UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Fármaco e Medicamentos
Área de Produção e Controle Farmacêuticos

Monitorização Terapêutica de Sufentanil em Pacientes Submetidos à Cirurgia Cardíaca

JOSÉLIA LARGER MANFIO

2011

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Fármaco e Medicamentos
Área de Produção e Controle Farmacêuticos

Monitorização Terapêutica de Sufentanil em Pacientes Submetidos à Cirurgia Cardíaca

JOSÉLIA LARGER MANFIO

Tese para obtenção do grau de
DOUTOR

Orientadora:
Profª Drª. Silvia R. C. J. Santos

VERSÃO CORRIGIDA

São Paulo
2011

JOSÉLIA LARGER MANFIO

Monitorização terapêutica de sufentanil em pacientes submetidos à cirurgia cardíaca.

Comissão Julgadora
da
Tese para obtenção do grau de Doutor

Profa. Dra. Silvia Regina Cavani Jorge Santos
Orientador/presidente

_____
1°. examinador

_____
2°. examinador

_____
3°. examinador

_____
4°. examinador

São Paulo, ____ de _____ de 2011.

DEDICATÓRIA

Aos meus amores, Marco André e Enzo, pelo amor incondicional, apoio e estímulo na busca constante pelo desenvolvimento e superação de desafios.

Aos meus pais (Joseles e Cordélia), pelo amor e educação recebidos.

AGRADECIMENTOS

À Professora Dra. Silvia Regina Cavani Jorge Santos, pela orientação, paciência, sabedoria, educação e oportunidade de conhecê-la.

Aos pacientes que voluntariamente aceitaram participar deste experimento acadêmico. Espero que meus resultados sejam capazes de alguma forma contribuir para a melhoria da terapêutica.

Aos parceiros clínicos do Instituto do Coração do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, por acreditar e apoiar este trabalho.

Aos colegas do laboratório de farmacocinética da USP, em especial a Cris, por todo apoio e experiência compartilhada.

A Maurício Bedin dos Santos, pela amizade, dedicação e apoio estatístico.

Aos analistas Wagner e Mariely pelo intenso trabalho, inúmeros ensinamentos e discussões analíticas.

Aos amigos Ana Maria, Naura, Eduardo, Michel, Rubia, Anelise, Alexandre e Liberato pela amizade e apoio no decorrer deste trabalho.

À *teacher* Juciane pelas correções, ensinamentos e amizade, em especial.

A todos os colegas da Biocinese, que entenderam minhas ausências, por várias vezes me substituíram, pelas numerosas discussões sobre este experimento, pelo apoio técnico e parceria na execução deste trabalho, enfim, sem vocês este trabalho não seria possível.

Ao casal Luís e Carmen Donaduzzi, pela oportunidade gerada pelo empreendedorismo e preocupação constante com a evolução de seus colaboradores e da cidade de Toledo.

À Pós-graduação da Faculdade de Ciências Farmacêuticas pela oportunidade de realizar o Doutorado.

RESUMO

Introdução: O monitoramento plasmático e a avaliação farmacocinética são importantes ferramentas empregadas no controle terapêutico. O sufentanil é responsável pela estabilização hemodinâmica do paciente com melhor supressão da resposta neuroendócrina comparado ao seu análogo o fentanil. Este fármaco tem sido largamente utilizado em cirurgias cardíacas devido também, a sua menor meia vida plasmática em relação ao fentanil o que permite uma rápida recuperação cirúrgica de pacientes submetidos a tais procedimentos.
Objetivo: Realizar o monitoramento plasmático do sufentanil em pacientes submetidos à cirurgia cardíaca com e sem circulação extracorpórea (CEC) e posteriormente avaliar a farmacocinética do mesmo.
Casuística: Investigaram-se 42 pacientes de ambos os sexos, portadores de insuficiência coronária crônica e candidatos à cirurgia eletiva de revascularização do miocárdio com ou sem circulação extracorpórea, internados na enfermaria clínica do Instituto do Coração do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Métodos – Etapa Clínica: Os pacientes inclusos neste estudo foram preparados para a realização do procedimento cirúrgico. Na indução da anestesia administrou-se 0,5 μg/Kg de sufentanil através de *bolus*, seguido de infusão de manutenção de 0,5 $\mu g/Kg^{-h}$. Coletaram-se amostras seriadas de sangue no intra-operatório pós-indução e no pós operatório até 36 h após administração do sufentanil. A infusão de sufentanil foi suspensa no momento do término da sutura da pele. O plasma foi separado e transferido para tubos de polietileno devidamente identificados e armazenados em temperatura - 20 ºC até a realização da análise.
Métodos – Etapa Analítica: As concentrações plasmáticas foram determinadas através do método desenvolvido e validado por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de Massas (LC-MS/MS). As amostras biológicas foram extraídas através de extração líquido-líquido em meio alcalino as quais foi adicionado fentanil como padrão interno. A separação cromatográfica foi obtida através de uma coluna C_{18} e fase móvel constituída por acetonitrila:acetato de amônio 5 mM + ácido fórmico 0,25% (70:30 v/v). O espectrômetro triplo quadro pólo, *eletrospray* positivo, monitorou as transições de massa entre 387,0>238,0, 285,7>165,1 e 337,0>188,0, para sufentanil, morfina e fentanil respectivamente.
Métodos – Etapa Estatística: A modelagem farmacocinética foi realizada através da aplicação do *software NonCompartmental Analysis, PK Solutions* 2.0. O índice de significância empregado foi de 5% ($p<0,05$). Utilizou-se o teste Qui-quadrado para avaliação da distribuição do gênero e o teste t-student para os parâmetros idade, peso, altura e IMC. Para os dados de concentração plasmática foi utilizado o teste não paramétrico de Friedman seguido do teste *post-hoc* de Dunn's para comparação dos momentos da cirurgia do grupo que foi submetido a CEC. Para comparação dos momentos entre os grupos (submetido a CEC *versus* sem CEC) aplicou-se o teste de Wilcoxon.
Resultados: Os pacientes cirúrgicos incluídos no protocolo eram adultos de ambos os sexos 9F/33M, com média de idade de 62,48 anos, 68,66 kg e IMC de 25,52 kg/m^2. Destes, 30 pacientes referem-se ao Grupo com CEC e 12 são do grupo sem CEC. As doses totais médias de sufentanil administradas ao grupo com CEC e ao grupo sem CEC foram semelhantes, 3,23 ±0,67μg/kg e 3,53 ±0,90μg/kg respectivamente. O método analítico proposto apresentou-se linear no intervalo

entre 0,05 - 500 ng/mL para o sufentanil e 10 - 1000 ng/mL para a morfina. Os dados obtidos na validação do método apresentaram especificidade, linearidade, robustez, precisão e exatidão. As concentrações plasmáticas obtidas forma estatisticamente diferentes entre os grupos com CEC e sem CEC. Durante o procedimento de circulação extra-corpórea foi observada intensa flutuação das concentrações plasmáticas de sufentanil. Foi aplicado o modelo tri-compartimental na avaliação cinética do sufentanil. Foram determinados os seguintes parâmetros farmacocinéticos: meia-vida de eliminação ($t_{1/2}$), alfa (α), beta (β) e gama (γ), área sob a curva (ASC), volume de distribuição (VD) e a depuração plasmática total (Cl). Destes, apenas $T_{1/2}$ (γ) apresentou diferença significativa entre os grupos.
Conclusões: O método proposto foi empregado satisfatoriamente na avaliação cinética do sufentanil. O protocolo realizado e os limites de quantificação do método analítico desenvolvido oportunizaram o emprego do modelo farmacocinético tri-compartimental para o fármaco estudado. As concentrações plasmáticas de sufentanil foram afetadas pela CEC o que implicou na diferença significativa entre as meia-vida de eliminação γ calculadas para os grupos com CEC e sem CEC.

Palavras-chave: sufentanil, cirurgia cardíaca, farmacocinética, circulação extra-corpórea, opióides.

ABSTRACT

I**ntroduction**: The plasma monitoring and the pharmacokinetic assessment are important tools employed in therapeutic control. Sufentanil is responsible for the hemodynamic stabilization of the patient with a better suppression of the neuroendocrine response compared to its analogue fentanyl. This pharmaco has been widely used in cardiac surgery also due to its shorter plasma half-life in relation to fentanyl, which allows a fast surgical recovery of patients who have undergone such procedures.

Objectives: Perform the plasma monitoring of sufentanil in patients undergoing cardiac surgery with or without extracorporeal circulation and afterwards assess the pharmacokinetics of it.

Study design: 42 patients of both genders with chronic coronary disease and candidates to elective surgery of myocardial revascularization with or without extracorporeal circulation were investigated. They were hospitalized in the clinical ward of the Heart Institute Hospital of the Medicine Faculty Clinic of the University of São Paulo.

Methods- Clinical phase: the patients included in this study were prepared for the performance of the surgical procedure. In the anesthesia induction 0,5 μg/Kg was administered through bolus, followed by maintenance infusion 0,5 $\mu g/Kg^{-h}$. Serial blood samples were collected in the intra-operatory after induction and in the post-operatory after 36 h of administration of sufentanil. Sufentanil infusion was suspended just as the skin suture was finished. The plasma was separated and transferred to the identified polyethylene test-tube and stored in a temperature -20ºC until the analyses.

Methods – Analytical phase: The plasma concentrations were determined through the developed method and validated by liquid chromatography mass spectrometry (LC-MS/MS). The biological samples were extracted through liquid-liquid extraction in alkaline mean, to which fentanyl was added as an internal pattern. The chromatographic separation was obtained through a C_{18} column and the mobile phase constituted by acetonitrile: 5 mM ammonia acetate + 0,25% formic acid (70:30 v/v). The triple-quad pole spectrometry, positive *eletrospray,* monitored the mass transitions among 387.0>238.0, 285.7>165.1 and 337.0>188.0, for sufentanil, morphine and fentanyl , respectively.

Methods – Statistical phase: The pharmacokinetic modeling was performed through the application of the *software NonCompartmental Analysis, PK Solutions* 2.0. The significance index employed was 5% (p<0,05). The qui-square test was used for the assessment of gender distribution and the t-student test for the age, weight, height and IMC parameters. The nonparametric test of Friedman was used for the plasma concentration, followed by Dunn´s post-hoc test for the comparison of the surgery moments of the group that was submitted to extracorporeal circulation. The test Wilcoxon was applied for the comparison of the moments between the groups (submitted to extracorporeal circulation versus without extracorporeal circulation).

Results: The surgical patients included in the protocol were adults of both genders 9F/33M, with an average age of 62.48 years old, 68.66 kg and IMC of 25.52 kg/m^2. 30 patients are from the group with extracorporeal circulation and 12 are from the group without extracorporeal circulation. The average total doses of sufentanil administered to the group with extracorporeal circulation and to the group without extracorporeal circulation were similar, 3.23 ±0.67μg/kg and 3.53 ±0.90μg/kg

respectively. The analytical method proposed proved linear in the interval between 0.05 - 500 ng/mL for sufentanil and 10 - 1000 ng/mL for morphine. The data obtained in the validation proved specificity, linearity, robustness, precision and accuracy. The plasma concentrations obtained were statistically different between the groups with extracorporeal circulation and without extracorporeal circulation. During the extracorporeal circulation procedure an intense fluctuation was observed in the plasma concentration of sufentanil. The tri-compartmental model was applied in the kinetic assessment of sufentanil. The following pharmacokinetic parameters were determined: half-life elimination ($t_{1/2}$), alpha (α), beta (β) and gamma (γ), area under the curve, distribution volume and the total plasma depuration. Only $T_{1/2}$ (γ) presented a significant difference between the groups.

Conclusions: The proposed method was satisfactorily employed in the kinetic assessment of sufentanil. The protocol carried out and the quantification limits of the analytical method developed opportunized the employment of the tri-compartmental pharmacokinetic model for the pharmaco studied. The plasma concentrations of sufentanil were affected by the extracorporeal circulation, which implied in the meaningful difference between the elimination half-life γ calculated for the groups with extracorporeal circulation and without extracorporeal circulation.

Keywords: sufentanil, cardiac surgery, pharmacokinetics, extracorporeal circulation, opioides.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Estrutura química do sufentanil..... 20

Figura 2. Espectro de massas do íon molecular e produto de fentanil. 39

Figura 3. Espectro de massas do íon molecular e produto de sufentanil..... 40

Figura 4. Cromatogramas de morfina, fentanil e sufentanil obtidos em amostras de plasma branco. 41

Figura 5. Cromatogramas de morfina, fentanil e sufentanil obtidos em amostras de plasma adicionadas de padrão interno – fentanil. 42

Figura 6. Linearidade do método de determinação de sufentanil plasmático por LC-MS/MS. Faixa de concentração do sufentanil no plasma 0,05 – 500 ng/mL versus razão de área sufentanil/ fentanil..... 44

Figura 7. Linearidade do método de determinação de morfina plasmática por LC-MS/MS. Faixa de concentração de morfina no plasma 10 – 1000 ng/mL versus razão de área morfina/ fentanil. 44

Figura 8. – Média das concentrações plasmáticas de sufentanil do pré ao pós operatório de pacientes submetidos a cirurgia cardíaca com CEC. 71

Figura 9 – Média das concentrações plasmáticas de sufentanil durante a CEC em pacientes submetidos à cirurgia cardíaca.....71

Figura 10 – Média das concentrações plasmáticas de sufentanil do pré ao pós operatório de pacientes submetidos à cirurgia cardíaca sem CEC. 72

Figura 11 – Média das concentrações plasmáticas de sufentanil do transoperatório de pacientes submetidos à cirurgia cardíaca com e sem CEC.....72

LISTA DE QUADROS E DIAGRAMAS

Quadro 01. Características Farmacocinéticas do Sufentanil 21

Quadro 02. Efeitos observados após a administração do sufentanil 21

Quadro 03. Descrição das Condições Cromatográficas 30

Quadro 04. Descrição da Coluna Cromatográfica 30

Quadro 05. Condições do Espectrômetro de Massas 31

Quadro 06. Descrição da Preparação das amostras biológicas 31

Quadro 07. Valores de G tabelados 38

Quadro 08 – Valores de normalidade laboratorias (em mg/dL) 61

Quadro 09. Dados antropométricos e demográficos dos pacientes avaliados no estudo. 63

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Resultados apresentados na avaliação da precisão (CV%) e da exatidão, intra-dias, de amostras de sufentanil nas concentrações CQB, CQM e CQA. 44

Tabela 2. Resultados apresentados na avaliação da precisão (CV%) e da exatidão, intra-dias, de amostras de morfina nas concentrações CQB, CQM e CQA..... 45

Tabela 3. Resultados apresentados na avaliação da precisão (CV%) e da exatidão, inter-dias, de amostras de sufentanil e morfina nas concentrações CQB, CQM e CQA..... 45

Tabela 4. Precisão (CV%) e a exatidão de amostras de sufentanil e morfina em plasma humano durante determinação da robustez por meio da variação da proporção de fase móvel nas concentrações CQB, CQM e CQA. 46

Tabela 5. Precisão (CV%) e a exatidão de amostras de sufentanil e morfina em plasma humano durante determinação da robustez por meio da variação da temperatura no forno da coluna nas concentrações CQB, CQM e CQA. 46

Tabela 6. Precisão (CV%) e a Exatidão de amostras de sufentanil e morfina em plasma humano durante determinação da robustez por meio da variação do fluxo da fase móvel nas concentrações CQB, CQM e CQA. 46

Tabela 7. Resumo do estudo de estabilidade dos analitos sufentanil e morfina, em plasma humano. 47

Tabela 8. Comparação estatística dos pacientes avaliados nos grupos com CEC versus sem CEC..... 68

Tabela 9. Tempo de cirurgia e valores de hematócrito (n = 42)..... 69

Tabela 10 - Concentração plasmática (ng/mL) do pré ao pós operatório referente ao medicamento –Sufentanil administrado a pacientes submetidos a cirurgia cardíaca com circulação extra corpórea (CEC)..... 69

Tabela 11 - Concentração plasmática (ng/mL) do pré ao pós operatório referente ao medicamento –Sufentanil administrado a pacientes submetidos a cirurgia cardíaca sem circulação extra corpórea (CEC)..... 70

Tabela 12 – Teste de Dunn's referente as concentrações plasmáticas de sufentanil Sufentanil administrado a pacientes submetidos a cirurgia cardíaca com circulação extra corpórea (CEC)..... 73

Tabela 13 – Teste de Wilcoxon referente as concentrações plasmáticas de sufentanil administrado a pacientes submetidos a cirurgia cardíaca sem circulação extra corpórea (CEC). 73

Tabela 14 – Teste de Mann Whitney referente às concentrações plasmáticas de sufentanil administrado a pacientes submetidos a cirurgia cardíaca com e sem circulação extra corpórea (CEC). 73

Tabela 15 – Parâmetros farmacocinéticos do sufentanil administrado a pacientes submetidos à cirurgia cardíaca com circulação extra corpórea (CEC). 82

Tabela 16 – Parâmetros farmacocinéticos do sufentanil administrado a pacientes submetidos a cirurgia cardíaca sem circulação extra corpórea (CEC). 83

Tabela 17 - Resultado da aplicação da ANOVA para o parâmetro meia-vida (h). ... 83

Tabela 18 - Resultado da aplicação da ANOVA para o parâmetro volume de distribuição (L/Kg)..... 83

Tabela 19 - Resultado da aplicação da ANOVA para o parâmetro Área sob a curva (ng/mL.h). 84

Tabela 20- Resultado da aplicação da ANOVA para o parâmetro clearance (mL/min.Kg) 84

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AAS – ácido acetilsalisílico
ACN - acetonitrila
ACP – analgesia controlada pelo paciente
ASC – área sob a curva
BSTFA - *Bis(Trimethylsilyl)-Trifluoroacetamide*
CEC – circulação extracorpórea
CG – cromatografia gasosa
Cl - *clearance*
CQ – controle de qualidade
CQA – controle de qualidade alto
CQB – controle de qualidade baixo
CQM – controle de qualidade médio
Cr - creatinina
CV – coeficiente de variação
DPR – desvio padrão relativo
DP –desvio padrão
EDTA – etilenodiaminotetracético sal sódico
ESI-MS – eletrospray espectrometria massa
h - hora
HFBA – ácido heptafluorobutírico anidro
IC – intervalo de confiança
IMC – índice de massa corporal
IOP – intra operatório
IV – intra venoso
LC – Limite superior
LI – Limite inferior
LIQ- limite inferior de quantificação
mL - mililitro
MS/MS – massa/massa
n – número de réplicas
Kg -quilo
ng - nanograma
PFPA – perfluorofenil azido
PI – padrão interno
PO – pós operatório
TFA – ácido trifluoro acético
TP – tempo de protrompina
µg – micro grama
Vd – volume de distribuição
Vmáx – valor máximo
Vmin – valor mínimo

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO 17
1.1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA 18
2. OBJETIVO PRINCIPAL 27
CAPÍTULO I. DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO BIOANALÍTICO PARA APLICAÇÃO NA QUANTIFICAÇÃO SIMULTÂNEA DE SUFENTANIL E MORFINA EM PLASMA NO INTRA-OPERATÓRIO DE CIRURGIA CARDÍACA .. 28
1. OBJETIVO 28
2. MATERIAIS E MÉTODOS 29
2.1. CRITÉRIOS DE ACEITAÇÃO 32
2.2. VALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO 32
2.3. ANÁLISE ESTATÍSTICA 38
3. RESULTADOS 39
4. DISCUSSÃO 48
CAPÍTULO II - MONITORAMENTO DAS CONCENTRAÇÕES PLASMÁTICAS DO SUFENTANIL APÓS ADMINISTRAÇÃO INTRA-VENOSA NO INTRA-OPERATÓRIO DE CIRURGIA CARDÍACA 58
1. OBJETIVO 58
2. MATERIAIS E MÉTODOS 59
2.1. ETAPA CLÍNICA 59
2.2. PROTOCOLO CIRÚRGICO 64
2.3. ETAPA ESTATÍSTICA 66
3. RESULTADOS 68
4. DISCUSSÃO 73
5. CONCLUSÕES 79
CAPÍTULO III – FARMACOCINÉTICA DO SUFENTANIL APÓS ADMINISTRAÇÃO INTRA-VENOSA NO INTRA-OPERATÓRIO DE CIRURGIA DE REVASCULARIZAÇÃO DO MIOCÁRDIO 80
1. OBJETIVO 80
2. MATERIAIS E MÉTODOS 81
2.1. ETAPA CLÍNICA 81
2.2. ETAPA ANALÍTICA 81
2.3. ETAPA ESTATÍSTICA 81

3.RESULTADOS 82
5. CONCLUSÕES 90
CONSIDERAÇÕES FINAIS 91
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 92
ANEXO I - APROVAÇÃO DA COMISSÃO CIENTÍFICA DE ÉTICA DO INCOR-HCFMUSP 102
ANEXO II - APROVAÇÃO CAPPESQ/HCFMUSP 103
ANEXO III - MODELO DO TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO 104
ANEXO IV - ARTIGO PUBLICADO 107

1. INTRODUÇÃO

A CEC foi utilizada inicialmente em 1950 e mantém-se como peça fundamental da cirurgia cardíaca. O emprego deste procedimento implica em uma série de alterações fisiológicas e bioquímicas no paciente que por sua vez, podem alterar a farmacocinética dos medicamentos empregados durante o procedimento cirúrgico (SMITH *et al*., 2006).

Os derivados do ópio têm sido utilizados em analgesia há muitos anos, tanto para dores crônicas como agudas. A partir de 1950 houve o emprego da morfina para procedimentos cirúrgicos cardíacos, porém por ocasionar bloqueio insuficiente da resposta endócrino metabólica e incompleta inconsciência a técnica foi proscrita. Em 1970, surgiram agonistas potentes como o sufentanil e o fentanil, de manuseio farmacológico mais seguro (SILVA, 2000).

No grupo dos opióides sintéticos e semi-sintéticos que possuem em sua estrutura química o anel fenilpiperidina, destaca-se o sufentanil, N-[4-(metoximetil)-1[2-(2 tienil)- etil]- 4- piperidinil] – N- fenilpropanamida, o qual apresenta uma potência 10 vezes maior do que seu análogo, fentanil, além de promover uma melhor estabilidade hemodinâmica devido a supressão de respostas neuroendócrinas durante o processo cirúrgico (BOVILL *et al.*, 1984).

Os efeitos destes compostos se deve a ocupação dos receptores kappa (k), delta (δ), mi (u) e sigma, reforçando a ação das vias inibitórias noradrenérgicas, serotoninérgicas a das endorfinas. Podem ainda inibir a liberação de neuromediadores da dor e hiperpolarizar neurônios aferentes medulares (BASSANEZI *et al*., 2006).

Estes anestésicos/analgésicos podem levar a tolerância, dependência física, psíquica, sedação, náusea, vômito, prurido, retenção urinária, constipação, coma e até a morte (MAYAKE *et al*., 1998; BASSANEZI *et al*., 2006).

Os opióides são efetivos no tratamento da dor e podem ser administrados praticamente em todas as vias e doses. Na administração epidural de opióides como o Sufentanil e o Fentanil as doses se assemelham as endovenosas, então o uso desta via mais cara e invasiva não se justifica (BASSANEZI *et al*., 2006).

Assim sendo, o sufentanil tem sido largamente utilizado em cirurgias cardíacas devido também, a sua menor meia vida plasmática em relação ao fentanil o que permite uma rápida recuperação cirúrgica de pacientes submetidos a tais

procedimentos. No entanto, a administração de morfina, durante o procedimento cirúrgico (intratecal) e no pós operatório, é preconizado para garantir a analgesia do paciente. Neste grupo de pacientes, a morfina foi associada ao sufentanil e a analgesia foi avaliada em um estudo concomitante. Desta forma, o método analítico desenvolvido, deveria quantificar o sufentanil e a morfina, inclusive garantindo a seletividade para ambos os fármacos.

A farmacocinética do sufentanil tem sido discutida por vários autores (BOVILL *et al*.,1984; HUDSON *et al*., 1989; GEPTS *et al.,* 1995;HUDSON *et al*., 2001 e ZHAU *et al.,* 2009), porém, pouco se discutiu a respeito da influência da CEC na farmacocinética do sufentanil. Por se tratar de um fármaco de extenso metabolismo hepático, a hipotermia e redução do fluxo hepático, característicos da CEC, terão influência na farmacocinética do sufentanil.

Desta forma, este estudo objetiva o monitoramento plasmático do sufentanil no intra e pós-operatório da cirurgia cardíaca com e sem CEC para que então, a farmacocinética deste fármaco possa ser avaliada.

1.1.Revisão Bibliográfica

Uso terapêutico do sufentanil

O sufentanil tem sido empregado na analgesia pós-operatória, durante o trabalho de parto e principalmente como adjuvante anestésico através da administração intravenosa, epidural e intratecal (SILVA, 2000).

Quando administrado por via intravenosa, é usado tanto como agente analgésico em associação com óxido nitroso/oxigênio, quanto como anestésico único em pacientes ventilados. Ele é particularmente útil para procedimentos mais longos e para intervenções mais dolorosas onde um analgésico potente é necessário para ajudar a manter a boa estabilidade cardiovascular. O sufentanil quando utilizado pela via intravenosa é indicado como um componente analgésico durante indução e manutenção de anestesia geral balanceada, assim como, um agente anestésico para indução e manutenção da anestesia em pacientes submetidos a procedimentos cirúrgicos de grande porte (MICROMEDEX,2010).

O sufentanil também é indicado para administração epidural em anestesia espinhal. O sufentanil quando utilizado pela via espinhal é indicado para o manejo da dor pós- operatória após cirurgia geral, torácica, ou procedimentos ortopédicos e

cesariana e ainda como analgésico associado à bupivacaína epidural para analgesia em parto vaginal (MICROMEDEX,2010).

A posologia do sufentanil deve ser individualizada de acordo com a idade, o peso, o estado físico, doenças associadas, o uso de outras medicações, e o tipo de procedimento cirúrgico e a anestesia. O efeito da dose inicial deve ser considerado para a determinação das doses suplementares (MICROMEDEX,2010).

Como em qualquer outro opióide a dose deve ser reduzida em pacientes idosos ou debilitados. A segurança e eficácia do uso de sufentanil pela via intravenosa em crianças abaixo de 2 anos de idade foi documentada em um número limitado de casos. Para indução e manutenção de anestesia em crianças de 2 a 12 anos de idade submetidas a cirurgias de grande porte, uma dose anestésica de 10-20 µg/kg administrada com oxigênio a 100% tem sido usada. A segurança e eficácia do sufentanil pela via espinhal em pacientes pediátricos foram documentadas em um número limitado de casos (MICROMEDEX,2010).

O emprego de sufentanil como analgésico, em pacientes submetidos à cirurgia geral, requer doses de 0,5-5,0 µg/kg que por sua vez proporcionam uma analgesia intensa, reduzindo a resposta simpática ao estímulo cirúrgico e preservando a estabilidade cardiovascular. A duração da ação é dose-dependente. Uma dose de 0,5 µg/kg pode durar 50 minutos. Doses suplementares de 10 a 25 µg devem ser individualizadas de acordo com as necessidades de cada paciente e de acordo com o tempo previsto de duração da cirurgia (MICROMEDEX,2010).

A utilização de doses maiores ou iguais a 8 µg/kg, provoca sono e mantém um nível profundo, dose-dependente, de analgesia sem o uso de agentes anestésicos adicionais. Assim as respostas simpáticas e hormonais ao estímulo cirúrgico são atenuadas. Doses suplementares de 25-50 µg geralmente são suficientes para manter a estabilidade cardiovascular durante a anestesia (MICROMEDEX,2010).

No caso específico da dor pós-operatória, uma dose inicial de 30 a 50 µg deve provavelmente promover um alívio adequado da dor por até 4 a 6 horas. Doses adicionais em *bolus* de 25 µg podem ser administradas se existem evidências de superficialização da analgesia (MICROMEDEX,2010)

Uma superdose de sufentanil manifesta-se como uma extensão de suas ações farmacológicas. Dependendo da sensibilidade individual, o quadro clínico é

determinado primariamente pelo grau de depressão respiratória, que varia da bradicardia a apnéia (MICROMEDEX,2010).

O sufentanil pode ser misturado em infusões de soro fisiológico ou soro glicosado. Tais diluições são compatíveis com equipamentos de infusão de plástico, e devem ser utilizados no máximo até 24 horas após a preparação (MICROMEDEX,2010).

Estrutura Química

O sufentanil (N-[4-(methoxymethyl)-1-(2-thiophen-2-ylethyl)-4-piperidyl]-N-phenyl-propanamide) é uma base orgânica por ter grupamento amina, pka 8,01, a 20% apresenta-se sob a forma não-ionizada no pH fisiológico. É administrado sob a forma de citrato. Apresenta peso molecular de 386.552 g/mol, fórmula mínima $C_{22}H_{30}N_2O_2S$ e Cas 56030-54-7 (O'NEIL et. al, 2001)

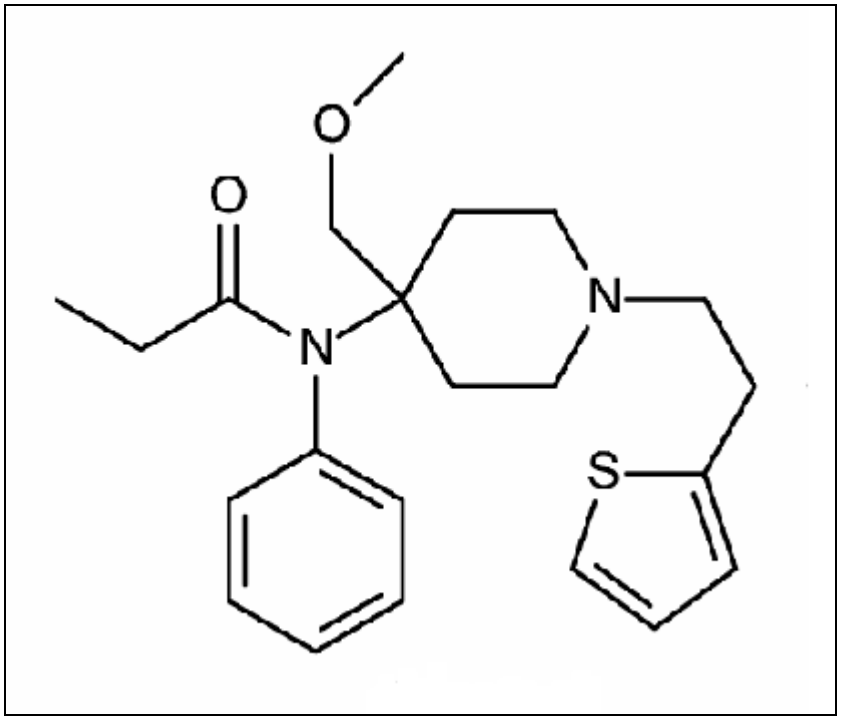

Figura 1. Estrutura química do sufentanil.

Farmacocinética e Farmacodinâmica

Esse analgésico é altamente lipossolúvel apresentando um coeficiente de partição octanol:água de 1,757. Além disso, as características farmacocinéticas do mesmo podem ser resumidas através do quadro abaixo (BOVILL *et al*., 1984):

Quadro 01. Características Farmacocinéticas do Sufentanil

Parâmetros	
Meia vida de distribuição	1,4 min
Volume de distribuição	2,9 L/kg
Meia vida de eliminação	164 min
Clearance total	0,762 l/h/kg
Ligação a proteínas plasmáticas em pH=7,4 (%)	92,5 (> 50% na alfa 1 glicoproteína ácida)

Fonte: Bovill,1984.

O sufentanil sofre biotransformação por meio do complexo citocromo P450 3A4, o qual promove uma N-dealquilação do anel piperidina e das amidas, como também uma O-desmetilação e uma hidroxilação aromática (BOVILL *et al*., 1984).

É um produto sintético derivado da fenilpiperidina, utilizado como anestésico geral e adjuvante à anestesia. Conforme SILVA, o Sufentanil apresenta efeitos em várias funções importantes do organismo humano, na seqüência são apresentados alguns destes efeitos observados após sua administração (SILVA, 2000).

Quadro 02. Efeitos observados após a administração do sufentanil

Efeitos Relacionados ao SNC	
Sedação	Moderado
Sensório Alterado	Fraco
Náuseas e Vômitos	Acentuado
Grau de Efeito Respiratório	
Depressão Respiratória	Moderado
Efeito Antitussígeno	Moderado
Grau de Efeitos Cardiovasculares	
Bradicardia	Moderado
Hipotensão	Moderado
Liberação de Histamina	Fraco
Efeito no Trato Urinário	
Aumento no Tônus do Ureter	Sem Efeito
Aumento no Tônus da Bexiga	Efeito Parcial

Fonte: Silva, 2000.

Inúmeros fatores podem afetar a farmacocinética desse analgésico, dentre eles podemos ressaltar: idade, obesidade, proteínas plasmáticas, características ácido-base sanguíneos, doenças hepáticas, renais, medicamentos (SCOTT, 1998).

Em pacientes idosos (acima de 65 anos) o aumento da massa adiposa, decréscimo da concentração plasmática de proteínas, diminuição do fluxo e funções das enzimas hepáticas determinam alterações dos parâmetros farmacocinéticos. Em neonatos nota-se o aumento do tempo de meia-vida de distribuição ($t_{1/2}$ α) e diminuição do clearance, devido as limitações hepáticas (SCOTT, 1998).

A obesidade, teoricamente, afeta a farmacocinética de drogas altamente lipossolúveis como o sufentanil, determinando o aumento do t ½ β e do volume de distribuição (Vd) (SCOTT, 1998).

Medicamentos que apresentam alta extração hepática, como o sufentanil, apresentam aumento de t ½ β e aparente manutenção de Vd na presença de hepatopatias. Alterações renais determinam modificações no *clearance* e t ½ β (SCOTT, 1998).

Alguns fármacos como a cimetidina podem alterar a cinética do sufentanil por modificarem a capacidade oxidativa das enzimas do complexo citocromo P450 (SCOTT, 1998). Além disso, procedimentos hospitalares para o paciente cirúrgico, como a circulação extracorpórea (CEC) podem alterar a farmacocinética do analgésico opióide em questão devido a modificações na concentração de proteínas plasmáticas (alfa-1 glicoproteína ácida), pressão arterial, temperatura corpórea e equilíbrio ácido-base sanguíneo (SCHOLZ *et al*., 1996).

Bovill e colaboradores (1984) foram os primeiros a estudar a farmacocinética de sufentanil em pacientes cirúrgicos. O sufentanil foi administrado em *bolus*, IV, na dose de 5 µg/kg, em 10 pacientes cirúrgicos (cirurgias eletivas diversas). Foi realizado o monitoramento plasmático do sufentanil até 8 horas após a indução. Neste experimento, observaram o rápido decaimento plasmático do sufentanil, sendo que 98% da dose administrada foi eliminada em 30 minutos (BOVILL *et al.,* 1984).

A partir de então, vários autores estudaram a farmacocinética do sufentanil, em diferentes doses, diferentes vias de administração, em pacientes cirúrgicos, e associado a outros fármacos. Na imensa maioria dos casos, a quantificação do sufentanil deu-se por radioimunoensaio, e as concentrações obtidas foram inferiores a 10 ng/mL (FLEZZANI *et al*., 1987; HUDSON *et al*., 1989; SCHWARTZ *et al*., 1989;

IONESCU *et al*., 1991; CROSS *et al*., 1994; GEPTS *et al*., 1995; THOMSON *et al*., 1998; SCHRAAG *et al*., 1998; AHONEN *et al*., 2000; BARVAIS *et al*., 2000; HUDSON *et al*., 2001; ZHAO *et al*., 2009). Dos autores previamente citados, Flezzani, Cross, Thomson, Ahonen e Barvais, avaliaram o sufentanil em cirurgias cardíacas.

Flezzani e colaboradores (1987) avaliaram a habilidade de uma bomba de infusão contínua computadorizada, do tipo CACI, de manter estáveis os níveis plasmáticos de sufentanil, a partir de dados farmacocinéticos deste fármaco obtidos em pacientes (citado por Bovill, 1984), durante a CEC de 10 pacientes cirúrgicos. Estes pacientes receberam lorazepam e morfina e foram anestesiados com diazepam, enflurano e sufentanil, alvo controlado, para se obter a concentração no compartimento central de 5 ng/mL. As concentrações plasmáticas de sufentanil foram obtidas por método de radioimunoensaio. Flezzani e colaboradores concluíram ser possível manter estáveis os níveis plasmáticos de sufentanil durante a CEC utilizando o esquema de infusão farmacocineticamente controlada, porém, os dados obtidos sugerem que possa ocorrer acúmulo do fármaco.

Thomson e colaboradores (1998) foram os pioneiros na avaliação da concentração plasmática de sufentanil e a correlação com seus efeitos em um estudo randomizado onde foram inclusos 32 pacientes submetidos a cirurgia cardíaca. Eles administraram doses totais de 1,87 ± 0,44 µg/mL, 3,12 ± 0,51 µg/mL e 4,93 ± 0,77 µg/mL através de bomba de infusão STANPUMP visando as seguintes concentrações plasmáticas de sufentanil: 0,4, 0,8 e 1,2 ng/mL de sufentanil. Estes pacientes também receberam propofol e isoflurano. Neste estudo concluiu-se que concentrações plasmáticas de 0,71 ± 1,3 ng/mL de sufentanil apresentam a melhor relação concentração-resposta e facilitam a estabilidade hemodinâmica durante a cirurgia. Concentrações iguais ou superiores a 1,25 ± 0,21 ng/mL minimizam a necessidade da administração de isoflurano, mas não melhoram a estabilidade hemodinâmica. Thomson e colaboradores (1998) também observaram que o sistema STAMPUMP apresentou um erro analítico de 64,8%, em relação as concentrações plasmáticas de sufentanil avaliadas por radioimunoensaio.

Zhao e colaboradores (2009) avaliaram a farmacocinética de sufentanil em 12 pacientes submetidos a diversas cirurgias eletivas que receberam este fármaco, infusão alvo controlada visando as concentrações 4 ou 6 ng/mL. Além de sufentanil os pacientes também receberam propofol e rocurônio. As concentrações plasmáticas

de sufentanil foram dosadas por LC-MS/MS até 24h após término da infusão. Através da aplicação do modelo tricompartimental obtiveram os seguintes parâmetros: volume aparente de distribuição no estado de equilíbrio 222,6L, *clearance* metabólico 0,84 L/min e meia-vida de eliminação 389 min. Observaram ainda que para idade, gênero e $PaCO_2$ existe correlação significativa com os parâmetros farmacocinéticos calculados. Estes autores concluíram que a farmacocinética do sufentanil pode ser explicada pelo modelo tricompartimental e que a técnica empregada no cálculo farmacocinético afeta os parâmetros farmacocinéticos determinados e suas correlações.

Gepts e colaboradores (1995) avaliaram a linearidade da farmacocinética do sufentanil em 23 pacientes, submetidos a diversas cirurgias eletivas, que receberam sufentanil em infusão rápida de 10 a 20 minutos, em doses que variaram de 250 a 1500 µg. Amostras sanguíneas foram coletadas durante a infusão até o seu término e após 48h do término da mesma. A quantificação plasmática de sufentanil foi realizada por radioimunoensaio. Este autores aplicaram modelo tricompartimental e obtiveram os seguintes parâmetros farmacocinéticos médios: volume de distribuição no estado de equilíbrio 339 L (335-343 L), *clearance* metabólico 0,92 L/min (0,84-1,05) e meia-vida de eliminação igual a 769 min (690 -1011). Não foi obtida correlação entre idade, peso ou índice de massa corporal com nenhum dos parâmetros calculados. Estes autores concluíram que a farmacocinética do sufentanil pode ser considerada linear na faixa estudada. A avaliação da meia-vida terminal necessita do monitoramento plasmática do fármaco por mais de 24h após a administração. O *clearance* metabólico está próximo do fluxo sanguíneo hepático e que o extenso volume de distribuição identificado é consistente com a elevada meia-vida terminal de eliminação. Simulações predisseram que concentrações plasmáticas no estado de equilíbrio declinam rapidamente após o término da administração independentemente da longa meia-vida de eliminação.

Quantificação Plasmática do Sufentanil

Vários investigadores (HANSDOTTIR *et al*.,1983; MICHIELS *et al*.,1983; LEJUS *et al*.,2000) reportaram estudos de disposição cinética do sufentanil em pacientes cirúrgicos utilizando o radioimunoensaio (RIE) como método analítico de escolha, visto que as concentrações plasmáticas terapêuticas do sufentanil são extremamente baixas (0,05-0,3 ng/mL). Além deste método, sugere-se ainda a

cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (CG-MS), outra técnica de alta sensibilidade para a detecção de baixas concentrações plasmáticas de sufentanil. Woestenborghs e colaboradores (1994) demonstraram que as técnicas de radioimunensaio e cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa são metodologias sensíveis e adequadas para a determinação de sufentanil no plasma (WOESTENBORGHS *et al*.,1994).

Schimidt e colaboradores (2006) utilizaram método validado para a determinação do fármaco Sufentanil em plasma humano utilizando método de Cromatografia Líquida acoplada a espectrometria de Massa. O Limite Inferior de Quantificação obtido foi de 0,25 pg/mL. A aplicabilidade do método foi demonstrada em um estudo clínico, em que quantificou-se os níveis do Sufentanil em plasma de pacientes e no plasma umbilical arterial dos recém nascidos que utilizaram analgesia epidural paciente-controlado.

Palleschi e colaboradores (2003) desenvolveram um método sensível e específico para a quantificação do Sufentanil no plasma humano utilizando cromatografia liquida acoplada a espectro de massa. Obtiveram êxito na determinação de Sufentanil nas amostras de plasma coletadas antes da administração epidural de uma única dose do fármaco em gestantes em trabalho de parto, vinte minutos após a administração da droga, e após nascimento em amostras arteriais e venosas do plasma do cordão umbilical dos bebês.

A exatidão total (erro relativo, E.R. %), a repetibilidade (desvios padrão relativos, DPR %) e a reprodutibilidade intra-laboratório (DPR, %) variaram de -9,28 a -2,71%, 6,42 a 2,82% e 13,52 a 6,06%, respectivamente, para o fármaco. O limite da quantificação para o Sufentanil em amostras humanas do plasma foi de 0,3 ng mL^{-1} (PALLESCHI *et al*., 2003).

Circulação Extracorpórea

Devemos considerar ainda a circulação extracorpórea (CEC), um procedimento relevante na alteração da cinética dos fármacos no organismo, uma vez que no período intra-operatório da cirurgia cardíaca com CEC, ocorrem perda de sangue, alta mobilização de líquidos com conseqüências hemodinâmicas relevantes somadas à hipotermia moderada e hemodiluição (GOUCKE *et al*., 1982). Reportou-

se no período pós-operatório destes pacientes a redução de 30% no fluxo hepático acompanhado por alterações na biotransformação de fármacos de alta extração e alterando consequentemente, a eliminação de fármacos fluxo-sanguíneo dependentes.

Flezzani e colaboradores avaliaram o decaimento plasmático de sufentanil durante a CEC e observaram que após 90 min de CEC a concentração plasmática obtida foi 4,5 ng/mL (±0,4 ng/mL) enquanto que imediatamente antes do procedimento era de 3,8 ng/mL (±0,4 ng/mL). O autor justifica esta diferença em virtude de erros de cálculo ao estimar o volume de distribuição do compartimento central, que foi informado a bomba de infusão continua computadorizada que controlava a administração de sufentanil aos pacientes.

Okutani e colaboradores (1988) demonstraram queda na concentração plasmática de 2,92 para 2,04 ng/mL nos primeiros 15 minutos do início da CEC para o sufentanil nos pacientes recebendo dose única de 30µg/kg. Alterações na farmacocinética do sufentanil durante a CEC merecem especial atenção, pois o conhecimento prévio de tais alterações pode contribuir na otimização da farmacoterapia no período intra-operatório através do ajuste de dose.

Cross e colaboradores (1994) avaliaram o efeito do método de controle de CO_2 (*α-stat* e *pH-stat*) na concentração plasmática de fentanil e sufentanil em pacientes submetidos a cirurgia com CEC. Neste estudo os autores concluíram que o método utilizado no controle dos níveis de CO_2 impacta nas concentrações plasmáticas de sufentanil e desta forma deveria ser informado em todos os estudos que avaliassem o monitoramento plasmático deste fármaco (CROSS *et al.*, 1994).

Desta forma, o conhecimento da disposição cinética do sufentanil em pacientes submetidos a CEC auxilia na sua monitorização terapêutica, diminuindo-se os riscos associados.

2. OBJETIVO PRINCIPAL

Realizar o monitoramento das concentrações plasmáticas do sufentanil administrado por infusão venosa contínua no intra-operatório de cirurgia cardíaca com e sem CEC e investigar a farmacocinética no pós operatório.

CAPÍTULO I. DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO BIOANALÍTICO PARA APLICAÇÃO NA QUANTIFICAÇÃO SIMULTÂNEA DE SUFENTANIL E MORFINA EM PLASMA NO INTRA-OPERATÓRIO DE CIRURGIA CARDÍACA

1. OBJETIVO

Desenvolver e validar método bioanalítico para quantificação simultânea de sufentanil e morfina em plasma utilizando à cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrometria de massas (LC/MS-MS).

2. MATERIAIS E MÉTODOS

Reagentes

Utilizaram-se como padrão de referência o sufentanil lote 6CB4E00 (JANSSEN-CILAG, São José dos Campos, Brasil) e a morfina M- 8777 (SIGMA, MO, EUA) e como padrão interno o fentanil lote B372 (JANSSEN-CILAG, São José dos Campos, Brasil). Utilizou-se a acetonitrila (ACN) grau cromatográfico e ácido fórmico (TEDIA, Fairfield, EUA); além do acetato de amônio (CARLO ERBA, Milão, Itália) reagente pureza analítica que foi empregado na fase móvel; a água ultra-pura foi obtida em equipamento de ultra-purificação de água (GEHAKA, Kansas City, EUA). Os solventes utilizados para extração líquido-líquido foram o éter etílico e o diclorometano (CARLO ERBA, Milan, Italy). A solução de hidróxido de sódio 5 M utilizada para alcalinizar o plasma no processamento das amostras foi preparada a partir de reagente pureza analítica (F. MAIA, São Paulo, Brasil). O plasma branco normal, hemolisado e lipêmico foram obtidos de voluntários sadios isentos de analito e do padrão interno para preparo das amostras adicionadas de padrão. Na análise cromatográfica utilizou-se coluna C18 X-terra de dimensões 100X2,1 mm i.d.; 3,5 μm (WATERS ASSOC. Milford, MA, EUA).

Equipamentos

A pesagem dos padrões para preparo de soluções estoque, solução de padrão interno para dopagem das amostras de plasma foi realizada em balança semi-micro analítica modelo XS205 (METTLER, Columbus, OH,EUA). As diluições foram realizadas utilizando-se micropipetas automáticas (EPPENDORF, Hauppauge, NY, EUA) e vidraria volumétrica classe A.

Para procedimento de extração das amostras de plasma empregaram-se: agitador de tubos tipo vortex modelo AP 56 (PHOENIX, Araraquara, SP, Brasil), agitador de microtubos (FINEMIXER PCR, Seul, Coréia), centrífuga refrigerada 5804 R (EPPENDORF, Hamburg, Alemanha), micropipetas automáticas (200, 1000 e 5000 µL) EPPENDORF, Hauppauge, NY,EUA), extrator de solventes para fase líquida (EVIGLAS, Santa Maria, RS, Brasil) e banho-maria (TECNAL, Piracicaba, SP, Brasil).

A degasificação da fase móvel foi realizada com auxílio de uma bomba à vácuo TE 058, (TECNAL, Piracicaba, SP, Brasil) e ultrassom com sistema de

aquecimento 1400 Maxiclean (A.UNIQUE, Indaiatuba, SP, Brasil). A análise cromatográfica foi executada em equipamento de cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas (LC-MS/MS), Alliance e detector Quattro Micro (WATERS Assoc., Milford, MA, USA). As condições cromatográficas bem como o procedimento de preparação das amostras encontram-se descritas nos quadros 03 a 06.

Quadro 03. Descrição das Condições Cromatográficas

Condições Cromatográficas	
Sistema	CLAE Alliance – Waters
Detecção	Espectrometria de Massas
Fase móvel: componentes	Fase A: Acetonitrila Fase B: Acetato de amônio 5mM e ácido fórmico 0,25%
Fluxo (mL/min)	1,0 mL/min – Split (1:5)
Temperatura do Auto Injetor	Ambiente
Temperatura da Coluna	40 ºC
Volume de Injeção	30 μL
Tempo de retenção do analito Sufentanil	Aproximadamente 1,08 minutos
Tempo de retenção do analito Morfina	Aproximadamente 1,02 minutos
Tempo de retenção do padrão interno	Aproximadamente 1,08 minutos
Tempo total de corrida	2 minutos

Quadro 04. Descrição da Coluna Cromatográfica

Coluna Cromatográfica	
Fabricante	Waters
Modelo	XTerra C_{18}
Comprimento da Coluna (cm)	100
Diametro da Coluna (mm)	2,1
Tamanho da Partícula (μm)	3,5

Quadro 05. Condições do Espectrômetro de Massas

Condições do Espectrômetro de Massas	
Sistema	Quattro Micro, Waters
Tipo de ionização	Electrospray positivo
Modo de operação	Monitoramento de reação múltipla (MRM)
Transição monitorada	387,0>238,0 (Sufentanil), 285,7>165,1 (Morfina) e 337,0>188, 0 (Fentanil)
Energia de colisão	25 eV (Sufentanil), 35 eV (Morfina) e 25 eV (Fentanil)
Gás do cone (nitrogênio)	50 L/h
Gás de colisão (argônio)	$2,3x10^{-3}$ mbar
Gás de dessolvatação	400 L/h
Voltagem do capilar	3,00 Kv
Voltagem do cone	35 V (Sufentanil), 45 eV (Morfina) e 35 V (Fentanil)
Voltagem do extrator	2 V
Voltagem do hexapolo	0,0 V
Temperatura do bloco	120 °C
Temperatura de dessolvatação	350 °C

Quadro 06. Descrição da Preparação das amostras biológicas

Agitar as amostras manualmente	5 segundos com movimentos circulares verticais
Volume de amostra de plasma	600 µL
Padrão interno (Fentanil 500 ng/mL)	50 µL
Solução de ajuste de pH	NaOH 0,1M
Volume da solução de ajuste de pH	50 µL
Solvente orgânico para extração	Éter etílico:diclorometano (70:30)
Volume de solvente para extração	5 mL
Tempo de agitação em vórtex e velocidade	2 min/velocidade 7
Tempo, rotação da centrifugação e Temperatura	10 min/3500 rpm à 4 ºC
Congelamento das amostras em gelo seco	aproximadamente 3 min
Transferência do sobrenadante filtrado p/ evaporação	Total
Vazão de Nitrogênio	8 L/min
Temperatura do Banho Maria	45 ºC
Volume de solução diluente p/ reconstituição do resíduo	150 µL
Solução Diluente para Reconstituição	Acetonitrila:ácido fórmico 0,1% (50:50)
Tempo de agitação em vórtex e velocidade	30 seg/velocidade 7
Volume de injeção	30 µL

2.1. Critérios de Aceitação

A curva de calibração representa a relação entre a resposta do instrumento e a concentração conhecida do analito. Foi gerada uma curva de calibração para cada corrida analítica, a qual foi utilizada para calcular a concentração do analito nas amostras dos controles de qualidade.

Para critério de aceitação da curva de calibração, o desvio é menor ou igual a 20% em relação à concentração nominal para o LIQ. Considera-se um desvio menor ou igual a 15% em relação à concentração nominal para as outras concentrações da curva de calibração. De acordo com a Resolução nº. 899 de 29 de Maio de 2003, o coeficiente de correlação linear deve ser igual ou superior a 0,98.

Para critérios de aceitação dos controles de qualidade (CQ´s), preconiza-se valor de desvio menor ou igual a 15% em relação à concentração nominal, conforme legislação vigente, segundo a fórmula:

$$CV\% = \frac{\text{Desvio-padrão}}{\text{Concentração média experimental}} x100$$

Nota: Ocorrendo desvio superior a 15% aplicado-se o teste de *Grubbs* para avaliar a presença ou não de valores *outliers*. O teste de *Grubbs* poderá ser aplicado nos parâmetros de limite inferior de quantificação, linearidade e controles de qualidade da recuperação, precisão e exatidão intra-dias da validação do método.

2.2. Validação do Método Analítico

A validação da metodologia analítica foi realizada de acordo com os critérios estabelecidos pelas Boas Práticas de Laboratório para quantificação de sufentanil e morfina em plasma através de LC-MS/MS e consistiu dos seguintes parâmetros: especificidade, limites de detecção e quantificação, linearidade, curva de calibração, recuperação absoluta, precisão intra e interdias e exatidão intra e interdias, estabilidade, e robustez.

Especificidade e Efeito Matriz

No ensaio de especificidade, analisaram-se amostras da matriz biológica (plasma) obtidas de seis indivíduos, sendo quatro amostras normais, uma lipêmica e uma hemolisada, nas condições cromatográficas descritas. Os resultados foram

comparados àqueles obtidos com solução aquosa dos analitos, na concentração próxima ao limite de quantificação.

A resposta de picos interferentes no tempo de retenção do fármaco deve ser inferior a 20% da resposta do limite de quantificação. Adicionalmente relativamente aos picos interferentes no tempo de retenção do padrão interno deve-se considerar limite inferior a 5% da resposta na concentração utilizada do mesmo no ensaio de quantificação dos analitos.

O efeito matriz foi avaliado através da comparação dos espectros de amostras de plasma dopadas com analito (CQB, CQM e CQA) e padrão interno frente a amostras contendo o analito e o padrão interno diluídos em fase móvel.

Limite de Detecção e Quantificação

O limite de quantificação corresponde à menor quantidade do analito em uma amostra que pode ser determinada com precisão e exatidão aceitáveis (<20%), sob as condições experimentais estabelecidas, apresentando sinal relativo ao ruído da linha de base superior à razão 10:1. O limite de detecção definido como um sinal relativo ao ruído da linha de base na razão de 2:1; representa a menor quantidade do analito presente em uma amostra que pode ser detectado, porém não necessariamente quantificado, sob as condições experimentais estabelecidas. Os limites de detecção e quantificação foram determinados a partir da análise de 3 e 6 réplicas respectivamente.

Linearidade

A linearidade de uma metodologia analítica representa a faixa de concentração em que é obtida adequada correlação linear entre a resposta mensurada (Y, a área do pico ou razão das áreas do fármaco e o padrão interno através do instrumento analítico), e as respectivas concentrações plasmáticas do fármaco inalterado (X). A equação da reta: $Y = aX + b$ evidenciando boa correlação linear entre Y e X, representa a curva de calibração construída diariamente. O critério mínimo aceitável do coeficiente de correlação linear (r^2) foi de 0,98.

Para verificar a faixa de linearidade do método foram adicionados ao "*pool*" de plasma, solução padrão de sufentanil (1000 µg/mL) e realizadas diluições sucessivas para se obter as seguintes concentrações 500; 250; 100; 50; 5; 0,5; 0,05 ng/mL. Para fins de estudo de especificidade adicionou-se solução padrão de morfina (1000 µg/mL) ao "*pool*" de plasma; foram realizadas diluições sucessivas para se obter as seguintes concentrações 1000; 500; 250; 100; 50; 25; 10 ng/mL. A inclusão de morfina neste estudo se deve ao fato de que os pacientes submetidos a este protocolo receberam este opióde no intra e pós operatório da cirurgia cardíaca.

Foram avaliadas sete concentrações de sufentanil e morfina adicionadas ao plasma (0,05_10; 0,5_25; 5_50; 50_100; 100_250; 250_500 e 500_1000 ng/mL) em seis determinações de cada. Estabeleceu-se correlação linear entre a concentração, considerada variável independente (x) e a resposta*, considerada variável dependente (y), aplicando a ponderação de 1/X. Os parâmetros de correlação foram estimados por meio do método dos mínimos quadrados resultando na equação da reta Y = aX + b.

*A resposta é obtida automaticamente pelo software Masslynx V4.1 do sistema de LC-MS/MS da marca Waters. Para o cálculo dessa resposta o equipamento utiliza a seguinte fórmula:

Resposta = área do analito x (concentração do PI/área do PI)

O parâmetro da linearidade é aceito se:

- O coeficiente de variação entre as determinações for menor ou igual à 15% para todos os pontos exceto para o limite de quantificação, que poderá ter um coeficiente de variação de até 20%.
- O desvio em relação à concentração nominal for menor ou igual à 15% para todos os pontos exceto para o limite de quantificação, que poderá ter um desvio de até 20%.
- O coeficiente de correlação linear deve ser igual ou superior a 0,98.

Curva de Calibração

A curva de calibração foi preparada pela adição das soluções padrão de sufentanil e morfina, diluídas a partir de solução estoque (1000 µg/mL) a alíquotas

de plasma humano livre do fármaco (plasma branco), obtendo-se as seguintes concentrações de sufentanil e morfina, respectivamente: 0,05_10; 0,5_25; 5_50; 50_100; 100_250; 250_500 e 500_1000 ng/mL, as quais foram estocadas a -20ºC até o momento do ensaio. Solução metanólica de fentanil (500 µg/mL) foi adicionada as amostras como padrão interno. As amostras de controle de qualidade foram preparadas da mesma maneira que a curva de calibração, nas concentrações de 0,15_30, 200_400 e 400_800 ng/mL de sufentanil e morfina, respectivamente.

Após a corrida cromatográfica, o valor nominal para cada concentração plasmática de sufentanil e de morfina foi plotado em função da razão da área do pico obtida para o fármaco e seu padrão interno (fentanil), obtendo-se o coeficiente de correlação linear (r^2 = 0,98) e sua equação respectiva (Y = aX + b). Os controles de qualidade internos (0,15_30, 200_400 e 400_800 ng/mL) foram preparados em sextuplicata e também analisados durante cada corrida analítica para avaliação da aceitação da mesma. O critério de aceitação de uma corrida determina-se pela obtenção de ao menos seis de nove controles com desvio inferior a 15% comparado ao valor nominal (para os controles alto, médio e baixo).

Estudo de Recuperação

Os estudos de recuperação têm como objetivo mensurar a eficiência do procedimento de extração de um método analítico dentro de um limite de variação aceitável. Porcentagens de recuperação do analito e do padrão interno próximos a 100% são desejáveis, porém, admite-se valores menores, desde que a recuperação apresente precisão e exatidão dentro de limites aceitáveis.

Para tanto, comparam-se os resultados analíticos de amostras extraídas a partir de três concentrações (baixa: 0,15 e 30 ng/mL, média: 200 e 400 ng/mL e alta: 400 e 800 ng/mL), contemplando a faixa de linearidade do método, com os resultados obtidos com soluções padrão não extraídas, as quais representam 100% de recuperação.

Exatidão e Erro Sistemático

A exatidão do método analítico foi avaliada através da determinação do erro sistemático do ensaio (porcentagem de inexatidão), estabelecendo-se como

aceitáveis valores inferiores a 15%, exceto para o limite de quantificação, para o qual se admitem desvios de até 20%.

A porcentagem de inexatidão corresponde ao desvio entre o valor nominal da concentração do fármaco na amostra e o valor obtido pelo método analítico e foi calculada através da análise de três concentrações em sextuplicata (baixa: 0,15 e 30 ng/mL, média: 200 e 400 ng/mL e alta: 400 e 800 ng/mL) na mesma corrida cromatográfica (exatidão intradias) e em corridas distintas por três dias consecutivos (exatidão interdias). O erro sistemático do ensaio foi determinado pela porcentagem de inexatidão.

Precisão Intra e Interdias

A reprodutibilidade do método analítico foi avaliada através de estudos de precisão intradia (mesma corrida cromatográfica) e estudos de precisão interdias (corridas cromatográficas distintas em dias consecutivos). A precisão intradia foi avaliada através da análise de três concentrações em sextuplicata (alta, média e baixa); enquanto que a precisão interdias exigiu a análise das concentrações em triplicata (baixa: 0,15 e 30 ng/mL, média: 200 e 400 ng/mL e alta: 400 e 800 ng/mL), em três dias consecutivos. A precisão foi expressa através de desvio padrão relativo (CV%), estabelecendo-se como aceitáveis valores inferiores a 15 %.

Estabilidade

Antes da realização dos estudos de estabilidade foram preparadas amostras de plasma de Controle de Qualidade em duas concentrações de CQB e CQA (0,15_ 30 e 400_800 ng/mL) através da dopagem das soluções padrão em 50 mL de plasma.

Para a determinação da estabilidade de sufentanil e de morfina em plasma, foi adotado como critério de aceitação a variação inferior a 15% para todas as concentrações estudadas. A quantificação das amostras foi realizada através de uma curva de calibração recém-preparada.

O estudo de estabilidade consistiu das seguintes avaliações:

- Após três ciclos de descongelamento do fármaco em matrizes biológicas: amostras de duas concentrações de sufentanil foram analisadas em triplicata em 3 dias consecutivos para a realização dos ciclos um, dois e três de congelamento e descongelamento. As amostras foram congeladas à -20 ºC e mantidas por 24 horas, sendo então submetidas ao descongelamento à temperatura ambiente. Quando completamente descongeladas, as amostras foram novamente congeladas por 24 horas e assim sucessivamente, até contemplar os três ciclos, quantificando-se o fármaco nas amostras após o terceiro ciclo. Os valores obtidos foram comparados aos valores nominais.
- Pós-processamento: as amostras processadas depois de analisadas permanecem na bandeja do auto - injetor aguardando o tempo em que será feita sua próxima injeção (48 h).
- De curta duração da matriz biológica em bancada: os controles permaneceram à temperatura ambiente por 4 horas em bancada, ao final do período foram analisados pelo método descrito.
- De longa duração da matriz biológica mantida em congelador (-20 ^{o}C): foi determinada a partir de duas concentrações em triplicata em diferentes períodos de tempo, garantindo a estabilidade durante o cronograma do estudo (137 dias).
- Solução padrão: preparar as soluções padrões a partir da solução estoque de sufentanil e de fentanil nas concentrações de CQB e CQA. Analisar e armazenar em refrigerador para próximas análises.

Robustez

A robustez do método foi avaliada por meio de análises das concentrações correspondentes ao CQB, CQM e CQA em duplicata, após modificações nas condições cromatográficas do método. Os resultados obtidos foram comparados com uma curva de calibração obtida no dia da avaliação destes parâmetros. Os parâmetros avaliados foram mudanças da proporção da fase móvel de 70:30 para 65:55 de Acetonitrila: Ácido fórmico 0,1%(0,25%) +Acetato de amônio 1M (0,5%), mudança da temperatura do forno de 40 ºC para 35 ºC e mudança do fluxo da fase móvel de 1,0 mL/min (split 1:5) para 1,1 mL/min (split 1:5).

2.3. Análise Estatística

Para construção da curva de calibração/linearidade utilizou-se o método dos quadrados mínimios. Os parâmetros de validação foram expressos como médias. Os valores de desvio padrão relativos (C.V.) foram calculados e comparados com o especificado para cada tipo de determinação, de acordo com os critérios de aceitação.

Teste de Grubbs

Para a detecção de valores *outliers* realiza-se o teste de Grubbs para um nível de significância α=0,05. Este teste tem a finalidade de verificar se os valores extremos (maior e/ou menor) são *outliers*. No teste de Grubbs utiliza-se o seguinte cálculo estatístico:

$$G_{Calc} = \frac{|x_i - \bar{x}|}{s},$$

em que:

$x_i =$ é uma observação da amostra $x_1, x_2, ..., x_n$;

$\bar{x} =$ é a média amostral;

$s =$ é o desvio padrão amostral.

Esta estatística testa a hipótese:

$$\begin{cases} H_0 : x_i \text{ é uma observação discrepante (outlier)} \\ H_1 : x_i \text{ não é uma observação discrepante (outlier)} \end{cases}$$

Se $G_{Calc} > G_{Tab}$, rejeita-se a hipótese H_0, ou seja, considera-se um valor discrepante e o mesmo é excluído dos cálculos, caso contrário mantêm-se o valor nos cálculos.

Quadro 07. Valores de G tabelados

Nº DE AMOSTRAS	VALOR DE G TABELADO
3	**1,15**
4	**1,48**

5	**1,71**
6	**1,89**
7	**2,02**
8	**2,13**
9	**2,21**
10	**2,29**
11	**2,34**
12	**2,41**
13	**2,46**
14	**2,51**

Fonte: Statistics for Analytical Chemistry

3. RESULTADOS

Perfil Cromatográfico e Espectro de Massas

O espectrômetro de massa, equipado com fonte de electrospray no modo positivo foi empregado no modo de monitorização com reação múltipla (MRM), monitorando as transições de 387,0>238,0 (Sufentanil), 285.7>165.1 (morfina) e 337,0>188, 0 (Fentanil), respectivamente.

Os espectros de massas do padrão interno fentanil e do sufentanil, íons molecular e produto poderão ser visualizados nas figuras 2 e 3.

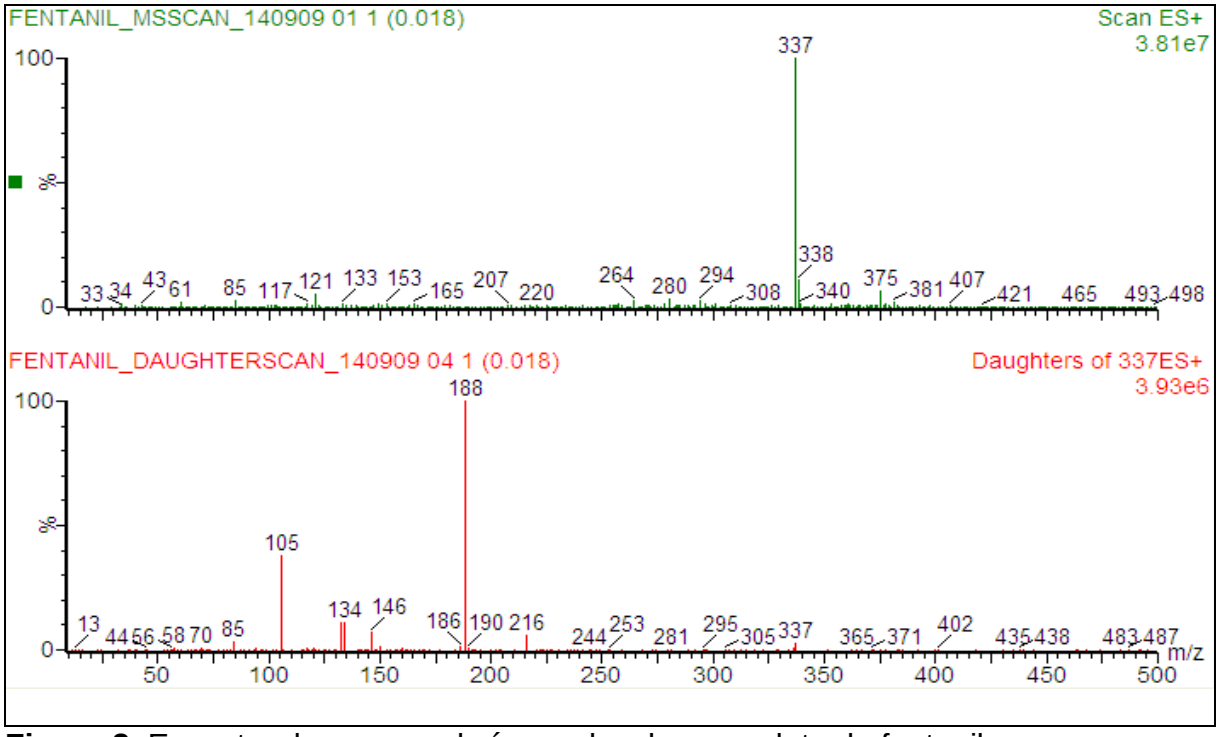

Figura 2. Espectro de massas do íon molecular e produto de fentanil.

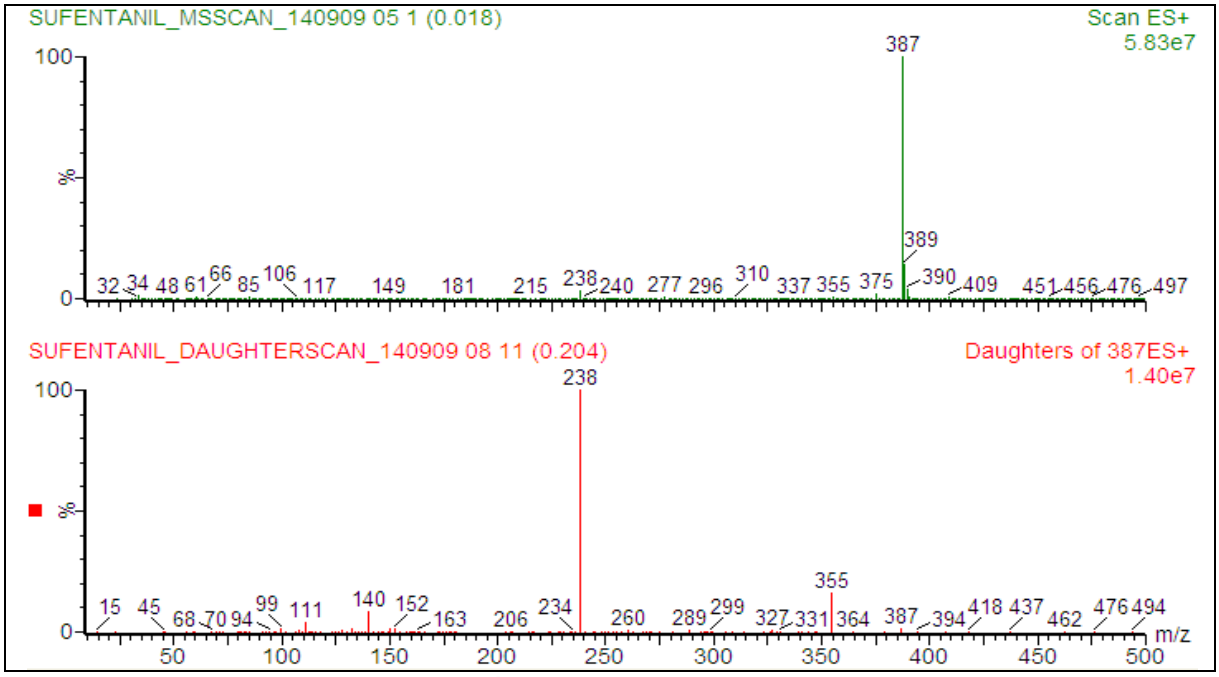

Figura 3. Espectro de massas do íon molecular e produto de sufentanil.

Especificidade

A presença de picos interferentes no tempo de retenção de sufentanil e morfina foram de 6,94% e 0,81% respectivamente, sendo inferior a 20% da resposta do LIQ e no tempo de retenção do padrão interno é de 0,03% sendo inferior a 5% da resposta na concentração utilizada. Portanto, o método demonstrou-se específico para os analitos e PI em questão, conforme cromatogramas apresentados nas figuras 4 e 5. Não foi observado efeito matriz no método avaliado.

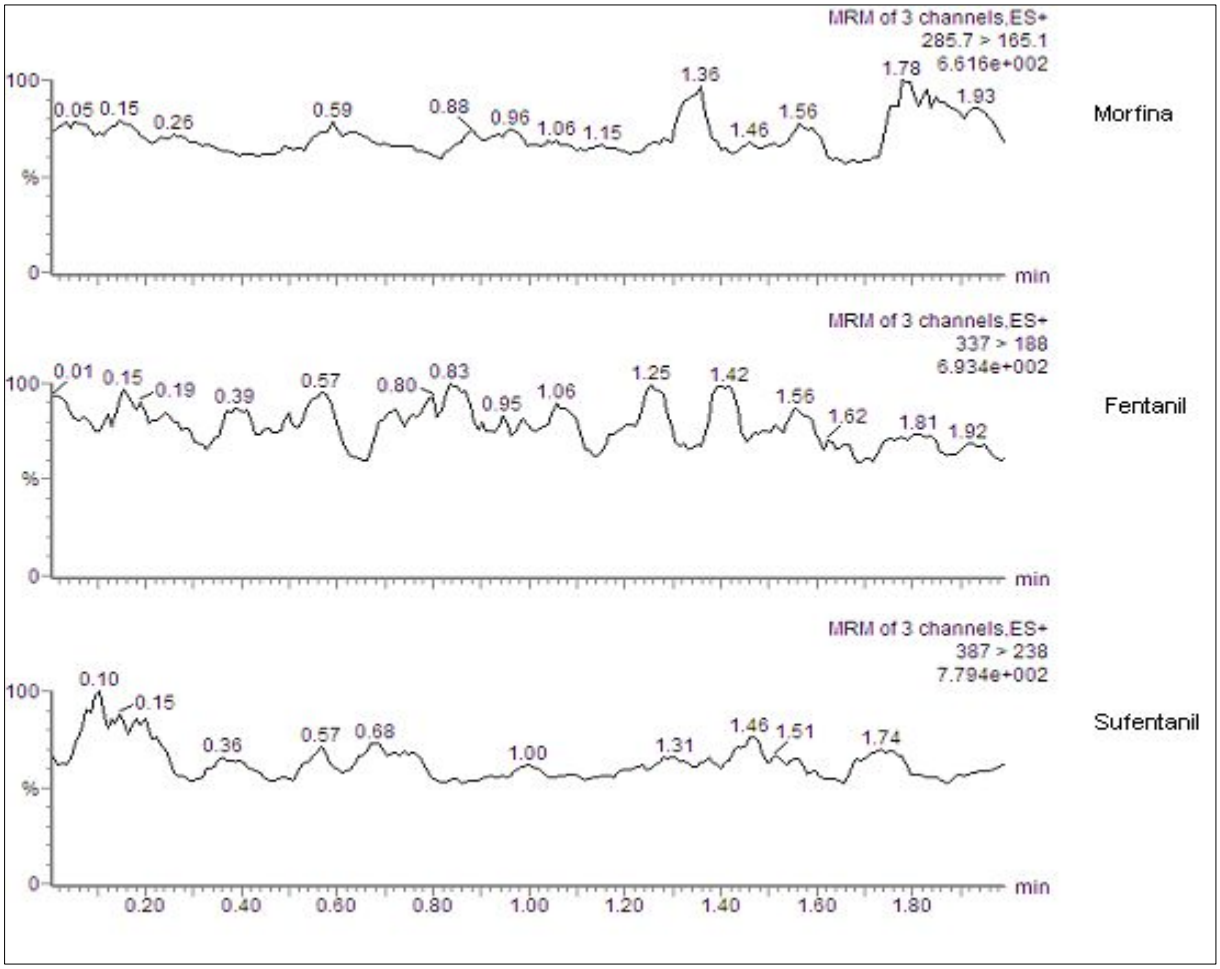

Figura 4. Cromatogramas de morfina, fentanil e sufentanil obtidos em amostras de plasma branco.

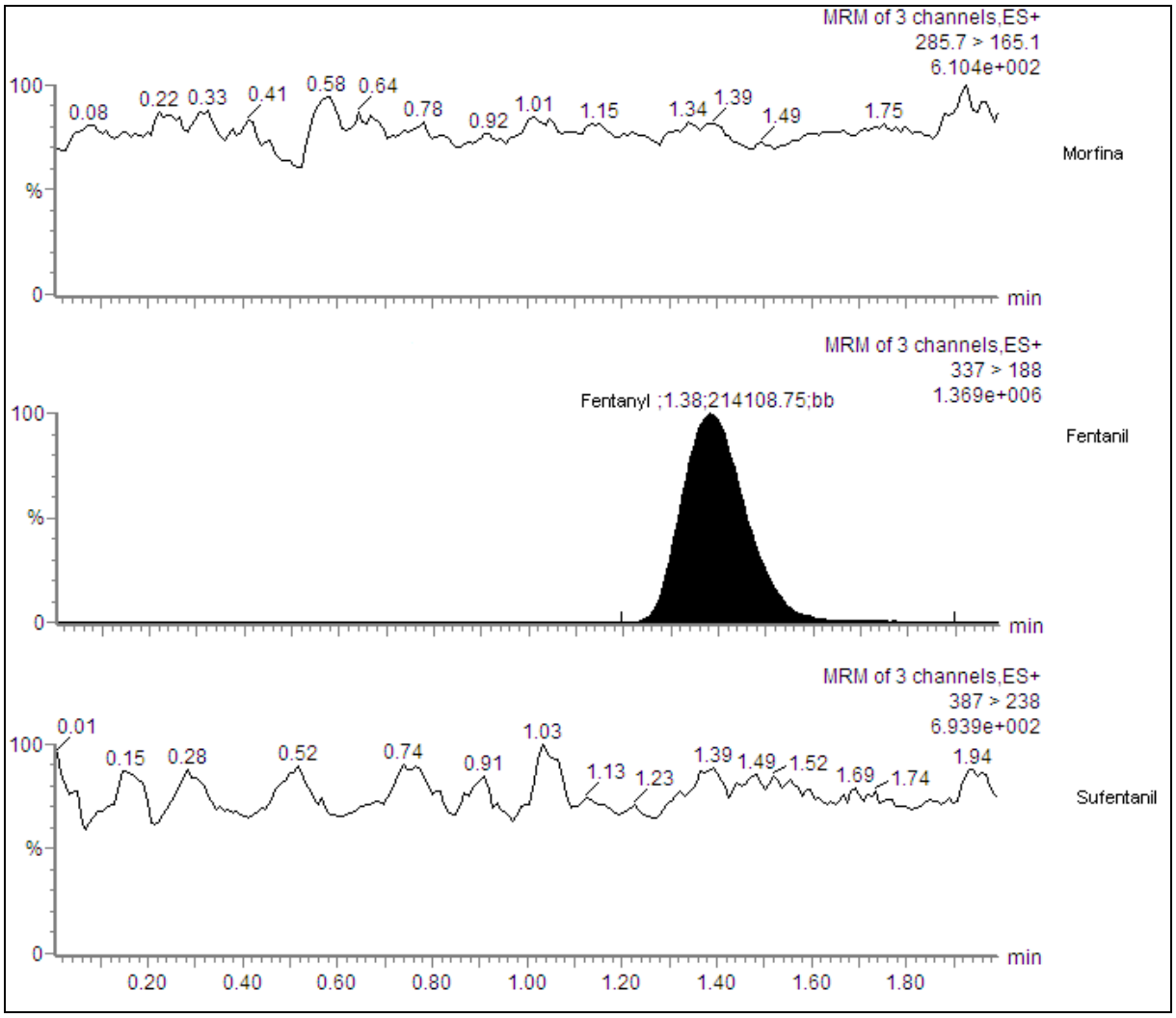

Figura 5. Cromatogramas de morfina, fentanil e sufentanil obtidos em amostras de plasma adicionadas de padrão interno – fentanil.

Recuperação

Foram avaliadas três diferentes concentrações de sufentanil e morfina respectivamente (CQB: 0,15_30 ng/mL, CQM: 200_400 ng/mL e CQA: 400_800 ng/mL) e uma concentração do PI (500 ng/mL), encontrando-se os seguintes resultados:

- As amostras CQB apresentaram recuperação de 90,35% para o analito sufentanil, 94,77% para o analito morfina e 95,10% para o padrão interno.
- As amostras CQM apresentaram recuperação de 92,21% para o analito sufentanil, 100,79% para o analito morfina e 82,47% para o padrão interno.
- As amostras CQA apresentaram recuperação de 89,37% para o analito sufentanil, 106,06% para o analito morfina e 104,30% para o padrão interno.

O método de extração líquido-líquido utilizando éter etílico:diclorometano (70:30) como solvente de extração, propiciou significativa percentagem de recuperação média para sufentanil e morfina de 90,64% e 100,54% respectivamente e PI 93,96% com precisão nos três níveis de concentração estudados.

Limite Inferior de Quantificação

Este parâmetro foi analisado com seis determinações da concentração de 0,05_10 ng/mL de sufentanil e morfina respectivamente. O valor do CV% encontrado foi de 3,20% para sufentanil e 14,67% para morfina com exatidão de 114,07% para sufentanil e 102,99% para morfina. Esses dados demonstram sensibilidade significativa do método com precisão e exatidão dentro dos limites preconizados.

Linearidade

Para sufentanil o valor do coeficiente de correlação linear apresentou um valor de 0,9982, a inclinação da reta apresentou valor de 6,3942 e o intercepto da reta apresentou valor de 0,2555, conforme apresentado na figura 6.

Para morfina o valor do coeficiente de correlação linear apresentou um valor de 0,9958, a inclinação da reta apresentou valor de 0,4457 e o intercepto da reta apresentou valor de -0,0966, conforme apresentado na figura 7.

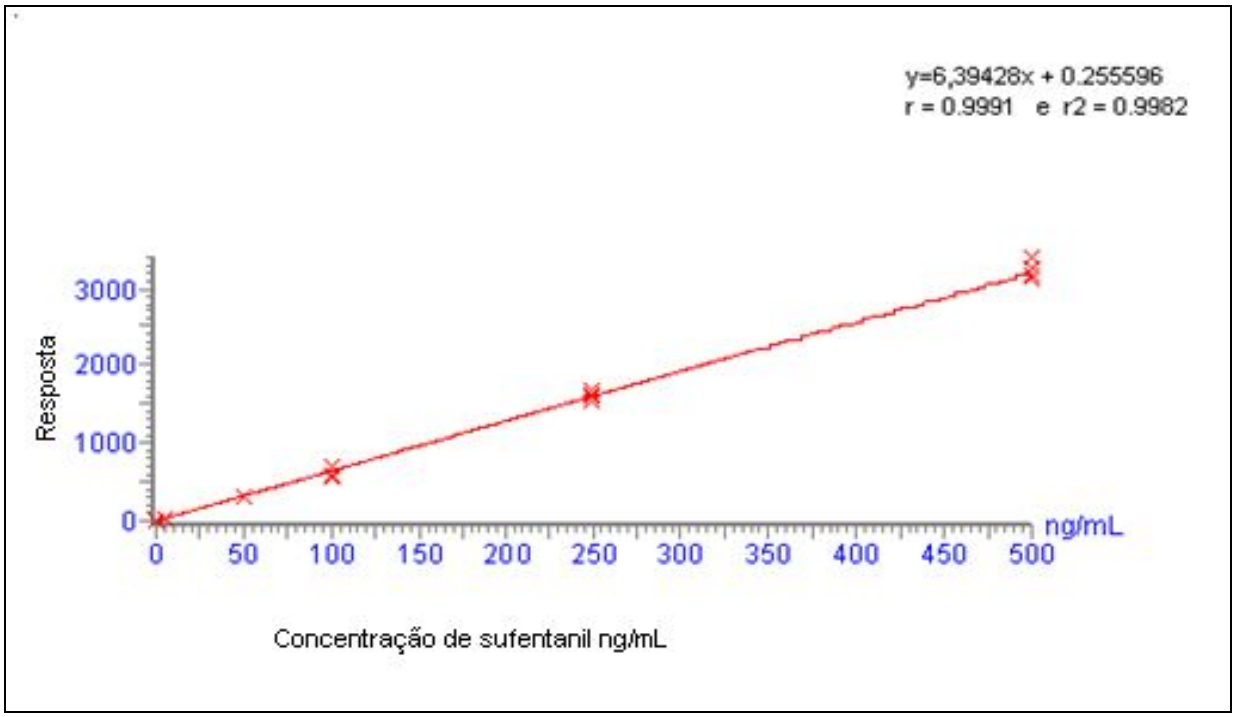

Figura 6. Linearidade do método de determinação de sufentanil plasmático por LC-MS/MS. Faixa de concentração do sufentanil no plasma 0,05 – 500 ng/mL versus razão de área sufentanil/ fentanil.

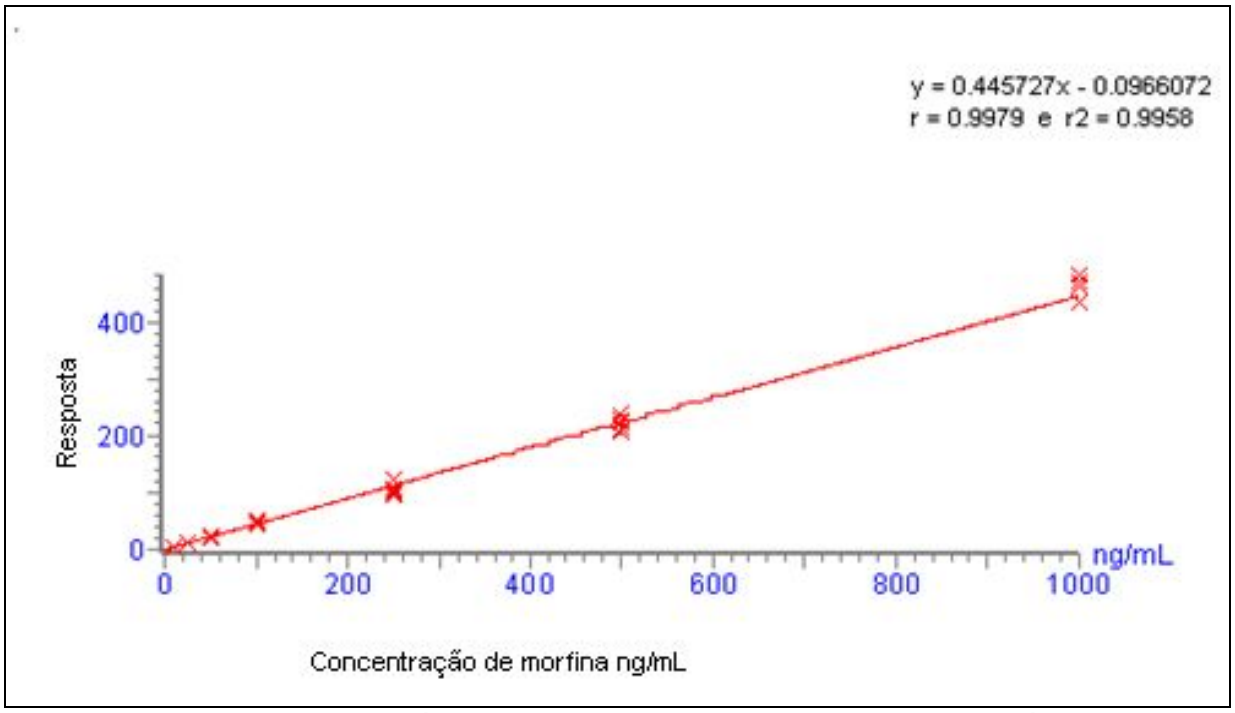

Figura 7. Linearidade do método de determinação de morfina plasmática por LC-MS/MS. Faixa de concentração de morfina no plasma 10 – 1000 ng/mL versus razão de área morfina/ fentanil.

Precisão e Exatidão

Os resultados foram determinados utilizando-se uma curva de calibração em cada dia de análise, encontrando-se os seguintes resultados, contemplados na tabelas 1, 2 e 3.

Tabela 1. Resultados apresentados na avaliação da precisão (CV%) e da exatidão, intra-dias, de amostras de sufentanil nas concentrações CQB, CQM e CQA.

	CQB		**CQM**		**CQA**	
Intra-dia	**CV%**	**Exatidão**	**CV%**	**Exatidão**	**CV%**	**Exatidão**
1	4,47%	102,72%	4,62%	104,90%	1,63%	109,50%
2	1,15%	105,49%	2,87%	105,11%	4,27%	103,01%
3	3,56%	91,06%	8,10%	93,68%	7,17%	104,29%

Abreviaturas- CV –coeficiente de variação; n= 6 de cada concentração

Tabela 2. Resultados apresentados na avaliação da precisão (CV%) e da exatidão, intra-dias, de amostras de morfina nas concentrações CQB, CQM e CQA.

	CQB		CQM		CQA	
Intra-dia	**CV%**	**Exatidão**	**CV%**	**Exatidão**	**CV%**	**Exatidão**
1	1,96%	109,13%	4,55%	101,20%	8,72%	95,16%
2	2,05%	105,75%	6,94%	96,79%	7,32%	97,47%
3	7,49%	96,18%	7,87%	99,01%	10,32%	99,44%

Abreviaturas- CV –coeficiente de variação; n= 6 de cada concentração

A precisão e exatidão inter-dias apresentou valores de coeficiente de variação e exatidão, contemplados na tabela 3.

Tabela 3. Resultados apresentados na avaliação da precisão (CV%) e da exatidão, inter-dias, de amostras de sufentanil e morfina nas concentrações CQB, CQM e CQA.

	Sufentanil		Morfina	
Inter-dia	**CV%**	**Exatidão**	**CV%**	**Exatidão**
CQB	3,28%	105,73%	6,88%	101,83%
CQM	1,27%	104,54%	4,98%	100,00%
CQA	7,27%	96,35%	1,80%	98,21%

Abreviaturas- CV –coeficiente de variação; n= 3 de cada concentração

Observou-se que o método apresenta precisão, pois os valores do CV para cada nível de concentração foram inferiores ao limite aceito de 15% e a exatidão correspondente, na faixa de 85 a 115% do valor nominal, cumprindo parâmetros preconizados.

Robustez

Os resultados obtidos encontram-se descritos nas tabelas 4, 5 e 6:

Tabela 4. Precisão (CV%) e a exatidão de amostras de sufentanil e morfina em plasma humano durante determinação da robustez por meio da variação da proporção de fase móvel nas concentrações CQB, CQM e CQA.

	Sufentanil		Morfina	
Concentrações	**CV%**	**Exatidão**	**CV%**	**Exatidão**
CQB	1,02%	96,90%	0,61%	102,25%
CQM	5,61%	99,94%	3,00%	107,06%
CQA	4,84%	103,21%	0,65%	111,74%

Abreviaturas- CV –coeficiente de variação; n= 2 de cada concentração

Tabela 5. Precisão (CV%) e a exatidão de amostras de sufentanil e morfina em plasma humano durante determinação da robustez por meio da variação da temperatura no forno da coluna nas concentrações CQB, CQM e CQA.

	Sufentanil		Morfina	
Concentrações	**CV%**	**Exatidão**	**CV%**	**Exatidão**
CQB	2,37%	99,53%	0,05%	97,76%
CQM	2,64%	107,03%	0,77%	95,12%
CQA	8,52%	96,46%	8,61%	91,60%

Abreviaturas- CV –coeficiente de variação; n= 2 de cada concentração

Tabela 6. Precisão (CV%) e a Exatidão de amostras de sufentanil e morfina em plasma humano durante determinação da robustez por meio da variação do fluxo da fase móvel nas concentrações CQB, CQM e CQA.

	Sufentanil		Morfina	
Concentrações	**CV%**	**Exatidão**	**CV%**	**Exatidão**
CQB	1,01%	102,93%	0,70%	96,20%
CQM	0,73%	101,51%	2,71%	99,12%
CQA	11,00%	101,15%	2,02%	93,61%

Abreviaturas- CV –coeficiente de variação; n= 2 de cada concentração

Os resultados obtidos demonstram que o método apresentou precisão e exatidão indicando robustez do método frente aos parâmetros avaliados.

Estabilidade dos Analitos Sufentanil e Morfina

A tabela 7 apresenta um resumo dos resultados referentes aos estudos de estabilidade dos analitos sufentanil e morfina.

Tabela 7. Resumo do estudo de estabilidade dos analitos sufentanil e morfina, em plasma humano.

Estabilidade	CV (%)		Desvios (%)[a]	
	S	**M**	**S**	**M**
Curta Duração 4 h	2,99	1,47	1,13	-1,59
	6,45	0,42	4,32	2,36
Pós-Processamento 48 h	7,37	1,74	7,92	-6,07
	2,97	1,96	0,70	2,48
Ciclo de Congelamento/Descongelamento	2,99	1,11	1,13	4,51
	8,45	8,42	-4,32	-4,75
Longa Duração 137 dias	8,32	5,96	-14,47	-8,42
	4,22	3,59	-7,00	-10,58

[a] (Concentração da amostra de estabilidade/concentração da amostra recém preparada) x 100 – 100
Abreviações- CV –coeficiente de variação, S – sufentanil, M- morfina; n= 3 de cada concentração

4. DISCUSSÃO

No geral, os narcóticos analgésicos opióides são fármacos de natureza básica e se encontram na matriz complexa ligados extensamente às proteínas plasmáticas. As técnicas analíticas empregadas para sua quantificação em fluidos e outras matrizes biológicas incluem os imunoensaios com marcadores radioativos ou enzimáticos e os métodos cromatográficos tais como a camada delgada, a cromatografia a gás e a cromatografia líquida dos analitos após extração líquido-líquido ou sólido-líquido.

Diversos métodos bioanalíticos para quantificação de sufentanil ou de morfina no plasma têm sido propostos, principalmente com finalidade na medicina legal, toxicologia forense e no controle das drogas de abuso. Entretanto, poucos são adequados aos estudos clínicos de farmacocinética uma vez que sua aplicação requer além de alta sensibilidade e seletividade, linearidade no seguimento do paciente a curto e médio prazos após dose intravenosa da ordem de até alguns submiligramas de sufentanil. Além disto, a prática clínica laboratorial carece de uma metodologia que permita a quantificação simultânea de sufentanil e morfina.

Por razões de rapidez nos resultados com reduzido tempo de execução, descreve-se a utilização do imunoensaio na quantificação de opiáceos com finalidade tóxico-forense assim como na realização dos primeiros ensaios clínicos de quantificação de morfina e sufentanil plasmático para estudo farmacocinético (CHAPMAN *et al*., 1994; CHAPMAN *et al*., 1995; LEE *et al*., 1991; SPECTOR & PARKER, 1970; MICHIELS *et al*., 1983; HANSDOTTIR *et al*., 1983; LEJUS *et al*., 2000). A cromatografia líquida com detector eletroquímico, quimioluminescência e com fluorescência são em parte mais específicas, mas mostraram-se pouco sensíveis além de exigirem *clean up* bastante demorado e dispendioso (ABBOTT *et al*., 1987; BOUQUILLON *et al*., 1992; ROTSHTEYN & WEINGARTEN, 1996; SVENSSON *et al*., 1995).

Desta forma, como as concentrações plasmáticas de sufentanil na faixa de 0,05 a 0,30 ng/mL são extremamente baixas na realização de estudos farmacocinéticos, posteriormente buscaram-se métodos mais seletivos e de alta sensibilidade para a realização de ensaios clínicos pelo desenvolvimento e aplicação de métodos bioanalíticos de alta complexidade.

Devido à diferente especificidade dos métodos analíticos reportados na literatura, grandes discrepâncias foram apontadas nos estudos farmacocinéticos iniciais com o sufentanil (BOVILL *et al*.,1984 e HUDSON *et al*., 1989) Tais divergências podem ter sido causadas pela deficiência analítica na determinação da eliminação deste fármaco, devido a baixa sensibilidade e alto coeficiente de variação do limite inferior de quantificação.

A cromatografia a gás utilizando o detector de ionização de chama (FID), de nitrogênio e fósforo (NPFID) ou de captura de elétrons (ECD) foi empregada nas décadas de 70 e 80. A principal desvantagem é a baixa sensibilidade para quantificação de opiáceos em matrizes biológicas incluindo a morfina, além dos problemas relacionados à seletividade desses detectores (WOESTENBORGHS *et al*., 1981; CALDWELL & CHALLENGER, 1989; CHRISTOPHERSEN *et al*., 1987; DAHLSTROM *et al*., 1977; FELBY *et al*., 1979; JOHANSEN *et al*., 1990; KROGH *et al*., 1993; HOFMANN *et al*., 1999; LEIS *et al*., 2000; MOORE *et al*., 1978; WASELS *et al*., 1989).

Na década de 90, a cromatografia líquida foi proposta na determinação dos opiáceos e/ou seus produtos de biotransformação principalmente com finalidade tóxico-forense. Entretanto, além de exigir procedimento de purificação bastante demorado e dispendioso, esta técnica mostrou-se pouco sensível na quantificação de opiáceos. Utilizou-se o detector ultravioleta em 210 nm combinado com detector eletroquímico seguido pela quimioluminescência, arranjo de diodo e de fluorescência (ABBOTT *et al*., 1987; BOUQUILLON *et al*., 1992; ROTSHTEYN & WEINGARTEN, 1996; SVENSSON *et al*., 1995).

Devido à alta potência desses fármacos, a dificuldade analítica aumenta obviamente para baixas concentrações do opióide presente na amostra. Adicionalmente, são requeridos métodos bioanalíticos de alta sensibilidade e seletividade, uma vez que a concentração dos analitos na amostra se reduz rapidamente em função de altas taxas de distribuição, biotransformação e excreção dos opióides.

No final dos anos 90, o desenvolvimento de método bioanalítico utilizando a cromatografia a gás – espectrometria de massa veio contribuir nos estudos relativos ao controle das drogas de abuso com a comprovação definitiva da estrutura molecular dos opióides através do espectro de massas. Relativamente aos métodos anteriormente descritos, a cromatografia a gás com detector de massas (CG-MS)

apresentou a vantagem de alta sensibilidade e seletividade na análise tóxico-forense, permitindo ainda sua aplicação em estudos clínicos de analgesia pós-operatória pela morfina; além do controle na dor severa pelos opióides nos pacientes com câncer (CHAPMAN *et al*., 1995; HEISKANEN &KALSO, 1997; HEISKANEN *et al*., 2000; IONESCU *et al*., 1989; LEE *et al*., 1991; WASELS *et al*., 1989).

Os métodos cromatográficos com detecção por espectrometria de massas apresentaram inúmeras vantagens sobre os demais detectores, uma vez que tem sido reportada boa sensibilidade e larga linearidade de resposta desse detector aos opiáceos. Entretanto, para garantir a sensibilidade requerida na determinação dos opiáceos em fluidos e outras matrizes biológicas, a derivatização dos analitos se tornou obrigatória na cromatografia a gás – espectrometria de massas. Relativamente a esse procedimento prévio a análise por CG-MS, uma série de agentes foi empregada tal como o BSTFA (DROST *et al*., 1984; ROPERO-MILLER *et al*., 2002; SANTOS *et al*., 2008), TFA (GOLDBERGER, 1993), PFPA (FRYIRS *et al*., 1997; KROGH *et al*., 1993; VAN NIMMEM *et al*., 2004), HFBA (LEIS *et al*., 2000), metoxamina e anidrido propiônico (MEATHERALL, 2005).

Por outro lado, outra opção mais vantajosa que a CG-MS foi a utilização da cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas, que não necessita do agente derivatizante, e garante a integridade da molécula com a ionização por *eletrospray* ESI-MS (BLANCHET *et al*., 1999; MARTENS-LOBENHOFFER, 2002; KATAGI *et al*., 2001; PACIFICI *et al*., 1995; SCHANZLE *et al*., 1999; TYREFORS *et al*., 1996; SCHMIDT *et al*., 2006) ou ainda por *ionspray* à pressão atmosférica API-MS (BOGUSZ *et al*., 1997; TATSUNO *et al*., 1996; ZUCCARO *et al*., 1997; PALLESCHI *et al*., 2003).

A sensibilidade por espectrometria de massas é alta, mas exige procedimentos de purificação muito específicos para as matrizes biológicas tais como a extração líquido-líquido utilizando solventes orgânicos ou a extração em fase sólida que emprega diversos preenchimentos nos cartuchos de fase sólida disponíveis comercialmente.

Com referência a preparação da matriz biológica previamente à análise cromatográfica, Krogh e col. (1993) reportaram a utilização de sistema automatizado de purificação aplicado a amostras de plasma com a desvantagem do custo elevado apesar da alta sensibilidade obtida; além disso, registrou-se ainda uma série de problemas decorrentes de inúmeras lavagens seguidas de sucessivos enxágües e a

necessidade de tratamento antifungos para a tubulação e sistemas de diluição que são inerentes ao sistema automatizado.

Drost e col. (1984) utilizaram de forma inovadora a extração em fase sólida em cartucho BOND ELUT C18 para a purificação da matriz biológica na determinação de morfina por CG-MS após derivatização com BSTFA; porém, a baixa sensibilidade e a linearidade limitada (5 – 200 ng/mL) mostraram-se insuficientes para aplicação em estudos clínicos.

Posteriormente, uma série de outros materiais foi empregada para extração em fase sólida da morfina de matrizes biológicas (GEIER *et al*., 1996; GOLBERGER *et al*., 1993; SCHUBERTH & SCHUBERT, 1989; SVENSSON *et al*., 2007; WANG *et al*., 1994; WASELS *et al*., 1989). Entretanto, nenhum desses métodos alcançou a sensibilidade e a linearidade suficientes para a realização de estudos farmacocinéticos.

Recentemente, Santos e col. (2008) recomendaram a purificação de amostras de plasma através da extração em fase sólida empregando cartucho BOND ELUT CERTIFY®, 50mg/3mL (VARIAN Incorporated, Lake Forest, CA, USA) com base na ótima recuperação registrada para os analitos (morfina e morfina-D3, padrão interno) fato que justificou boa sensibilidade, além da extensa faixa de linearidade obtida por esses autores. A extração em fase sólida empregando esse cartucho mostrou-se superior aqueles reportados por Drost e col. (1984) e por Ropero-Miller e col. (2002) em decorrência da maior capacidade do cartucho CERTIFY (VARIAN Incorporated, Lake Forest, CA, USA) em concentrar o opióide contido na matriz biológica garantindo alta recuperação da extração da morfina na quantificação por CG-MS.

Por outro lado, a partir de cartuchos C18 (BAKER, Deventer, Netherlands) demonstrou-se linearidade de 0,3 a 2 ng/mL e sensibilidade decorrente da alta eficiência da extração em fase sólida para o sufentanil em plasma (98,9%) pela utilização do método em LC-MS/MS descrito por Palleschi e col. (2003); em contrapartida, Schmidt e col. (2006) reportaram recuperação menor pela utilização de cartuchos STRATA SCREEN-C (PHENOMENEX, Aschaffenburg, Germany).

Em relação à purificação por extração líquido-líquido, a extração em fase sólida é procedimento mais demorado e de alto custo; dentre suas desvantagens ressaltam-se o grande volume de plasma requerido para análise do analito, além da

variabilidade nos resultados obtidos, justificada pela falta de homogeneidade dos cartuchos contendo o preenchimento escolhido.

Em contrapartida, outra técnica de purificação para determinação de fármacos em matrizes biológicas simples, rápida e baixo custo é a precipitação de proteínas. Entretanto, esse procedimento não é indicado para a determinação de morfina e o sufentanil por LC/MS/MS, devido ao grande número de interferentes presentes no extrato orgânico.

Conseqüentemente, a extração líquido-líquido tem sido recomendada desde longa data, pelo surgimento da aplicação da técnica de CG/MS na determinação de opióides em matrizes biológicas (CONE *et al*., 1983; DAHLSTROM & PAALZOW, 1975; FRYIRS *et al*., 1997; JONES *et al*., 1984; LEIS *et al*., 2000; MEATHERALL *et al*., 2005; WATSON *et al*., 1995). Entretanto, a maioria desses métodos não alcançou a sensibilidade requerida nos estudos clínicos a partir de doses reduzidas de morfina.

Diversos solventes têm sido reportados para a extração líquido-líquido da morfina ou do sufentanil do plasma (CONE *et al*., 1983; DAHLSTROM & PAALZOW, 1975; FRYIRS *et al*., 1997; JONES *et al*., 1984; LEIS *et al*., 2000; MEATHERALL *et al*., 2005; WATSON *et al*., 1995; GERGOV *et.al*, 2009; MARTENS-L0BENHOFFER, 2002). Gergov e col. (2009) realizaram a determinação qualitativa de 25 opioides, dentre eles morfina e sufentanil em sangue e urina, pelo método LC-MS/MS utilizando acetato de butila em pH 7 na extração líquido-líquido; neste estudo o objetivo era analisar simultaneamente para fins de “screening” o maior número possível de opióides, sem a realização de estudos de recuperação absoluta e relativa.

Martens-Lobenhoffer (2002) quantificaram o sufentanil no soro após extração liquido-líquido em meio alcalino utilizando mistura de tolueno e isopropanol; entretanto, não somente a especificidade ficou comprometida pelo uso do isopropanol, mas a integridade do detector de massas. Desta forma, para a realização do presente estudo buscou-se outra mistura de solventes para a extração líquido-liquido, previamente a análise por LC/MS/MS.

Assim, com base nas diferentes características físico-químicas das moléculas desses dois analitos, uma vez que a morfina é anfótera e o sufentanil é uma base fraca, testou-se a mistura de éter e diclorometano como solvente de extração com bons resultados na seletividade e na recuperação de ambos os

analitos. Devido ao caráter básico do sufentanil e a anfotericidade da morfina, testou-se a alcalinização do plasma pela adição de hidróxido de sódio 0,01 N. Conforme esperado, houve melhora considerável na recuperação da extração dos dois analitos conferindo sensibilidade com reprodutibilidade na análise simultânea.

Desta forma, no presente estudo optou-se pela técnica de extração líquido-líquido em meio alcalino para purificação do plasma previamente a quantificação do sufentanil e morfina através de LC-MS/MS. Registrou-se ótima linearidade (0,05 a 500 ng/mL para o sufentanil e 10 a 1000 ng/mL para a morfina) e alta recuperação equivalente a 90,64% para o sufentanil, 100,54% para morfina e 93,96% para o padrão interno. Os resultados obtidos no presente estudo mostraram superioridade quando comparados aqueles reportados por Martens-Lobenhoffer (2002); tal fato pode ser justificado em decorrência da menor recuperação, da ordem de 75% para o sufentanil e 74% para o fentanil, empregado como padrão interno.

Além disso, torna-se muito oportuno, a utilização de análise simultânea para quantificação dos dois analitos na mesma amostra de plasma uma vez que no presente estudo os pacientes receberam o sufentanil e a morfina no transoperatório de cirurgia cardíaca. Desta forma, desobriga-se a necessidade de grandes volumes de plasma requerido por ensaio devido ao número de amostras de sangue previsto na coleta seriada para monitoramento das concentrações e estudo farmacocinético.

Em relação ao padrão interno, reportaram-se para a quantificação de sufentanil, o análogo fentanil (MARTENS-LOBENHOFFER, 2002; PALLESCHI *et al*., 2003), o sufentanil deuterado (SCHMIDT *et al*., 2006) e o alfentanil (WOSTENBORGHS *et al*., 1981).

Com relação à análise cromatográfica, a escolha da coluna e da fase móvel é fundamental. Em estudos anteriores avaliou-se a influência da constituição da fase móvel na ionização da morfina pela utilização de solventes orgânicos, metanol e acetonitrila. Reportou-se então que a ionização da morfina aumentava gradualmente com o aumento da proporção do solvente orgânico na fase móvel; tal verificação foi baseada nas alterações da viscosidade, condutividade e tensão superficial que por sua vez facilitariam o *spraying*, *droplet* e formação do íon (TANG & KERBALE, 1991; TANG & KERBALE, 1993; ZHOU & HAMBURGER, 1995). Apesar do efeito de ambos solventes serem semelhantes, a acetonitrila apresentou um ganho em termos de ionização para a morfina comparada ao metanol (DAMS *et al*.., 2002).

Desta forma, inúmeras misturas foram reportadas para a fase móvel contendo acetonitrila em associação a outros constituintes tais como as misturas de água, acetonitrila e ácido trifluoroacético 0,02% em sistema de gradiente de eluição (MARTENS-LOBENHOFFER, 2002; PALLESCHI *et. al*., 2003) ou acetonitrila, ácido fórmico e tampão acetato de amônio (SCHIMIDT *et. al*., 2006; GERGOV *et al*.,2009).

Reportou-se diferença no grau de ionização da morfina pela adição de ácidos voláteis e meios tamponados. Assim, a adição de ácido fórmico ou de acético na fase móvel resulta em decréscimo máximo da ordem de 70% na ionização da morfina enquanto que a adição de tampões resulta num decréscimo máximo de 90%. O efeito de supressão de sinal provocado pelos ácidos voláteis parece ser mais lento que aquele que ocorre na presença de tampões (DAMS *et al*., 2002; DAMS *et al*.., 2002). Porém, a presença expressiva de solventes orgânicos na fase móvel tem como conseqüência duas grandes desvantagens, o elevado custo especialmente no caso da acetonitrila, e a necessidade de tratamento dos resíduos.

Com base no exposto, no presente estudo buscou-se a otimização da fase móvel destinada a quantificação de opióides, pela escolha do solvente orgânico principal, do tampão e pela adição de ácido fórmico por ser mais volátil, não apresentando a desvantagem de cristalização na tubulação do sistema de espectrometria de massas. Além disso, a proporção das fases aquosa e orgânica foi investigada, selecionando-se aquela pela simetria cromatográfica, linha de base estável, relação sinal/ruído LQ superior a 1/5 e um ótimo sinal analítico em virtude da ionização promovida aos analitos de interesse. Outro fator de relevância considerado foi a grandeza da velocidade de fluxo escolhida com base nos critérios de menor tempo de corrida sem afetar a sensibilidade e reprodutibilidade analíticas. Desta forma, utilizaram-se as condições cromatográficas selecionadas por apresentarem rápida eluição dos analitos sem a presença de co-eluentes ou componentes endógenos.

No presente estudo, optou-se pelo uso da fase reversa, neste sistema, os componentes mais polares da mistura são eluídos antes dos componentes menos polares. Relativamente à escolha da coluna analítica, optou-se pela utilização de fase estacionária octadecil (C_{18}), também denominada de ODS (octadecilsilano) largamente reportada anteriormente (MARTENS-LOBENHOFFER, 2002; PALLESCHI *et al.,* 2003; GERGOV *et al*., 2009). Esta fase estacionária é bidentada (preparadas a partir de silanos bidentados formados por dois átomos de silício

interligados entre si por um grupo etila ou propila) e estável na faixa de pH de 2 a 11,5, uma vez que o acesso aos grupos silanois é reduzido. Além disso, esta fase estacionária possui maior número de carbonos, possibilitando maior número de interações entre fase estacionária, analito e fase móvel obtendo-se boa resolução e seletividade, proporcionando uma separação adequada do analito de interesse dos demais componentes da mistura.

Na otimização de métodos bioanalíticos, procura-se rapidez na corrida e efetividade dos resultados. Assim sendo, considerando-se o tempo de corrida pela análise de uma amostra, garantida a resolução e seletividade, tem-se a opção de substituir a coluna C_{18} pela coluna C_8 de menor número de interações com o analito e com o solvente. Entretanto, no caso do sufentanil e da morfina a escolha foi pela coluna C_{18}. A utilização da espectroscopia de massa possibilita a opção de se empregar colunas com comprimentos reduzidos (5 cm) como a escolhida para a realização do presente estudo com a vantagem da redução do tempo de corrida garantindo-se a resolução e a seletividade.

Em termos de detecção, conforme mencionado anteriormente, visando boa sensibilidade e ampla faixa de linearidade de resposta, desenvolveu-se e validou-se o método bioanalítico de análise simultânea de sufentanil e morfina por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas em função das reduzidas concentrações plasmáticas para os analitos. Diante disso, técnicas convencionais cromatográficas com detecção por ultravioleta e fluorescência são insuficientes para a detecção dos LQ's de 0,05 e 1 ng/mL requeridos para sufentanil e para a morfina. Assim, utilizou-se a detecção por espectrometria de massas proporcionando maior sensibilidade e seletividade analítica exigidas pelo estudo proposto em volume reduzido de amostra biológica.

O método LC-MS/MS proposto é boa alternativa para quantificação de sufentanil e morfina em plasma humano uma vez que a extração líquido-líquido garante ótima recuperação destes fármacos. Através dos resultados da validação registrou-se boa precisão e exatidão na faixa de linearidade proposta (0,05 – 500 ng/mL para o sufentanil e 1 – 1000 ng/mL para morfina).

Atualmente nas grandes cirurgias (tórax e abdômen superior) onde a manipulação é extensa e os procedimentos altamente invasivos. O uso do sufentanil é terapia de primeira linha em anestesia e na estabilidade hemodinâmica do paciente no intra-operatório, enquanto que a morfina é o analgésico de escolha no

pós-operatório; conseqüentemente, a quantificação simultânea destes opióides é aplicável ao estudo proposto de farmacocinética.

5. CONCLUSÃO

Com base nos parâmetros linearidade, sensibilidade, precisão e exatidão, estabilidade e robustez o método bioanalítico desenvolvido e validado utilizando à cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massa (LC/MS-MS) foi considerado adequado para a quantificação simultânea de sufentanil e de morfina em plasma humano.

Capítulo II - MONITORAMENTO DAS CONCENTRAÇÕES PLASMÁTICAS DO SUFENTANIL APÓS ADMINISTRAÇÃO INTRA-VENOSA NO INTRA-OPERATÓRIO DE CIRURGIA CARDÍACA

1. OBJETIVO

Realizar o monitoramento do sufentanil no intra e pós-operatório de cirurgia cardíaca com e sem circulação extracorpórea comparando-se estes dois grupos de pacientes.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Etapa Clínica

Considerações Éticas

O Protocolo de Pesquisa e o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido foram aprovados pela Comissão Científica do Instituto do Coração e pelos Comitês de Ética em Pesquisa das Unidades da Universidade de São Paulo envolvidas no presente estudo (InCor-HCFMUSP – Mem CC.905/02 e CAPPesq/FMUSP – Mem C.C.0275 de 04/03/04).

Critérios de Elegibilidade dos Pacientes

Foram selecionados pacientes portadores de insuficiência coronária crônica e candidatos à cirurgia eletiva de revascularização do miocárdio com ou sem circulação extracorpórea, internados na enfermaria clínica do Instituto do Coração do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, os quais satisfizeram os critérios de elegibilidade descritos a seguir.

Critérios de Inclusão

a) Pacientes de ambos os sexos submetidos à cirurgia de revascularização do miocárdio com ou sem circulação extracorpórea com indicação do uso de morfina através de administração intratecal durante o procedimento cirúrgico e ACP (analgesia controlada pelo paciente) no pós-operatório tardio, em adição ao protocolo cirúrgico padronizado na instituição (na sequência item 2.2.);

b) Idade entre 18 e 80 anos;

c) Pacientes com função renal dentro dos limites da normalidade ou portadores de insuficiência renal leve em função da idade e da doença de base, avaliada através do *clearance* de creatinina estimado pelo nomograma de Cockcroft e Gault (COCKCROFT; GAULT, 1976);

d) Pacientes com funções hepática e endócrina dentro dos limites da normalidade, avaliados através do perfil bioquímico de sangue e urina e perfil hematológico;

e) Capacidade de ler, entender e fornecer o Consentimento Informado Livre e Esclarecido.

Critérios de Exclusão

a) Contra-indicação para realização de bloqueios locorregionais, incluindo história de coagulopatia prévia, uso de heparina de baixo peso molecular, warfarina, trombolítico ou potentes antiagregantes plaquetários (exceto AAS no pré-operatório);

b) Pacientes com fração de ejeção de ventrículo esquerdo inferior a 40%, avaliada através de ecocardiograma;

c) Pacientes com infecção sistêmica ou no local da punção;

d) Pacientes submetidos a procedimentos cirúrgicos combinados, tais como valvares, de carótida e ressecção de aneurisma;

e) Pacientes com quaisquer contra-indicações para o uso dos medicamentos empregados neste estudo.

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Após definição da indicação cirúrgica, os pacientes foram convidados a participar do presente estudo. Após o processo de consentimento informado, e esclarecimento de todas as dúvidas do paciente ou de seu representante legal, em havendo interesse de participação do estudo, o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido previamente aprovado pelos Comitês de Ética em Pesquisa das Instituições envolvidas no presente estudo (InCor/HCFMUSP e CAPPesq/HCFMUSP), foi assinado e datado pelo paciente ou seu representante legal e pelo investigador clínico.

Seleção de Pacientes

A etapa de seleção de pacientes incluiu a realização de exames laboratoriais, de imagem e a avaliação do risco cirúrgico do pré-operatório.

Exames Laboratoriais

Coagulograma

O coagulograma de cada paciente foi avaliado ao longo do tempo (TP) e atividade de protrombina (AP – valor de normalidade acima de 70%).

Avaliação da Função Renal

A função renal foi avaliada por meio da determinação de uréia sérica (U – valor de normalidade entre 10 e 50 mg/dl) e creatinina sérica (Cr – valor de normalidade entre 0,6 e 1,4 mg/dl). O *clearance* de creatinina (mL/min) foi estimado através do método de PROUGH (PROUGH & FOREMAN, 1989), abaixo descrito, sendo o valor de normalidade para homens de 85 a 125 mL/min e para mulheres, 75 a 115 mL/min.

$$\textbf{\textit{Clearance} estimado} = \frac{\textbf{(140 – idade) x Peso (Kg)}}{\textbf{72 x Cr (mg/dL)}}$$

Colesterol Total e Frações e Triglicérides

Foram também avaliados no pré-operatório os níveis séricos de triglicérides, colesterol total e as frações LDL e HDL, considerando-se os seguintes valores de normalidade laboratoriais (em mg/dL):

Quadro 08 – Valores de normalidade laboratorias (em mg/dL)

	Ótimo	**Limítrofe**	**Alto**	**Muito alto**
Triglicérides	< 150 mg/dl	150-200	200-499	>500
Colesterol	< 200 mg/dl	200-239	>240	
LDL	< 100 mg/dl (100 – 129)	130 - 159	160-189	>190
HDL	< 40 mg/dl		> 60	

Função Hepática

A função hepática foi avaliada através da determinação de TGO, TGP e Gama GT. Foram incluídos os pacientes com valores laboratoriais inferiores a duas vezes o limite superior de normalidade do laboratório.

Função Endócrina

A função endócrina foi avaliada pela determinação da glicemia.

Casuística

O estudo final e a análise de dados referem-se a inclusão prospectiva de quarenta e dois (42) pacientes de ambos os sexos (33 homens e 9 mulheres), com idade entre 41 e 78 anos, submetidos a revascularização do miocárdio com ou sem circulação extracorpórea que receberam infusão contínua de sufentanil e morfina intratecal no intra-operatório (IOP), seguido de morfina ACP no pós-operatório (PO).

Os pacientes foram distribuídos em dois grupos em função da utilização do procedimento de circulação extracorpórea (CEC) durante a cirurgia cardíaca. No **Grupo com CEC** foram incluídos trinta (30) pacientes submetidos à anestesia geral e utilização de circulação extracorpórea. O **Grupo sem CEC** foi constituído por doze (12) pacientes submetidos aos mesmos procedimentos cirúrgicos e anestésicos acima mencionados, no entanto sem a utilização do procedimento de circulação extracorpórea durante a cirurgia cardíaca. Segue abaixo a distribuição de pacientes em cada grupo, descritos por número de alocação no estudo.

- **Grupo com CEC:** Trinta pacientes submetidos à anestesia geral com CEC conforme seguem os números de alocação: #01, #02, #03, #05, #07, #08, #09, #10, #13, #16, #17, #20, #21, #22, #23, #24, #25, #27, #28, #29, #31, #32, #33, #34, #35, #37, #39, #42, #46, #47.
- **Grupo sem CEC:** Doze pacientes submetidos a anestesia geral + morfina intratecal sem CEC conforme seguem os números de alocação: #04, #06, #11, #12, #14, #15, #18, #19, #26, #30, #38 e #44.

Foram registrados os dados antropométricos, demográficos e cirúrgicos de cada paciente, incluindo sexo, idade, peso, altura e IMC. Os dados antropométricos dos pacientes avaliados neste estudo estão resumidos no Quadro 09.

Quadro 09. Dados antropométricos e demográficos dos pacientes avaliados no estudo, n=42.

Nº Alocação	Grupo	Iniciais	Sexo	Idade (anos)	Peso (Kg)	Altura (m)	IMC (Kg/m^2)
# 01	1 - com CEC	JPL	M	43	66,6	1,56	27,37
# 02	1 - com CEC	SDC	F	60	59,0	1,55	24,56
# 03	1 - com CEC	FAR	M	59	67,0	1,65	24,61
# 05	1 - com CEC	VAM	M	56	75,0	1,65	27,55
# 07	1 - com CEC	RAD	M	62	75,0	1,65	27,55
# 08	1 - com CEC	APC	M	50	65,0	1,60	25,39
# 09	1 - com CEC	M-F	M	55	85,0	1,75	27,76
# 10	1 - com CEC	D-G	M	66	72,0	1,72	24,34
# 13	1 - com CEC	LVJ	M	65	68,0	1,68	24,09
# 16	1 - com CEC	FPS	M	65	63.3	1,56	26,01
# 17	1 - com CEC	VPF	F	78	52,7	1,52	22,81
# 20	1 - com CEC	VNC	M	63	53,0	1,56	21,78
# 21	1 - com CEC	JSG	M	53	95,5	1,75	31,18
# 22	1 - com CEC	SVG	M	64	63,0	1,62	24,01
# 23	1 - com CEC	J-M	M	64	73,5	1,79	22,94
# 24	1 - com CEC	ACB	M	51	71,0	1,55	29,55
# 25	1 - com CEC	MBA	M	71	61,1	1,64	22,72
# 27	1 - com CEC	GMK	M	57	83,5	1,65	30,67
# 28	1 - com CEC	W-N	M	77	63,0	1,55	26,22
# 29	1 - com CEC	LAJ	M	71	80,0	1,70	27,68
# 31	1 - com CEC	G-B	M	61	82,0	1,87	23,45
# 32	1 - com CEC	A-M	M	56	65,0	1,65	23,88
# 33	1 - com CEC	NCM	F	70	69,6	1,61	26,85
# 34	1 - com CEC	AJS	M	58	76,0	1,67	27,25
# 35	1 - com CEC	EAS	M	61	50,6	1,67	18,14
# 37	1 - com CEC	LES	M	58	99,5	1,75	32,49
# 39	1 - com CEC	AJS	M	67	59,0	1,57	23,94
# 42	1 - com CEC	ASS	M	60	56,0	1,52	24,24
# 46	1 - com CEC	J-R	M	77	57,0	1,69	19,96
# 47	1 - com CEC	JBA	F	49	48,0	1,62	18,29
# 04	2- sem CEC	E-B	F	41	48,0	1,50	21,33

# 06	2- sem CEC	O-S	F	67	78,0	1,70	26,99
# 11	2- sem CEC	MLA	M	63	88,0	1,72	29,75
# 12	2- sem CEC	GAT	M	77	75,0	1,69	26,26
# 14	2- sem CEC	EMS	F	64	72,0	1,56	29,59
# 15	2- sem CEC	A-F	M	76	67,6	1,64	25,13
# 18	2- sem CEC	J-L	M	66	61,1	1,60	23,87
# 19	2- sem CEC	MVS	F	67	61,2	1,60	23,91
# 26	2- sem CEC	E-B	M	69	78,8	1,64	29,30
# 30	2- sem CEC	M-S	M	64	69,1	1,61	26,66
# 38	2- sem CEC	JMG	F	51	54,0	1,50	24,00
# 44	2- sem CEC	JFS	M	72	76,0	1,66	27,58

2.2. Protocolo Cirúrgico

Pré-Operatório

No pré-operatório, os pacientes receberam como medicação pré-anestésica midazolam na dose de 0,1 a 0,2 $mg.Kg^{-1}$ por via oral 30 minutos antes da operação, até a dose máxima de 15 mg. Ao serem admitidos na sala de cirurgia, foram monitorizados com oximetria de pulso e eletrocardiografia contínua com cinco derivações e análise contínua das derivações DII e V5 e do segmento ST. O acesso venoso foi realizado em membro superior com cateter 14 ou 16. A monitorização invasiva da pressão arterial foi realizada através de punção da artéria radial com cateter número 20.

Intra-Operatório

Após a pré-oxigenação, a indução da anestesia foi realizada com sufentanil i.v., na dose de 0,50 $\mu g.Kg^{-1}$, etomidato na dose de 0,2 a 0,3 $mg.Kg^{-1}$, seguido de relaxamento muscular com brometo de pancurônio, dose de 0,1 a 0,2 $mg.Kg^{-1}$. Foi aplicada ventilação manual sob máscara e intubação orotraqueal com tubo de diâmetro adequado, instalando-se a seguir ventilação controlada mecânica (CICERO EM, Dräger, Alemanha) com volume corrente de 8 a 10 $mL.Kg^{-1}$, freqüência respiratória de 12 inspirações por minuto, relação I:E=1:2 e FiO_2= 0,6 (oxigênio e ar comprimido). Após intubação orotraqueal, iniciou-se a monitorização do $ETCO_2$. A manutenção da anestesia foi realizada com infusão contínua de sufentanil i.v. na dose de 0,50 $\mu g/Kg/h$, associado à isoflurano por via inalatória em concentrações de

0,4 a 0,5% para manutenção da hipnose e relaxamento muscular com doses fracionadas de brometo de pancurônio. Adicionalmente, foi administrada morfina intratecal na dose máxima de 400 μg. A hipnose foi mantida neste período com propofol em infusão contínua alvo controlada com concentração alvo de 2,5 μg/mL.

Após a indução da anestesia procedeu-se à colocação de sensor de temperatura em nasofaringe e a sondagem vesical. A complementação da monitorização hemodinâmica foi realizada por meio da introdução de cateter de duplo lúmen ou cateter de Swan-Ganz, conforme a indicação do caso, através de punção em veia jugular interna direita.

A antibioticoprofilaxia foi realizada com três doses de cefuroxima (1,5 g 12/12 horas no início da cirurgia, início do pós-operatório imediato e no 1º dia do pós-operatório tardio). Todos os pacientes receberam difenidramina na dose de 25 mg, ranitidina na dose de 50 mg e metilpredinisolona 1g após a indução da anestesia geral.

Foram colhidas glicemias capilares no trans-operatório com aparelho DEXTROSTIX® (BAYER DIAGNOSTICOS SA, São Paulo, Brasil), em três momentos: na indução, antes da entrada em CEC e após a saída de CEC. Em caso de hiperglicemia, esta foi tratada com insulina regular de acordo com o seguinte protocolo: 200–250mg%: 5 UI; 251-300mg%: 10 UI e acima de 300mg%: 15 UI.

Também foram colhidas gasometrias arteriais no pré-operatório, após acesso arterial, após a indução da anestesia, ao final da cirurgia, no pós-operatório imediato (POI), no primeiro dia pós-operatório (1°PO) e no segundo dia pós-operatório (2°PO) para avaliação da relação PaO_2/FiO_2.

A infusão de sufentanil foi suspensa no momento do término da sutura da pele, sendo então instalada bomba de infusão intravenosa de morfina controlada pelo paciente (ACP).

Pós-Operatório

Ao término da CEC reduziu-se a infusão de propofol até a obtenção de níveis plasmáticos ao redor de 1 µg/mL, para manutenção da sedação até a indicação de extubação traqueal. A extubação foi realizada quando os pacientes

atingiram todos os critérios, a seguir descritos: paciente responsivo ao comando verbal, saturação periférica maior que 94% em FIO_2 equivalente a 40%, freqüência respiratória inferior a 20 ipm, pH sanguíneo superior a 7.3, temperatura superior a 36ºC, drenagem inferior a 100 mL/h e com estabilidade hemodinâmica, ou seja, sem necessidade de grande suporte inotrópico e sem arritmias incontroláveis.

Os parâmetros monitorados no período pós-operatório encontram-se descritos na Seção 2.2.1.(Variáveis).

Coleta de amostras sanguíneas para o monitoramento de sufentanil em plasma de pacientes no intra e pós-operatório

As amostras sanguíneas referentes ao período intra-operatório foram colhidas de cateter arterial nos tempos: basal, 5, 15, 30, 60, 120, 240 minutos e final da cirurgia (sutura da pele). No grupo 1 – com CEC, foram ainda coletadas amostras sanguíneas durante a CEC: antes do início da CEC, 5, 15, 30, 60 minutos e final da CEC. As amostras sanguíneas referentes ao período pós-operatório incluindo-se a extubação, foram colhidas de cateter venoso central nos tempos 5, 15, 30, 60 minutos, 3, 6, 12, 18, 24 e 36 horas. O volume de sangue referente a cada coleta (5 mL) foi transferido para tubo contendo EDTA sódico (BD, São Paulo, SP, Brasil), homogeneizado por inversão três vezes. O sangue foi centrifugado a 3000 rpm durante 30 minutos. O plasma foi transferido para tubos de polietileno devidamente identificados e armazenados em temperatura -20º C até a realização da análise.

A determinação de sufentanil plasmático nas amostras coletadas foi realizada através do método analítico de cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas (LC-MS/MS) previamente descrita no **Capítulo I**.

2.3. Etapa Estatística

Variáveis

Variáveis Independentes

A Circulação Extracorpórea foi a variável independente do presente estudo.

Variáveis Dependentes

A influência da variável independente foi avaliada nas seguintes variáveis dependentes: concentrações plasmáticas de sufentanil no intra e pós-operatório.

Monitoramento de sufentanil plasmático no Intra e Pós-Operatório

As concentrações plasmáticas de sufentanil foram obtidas nos tempos 0, 5, 15, 30, 60, 120, 240 minutos e final no intra-operatório, 0, 5, 15, 30, 60 minutos e final durante a CEC e 0, 5, 15, 30, 60 minutos, 3, 6, 12, 18, 24 e 36 horas após o término da cirurgia.

Variáveis de Homogeneidade

A homogeneidade foi avaliada através da comparação intergrupos quanto à idade, peso, IMC e sexo.

Métodos Estatísticos

As análises estatísticas foram realizadas através da utilização dos softwares *Microsoft Excel 2002* (Microsoft Corporation, USA) e *GraphPad Prism for Windows versão 5.0* (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA).

Foi realizado o teste de Kolmogorov-Smirnov para os dados antropométricos e de concentração plasmática dos dois grupos, para verificar se os dados seguem a distribuição gaussiana. Os dados antropométricos (idade, peso, altura e IMC) apresentaram distribuição gaussiana, logo, foram comparados utilizando-se de teste paramétrico t de Student não pareado *(two-tailed distribution, two-sample equal variance)*. Quanto ao parâmetro gênero, variável qualitativa, os dois grupos foram comparados utilizando o teste de Qui-quadrado. Os dados de concentração plasmática não apresentaram distribuição gaussiana, portanto foi utilizado o teste não paramétrico de Friedman (varias variáveis – Anova não paramétrica). Uma vez observada diferença significativa entre os grupos aplicou-se o teste *post-hoc* de Dunn's para avaliação dos dados referente ao grupo submetido a CEC. Já para o grupo sem CEC utilizou-se o teste não paramétrico de Wilcoxon (variáveis dependentes). Por fim, a comparação entre os grupos (submetido a CEC *versus* sem CEC) foi realizada pelo teste não paramétrico de Mann Whitney (grupos

independentes). Para todos os testes foram considerados o nível de significância de 5% (p<0,05).

3. RESULTADOS

Casuística

Os dados referentes ao sexo, às médias e desvios-padrão dos parâmetros idade, peso, altura e índice de massa corpórea dos pacientes avaliados nos grupos Com CEC e Sem CEC, bem como a comparação estatística entre os grupos encontram-se na Tabela 8; o tempo total de cirurgia e hematócrito basal e final encontram-se na Tabela 9.

Tabela 8. Comparação estatística dos pacientes avaliados nos grupos com CEC versus sem CEC

	Grupo 1 com CEC	Grupo 2 sem CEC	Teste Estatístico (p)
N	**30**	**12**	
Sexo*			**Qui-Quadrado**
Masculino	**26**	**7**	**0,11**
Feminino	**4**	**5**	
Idade (anos)*			**teste T Student**
Média (± DP)	**61,50 (8,44)**	**64,75 (10,07)**	**0,30**
Mediana	**61,00**	**66,50**	
Peso (Kg)*			**teste T Student**
Média (± DP)	**68,50 (12,54)**	**69,07 (11,37)**	**0,89**
Mediana	**66,80**	**70,55**	
Altura (m)*			**teste T Student**
Média (± DP)	**1,64 (0,08)**	**1,62 (0,07)**	**0,36**
Mediana	**1,65**	**1,63**	
IMC (Kg/m²)*			**teste T Student**
Média (± DP)	**25,24 (3,42)**	**26,20 (2,64)**	**0,39**
Mediana	**24,59**	**26,46**	
Dose Total de Sufentanil Infundida			**teste T Student**
Média (± DP)	**3,23 (0,67)**	**3,53(0,90)**	**0,38**

Significância estatística, p<0,05; teste T Student, variância não equivalente, dados não pareados.
*Não houve diferença significativa (p<0,05) entre os grupos.

Na Tabela 9, são apresentadas as estatísticas descritivas do tempo total de cirurgia em minutos, assim como dos valores basal e final de hematócrito.

Tabela 9. Tempo de cirurgia e valores de hematócrito (n = 42)

	Grupo 1	Grupo 2	Valor de P
Tempo da Cirurgia (min)			**Mann Whitney**
Mediana	387,5	357,5	0,9424
(mínimo-máximo)	(240 - 630)	(210 - 750)	
Hematócrito Basal			**Mann Whitney**
Mediana	40	40	0,5962
(mínimo-máximo)	(31 - 49)	(31 -46)	
Hematócrito Final			**Mann Whitney**
Mediana	30	32	0,2389
(mínimo-máximo)	(23 - 36)	(27 - 34)	

Significância estatística, p<0,05; *Não houve diferença significativa (p<0,05) entre os grupos.

Monitoramento da Concentração plasmática de sufentanil

Os dados descritivos da concentração plasmática de sufentanil do pré ao pós operatório de pacientes submetidos à cirurgia cardíaca, dos grupos com CEC e sem CEC encontram-se respectivamente nas tabelas 10 e 11. Os perfis médios dos dois grupos encontram-se nas figuras 8 a 11.

Tabela 10 - Concentração plasmática (ng/mL) do pré ao pós operatório referente ao medicamento –Sufentanil administrado a pacientes submetidos a cirurgia cardíaca com circulação extra corpórea (CEC).

Tempos	Mínimo	Máximo	Média	Mediana	Desvio Padrão
5 min	0,08	2,83	1,02	0,90	0,60
15 min	0,18	5,87	0,82	0,63	1,00
30 min	0,24	2,55	0,78	0,64	0,48
60 min	0,32	5,45	0,78	0,57	0,93
120 min	0,29	1,10	0,51	0,48	0,19
Antes da CEC	0,24	6,29	0,77	0,49	1,10
5 min	0,00	8,87	1,22	0,75	1,69
15 min	0,00	4,83	0,94	0,74	0,90
30 min	0,00	4,76	0,90	0,67	0,86
60 min	0,00	2,32	0,75	0,69	0,48
240 min	0,00	2,11	0,73	0,70	0,40

Final da CEC	0,28	7,23	1,02	0,57	1,36
Final cirurgia	0,22	4,01	0,59	0,37	0,72
5 min	0,21	2,85	0,50	0,34	0,50
15 min	0,19	1,49	0,43	0,31	0,32
30 min	0,17	1,14	0,32	0,25	0,20
60 min	0,14	1,34	0,38	0,26	0,31
3 horas	0,08	1,25	0,29	0,22	0,25
6 horas	0,09	0,79	0,21	0,18	0,16
12 horas	0,05	1,09	0,22	0,15	0,24
18 horas	0,06	1,38	0,19	0,12	0,24
24 horas	0,00	0,94	0,16	0,11	0,16
36 horas	0,00	0,52	0,12	0,10	0,11

Tabela 11 - Concentração plasmática (ng/mL) do pré ao pós operatório referente ao medicamento –Sufentanil administrado a pacientes submetidos a cirurgia cardíaca sem circulação extra corpórea (CEC).

Tempos	Mínimo	Máximo	Média	Mediana	Desvio Padrão
5 min	0,05	4,88	1,28	0,99	1,22
15 min	0,00	2,11	0,80	0,72	0,52
30 min	0,34	2,31	0,82	0,65	0,53
60 min	0,33	1,31	0,63	0,54	0,28
120 min	0,27	1,13	0,63	0,58	0,23
240 min	0,31	1,75	0,68	0,58	0,38
Final cirurgia	0,38	1,52	0,75	0,70	0,34
5 min	0,27	0,70	0,46	0,43	0,15
15 min	0,26	0,85	0,51	0,51	0,21
30 min	0,20	1,73	0,53	0,36	0,43
60 min	0,18	0,89	0,42	0,35	0,21
3 horas	0,11	0,61	0,31	0,28	0,16
6 horas	0,09	0,48	0,25	0,25	0,13
12 horas	0,05	0,69	0,24	0,15	0,20
18 horas	0,06	0,38	0,16	0,15	0,09
24 horas	0,07	0,51	0,21	0,18	0,14
36 horas	0,06	0,53	0,21	0,17	0,17

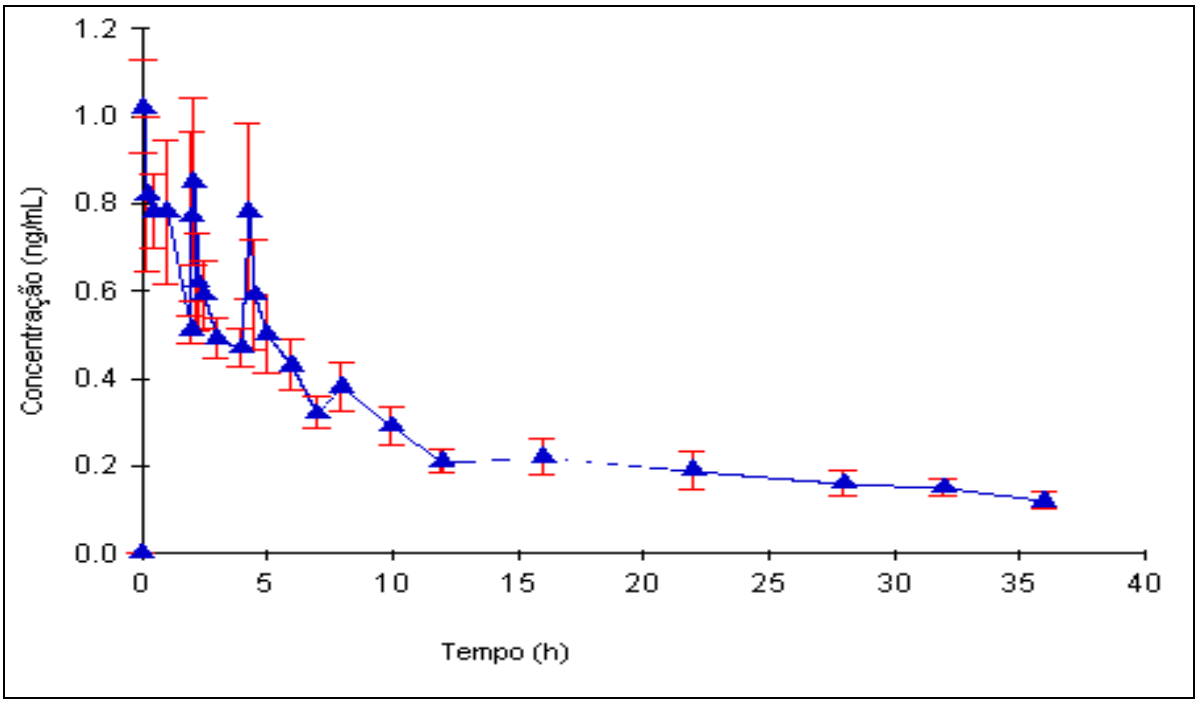

Figura 8 – Média das concentrações plasmáticas de sufentanil do pré ao pós operatório de pacientes submetidos a cirurgia cardíaca com CEC.

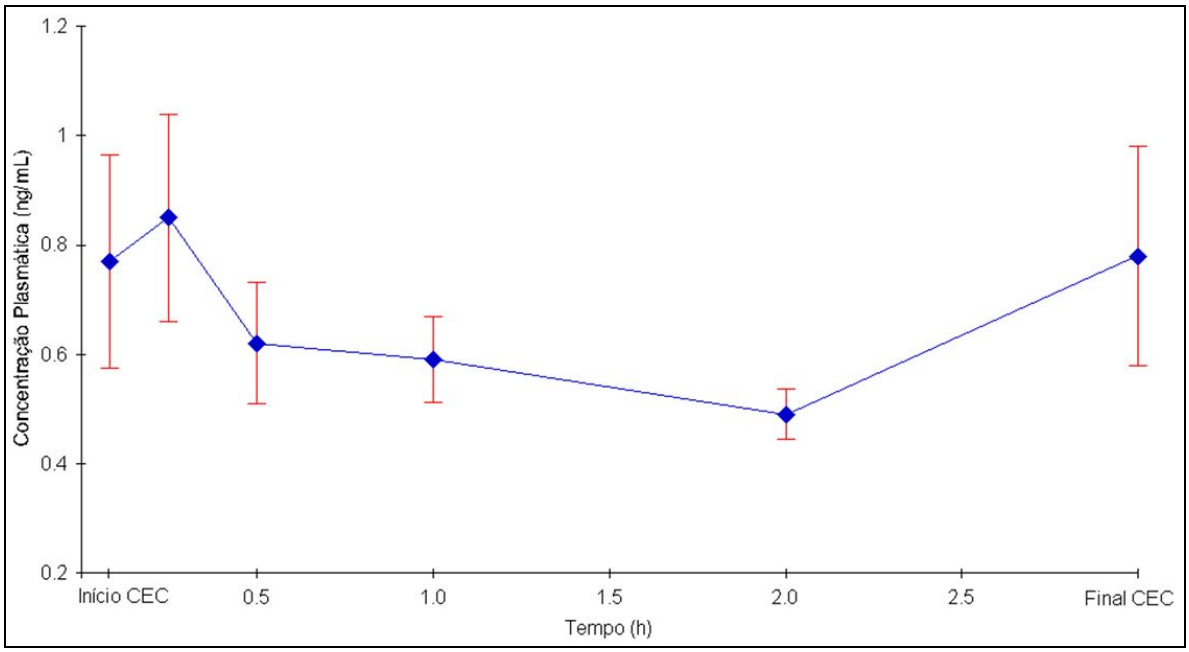

Figura 9 – Média das concentrações plasmáticas de sufentanil durante a CEC em pacientes submetidos à cirurgia cardíaca.

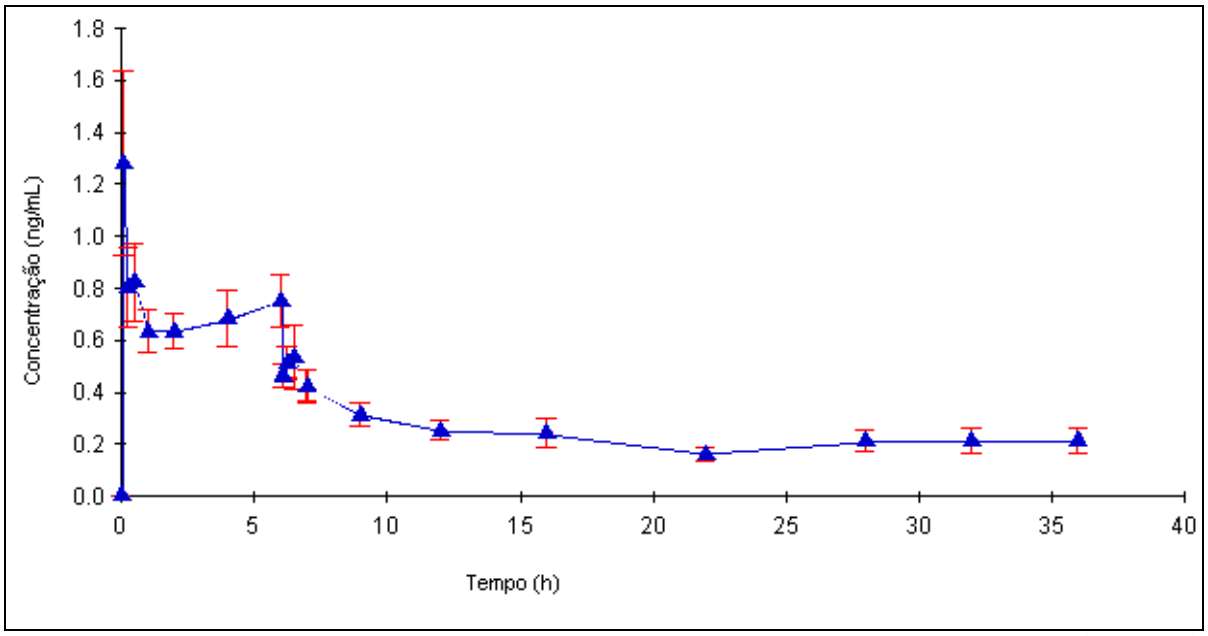

Figura 10 – Média das concentrações plasmáticas de sufentanil do pré ao pós operatório de pacientes submetidos a cirurgia cardíaca sem CEC.

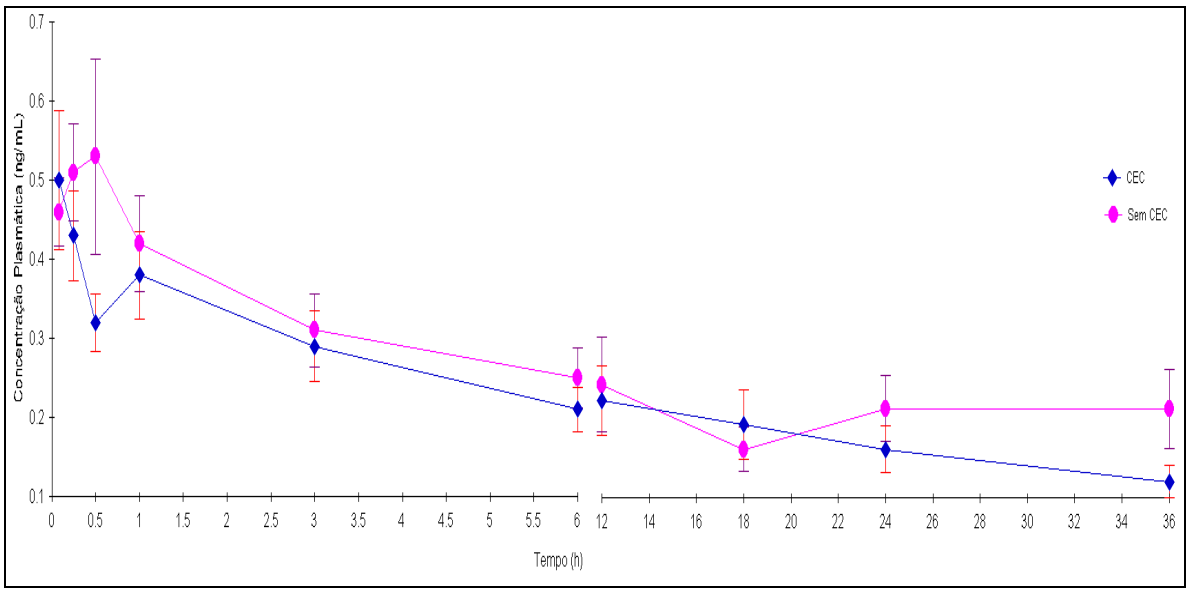

Figura 11 – Média das concentrações plasmáticas de sufentanil do transoperatório de pacientes submetidos a cirurgia cardíaca com e sem CEC.

Avaliação Estatística

Os resultados descritivos da comparação entre as concentrações plasmáticas de sufentanil no intra operatório obtidas nos grupos com CEC encontram-se na tabela 05.

Tabela 12 – Teste de Dunn's referente as concentrações plasmáticas de sufentanil Sufentanil administrado a pacientes submetidos a cirurgia cardíaca com circulação extra corpórea (CEC).

Comparação Múltipla - Tesde de Dunn´s		
Grupos	**Valor P**	
Início da cirurgia X início da CEC	P > 0,05	ns
Início da cirurgia X final da CEC	P < 0,05	**
Início da cirurgia X final da cirurgia	P < 0,05	**
Início da CEC X final da CEC	P > 0,05	ns
Início da CEC X final da cirurgia	P < 0,05	**
Final da CEC X final da cirurgia	P < 0,05	**

** diferença significativa ns – diferença não significativa

Tabela 13 – Teste de Wilcoxon referente as concentrações plasmáticas de sufentanil administrado a pacientes submetidos a cirurgia cardíaca sem circulação extra corpórea (CEC).

Teste de Wilcoxon		
Grupos	**Valor P**	
Início da cirurgia X final da cirurgia	P > 0,05	ns

ns – diferença não significativa

Tabela 14 – Teste de Mann Whitney referente às concentrações plasmáticas de sufentanil administrado a pacientes submetidos a cirurgia cardíaca com e sem circulação extra corpórea (CEC).

Teste de Mann Whitney		
Grupos 1x2	**Valor P**	
Início da cirurgia	P > 0,05	ns
Final da cirurgia	P > 0,05	ns

ns – diferença não significativa

4. DISCUSSÃO

O emprego de CEC nas cirurgias de revascularização do miocárdio é descrito há décadas (desde 1950), foi amplamente estudado e ainda é objeto de discussão. O arsenal terapêutico utilizado em tais procedimentos, suas interações e complexos fenômenos biológicos envolvidos ainda carecem de avaliação.

O sufentanil, frequentemente utilizado em cirurgias cardíacas, é recomendado sobretudo em virtude da sua potência analgésica, 1.000 vezes superior a morfina, meia-vida de eliminação mais rápida e estabilidade

hemodinâmica superior, uma vez que provoca, em menor intensidade a liberação de histamina, quando comparado com a morfina (HARDMAN *et al.,* 2006).

As doses totais médias de sufentanil administradas ao grupo com CEC e ao grupo sem CEC foram semelhantes, 3,23 ±0,67µg/kg e 3,53 ±0,90µg/kg respectivamente. O sufentanil foi administrado inicialmente *in bolus*, 0,5 µg/kg e após a indução, através de infusão contínua na dose de 0,5 µg/kg/h. Não foi observada diferença significativa entre o tempo total de cirurgia e os valores basal e final de hematócrito entre os grupos com CEC e sem CEC. Destaca-se que o período médio de duração da CEC foi de 99 minutos (mínimo 54 e máximo 213 minutos). Em termos de hemodiluição, apesar de não haver diferença significativa entre os grupos, os valores de hematócrito final do grupo com CEC são inferiores ao grupo sem CEC.

As concentrações plasmáticas obtidas para o grupo com CEC foram não consideradas estatisticamente diferentes das obtidas no grupo sem CEC, conforme apresentado na tabela 14. No entanto, no período intra-operatório, o grupo sem CEC apresentou concentrações médias superiores as do grupo com CEC, exceto durante o período de circulação extra-corpórea, onde se observou elevação do nível plasmático, que será discutido posteriormente.

No grupo com CEC, observa-se que a curva média das concentrações plasmáticas é afetada pela variabilidade inter-individual expressa através da observação de valores extremos de concentração, especialmente pronunciado durante a CEC.

No grupo de pacientes sem CEC a curva média das concentrações plasmáticas aproxima-se da mediana. Apesar do grupo ser composto por um tamanho da amostra menor, neste estudo, o desvio padrão médio das concentrações plasmáticas observado foi de 0,29 enquanto que no grupo com CEC o desvio padrão médio foi 0,53, o que caracteriza alta variabilidade.

Em ambos os grupos, logo após o pico de concentração obtido com a administração do *bolus*, ocorre um decaimento na concentração plasmática do sufentanil. No grupo com CEC este decaimento é observado até 120 minutos de cirurgia enquanto que no grupo sem CEC, o último ponto correspondente a este declínio é observado em 60 minutos de cirurgia.

Posterior ao período 120 minutos no grupo com CEC e 60 minutos no grupo sem CEC ocorreu o clampeamento das artérias e veias do paciente prejudicando a

livre distribuição da droga. Neste período, uma elevação na concentração plasmática de sufentanil é observada em ambos os grupos. No grupo sem CEC a concentração média (assim como a mediana) segue aumentando até o término do procedimento cirúrgico para que então possa iniciar a curva de decaimento plasmático. Este fato é fundamentado novamente pelo procedimento, neste período, de desclampeamento das artérias e veias, liberando a livre circulação do fármaco.

Já no grupo com CEC, durante a mesma, observa-se grande oscilação na curva média das concentrações plasmáticas com leve tendência ao acúmulo, assim como o observado por Flezzani e colaboradores (1987).

Flezzani e colaboradores (1987) utilizaram dados farmacocineticos prévios de Bovill (1984) a fim de avaliar a habilidade de uma bomba de infusão contínua computadorizada, do tipo CACI, de manter estáveis os níveis plasmáticos de sufentanil, a partir de dados farmacocinéticos deste fármaco obtidos em pacientes durante a CEC de 10 pacientes cirúrgicos. Estes pacientes receberam lorazepam e morfina e foram anestesiados com diazepam, enflurano e sufentanil, alvo controlado, para se obter a concentração no compartimento central de 5 ng/mL de sufentanil. As concentrações plasmáticas de sufentanil foram obtidas por método de radioimunoensaio. Flezzani e col. (1987) concluíram ser possível manter estáveis os níveis plasmáticos de sufentanil durante a CEC utilizando o esquema de infusão alvo controlada, porém, os dados obtidos sugerem que possa ocorrer acúmulo do fármaco.

O presente estudo evidenciou variação plasmática de sufentanil durante a CEC assim como no trabalho de Flezzani e colaboradores (1987). No entanto, a curva de decaimento plasmático não foi similar a observada neste trabalho prévio, onde a concentração de sufentanil após 90 min de CEC foi 4,50 ng/mL (±0,40 ng/mL) enquanto que imediatamente antes do procedimento era de 3,80 ng/mL (±0,40 ng/mL). O autor justifica esta diferença em virtude de erros de cálculo ao estimar o volume de distribuição do compartimento central, que foi informado a bomba de infusão continua computadorizada que controlava a administração de sufentanil aos pacientes.

Okutani e colaboradores (1988) relataram que no início da CEC é observado declínio na concentração plasmática de sufentanil na ordem de 30-35% Este fato foi observado em estudo realizado em 40 pacientes submetidos à cirurgia cardíaca (artéria coronária), divididos em quatro grupos com esquema posológico variando de

30 µg/kg *in bolus*, 10 µg/kg *in bolus* seguido de infusão contínua de 0,05 µg/ kg^{-h}, 20 µg/kg *in bolus* seguido de infusão contínua de 0,10 µg/kg^{-h} e 40 µg/kg *in bolus* seguido de infusão contínua de 0,20 µg/kg^{-h}. As concentrações plasmáticas de sufentanil foram detectadas por radioimunoensaio nos períodos antes da CEC, durante a CEC de 15 em 15 minutos até 45 minutos, durante o reaquecimento a 35°C, imediatamente após a CEC e aos 15, 60 e 240 minutos pós CEC.

Neste trabalho observou-se a variabilidade das concentrações plasmáticas inter indivíduos durante a CEC, assim como Flezzani e colaboradores (1987) em contradição com a estabilidade relatada por Okutani e colaboradores (1988). Esta estabilidade pode ser conseqüência da não metabolização do sufentanil durante este período e, desta forma a concentração permanece estável (GEDNEY *et al*., 1995).

Em contradição com Flezzani (1987) que relatou 20% de redução da concentração plasmática em 5 minutos de CEC e Okutani (1988), 30-35% em 15 minutos, este trabalho evidenciou aumento da concentração plasmática média durante a CEC. No entanto, avaliando-se os dados individuais do grupo de 32 pacientes submetidos à CEC, verifica-se que em 08 pacientes ocorreu declínio médio de 58% da concentração plasmática de sufentanil do período antes da CEC e 5 minutos de CE, em 21 pacientes houve aumento médio de 90% da concentração e em 1 paciente a concentração permaneceu inalterada. A variabilidade observada durante a CEC não teve relação com o aumento ou redução da concentração nos primeiros 5 minutos da CEC.

O aumento da concentração plasmática de sufentanil na fase hipotérmica da CEC pode ser explicado pela redução do fluxo sanguíneo hepático e pela influência da baixa temperatura contribuindo para a redução do seu metabolismo, já que o sufentanil tem alta taxa de extração hepática (GEDNEY *et al*., 1995). Desta forma, como o metabolismo está reduzido, aumenta a concentração de droga no plasma.

Outra possibilidade refere-se ao fato de que a hemodiluição provocada no período inicial da CEC produz uma diminuição na ordem de 40% a 50% na concentração de proteínas plasmáticas. Esta redução gera um aumento da fração livre do fármaco que provocará a distribuição do mesmo aos tecidos (ROSEN & ROSEN, 1997). Esta observação é de grande relevância para fármacos de elevada taxa de ligação as proteínas plasmáticas como é o caso do sufentanil.

O aumento da concentração plasmática no período de reaquecimento é consenso entre este trabalho e ambos citados anteriormente. Este fato indica que o

sufentanil é seqüestrado pelos tecidos durante a fase hipotérmica da CEC e redistribuído no período de reaquecimento.

No grupo sem CEC a concentração plasmática apresenta-se estável durante o procedimento cirúrgico, e assim como no grupo com CEC, pós desclampeamento observa-se ligeiro aumento da concentração de sufentanil, na ordem de 5,46% enquanto que na CEC o aumento médio é de 31%.

Estudos de monitoramento plasmático de outros fármacos durante a CEC tem demonstrado redução do nível plasmático dos mesmos durante este procedimento. Carmona e colaboradores (CARMONA *et al.,* 2003), assim como Sanches (SANCHES, 2007) observaram a redução do nível plasmático de propranolol (administração oral) durante a CEC, em adultos e crianças respectivamente.

Ainda em relação aos efeitos da CEC sobre a concentração plasmática de medicamentos, é importante considerar que fármacos com baixos volumes de distribuição tendem a ser mais afetados (hemodiluição), fármacos lipofílicos tendem a interagir mais com os componentes do oxigenador em comparação com os hidrofílicos e fármacos lipofílicos, com elevado índice de ligação as proteínas plasmáticas parecem sofrer menor impacto do que as com menor índice de ligação as proteínas plasmáticas. Já no caso dos fármacos hidrofílicos o inverso é verdadeiro (ROSEN & ROSEN, 1997)

A avaliação estatística dos dados foi realizada através da aplicação de métodos não paramétricos haja visto a não comprovação da normalidade dos mesmos. No caso do grupo 1 (com CEC), avaliou-se através do teste de comparação múltipla os níveis plasmáticos de sufentanil no início da cirurgia, início da CEC, final da CEC e final da cirurgia. Observou-se diferença significativa entre as concentrações plasmáticas dos períodos início da cirurgia versus final da CEC, início da cirurgia versus final da CEC, início da CEC versus final da cirurgia e final da CEC versus final da cirurgia. Estas informações destacam que o procedimento de circulação extracorpórea impacta o nível plasmático de sufentanil.

Já no grupo sem CEC, este mesmo tipo de avaliação estatística comprovou a não diferença significativa em relação ao nível plasmático de sufentanil no início e final da cirurgia.

Na comparação estatística dos grupos com e sem CEC,no período intra-operatório, avaliando-se o início no grupo sem CEC versus o início da cirurgia no

grupo com CEC assim como o final no grupo sem CEC e o final da cirurgia no grupo com CEC, não se comprovou a diferença entre os grupos. Destaca-se que ao comparar-se o final da cirurgia entre os grupos o valor de p obtido foi de 0,06.

Estes dados colaboram com a hipótese que no grupo com CEC, durante a mesma, houve alterações nos níveis plasmáticos de sufentanil, mas ao término deste procedimento, os níveis plasmáticos retornaram a normalidade, assim como observado no grupo sem CEC.

Thomson e colaboradores (1998) concluíram que concentrações plasmáticas de 0,71 ± 1,30 ng/mL de sufentanil apresentavam a melhor relação concentração-resposta e facilitavam a estabilidade hemodinâmica durante a cirurgia. Concentrações iguais ou superiores a 1,25 ± 0,21 ng/mL minimizam a necessidade da administração de isoflurano, mas não melhoram a estabilidade hemodinâmica. No presente estudo, no grupo com CEC, a concentração plasmática de sufentanil esteve abaixo da margem terapêutica proposta por Thomson (1998) entre 60 minutos de cirurgia até o início da CEC e no final da cirurgia. No grupo sem CEC as concentrações permaneceram abaixo deste valor a partir de 60 minutos de cirurgia até o final da mesma onde tornaram a alcançar esta margem.

No período pós operatório, as curvas de decaimento plasmático praticamente se sobrepõem, mostrando que ao término do procedimento cirúrgico o fármaco assume o mesmo comportamento em ambos os grupos, apesar de que estatisticamente existe diferença entre ambos (p-valor igual a 0,0110) e observa-se maior concentração plasmática e maior variabilidade no grupo sem CEC (CV%).

Outros estudos fazem-se necessários para elucidar as causas da interferência da CEC no nível plasmático de sufentanil. Salvo suas limitações, este estudo evidencia a influência do procedimento de circulação extracorpórea nas concentrações plasmáticas de sufentanil durante a mesma.

5. CONCLUSÕES

As alterações do nível plasmático de sufentanil observadas durante o procedimento de circulação extra-corpórea fora diferentes das descritas previamente para este fármaco, sendo que:

- Pacientes submetidos à cirurgia de revascularização do miocárdio sem o procedimento CEC apresentaram os mesmos níveis plasmáticos no início da cirurgia e no final da mesma quando comparados aos pacientes que foram submetidos a cirurgia de revascularização do miocárdio com o procedimento CEC.
- No grupo de pacientes submetidos a cirurgia de revascularização do miocárdio com CEC não se observou diferença significativa entre as concentrações plasmáticas de sufentanil entre o início da cirurgia e o início da CEC e entre o início da CEC e o final da mesma. No entanto, durante a CEC observou-se aumento na média das concentrações plasmáticas dos pacientes.
- No pós operatório observou-se diferença significativa entre os níveis plasmáticos de sufentanil entre ambos grupos de pacientes, com e sem CEC.
- O grupo de pacientes submetidos ao procedimento cirúrgico sem CEC apresentou maior variabilidade e maior concentração plasmática de sufentanil no pós-operatório.
- As concentrações plasmáticas de sufentanil observados neste estudo são semelhantes aos descritos na literatura.

CAPÍTULO III – FARMACOCINÉTICA DO SUFENTANIL APÓS ADMINISTRAÇÃO INTRA-VENOSA NO INTRA-OPERATÓRIO DE CIRURGIA DE REVASCULARIZAÇÃO DO MIOCÁRDIO

1. OBJETIVO

- Investigação da farmacocinética do sufentanil no pré, intra e pós-operatório de pacientes submetidos à cirurgia de revascularização do miocárdio com e sem CEC.

- Avaliação dos efeitos da circulação extracorpórea sobre a farmacocinética do sufentanil administrado no intra-operatório de pacientes submetidos à cirurgia de revascularização do miocárdio.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Etapa Clínica

O estudo da farmacocinética do sufentanil utilizou os dados observados nos quarenta e dois (42) pacientes incluídos no estudo de monitoramento plasmático de sufentanil sendo que toda a descrição referente à etapa clínica foi previamente mencionada no Capítulo II.

2.2. Etapa Analítica

A determinação de sufentanil plasmático nas amostras coletadas foi realizada através do método analítico de cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas (LC-MS/MS) previamente descrito no Capítulo I.

2.3. Etapa Estatística

Parâmetros farmacocinéticos

Estimaram-se os parâmetros farmacocinéticos através da aplicação do modelo tricompartimental utilizando-se o software PKsolutions 2.0 (Non Compartment Data Analysis software, Ashland, OH, USA) com base nas concentrações plasmáticas do sufentanil obtidas no intra e pós operatório.

Este modelo permite prever as meias-vidas de eliminação ($t_{1/2}$), alfa (α), beta (β) e gama (γ), relativas as três velocidades de decaimento plasmático, conforme observado na curva das concentrações plasmáticas de sufentanil. Além destes parâmetros foram calculados a disponibilidade sistêmica através do cálculo da área sob a curva (ASC) de zero ao tempo da última coleta plasmática e de zero ao infinito, o volume inicial de distribuição (V_1), o volume aparente de distribuição e a depuração plasmática (Cl).

A análise farmacocinética baseou-se na comparação dos resultados médios e medianos obtidos para cada parâmetro farmacocinético determinado através do softerware Pksolution 2.0 para os grupos submetidos ou não ao procedimento de circulação extracorpórea.

Métodos Estatísticos

As análises estatísticas foram realizadas através da utilização dos softwares *Microsoft Excel 2002* (Microsoft Corporation, USA) e *GraphPad Prism for Windows versão 5.0* (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA).

Considerando-se que os dados farmacocinéticos seguem distribuição gaussiana, os grupos foram comparados por meio da aplicação da análise de variância (ANOVA). Foi considerado nível de significância de 5% ($p<0,05$).

3.RESULTADOS

Análise Farmacocinética

Os dados descritivos dos parâmetros farmacocinéticos obtidos a partir da aplicação do modelo tricompartimental dos pacientes submetidos à cirurgia cardíaca, dos grupos com CEC e sem CEC encontram-se respectivamente nas tabelas 15 e 16. Nas tabelas 17 a 20 encontra-se o resultado da aplicação de ANOVA para cada parâmetro farmacocinético calculado.

Tabela 15 – Parâmetros farmacocinéticos do sufentanil administrado a pacientes submetidos à cirurgia cardíaca com circulação extra corpórea (CEC).

Parâmetro	Unidade	Média	Mediana	Desvio padrão	CV %
α	h	1,73	0,76	1,83	106,12
β	h	4,14	3,43	3,41	82,52
γ	h	23,25	22,70	14,28	61,43
V_1	L/kg	0,61	0,54	0,30	50,08
Vd	L/kg	8,02	7,03	6,53	81,44
ASC_{0-t}	ng/mL.h	14,13	9,60	14,44	102,19
ASC_{0-inf}	ng/mL.h	19,63	14,80	15,12	77,01
Cl	mL/min.kg	3,71	3,71	1,95	52,49

Abreviações: α- meia-vida alfa,β – meia-vida beta, γ - meia-vida gama, V1 –volume inicial, Vd – Volume aparente de distribuição, ASC_{0-t} – área sob a curva calculada do tempo zero até 36h, ASC_{0-inf} – área sob a curva calculada do tempo zero até o infinito, CV – coeficiente de variação.

Tabela 16 – Parâmetros farmacocinéticos do sufentanil administrado a pacientes submetidos à cirurgia cardíaca sem circulação extra corpórea (CEC).

Parâmetro	Unidade	Média	Mediana	Desvio padrão	CV %
α	h	2,08	0,76	2,35	113,09
β	h	6,20	3,22	6,16	99,32
γ	h	36,35	33,95	21,15	58,18
V_1	L/kg	1,30	0,51	2,75	210,81
Vd	L/kg	8,79	6,76	6,38	72,67
ASC_{0-t}	ng/mL.h	15,41	13,05	7,81	50,69
ASC_{0-inf}	ng/mL.h	32,63	18,50	32,27	98,90
Cl	mL/min.kg	3,23	3,08	2,32	71,92

Abreviações: α- meia-vida alfa,β – meia-vida beta, γ - meia-vida gama, V1 –volume inicial, Vd – Volume aparente de distribuição, ASC_{0-t} – área sob a curva calculada do tempo zero até 36h, ASC_{0-inf} – área sob a curva calculada do tempo zero até o infinito, CV – coeficiente de variação.

Tabela 17 - Resultado da aplicação da ANOVA para o parâmetro meia-vida (h).

Parâmetro	Grupo Com CEC	Grupo Sem CEC	P-valor
	Média ± Erro Padrão		
α	1,73 ± 0,347	2,08 ± 0,680	0,6113
β	4,14 ± 0,634	6,20 ± 1,856	0,1841
γ	23,25 ± 2,749	36,35 ± 6,376	0,0326*

* Diferença significativa

Os resultados contidos na tabela 17 mostram que existe diferença significativa entre as meias vidas ($T_{1/2}$) γ do grupo submetido a CEC e o grupo não submetido a CEC ao nível de 5% de significância. Para as demais meias vidas não houve diferenças significativas.

Tabela 18 - Resultado da aplicação da ANOVA para o parâmetro volume de distribuição (L/Kg)

.Parâmetro	Grupo Com CEC	Grupo Sem CEC	P-valor
	Média ± Erro Padrão		
V1	0,61 ± 0,057	1,31 ± 0,794	0,1803
Vd	8,021 ± 1,213	8,793 ± 1,845	0,7309

Abreviações: V1 –volume inicial Vd – Volume aparente de distribuição

Os resultados contidos na tabela 18 mostram que não houve diferença significativa entre os volumes de distribuição do grupo submetido a CEC e o grupo não submetido a CEC ao nível de 5% de significância.

Tabela 19 - Resultado da aplicação da ANOVA para o parâmetro Área sob a curva (ng/mL.h).

.Parâmetro	Grupo Com CEC	Grupo Sem CEC	P-valor
	Média ± Erro Padrão		
ASC_{0-t}	14,13 ± 2,729	15,41 ± 2,255	0,7744
ASC_{0-inf}	19,63 ± 2,857	32,63 ± 9,316	0,0883

Abreviações: ASC_{0-t} – área sob a curva calculada do tempo zero até 36h, ASC_{0-inf} – área sob a curva calculada do tempo zero até o infinito.

Os resultados contidos na tabela 19 mostram que não houve diferença significativa entre os valores de ASC do grupo submetido a CEC e o grupo não submetido a CEC ao nível de 5% de significância.

Tabela 20- Resultado da aplicação da ANOVA para o parâmetro clearance (mL/min.Kg)

Parâmetro	Grupo Com CEC	Grupo Sem CEC	P-valor
	Média ± Erro Padrão		
Clearance	3,71 ± 0,36	3,23 ± 0,67	0,5067

Os resultados contidos na tabela 20 mostram que não houve diferença significativa entre os valores de *clearance* do grupo submetido a CEC e o grupo não submetido a CEC ao nível de 5% de significância.

4. DISCUSSÃO

A determinação dos parâmetros farmacocinéticos é relativamente simples quando pensamos no organismo humano como um único compartimento. No entanto, em algumas situações tem-se que contextualizar a disposição de um fármaco em dois ou até mesmo três compartimentos (WINTER, 2004).

A farmacocinética do sufentanil tem sido descrita através do modelo tricompartimental e foi avaliada a partir de estudos clínicos realizados em pacientes cirúrgicos, não necessariamente cardíacos (BOVILL *et al*.,1984; HUDSON *et al*., 1989; GEPTS *et al.,* 1995;HUDSON *et al*., 2001 e ZHAU *et al.,* 2009). Exceções foram descritas por Schwartz e colaboradores (1989) que empregaram o modelo bicompartimental para o sufentanil em um estudo que envolveu 18 pacientes neurocirúrgicos e Bovill (1984) que também aplicou este modelo em um dos dez pacientes incluídos no estudo de avaliação da farmacocinética deste fármaco.

Neste trabalho, optou-se pelo modelo tricompartimental, pois as meias-vidas α, β e γ, apresentaram-se bem definidas. Além deste dado, a eliminação do sufentanil foi avaliada por um período satisfatório (36 h). O método analítico desenvolvido foi capaz de quantificar concentrações ínfimas do fármaco colaborando assim para determinação da sua eliminação em praticamente toda a sua totalidade.

Entre os parâmetros farmacocinéticos empregados na prática clínica, a meia-vida é de suma importância, pois possibilita o cálculo da dose e esquema posológico a serem empregados no paciente, já que define em quanto tempo 50% da dose administrada será eliminada pelo organismo (WILKINSON, 2001)

A aplicação do modelo tricompartimental permitiu o cálculo de três meias-vidas: α, β e γ. No presente estudo, os dados obtidos originaram uma meia-vida α média de 1,73 h para o grupo com CEC e 2,08 h para o grupo sem CEC. A meia-vida β média calculada para os grupos com e sem CEC foram respectivamente 4,14 h e 6,20 h. A meia-vida γ média calculada para os grupos com e sem CEC foram respectivamente 23,25 h e 36,96 h. Em um estudo realizado em 103 pacientes submetidos a cirurgia de revascularização coronária, onde também foi aplicado o modelo tricompartimental, foram obtidas as seguintes meias-vidas α, β e γ: 0,7 min., 10,9 min. e 356 min., respectivamente (HUDSON, 2001), porém este estudo teve como limitação a determinação das concentrações plasmáticas de sufentanil apenas no período anterior a CEC o que prejudicou a predição da completa eliminação do fármaco e conseqüentemente o cálculo das meias-vidas plasmáticas. No presente estudo, as concentrações plasmáticas foram obtidas até 36 h após a administração do sufentanil permitindo a visualização do completo decaimento plasmático do mesmo e conseqüente cálculo das meias-vidas plasmáticas.

Outros autores também apresentaram meias-vidas plasmáticas muito inferiores ao demonstrado neste trabalho, porém, tais dados resultam de pacientes cirúrgicos não cardíacos e a avaliação ocorreu por períodos inferiores ao realizado neste trabalho (BOVILL *et al*.,1984; HUDSON *et al.,* 1989; GEPTS *et al*., 1995 e ZHAU *et al.,* 2009). Desta forma, a comparação direta de tais resultados é limitada.

Ainda referente à meia-vida plasmática, apesar dos valores variarem para mais ou para menos, nos diversos trabalhos publicados previamente, o decaimento plasmático do sufentanil, visivelmente observado nos dados apresentados (Capítulo II) não pode ser explicado unicamente pelo valor da meia-vida de eliminação. Em

1992, Hughes e colaboradores (1992) introduziram o conceito de meia-vida contexto-sensível que representa o tempo necessário para que a concentração do fármaco reduza-se pela metade após o término da infusão. Sufentanil apresenta uma baixa meia-vida contexto-sensível (ZHAU *et al*., 2009).

Foi observada uma alta variabilidade interindivíduos referente as meias-vidas calculadas, especialmente no caso da meia-vida α. Neste caso específico tem-se a comentar que este parâmetro foi calculado no período relativo à primeira hora de cirurgia, incluindo o clampeamento e redução do fluxo sanguíneo. Neste período a flutuação dos níveis plasmáticos e a variabilidade dos mesmos interpacientes foram bastante expressivas.

Não foram observadas diferenças significativas entre os valores das meias-vidas α e β dos grupos com e sem CEC. Em relação à meia-vida β, observou-se que a variância dos grupos apresentou-se diferente, sendo que o grupo sem CEC foi considerado o mais variável. Porém, para o parâmetro meia-vida γ foi observada diferença significativa entre os grupos com e sem CEC. Esta diferença justifica-se pelo fato de que o decaimento plasmático foi menos pronunciado no grupo sem CEC, onde se obtiveram concentrações plasmáticas levemente superiores as do grupo com CEC.

Outro parâmetro avaliado foi o volume de distribuição. Esta informação é útil na análise de como se processa a distribuição de um fármaco, se este é extensamente distribuído ou não. O volume de distribuição é uma função da solubilidade do fármaco óleo/água e da propriedade do fármaco de se ligar as proteínas plasmáticas. Fatores que tendem a manter o fármaco no plasma ou aumentar sua concentração plasmática (baixa liposolubilidade, aumenta da ligação as proteínas plasmáticas ou redução da ligação aos tecidos), reduzem o volume aparente de distribuição. Fatores que reduzem a concentração plasmática (redução da ligação as proteínas plasmáticas, aumento da ligação aos tecidos ou aumento da liposolubilidade) aumentam o volume aparente de distribuição (WINTER, 2004).

No modelo tricompartimental, admite-se que o fármaco se distribui com velocidades diferentes em 3 compartimentos distintos, sendo o central relativo aos órgãos intensamente irrigados, os músculos como o segundo compartimento e os tecidos adiposos como o terceiro compartimento. Normalmente fármacos de natureza lipofílica tendem a se distribuir até o terceiro compartimento, chamado de depósito e levando o paciente a situação de acúmulo.

Neste estudo, foram calculados 2 tipos de volumes de distribuição: o volume inicial de distribuição (V1) e o volume de distribuição aparente (Vd). O volume inicial de distribuição médio calculado para o grupo com e sem CEC, respectivamente foi de 0,61 e 1,30 L. O volume aparente de distribuição calculado para os grupos com e sem CEC foi respectivamente 8,02 e 8,79L/kg.

Em trabalho prévio Hudson e colaboradores (1989) reportaram o volume de distribuição no estado do equilíbrio para o sufentanil de 8,7 L/kg, similar ao observado neste trabalho. Em um estudo posterior, estes mesmos autores (HUDSON, 2001), determinaram que o volume V1 do sufentanil foi 5,7 totalizando um volume do estado de equilíbrio de 248,8 L, ou seja, 3,54 L/kg (considerando um paciente de 70 kg). Desta forma, o valor obtido para o volume aparente de distribuição, no presente trabalho, foi 2 vezes maior do que no segundo trabalho de Hudson e colaboradores (2001). Esta diferença pode ser explicada pelo fato que a predição do volume de distribuição é extremamente dependente das concentrações plasmáticas determinadas, tanto em termos de valores como em termos de freqüência destas avaliações. Estudos com diferentes tempos de amostragem e diferentes metodologias analíticas responsáveis pela quantificação plasmática de sufentanil não podem sofrer comparação direta. Outras diferenças encontradas entre o segundo trabalho de Hudson (2001) e o presente foram as doses de sufentanil administradas aos pacientes e a forma de administração.

Destaca-se ainda que vários autores (BOVILL *et al*., 1984: GEPTS *et al.*, 1995 e ZHAU *et al.,*2009), que não avaliaram o sufentanil durante cirurgias cardíacas, obtiveram volumes de distribuição menores. No entanto, tais autores trabalharam com reduzido número de amostras para quantificação plasmática e utilizaram basicamente radioimunoensaio.

Não foi observada diferença significativa entre os volumes de distribuição dos grupos com e sem CEC, segundo descrito na tabela 18. No entanto, no caso específico do volume relativo ao compartimento central, o grupo sem CEC apresentou maior variabilidade quando comparado ao grupo com CEC.

A depuração plasmática ou *clearance* avalia o volume de sangue que fica livre do fármaco por uma unidade de tempo. Este índice é útil na avaliação do processo de metabolização e eliminação do fármaco. Para fármacos com depuração sistêmica abaixo de 6 mL/min/kg, como o sufentanil, tem taxa de eliminação restrita a metabolização (BUYLAERT *et al*., 1989). Adicionalmente sabe-se que a CEC pode

afetar a atividade do citocromo P-450 (PEREIRA *et al.,* 2000) também responsável pela biotransformação do sufentanil.

Neste trabalho obtiveram-se os seguintes índices de depuração sistêmica para o sufentanil: 3,71 e 3,23 mL/min.kg para os grupos com e sem CEC respectivamente. Estes valores são cerca de 20 vezes inferiores aos obtidos por Hudson e colaboradores (HUDSON *et al*., 2001). As discrepâncias observadas nos diversos trabalhos sobre a farmacocinética do sufentanil podem ser justificadas pelo cometário de Gepts e colaboradores (1995) que afirmam que amostragens de curta duração resultam em erro significativo na predição da fase terminal da eliminação, com detrimento do volume de distribuição e/ou superestimação do *clearance*.

Visando a melhor visualização dos resultados de depuração plasmática apresentados em diferentes trabalhos, elaborou-se uma relação dos *clearances* de sufentanil publicados nos últimos anos, padronizando-se a unidade L/min: 5,19 (HUDSON *et al*., 2001), 3,5 (ZHAU *et al.,* 2009), 2,8 (GEPTS *et al*., 1995), 1,05 (HUDSON *et al*., 1989), 0,889 (BOVILL *et al.,* 1984) e por fim 0,259 para o grupo com CEC neste estudo. Em todos estes estudos foram utilizadas diferentes doses de sufentanil, em esquemas posológicos diversos, com distintos cronogramas de coleta de amostras, diferentes métodos analíticos e com exceção de Hudson (2001), todos os pacientes são cirúrgicos, porém, não cardíacos.

Em relação ao *clearance*, também não se obteve diferença significativa entre os dois grupos de pacientes avaliados, conforme tabela 20. Novamente, percebe-se a maior variabilidade no grupo sem CEC, provavelmente em virtude do número menor de pacientes.

Falando-se especificamente sobre os parâmetros: meia-vida, *clearance* e volume de distribuição, considerando-se as diferenças observadas entre os valores calculados neste estudo e os demais publicados, é importante contextualizar estes dados em relação ao procedimento cirúrgico utilizado e suas respectivas alterações fisiológicas. O *clearance* calculado foi inferior ao descrito na literatura, porém, correlaciona-se ao fato de que o metabolismo do fármaco foi reduzido durante o procedimento cirúrgico. À medida que o *clearance* diminui, a meia-vida tende a aumentar (WILKINSON, 2001). Em relação ao volume de distribuição, superior ao relatado previamente, é conseqüente a diminuição da ligação do fármaco as proteínas plasmáticas, já que estas se encontram alteradas pela hemodiluição e pela sua própria redução, peculiar ao procedimento cirúrgico empregado.

Outro dado importante da farmacocinética do sufentanil refere-se a sua disponibilidade sistêmica. Para tal, foi calculada a área sob a curva do tempo zero ao tempo 36h (ASC_{0-36}) e a área sob a curva do tempo zero extrapolada até o infinito ($ASC_{0-\infty}$), através do método dos trapezóides. Para o grupo com CEC foram obtidos os seguintes valores: 14,12 ng/mL.h e 19,62 ng/mL.h para ASC_{0-36} e $ASC_{0-\infty}$ respectivamente. No grupo sem CEC obtiveram-se os seguintes resultados: 15,41 ng/mL.h e 32,62 ng/mL.h para ASC_{0-36} e $ASC_{0-\infty}$ respectivamente. Estes dados, apesar da sua importância, não foram relatados previamente por nenhum dos trabalhos citados anteriormente.

Não foram observadas diferenças significativas nos resultados de ASC_{0-36} e $ASC_{0-\infty}$ para os grupos com e sem CEC, conforme tabela 19. Os valores obtidos para o grupo sem CEC foram superiores em conformidade com as doses totais médias administradas em cada grupo, 3,23 µg/kg e 3,53 µg/kg com e sem CEC respectivamente. É importante comentar que as variâncias observadas não foram semelhantes entre os grupos. No caso da $ASC_{0-36,}$ a maior variabilidade observada foi no grupo com CEC, ao contrário do relatado para o parâmetro $ASC_{0-\infty}$ onde a maior variabilidade ocorreu no grupo sem CEC. Esta última situação justifica-se pela maior discrepância obtida para as concentrações finais (utilizadas no cálculo da extrapolação da ASC) e o número menor de pacientes em relação ao grupo com CEC.

Os achados farmacocinéticos podem ser explicados a partir da correlação dos mesmos com características do grupo de pacientes avaliados. Neste sentido, alguns autores (HUDSON *et al*., 1989 e ZHAU *et al*., 2009) comprovaram a correlação linear entre aumento do volume de distribuição e redução do *clearance* metabólico com o aumento da idade dos pacientes Este fato pode ser explicado pelo aumento dos tecidos adiposos e redução do fluxo e atividades das enzimas hepáticas com a idade. Zhau e colaboradores (2009) também comprovaram a influência do gênero na farmacocinética do sufentanil, pois evidenciaram que nos homens os volumes de distribuição são superiores aos das mulheres. Desta forma, pesquisaram-se ainda correlações entre os parâmetros farmacocinéticos calculados e alguns dados antropométricos dos pacientes como: sexo, idade, peso e índice de massa corporal. Assim como Gepts e colaboradores (1995), não foram comprovadas correlações entre os parâmetros farmacocinéticos e gênero, idade, peso ou índice de massa corporal dos pacientes avaliados.

5. CONCLUSÕES

Os parâmetros farmacocinéticos preditos para o sufentanil neste estudo foram significativamente diferentes das descritas previamente para este fármaco, sendo que:

- O modelo tricompartimental é compatível com a farmacocinética do sufentanil.
- No geral, as meias-vidas e o volume de distribuição aparente foram superiores e o *clearance* inferior ao relatado previamente para este fármaco.
- A meia-vida gama foi considerada estatisticamente diferente entre os grupos com e sem CEC, sugerindo que tal procedimento impactou na cinética de eliminação deste fármaco.
- Em linhas gerais, observou-se maior variabilidade no grupo sem CEC, considerando-se que este grupo apresentou menor “n” em relação ao grupo com CEC.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Um método analítico por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas, sensível e seletivo, utilizando extração líquido-líquido e padrão interno fentanil foi desenvolvido e validado para a quantificação de morfina e sufentanil.

O método analítico desenvolvido foi satisfatoriamente aplicado na quantificação de sufentanil no plasma de pacientes submetidos a cirurgia cardíaca.

Os níveis plasmáticos de sufentanil obtidos após a administração de 0,50 µg/Kg in *bolus*, seguido de infusão contínua na dose de 0,50 $\mu g/Kg^{-h}$ foram semelhantes aos descritos na literatura.

O procedimento de circulação extracorpórea alterou o nível plasmático de sufentanil, sendo que se observou aumento da média das concentrações plasmáticas determinadas neste período.

No pós-operatório observou-se diferença entre os níveis plasmáticos de sufentanil entre o grupo com e sem CEC.

Aplicou-se o modelo tricompartimental na avaliação cinética do sufentanil.

Os parâmetros farmacocinéticos preditos para o sufentanil, após aplicação deste protocolo, foram diferentes aos relatados em trabalhos prévios, sendo que a meia-vida e o volume de distribuição foram superiores e o *clearance* inferior. Tais predições são explicadas pelo procedimento cirúrgico ao qual foram submetidos os grupos de pacientes e suas respectivas alterações fisiológicas.

Observou-se diferença na meia-vida terminal de eliminação entre os grupos com e sem CEC.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBOTT RW, TOWNSHEND A, GILL R. Determination of morphine in body fluids by high performance liquid chromatography with chemiluminescence. **Analyst.** 112,p. 397-406, 1987.

AHONEN, J., OLKKOLA, K.T., HYNYNEN, M., SEPPÄLÄ, T., IKÄVALKO, H., REMMERIE, B., SALMENPERÄ, M.. Comparison of alfentanil, fentanyl and sufentanil for total intravenous anaesthesia with propofol in patients undergoing coronary artery bypass surgery. **British J. of Anaeth**. v.85, n.4, p.533-40, 2000.

BARVAIS, L., HEITZ, D., SCHMARTZ, D., MAES, V., COUSSAERT, E., CANTRAINE, F., HOLLANDER, A.. Pharmacokinetic Model-driven infusion of sufentanil and midazolam during cardiac surgery: assessment of the prospective predictive accuracy and the quality of anesthesia. **J. of Cardiothor. and Vascular Anesth**. v. 14, n.4, p.402-408, 2000.

BASSANEZI, B. S. B; FILHO, A.G. O. Analgesia Pós Operatória*.* Ver. Col. Bras. Cir. v. 33 n.2, 2006.

BLANCHET M., BRU G., GUERRET M., BROMET-PETIT M., BROMET N. Routine determination of morphine, morphine 3-beta-D-glucuronide and morphine 6-beta-D-glucuronide in human serum by liquid chromatography coupled to electrospray mass spectrometry. **J. Chromatogr A**, 854, p.93-108, 1999.

BOGUSZ MJ., MAIER RD., ERKENS M., DRIESSEN S. Determination of morphine and its 3- and 6-glucuronide and 6-monoacetylmorphine in body fluids by liquid chromatography atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry. **J. Chromatogr B Biomed Applic**, 703, p. 115-127, 1997.

BOUQUILLON A., FREEMAN D, MOULIN D.E. Simultaneous solid-phase extraction and chromatography with electrochemical detection. **J Chromatogr.** 577, p. 354-7, 1992.

BOVILL, JG;SEBEL, PS;BLACKBURN, CL;OEI-LIM, V;HEYKANTS, JJ: The pharmacokinetics of sufentanil in surgical patients*.* **Anesthesiology** v.61, p.502-506, 1984.

BRASIL. Resolução n 899, de 29 de maio de 2003. Diário Oficial da União, Brasília, 02 de junho de 2003. Seção 1. [A Agência Nacional de Vigilância Sanitária aprova o Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. Disponível em:

http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/2003/re/899_03re.htm. Acessado em: 20/03/2008.

BUYLAERT WA., HERREGODS LL., MORTIER EP., BOGAERT MG., Cardiopulmonary bypass and the pharmacokinetics of drugs. Un update. **Clin Pharmacokinet** 17, v.1, p. 10-26, 1989

CALDWELL R, CHALLENGER H. A capillary column gas-chromatographic method for the identification of drugs of abuse in urine samples. **Ann Clin Biochem,** 26, p.430-43,1989

CARMONA MJC., MALBOUISSON LMS., PEREIRA VA., BERTOLINE MA., OMOSAKO CEK., LE BIHAN KB., AULER Jr. JOC., SANTOS, SRCJ.. Cardiopulmonary bypass alters the pharmacokinetics of propanolol in patients undergoing cardiac surgery. **Braz J. Med Biol Res**, 38, p. 713-21, 2003.

CHAPMAN DJ, JOEL SP, AHERNE GW. Evaluation of a differential radioimmunoassay technique for the determination of morphine and morphine-6-glucuronide in human plasma. **J Pharm Biomed Anal**, 12, p. 353-60, 1994.

CHAPMAN DJ, CROSS MJ, JOEL SP, AHERNE GW. A specific radioimmunoassay for the determination of morphine-6-glucuronide in human plasma. **Ann Clin Biochem**, 32, p.297-302, 1995.

CHRISTOPHERSEN AS, BISETH A, SKUTERUD B, GADEHOLT G. Identification of opiates in urine by capillary column gas chromatography of two different derivatives. **J Chromatogr**, 422, p.117-24, 1987

CONE EJ, DARWIN WD, BUCHWALD WF. Assay for codeine, morphine and ten potential urinary metabolites by gas chromatography--mass fragmentography. **J Chromatogr**, 275, p.307-18, 1983.

COCKCROFT DW, GAULT MH. Prediction of creatinine clearance from serum creatinine. **Nephron** 16, p.31-41, 1976

CROSS, D.A., NIKAS, D.. The effects of carbon dioxide management on plasma levels of fentanyl and sufentanil during hypothermic cardiopulmonary bypass. J. of Cardiothor. and Vascular Anesth. V.8, n.6, p.649-52, 1994.

DAMS R., BENIJTS T., GÜNTHER W., LAMBERT W.,LEENHEER A.. Influence of the eluent composition on the ionization efficiency for morphine of pneumatically assisted electrospray, atmospheric-pressure chemical ionization and sonic spray. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 16, p. 1072–1077, 2002.

DAHLSTROM BE, PAALZOW LK. Pharmacokinetics of morphine in plasma and discrete areas of the rat brain. **J Pharmacokinet Biopharm**, 3,p.293-302,1975

DAHLSTROM B, PAALZOW L, EDLUND PO. Simultaneous determination of codeine and morphine in biological samples by gas chromatography with electron capture detection. **Acta Pharmacol Toxicol**, 41,p.273-9,1977.

DROST RH, VAN OOIJEN RD, IONESCU T, MAES RA. Determination of morphine in serum and cerebrospinal fluid by gas chromatography and selected ion monitoring after reversed-phase column extraction. **J Chromatogr**, 310,p.193-8,1984.

FELBY S. Morphine: its quantitative determination in nanogram amounts in small samples of whole blood by electron-capture gas chromatography. **Forensic Sci Int**, 13,p.145-50,1979.

FLEZZANI, P., ALVIS, M.J., JACOBS, J.R., SCHILLING, M.M., BAI, S., REVES, J.G.. Sufentanil disposition during cardiopulmonary bypass. **Can. J. Anaesth**, v 34, p. 566-9, 1987.

FRYIRS, B;WOODHOUSE,A;HUANG, JL;DAWSON, M;MATHER, LE: Determination of subnanogram concentrations of fentanyl in plasma by gas chromatography-mass spectrometry: comparison with standard radioimmunoassay. **J. Chromatogr. B**, v.688 p.79-85, 1997.

GEIER A, BERGEMANN D, VON MEYER L. Evaluation of a solid-phase extraction procedure for the simultaneous determination of morphine, 6-monoacetylmorphine, codeine and dihydrocodeine in plasma and whole blood by GC/MS. **Int J Legal Med**, v.109,p.80-3,1996.

GEPTS, E., SHAFER, S.L., CAMU, F., STANSKI, D.R., WOESTENBORGHS,R., VAN PEER, A., HEYKANTS,J.J.P. Linearity of pharmacokinetics and model estimation of sufentanil. **Anesthesiology** v.83, p.1194-1204, 1995.

GERGOV M., NOKUA P., VUORI E., OJANPERA I.. Simultaneous screening and quantification of 25 opioid drugs in post-mortem blood and urine by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Forensic Scie. Int**. v.186, p. 36-43, 2009.

GEDNEY JA., GHOSH S.. Pharmacokinetics of analgesics, sedatives and anaesthetic agents during cardiopulmonary bypass. Review Article. **British J. Anaesthesia**. v.75, p.344-51, 1995.

GIBALDI. *Biopharmaceutics and clinical pharmacokinetics.* 4 ed. Philadelphia: Lea&Ferbiger, 1991.

GOLDBERGER BA, DARWIN WD, GRANT TM, ALLEN AC, CAPLAN YH, CONE EJ. Measurement of heroin and its metabolites by isotope-dilution electron-impact mass spectrometry. **Clin Chem**, v.39,p.670-5,1993

HALL, R: The pharmacokinetics behaviour of opioids administered during cardiac surgery – review article*.* **Can. J. Anaesth**. v.38, n.6, p.747-756, 1991.

HANSDOTTIR V., HEDNER, T., WOESTENBORGHS, R., NORDBERG, G. **J. Pharm. Pharmacol.** v,35, p.86-93, 1983.

HARDMAN JG, GILMAN AG, LIMBIRD LE.(2001) *Goodman & Gilman's The pharmacological basis of therapeutics*, McGraw-Hill Book Co., New York, NY

HEISKANEN T, KALSO E. Controlled-release oxycodone and morphine in cancer related pain. **Pain**, v.73,p.37-45,1997.

HEISKANEN TE, RUISMÄKI PM, SEPPÄLÄ TA, KALSO EA. Morphine or oxycodone in cancer pain? **Acta Oncol**, v.39,p.941-7,2000.

HOFMANN U, SEEFRIED S, SCHWEIZER E, EBNER T, MIKUS G, EICHELBAUM M. Highly sensitive gas chromatographic-tandem mass spectrometric method for the determination of morphine and codeine in serum and urine in the femtomolar range. **J Chromatogr B Biomed Sci Appl**, v.727,p.81-8, 1997.

HUDSON, RJ;BERGSTROM, RG;THOMSON, IR;SABOURIN, MA;ROSENBLOOM, M;STRUNIN, L. Pharmacokinetics of sufentanil in patients undergoing abdominal aortic surgery. **Anesthesiology** v.70, p.426-431, 1989.

HUDSON, R.J., HENDERSON, B.T., THOMSON, I.R., MOON, M., PETERSON, M.D. Pharmacokinetics of sufentanil in Patients undergoing coronary artery bypass graft surgery. J. of Cardiothoracic and Vascular **Anesthesia** v15, n.6, p.693-699, 2001.

IONESCU, T.I., TAVERNE, R.H.T., HOUWELING, P.L., DROST, R.H., NUIJTEN, S., VAN ROSSUM, J.. Pharmacokinetic study of extradural and intrathecal sufentanil anaesthesia for major surgery. **British J. of Anaesth**. v.66, p.458-464, 1991.

JOHANSEN M, RASMUSSEN K.E, CHRISTOPHERSEN A.S. Determination of pholcodine and its metabolites in urine by capillary gas chromatography. **J Chromatogr**, v.532,p.277-84, 1990.

JONES AW, BLOM Y, BONDESSON U, ANGGARD E. Determination of morphine in biological samples by gas chromatography-mass spectrometry. Evidence for persistent tissue binding in rats twenty-two days post-withdrawal. **J Chromatogr**, v.309, p.73-80, 1984

KATAGI M. NISHIKAWA M., TATSUNO M., MIKI A., TSUCHIHASHI H. Column-switching high-performance liquid chromatography-electrospray ionization ass spectrometry for identification of heroin metabolites in human urine. **J. Chromat B Biomed Applic**, v.751, p.177-85, 2001.

KROGH M, CHRISTOPHERSEN A.S, RASMUSSEN K.E. Automated sample preparation by on-line dialysis and trace enrichment. Analysis of morphine, 6-monoacetylmorphine, codeine, ethylmorphine and pholcodine in plasma and whole blood by capillary gas chromatography and capillary gas chromatography-mass spectrometry. **J Chromatogr**, v.621, p.41-8, 1993.

LEE JW, PEDERSEN JE, MORAVETZ TL, DZERK AM, MUNDT AD, SHEPARD KV. Sensitive and specific radioimmunoassays for opiates using commercially available materials. I: Methods for the determinations of morphine and hydromorphone. **J Pharm Sci***,* v. 80, p.284-8,1991.

LEIS HJ, FAULER G, RASPOTNIG G, WINDISCHHOFER W. Quantitative analysis of morphine in human plasma by gas chromatography-negative ion chemical ionization mass spectrometry. **J Chromatogr B Biomed Sci Appl.** V.744,p. 113-9,2000.

LEJUS, C., SCHOERER, D., FURIC I., LE MOING, J-P., LEVRON, J-C., PINAUD, M. B.J. **Anaesth.** 85, 615-7,2000.

MARTENS-LOBENHOFFER, J. **J. Chromatog.B,** v.769,p. 227-233, 2002.

MARTIN, WR. Pharmacology of opioids. **Pharmacol. Rev**.,v. 35, p.283-323,1983.

MAYAKE, R.S.. Sedação e Analgesia em Crianças. **Rev. Assoc. Med. Bras**. v. 44, n. 1, p. 56-64, 1998.

MICHIELS M, HENDRIKS R, HEYKANTS J..Radioimmunoassay of the new opiate analgesics alfentanil and sufentanil. Preliminary pharmacokinetic profile in man. **J Pharm Pharmacol.** v.35,p.86-93,1983

MICROMEDEX Healthcare Series. Disponível em http://www.thomsonhc.com/hcs/librarian/ND_T/HCS/ND_PR/Main/CS/3894F9/DUP... pg 1-41. Acesso em 14/10/2010.

MEATHERALL R. GC-MS quantitation of codeine, morphine, 6-acetylmorphine, hydrocodone, hydromorphone, oxycodone, and oxymorphone in blood. **J Anal Toxicol**, v.29, p.301-8,2005.

MOORE JM. Rapid and sensitive gas chromatographic quantitation of morphine codeine and O6-acetylmorphine in illicit heroin using an electron capture detector. **J Chromatogr**, v.147,p.327-36,1978.

OKUTANI, R;PHILBIN, D;ROSOW, C;KOSKI, G;SCHNEIDER, RC: Effect of hypothermic hemodilutional cardiopulmonary bypass on plasma sufentanil and catecholamine concentrations in humans*.* **Anesth. Analg**. v.67, p.667-670, 1988.

O'NEIL, M.J., SMITH, A., HECKELMAN, P.E. The Merck Index – An Encyclopedia of Chemicals, Drugs and Biologicals. 13th ed. Merck & Co., INC. NJ USA, pp 8974, 2001.

PACIFICI, R., PICHINI, S., ALTIERI, I., CARONNA, A. PASSA, A.R., ZUCCARO, P. High performance liquid chromatography-electrospray mass spectrometric determination of morphine and its 3- and 6- glucuronides: application to pharmacokinetics studies. **J. Chromatog. B**, v.664,p. 329-334, 1995.

PALLESCHI, L. Quantitative determination of sufentanil in human plasma by liquid cromatografy tandem mass spectrometry. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analisis**, v.32, p.329-336, 2003.

PEREIRA, A. L. de S.T. Validity of behavioral and psiologic parameters for acute pain assessment of term newborn infants*.* **São Paulo Med. J.** v.117, n.2, p. 72-80.p, 1999.

PROUGH DS, FOREMAN AS. Anesthesia and renal function. In: International Anesthesia Research Society. Ed Review Course Lectures. Cleveland, Ed. Cleveland, IARS 7-11,1989.

RITCHEL. Handbook of basic pharmacokinetics-including clinical applications*.* 4 ed. Hamilton: Drug Intelligence, 1992.

ROPERO-MILLER JD, LAMBING MK, WINECKER RE. Simultaneous quantitation of opioids in blood by GC-EI-MS analysis following deproteination, detautomerization of keto analytes, solid-phase extraction, and trimethylsilyl derivatization. **J Anal Toxicol**, v.26, p.524-8, 2002.

ROSEN, D.A., ROSEN, K.R. Elimination of drugs and toxins during cardiopulmonary bypass. **J. Cardiothor. and Vasc. Anest**., v.11, n.3, p337-340, 1997.

ROSSI, SS;DYCK, JB;YAKSH, TL..Simultaneous extraction of sufentanil and midazolam from human plasma. **Clin. Chim. Acta** v.244, p.103-110, 1996.

ROTSHTEYN Y, WEINGARTEN B. A highly sensitive assay for the simultaneous determination of morphine, morphine-3-glucuronide, and morphine-6-glucuronide in human plasma by high-performance liquid chromatography with electrochemical and fluorescence detection **Ther Drug Monit**, v.18,p. 179-88, 1996.

SACHS, L: *Applied statistics*, 2nd Ed., Springer, New York, 1984

SANCHES C.. Monitoramento do propanolol em crianças submetidas a correção cirúrgica da Tetralogia de Fallot através de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência – Fluorescência. [Dissertação]. São Paulo: Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, 2007.

SANTOS V., LÓPEZ, K. J. V., SANTOS, L. M., YONAMINE,M., CARMONA, M. J. C., SANTOS, S. R. C. J.. Determining plasma morphine levels using GC-MS after solid phase extraction to monitor drug levels in the postoperative period. **Clinics**, v.63,p.307-14, 2008.

SCHANZLE G., LI S., MIKUS G., HOFMANN U. Rapid, highly sensitive method for the determination of morphine and its metabolites in body fluids by chromatography-mass spectrometry. **J. Chromat B Biomed Applic**, v.721, p.55-65, 1999.

SCHIMIDT, R.et al.. High sensitive determination of sufentanil in human plasma of parturients and neonates following patient controlled epidural analgesia (PCEA). **Journal of Cromatography B**, v.836, p.98-107, 2006.

SCHOLZ, J;STEINFATH, M;SCHULZ, M: Clinical Pharmacokinetics of alfentanil, fentanil and sufentanil – An Update. **Clin. Pharmacokinet**. v.31, n.4, p.275-292, 1996.

SCHUBERTH J, SCHUBERTH J. Gas chromatographic-mass spectrometric determination of morphine, codeine and 6-monoacetylmorphine in blood extracted by solid phase. **J Chromatogr**, v.;490, p.444-9, 1989.

SCHRAAG, S., MOHL, U., HIRSCH, M., STOLBERG, E., GEORGIEFF, M.. Recovery from opioid anaesthesia: the clinical implication of context-sensitive half-times. **Anesth. Analg**. v.86, p.184-90, 1998.

SCHWARTZ, A.E., MATTEO, R.S., ORNSTEIN, E., YOUNG, W.L., THORNHILL, M. Pharmacokinetics of sufentanil in neurosurgical patients undergoing hyperventilation. **Br. J. Anaesth**. v.63, p. 385-388, 1989.

SCOTT, BH: Opioids in cardiac surgery: Cardiopulmonary bypass and inflammatory response. **Int. J. Cardiol.** v.64 sup. 01, p.535-541, 1998.

SHARGEL, L: *Applied biopharmaceutics and pharmacokinetics.* 3 ed. London. Prentice-Hall International, 1993.

SMITH, B. R., RINDER, H.M., RINDER, C.S. Chapter 59: Cardiopulmonary Bypass In: Michaelson, A (ed) Platelets, 2nd Ed. New York: Academic Press, p.1077-95, 2006.

SILVA P. *Farmacologia*. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan;. p. 148-151, 2000.

SVENSSON JO, YUE QY, SAWE J. Determination of codeine and metabolites in plasma and urine using ion-pair high-performance liquid chromatography.*J* **Chromatogr B Biomed Appl**. v.674,p. 49-55, 1995.

SVENSSON JO, ANDERSSON M, GUSTAVSSON E, BECK O. Electrospray LC-MS method with solid-phase extraction for accurate determination of morphine-, codeine-, and ethylmorphine-glucuronides and 6-acetylmorphine in urine. **J Anal Toxicol**, v. 31,p.81-6, 2007.

SZEITZ, A;RIGGS, KW;CLARK, CH.. Sensitive and selective assay for fentanyl using gas chromatography with mass selective detection. **J. Chromatogr. B**, v.675, p.33-42, 1996

TANG L., KERBALE P.. Effect of conductivity of electrosprayed solution on the elctrospray current. Factors determining analyte sensitivity in electrospray mass spectrometry. **Anal Chem**, v.63, p.2709-15, 1991;

TANG L., KERBALE P..Dependence of ion intensity in electrospray mass spectrometry on the concentration of analytes in the electrosprayed solution. **Anal Chem**, v.65, p.3654-68, 1993;

TATSUNO M., NISHIKAWA M., KATAGI M., TSUCHIHASHI H.. Simultaneous determination of illicit drugs in human urine by liquid chromatography-mass spectrometry. J. Anal Toxicol, v.20, p.281-86, 1996.

THOMSON, I. R., HERDERSON, B.T., SINGH, K., HUDSON, R.J. Anesthesiology, v 89 p 852-61, 1998

TYREFORS N., HYLLBRANT B., EKMAN L., JOHANSSON M., LAYNGSTRAM B. Determination of morphine, morphine-3-glucuronide and morphine-6-glucuronide in

human seru by solid phase extraction and liquid chromatography-mass spectrometry with electrospray ionization. **J. Chromatogr A**, v.729, p.279-85, 1996.

VAN NIMMEM NFJ., VEULEMANS HAF.. Development and validation of a highly sensitive gas chromatographic mass spectrometric screening method for the simultaneous determination of nanogram levels of fentanyl, sufentanil and alfentanil in air and surface contamination wipes. **J. Chromatogr. B**, v.1035, p.249-59, 2004.

WANG WL, DARWIN WD, CONE EJ. Simultaneous assay of cocaine, heroin and metabolites in hair, plasma, saliva and urine by gas chromatography-mass spectrometry. **J Chromatogr B Biomed Appl**, v.660, p.279-90,1994.

WASELS R, BELLEVILLE F, PAYSANT P, NABET P, KRAKOWSKI I. Determination of morphine in plasma by gas chromatography using a macrobore column and thermoionic detection after Extrelut column extraction: application to follow-up morphine treatment in cancer patients. **J Chromatogr.** v.489**,**p.411-18, 1989.

WILKINSON GR. Pharmacokinetics: The dynamics of drug absorption, distribution and elimination. In: Hardman, JG., Limbird, LE., ed Goodman & Gilman's – The Pharmacological Basis of Therapeutics. Chicago, McGraw-Hill Medical Publishing Division, p.3-29, 2001.

WINTER, MICHAEL E. Basic Clinical Pharmacokinetics. 4th ed., Lippincott Williams & Wilkins, 2004.

WOESTENBORGHS R., MICHIELSEN L., HEYKANTS J.. Rapid and sensitive gas chromatographic method for the determination of alfentanil and sufentanil in biological samples. J. Chromatogr, v.224, p.122-127, 1981.

WOESTENBORGHS, RJH; TIMMERMAN, PMMBL; CORNELISSEN, MLJE; VAN ROMPAEY, FAMBS; GEPTS, E; CAMU, F; HEYKANTS, JJP;STANKIS, DR: *Assay methods for sufentanil in plasma-radioimmunoassay versus gas chromatography-mass spectrometry.* Anesthesiology v.80, p.666-670, 1994.

ZHAO, Y., DUAN, J-L., WU, X-M., JIANG, J-Y., LU, W., ZHANG L-P., WANG, J., MENG, X-L., XU, C-Y., JIA, D-L., LIU, W., SHENG, X-Y.. Two-stage analysis of pharmacokinetics of sufentanil administered by target-controlled infusion in Chinese patients. Chinese Medical Journal. v.122, n.17, p.1979-84, 2009.

ZHOU S., HAMBURGER M.. Effects of solvent composition of molecular íon response in electrospray mass spectrometry: investigation of ionization process. Rapid Comm Mass Spectrom, v.9, p.1516-21, 1995.

ZUCCARO P, RICCIARELLO R, PICHINI S, PACIFICI R, ALTIERI I, PELLEGRINI M, D'ASCENZO G. Simultaneous Determination of Heroin, 6-Monoacetylmorphine, Morphine and its Glucuronides by Liquid Chromatography-Atmospheric Pressure Ionspray-Mass Spectrometry. **J Anal Toxicol**, v.21,p.268-77, 1997.

Anexo I - Aprovação da Comissão Científica de Ética do InCor-HCFMUSP

INSTITUTO DO CORAÇÃO
(Fundação E. J. Zerbini)
Hospital das Clínicas
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

Mem.CC.905/02

São Paulo, 17 de outubro de 2002.

Ilma. Sra.
Dra. Maria José Carvalho Carmona

A Comissão Científica e de Ética do Instituto do Coração, apreciou e aprovou na sessão 417/02/17 de 17/10/2002, Protocolo de Pesquisa SDC - 2119/02/126 - **"Anestesia subaracnóidea associada à anestesia geral em cirurgia cardíaca - efeitos sobre a função pulmonar, a glicemia e a analgesia pós-operatória"**,e foi o seguinte o parecer do relator: **"Aprovado no mérito científico, sem ônus para a Instituição".**

Atenciosamente,

Selma Cristina Quaia
Secretária da Comissão Científica e de Ética
InCor/HC/FMUSP

SCQ/mva

Anexo II - Aprovação CAPPesq/HCFMUSP

HC HOSPITAL DAS CLÍNICAS

DIRETORIA CLÍNICA

Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa

Mem.C.C.0275 de 04.03.04

O Presidente da Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em 30.04.04, tomou conhecimento da inclusão do **DRA. LUCIANA MORAES DOS SANTOS** como pesquisadora executante no Protocolo de Pesquisa nº **902/02** intitulado "**Anestesia subaracnóidea associada à anestesia geral e cirurgia cardíaca – efeitos sobre a função pulmonar, a glicemia e analgesia pós-operatória**", apresentado pela **COMISSÃO CIENTÍFICA E DE ÉTICA DO INCOR**, tendo em vista desistência da **DRA. YURI MOREIRA SOARES**.

Pesquisador Responsável: **DRA. MARIA JOSÉ CARVALHO CARMONA**

CAPPesq, 30 de Abril de 2004.

PROF. DR. EUCLIDES AYRES DE CASTILHO
Presidente da Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa

Anexo III - Modelo do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

I – DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU LEGAL RESPONSÁVEL

1. Nome do Paciente:

.....

Documento de Identidade Nº .....Sexo: ( )M ( )F

Data de Nascimento:...../...../.....

Endereço:.....Nº:.....Apto:.....

Bairro:.....Cidade:.....

CEP:.....Telefone:.....

2. Responsável Legal:.....

Natureza (grau de parentesco, tutor, curador, etc.):.....

Documento de Identidade Nº:.....Sexo: ( )M ( )F

Data de Nascimento:...../...../.....

Endereço:.....Nº:.....Apto:.....

Bairro:.....Cidade:.....CEP:.....Tel:.....

II – DADOS SOBRE A PESQUISA

1. Título do Protocolo de Pesquisa: "MODELAGEM FARMACOCINÉTICA DA MORFINA ADMINISTRADA SOB À VIA SUBARACNOÍDICA EM PACIENTES SUBMETIDOS A REVASCULARIZAÇÃO DO MIOCÁRDIO COM CIRCULAÇÃO EXTRACORPÓREA"

2. Pesquisador: FÁTIMA DA SILVA LEITE
Cargo/Função: Farmacêutica
Departamento da FCF/USP: Departamento de Farmácia

3. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA
Sem Risco ( ) Risco Mínimo (x) Risco Médio ( )
Risco Baixo ( ) Risco Maior ( )
Probabilidade de que o indivíduo sofra algum dano como conseqüência imediata ou tardia do estudo.
Para a finalidade deste estudo, serão colhidas onze amostras sanguíneas de cateter venoso (veia subclávia) durante o procedimento cirúrgico por médico assistente de cirurgia e por enfermeira na recuperação pós-operatória, não excedendo no total 170 ml.

4. Duração da Pesquisa: 2 anos

III – REGISTRO DAS EXPLICAÇÕES DO PESQUISADOR AO PACIENTE OU SEU REPRESENTANTE LEGAL SOBRE A PESQUISA, CONSIGNANDO:

1. Justificativa e os objetivos da pesquisa: Em cirurgia cardíaca a dor no pós-operatório pode ser muito intensa devido à própria cirurgia e à presença dos drenos no tórax. A presença desta dor, além de desconfortável, pode dificultar a realização dos exercícios de fisioterapia e contribuir para o aparecimento de complicações, até mesmo a pneumonia no pós-operatório. Sabe-se que a associação de anestesia do tipo "raqui", realizada através de uma picada de agulha nas costas antes da realização da anestesia geral pode contribuir para a diminuição da dor pós-operatória. Também se pretende avaliar o comportamento da morfina administrada em seu organismo através do bloqueio subaracnóide (anestesia nas costas), para que se possa ajustar a dose e conseguir um maior alívio da dor com o menor efeito adverso possível.

2. Procedimentos que serão utilizados e propósitos, incluindo a identificação dos procedimentos que são experimentais: Será realizado bloqueio subaracnóide (anestesia nas costas), amplamente aceita e executada pelos profissionais anestesiologistas, com respaldo na literatura científica, avaliando suas diferenças na função pulmonar, na glicemia (açúcar no sangue) e na dor pós-operatória. Além disso, serão colhidas onze amostras sanguíneas através de cateter venoso (veia subclávia) durante o procedimento cirúrgico, serão coletados no total aproximadamente 130-150 mL de sangue.

3. Desconfortos e riscos esperados: O risco é mínimo, desde que o hematoma peridural ou subaracnóideo (coleção de sangue na coluna após a anestesia nas costas) é muito raro de acordo com os dados encontrados na literatura. Em relação às coletas de sangue, pode haver o aparecimento de hematoma (mancha roxa) no local da coleta de amostras de sangue devido a existência de um cateter venoso.

4. Benefícios que poderão ser obtidos: Melhora na função pulmonar em virtude da melhor analgesia no período pós-operatório após ser submetido a raquianestesia/anestesia nas costas, relativamente à anestesia geral, o procedimento habitual realizado atualmente em todos os pacientes. Além disso, pode-se diminuir os riscos associados com a utilização da morfina, pois o conhecimento do comportamento do medicamento no seu organismo, pode contribuir para o ajuste da dose utilizada durante a cirurgia.

5. Procedimentos alternativos que possam ser vantajosos para o indivíduo: Como procedimento alternativo pode ser realizada analgesia endovenosa, que pode não ser tão eficaz quanto o bloqueio subaracnóide (previsto na anestesia nas costas) na analgesia pós-operatória.

IV – ESCLARECIMENTOS DADOS PELO PESQUISADOR SOBRE GARANTIAS DO SUJEITO DA PESQUISA

1. Acesso, a qualquer tempo, às informações sobre procedimentos, riscos e benefícios relacionados à pesquisa, inclusive para dirimir eventuais dúvidas.
2. Liberdade de retirar seu consentimento a qualquer momento e de deixar de participar do estudo, sem que isto traga prejuízo à continuidade da assistência.
3. Salvaguarda da confidencialidade, sigilo e privacidade.
4. Disponibilidade de assistência no Instituto do Coração HCFMUSP, por eventuais danos a saúde, decorrentes da pesquisa.
5. Viabilidade de indenização por eventuais danos à saúde decorrentes da pesquisa.

V – INFORMAÇÕES DE NOMES, ENDEREÇOS E TELEFONES DOS RESPONSÁVEIS PELO ACOMPANHAMENTO DA PESQUISA, PARA CONTATO EM CASO DE INTERCORRÊNCIAS CLÍNICAS E REAÇÕES ADVERSAS.

Dra. Maria José Carmona
Av. Dr. Enéas de Carvalho Aguiar, 44
Fone: (11) 3069-5232
(BIP - Central: 5188-3838, código: 1012885)

VI – CONSENTIMENTO PÓS-ESCLARECIDO

Declaro que, após convenientemente esclarecido pelo pesquisador e ter entendido o que me foi explicado, consinto em participar do presente Protocolo de Pesquisa.

São Paulo, _____ de _____ de _____.

_____
Assinatura do sujeito de pesquisa
ou responsável legal

_____
Assinatura do pesquisador
(carimbo ou nome legível)

Anexo IV - Artigo Publicado

DRUG FORMULATIONS AND CLINICAL METHODS

Development and Validation of an HPLC/MS/MS Method for the Determination of Sufentanil and Morphine in Human Plasma

JOSÉLIA LARGER MANFIO and VERÔNICA JORGE SANTOS
School of Pharmaceutical Sciences USP/SP, Av. Lineu Prestes, 580 Bloco 13ª, Butantã–Cidade Universitária, CEP 05508-900, São Paulo–SP Brazil
VERA LÚCIA LANCHOTE
School of Pharmaceutical Sciences USP, Av. do Café, 3000, CEP 14050-220, Ribeirão Preto–SP Brazil
LUCIANA M. SANTOS, MARIA JOSÉ C. CARMONA, and JOSÉ OTAVIO AULER, JR
Anesthesiology, Heart Institute, HCFMUSP, Av. Dr. Eneas Carvalho de Aguiar, 44, Jardim Paulista, CEP 05403-000, São Paulo–SP Brazil
LIBERATO BRUM JUNIOR
Biocinese-Biopharmaceutical Studies Center, Av. Ministro Cirne de Lima, 1541, Vila Becker, CEP 85903-590, Toledo–Pr Brazil
CARMEN MARIA DONADUZZI
Prati, Donaduzzi & Cia Ltda–Rua Mitsugoro Tanaka, 145, Distrito Industrial, CEP 85903-630, Toledo–Pr Brazil
SILVIA R.C.J. SANTOS
School of Pharmaceutical Sciences USP/SP, Av. Lineu Prestes, 580 Bloco 13ª, Butantã – Cidade Universitária, CEP 05508-900, São Paulo–SP Brazil

A sensitive and fast HPLC/MS/MS method for measurement of sufentanil and morphine in plasma was developed and validated. A single liquid–liquid extraction in alkaline medium was used for the cleanup of plasma, and fentanyl was added as an internal standard (IS). The analyses were carried out using a C_{18} column and the mobile phase acetonitrile–5 mM ammonium acetate + 0.25% formic acid (70 + 30, v/v). The triple-quadrupole mass spectrometer equipped with an electrospray source in positive mode was set up in the selective reaction monitoring mode to detect precursor → product ion transition 387.0 > 238.0, 285.7 > 165.1, and 337.0 > 188.0 for sufentanil, morphine, and IS, respectively. The method was linear in the 0.05 (LOQ) – 500 ng/mL range for sufentanil and 10 (LOQ) – 1000 ng/mL range for morphine. Good selectivity, linearity, precision, accuracy, and robustness were obtained for the HPLC/MS/MS method. The proposed method was successfully applied for the determination of sufentanil and morphine in patients undergoing cardiac surgery.

Opioid analgesics have long been used for the control of pain. Since 1950 morphine has been administered for cardiac surgery procedures; however, it causes an insufficient blockage of endocrine metabolic response and incomplete unconsciousness. Thus, this technique was banned. In 1970, powerful agonists such as sufentanil and fentanil were available. In addition to this, pharmacologic administration was safer (1).

Sufentanil alkaline amine, $Pk_a = 8.01$, supplies 20% of nonionized drug at physiological pH. This analgesic is highly lipid-soluble, with a partition coefficient of 1.75. Sufentanil's distribution volume is 2.9 L/kg, distribution half-life is 1.4 min, terminal half-life is 164 min, and clearance is 12.70 mL/min kg.

Sufentanil shows 92.5% plasma protein binding at pH 7.4, more than 50% with alpha-1-acid glycoprotein. Sufentanil was metabolized by cytochrome P450, causing an *N*-dealkylation of the piperidine ring and amides, an *O*-desmethylation, and an aromatic hydroxylation (2).

Morphine is commonly used as a powerful analgesic in the intra- and post-surgical periods. The ability of opioids to block the pain stimulus, followed by hemodynamic intrinsic capacity, are reasons why these drugs are used as anaesthetics in cardiac surgery. Morphine is usually administered as the sulfate ($C_{34}H_{40}N_2O_{10}S$), MW 668.76 (C: 61.06%,H: 6.03%, N:4.19%, O: 23.93%, and S:4.79%). After absorption, morphine rapidly leaves the circulation and penetrates into the tissues and organs, such as kidneys, lungs, spleen, adrenal glands, and thyroid. Its penetration in cerebral tissue is very slow because morphine does not have a highly lipid-soluble character. In therapeutic concentrations, a third of the morphine present in blood is bound to plasma proteins. It was observed that 24 h after the last dose, the tissue concentration

Received October 30, 2008. Accepted by SW September 4, 2009.
Corresponding author's e-mail: manfiojoselia@bol.com.br

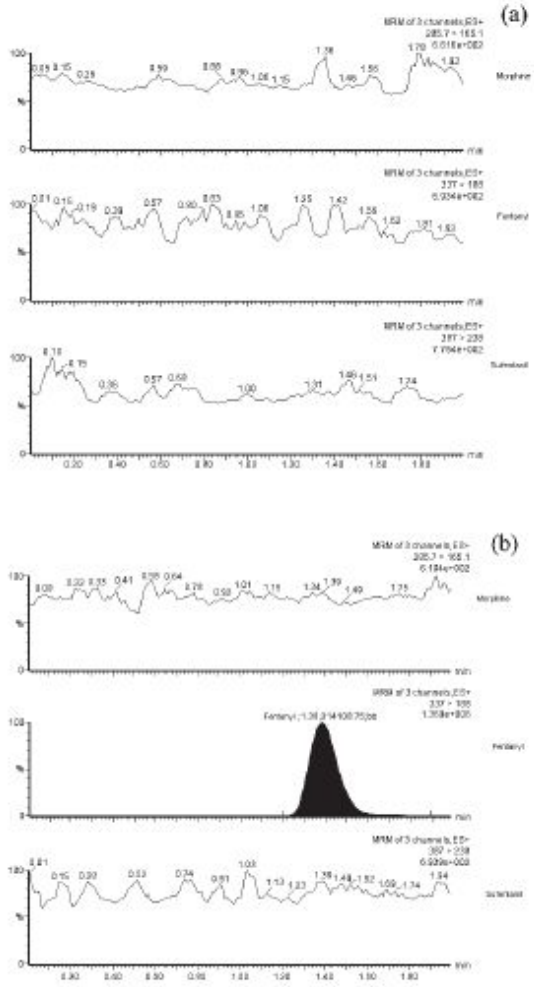

Figure 1. (a) Blank plasma chromatograms for sufentanil, fentanyl, and morphine; (b) blank matrix chromatogram of the internal standard.

was low with a biological half-life ($t_{1/2}\beta$) of 2 h in adults. The reported plasma clearance and distribution volume (3) were, respectively, 24 mL/min kg (Cl_T) and 3.3 L/kg (Vd). The main morphine metabolic route is its conjugation with glycuric acid. The two main metabolites formed are morphine-3-glucuronide (M3G) and morphine-6-glucuronide (M6G); in addition, a small quantity of morphine-3,6-glucuronide is formed (4).

Several investigators have reported studies of the distribution of sufentanil in cardiac surgical patients employing radioimmunoassay (RIA) as the analytical method of choice in cases where the therapeutic plasma concentrations of sufentanil are extremely low (0.05–0.3 ng/mL; 5–7). Woestenborghs et al. (8) demonstrated that RIA and GC/MS are sensitive and adequate techniques for sufentanil determination in plasma. Palleschi et al. (9) developed a sensitive and specific method for sufentanil quantification in human plasma using HPLC/MS with an LOQ of 0.3 ng/mL. Schmidt et al. (10) employed a validated method for sufentanil determination in human plasma using an HPLC/MS method with LOQ of 0.25 pg/mL. This method showed good LOQ, precision, accuracy, and linearity, whereas, the SPE was expensive to analyze a large quantity of samples and the variability of cartridges was very significant (10).

RIA methods, although relatively simple, have cross reactivity principally because the main morphine metabolites M3G and M6G appear in plasma in high concentrations (11–13). HPLC with electrochemical, chemiluminescence, and fluorescence detection usually are more specific and a little more sensitive. However, they require a very lengthy and expensive cleanup (14–17). GC with a flame ionization detector, nitrogen-phosphorous detector, or electron capture detector has been used; the disadvantage is the low sensitivity for morphine in biological samples and problems linked to the lack of selectivity of these detectors (18–27). Other authors have also proposed HPLC/MS/MS and SPE for characterization of morphine and its metabolites at levels under 10 ng/mL with run times smaller than 10 min (28–30).

The literature presents several options for sufentanil and morphine determination in plasma. The main objective of this work was to develop and validate a rapid and selective analytical method for simultaneous quantification of sufentanil and morphine by HPLC/MS/MS. The simultaneous determination of sufentanil and morphine is useful for pharmacokinetic studies of these drugs taken as analgesics by surgery patients.

Experimental

Chemical and Reagents

(a) *Sufentanil*.—Reference standard 99.84% (Janssen-Cilag, São José dos Campos, Brazil).

(b) *Fentanyl*.—Reference internal standard (IS) 98.96% (Janssen-Cilag).

(c) *Morphine sulfate*.—Reference standard 99.75% (Cristália, Itabira, Brazil).

(d) *Acetonitrile*.—HPLC grade (Tedia, Fairfield, NJ).

(e) *Formic acid*.—HPLC grade (Tedia).

(f) *Ammonium acetate*.—Reagent grade (Carlo Erba, Milan, Italy).

(g) *Diethyl ether*.—Reagent grade (Carlo Erba).

(h) *Dichloromethane*.—Reagent grade (Carlo Erba).

(i) *Sodium hydroxide*.—Reagent grade (F. Maia, São Paulo, Brazil).

(j) *Water*.—Obtained from a Gehaka system (Gehaka, Kansas City, MO).

(k) *Anticoagulant*.—BD Vacutainer® tubes with sodium heparin (Beckton Dickinson Co., Franklin Lakes, NJ).

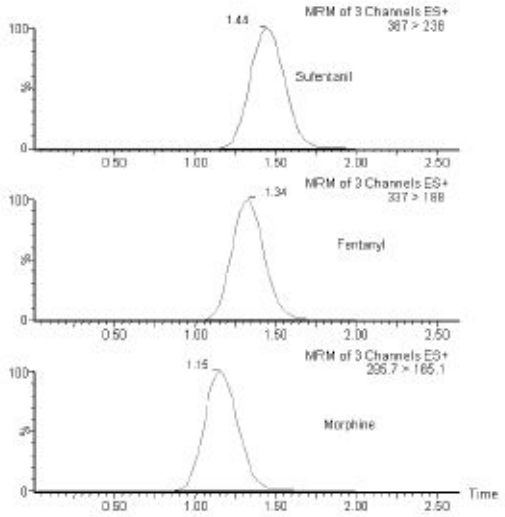

Figure 2. Representative HPLC/MS/MS chromatograms of a plasma sample containing sufentanil (200 ng/mL), morphine (400 ng/mL), or IS (500 ng/mL).

Apparatus and Analytical Conditions

The HPLC system was a Waters Alliance 2695 (Milford, MA). The experiments were carried out on a Waters Xterra C_{18} column (100 × 2.1 mm id, 3.5 µm particle size), and a C_{18} Security Guard cartridge (Phenomenex, Torrance, CA) was used to protect the analytical column. The HPLC system was operated at 40°C. The flow rate of the mobile phase under isocratic condition was 1.0 mL/min; 80% of the column eluate was diverted to waste, and 20% was allowed to reach the mass spectrometer. The autosampler was set at room temperature, and the injection volume was 30 µL. Mobile phase consisted of acetonitrile–5 mM ammonium acetate + 0.25% formic acid (70 + 30, v/v). The mobile phase was filtered through a 0.2 µm membrane filter (Millipore, Billerica, MA).

Analyte and IS were detected on a triple-quadrupole mass spectrometer (Quattro Micro Atmospheric Pressure Ionization, Waters Micromass, Milford, MA) equipped with an electrospray ionization source operating in the positive ion mode. MassLynx software version 4.1 was used to control all parameters of HPLC and MS. Quantification was performed using the selective reaction monitoring (SRM) mode to study precursor → product ion transitions for sufentanil (m/z 387.0 → 238.0), morphine (m/z 285.7 → 165.1), and fentanyl (m/z 337.0 → 188.0). Source-dependent parameters optimized were gas 1 flow rate (nebulizer gas): 50 L/h; gas 2 flow rate (heater gas): 400 L/h; ion spray voltage: 3000 V; and temperature: 350°C. Compound-dependent parameters set were declustering potential (DP): 35 V (sufentanil), 45 V (morphine), and 35 V (fentanyl) and collision energy (CE): 25 eV (sufentanil), 35 eV (morphine), and 25 eV (fentanyl). Entrance and exit potential were 5 V for both the analyte and IS. Argon used as the collision-induced dissociation (CID) gas was set at 2.3×10^{-3} mbar, and the electron multiplier was set at 760 V. The mass spectrometer was maintained at unit resolution, and dwell time was set at 0.2 s.

Table 1. Intraday precision and accuracy for the determination of sufentanil (S) and morphine (M) in human plasma

	RSD, %		Accuracy, %	
QC	S[a]	M[b]	S	M
Low	4.5	2.0	103.0	109.2
Medium	1.2	2.0	105.5	105.8
High	3.6	7.5	91.0	96.2

[a] Sufentanil QC: 0.15 (low), 200 (medium), 400 (high) ng/mL.
[b] Morphine QC: 30 (low), 400 (medium), 800 (high) ng/mL.

Preparation of Stock Solutions, Calibration Standards, and QC Samples

The stock solutions of morphine and IS were prepared by dissolving accurately weighed amounts in methanol to give a final concentration of 1000 µg/mL and 500 ng/mL, respectively. The stock solution of sufentanil was prepared by dissolving an accurately weighed amount in ultrapure water and further diluting with methanol to obtain a series of working solutions from 5 to 50 000 ng/mL. Similarly, a standard stock solution of morphine was diluted with methanol to obtain a series of working solutions from 1000 to 100 000 ng/mL. All solutions were stored at 4–8°C and brought to room temperature before use. Blank human blood was collected with heparin from healthy, drug-free volunteers. After centrifugation, blank plasma was collected and stored at –20°C until used. The calibration standards and QC samples were prepared by spiking blank plasma with

Table 2. Interday precision and accuracy for the determination of sufentanil (S) and morphine (M) in human plasma

	RSD, %		Bias, %[a]	
QC	S[b]	M[c]	S	M
Low	3.3	6.9	0.0	2.1
Medium	1.3	5.0	2.7	20.0
High	7.3	1.8	28.0	14.2

[a] Bias = [(measured concentration – nominal concentration)/nominal concentration)] × 100.
[b] Sufentanil QC: 0.15 (low), 200 (medium), 400 (high) ng/mL.
[c] Morphine QC: 30 (low), 400 (medium), 800 (high) ng/mL.

Table 3. Robustness of the determination of sufentanil (S) and morphine (M) in human plasma

QC		Mobile phase concentration		Mobile phase flux		Column temperature	
		RSD, %	Accuracy, %	RSD, %	Accuracy, %	RSD, %	Accuracy, %
S	Low	1.0	96.9	1.0	102.9	2.4	99.5
	Medium	5.6	99.9	0.7	101.5	2.6	107.0
	High	4.8	103.2	11.0	101.1	8.5	96.5
M	Low	0.6	102.3	0.7	96.2	0.0	97.80
	Medium	3.00	107.00	2.70	99.10	0.80	95.10
	High	0.60	111.70	2.00	93.60	8.60	91.60

working solution. Calibration standards were made at 0.05, 0.5, 5.0, 50, 100, 250, and 500 ng/mL for sufentanil and 10, 25, 50, 100, 250, 500, and 1000 ng/mL for morphine. The QC samples were prepared in pooled plasma with the concentrations of 0.15 (low), 200 (medium), and 400 (high) ng/mL for sufentanil, and 30 (low), 400 (medium), and 800 (high) ng/mL for morphine. They were divided into aliquots that were stored at –20°C until analysis.

Plasma Extraction Procedure

A total of 600 µL spiked plasma was transferred to a 15 mL glass tube, followed by addition of 50 µL IS solution (500 ng/mL fentanyl in methanol) and 50 µL NaOH, 0.1 M. All samples were vortex-mixed for 2 min. Then, a 5000 µL aliquot extraction solvent, diethyl ether–dichloromethane (70 + 30, v/v), was added using a Dispensette Organic bottletop dispenser (Brand GmbH, Wertheim, Germany). The tubes were vortex-mixed for 2 min and then centrifuged (Eppendorf 5804 R, rotor A-4-44 with 17 cm radius; Eppendorf America, Hauppauge, NY) for 10 min at 3500 × *g* and 4°C. The samples were frozen with dry ice. The organic layer was transferred into 15 mL conical glass tubes and evaporated under a nitrogen stream while immersed in a 45°C water bath. Each sample was reconstituted with 150 µL mobile phase. The samples were transferred to autosampler vials and 30 µL was injected into the HPLC system.

Bioanalytical Method Validation

The method was validated by the determination of the following parameters: matrix effects, selectivity, linearity, range, recovery, accuracy, precision, LOQ, and stability (25).

(a) *Selectivity and matrix effect.*—The selectivity was assessed using six blank human plasma samples, randomly selected from different sources (including hemolyzed and lipemic plasma), that were subjected to the extraction procedure and chromatographed to determine the extent to which endogenous plasma components could interfere in the analysis of the sufentanil, morphine, and IS. The results were compared to a solution (LOQ) containing 0.05 (sufentanil) and 10 (morphine) ng/mL.

The matrix effects were evaluated according to the literature (31–36). Three replicates of low, medium, and high QC samples were spiked, each one with six samples of blank human plasma from different sources. The mean peak areas of each QC sample were compared to the mean peak areas of the neat references (sufentanil, morphine, and IS dried and reconstituted in mobile phase) at the same concentrations.

(b) *Calibration curves.*—The calibration curves were constructed from a blank sample (a plasma sample processed without IS), a zero sample (a plasma processed with IS), and seven concentrations including the LOQ ranging from 0.05 to 500 ng/mL for sufentanil and 10 to 1000 ng/mL for morphine. The blank sample and the zero sample were used to check for any kind of interference, from volunteer plasma for example, or another kind of mistake from the analytical process. The peak area ratio of the drug to the IS against the respective standard concentration (x) was used for plotting the curve, and the linearity was evaluated by a weighted ($1/x^2$) least squares regression analysis. This linear regression was used due to curve fitting, as well as increasing the accuracy of the low concentration (QC) levels. The acceptance criteria for each calculated standard concentration was not more than 15% deviation from the nominal value, except for the LOQ that was set at 20%.

(c) *Recovery.*—The analytical recovery was calculated (*see* equation below) by comparing chromatographic peak areas from unextracted standard samples and from extracted

Table 4. Recovery of sufentanil (S), morphine (M), and fentanyl (IS) after the extraction procedure

QC	Recovery (%) (mean ± RSD, %)		
	S[a, b]	M[a, c]	IS[a]
Low	90.4 ± 12.9	94.8 ± 9.1	95.1 ± 9.7
Medium	92.2 ± 3.2	100.2 ± 7.2	82.5 ± 1.7
High	89.4 ± 9.7	106.1 ± 3.3	104.3 ± 5.4
Mean	90.6 ± 8.6	100.3 ± 6.5	94.0 ± 5.6

[a] Mean of six replicates.
[b] Sufentanil QC: 0.15 (low), 200 (medium), 400 (high) ng/mL.
[c] Morphine QC: 30 (low), 400 (medium), 800 (high) ng/mL.

Table 5. Summary of stability of sufentanil (S) and morphine (M) in human plasma

Stability	RSD, %		Bias, %[a]	
	S	M	S	M
Short-term 4 h[b]	3.0	1.5	1.1	−1.6
	6.5	0.4	4.3	2.4
Autosampler 48 h	7.4	1.7	7.9	−6.1
	3.0	2.0	0.7	2.5
Three freeze-thaw cycles	3.0	1.1	1.1	4.5
	8.5	8.4	−4.3	−4.8
Long-term, 13 days[c]	8.3	6.0	−14.5	−8.4
	4.2	3.6	−7.0	−10.6

[a] Bias = [(measured concentration − nominal concentration)/nominal concentration)] × 100.

[b] Short-term = Stability in neat plasma for up to 4 h at room temperature.

[c] Long-term = Stability for at least 137 days at −20°C.

standard samples at three different concentrations, 0.15, 200, and 400 ng/mL for sufentanil, and 30, 400, and 800 ng/mL for morphine, and 500 ng/mL for the IS. The unextracted standard were prepared with samples of plasma where the addition of IS, sufentanil, and morphine occurred after the plasma extraction procedure. The extracted sample was prepared with the normal plasma extraction procedure.

$$Recovery,\% = (extracted\ mean/unextracted\ mean) \times 100$$

(d) *LOQ and LOD.*—The lowest standard concentration on the calibration curve should be accepted as the LOQ if the following conditions are met: the analyte peak response at the LOQ should be at least five times the response compared to blank response, and analyte peak (response) should be identifiable, discrete, and reproducible with a precision of 20% and accuracy of 80–120% (25).

(e) *Accuracy and precision.*—To evaluate the interday precision and accuracy, the QC samples were analyzed together with one independent calibration standard curve for 3 days, while intraday precision and accuracy were evaluated through analysis of validation control samples at three different concentrations in six replicates on the same day. Interday and intraday precision were expressed as RSD. The accuracy was expressed as the percent ratio between the experimental concentration and the nominal concentration for each sample. The evaluation of precision was based on the criteria (25) that the deviation of each concentration level should be within ±15%, except for the LOQ for which it should be within ±20%. Similarly, for accuracy the mean value should not deviate by more than ±15% of the nominal concentration except the LOQ, where it should not deviate by more than ±20% of the nominal concentration.

(f) *Robustness.*—The robustness was evaluated when control samples were analyzed with altered chromatography parameters. These alterations corresponded to mobile phase concentration (70 + 30 to 65 + 35, v/v), mobile phase flow rate (1.0 to 1.1 mL/min), and column temperature (40 to 35°C). The extraction parameters had been checked during the method development, when in accordance with recovery the best condition was chosen.

(g) *Stability.*—The samples were stored at −20°C. The freeze-thaw stability of sufentanil and morphine was determined in low and high QC samples ($n = 3$) over three freeze-thaw cycles within 3 days. In addition, at room temperature 22°C, short (4 h) and processed (48 h) sample stability were also studied. Three aliquots each of the low and high QC samples were frozen at −20°C for 137 days. The samples were analyzed and the results were compared with that of the zero cycle. The samples were considered stable if

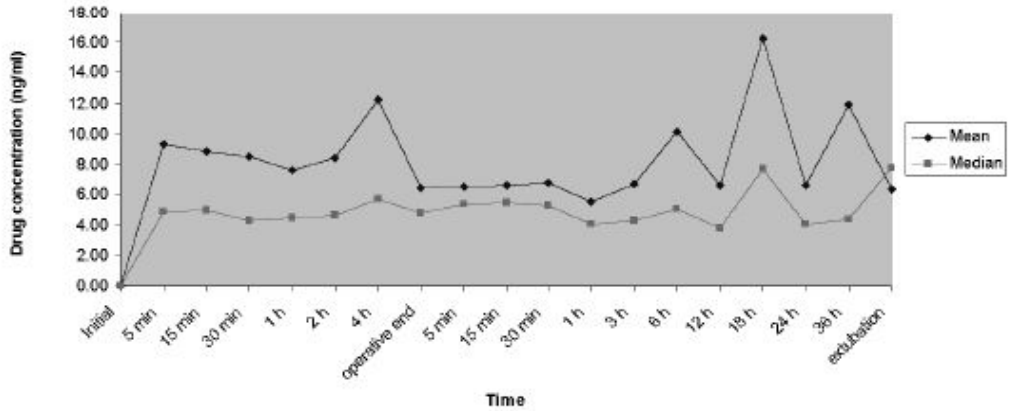

Figure 3. Representative mean and median plasma concentration versus time profiles after administration of 400 μg intrathecal morphine anaesthesia and 11 mg morphine PCA to patients undergoing cardiac surgery.

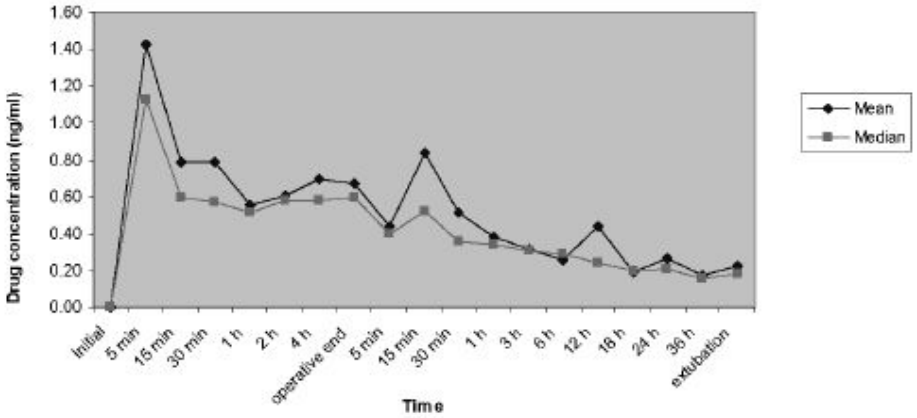

Figure 4. Representative mean and median plasma concentration versus time profiles after administration of 0.50 μg/kg intravenous sufentanil anaesthesia and 0.50 μg/kg/h continuous sufentanil to patients undergoing cardiac surgery.

the deviation (expressed as percentage bias) from the zero cycle was within ±15%.

Results and Discussion

The coupling of HPLC with MS/MS detection showed high selectivity because only the ions derived from the analytes of interest were monitored, and the comparison of the chromatograms of the blank and spiked human plasma indicated that no interferences were detected from endogenous substances (Figure 1). Typical chromatograms obtained by the proposed HPLC/MS/MS method with the resolution of the symmetrical peak corresponding to sufentanil, morphine and IS are shown in Figure 2. The low retention times of 1.44 min (sufentanil) and 1.15 min (morphine) allow a rapid determination of the drugs, which is an important advantage for the routine analysis.

Matrix effects were examined and the RSD values of the mean peak areas of sufentanil, morphine, and IS were <6.26%, indicating low difference in ionization efficiency using different plasma samples. The results were higher than 93.24%, suggesting that the ion suppression by endogenous components was not interfering in the repeatability of the method.

The linearity was determined by six determinations of seven concentrations in the range of 0.05–500 ng/mL (sufentanil) and 10–1000 ng/mL (morphine). The r values (0.9991 for sufentanil and 0.9979 for morphine) indicated significant linearity of the calibration curves for the method. The sufentanil LOQ evaluated in an experimental assay was 0.05 ng/mL (S/N > 5:1), and LOD was found to be 0.025 ng/mL (S/N > 1:3). The morphine LLOQ evaluated in an experimental assay was 10 ng/mL (S/N > 5:1), and LOD was found to be 5.0 ng/mL (S/N > 1:3). The validation results demonstrated good precision and accuracy (Tables 1 and 2) in the linearity range. The RSD values (precision) were less than 15%, accuracy was 85–115% in accordance with regulatory guidelines (25). The data showed that the method possesses adequate chromatography robustness (Table 3).

Martens-Lobenhoffer (26) proposed an HPLC/MS/MS method and prior liquid–liquid extraction into alkaline medium with a linear range of 10–500 pg/mL for sufentanil determination in serum. The recovery in his study was 75% for sufentanil and 74% for fentanyl, lower than the present study. The results of the liquid–liquid extraction method developed using diethyl ether and dichloromethane as the extraction solvent allowed mean recoveries of sufentanil (91%), morphine (100%), and IS (94%) at the specified concentration levels, confirming the suitability of the method for the plasma samples (Table 4). For the extraction, different organic solvents and mixtures were also evaluated, including ethyl acetate and acetonitrile; however, the recovery was worse than achieved with diethyl ether and dichloromethane.

As shown in Table 5, the plasma samples were stable for at least 137 days at –20°C (long term) and after three freeze-thaw cycles, demonstrating that human plasma samples could be thawed and refrozen without compromising their integrity. Sufentanil and morphine were stable in neat plasma for up to 4 h at room temperature (short term). The results demonstrated that extracted samples could be analyzed after storage in the autosampler for at least 48 h at room temperature 22°C with an acceptable precision and accuracy.

The validated method was successfully used to quantify sufentanil and morphine in human plasma of patients undergoing cardiac surgery. The study protocol was approved by an Ethics Committee from the School of Pharmaceutical Sciences of USP, São Paulo, Brazil. Patients gave written informed consent to participate in the study. Patients received 0.50 μg/kg intravenous sufentanil and 400 μg intrathecal morphine anaesthesia; during surgery they received

0.50 µg/kg/h infusion bomb (Anne, Abbott, Chicago, IL) sufentanil. Morphine patient-controlled analgesia (11 mg) was performed by a venous catheter after the orotracheal extubation in the intensive care unit after surgery. A series of blood samples was collected from the venous catheter of patients: at the preoperative period (initial, 5 min after induction); during the operative period (15 min, 30 min, 1 h, 2 h, and 4 h, and at the end of the surgery); at the postoperative period (5 min, 15 min, 30 min, 1 h, 3 h, 6 h, 12 h, 18 h, 24 h, and 36 h, and after extubation). The mean and median plasma concentrations versus time profiles for 11 subjects are presented in Figures 3 and 4.

Conclusions

A simple and fast HPLC/MS/MS method for the determination of sufentanil and morphine in human plasma was developed and validated. This method involves a single step liquid–liquid extraction procedure using fentanyl, a commercially available substance, as an internal standard. The results of the validation studies show that the optimized HPLC/MS/MS method possesses selectivity, sensitivity, linearity, precision, and accuracy over the entire range of significant therapeutic plasma concentrations. Moreover, the proposed method was successfully applied for the determination of sufentanil and morphine in patients undergoing cardiac surgery.

Acknowledgments

We wish to thank Prati, Donaduzzi & Cia Ltda for financial support and Biocinese–Center of Biopharmaceutic Studies for laboratory analytical support.

References

(1) Silva, P. (2000) *Farmacologia*, Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, Brazil

(2) Scott, B.H. (1998) *Int. J. Cardiol.* **64**, 535–541

(3) Hardman, J.G., Gilman, A.G., & Limbird, L.E. (2001) *Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics*, McGraw-Hill Book Co., New York, NY

(4) Christrup, L.L. (1997) *Acta Anaesth. Scand.* **41**, 116–122

(5) Lejus, C., Schoerer, D., Furic, I., Le Moing, J.-P., Levron, J-C., & Pinaud, M.B.J. (2000) *Br. J. Anaesth.* **85**, 615–617

(6) Michiels, M., & Hendriks, R. (1996) *J. Clin Pharmacokinet.* **31**, 275–292

(7) Hansdottir, V., Hedner, T., Woestenborghs, R., & Nordberg, G. (1983) *J. Pharm. Pharmacol.* **35**, 86–93

(8) Woestenborghs, R.J.H., Timmerman, P., Cornelissen, M., Van Rompaey, F., Gepts, E., Camu, F., Heykants, J., & Stankis, D. (1994) *Anesthesiology* **80**, 666–670

(9) Palleschi, L., Lucentini, L., Ferretti, E., Anastasi, F., Amoroso, M., & Draisci, G.J. (2003) *J. Pharm. Biomed. Anal.* **32**, 329–336

(10) Schmidt, R., Bremerich, D.H., & Geisslinger, G. (2006) *J. Chromatogr. B* **836**, 98–107

(11) Chapman, D.J., Joel, S.P., & Aherne, G.W. (1994) *J. Pharm. Biomed. Anal.* **12**, 353–360

(12) Chapman, D.J., Cross, M.J., Joel, S.P., & Aherne, G.W. (1995) *Ann. Clin. Biochem.* **32**, 297–302

(13) Lee, J.W., Pedersen, J.E., Moravetz, T.L., Dzerk, A.M., Mundt, A.D., & Shepard, K.V. (1991) *J. Pharm. Sci.* **80**, 284–288

(14) Abbott, R.W., Townshend, A., & Gill, R. (1987) *Analyst* **112**, 397–406

(15) Bouquillon, A., Freeman, D., & Moulin, D.E. (1992) *J. Chromatogr.* **577**, 354–357

(16) Rotshteyn, Y., & Weingarten, B. (1996) *Ther. Drug Monit.* **18**, 179–188

(17) Svensson, J.O., Yue, Q.Y., & Sawe, J. (1995) *J. Chromatogr. B* **674**, 49–55

(18) Caldwell, R., & Challenger, H. (1989) *Ann. Clin. Biochem.* **26**, 430–443

(19) Christophersen, A.S., Biseth, A., Skuterud, B., & Gadeholt, G. (1987) *J. Chromatogr.* **422**, 117–124

(20) Johansen, M., Rasmussen, K.E., & Christophersen, A.S. (1990) *J. Chromatogr.* **532**, 277–284

(21) Krogh, M., Christophersen, A.S., & Rasmussen, K.E. (1993) *J. Chromatogr.* **621**, 41–48

(22) Hofmann, U., Seefried, S., Schweizer, E., Ebner, T., Mikus, G., & Eichelbaum, M. (1997) *J. Chromatogr. B* **727**, 81–88

(23) Leis, H.J., Fauler, G., Raspotnig, G., & Windischhofer, W. (2000) *J. Chromatogr. B* **744**, 113–119

(24) Wasels, R., Belleville, F., Paysant, P., Nabet, P., & Krakowski, I. (1989) *J. Chromatogr.* **489**, 411–418

(25) U.S. Food and Drug Administration (2001) *Guidance for Industry, Bioanalytical Method Validation*, Center for Drug Evaluation and Research, Rockville, MD

(26) Martens-Lobenhoffer, J. (2002) *J. Chromatogr. B* **769**, 227–233

(27) Bosch, M.E., Rojas, A.R.S., & Ojeda, C.B. (2007) *J. Pharm. Biom. Anal.* **43**, 799–815

(28) Pacifici, R., Pichini, S., Altieri, I., Caronna, A. Passa, A.R., & Zuccaro, P. (1995) *J. Chromatogr. B* **664**, 329–334

(29) Naidong, W., Lee, J.W., Jiang, X., Wehling, M., Hulse, J.D., & Lin, P.P. (1999) *J. Chromatogr. B* **725**, 255–269

(30) Concheiro, M., Castro, A., Quintela, O., López-Rivadulla, M., & Cruz, A. (2006) *J. Chromatogr. B* **832**, 81–89

(31) Oliveira, P.R., Brum Junior, L., Fronza, M., Bernardi, L.S., Masiero, S.M.K., & Dalmora, S.L. (2006) *Chromatographia* **63**, 315–320

(32) Lai, L., Ma, L., Chen, X.J., Wang, G.J., Wang, J.P., & Davey, A.K. (2006) *Chromatographia* **64**, 655–659

(33) Xu, P., Li, H.-D., Zhu, Y.-G., Chen, B-M., Ma, N., Xie, Y.-L., & Zhang, B.-K. (2008) *Chromatographia* **67**, 935–939

(34) Yuan, B., Wang, X., Zhang, F., Jia, J., & Tang, F. (2008) *Chromatographia* **68**, 533–539

(35) Guo, D., Xiong, Y., Zhang, Y., Wu, Z., Gui, L., & Chen, J. (2009) *J. Chromatogr. B* **877**, 323–327

(36) Wahajuddin, Singh, S.P., & Jain, G.K. (2009) *J. Chromatogr. B* **877**, 1133–1139

Copyright of Journal of AOAC International is the property of AOAC International and its content may not be copied or emailed to multiple sites or posted to a listserv without the copyright holder's express written permission. However, users may print, download, or email articles for individual use.