* pode ser utilizado quando está em causa um estudo parcial motivado por modificações introduzidas numa técnica já validada (ex: alterações no intervalo de concentrações; mudança no sistema de detecção; diminuição do volume de amostra - amostras pediátricas; alteração da matriz biológica, ou simplesmente a alteração do anticoagulante utilizado na recolha da amostra) (Guidance for Industry, 2001). No entanto, alguns autores preferem falar em *revalidação* e *validação cruzada* (Dadgar *et al.*, 1995; Bressolle *et al.*, 1996). A primeira refere-se à necessidade de uma nova avaliação face a alterações significativas ao método validado (ex. diferenças significativas na extracção da amostra ou nas condições cromatográficas). A alteração da coluna cromatográfica ou da fase móvel poderá alterar a linearidade e a selectividade do método, porém, não produz qualquer efeito sobre a eficácia da extracção da amostra. A este respeito, podemos encontrar algumas orientações sobre a revalidação de métodos analíticos no trabalho de Daghar *et al.* (1995). A precisão, a exactidão e o limite de quantificação são considerados como os testes mínimos requeridos durante um processo de revalidação (Jenke, 1996c). A expressão *validação cruzada* está relacionada com a aplicação de um método validado a outras condições, nomeadamente, a matrizes biológicas diferentes (ex: homogeneizado de cérebro vs. soro vs. plasma), provenientes de diferentes espécies (ex: plasma de rato vs. plasma humano) (Dadgar *et al.*, 1995; Bressolle *et al.*, 1996), ou quando se pretende comparar dois ou mais métodos analíticos (ex: o método validado serve de referência ao novo método, que, por sua vez, pode funcionar como alternativa ao primeiro) (Lang e Bolton, 1991a; Guidance for Industry, 2001).

Existem razões legais, técnicas e comerciais que justificam a implementação da validação dos métodos. Os dados analíticos pouco fiáveis podem conduzir a decisões desastrosas e

prejuízos financeiros irreparáveis. Actualmente, para provar a sua competência técnica, os laboratórios sujeitam-se à avaliação de vários parâmetros por parte de órgãos de âmbito nacional ou internacional, nos chamados processos de acreditação.

Nos últimos anos, principalmente na década de 90, assistimos à publicação de vários artigos e revisões a respeito da validação dos métodos analíticos (Mehta, 1989; Cardone *et al.*, 1990; Lang e Bolton, 1991a; 1991b; Jenke, 1996a; 1996b; 1996c), e especificamente sobre métodos bioanalíticos (Buick *et al.*, 1990; Karnes e March, 1991; Karnes *et al.*, 1991; Shah *et al.*, 1991; 1992a; 1992b; Hartmann *et al.*, 1994; Dadgar *et al.*, 1995; Shah e Midha, 1995; Braggio *et al.*, 1996; Bressolle *et al.*, 1996; Wieling *et al.*, 1996; Hartmann *et al.*, 1998; Shah *et al.*, 2000), nos quais podemos encontrar definições, procedimentos, parâmetros e estratégias de validação. Infelizmente, as estratégias e definições nem sempre são coincidentes. Uma tentativa para harmonizar estas diferenças foi feita através da ICH (*International Conference on Harmonization*) (EMA, 1995a; EMA, 1995b) para os produtos farmacêuticos, na qual os representantes das indústrias e as agências reguladoras dos EUA, União Europeia e Japão definiram os parâmetros, requisitos, e em alguns casos, também as metodologias para a validação dos métodos analíticos. A FDA (Guidance for Industry, 2001) e o grupo EURACHEM (1998; 2000) publicaram também os seus documentos.

Não obstante o facto de importantes organismos internacionais, como a IUPAC (*International Union of Pure and Applied Chemistry*), a ISO (*International Organization for Standardization*) e a AOAC (*Association of Official Analytical Chemists*) terem redigido documentos técnicos que definem guias de orientação para a validação de métodos analíticos, também nestes se verificam diferenças (Hartmann *et al.*, 1998), o que origina certamente alguma confusão no que respeita a nomenclatura e conceitos. A maioria das definições sugeridas pela ICH corrobora as de outras organizações internacionais, tais como, IUPAC, ILAC (*International Laboratory Accreditation Conference*) e WELAC (*Western European Laboratory Accreditation Cooperation*). Contudo, as definições de selectividade e especificidade sugeridas pela ICH foram criticadas por Vessman (1996).

2.1.2. Validação da técnica analítica cromatográfica

Os métodos analíticos para a quantificação de fármacos e seus metabolitos em amostras biológicas desempenham um papel fundamental na avaliação e interpretação de resultados

provenientes de estudos de biodisponibilidade (BD) e bioequivalência (BE), e de estudos farmacocinéticos (Shah *et al.*, 1992a). Geralmente, para a realização de estudos farmacocinéticos não é exigida a validação completa da metodologia analítica, porém, a validação do método deve incluir o estudo da sua aplicação às amostras que motivaram o seu desenvolvimento, por exemplo, às amostras dos doentes (Shah *et al.*, 1992a).

A validação de um método define-se como o conjunto de todos os procedimentos necessários para demonstrar que determinado método, concebido para quantificar um analito (ou uma série de analitos), numa dada matriz biológica, é suficientemente fiável para originar resultados com elevado grau de confiança. Assim, é essencial que determinado método se encontre bem caracterizado e validado de forma a originar resultados que possam ser satisfatoriamente interpretados (Shah *et al.*, 1992a).

Na validação de um método analítico múltiplas variáveis devem ser consideradas, desde o processo de colheita da amostra, ou o tipo de matriz biológica, ao procedimento utilizado na preparação da amostra, à separação cromatográfica, à detecção, e finalmente à análise dos dados obtidos (Bressolle *et al.*, 1996). Durante o desenvolvimento da técnica analítica a validação deve incluir o protocolo escrito, o plano operacional previamente elaborado e que inclui a definição do sistema a validar, a descrição detalhada do procedimento experimental, a identificação dos parâmetros de validação e a definição dos critérios de aceitação. Por fim, deve proceder-se à elaboração de relatórios técnicos - onde devem constar todos os resultados dos ensaios em que se baseiam quaisquer conclusões da validação (Shah *et al.*, 1992b).

Os parâmetros essenciais para assegurar a fiabilidade de um método analítico de quantificação de substâncias em matrizes biológicas são os seguintes: linearidade, precisão, exactidão, sensibilidade, limite de quantificação (LQ) e limite de detecção (LD), selectividade, especificidade, eficácia da extracção, estabilidade do analito na matriz biológica e a robustez do método (quando aplicável). Assim, o processo de validação de um método cromatográfico desenvolvido para quantificar substâncias em matrizes biológicas pode ser esquematicamente representado pela Figura 2.1.

A dispersão de informação e a quase inexistência de orientações oficiais, à data do desenvolvimento da metodologia analítica, levou-nos a uma procura exaustiva na bibliografia de princípios orientadores para a validação dos métodos analíticos no sentido de se pré-definirem critérios de aceitação adequados para o fim em causa.

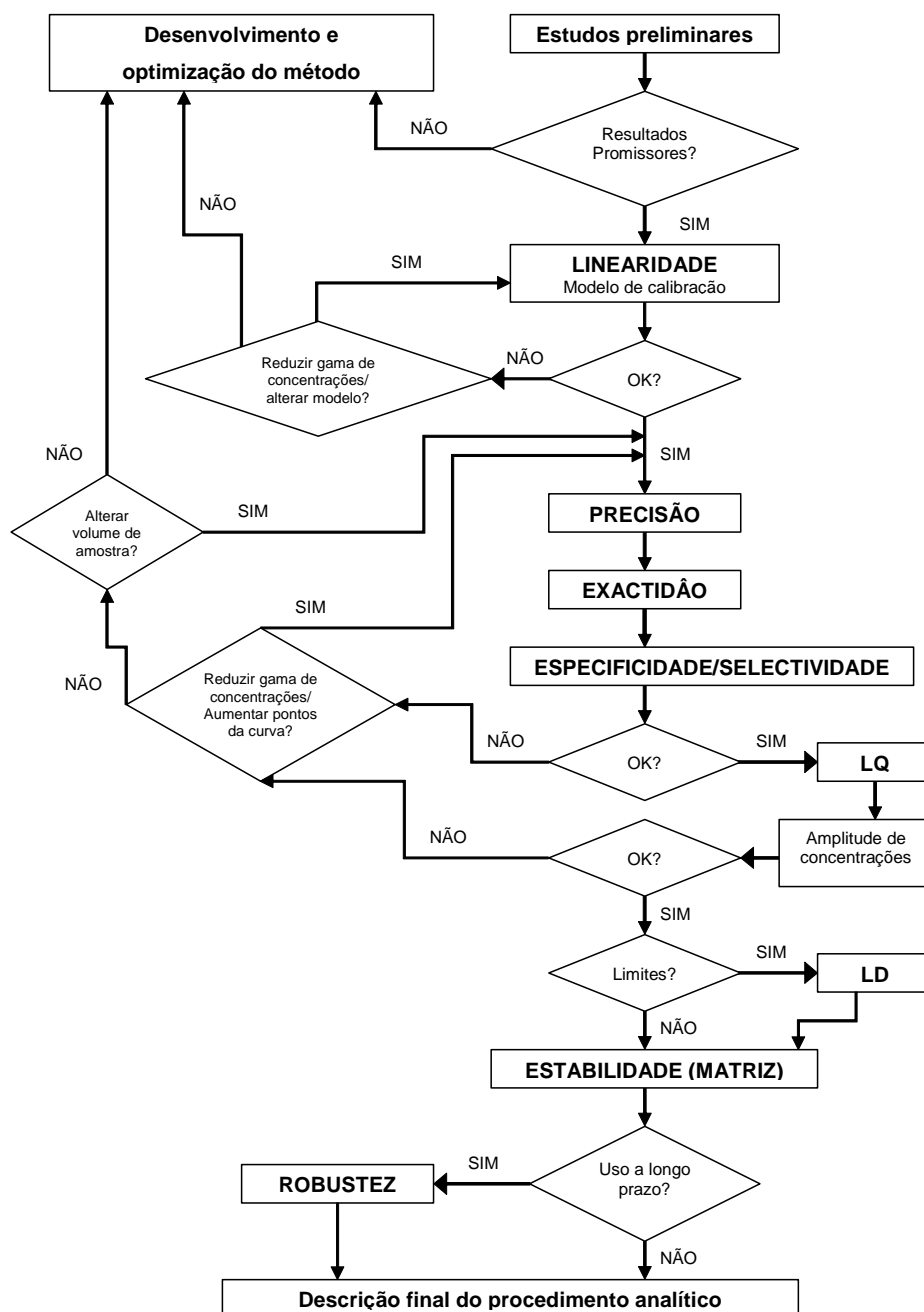


Figura 2.1. Representação esquemática da validação de uma técnica analítica para quantificação de um analito numa matriz biológica.

2.1.3. Parâmetros analíticos

2.1.3.1. Curva de calibração e linearidade

A relação entre o sinal medido (área ou altura do pico) e a massa ou concentração do analito é expressa por uma equação matemática, designada por *curva de calibração*. Para definir adequadamente a relação entre a concentração e a resposta é necessário recorrer a um número suficiente de padrões (5 a 8 padrões, sem incluir o *branco* ou seja, o ponto zero), devendo abranger toda a gama de concentrações esperadas (Shah *et al.*, 1992a). As directrizes da ICH especificam um mínimo de 5 pontos para o estudo da recta de calibração (EMEA, 1995b).

Embora alguns procedimentos analíticos necessitem de recorrer ao modelo de calibração não-linear (o que, normalmente, se traduz num maior número de padrões necessários para definir a relação resposta-concentração), o mais comum é utilizar o modelo linear, através do *Método dos Mínimos Quadrados*. Nesta abordagem, a variável independente (x) é a concentração e a variável dependente (y) a resposta cromatográfica, assumindo que a medida do erro é igual e normalmente distribuída para cada amostra (Bressolle *et al.*, 1996).

No entanto, o modelo de regressão linear só poderá ser correctamente aplicado se as suas suposições forem cumpridas, o que nem sempre acontece quando se está perante intervalos de concentração amplos e dinâmicos, como acontece, frequentemente, nos estudos farmacocinéticos. Por vezes, pode ser necessário recorrer ao modelo de regressão linear ponderada, se a condição de homoscedasticidade não é cumprida, ou seja, quando a variância não é igual para todos os pontos da recta de calibração.

A este propósito remetemos o assunto para o Capítulo 3, onde se faz o estudo do modelo de regressão que melhor ajusta os dados das curvas de calibração obtidas durante a validação da técnica analítica.

2.1.3.1.1. Linearidade (e intervalo ou amplitude de concentrações)

A capacidade de obter resultados linearmente proporcionais à concentração de analito na amostra dentro de um intervalo determinado, designa-se por linearidade (Jenke, 1996a). Em qualquer técnica instrumental, a relação linear só é válida para uma gama de concentrações, designada aqui, por intervalo de concentrações. Este intervalo é estabelecido quando se confirma que o método apresenta um grau aceitável de linearidade, exactidão e precisão, para

as concentrações compreendidas entre os valores especificados (EMEA, 1995b). O uso de extrapolação para além dos extremos da recta de calibração não está recomendado, quer acima do padrão de concentração mais elevado, quer abaixo do padrão de concentração mais baixa, ou seja, abaixo do limite de quantificação (LQ) (Hartmann *et al.*, 1998).

A linearidade do método pode ser demonstrada através do estudo estatístico dos parâmetros da recta ($y=a+bx$): o declive (b), a ordenada na origem (a) e o coeficiente de correlação (r). O declive deve ter um valor estatisticamente diferente de zero, a ordenada na origem não deverá ser estatisticamente diferente de zero e o coeficiente de correlação da recta de calibração não deve ser significativamente diferente de 1 (Bressolle *et al.*, 1996).

A linearidade é frequentemente testada apenas utilizando o coeficiente de correlação, r . Quando $r=1$, este parâmetro indica-nos que todos os pontos se encontram exactamente sobre uma linha de declive positivo; quando $r=0$ indica-nos a falta de correlação entre a variável dependente (y) e a variável independente (x). No entanto, a magnitude de r , só por si, constitui um mau indicador de linearidade (Miller, 1991). De facto, o valor de r indica-nos apenas o grau de dependência entre duas variáveis (Analytical Methods Committee, 1988). Para além disso, foi já demonstrado que uma percentagem considerável de erros no extremo inferior da recta de calibração pode coexistir com coeficientes de correlação aceitáveis, erros esses que são subestimados na análise das medidas de dispersão dos parâmetros da regressão, a e b (Mulholland e Hibbert, 1997).

O estudo da homogeneidade de variâncias faz parte da avaliação da curva de calibração (Capítulo 3). Este estudo pode colocar em questão a aceitabilidade do intervalo assumido pela variável x . Na prática, uma diferença significativa de variâncias implica ou a diminuição do leque de concentrações considerado, ou a ponderação da regressão linear.

2.1.3.2. Sensibilidade, limite de detecção e limite de quantificação

A sensibilidade de um método relaciona-se com a variação mínima que é preciso impor à grandeza a medir (concentração) para se obter uma variação significativa do resultado da medição (sinal). Um método será considerado sensível se pequenas variações na concentração (x) originarem grandes alterações na resposta medida (y). A sensibilidade é, por conseguinte, definida pelo declive da recta de calibração (Mehta, 1989), e portanto, se o modelo de regressão é o linear, pode ser medida em qualquer ponto da recta de calibração. Embora relacionados entre si, a sensibilidade não deve ser confundida com o limite de detecção (LD), nem com o

limite de quantificação (LQ), que estão relacionados com a capacidade do método em detectar concentrações baixas.

2.1.3.2.1. Limite de detecção

O limite de detecção (LD) define-se como a quantidade mais baixa de analito numa amostra que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada (Buick *et al.*, 1990). Esta é também a definição utilizada pela ICH (EMEA, 1995a). Uma das definições mais comuns de LD, aceite internacionalmente, assume que o mais pequeno sinal que é possível distinguir do sinal do branco relaciona-se com este e com o seu desvio-padrão (Miller, 1991).

O limite de detecção de uma técnica analítica pode ser determinado por 3 processos: (A) avaliação visual (EMEA, 1995b), (B) relação sinal/ruído (EMEA, 1995b) e o (C) método baseado em parâmetros da curva de calibração (Miller, 1991; EMEA, 1995b).

O primeiro método (processo A), baseia-se na adição de quantidades conhecidas de analito a uma matriz, de forma a que seja possível distinguir o sinal analítico e o ruído da linha de base, estabelecendo-se assim o LD através da menor quantidade que é possível visualizar, ou seja detectar. Este procedimento também pode ser realizado introduzindo parâmetros no processo de integração do instrumento analítico.

A relação sinal/ruído (processo B) só pode ser aplicada nos casos em o instrumento exhibe uma linha de base. Esta relação é obtida por comparação dos sinais apresentados por amostras com baixas concentrações conhecidas, com o sinal apresentado pela matriz isenta do composto de interesse. A concentração mínima para a qual a substância pode ser detectada é assim estabelecida, sendo geralmente aceite uma proporção de 3:1 ou 2:1 (EMEA, 1995b). Nos métodos cromatográficos, o LD é, frequentemente, calculado com base na relação obtida para a altura do pico e a máxima flutuação do ruído da linha de base (geralmente 3:1) medida para uma dada distância (20 vezes a largura do pico medido a meia altura). Porém, para os métodos bioanalíticos, os brancos da matriz são frequentemente caracterizados por picos interferentes, capazes de alterar a avaliação da linha de base, pelo que este tipo de determinação do LD não é, geralmente, o mais apropriado. Para além disso, esta avaliação é baseada na altura do pico, e muitas vezes, o sinal recomendado para a quantificação do analito é a área do pico (Hartmann *et al.*, 1998).

O limite de detecção pode ainda ser determinado com base na curva de calibração e as respectivas medidas de dispersão.

Assim, o LD pode ser expresso em unidades de resposta (Miller, 1991):

$$LD = \mu_{Br} + K \cdot \sigma_{Br} \quad (\text{Equação 2.1})$$

onde μ_{br} representa a resposta do branco, estimada como a média de y_{br} , e σ_{br} o desvio-padrão da medida do sinal do branco, estimado por S_{Br} .

O correspondente LD, expresso em unidades de concentração, X_{LD} , pode ser obtido por:

$$X_{LD} = \frac{K \cdot S_{Br}}{b} \quad (\text{Equação 2.2})$$

onde K é uma constante à qual foi atribuído o valor de 3, segundo recomendação da IUPAC, b é o declive da recta de calibração.

S_B é uma estimativa do desvio-padrão da medida do branco, que pode ser determinada pela ordenada na origem (Miller, 1991). Por vezes, esta medida de desvio-padrão pode ser obtida a partir do desvio-padrão residual obtido para a recta de calibração ou da estimada do desvio-padrão da ordenada na origem (Hartmann *et al.*, 1998). Esta recomendação é dada pela ICH (EMEA, 1995b).

Segundo a definição da IUPAC, para um $K=3$, o CV no limite de detecção será de 33,3% (Miller, 1991). O factor de multiplicação $K=3$, é geralmente considerado como mínimo (Hartmann *et al.*, 1998).

O cálculo do LD através dos parâmetros da curva de calibração e sua dispersão (processo C) é certamente um processo menos subjectivo já que se apoia em considerações estatísticas.

2.1.3.2.2. Limite de quantificação

O limite de quantificação (LQ), define-se, por sua vez, como a quantidade mais baixa de analito numa amostra que pode ser quantificada com precisão e exactidão aceitáveis (Buick *et al.*, 1990). O LQ equivale à concentração mais baixa da curva de calibração e deve ser determinado através do cálculo do coeficiente de variação e medidas de exactidão apropriadas, utilizando pelo menos 5 padrões independentes (Shah *et al.*, 1992b). Os valores médios devem

estar compreendidos entre limites fixos, normalmente devem representar $\pm 20\%$ do valor nominal e apresentar um coeficiente de variação que não exceda os 20% (Shah *et al.*, 1992b).

Para além do exposto, alguns autores utilizam uma abordagem semelhante à que foi referida para o cálculo do LD (EMEA, 1995b). É comum a definição do LQ através de uma equação semelhante à equação 2.2, donde,

$$X_{LQ} = \frac{K \cdot S_{Br}}{b} \quad \text{(Equação 2.3)}$$

em que o K assume um valor de 10 ou 20; para um coeficiente de variação de 10% ou 5%, respectivamente (Karnes *et al.*, 1991; Miller, 1991).

Uma vez estabelecido o LQ, este deve ser usado como limite operacional (Karnes *et al.*, 1991), ou seja extrapolações para valores além da curva de calibração não estão recomendadas, a menos que se demonstre boa exactidão e precisão nos procedimentos de diluição ou concentração das amostras.

2.1.3.3. Especificidade e selectividade

A especificidade de um método pode ser definida como a capacidade de avaliar, de forma inequívoca, o analito, na presença de componentes que podem interferir com a sua determinação, ou seja, sem interferências de nenhum outro composto presente na amostra (compostos endógenos) (Bressolle *et al.*, 1996). A selectividade define-se, por sua vez, como a capacidade de um método em detectar simultaneamente substâncias químicas diferentes, presentes numa mesma amostra, nomeadamente produtos de degradação, metabolitos ou fármacos administrados concomitantemente (Bressolle *et al.*, 1996).

Por vezes, os termos *selectividade* e *especificidade* são utilizados indistintamente, podendo originar alguma confusão desnecessária. Um método instrumental que produz uma resposta para uma única substância de interesse pode ser chamado específico (o analito é o único responsável pelo sinal medido); um método que produz resposta para várias entidades químicas, pode ser chamado selectivo, caracterizando-se pela existência de uma resposta preferencial para a substância de interesse; portanto, podemos falar em grau de selectividade, enquanto que a especificidade é uma característica de natureza absoluta (Vessman, 1996).

Dado que nos métodos cromatográficos é comum a resposta a várias substâncias simultaneamente, o termo selectividade foi sugerido como o mais apropriado (Karnes *et al.*, 1991). Esta terminologia é utilizada pela FDA (Guidance for Industry, 2001).

A especificidade/selectividade pode ser avaliada de várias formas. Karnes *et al.* (1991) sugerem que uma forma simples de avaliar a especificidade é demonstrar a ausência de resposta no branco da matriz biológica. Esta avaliação consiste no exame minucioso de diferentes amostras de brancos de matriz biológica, provenientes de diferentes fontes, ao longo do intervalo de tempo esperado para obter os picos de interesse (Karnes *et al.*, 1991). Portanto, esta prova faz-se por comparação da matriz isenta da substância de interesse, com a matriz adicionada com a substância (padrão), e deve demonstrar que não existe interferência no tempo de retenção do composto em análise, nem do padrão interno, caso se utilize. A *Conferencia de Washington* recomenda a utilização de pelo menos 6 amostras independentes da mesma matriz biológica (Shah *et al.*, 1992a).

A especificidade pode também ser avaliada através do estudo da ordenada na origem (a), com o objectivo de averiguar se este parâmetro da recta de calibração é ou não significativamente diferente de zero (teste F) (Karnes *et al.*, 1991).

No entanto, os maiores problemas relacionados com a especificidade/selectividade devem-se à presença de metabolitos ou produtos de degradação. Para avaliar a selectividade da metodologia analítica podemos recorrer (Mehta, 1989; Karnes *et al.*, 1991; Bressolle *et al.*, 1996; Jenke, 1996b):

I) a outros métodos ou estratégias de detecção do analito, por exemplo, fazer a detecção a diferentes comprimentos de onda para avaliar a pureza do pico, ou utilizando detectores dotados de maior especificidade para a substância (ex: espectrometria de massa);

II) a outras técnicas, ou à mesma técnica cromatográfica em condições diferentes (ex: outra coluna cromatográfica com diferente selectividade);

III) à colheita de amostras biológicas nos doentes, preferencialmente em diferentes tempos, o que é especialmente importante nos estudos farmacocinéticos, onde é previsível a presença de metabolitos e/ou outros fármacos que estejam a ser administrados ao doente fora do âmbito do estudo;

IV) ao método de *adição de padrão*, em que quantidades conhecidas de analito são adicionadas a uma amostra real (ex: ensaio clínico), a qual pode conter metabolitos. Neste caso, deve verificar-se uma relação linear entre a concentração de analito adicionado e a resposta obtida. Este método é particularmente útil quando não é possível obter matriz isenta da substância de interesse.

Numa determinação analítica em que a concentração (x) é medida em função de uma resposta (y) é desejável que a matriz não influencie essa resposta. Em caso de haver alguma contribuição da matriz, esse facto pode levar a um erro sistemático constante ou proporcional, que se traduzirá em falta de especificidade (Figura 2.2) (Karnes *et al.*, 1991). Alguns autores defendem que a avaliação da especificidade/selectividade deve ser incluída no estudo do *Bias* ou *Viés* (Hartmann *et al.*, 1998).

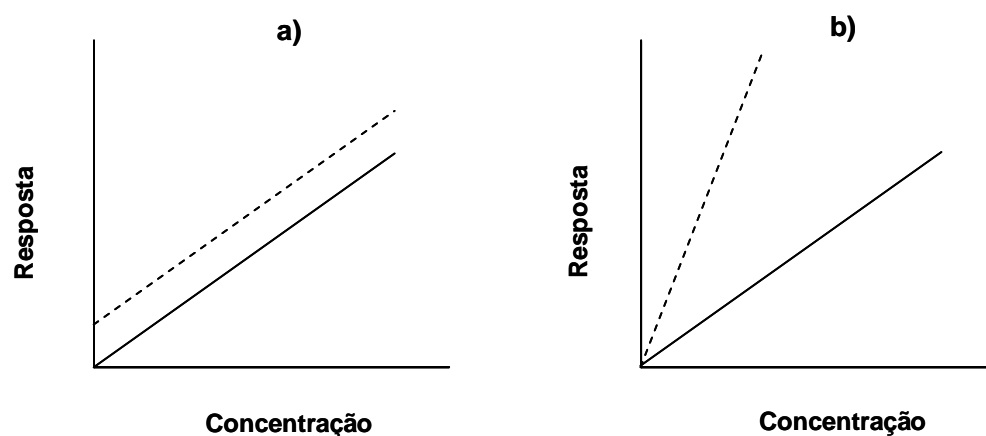


Figura 2.2. Efeito da matriz biológica (-----) nas curvas de calibração.

A determinação de fármacos em amostras biológicas decorrentes de estudos farmacocinéticos em doentes está sujeita a um maior número de potenciais interferentes (devido aos fármacos que são administrados concomitantemente, fora do âmbito do estudo), comparativamente com o que sucede, por exemplo, quando se analisam amostras provenientes de voluntários sãos, nos ensaios clínicos. Nestas circunstâncias e dado que seria impossível testar todas as possibilidades de interferência, está recomendado que se faça o estudo dos fármacos que previsivelmente irão ser administrados simultaneamente (Mehta, 1989).

2.1.3.4. Precisão e exactidão

A precisão e a exactidão são dois dos parâmetros principais na validação dos métodos, pois determinam a sua aceitação.

2.1.3.4.1. Precisão

A precisão de um método é uma medida de dispersão que caracteriza os valores analíticos em redor da sua média. Define-se como sendo o grau de concordância entre os valores de uma série repetida de ensaios analíticos (EMEA, 1995a).

A precisão pode ser avaliada a três níveis: o estudo da repetibilidade ou estudo intra-dia, a precisão intermédia e a reprodutibilidade (Hartmann *et al.*, 1998).

O estudo da precisão *intra-dia* ou *repetibilidade* do método é considerado como a medida da precisão do método sob condições óptimas, isto é, nas mesmas condições instrumentais, sobre a mesma amostra, pelo mesmo técnico, no mesmo laboratório, e no decurso de uma mesma série de ensaios efectuados num curto intervalo de tempo, geralmente durante um dia. Este estudo é feito em várias preparações da mesma amostra, e não deve ser confundido com a *precisão instrumental*, que é avaliada por uma sequência de injeções repetidas da mesma preparação.

A precisão é avaliada pelo desvio-padrão e coeficiente de variação (CV) das respostas obtidas para uma mesma concentração. Este parâmetro é também conhecido por desvio-padrão relativo - RSD ("*Relative Standard Deviation*") e pode ser dado pela equação:

$$CV(\%) = \frac{\sigma}{\mu} \cdot 100 \quad (\text{Equação 2.4})$$

onde σ é o desvio-padrão absoluto e μ é a média aritmética das respostas (determinações).

A precisão intermediária avalia a influência de variações dentro do mesmo laboratório: diferentes dias, diferentes analistas ou diferentes equipamentos (EMEA, 1995a). O estudo da precisão, entre vários lotes de determinações, durante vários dias, comumente designado por *ensaio inter-dia*, está geralmente sujeito a maior variabilidade, e por isso é considerado como uma medida mais representativa dos resultados a serem observados durante a utilização do método na rotina (Bressolle *et al.*, 1996).

Por fim, segundo a ISO, reprodutibilidade é o grau de concordância entre os valores obtidos pelo mesmo método, para a mesma amostra, sob condições diferentes (operador, local, equipamentos) (Hartmann *et al.*, 1994). Por norma, o termo reprodutibilidade expressa a precisão entre laboratórios. A sua avaliação só se faz (se necessário) após completa validação

por um laboratório, ou seja, depois do estudo da robustez do método (Hartmann *et al.*, 1998). O estudo da reprodutibilidade é exigido em metodologias oficiais, por exemplo, em caso de padronização de procedimentos para posterior inclusão em farmacopeias (EMEA, 1995a; EMEA, 1995b).

Normalmente, em estudos farmacocinéticos, a avaliação da precisão é feita com base no estudo da repetibilidade ou ensaio *intra-dia* e no estudo da precisão a diferentes tempos ou seja, o ensaio *inter-dia*.

2.1.3.4.2. Exactidão

A exactidão de um método define-se como sendo a capacidade de um método analítico em dar resultados o mais próximo possível do valor real ou verdadeiro. A ICH, define *exactidão* como o grau de concordância entre o valor obtido num ensaio e um valor de referência aceite como verdadeiro (EMEA, 1995a).

Segundo a AOAC e a ISO, o termo exactidão traduz a combinação do erro sistemático e do erro aleatório, enquanto a avaliação do erro sistemático deve ser indicada apenas como *Bias* ou *Viés* (Hartmann *et al.*, 1994; Hartmann *et al.*, 1998).

O ensaio de avaliação da exactidão do método pode ser realizado conjuntamente com o ensaio da precisão (Hartmann *et al.*, 1998). É comum realizar esta avaliação recorrendo à adição de quantidades conhecidas de substância de referência à matriz, a diferentes níveis de concentração. A exactidão é dada pela diferença entre a quantidade de analito adicionada, que é conhecida, e a concentração de analito obtida pelo método (Jenke, 1996b). Estatisticamente, o erro sistemático ou seja, o *Bias* ou *Viés* pode ser determinado por análise de regressão, e por análise comparativa (teste *t*) (Hartmann *et al.*, 1998).

Assim, para cada nível de concentração, o *Bias* ou *Viés* é obtido através da comparação entre a concentração observada (C_{obs}) e a concentração teórica ou nominal (C_{nom}); sendo que, C_{obs} representa a média aritmética das determinações efectuadas (x), obtida através da introdução das respostas (y) na equação do modelo de regressão da curva de calibração.

O cálculo deste erro é obtido pela seguinte equação (Braggio *et al.*, 1996; Wieling *et al.*, 1996):

$$Bias(\%) = \frac{C_{nom} - C_{obs}}{C_{nom}} \cdot 100 \quad (\text{Equação 2.5})$$

Para além desta abordagem, a exactidão pode ainda ser avaliada por (1) comparação de métodos e pelo (2) método de adição de padrão (Hartmann *et al.*, 1998).

O método de *adição de padrão* é particularmente útil quando é impossível obter a matriz isenta de analito (ex: compostos endógenos). Neste caso, procede-se à adição de quantidades conhecidas da substância de interesse a uma matriz que contem já essa substância. No entanto, este método não permite detectar um erro sistemático constante.

A *comparação de métodos* é um recurso útil quando não é possível obter preparações homogêneas por adição de analito ao *branco* de matriz, e quando não é possível obter o *branco* de matriz (matriz isenta de analito). É o processo utilizado sempre que se pretende avaliar o comportamento de um método que foi transferido de outro laboratório ou quando se pretende estabelecer um método alternativo (Hartmann *et al.*, 1998). A análise de regressão pode ser utilizada para realizar este estudo comparativo (Hartmann *et al.*, 1997).

2.1.3.4.3. Critérios de aceitação

A *Conferência de Washington* estabeleceu um mínimo de 5 determinações por cada concentração e um mínimo de 3 níveis de concentração para avaliar a exactidão e a precisão: um nível perto do LQ, um nível mediano (ou simplesmente o centro da amplitude de concentrações), e um nível próximo do extremo superior da curva de calibração (Shah *et al.*, 1992b).

A ICH estabelece um mínimo de 9 determinações para a avaliação da repetibilidade (3 concentrações/3 determinações cada) (1995b) e a ISO sugeriu 8 dias x 2 determinações para os 3 níveis de concentração (Hartmann *et al.*, 1998).

Segundo a *Conferência de Washington*, os valores médios obtidos devem representar $\pm 15\%$ % do valor nominal considerado como verdadeiro, excepto no LQ em que este valor pode assumir $\pm 20\%$. A precisão em redor do valor médio não deverá exceder os 15%, excepto para o LQ, em que o coeficiente de variação pode assumir um valor menor ou igual a 20% (Shah *et al.*, 1992b). O significado destes limites foi discutido por Hartmann *et al.* (1994).

2.1.3.5. Ensaio de recuperação ou eficácia da extracção

Por norma, as amostras biológicas são submetidas a um tratamento prévio (ex: extracção com solvente orgânico) antes de serem sujeitas aos métodos instrumentais de análise. Essa preparação pode ser mais ou menos complexa, mas é sempre causa de erro e de diminuição do rendimento da técnica. A maioria dos processos leva a perda de analito por partição incompleta, ou adsorção. Torna-se, por isso, imprescindível avaliar a capacidade de recuperação do procedimento analítico ou seja, a sua eficácia durante a extracção.

A recuperação absoluta é a medida da resposta de uma matriz adicionada de analito, expressa em percentagem do padrão puro, não sujeito a qualquer pré-tratamento (Bressolle *et al.*, 1996). Nos métodos cromatográficos (HPLC), a recuperação pode ser determinada por comparação da área/altura do pico da amostra sujeita a extracção, com o pico produzido por idêntica quantidade de analito reconstituído no fluído (preferencialmente na fase móvel), para cada nível de concentração (Mehta, 1989). Este tipo de avaliação que compara a matriz com o solvente puro é designado por recuperação relativa, expressa em percentagem da medida obtida no solvente puro (Karnes *et al.*, 1991). Considerando que o rendimento do ensaio pode variar com a concentração, a eficiência da extracção deve ser avaliada a, pelo menos, três níveis de concentração, ou seja, dois níveis perto dos extremos da curva de calibração (um nível de concentração baixa e outro nível de concentração alta) e um nível intermédio (Mehta, 1989).

Nos métodos de padrão interno (Pi), esta substância deve igualmente ser submetida ao estudo de recuperação, na concentração utilizada no ensaio (Bressolle *et al.*, 1996). Afinal, a correcção da extracção é uma das razões que justificam o uso do padrão interno (Hooper, 1995). Logo, este estudo consistirá na comparação dos valores obtidos pela análise dos extractos de matriz adicionada de analito (com e sem Pi) e de padrão interno (sem analito), com os valores obtidos a partir da análise das respectivas soluções-padrão do analito (com e sem Pi) e do Pi (sem analito).

Assim, a recuperação, em percentagem, pode ser descrita pela seguinte equação (Ramachandran *et al.*, 1994):

$$\text{Recuperação(\%)} = \frac{A_{\text{Extr.}}}{A_{\text{Sol.}}} \cdot 100 \quad (\text{Equação 2.6})$$

sendo que, para um dado nível de concentração de LTG e/ou Pi, A_{Extr} é a área do pico obtido a partir da amostra de plasma submetida a extracção, ou seja, o extracto; enquanto que A_{Sol} é a área do pico obtido a partir da correspondente solução aquosa. Na avaliação da eficácia da extracção da LTG juntamente com o Pi, A será substituído pela correspondente razão $A_{\text{LTG}}/A_{\text{Pi}}$.

No que respeita aos critérios de aceitação definidos para estes ensaios, os valores obtidos devem ser reprodutíveis e preferencialmente com valores acima de 75% (Mehta, 1989). Alguns autores estabeleceram um valor mínimo de 70% (Braggio *et al.*, 1996), mas valores de 50, 80 e 90% foram já descritos (Karnes *et al.*, 1991).

Em geral, é preferível obter resultados precisos mesmo que a percentagem de recuperação seja baixa (Hooper, 1995). Por vezes, a recuperação do método é sacrificada em prol de uma maior selectividade; não obstante, o método é aceitável desde que demonstre ter sensibilidade, precisão e exactidão adequadas (Dadgar *et al.*, 1995).

A recuperação do método reflecte-se no *Bias* (e especificidade/selectividade), pelo que a avaliação deste erro poderá ser considerada como suficiente (Hartmann *et al.*, 1998).

2.1.3.6. Estabilidade

A avaliação da estabilidade é uma parte fundamental da validação de métodos desenvolvidos para a quantificação de substâncias em matrizes biológicas, pois sem esta garantia, os subseqüentes dados farmacocinéticos são questionáveis. Existem vários factores que podem alterar a estabilidade, nomeadamente a temperatura, o tempo de conservação, a concentração de analito, o tipo de fluido biológico e até a espécie animal (Timm *et al.*, 1985). Segundo a Conferência de Washington, a estabilidade do analito na matriz biológica deve ser avaliada durante o processo de armazenamento da amostra (Shah *et al.*, 1992b). O objectivo deste estudo é averiguar se as amostras do estudo se encontram adequadamente conservadas no momento da análise (Bressolle *et al.*, 1996).

A avaliação da estabilidade do analito na matriz biológica deverá incluir o (1) estudo da estabilidade a curto prazo - nas condições normais de processamento (temperatura ambiente), e de armazenamento (4°C, -20°C) da amostra no laboratório; o (2) estudo da conservação das amostras por longos períodos de tempo (ex: congelação a -20°C, durante 12 meses) e eventuais ciclos de congelação/descongelação. Para além disso, a estabilidade do extracto seco e/ou extracto reconstituído pode ser também importante, sobretudo quando as amostras são processadas por meio de injectores automáticos. Neste caso, as amostras reconstituídas podem

aí permanecer por períodos de tempo, muitas vezes, superiores a 48 horas, designadamente, quando é necessário repetir a análise (Dadgar *et al.*, 1995; Bressolle *et al.*, 1996; Hartmann *et al.*, 1998).

Normalmente, a avaliação da estabilidade na matriz biológica é feita por comparação das respostas das amostras (obtidas por adição de analito à matriz), sujeitas a condições definidas de temperatura e de tempo, com as respostas das amostras preparadas no momento da análise (amostras de referência). Uma outra estratégia de estudo da estabilidade passa pela preparação de todas as amostras no mesmo dia, sujeitando as amostras de referência a nitrogénio líquido ou a temperaturas inferiores a -130°C durante o seu armazenamento (Dadgar *et al.*, 1995). Com estas condições, a degradação é praticamente nula (Dadgar *et al.*, 1995), no entanto, esta técnica está limitada pela necessidade de equipamento especializado.

Os ensaios de estabilidade das amostras devem decorrer nas mesmas condições a que estas são sujeitas durante a rotina laboratorial, de forma a averiguar se o analito sofre degradação à temperatura de conservação (ex. -20°C ou -80°C) ou se, porventura, se verificam fenómenos de adsorção do analito às paredes do recipiente seleccionado para a recolha e/ou armazenamento da amostra (ex: tubos de vidro, *ependdorfs*).

A *Conferência de Washington* recomenda o estudo de 2 níveis de concentração (baixa e alta) em duplicado (Shah *et al.*, 1992b). Hooper (1995) recomenda o uso de aproximadamente 10 amostras para que a comparação seja estatisticamente significativa. A comparação é feita através de uma razão entre as médias das amostras de estabilidade e das amostras de referência, a qual deverá estar compreendida entre 90-110%; os intervalos de confiança das razões deverão estar compreendidos entre 80-120% (Hooper, 1995). O estudo da estabilidade com base em considerações estatísticas foi desde cedo abordado por Timm *et al.* (1985).

2.1.3.7. Robustez

Apesar da robustez do método não ter sido considerada na *Conferência de Washington* (Shah *et al.*, 1992b), o seu estudo adquire, certamente, maior importância quando se pretende aplicar o método por longos períodos de tempo e/ou aplicá-lo em diferentes laboratórios. É um dos parâmetros abordados nas recomendações da ICH (EMEA, 1995a; EMEA, 1995b) e é normalmente avaliado na fase final do desenvolvimento/validação de um método, com o objectivo de investigar de forma sistemática os procedimentos/condições que necessitam de um rigoroso controlo durante a sua aplicação na rotina (Dadgar *et al.*, 1995; Hartmann *et al.*, 1998).

Alguns autores incluem a avaliação da robustez no estudo da precisão (Hartmann *et al.*, 1998). A robustez avalia-se através do efeito que pequenas alterações nas condições operacionais da análise produzem sobre a fiabilidade do método. São exemplo destas pequenas alterações, a mudança de operador, a existência de grandes intervalos de tempo entre os períodos operacionais, pequenas modificações instrumentais ou alterações das condições cromatográficas (alterações de pH, de composição da fase móvel, de temperatura) (Bressolle *et al.*, 1996). Durante o processo de extração da amostra, é importante estudar a influência de pequenas variações de pH, da força iónica, ou dos volumes de solvente orgânico/aquoso utilizados; relativamente ao método cromatográfico propriamente dito, deve-se estudar o efeito de pequenas variações na composição da fase móvel, no pH do tampão, na temperatura ambiente e o impacto da utilização de diferentes colunas cromatográficas do mesmo tipo (o mesmo material de enchimento, mas com fases estacionárias de lotes diferentes, ou diferentes processos de fabrico) (Dadgar *et al.*, 1995; Hartmann *et al.*, 1998). Em HPLC, diferentes colunas cromatográficas do mesmo fabricante, são uma fonte comum de variabilidade (Bressolle *et al.*, 1996). Para avaliar a robustez das colunas, alguns autores recomendam a utilização de, pelo menos duas colunas de diferentes lotes (Dadgar *et al.*, 1995), enquanto outros sugerem a utilização de três colunas, duas de diferentes lotes do mesmo fabricante e pelo menos uma coluna de um fabricante diferente (Jenke, 1996c).

2.2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.2.1. Desenvolvimento da técnica analítica

Os materiais de referência, lamotrigina (LTG) BW430C78 [3,5-diamino-6-(2,3-diclorofenil)-1,2,4-triazina] e o seu padrão interno (Pi) BW725C78 [3,5-diamino-6-(2-metoxifenil)-1,2,4-triazina] (análogo estrutural), foram cedidos pela Glaxo Wellcome (Cardiff, Reino Unido) (Figura 2.3); o branco de plasma humano foi cedido pelo Instituto Português de Oncologia (Coimbra, Portugal); o acetato de etilo, o metanol, o cloreto de sódio, o hidróxido de sódio, o hidrogenofosfato de potássio e a trietilamina foram adquiridos à Merck (Merck KGaA, Darmstadt, Alemanha).

A técnica utilizou um cromatógrafo BAS-480 equipado com uma bomba PM-80, um injetor manual Rheodyne com um *bucle* de 50 μ L e um detector de UV/Vis BAS UV-116 (Bioanalytical Systems Inc., Lafayette Indiana Ocidental, EUA.).

A separação cromatográfica processou-se numa coluna LiChrospher 100 RP-18 (5 μ m) LiChroCART 125-4 (Merck KGaA, Darmstadt, Alemanha), à temperatura ambiente, com uma fase móvel constituída por 35,0% metanol, 64,7% hidrogenofosfato de potássio 0,1 M e 0,3% trietilamina, a um fluxo de 1,0 mL/min. A detecção foi realizada a 306 nm.

Os padrões de lamotrigina, com concentrações finais de 0,1; 0,5; 2,5; 5,0; 10,0 e 15,0 mg/L, foram obtidos por adição de alíquotas de solução-mãe de LTG e das soluções intermédias a branco de plasma.

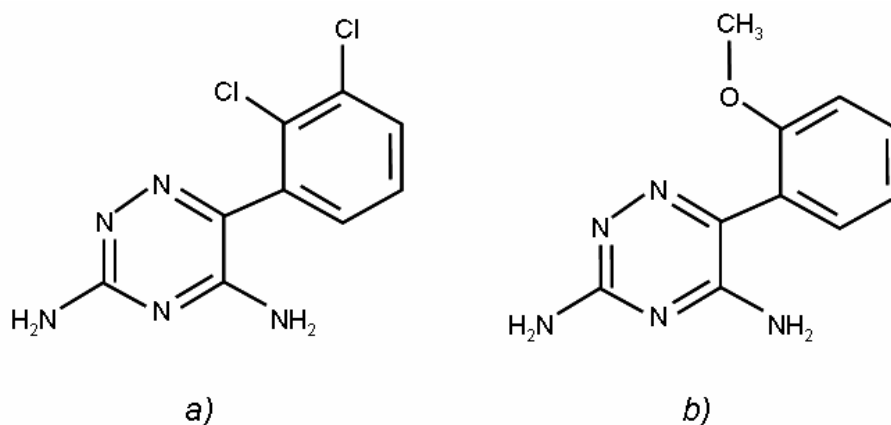


Figura 2.3. Lamotrigina (LTG) BW430C78 [3,5-diamino-6-(2,3-diclorofenil)-1,2,4-triazina]^{a)} e padrão interno (Pi) BW725C78 [3,5-diamino-6-(2-metoxifenil)-1,2,4-triazina]^{b)}.

2.2.1.1. Preparação da amostra

A extracção da LTG e do Pi a partir da matriz biológica foi baseada no método apresentado por Fraser *et al.* (Fraser *et al.*, 1995) e Sallustio & Morris (Sallustio e Morris, 1997). Após a adição de 100 µl da solução de Pi (40 mg/L) a 1 mL de amostra, procedeu-se à sua basificação com NaOH 2M. Posteriormente, adicionou-se acetato de etilo, seguido de agitação e centrifugação a 1585 g. Finalmente, a camada orgânica foi transferida para um tubo de vidro cónico e evaporada à secura a 45°C. O resíduo foi reconstituído com fase móvel imediatamente antes de ser injectado no sistema cromatográfico (Figura 2.4).

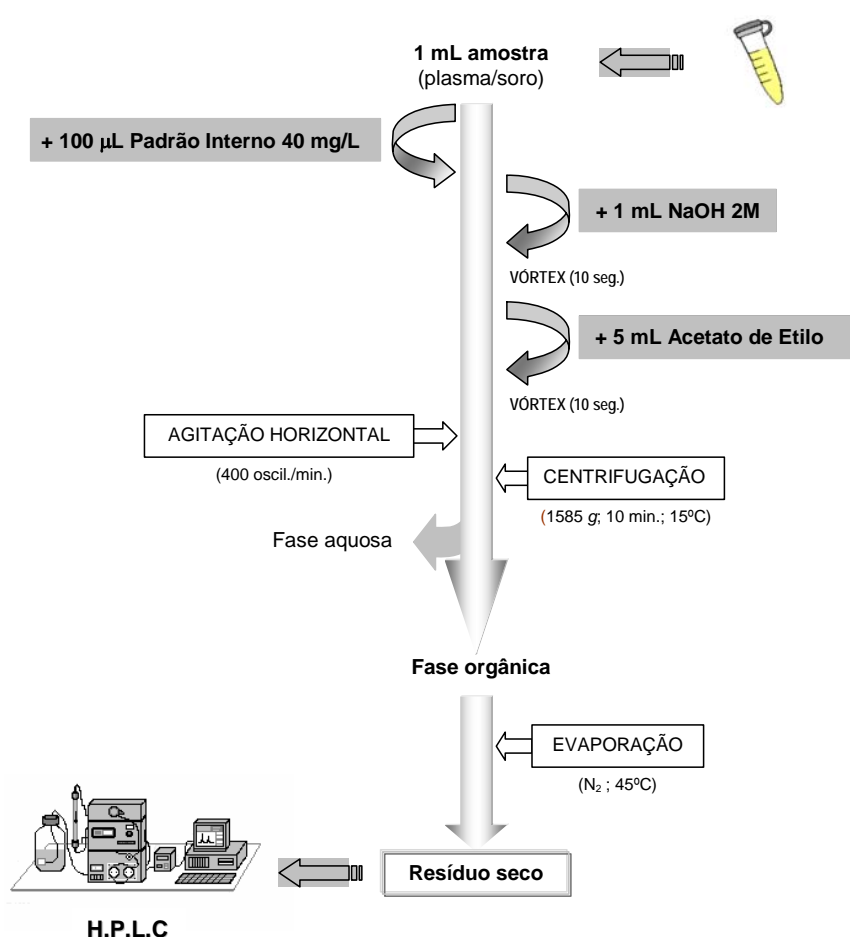


Figura 2.4. Esquema representativo da preparação da amostra.

2.2.2. Validação da técnica analítica

A validação do método consistiu no estudo dos parâmetros analíticos de fiabilidade: linearidade, especificidade, selectividade, sensibilidade, precisão, exactidão, recuperação e estabilidade.

2.2.2.1. Curva de calibração e linearidade

A linearidade foi testada para as concentrações compreendidas entre 0,1 mg/L e 15,0 mg/L. Para a realização do ensaio intra-dia, cada nível de concentração foi analisado 5 vezes, enquanto que o ensaio inter-dia decorreu ao longo de 5 dias. Os dados obtidos foram representados graficamente para obtenção da razão entre a área da LTG e a área do Pi (A_{LTG}/A_{Pi}) vs. concentração de LTG. Após a análise dos dados obtidos, optou-se pelo método de regressão linear ponderada, utilizando o inverso do quadrado da concentração como factor de ponderação (ver Capítulo 3). Estes dados foram usados para o estudo subsequente dos parâmetros de fiabilidade da validação.

2.2.2.2. Sensibilidade, limite de detecção e limite de quantificação

O limite de detecção (LD) da técnica analítica foi determinado através da equação, $X_{LD}=K S_{Br}/b$ (equação 2.2.), onde X_{LD} é o LD expresso em concentração, o K é uma constante à qual foi atribuído o valor de 3, segundo recomendação da IUPAC, b é o declive da recta de calibração e S_{Br} é uma estimativa da dispersão do branco, determinada pelo desvio-padrão da ordenada na origem (S_a) (Miller, 1991). O limite de quantificação (LQ) foi avaliado de acordo com as medidas de precisão e exactidão, tal como foi discutido anteriormente.

2.2.2.3. Especificidade e selectividade

Para estudar a especificidade do presente método foram analisadas seis amostras independentes de branco de plasma humano, isto é, desprovido de fármaco (Karnes *et al.*, 1991; Shah *et al.*, 1992b).

Uma vez que a LTG é normalmente usada em associação com outros fármacos, para a avaliação da selectividade do método foram estudadas várias substâncias activas consideradas como potenciais interferentes: carbamazepina, fenitoína, ácido valpróico, fenobarbital, primidona, vigabatrina, gabapentina, clobazam, clonazepam, midazolam e paracetamol. O estudo consistiu na comparação dos cromatogramas obtidos para cada fármaco com o cromatograma típico da LTG e do Pi. Para além disso, foram também analisadas amostras de doentes a diferentes tempos de colheita para avaliar a presença de eventuais metabolitos interferentes.

2.2.2.4. Precisão e exactidão

A precisão e a exactidão foram avaliadas com o mesmo conjunto de dados (5 determinações para cada concentração), utilizando as equações 2.4 e 2.5, respectivamente. Esta avaliação foi feita no conjunto total de dados (6 níveis de concentração) obtidos no ensaio *intra-dia* e no ensaio *inter-dia*.

2.2.2.5. Recuperação

Este estudo consistiu na comparação dos valores obtidos pela análise dos padrões do analito (com e sem Pi) e do Pi (sem analito) na matriz biológica, com os valores obtidos a partir da análise das respectivas soluções-padrão do analito (com e sem Pi) e do Pi (sem analito).

As amostras utilizadas para o estudo da recuperação do método foram preparadas por adição de alíquotas de concentração conhecida de LTG e/ou Pi ao branco de plasma. As áreas dos picos de LTG e/ou Pi, depois de submetidas a extracção, foram comparadas com as áreas obtidas após injeccção directa dos correspondentes padrões preparados em metanol. O estudo da recuperação de LTG na presença do padrão interno implicou a utilização da razão das respectivas áreas (A_{LTG}/A_{Pi}).

Nesta análise, as áreas dos picos de LTG/Pi obtidas após injeccção directa são consideradas como o 100%. O Pi foi adicionado às soluções imediatamente antes da injeccção no sistema cromatográfico.

Este procedimento permitiu avaliar a recuperação de amostras que contêm LTG na presença do Pi, do analito isoladamente ou do Pi isoladamente, por análise de cinco réplicas para cada concentração (para 3 níveis de concentração) no mesmo dia (Wieling *et al.*, 1996).

2.2.2.6. Estabilidade

A avaliação da estabilidade foi conduzida de acordo com as recomendações de Hooper (1995). Esta avaliação incluiu: (1) estudo do analito na matriz a 4°C (conservação no frigorífico) e o (2) estudo do analito na matriz a -25°C (congelamento).

As amostras utilizadas para o estudo da estabilidade do fármaco na matriz biológica foram preparadas por adição de uma alíquota de concentração conhecida de LTG (2,5 e 10 mg/L) a um branco de plasma, e posteriormente armazenadas a 4°C e a -25°C.

A avaliação foi efectuada por análise de dez réplicas em cada dia, de acordo com a Figura 2.5. A análise dos dados foi feita por comparação das respostas (área do pico) obtidos no dia da análise (dia N), com as respostas obtidas no primeiro dia do estudo (dia 0) - data a partir da qual as amostras são submetidas às condições que se pretendem testar.

A data de validade é dada pelo número de dias (N) que passaram desde o dia 0, até que se verifique uma diferença significativa entre as amostras do estudo e as amostras de referência. Para isso, as razões das respostas foram avaliadas, calculando a sua média e o seu intervalo de confiança a 90%; a razão da média das respostas obtidas também foi avaliada.

Os ciclos de congelamento/descongelamento não foram investigados durante este processo de validação porque as amostras dos doentes que participaram no estudo farmacocinético foram, desde logo, armazenadas em recipientes individuais de 1 mL, após a sua colheita e centrifugação. Da mesma forma, a estabilidade à temperatura ambiente também não foi testada, pois este requerimento só seria imprescindível no caso de aplicação de sistemas de injeção automática, o que não se verificou.

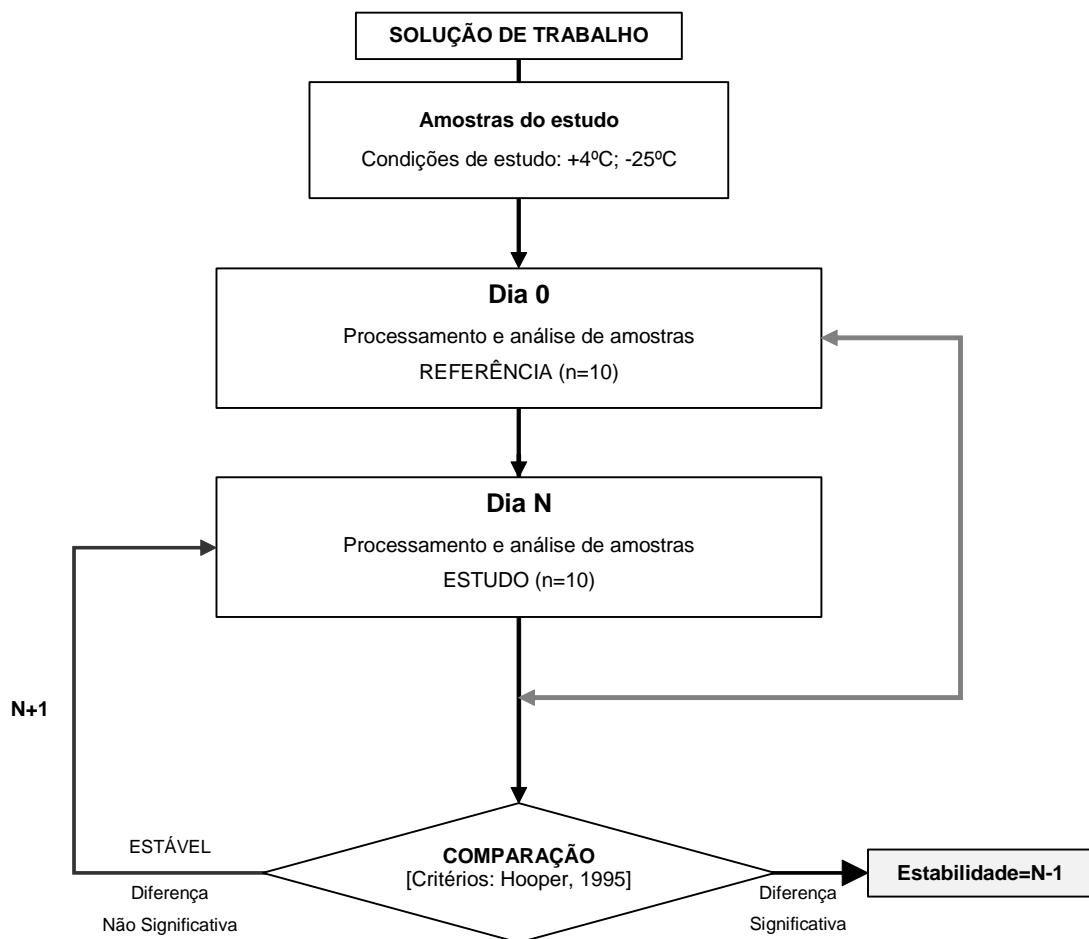


Figura 2.5. Esquema de execução do estudo de estabilidade na matriz biológica. O *Dia 0* corresponde ao primeiro dia do estudo (a partir do qual as amostras são submetidas às condições específicas de armazenamento - +4 °C ou -25°C); o *Dia N* corresponde ao dia em que se averigua se o analito permanece estável nessas condições; *N+1* correspondente ao ensaio imediatamente a seguir; e *N-1* correspondente ao ensaio imediatamente anterior.

2.3. RESULTADOS

2.3.1. Validação da técnica analítica

Tabela 2.1. Dados obtidos no ensaio intra-dia.

Conc. (mg/L)	A	Api	Razão A/Api
0,1	75381	3373583	0,0223
0,1	62834	2744443	0,0229
0,1	68050	2863618	0,0238
0,1	73212	3190782	0,0229
0,1	75930	3144582	0,0241
0,5	257216	2014039	0,1277
0,5	405062	3171034	0,1277
0,5	288208	2030940	0,1419
0,5	241389	1784224	0,1353
0,5	170464	1336876	0,1275
2,5	1821207	2519066	0,7230
2,5	1313376	1854051	0,7084
2,5	1455983	1988923	0,7320
2,5	1571247	2257804	0,6959
2,5	1891859	2639658	0,7167
5,0	2920147	1953823	1,4946
5,0	3625661	2558610	1,4170
5,0	3470936	2411890	1,4391
5,0	3255545	2293479	1,4195
5,0	3348493	2296357	1,4582
10,0	7548655	2788875	2,7067
10,0	7461482	2621568	2,8462
10,0	8558588	2994875	2,8577
10,0	7417735	2879871	2,5757
10,0	6983170	2374008	2,9415
15,0	12209191	3244845	3,7626
15,0	12953689	2911392	4,4493
15,0	11682576	2903904	4,0231
15,0	10940196	2852877	3,8348
15,0	11147470	2672128	4,1718

Conc.=Concentração de LTG; A=Área do pico de LTG; Api=Área do pico de padrão interno.

Tabela 2.2. Dados obtidos no ensaio inter-dia.

Conc. (mg/L)	A	Api	Razão A/Api
0,1	89732	2780180	0,0323
0,1	83003	2460993	0,0337
0,1	123588	3535188	0,0350
0,1	118272	3117456	0,0379
0,1	64864	2497706	0,0260
0,5	399103	2986622	0,1336
0,5	309584	2179106	0,1421
0,5	393720	2825141	0,1394
0,5	431599	2959311	0,1458
0,5	279882	1984052	0,1411
2,5	2111016	3253657	0,6488
2,5	1393606	2004521	0,6952
2,5	1574631	2444087	0,6443
2,5	2379968	3407448	0,6985
2,5	2157593	3074835	0,7017
5,0	4240341	3337117	1,2707
5,0	3595902	2485049	1,4470
5,0	3581481	3080708	1,1626
5,0	4469835	3314859	1,3484
5,0	4545205	3048304	1,4911
10,0	7427676	3044278	2,4399
10,0	8594665	2962489	2,9012
10,0	9385589	3818931	2,4576
10,0	9109442	3402017	2,6777
10,0	8155147	3055876	2,6687
15,0	12700467	3414331	3,7198
15,0	10505641	2661383	3,9474
15,0	12581530	3482997	3,6123
15,0	14246163	3731211	3,8181
15,0	13158717	3326533	3,9557

Conc.=Concentração de LTG; A=Área do pico de LTG; Api=Área do pico de padrão interno.

2.3.1.1. Curva de calibração e sensibilidade

As curvas de calibração dos ensaios intra- e inter-dia (durante os 5 dias) foram obtidas por regressão linear ponderada, de acordo com o procedimento descrito no Capítulo 3. O factor de ponderação, aplicado ao modelo de regressão dos dados provenientes dos dois ensaios, foi igual ao inverso da concentração ($1/x^2$). Os resultados estão representados na Tabela 2.3.

Tabela 2.3. Equação da recta.

Ensaio	Equação da recta	Coefficiente de correlação
Inter-dia	$y=0,2636 x +0,0067$	$r=0,995$
Intra-dia	$y=0,2804 x -0,0049$	$r=0,999$

y representa a relação A_{LTG}/A_{Pi} e x representa a concentração expressa em mg/L.

O LQ é igual ao menor padrão da recta estudado que apresenta valores de exactidão e precisão aceitáveis, de acordo com os critérios estabelecidos *a priori* (LQ = 0,1 mg/L). O LD calculado apresentou um valor de 0,008 mg/L.

2.3.1.2. Especificidade e selectividade

Os cromatogramas típicos de LTG extraída a partir de uma matriz de plasma humano encontram-se representados na Figura 2.6; os tempos de retenção obtidos para a LTG e seu Pi foram de 6,7 e 2,3 minutos, respectivamente. A ausência de resposta nas amostras de branco de plasma foi demonstrada (Figura 2.6a). Os fármacos avaliados (carbamazepina, fenitoína, ácido valpróico, fenobarbital, primidona, vigabatrina, gabapentina, clobazam, clonazepam, midazolam e paracetamol), normalmente usados em co-administração com a lamotrigina, não interferiram com a técnica.

Nesta fase de validação do método procedeu-se também à colheita de algumas amostras nos doentes, em diferentes tempos (antes e após a administração do fármaco) com o objectivo de avaliar a eventual presença de metabolitos da LTG, ou de outros fármacos AEs administrados ao doente, capazes de interferir com o método. A Figura 2.7 mostra-nos um cromatograma obtido a partir de uma amostra de um doente, simultaneamente medicado com lamotrigina e ácido valpróico. Este doente encontrava-se submetido a 200 mg de lamotrigina por dia. A

colheita da amostra foi realizada 2 horas após a administração de LTG. Posteriormente, a sua concentração sérica foi avaliada em 10,6 mg/L de LTG.

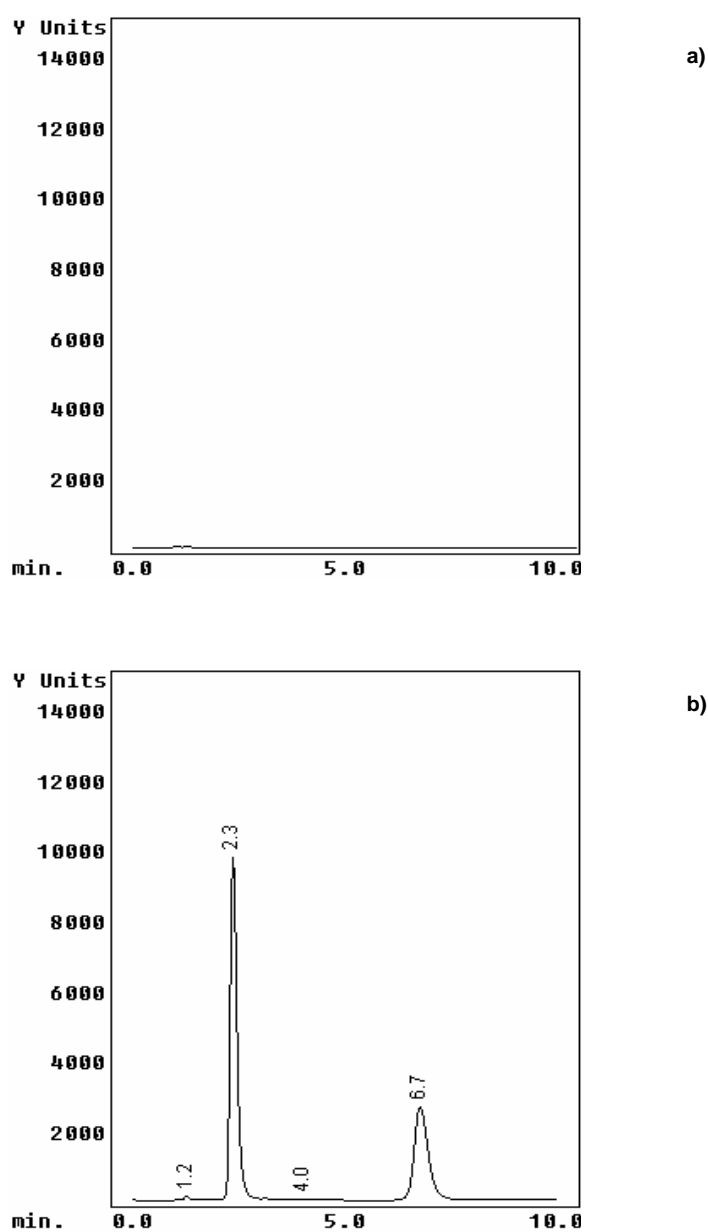


Figura 2.6. Cromatogramas representativos de um branco de plasma humano^{a)} e um padrão de 2,5 mg/L de lamotrigina ($t_r=6,7$ min.), ao qual foi adicionado 4,0 mg/L de padrão interno ($t_r=2,3$ min.)^{b)}.

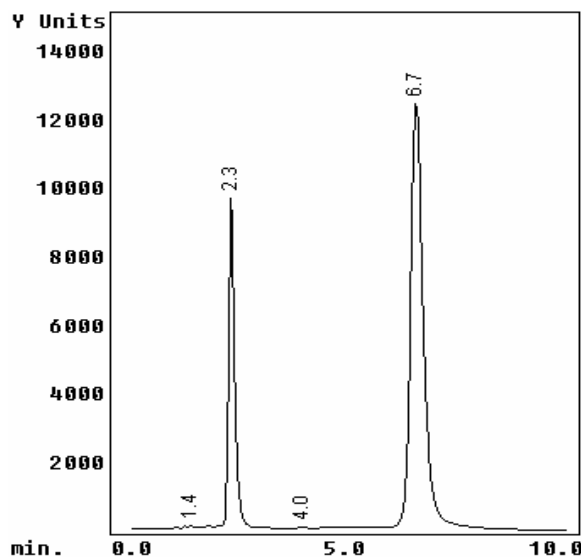


Figura 2.7. Cromatograma típico de uma amostra de um doente medicado com lamotrigina (200 mg/dia); a colheita foi realizada 2 horas após administração do fármaco; este doente epilético estava medicado com lamotrigina e ácido valpróico (Conc. LTG=10,6 mg/L; tr=6,7 min.).

2.3.1.3. Precisão e exactidão

O resumo da precisão e exactidão do método está representado na Tabela 2.4. Os coeficientes de variação médios foram 4,02% para o ensaio intra-dia e 6,67% para as análises realizadas nos 5 dias.

No que respeita à exactidão, o valor de *Bias* variou entre -3,63% e 3,46% para o ensaio intra-dia e -3,79% e 1,82% para o ensaio inter-dia. A comparação emparelhada entre concentrações nominais e experimentais também não revelou diferença estatística ($p > 0,05$), o que confirmou a exactidão do método.

Todos os valores estavam de acordo com os critérios de *Washington* (Shah *et al.*, 1992b).

Tabela 2.4. Resumo dos resultados da precisão (%CV) e da exactidão (%Bias) do método analítico desenvolvido para a determinação de lamotrigina em plasma humano (n=30).

	Ensaio					
	Intra-dia			Inter-dia		
C _{Teórica} (mg/L)	C _{Experimental} * (mg/L)	CV (%)	Bias (%)	C _{Experimental} * (mg/L)	CV (%)	BIAS (%)
0,1	0,10±0,003	3,12	+0,28	0,10±0,017	13,45	-0,33
0,5	0,49±0,023	4,88	-2,33	0,51±0,017	3,18	+1,44
2,5	2,57±0,049	1,93	+2,73	2,55±0,108	4,22	+1,82
5,0	5,17±0,114	2,21	+3,46	5,07±0,504	9,88	+1,46
10,0	9,95±0,515	5,19	-0,48	9,95±0,718	7,20	-0,52
15,0	14,46±0,983	6,81	-3,63	14,43±0,561	3,88	-3,79
Média	-	4,02	+0,004	-	6,97	+0,013

C_{Teórica}=Concentração teórica; C_{Experimental}=Concentração experimental; CV=Coefficiente de variação; *média±desvio-padrão.

2.3.1.4. Recuperação

A recuperação média da lamotrigina a partir da matriz foi consistente na gama de concentrações avaliadas, revelando um valor médio de 82,05±7,46% (média±desvio-padrão) (Tabela 2.5). É de salientar a medida de dispersão dos valores obtidos, já que alguns autores consideram ser este ponto fulcral na avaliação da eficácia da extracção (Hooper, 1995). A recuperação média do padrão interno foi de 86,14±9,26%.

Tabela 2.5. Recuperação absoluta (%) da lamotrigina em plasma humano na presença de padrão interno (Pi=4,0 mg/L).

Concentração Teórica (mg/L)	n	Recuperação (%)	
		M±DP	CV (%)
2,5	5	83,67±4,49	5,37
5,0	5	79,70±6,51	8,17
15,0	5	82,78±11,02	13,31
Média	-	82,05±7,46	9,09

M±DP=Média±desvio-padrão; CV=Coefficiente de variação; n=número de amostras.

2.3.1.5. Estabilidade

A estabilidade do analito na matriz a 4°C foi avaliada a dois níveis de concentração, com dez determinações em cada dia de estudo, em 7 dias diferentes. As amostras foram preparadas por adição de alíquotas de solução-mãe para obter concentrações finais de 2,5 e 10,0 mg/L de LTG.

O estudo foi feito através da razão entre a resposta obtida no dia do ensaio (dia N) e a resposta obtida no Dia 0. Esta comparação é realizada através da razão das médias das respostas e através da média e intervalo de confiança (90%) da razão entre respostas. Os resultados para cada nível de concentração encontram-se na Tabela 2.6. A evolução das razões (os dois níveis em conjunto; n=20), durante os 11 dias, pode ser observada na Figura 2.8.

A lamotrigina revelou ser estável em plasma quando armazenada a 4°C, durante onze dias (Tabela 2.6 e Figura 2.8).

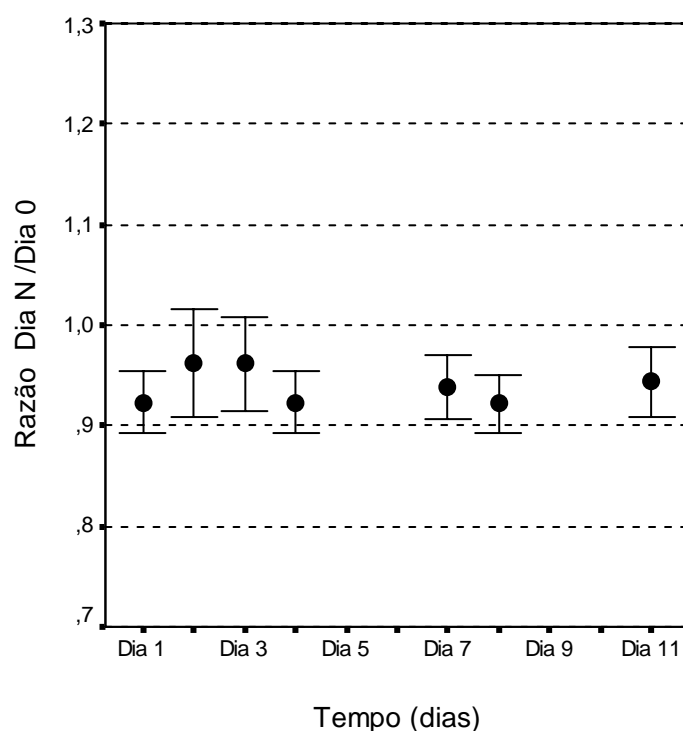


Figura 2.8.Estudo de estabilidade da lamotrigina em plasma a 4°C, durante 11 dias: evolução da razão (média) entre as respostas obtidas no dia do ensaio (Dia 1, Dia 2, Dia 3, Dia 4, Dia 7, Dia 8 e Dia 11) e as respostas obtidas no primeiro dia de estudo (Dia 0); as barras representam o intervalo de confiança a 90%, n=20.

Tabela 2.6. Estudo de estabilidade da lamotrigina em plasma a 4°C, durante 11 dias, para 2 níveis de concentração.

Padrão	Dia*	Resposta A/Api		Razão das médias Dia N /Dia 0 (%)	Razão Dia N /Dia 0 IC 90%
		M±DP	CV (%)		
2,5 mg/L	0	0,877±0,066	7,56	-	-
	1	0,818±0,035	4,26	93,3	0,89 - 0,98
	2	0,859±0,108	12,54	98,0	0,90 - 1,07
	3	0,876±0,098	11,14	99,9	0,94 - 1,07
	4	0,819±0,048	5,81	93,4	0,88 - 0,99
	7	0,833±0,034	4,06	95,0	0,90 - 1,01
	8	0,819±0,032	3,91	93,4	0,90 - 0,98
	11	0,850±0,047	5,54	96,9	0,92 - 1,02
10,0 mg/L	0	3,590±0,201	5,60	-	-
	1	3,246±0,223	6,87	90,5	0,86 - 0,96
	2	3,367±0,461	13,70	93,9	0,86 - 1,01
	3	3,287±0,343	10,43	91,6	0,85 - 0,99
	4	3,242±0,151	4,65	90,4	0,87 - 0,94
	7	3,297±0,195	5,92	91,9	0,88 - 0,96
	8	3,253±0,364	11,19	90,7	0,86 - 0,95
	11	3,267±0,212	6,50	91,1	0,87 - 0,96

Conc.=Concentração de LTG; A=Área do pico de LTG; Api=Área do pico de padrão interno; M±DP=Média±desvio-padrão; CV=Coefficiente de variação; *Dia 0=Primeiro dia de estudo; Dia N=Número de dias que decorreram após o primeiro dia de estudo.

A estabilidade do analito na matriz biológica à temperatura de -25°C foi igualmente avaliada por análise de dez réplicas em cada dia para os dois níveis de concentração (2,5 e 10,0 mg/L). Este estudo pretende avaliar a estabilidade a longo prazo, ou seja, saber quanto tempo podem ficar as amostras armazenadas no congelador até serem analisadas. Este estudo foi realizado no 10º, 46º, 63º, 107º e no 151º dia após congelação das amostras.

A lamotrigina revelou ser estável em plasma quando armazenada a -25°C durante aproximadamente 5 meses (Figura 2.9).

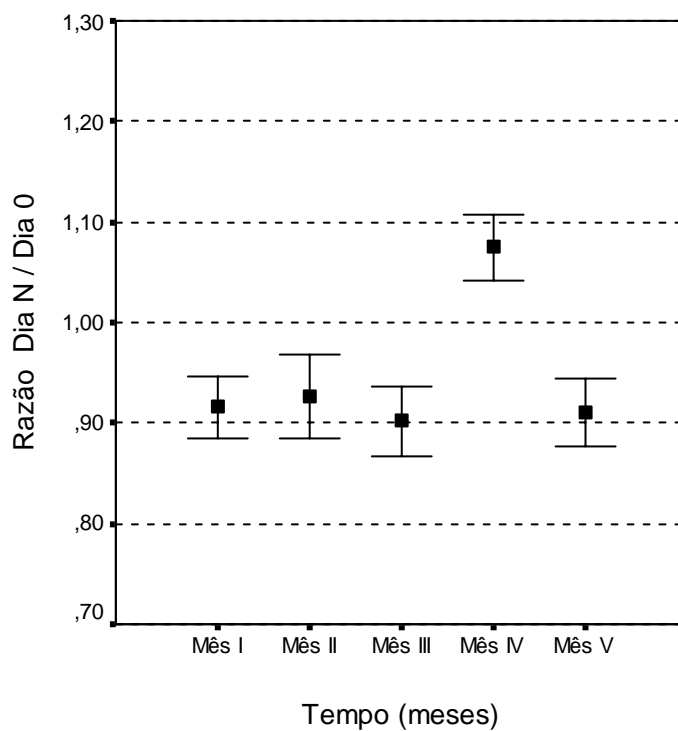


Figura 2.9.Estudo de estabilidade da lamotrigina em plasma a -25°C: evolução da razão (média) entre as respostas obtidas no dia do ensaio (Dia N, do Mês Y) e as respostas obtidas no primeiro dia de estudo (Dia 0). O Mês I, II, III, IV e V corresponde, respectivamente, ao 10º, 46º, 63º, 107º e 151º dia de estudo a partir do Dia 0; as barras representam o intervalo de confiança a 90%, n=20.

2.4. DISCUSSÃO

O desenvolvimento de uma técnica de cromatografia líquida de elevada resolução (HPLC) capaz de quantificar adequadamente as concentrações de lamotrigina existentes no soro humano representa um avanço científico importante, na medida em que abre perspectivas de estudo, nomeadamente a nível farmacocinético e farmacodinâmico, para um melhor conhecimento da relação existente entre a dose administrada e a concentração plasmática e entre esta e a resposta farmacológica induzida pela LTG.

O método para a determinação de LTG por cromatografia líquida foi desenvolvido pela primeira vez, em 1987, por Cohen e colaboradores (Cohen *et al.*, 1987). A LTG foi quantificada através de uma coluna de fase normal, após extracção da amostra com acetato de etilo. Mais tarde, Fazio *et al.* foram responsáveis pelo desenvolvimento de um método de HPLC capaz de quantificar a LTG e o seu Pi em menos de 3 minutos, utilizando uma coluna de fase normal de pequenas dimensões (75 mm) e com um tamanho de partícula de 3 μm (Fazio *et al.*, 1992). Este tipo de cromatografia em fase normal foi mais tarde utilizado por Bartoli *et al.* (Bartoli *et al.*, 1997), e por Vidal *et al.* (1999) porém, a sua principal limitação é a natureza dos solventes (hidrofóbicos) utilizados na fase móvel.

A lamotrigina foi, igualmente, quantificada através de ensaio radioimunológico (Biddlecombe *et al.*, 1990), ensaio imunofluorimétrico (Sailstad e Findlay, 1991) e por electroforese capilar (EC) (Shihabi e Oles, 1996). Quando comparados com a análise cromatográfica (HPLC), estes métodos revelaram valores de $r=0,980$ (Biddlecombe *et al.*, 1990), $r=0,989$ (Sailstad e Findlay, 1991), e $r=0,970$ (Shihabi e Oles, 1996), respectivamente. Apesar de não se ter assistido à comercialização de ensaios imunológicos para a quantificação de lamotrigina, à semelhança do que se verificou com os outros AEs convencionais (geralmente quantificados por ensaio imunológico de polarização de fluorescência - FPIA), a EC ganhou alguns adeptos e foi aplicada à rotina laboratorial (Thormann *et al.*, 2001; Theurillat *et al.*, 2002). A LTG foi ainda quantificada por cromatografia gasosa (Hallbach *et al.*, 1997; Queiroz *et al.*, 2002) e por cromatografia em camada fina (TLC) de elevada resolução (Patil e Bodhankar, 2005a). Contudo, a cromatografia líquida de elevada resolução é a técnica eleita na maior parte dos métodos desenvolvidos para determinar a LTG em matrizes biológicas. Recentemente foram desenvolvidos novos ensaios para a avaliação da LTG na presença de impurezas (ácido 2,3-diclobenzóico), por espectrofotometria, TLC e HPLC (Youssef e Taha, 2007).

A cromatografia em fase reversa foi claramente a técnica de HPLC mais utilizada para a quantificação de LTG em fluidos biológicos. Em 1991, com o intuito de determinar a LTG e o seu

metabolito 2-N-glucuronido, composto altamente polar, foi desenvolvida uma nova técnica recorrendo a HPLC em fase reversa (Sinz e Remmel, 1991). Esta técnica apesar de permitir a determinação simultânea da LTG e do seu metabolito no plasma e na urina, apresentou, no entanto, alguns pontos desfavoráveis, como sejam os tempos de retenção elevados (cerca de 30 minutos), o recurso a gradiente de fase móvel e o aquecimento da coluna a 40°C, que podem constituir limitações importantes, nomeadamente porque exigem equipamento especializado. Ainda no mesmo ano, foi publicada outra técnica de determinação de LTG recorrendo a uma coluna com ciano-partículas (Cociglio *et al.*, 1991). Desde então, a determinação de LTG por HPLC em fase reversa tem sido apontada em vários trabalhos (Ramachandran *et al.*, 1994; Fraser *et al.*, 1995; Papadoyannis *et al.*, 1995; Hart *et al.*, 1997; Lensmeyer *et al.*, 1997; Sallustio e Morris, 1997; Ren *et al.*, 1998; Angelis-Stoforidis *et al.*, 1999; Matar *et al.*, 1999; Vidal *et al.*, 1999; Barbosa e Mídio, 2000; Torra *et al.*, 2000). O número elevado de trabalhos publicados até 2000, traduz, certamente, o interesse suscitado sobre o tema.

No que diz respeito à preparação da amostra, a maioria dos métodos analíticos de determinação de LTG publicados utiliza a técnica extracção líquido-líquido com solvente orgânico (Cohen *et al.*, 1987; Fazio *et al.*, 1992; Fraser *et al.*, 1995; Forssblad *et al.*, 1996; Hart *et al.*, 1997; Sallustio e Morris, 1997; Matar *et al.*, 1999; Barbosa e Mídio, 2000). Ainda que alguns autores tenham referido o clorofórmio (Hart *et al.*, 1997) ou o éter dietílico (Matar *et al.*, 1999), a maioria dos autores utilizou o acetato de etilo como solvente orgânico. Apesar de mais dispendiosa, alguns autores preferem a extracção em fase sólida (Sinz e Remmel, 1991; Papadoyannis *et al.*, 1995; Yamashita *et al.*, 1995; Lensmeyer *et al.*, 1997; Torra *et al.*, 2000). Alguns dos procedimentos publicados são baseados na injeção directa após precipitação de proteínas com acetonitrilo (Ramachandran *et al.*, 1994; Ren *et al.*, 1998; Angelis-Stoforidis *et al.*, 1999) ou na injeção da amostra em diclorometano após basificação (Bartoli *et al.*, 1997; Vidal *et al.*, 1999). No entanto, estes métodos necessitam de recorrer a detecção a dois comprimentos de onda (220 nm e 310 nm) (Ramachandran *et al.*, 1994), originam tempos de análise longos (Ren *et al.*, 1998) ou possuem limites de detecção relativamente altos (Angelis-Stoforidis *et al.*, 1999). Alguns dos métodos referidos utilizaram uma razão de amostra/acetonitrilo de 1:1 (vol./vol.) (Ramachandran *et al.*, 1994; Ren *et al.*, 1998), no entanto, este facto pode levar a precipitação e bloqueio da coluna (Jürgens *et al.*, 1984). Para além disso, este tipo de tratamento da amostra pode originar a diminuição do tempo de vida da coluna devido a eventual remoção incompleta das proteínas da matriz biológica. Em 1997, foi desenvolvido um método capaz de analisar a LTG e os seus dois metabolitos, o glucuronido e o metabolito metilado, que utiliza um sistema automático de preparação de amostra incluído no próprio sistema cromatográfico (Cooper *et al.*, 1997). Este método consegue determinar estes três compostos simultaneamente,

apesar das suas diferenças de polaridade e de intervalos de concentração, porém, requer o estabelecimento prévio de um sistema complexo de preparação de amostras, para além de recorrer a gradiente de fase móvel e dois comprimentos de onda durante os 18 minutos de análise.

Neste tipo de análise que exige um pré-tratamento da amostra com passos mais ou menos complexos, é essencial o recurso à utilização de um padrão interno (Pi). Através de uma revisão feita aos métodos de quantificação de lamotrigina publicados até à data, o Pi mais utilizado foi o análogo estrutural da lamotrigina (3,5-diamino-6-(2-metoxifenil)-1,2,4-triazina) (Cohen *et al.*, 1987; Cociglio *et al.*, 1991; Sinz e Remmel, 1991; Fazio *et al.*, 1992; Fraser *et al.*, 1995; Papadoyannis *et al.*, 1995; Sallustio e Morris, 1997; Angelis-Stoforidis *et al.*, 1999; Barbosa e Mídio, 2000). Em determinadas circunstâncias, foram usadas outras substâncias, tais como, o hexobarbital (Ramachandran *et al.*, 1994), o tiopental (Hart *et al.*, 1997), o butalbital (Torra *et al.*, 2000), a acetanilida (Yamashita *et al.*, 1995), a nortriptilina (Bartoli *et al.*, 1997), a protriptilina (Vidal *et al.*, 1999), o felbamato (Ren *et al.*, 1998) ou a pipamperona (Dumortier *et al.*, 2001). Foi também publicada uma técnica de quantificação da LTG que não recorre ao uso de Pi, justificando o facto com a elevada eficácia de extracção da técnica (Forssblad *et al.*, 1996).

Alguns destes métodos apresentam capacidade para determinar vários fármacos AEs simultaneamente. Em 1994, Ramachandran *et al.* (1994) desenvolveram um método analítico em fase reversa capaz de quantificar a lamotrigina na presença de fenitoína, fenobarbital e carbamazepina recorrendo a detecção a dois comprimentos de onda (220 nm e 310 nm). Em 1997, foi proposto um método de quantificação da LTG, na presença de fenitoína, carbamazepina e seu epóxido, após uma extracção em fase sólida e separação numa coluna (de grupos cianopropil) sujeita a uma temperatura constante de 50°C, seguida de detecção a 214 nm (Lensmeyer *et al.*, 1997). Porém, este método para além de ser dispendioso devido ao tipo de preparação de amostra que utiliza, encontra-se igualmente, limitado pela necessidade de equipamento especializado para aquecimento da coluna, o que se verifica também no método proposto por Sinz e Remmel, (1991), tal como já foi referido atrás. Um outro método foi desenvolvido para quantificar LTG, oxcarbazepina e o seu metabolito activo, 10-hidroxicarbazepina, simultaneamente a 210 nm (Torra *et al.*, 2000), porém, não é possível quantificar o metabolito activo na presença de etossuccimida, pois os dois compostos apresentam tempos de retenção muito semelhantes na referida técnica. Foi também publicado um método capaz de quantificar simultaneamente seis AEs (lamotrigina, carbamazepina, fenitoína, fenobarbital, primidona e etossuccimida) e dois metabolitos da carbamazepina (carbamazepina-epóxido e carbamazepina-diol) a 220 nm (Matar *et al.*, 1999).

O presente método de cromatografia líquida de elevada resolução foi desenvolvido e validado utilizando um sistema em fase reversa em condições cromatográficas muito simples: separação cromatográfica rápida (10 minutos) e detecção UV. A LTG apresenta dois máximos de absorção UV, um sinal mais forte a 220 nm, e um sinal mais fraco a 310 nm. No entanto, fármacos AEs (fenobarbital, primidona, etossuccimida, fenitoína, oxcarbazepina, carbamazepina e seus metabolitos), bem como, compostos endógenos absorvem a 200 nm, pelo que podem constituir fontes de interferência da técnica (Ramachandran *et al.*, 1994; Lensmeyer *et al.*, 1997; Matar *et al.*, 1999; Torra *et al.*, 2000). Por exemplo, o epóxido da carbamazepina, pode eluir ao mesmo tempo que a lamotrigina, no entanto este metabolito não absorve para valores de comprimento de onda superiores a 300 nm (Ramachandran *et al.*, 1994; Fraser *et al.*, 1995). Assim, a detecção a 310 nm permite eliminar a maior parte das interferências presentes no plasma (Ren *et al.*, 1998). Consequentemente, nesta técnica a leitura foi processada a 306 nm, tal como a técnica desenvolvida por Cohen *et al.* (Cohen *et al.*, 1987) e outras técnicas publicadas posteriormente (Fraser *et al.*, 1995; Papadoyannis *et al.*, 1995; Hart *et al.*, 1997; Angelis-Stoforidis *et al.*, 1999; Barbosa e Mídio, 2000). A extração com acetato de etilo como solvente orgânico, para além das vantagens que apresenta em termos de durabilidade da coluna cromatográfica comparativamente com o método de precipitação de proteínas, permite excluir todas as impurezas hidrofílicas existentes no soro, que são removidas juntamente com fase aquosa. Para além disso, tentou-se diminuir o volume de solvente orgânico, com o objectivo de diminuir o tempo necessário para a evaporação da fase orgânica, verificando-se um aumento da razão entre amostra/acetato de etilo (vol.:vol.), comparativamente com outros métodos (Cohen *et al.*, 1987; Fazio *et al.*, 1992; Forssblad *et al.*, 1996; Sallustio e Morris, 1997; Barbosa e Mídio, 2000). Nesta técnica, a adição de trietilamina à fase móvel justifica-se pelo facto de a LTG ser um composto básico relativamente polar, capaz de reagir com alguns grupos residuais (silanol) da coluna cromatográfica num sistema em fase reversa, o que pode traduzir-se em deformações dos picos dos cromatogramas (Juergens, 1988). Estas bases orgânicas de cadeia alquílica curta, como a trietilamina e a n-butilamina, foram utilizadas para a separação da LTG em condições básicas (pH=8,5) por Juergens (1988) e mais tarde, por outros autores (Hart *et al.*, 1997; Lensmeyer *et al.*, 1997; Barbosa e Mídio, 2000).

A selectividade foi averiguada através do estudo de AEs frequentemente utilizados em associação com a lamotrigina na terapêutica de ambulatório (carbamazepina, fenitoína, ácido valpróico, fenobarbital, primidona, vigabatrina, gabapentina, clobazam), bem como outros fármacos utilizados na terapêutica de intervenção durante a hospitalização dos doentes (clonazepam, midazolam e paracetamol). Não se verificou interferência por parte destes fármacos.

O estudo da estabilidade da substância na matriz biológica assume também alguma relevância já que permite assegurar que a amostra se mantém inalterada desde a sua colheita no internamento hospitalar até ser analisada no laboratório, desde que devidamente acondicionada e refrigerada. Neste estudo foi demonstrado que a LTG permanece estável durante 11 dias a 4°C e por 5 meses quando as amostras são congeladas a -25°C.

O método desenvolvido por Barbosa e Mídio (2000) é porventura o que mais se assemelha à técnica em questão, ainda assim, apresenta uma amplitude de concentrações mais restrita e um limite de quantificação e de detecção superiores, para além da preparação da amostra ser potencialmente mais demorada devido ao maior volume de acetato de etilo que utiliza no processo de extracção.

À luz dos critérios de validação referidos inicialmente neste capítulo, os valores apresentados provam que o método é exacto e preciso, sensível e selectivo. A exactidão nos extremos da curva de calibração, especialmente no limite de quantificação, foi excelente. Este facto deve-se à aplicação do modelo de regressão linear ponderada (Capítulo 3). Esta abordagem repercutiu-se também no limite de detecção calculado (0,008 mg/L), que se apresentou como o mais baixo de todos os outros métodos referidos atrás (Cohen *et al.*, 1987; Cociglio *et al.*, 1991; Sinz e Remmel, 1991; Fazio *et al.*, 1992; Ramachandran *et al.*, 1994; Papadoyannis *et al.*, 1995; Forssblad *et al.*, 1996; Bartoli *et al.*, 1997; Hart *et al.*, 1997; Lensmeyer *et al.*, 1997; Sallustio e Morris, 1997; Ren *et al.*, 1998; Angelis-Stoforidis *et al.*, 1999; Matar *et al.*, 1999; Barbosa e Mídio, 2000; Torra *et al.*, 2000).

Por conseguinte, a técnica validada neste trabalho configura-se como a mais adequada ao propósito que inicialmente motivou o seu desenvolvimento, pois permite quantificar a LTG numa gama de concentrações suficientemente abrangente, permitindo, por um lado, a determinação de concentrações elevadas, referentes às amostras colhidas no t_{max} (~2 horas após administração), ou seja, os máximos ou *picos* de concentração, e por outro lado, simultaneamente, possibilita o estudo do perfil de concentrações ao longo de dias consecutivos de descontinuação terapêutica, o que leva as concentrações séricas dos doentes até valores muito baixos (ver Capítulo 4). Esta estratégia de descontinuação da dose de AE é uma técnica de precipitação de crises utilizada nos doentes epiléticos com o objectivo de caracterizar o seu tipo de crise e/ou localizar o foco epilético em candidatos a tratamento cirúrgico. Este estudo baseia-se na monitorização vídeo-electroencefalográfica (VEEG) do doente durante um período de tempo definido (ver Capítulo 1 e 5). Assim, a técnica analítica em causa permite quantificar concentrações até 0,1 mg/L, já que é esse o valor do limite de quantificação.

Em resumo, o método analítico aqui apresentado pode ser classificado como sendo simples e reprodutível, tendo demonstrado a sua utilidade e adequação para a determinação de

LTG em soro humano. Por conseguinte, este método encontra-se apto a ser aplicado, não só à investigação clínica facilitando a realização de estudos de farmacocinéticos/ farmacodinâmicos, mas também à monitorização terapêutica dos doentes na rotina clínica através da determinação dos seus níveis séricos (Castel-Branco *et al.*, 2001). Importa no entanto referir que, fruto do interesse gerado nos últimos anos por todo o mundo em torno da utilização clínica da LTG, continuamos a assistir ao desenvolvimento de técnicas de HPLC para a sua determinação, isoladamente (Crocì *et al.*, 2001; Cheng *et al.*, 2005) ou simultaneamente com outros AEs convencionais e de nova geração (Bugamelli *et al.*, 2002; Contin *et al.*, 2005; Patil e Bodhankar, 2005b; Greiner-Sosanko *et al.*, 2007). O estudo da variabilidade inter-laboratorial da técnica de HPLC realizado em 70 laboratórios (13 países europeus) revelou valores semelhantes aos referidos para os AEs convencionais (Williams *et al.*, 2003). Recentemente foi publicada uma técnica específica para a análise de LTG em comprimidos (Emami *et al.*, 2006).