

DETERMINAÇÃO SIMULTÂNEA DE CARBAMAZEPINA, FENITOÍNA E FENOBARBITAL EM SANGUE SECO EM PAPEL POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA**Gabriela Martins Silva de Lima, Roberta Zilles Hahn, Cristina Rama, Liliane Rhoden, Paulina Hidalgo, Cleber Álvares da Silva, Marina Venzon Antunes e Rafael Linden***

Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Feevale, Rodovia ERS 239, n. 2755, 93352-000 Novo Hamburgo – RS, Brasil

Recebido em 26/11/2013; aceito em 10/03/2014; publicado na web em 17/06/2014

SIMULTANEOUS DETERMINATION OF CARBAMAZEPINE, PHENYTOIN AND PHENOBARBITAL IN DRIED BLOOD SPOTS BY HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY. Carbamazepine, phenobarbital and phenytoin were determined in dried blood spots (DBS) by high performance liquid chromatography, after extraction of 8 mm DBS using a mixture of acetonitrile and methanol. Analytes were separated by reversed-phase chromatography, with a run time of 17 minutes. Intra-assay and inter-assay precisions were in the 5.3 to 8.4% and 3.3 to 5.2% ranges, respectively. Accuracy was in the 98.8 to 104.3% range. The method had sensitivity to detect all analytes at levels below minimum therapeutic concentrations. The analytes were stable at 4 °C and room temperature for up to 12 days and at 45 °C for 9 days. The method was applied to 14 paired clinical samples of blood serum and DBS.

Keywords: antiepileptic drugs; dried blood spots; HPLC; therapeutic drug monitoring.

INTRODUÇÃO

O tratamento da epilepsia é baseado na utilização de fármacos chamados de anticonvulsivantes, objetivando proporcionar ao paciente uma melhora na qualidade de vida por meio do controle adequado das crises convulsivas.¹ Entretanto, os sinais clínicos indicativos de posologias inadequadas destes fármacos normalmente se apresentam na forma de eventos indesejáveis, tais como a ocorrência de convulsões ou a excessiva depressão do sistema nervoso central.² Desta forma, considerando que as concentrações séricas destes fármacos apresentam maior correlação com seus efeitos clínicos do que com as doses empregadas, eles são frequentemente objeto do monitoramento terapêutico.³ O monitoramento terapêutico dos fármacos anticonvulsivantes tem como objetivo a individualização do tratamento a partir da determinação das concentrações dos fármacos, seguida de ajustes posológicos, quando necessários.^{4,5}

Uma alternativa recente no monitoramento terapêutico de fármacos é a utilização de sangue impregnado em papel (mancha de sangue seco em papel, MSS) devido à possibilidade de coletas minimamente invasivas.⁶ Além disto, a secagem das amostras biológicas no papel permite a estabilização dos analitos e o transporte por meio do serviço postal convencional, visto que o sangue seco não é considerado uma amostra com risco biológico.^{6,7} Porém, uma limitação inerente ao emprego de MSS é a necessidade de métodos analíticos de elevada sensibilidade, devido ao volume reduzido das amostras.⁶ Embora diversos autores tenham relatado métodos baseados em espectrometria de massas para a análise de fármacos em MSS, o uso de sistemas de cromatografia líquida associados a detectores espectrofotométricos (CLAE-UV) já foi descrito para diversos fármacos no contexto do monitoramento terapêutico, tais como o imunossupressor ácido micofenólico⁸ e o antirretroviral atazanavir.⁹ Recentemente foi descrito um método baseado em CLAE-UV para determinação de anticonvulsivantes em MSS, porém utilizando preparação de amostra relativamente complexa, composta de extração líquido-líquido seguida de extração em fase sólida, e sem descrição da sua aplicação em pacientes em uso dos fármacos.¹⁰

Desta forma, o presente trabalho objetiva desenvolver e validar um método para a determinação simultânea de carbamazepina (CBZ), fenobarbital (FNB) e fenitofina (FNT) em MSS, empregando uma preparação simples de amostras associadas à análise por CLAE-UV.

PARTE EXPERIMENTAL**Reagentes, materiais e amostras de referência**

CBZ e FNT foram adquiridas da Alpha Aesar (Ward Hill, Estados Unidos). Fenobarbital (FNB) foi obtido do Laboratório Cristália (Itapira, Brasil). Propranolol foi adquirido da Purifarma Química e Farmacêutica (São Paulo, Brasil). Metanol e acetonitrila (grau HPLC), ácido fosfórico 85%, fosfato de potássio monobásico e fosfato de potássio dibásico foram adquiridos da Merck (Darmstadt, Alemanha). Papel Whatman 903 foi adquirido da GE Healthcare (Westborough, Estados Unidos).

Preparação das soluções e dos padrões

Soluções estoque individuais dos fármacos foram preparadas a partir da sua dissolução em metanol a fim de obter uma concentração de 10 mg mL⁻¹ para FNT e FNB e de 1 mg mL⁻¹ para CBZ. A solução de trabalho combinada foi preparada pela adição de alíquotas das soluções estoque de cada anticonvulsivante e ajuste do volume final com metanol para obter concentrações de 500 µg mL⁻¹ para FNT e FNB e 200 µg mL⁻¹ para CBZ. A solução estoque de propranolol foi preparada na concentração de 1 mg mL⁻¹ em metanol. A solução de trabalho do padrão interno (PI) (propranolol 1 µg mL⁻¹) foi preparada através da dissolução da solução estoque com metanol. A mistura de extração foi composta de acetonitrila e metanol (1:3, v/v).

Equipamentos e condições cromatográficas

As análises foram realizadas em um sistema de cromatografia líquida de alta eficiência Accela 600, composto de sistema de bombeamento quaternário, autoamostrador e detector de arranjo de diodos. O sistema de cromatografia foi controlado pelo programa ChromQuest

*e-mail: rafael.linden@feevale.br

5.0 (Thermo Scientific, EUA). A separação cromatográfica foi realizada em uma coluna Hypersil Gold C18, também proveniente da Thermo Scientific, com 15 cm de comprimento, 4,6 mm de diâmetro interno e contendo partículas com 3 µm de diâmetro. A fase móvel foi uma mistura de tampão fosfato 25 mM pH 6,2, acetonitrila e metanol (73:18:9, v/v), eluída a uma vazão de 0,9 mL min⁻¹. O tampão foi filtrado em membrana de acetato de celulose com poros de 0,45 µm de diâmetro (Sartorius, Alemanha) antes da preparação da fase móvel. A fase móvel foi sonicada por 20 min antes da sua utilização. A coluna foi mantida a 52 °C durante a análise. Os cromatogramas foram monitorados em 205 nm, com aquisição de espectros de varredura entre 200 e 380 nm. A duração da análise cromatográfica foi de 17 min.

Preparação das amostras

Discos de MSS foram obtidos por meio da perfuração dos cartões Whatman 903 com um perfurador com punção de 8 mm de diâmetro (equivalente a 20 µL de sangue total), sendo utilizado um disco por extração. O disco foi transferido para microtubo de polipropileno, ao qual foi adicionado 250 µL da mistura de extração e 50 µL da solução de trabalho de padrão interno. A mistura foi homogeneizada em homogeneizador rotativo por 30 minutos a 100 RPM, em temperatura ambiente. Após, o sobrenadante foi transferido para outro microtubo de polipropileno e evaporado até a secura a 55 °C, sob fluxo de ar. O extrato seco foi retomado com 200 µL da fase móvel, seguido de centrifugação a 10.000 g por 10 minutos. O sobrenadante foi transferido para um frasco de autoamostrador. Uma alíquota de 25 µL foi injetada na coluna cromatográfica.

Seletividade

A seletividade foi avaliada por meio da verificação da presença de interferentes nos tempos de retenção dos analitos em MSS obtidas de 6 indivíduos não usuários dos fármacos avaliados neste estudo. Todos os picos presentes nos cromatogramas tiveram seus espectros de varredura no UV comparados com espectros de referência, adquiridos a partir das análises de amostras de referência e armazenadas em uma biblioteca espectral, bem como tiveram sua pureza avaliada pela rotina computacional disponibilizada pelo programa ChromQuest 5.0.

Linearidade

A linearidade dos modelos de calibração foi avaliada em seis níveis, em sextuplicata para cada nível, empregado sangue total com hematócrito % (Hct%) 40 como matriz. Em amostras de sangue total isento dos fármacos de interesse foram adicionadas soluções de trabalho combinadas dos analitos a fim de obter soluções analíticas nas concentrações de 1,56; 3,12; 6,25; 12,5; 25 e 50 µg mL⁻¹ para FNB e FNT e 0,625; 1,25; 2,5; 5; 10 e 20 µg mL⁻¹ para CBZ. O sangue foi aplicado ao papel Whatman 903 e seco em temperatura ambiente por 3 h para obtenção das MSS. As curvas analíticas foram construídas calculando as razões entre as áreas dos picos de cada analito e do padrão interno e comparando estas razões com as concentrações nominais dos calibradores. A homocedasticidade dos dados de calibração foi avaliada com o teste *F* com nível de confiança de 95%. As curvas foram ajustadas a partir da regressão linear empregando diversos fatores ponderais (1/*x*, 1/*x*^{0.5}, 1/*x*², 1/*y*, 1/*y*^{0.5}, 1/*y*²). Os modelos de calibração foram avaliados pelos coeficientes de correlação (*r*) e do erro percentual cumulativo (Σ%ER).¹¹ Foi selecionado o modelo de regressão com *r* superior a 0,99, associado ao menor Σ%ER. Curvas analíticas diárias, usando as mesmas concentrações (medidas únicas por concentração), foram preparadas durante o processamento de todos os lotes analíticos.

Precisão e exatidão

Foram preparadas amostras de MSS controle para avaliação da precisão e da exatidão em concentração baixa (CQB), média (CQM) e alta (CQA). O CQB conteve FNB, FNT e CBZ nas concentrações de 2,34; 2,34 e 0,94 µg mL⁻¹, respectivamente. O CQM conteve FNB, FNT e CBZ nas concentrações de 9,38; 9,38 e 3,75 µg mL⁻¹, respectivamente. O CQA conteve FNB, FNT e CBZ nas concentrações de 37,5; 37,5 e 15,5 µg mL⁻¹, respectivamente. As análises foram realizadas como descrito anteriormente, em triplicatas, e repetidas em 5 dias diferentes. A precisão intraensaios e a precisão interensaios foram calculadas pela análise de variância (ANOVA), usando “dia” como variável agrupadora. A exatidão foi calculada como percentagem média obtida do valor teórico adicionado nas amostras. O critério de aceitação para exatidão foi valores médios de ±15% do valor nominal e para precisão foi um CV máximo de 15%.¹²

Limite inferior de quantificação

Uma amostra de controle de qualidade no nível do limite de quantificação, na concentração de 1,56 µg mL⁻¹ para FNB e FNT e 0,63 µg mL⁻¹ para CBZ (controle de qualidade no limite de quantificação, CQLQ), foi testada em triplicata em 3 dias diferentes e sua precisão e exatidão foram calculadas conforme descrito anteriormente. Os critérios de aceitação para o CQLQ foram precisão (CV%) ≤ 20 e exatidão entre 80 a 120%, de acordo com Shah *et al.*¹²

Estabilidade em diferentes temperaturas

Foram preparadas amostras de MSS para estudo de estabilidade em concentração baixa (CQEB) e concentração alta (CQEA), as quais foram preparadas conforme descrito anteriormente. Amostras controle foram mantidas a 4, 25 e 45 °C, com análises realizadas nos dias 3, 6, 9 e 12. A estabilidade em diferentes temperaturas foi avaliada pela diferença percentual entre a média das concentrações obtidas no dia de preparação das amostras controle e as médias obtidas no final do ciclo. A estabilidade foi considerada aceitável se todos os valores encontrados estivessem na faixa de 85 a 115% das concentrações obtidas no início da série.

Determinação de anticonvulsivantes em soro

A dosagem de anticonvulsivantes em amostras de soro foi realizada conforme protocolo estabelecido no Laboratório de Análises Toxicológicas da Universidade Feevale, baseado em Ma e colaboradores.¹³ A dosagem é realizada a partir de uma precipitação proteica da amostra de soro com acetonitrila. A separação cromatográfica emprega as mesmas condições descritas para as amostras de MSS. O método foi validado de acordo com consensos internacionais para métodos bioanalíticos.¹²

Avaliação da partição plasma-sangue

Sangue total contendo EDTA como anticoagulante (%Hct = 40) foi adicionado dos fármacos a fim de obter as concentrações dos controles de qualidade baixo, médio e alto, anteriormente descritos. Após, as soluções resultantes foram incubadas por 60 min a 37 °C. A concentração dos fármacos foi determinada, em triplicata, em alíquotas do sangue total incubado (C_s) e no plasma (C_p) obtido após centrifugação a 2.000 g por 10 min. A partir destas concentrações foram determinadas a razão entre as concentrações no plasma e no sangue (RPS), a fração percentual no plasma (f_p %, Equação 1) e a concentração nas células sanguíneas (C_{cs}, equação 2).¹³ A

concentração estimada no soro (CES) a partir da concentração em MSS (C_{MSS}) pode ser determinada a partir da Equação 2, quando o %Hct do paciente é conhecido, ou por meio da Equação 3, usando a RPS média como fator de multiplicação.¹⁴

$$f_p \% = (C_p/C_s) \times (1 - \text{Hct}) \times 100 \quad (1)$$

$$\text{CES} = [C_{MSS} / (1 - \text{Hct})] \times f_p \quad (2)$$

$$\text{CES} = C_{MSS} \times \text{RPS} \quad (3)$$

Aplicação do método

O trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Feevale sob o registro 4.03.01.11.1972. Foram convidados a participar pacientes em tratamento com os fármacos descritos no estudo, vinculados a um serviço de neurologia. Como critérios de exclusão foram adotados pacientes com distúrbios de coagulação sanguínea. Todos os pacientes ou seus responsáveis manifestaram concordância expressa em participar do estudo a partir da assinatura de um termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Cromatografia e preparação das amostras

Embora a determinação de FNB, FNT e CBZ em amostras biológicas já tenha sido descrita empregando cromatografia a gás,¹⁵ A utilização da cromatografia líquida de alta eficiência com detector de arranjo de diodos mostrou-se apropriada para a determinação simultânea e quantitativa dos analitos avaliados, especialmente devido à simplicidade do procedimento de preparação das amostras. A análise cromatográfica teve duração total de 17 min, com tempos de retenção de 5,2; 10,4; 13,0 e 14,0 min para FNB, PI, FNT e CBZ, respectivamente. Na Figura 1 são apresentados cromatogramas obtidos a partir de MSS, adquiridos com o método. Não foram identificados interferentes endógenos no processamento de amostras isentas de fármacos, assim como os picos referentes aos analitos sempre apresentaram similaridade espectral superior a 0,999 com os espectros de referência e pureza espectral superior a 99,5%.

A técnica utilizada para o preparo das amostras foi relativamente simples, com a utilização de discos de 8 mm de MSS, acrescentados de 250 μL do solvente de extração e 50 μL do PI, seguidos de homogeneização, centrifugação e evaporação da fase orgânica. Shah *et al.* empregaram uma etapa semelhante de extração líquido-líquido, a qual foi seguida de retomada do extrato em água e posterior extração em fase sólida, com nova evaporação da fase orgânica antes da injeção no sistema de CLAE.¹⁰ A abordagem utilizada neste estudo, mais simples e rápida, permitiu a obtenção de sensibilidade e seletividade suficientes para a aplicação clínica do método.

Validação do método

Não houve indicação de instabilidade dos analitos quando as MSS foram mantidas em temperatura ambiente ou 4 °C durante 12 dias, com variações de concentração dos analitos entre 93,5 e 108,9% dos valores iniciais da série (Tabela 1). Entretanto, na temperatura de 45 °C foi identificada uma tendência de redução nas concentrações determinadas nas amostras controle, com valores aceitáveis, na faixa de 85,8 a 99,8% até o dia 9, sendo que diversas amostras controle apresentaram valores inferiores a 85% da concentração inicial da série no dia 12, demonstrando instabilidade. Assim, MSS contendo os analitos avaliados neste estudo não requerem condições especiais

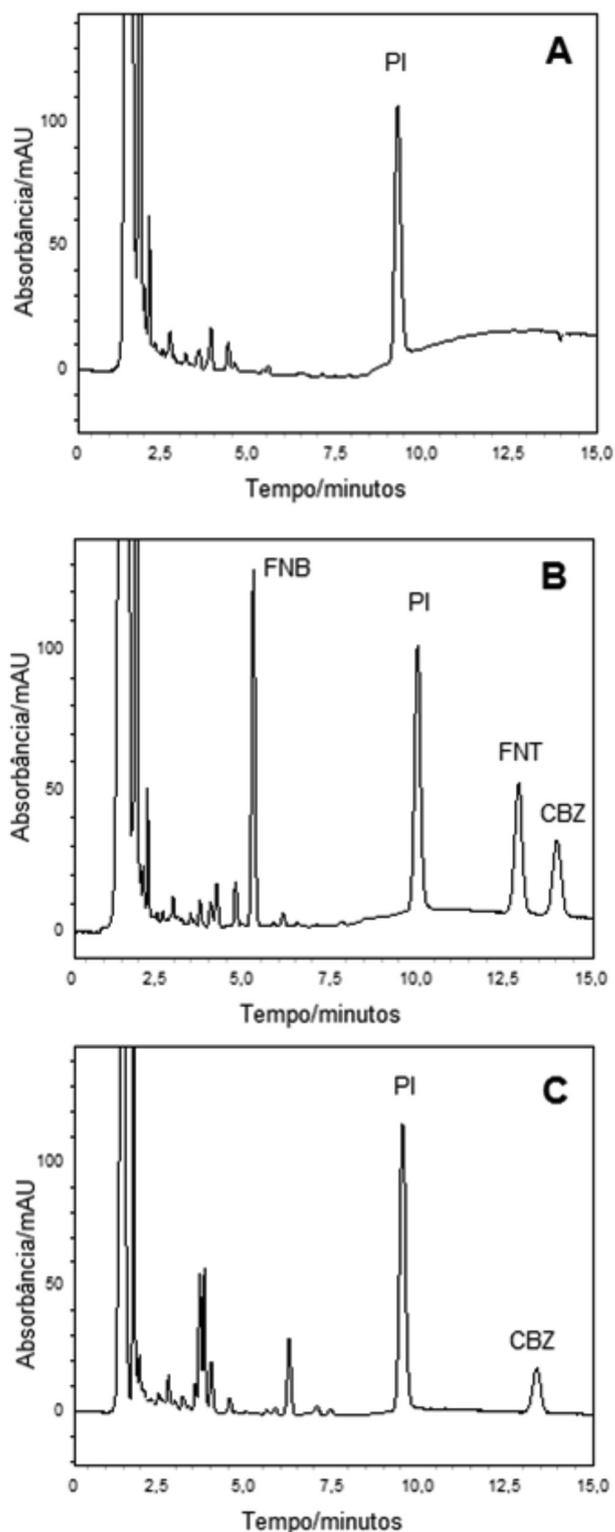


Figura 1. Cromatogramas obtidos a partir de MSS, monitorados em 205 nm. Tempos de retenção de 5,2 min para FNB, 10,4 min para PI (propranolol), 13,0 min para FNT e 14,0 min para CBZ. A: MSS isento dos fármacos. B: MSS contendo FNB e FNT 25 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e CBZ 10 25 $\mu\text{g mL}^{-1}$. C: MSS de paciente contendo CBZ 5,52 $\mu\text{g mL}^{-1}$

de conservação, permitindo seu transporte e armazenamento em embalagens não refrigeradas, expostas a temperaturas de até 45 °C, por até 9 dias, o que é compatível com o transporte postal.

Os dados da curva de calibração apresentaram heterocedasticidade significativa, com $F_{exp} = 285,7$ a 527,3 ($F_{tab(5; 5; 0,95)} = 5,05$) para os

Tabela 1. Percentagens (%) do valor inicial da série de amostras-controle em MSS mantidas a 4 °C, temperatura ambiente (TA) e 45 °C

Fármaco	Controle	Dia 3			Dia 6			Dia 9			Dia 12		
		4 °C	TA	45 °C	4 °C	TA	45 °C	4 °C	TA	45 °C	4 °C	TA	45 °C
Carbamazepina	CQB	102,3	97,5	101,5	97,5	103,8	95,3	100,2	105,6	93,5	95,3	93,5	87,6
	CQM	93,8	103,8	92,7	98,2	102,4	94,8	101,8	97,8	85,6	99,8	98,7	85,5
	CQA	105,8	102,6	98,6	103,9	94,4	91,3	93,8	96,5	90,3	91,9	90,3	90,2
Fenitoína	CQB	108,9	98,9	98,5	101,5	94,7	91,2	103,5	97,7	93,8	103,9	93,7	93,7
	CQM	94,2	104,6	93,4	95,1	104,5	95,3	96,6	102,5	85,8	95,6	97,6	83,8
	CQA	96,3	99,8	100,5	103,5	101,8	90,8	96,3	105,3	99,8	93,4	101,3	85,4
Fenobarbital	CQB	101,4	102,5	95,7	103,4	104,2	93,6	102,8	103,8	90,5	104,9	90,3	92,7
	CQM	93,8	97,8	100,7	106,1	99,2	97,2	96,3	97,7	93,9	93,6	105,7	83,9
	CQA	104,7	100,9	94,2	100,5	95,4	101,3	101,2	103,9	87,1	99,4	94,9	88,7

CQAB: controle de qualidade baixo; CQM: controle de qualidade médio; CQB: controle de qualidade baixo.

diferentes analitos. Diferentes fatores ponderais foram avaliados para a seleção modelo de regressão a ser empregado. Dentre os modelos avaliados, a regressão utilizando o fator ponderal $1/x^2$ apresentou menor $\Sigma\%ER$, com valores entre $1,2 \times 10^{-12}$ e $4,1 \times 10^{-12}$, e com coeficientes de correlação entre 0,9904 e 0,9975. Todas as curvas de calibração incluíram valores significativamente inferiores às faixas terapêuticas estabelecidas para os anticonvulsivantes avaliados, caracterizando uma elevada sensibilidade mesmo com o emprego de amostras de pequeno volume, de aproximadamente 20 μL .

Os resultados dos ensaios de precisão e exatidão mostraram-se adequados, conforme Tabela 2. A precisão intra-ensaios apresentou valores entre 5,3 e 8,4% e a precisão inter-ensaios entre 3,3 e 5,2%, demonstrando adequada repetibilidade do método. A exatidão foi determinada entre 98,8 e 104,3%, também dentro dos critérios de aceitação para métodos bioanalíticos.¹² O limite de quantificação foi de 1,56 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para FNB e FNT e de 0,63 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para CBZ, concentração na qual foi possível obter precisão (entre 9,2 a 10,1%) e exatidão (103,6 a 106,5%) aceitáveis. Shah *et al.*¹² obtiveram limites de quantificação mais elevados para FNB e CBZ (1,96 e 0,99 $\mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente), apesar de sua preparação de amostra mais complexa. Também, a exatidão obtida neste estudo, entre 99,4 e 106,5% para FNB e CBZ, apresentou menor dispersão do que os

Tabela 2. Valores observados para a precisão e exatidão do método

Fármaco	Amostra controle	Concentração ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Precisão (CV%)		Exatidão (%)
			Intra-ensaios	Inter-ensaios	
Carbamazepina	CQLQ	1,56	9,2	6,8	105,6
	CQB	2,34	7,2	4,9	99,7
	CQM	9,38	7,7	4,6	104,3
	CQA	37,5	7,3	3,9	100,8
Fenitoína	CQLQ	0,63	8,8	5,5	103,6
	CQB	0,94	7,5	3,5	101,9
	CQM	3,75	8,4	5,2	98,8
	CQA	15	5,3	3,3	101,1
Fenobarbital	CQLQ	1,56	10,1	6,6	106,5
	CQB	2,34	6,3	4,3	103,1
	CQM	9,38	8,2	4,4	101,9
	CQA	37,5	7,1	4,6	100,8

CQB: controle de qualidade baixo; CQM: controle de qualidade médio; CQA: controle de qualidade alto.

valores encontrados por Shah *et al.*,¹² os quais estiveram entre 98,2 e 112,6%, o que pode ser atribuída ao procedimento simplificado de preparação de amostras.

O conhecimento da partição plasma/sangue total dos anticonvulsivantes é importante para permitir a estimativa de concentrações séricas a partir daquelas mensuradas em MSS, com o emprego de fatores de multiplicação apropriados.¹⁴ Os valores médios de RSP foram 0,96; 1,14 e 1,63 para CBZ, FNB e FNT, respectivamente (Tabela 3). Também, a partir das concentrações obtidas em sangue total e plasma no estudo de partição, foram calculadas as f_p %, que foram estimadas como 52,0; 61,8 e 88,8 para CBZ, FNB e FNT, respectivamente (Tabela 3).

Tabela 3. Partição dos anticonvulsivantes entre sangue e plasma (%Hct = 40)

Fármaco	Controle	RPS	f_p %
Carbamazepina	CQB	0,93	50,6
	CQM	0,96	52,2
	CQA	0,98	53,3
	Média	0,96	52,0
Fenitoína	CQB	1,58	85,9
	CQM	1,68	91,4
	CQA	1,65	89,2
	Média	1,63	88,8
Fenobarbital	CQB	1,17	63,6
	CQM	1,11	60,3
	CQA	1,13	61,5
	Média	1,14	61,8

Aplicação do método

Um total de 14 amostras pareadas de plasma e MSS foram obtidas e analisadas (Tabela 4). As concentrações obtidas em soro e em MSS apresentaram proporcionalidade, com razões soro/MSS médias de 1,11 (faixa de 0,99 a 1,22) para CBZ, 1,17 (faixa de 1,09 a 1,23) para FNB e 1,80 para FNT. Enquanto as razões soro/MSS determinadas para FNB foram semelhantes as RPS determinadas *in vitro*, os valores das razões soro/MSS para CBZ e FNT foram aproximadamente 10% superiores às RPS. Estas diferenças podem ser parcialmente atribuídas a diferenças no %Hct entre os pacientes e o sangue empregado no experimento *in vitro*, especialmente considerando que a maior parte dos pacientes foi composta por crianças que normalmente apresentam

Tabela 4. Concentrações ($\mu\text{g mL}^{-1}$) dos fármacos em plasma e MSS

Paciente	FNB			FNT			CBZ		
	Soro	MSS	CES (% CS)	Soro	MSS	CES (% CS)	Soro	MSS	CES (% CS)
1	-	-	-	-	-	-	6,05	5,07	4,86 (80,5)
2	-	-	-	-	-	-	3,97	3,44	3,3 (83,1)
3	-	-	-	-	-	-	5,45	4,66	4,47 (82,1)
4	16,88	13,41	15,29 (90,6)	-	-	-	-	-	-
5	-	-	-	13,42	7,43	12,11 (90,2)	-	-	-
6	-	-	-	26,51	14,82	24,16 (91,2)	-	-	-
7	-	-	-	-	-	-	4,19	3,62	3,47 (82,8)
8	14,7	13,63	15,53 (105,6)	-	-	-	-	-	-
9	-	-	-	-	-	-	5,56	5,52	5,3 (95,3)
10	-	-	-	-	-	-	2,10	1,78	1,71 (81,4)
11	-	-	-	-	-	-	3,49	3,25	3,12 (89,3)
12	-	-	-	-	-	-	11,30	10,78	10,35 (91,6)
13	-	-	-	-	-	-	11,98	12,04	11,56 (96,5)
14	-	-	-	-	-	-	6,03	5,88	5,64 (93,5)

CES: concentração estimada no soro a partir da concentração em MSS; %CS: porcentagem da concentração no soro representada pela CES.

valores de %Hct aumentados. As concentrações séricas foram estimadas através da Equação 3, considerando que o %Hct individual dos pacientes não estava disponível. Utilizando esta abordagem, as concentrações séricas estimadas a partir das concentrações em MSS estiveram na faixa entre 80,5 a 96,5% para CBZ; 90,6 a 105,6% para FNB e 90,6 a 91,2% para FNT.

CONCLUSÕES

Um método para a determinação simultânea de CBZ, FNB e FNT em MSS empregando cromatografia líquida de alta eficiência com detector de arranjo de diodos foi desenvolvido e validado, apresentando características de desempenho analítico que permitem a sua utilização clínica. Os analitos foram estáveis por até 12 dias à temperatura ambiente e em refrigeração. Empregando as concentrações determinadas em MSS e fatores de multiplicação obtidos *in vitro* foi possível estimar concentrações em soro em valores entre 80 e 105% dos valores séricos efetivamente mensurados.

REFERÊNCIAS

- Porto, L. A.; Siqueira, J. S.; Seixas, L. N.; Almeida, J. R. G.; Quintans Jr., L. J.; *J. Epilepsy Clin. Neurophysiol.* **2007**, *13*, 169.
- Greenwood, R. S.; *Epilepsia* **2000**, *41*, s42.
- Krasowski, M. D.; *Pharmaceuticals* **2010**, *3*, 1909.
- Eadie, M. J.; *British J. Clin. Pharmacol.* **2011**, *52*, 11.
- Neels, H. M.; Sierens, A. C.; Naelaerts, K.; Scharpé, S. L.; Hatfield, G. M.; Lambert, W. E.; *Clin. Chem. Lab. Med.* **2004**, *42*, 1228.
- Edelbroek, P. M.; van der Heijden, J.; Stolck, L. M. L.; *Ther. Drug Monit.* **2009**, *31*, 327.
- Stove, C. P.; Ingels, A-S. M. E.; De Kesel, P. M. M.; Lambert, W. E.; *Crit. Rev. Toxicol.* **2012**, *42*, 230.
- Arpini, J.; Antunes, M. V.; Pacheco, L.S.; Gnatta, D.; Rodrigues, M. F.; Keitel, E.; Linden, R.; *Clin. Biochem.* **2013**, *46*, 1905.
- van Schooneveld, T.; Swindells, S.; Nelson, S. R.; Moore, R.; Robbins, B. L.; Fletcher, C. V.; *Antimicrob. Agents Chemother.* **2010**, *54*, 4124.
- Shah, N. M.; Hawwa, A. F.; Millership, J. S.; Collier, P.S.; McElroy, J. C.; *J. Chromatogr. B* **2013**, *923-924*, 65.
- Almeida, A. M.; Castel-Branco, M. M.; Falcão, A. C.; *J. Chromatogr. B* **2002**, *774*, 215.
- Shah, V. P.; Midha, K. K.; Findlay, J. W. A.; Hill, H. M.; Hulse, J. D.; MacGilveray, I. J.; McKay, G.; Miller, K. J.; Patnaik, R. N.; Powell, M. L.; Tonelli, A.; Viswanathan, C. T.; Yacobi, A.; *Pharm. Res.* **2000**, *17*, 1551.
- Ma, C. L.; Jiao, Z.; Jie, Y.; Shi, X. J.; *Chromatographia* **2007**, *65*, 267.
- Hinderling, P. H.; *Pharmacol. Rev.* **1997**, *49*, 279.
- Hahn, R. Z.; Kreutz, O. C.; Antunes, M. V.; Linden, R.; da Silva, J.; da Silva, C. A.; *Quim. Nova* **2013**, *36*, 720.