UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Programa de Pós-Graduação em Fármaco e Medicamentos
Área de Produção e Controle Farmacêuticos

Monitoramento do propranolol em crianças submetidas a correção cirúrgica da Tetralogia de Fallot através de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência – Fluorescência.

CRISTINA SANCHES

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE

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

São Paulo
2007

CRISTINA SANCHES

Monitoramento do propranolol em crianças submetidas a correção cirúrgica da Tetralogia de Fallot através de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência – Fluorescência.

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE

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

São Paulo
2007

***“Seja qual for o teu sonho, comece...
Ousadia tem genialidade, poder e magia”
Julian Wolfgang Goethe***

DEDICATÓRIA

Ao Reginaldo, pelo amor, paciência,
compreensão e carinho durante esta caminhada,
e por ser, acima de tudo, companheiro.

A Pedro e Marlene, meus pais, e Rafael, meu irmão,
pelo apoio, amor e dedicação incondicionais em
todos os momentos de minha vida.

AGRADECIMENTOS

À Deus, pelas graças concedidas.

À Professora Silvia Regina Cavani Jorge Santos,
por acreditar e tornar possível a realização deste sonho,
pelos ensinamentos e conselhos que levarei pela vida
e por ser um exemplo de constante amor e
dedicação à vida acadêmica.
A você minha admiração e respeito.

Aos amigos do laboratório (Adriana, Carlos, Dani, Gislei,
Grazi, Karen, Karina, Mauro, Verônica)
pelos momentos inesquecíveis que compartilhamos.

À equipe de Anestesiologia do
Instituto do Coração HC FMUSP (Profa. Maria José,
Filomena e Anne) pela valiosa parceria na
realização deste trabalho.

Aos pacientes que aceitaram participar deste projeto acadêmico.
Espero que de alguma forma, tenhamos contribuído para
a melhora da farmacoterapia no país.

À Pós-graduação da Faculdade de Ciências Farmacêuticas
pela oportunidade de realizar o Mestrado,
em especial à Beth.

À CAPES, por acreditar e incentivar
a formação de pessoal de ensino superior e
a pesquisa no país.

À minha nova família (por opção)
Reginaldo, Judith, Débora e Vinícius, por me receberem
sempre de braços abertos e com tanto carinho.

À Regina e à Dra. Rita,
pelo apoio para a realização deste trabalho.

Aos amigos queridos que torceram por mim
durante a realização deste trabalho.

Resumo

O objetivo do presente trabalho foi validar micrométodo simples e sensível para a quantificação do propranolol em plasma utilizando CLAE – F com a finalidade de aplicação no monitoramento das concentrações de propranolol durante o *washout*. Necessitou-se apenas de 200mcL de plasma. Os tempos de retenção para o fármaco e o padrão interno (verapamil) foram 8,4 e 17,5min, respectivamente, utilizando coluna de fase reversa C18, (150 x 6mm, 5micra) e fase móvel consistindo de tampão acetato 0,1M, pH5,0 e acetonitrila (60:40, v/v), 0,7 mL/min, detecção 290nm (Ex) e 358nm (Em) em sistema isocrático de eluição. A validação deste método analítico avaliada através dos limites de confiança apresentou sensibilidade de 0,02 ng/mL (LD), linearidade na faixa compreendida entre 0,05 -1000ng/mL e 4,7% e 8,6% para precisão intra- e inter-dias, respectivamente. Observou-se, também, boa exatidão e alta seletividade para este método. Concluindo, o método analítico apresentado para a quantificação do propranolol mostrou elevada sensibilidade para quantificação do propranolol. Após a última dose pré-operatória, as concentrações plasmáticas do propranolol normalizadas com o hematócrito de seis pacientes pediátricos, expressas através das medianas, foram: 7,09 ng/mL no início da cirurgia, 2,69 ng/mL no início da CEC, 1,14 ng/mL intra-CEC, 2,79 ng/mL no pós-CEC, e 2,70 ng/mL no final da cirurgia. No pós-operatório tardio, registraram-se as medianas 0,63 ng/mL no 1ºPO e 0,03 ng/mL no 2ºPO. Registrou-se declínio de 7,09 para 2,70 ($p<0,05$) da concentração de propranolol (normalizada) do início da cirurgia comparado ao início da CEC. Apesar do prolongado tempo de residência média (MRT) de 35,8 h as concentrações do propranolol mostraram redução significativa do 1º PO para o 2º PO, indicando que restaurada a redistribuição, a eliminação foi completa.

Palavras-chaves: Propranolol, Tetralogia de Fallot, Cirurgia cardíaca, Concentração plasmática, CLAE-F.

Abstract

The objective of the present study was to develop a simple and sensitive micromethod for the quantification of propranolol in plasma using HPLC-fluorescence for drug plasma concentration monitoring during the washout. Only 200mcL of biological sample was necessary. The retention times of the drug and its internal standard (verapamil) were 8.4 and 17.5 min, respectively, using a C18 reverse-phase column and a mobile phase consisting of 0.1 M acetate buffer, pH 5.0, and acetonitrile (60:40, v/v), with detection at $\lambda_{\text{ex}} = 290 \text{ nm}$ and $\lambda_{\text{em}} = 358 \text{ nm}$ in an isocratic elution system. Validation of this analytical method showed that it was highly sensitive, with a detection limit of 0.02 ng/ml, linearity in the range of 0.05 to 1000 ng/mL, and intra- and inter-day precision of 4.7 and 8.6%, respectively. In addition, the method showed good accuracy and high selectivity. Analytical method validated showed high sensitivity for the quantification of propranolol; then this method was applied to quantify propranolol in plasma of children during the surgery for correction of tetralogy of Fallot including a followup at the first and second days of the intervention. The plasma propranolol concentrations, hematocrit normalized, after the last preoperative dose, expressed as medians, were: 7.09 ng/mL at the beginning of surgery, 2.69 ng/mL at the beginning of cardiopulmonary bypass (CPB), 1.14 ng/mL during CPB, 2.79 ng/mL after CPB, and 2.70 ng/mL at the end of surgery. Median of late postoperative propranolol concentrations were 0.63 ng/mL on postoperative day 1 and 0.03 ng/mL on day 2. A significant decline on the normalized propranolol concentration was observed between the beginning of surgery and the beginning of CPB. In addition, in spite of the prolonged mean residence time of 35.8 hours, the propranolol concentrations decreased significantly at the postoperative period on day 1 up to day 2, indicating that, once the redistribution is restored, the washout of drug was completed.

Keywords: Propranolol, Tetralogy of Fallot, Heart surgery, Plasma concentration, HPLC-F.

Listagem de Ilustrações

Figura 1 -	Desenho ilustrativo das lesões fisiopatológicas presentes na Tetralogia de Fallot	16
Figura 2 -	Estrutura química do propranolol	21
Figura 3 -	Perfil cromatográfico do plasma extraído	55
Figura 4 -	Perfil cromatográfico do propranolol em plasma	57
Figura 5 -	Curva de calibração diária para o fármaco em plasma, utilizando o verapamil como padrão interno	58
Figura 6 -	Linearidade do propranolol	59
Figura 7 -	Curva do estudo da Recuperação Absoluta do propranolol	61
Figura 8 -	Curva do estudo de Recuperação Relativa do propranolol	61
Figura 9 -	Curva do estudo da Precisão Intra-dia do propranolol	62
Figura 10 -	Curva do estudo da Precisão Inter-dia do propranolol	63
Figura 11 -	Curva do estudo da Exatidão do propranolol	63
Figura 12 -	Curva de decaimento das concentrações plasmáticas do propranolol (medianas).	79
Figura 13-	Curva de decaimento das concentrações plasmáticas do propranolol <i>versus</i> curva de decaimento do hematócrito durante a CEC	80
Figura 14-	Decaimento das concentrações plasmáticas do propranolol (medianas) em seis pacientes no início e final da cirurgia	80
Figura 15-	Decaimento das concentrações plasmáticas do propranolol (medianas) em seis pacientes durante a CEC	81
Figura 16-	Decaimento das concentrações plasmáticas do propranolol (medianas) em seis pacientes no final da cirurgia, 1º e 2ºPO.	82
Figura 17-	Decaimento individual das concentrações plasmáticas de propranolol	84

Listagem de Tabelas

Tabela 1 - Mudanças fisiológicas e bioquímicas observadas durante o desenvolvimento	26
Tabela 2- Características individuais dos pacientes investigados	37
Tabela 3- Dados individuais dos pacientes investigados relativos a dose, intervalo de tempo entre a última administração de propranolol e o início da cirurgia, e a duração dos procedimentos de cirurgia e de circulação extracorpórea	38
Tabela 4- Limites de confiança para o método analítico de determinação de propranolol plasmático	60
Tabela 5 - Estudos de precisão intra e inter-dias e exatidão do propranolol	62
Tabela 6 - Estabilidade do propranolol após ciclos de congelamento / descongelamento, concentração 15,6 ng/mL (n=3).	65
Tabela 7 - Estabilidade do propranolol após ciclos de congelamento / descongelamento, concentração 250ng/mL. (n=3)	65
Tabela 8- Estabilidade do propranolol no tempo e condição de análise, para três concentrações, amostras reais (250, 62,5 e 15,6ng/mL) (n=3).	66
Tabela 9- Estabilidade de longa duração do propranolol, concentração 7,8 ng/mL (n=3)	67
Tabela 10- Estabilidade de longa duração do propranolol concentração 500ng/mL (n=3)	67
Tabela 11- Estabilidade da solução padrão de propranolol, mantida a temperatura ambiente por 6 horas, previamente à extração, concentração 7,8 ng/mL	68
Tabela 12- Estabilidade da solução padrão de propranolol mantida a temperatura ambiente por 6 horas, previamente à extração, concentração 500ng/mL	69
Tabela 13- Estabilidade da solução do padrão interno (verapamil 100µg/mL), mantido a temperatura ambiente por 6h, previamente à extração.	70
Tabela 14- Características da população de pacientes portadores da Tetralogia de Fallot	71

Tabela 15-	Última dose administrada na noite que precedeu a cirurgia, intervalo decorrido entre a administração da última dose de propranolol no pré-operatório e o início da cirurgia	73
Tabela 16-	Comparação entre as concentrações plasmáticas do propranolol no transoperatório da cirurgia de pacientes com Tetralogia de Fallot, valor obtido versus valor corrigido com o hematócrito	75
Tabela 17-	Comparação entre concentrações plasmáticas obtidas para o propranolol nos diversos períodos no transoperatório	77
Tabela 18-	Comparação entre concentrações plasmáticas corrigidas para o propranolol nos diversos períodos no transoperatório	78
Tabela 19-	Disponibilidade sistêmica do propranolol no transoperatório.	83

Lista de Fluxograma

Fluxograma 1 - Quantificação do propranolol plasmático

44

Listagem de abreviaturas e siglas

1ºPO	Primeiro dia de pós operatório
2º PO	Segundo dia de pós operatório
AUC	Área sobre a curva
CEC-H	Circulação Extra Corpórea com Hipotermia
CLAE-F	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência – Fluorescência
Cp	Concentração plasmática
CQ	Controle de Qualidade
CV%	Coeficiente de Variação
EDTA	Etilenodiaminotetracético sal sódico
g	Grama
Ht%	hematócrito
IC95%	Intervalo de Confiança 95%
IMC	Índice de Massa Corpórea
IOP	Intra-operatório
Kg	Quilograma
L	litros
LD	Limite de detecção
LQ	Limite de quantificação
m	Metro
M	Molar
m ²	Metro quadrado
mcg	Micrograma
mcL	Microlitro
mg	Miligrama
min	Minutos
mL	Mililitro
mm	Milímetro
MRT	Tempo de Residência Média
N ₂	Nitrogênio
nm	Nanômetro
p	Significância estatística
PI	Padrão Interno
POI	Pós-operatório imediato
R ²	Coeficiente de correlação linear
T4F	Tetralogia de Fallot
v/v	Volume por volume

Listagem de símbolos

β	beta
λ_{em}	Comprimento de onda de emissão
λ_{ex}	Comprimento de onda de excitação
+/-	Mais ou menos
°C	Graus Célcus

Sumário

1 - INTRODUÇÃO	26
2 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	29
2.1 Tetralogia de Fallot.....	29
2.2 Propranolol.....	34
2.4 A cirurgia cardíaca com Circulação Extra Corpórea.....	42
2.5 Determinação do propranolol em plasma.....	46
3 - OBJETIVOS.....	48
3.1 Principal	48
3.2 Secundários.....	48
4 - MATERIAL E MÉTODOS.....	49
4.1 Etapa Clínica.....	49
4.1.1 Critérios de inclusão no estudo.....	49
4.4.2 Critérios de exclusão no estudo.....	49
4.1.3 Casuística	50
4.1.3 Desenho do protocolo clínico.....	51
4. 2 Etapa analítica	54
4.2.1 Reagentes, soluções e padrões de referência.....	54
4.2.2 Procedimento de Extração.....	56
Fluxograma 1. Quantificação do propranolol plasmático através de CLAE-F.....	58
4.2.3 Análise Cromatográfica.....	59
4.3 Validação do método analítico.....	60
4.3.1 Especificidade.....	60
4.3.2. Limite de Detecção e Quantificação.....	61
4.3.3 Linearidade.....	61
4.3.4 Curva de calibração.....	62
4.3.5 Estudos de recuperação	63
4.3.5.1 Recuperação absoluta.....	64
4.3.5.2 Recuperação relativa.....	64
4.3.6 Exatidão	64
4.3.7 Precisão intra e inter-dia.....	65
CMD.....	65
4.3.8 Estabilidade.....	66
4.3.9 Robustez.....	67
4.4 Análise Estatística e cálculo do tempo de residência média.....	68
5. RESULTADOS.....	69
5.1 Validação do método analítico	69
5.1.1 Especificidade.....	69
5.1.2 Perfil cromatográfico.....	70
5.1.3 Limites de Confiança	72
5.1.4 Estabilidade do Propranolol.....	79
Concentração obtida.....	81

após 18hs(a)	81
5.2 Monitoramento terapêutico de propranolol nos pacientes cirúrgicos.....	86
Cirurgia.....	89
6. DISCUSSÃO	98
6.1 Validação do método analítico.....	98
6.2 Quantificação de propranolol no plasma de pacientes submetidos à correção da Tetralogia de Fallot.....	100
7. CONCLUSÃO.....	107
8 - REFERÊNCIAS	108
Apêndices.....	118
Faculdade de Ciências Farmacêuticas.....	119
TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO.....	119
I – DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU LEGAL RESPONSÁVEL.....	119
II – DADOS SOBRE A PESQUISA.....	119
III – REGISTRO DAS EXPLICAÇÕES DO PESQUISADOR AO PACIENTE OU SEU.....	120
SUJEITO DA PESQUISA.....	121
V – INFORMAÇÕES DE NOMES, ENDEREÇOS E TELEFONES DOS RESPONSÁVEIS.....	121
Anexos.....	124

1 - INTRODUÇÃO

A população pediátrica é caracterizada por um número limitado de pacientes, grande variação de idade, estágios de desenvolvimento diferentes, estratégias de tratamento e diagnóstico estritos e sensibilidade farmacológica e toxicológica. Existem poucos estudos acerca da segurança e eficácia dos fármacos além de apresentações farmacêuticas voltadas apenas para o público adulto. O que torna a investigação medicamentosa na população pediátrica um assunto crítico e urgente (LÄER *et al.*, 2005).

A Tetralogia de Fallot (T4F) corresponde a 10% de todas as cardiopatias congênitas, sendo a cianótica mais comum na primeira infância (HAY *et al.*, 1993). Observa-se um defeito no septo ventricular e uma obstrução severa no fluxo do ventrículo direito, sendo associado hipertrofia ventricular e diminuição do fluxo sanguíneo na aorta. Poucas crianças são assintomáticas, a maioria apresentam cianose a partir dos 4 meses de idade, normalmente progressiva, levando a crescimento e desenvolvimento retardados. Além disso, a fadiga e a dispnéia no exercício e períodos de hipóxia são comuns neste tipo de paciente. Os bloqueadores de receptores beta-adrenérgicos apresentam grande valor terapêutico no atendimento de pacientes com obstrução funcional do fluxo ventricular. Desta forma, o propranolol pode ser utilizado com sucesso nas três situações: controle do ataque de dispnéia aguda; redução das crises de hipóxia e na melhora das condições clínicas das crianças que aguardam a correção cirúrgica. Por outro lado, altas doses do propranolol são requeridas para manter a eficácia desejada sendo uma desvantagem na clínica uma

vez que altas concentrações sanguíneas podem causar sérios problemas respiratórios, diminuição no débito cardíaco e insuficiência cardíaca (CUMMING, 1970).

Pacientes com Tetralogia de Fallot devem ser submetidos à correção cirúrgica, que envolve o fechamento do defeito do septo inter-ventricular e alívio da obstrução do fluxo do ventrículo direito (VAN ARSDELL *et al.*, 2000; PIGULA *et al.*, 1999; GARSON *et al.*, 1980). A administração de propranolol no período pré-operatório é vantajosa e tem demonstrado uma redução na incidência de eventos isquêmicos, hipertensão e taquidisritmias secundárias (CARMONA, 2005). Uma vez que a circulação extracorpórea e hipotermia causam mudanças nas concentrações plasmáticas de propranolol, torna-se importante o monitoramento da concentração plasmática do fármaco no intra e pós-operatório da cirurgia para correção da anomalia.

Na tentativa de determinar as concentrações plasmáticas do propranolol diferentes métodos têm sido desenvolvidos (BOUDOULAS *et al.*, 1978; RAO *et al.*, 1978; SHAND *et al.*, 1970; WALLE *et al.*, 1975; DRUMMER *et al.*, 1981; FU *et al.*, 1989; HARRISON *et al.*, 1985; HEDEEN *et al.*, 1991; KOSHAKJI *et al.*, 1986; SOOD *et al.*, 1988). Muitos problemas relacionados principalmente com a seletividade, sensibilidade e a escolha do padrão interno para o método cromatográfico foram extensamente discutidos anteriormente (DRUMMER *et al.*, 1981; FU *et al.*, 1989; HARRISON *et al.*, 1985; HEDEEN *et al.*, 1991; KOSHAKJI *et al.*, 1986; SOOD *et al.*, 1988).

Uma importante limitação do monitoramento terapêutico em pacientes pediátricos é o volume de plasma necessário para a quantificação do fármaco. Sendo assim, uma vez que necessitamos quantificar o propranolol em concentrações muito baixas, durante *washout* de pacientes pediátricos submetidos à correção da Tetralogia de Fallot, o objetivo do estudo no presente período foi realizar a otimização e validação

de método analítico para monitoramento posterior do propranolol após a última dose pré-operatória, durante o período intraoperatório e pós-operatório da cirurgia de correção da anomalia em crianças.

2 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Tetralogia de Fallot

A Tetralogia de Fallot consiste em defeito do septo ventricular e obstrução severa do fluxo do ventrículo direito, sendo que, o desvio intracardíaco é predominantemente da esquerda para a direita e corresponde a 10% das cardiopatias congênitas, sendo a cianótica mais comum na primeira infância. O defeito ventricular está normalmente localizado na porção membranosa do septo, podendo também estar totalmente envolvido pelo tecido muscular sendo normalmente amplo. A obstrução do fluxo ventricular direito pode ser na região infundibular (50 a 75% dos casos), valvular (raro) ou em ambas as regiões (cerca de 25%) (HAY *et al.*, 1993).

Figura 1 . Desenho ilustrativo das lesões fisiopatológicas presentes na Tetralogia de Fallot

O termo “Tetralogia de Fallot” é utilizado para descrever esta combinação de lesões, desde que haja sempre a associação com a hipertrofia do ventrículo direito e a variação da dextroposição da aorta com origem biventricular da valva aórtica.

A severa obstrução da via de saída do ventrículo direito (por estenose infundibulovalvular pulmonar) associada à comunicação intraventricular (defeito do septo) resultam num desvio do fluxo sanguíneo da direita para a esquerda na região ventricular, com desnaturação do sangue arterial. O grau de desnaturação e a extensão da cianose dependem do tamanho do desvio. Este, por sua vez, é dependente da resistência ao fluxo do ventrículo direito, do tamanho do defeito do septo ventricular e a resistência vascular sistêmica.

A expectativa de vida dos pacientes não tratados, nos casos mais severos, encontra-se na faixa dos 7 aos 12 anos de idade, muito embora um número significativo de pacientes tenha sobrevivido até a vida adulta (FURBER, 1974).

As características clínicas deste grupo de pacientes variam dependendo do grau da obstrução do fluxo do ventrículo direito. Os pacientes com um leve grau de obstrução são apenas minimamente cianóticos ou acianóticos, podendo também apresentar insuficiência cardíaca. Aqueles com obstrução máxima são profundamente cianóticos desde o nascimento. Entretanto, poucas crianças são assintomáticas, a maioria apresentam cianose a partir dos 4 meses de idade, sendo normalmente progressiva. O crescimento e o desenvolvimento destas crianças são retardados. Além disso, a fadiga e a dispnéia ao exercício são comuns.

Estas crianças apresentam ainda períodos de hipóxia, caracterizados pelos seguintes sintomas: aparecimento repentino ou agravamento da cianose, brusco aparecimento de dispnéia; alterações no estado de consciência (variando desde

irritabilidade até a síncope); diminuição da intensidade ou desaparecimento do murmúrio sistólico. Estes episódios podem começar no período neonatal e continuar até o período escolar da criança.

Durante os ataques agudos de dispnéia, o desvio do fluxo sanguíneo da direita para a esquerda aumenta consideravelmente e a saturação de oxigênio arterial cai bruscamente. Existe alteração aguda da resistência ao fluxo do ventrículo direito relativamente à resistência vascular sistêmica. Quando a resistência ao fluxo ventricular direito aumenta (pela constrição do infundíbulo), a razão da resistência resultante favorece o desvio do fluxo da direita para a esquerda, causando os episódios de hipóxia. A diminuição da resistência vascular sistêmica também leva a ataques de dispnéia.

Os pacientes apresentam também contagem de hemoglobina, hematócritos e células vermelhas levemente ou visivelmente elevadas, dependendo do grau de saturação do oxigênio arterial (VAN ARSDELL *et al.*, 2000; FIGULA *et al.*, 1999; GARSON *et al.*, 1980).

Os efeitos em longo prazo da arritmia e a hipoxemia crônica são: a lesão progressiva do ventrículo direito, sendo substituído por tecido fibroso, incidência de ectopia ventricular, morte súbita e debilidade do crescimento vascular alveolar e pulmonar (LEE, *et al.*, 2004).

A primeira cirurgia de reparo definitivo da anomalia congênita completada com sucesso ocorreu em 1954 e desde então é o tratamento padrão para paciente com Tetralogia de Fallot (LEE *et al.*, 2004). A cirurgia de correção consiste no fechamento do defeito do septo ventricular com alívio da obstrução do fluxo do ventrículo direito. Entretanto, a idade ideal para a correção cirúrgica destes pacientes ainda é

controversa. Evidências sugerem que o reparo precoce minimiza danos secundários ao coração e outros órgãos, principalmente ao cérebro. A correção precoce remove o estímulo da hipertrofia do ventrículo direito, preserva a função elétrica e mecânica do miocárdio, evita riscos associados com o desvio da artéria pulmonar (trombose do desvio, insuficiência cardíaca congestiva, distorção da artéria pulmonar e doença vascular pulmonar). Entretanto, o reparo precoce pode estar associado ao aumento da mortalidade, aparecimento de arritmias cardíacas e resposta hemodinâmica não satisfatória (LEE, *et al.*, 2004; VAN ARSDELL *et al.*, 2000; PIGULA *et al.*, 1999; GARSON *et al.*, 1980).

Nos casos em que se torna necessário retardar a cirurgia de correção da anomalia, o tratamento paliativo é uma alternativa (HERBERT e FARNSWORTH, 1971). De acordo com Garson e colaboradores (1980 e 1981), existem três formas de tratamento: cirurgia cardíaca, anastomose aortopulmonar e tratamento crônico com propranolol. Deve-se levar em conta que: a) os dois últimos necessitam de posterior correção cirúrgica; b) a cirurgia cardíaca de correção da anomalia em crianças menores de um ano apresenta uma elevada morbidade e c) a realização da anastomose pode necessitar de cuidados paliativos para eliminar as crises de dispnéia. Desta forma, enquanto estas crianças não apresentam idade e nem condições clínicas ideais para a realização da correção cirúrgica, a terapia paliativa com propranolol é requerida para a redução dos severos períodos de dispnéia e também para a prevenção das crises e da dispnéia causada pelo exercício.

A taxa de mortalidade dos pacientes submetidos à correção cirúrgica da anomalia é de 7%, os principais fatores são a insuficiência cardíaca e arritmias (LEE *et al.*, 2004; NOLLERT *et al.*, 2003). Lee e colaboradores (2004), observaram que dos 160

pacientes submetidos à cirurgia 2,5% faleceram nas primeiras duas semanas pós-operatória devido à insuficiência cardíaca e sepse, e que 12,5% necessitaram de uma segunda intervenção cirúrgica. Complementando, Nollert e colaboradores (2003), verificaram, através do acompanhamento pós-operatório em média até 25 anos, que o risco de insuficiência cardíaca encontra-se aumentada nos 10 primeiros anos após a cirurgia, permanecendo estável nos 30 anos subseqüentes. Os mesmos pesquisadores relatam ainda que um dos fatores de risco mais importante que levava à morte por insuficiência cardíaca neste grupo de pacientes era a inexistência de tratamento paliativo, reiterando assim, a necessidade de iniciar esse tratamento o mais breve possível, a partir dos 3 meses de idade, sugerido por Garson e colaboradores (1981).

Os bloqueadores de receptores beta-adrenérgicos apresentam um grande valor terapêutico no gerenciamento de pacientes com obstrução funcional do fluxo ventricular. A experiência clínica mostra que o propranolol pode ser utilizado com sucesso nas seguintes situações: gerenciamento e prevenção de ataque de dispnéia agudo; e na melhora das condições clínicas das crianças de 2 a 6 anos de idade que aguardam a correção cirúrgica (BARAZZONE, 1988; CUMMING, 1970). Agem inibindo o tônus simpático levando ao relaxamento infundibular, diminuição do fluxo ventricular direito e contração muscular (PONCE *et al.*, 1973; HERBERT & FARNSWORTH, 1971; WENSLEY *et al.*, 1987).

Existem amplas evidências que, em muitos casos, o aumento das catecolaminas circulantes eleva a frequência cardíaca e a contração do miocárdio, precipitando episódios de cianose (CUMMING, 1965). O bloqueio dos receptores beta-adrenérgicos com propranolol mostrou-se efetivo, reduzindo ou cessando as crises de dispnéia (CUMMING e CARR, 1967; PONCE *et al.*, 1973; ERIKSSON, THOREN e

ZETTERQVIST, 1969; LOGGIE e VAN MAANEN, 1972; SHAH & KIDD, 1967; GARSON, GILLETE & MCNAMARA, 1967) embora, alguns pacientes apresentem-se refratários ou não respondam ao tratamento profilático. (ERIKSSON, THOREN & ZETTERQVIST, 1969; LOGGIE & VAN MAANEN, 1972; SHAH & KIDD, 1967; GARSON, GILLETE & McNAMARA, 1981; ROSS, ROBERTSON & WATSON, 1966).

2.2 Propranolol

Figura 2. Estrutura química do propranolol

O propranolol vem sendo utilizado no tratamento paliativo da Tetralogia de Fallot desde 1964 (PONCE *et al.*, 1973). Trata-se de um beta bloqueador não seletivo que interage com os receptores β_1 e β_2 com a mesma afinidade, possui atividade simpatomimética intrínseca escassa e não causa o bloqueio de receptores α -adrenérgicos. É altamente lipofílico e quase completamente absorvido após administração per oral. Entretanto, grande parte do fármaco é metabolizado pelo fígado após a primeira passagem através da circulação portal; e em média, apenas 25% da

dose alcançam à circulação sistêmica, atingindo concentração plasmática máxima após 1,5 horas. Apresenta meia-vida de eliminação de 4 a 6 horas em adultos e crianças, função de *clearance* elevado devido ao metabolismo hepático (10 a 15mL/kg/min). O propranolol é fármaco de natureza básica, se ligando em aproximadamente 90% às proteínas plasmáticas, principalmente às alfa1-glicoproteínas ácidas, através de ligações lábeis, e também aos pulmões o que justifica seu alto volume de distribuição (4L/Kg). Além disso, atravessa facilmente a barreira hematoencefálica. (CARMONA *et al.*, 2005; LACY, 2004; PEREIRA *et al.*, 2003; PEREIRA *et al.*, 2000; HOLLEY *et al.*, 1982).

A eliminação do propranolol depende do fluxo sanguíneo do fígado e da função hepática, podendo também estar alterado pela co-administração de outros fármacos que afetam o metabolismo hepático (indutores ou inibidores) ou ainda pela perfusão sanguínea (CARMONA *et al.*, 2005; HARDMAN, GILMAN & LIMBIRD, 2001).

Existe grande variabilidade interindividual na eliminação pré-sistêmica pelo fígado (através do CYP2D6), com enorme variação das concentrações plasmáticas após a administração oral contribuindo para uma ampla faixa de dose. Além disto, altas doses do propranolol são requeridas para manter a eficácia desejada sendo uma desvantagem na clínica (PEREIRA *et al.*, 2003).

Ponce e colaboradores (1973), consideraram como concentrações plasmáticas adequadas níveis entre 40 e 90ng/mL para o controle das crises de hipóxia em pacientes com Tetralogia de Fallot.

As concentrações plasmáticas do propranolol apresentam-se alteradas em pacientes cirúrgicos com circulação extracorpórea e hipotermia, consequentemente, as

doses devem ser ajustadas para estes pacientes visando diminuição dos efeitos prejudiciais no período pós operatório (PEREIRA *et al.*, 2003).

Devido ao bloqueio beta-adrenérgico não seletivo, altas concentrações sanguíneas do propranolol podem causar sérios problemas respiratórios, mudanças no débito cardíaco e insuficiência cardíaca (PEREIRA *et al.*, 2000).

É extensamente utilizado para o tratamento de arritmias cardíacas, angina *pectoris*, hipertensão, feocromocitoma, estenose subaortica hipertrófica idiopática, Tetralogia de Fallot, tireotoxicosis, entre outras indicações. Apresenta como principais efeitos sobre o miocárdio a diminuição dos batimentos cardíacos, da contratilidade, da pressão arterial induzida pelo exercício, do débito cardíaco, do fluxo coronariano, aumento da resistência coronariana e uma redução no consumo de oxigênio pelo miocárdio (CONN, 1974).

No tratamento da Tetralogia de Fallot, o propranolol apresenta vantagens por aumentar a resistência periférica, deprimir a contractilidade do miocárdio, prevenir taquicardias e aumentar a curva de dissociação hemoglobina-oxigênio (aumentando a disponibilidade de oxigênio nos tecidos) (GARSON *et al.*, 1981).

A utilização de beta-bloqueadores no período pré-operatório reduz a incidência de eventos isquêmicos intraoperatório relacionados ao aumento do débito cardíaco e respostas hemodinâmicas devido a estímulos cirúrgicos durante a revascularização do miocárdio. A administração destes fármacos anteriormente à CEC e a sua retomada após o término da cirurgia é considerado seguro e benéfico (CARMONA *et al.*, 2005), prevenindo as crises de hipóxia durante a indução da anestesia (BARAZZONE *et al.*, 1988). Por outro lado, a interrupção abrupta do fármaco tem sido associada com isquemia do miocárdio, hipertensão e taquidisritmias secundárias (CARMONA *et al.*,

2005). Sabe-se ainda que, durante e após o procedimento de circulação extracorpórea, as alterações fisiológicas podem levar a alterações cinéticas nas concentrações plasmáticas do propranolol (HOLLEY *et al.*, 1982), sendo um fator de risco importante para complicações no período pós operatório devido ao seu bloqueio beta adrenérgico (BUCHHORN *et al.*, 2002). Desta forma, o momento adequado para descontinuar a terapia com propranolol no período pré operatório é controverso, variando de duas semanas até poucas horas antes do início da cirurgia (BARAZZONE *et al.*, 1988).

Garson e colaboradores (1981) sugerem a administração de propranolol, para crianças com Tetralogia de Fallot, de doses iniciais de 1mg/kg por dia, per oral, divididas em 6 tomadas diárias; caso a dose não seja efetiva na primeira semana de tratamento, sugerem aumentar a dose até um máximo de 5mg/kg por dia; por outro lado, caso o paciente já faça uso de propranolol e torne-se refratário, os autores sugerem aumentar a dose até um máximo de 10 a 15mg/kg por dia, com monitoramento do tamanho, frequência e contratilidade cardíaca.

2.3 Farmacocinética / Toxicocinética em crianças

As crianças, e particularmente os neonatos, são mais sensíveis biologicamente à exposição aos agentes tóxicos, com base no peso, quando comparadas aos adultos. O entendimento da taxa de maturação, da capacidade metabólica e os casos reportados de medicamentos, abuso de drogas, contaminantes, agentes endógenos e da dieta ajudam a entender esta diferença. Para a maioria dos xenobióticos a imaturidade da biotransformação, eliminação e de outros sistemas fisiológicos levam a níveis

plasmáticos maiores por períodos mais prolongados (GINSBERG *et al.*, 2002; SCHEYPLEIN *et al.*, 2002; BRUCKNER, 1999).

A importância do entendimento das diferenças farmacocinéticas entre adultos e crianças encontra-se expresso em algumas leis da agência regulatória Americana (*Food and Drug Administration* - FDA), que incentiva os fabricantes a conduzirem estudos de eficácia e farmacocinética de medicamentos em crianças através da *Food and Drug Administration Modernization Act of 1997*. Após esta iniciativa outras surgiram como *Best Pharmaceuticals for Children Act of 2002* e *Pediatric Research Equity Act of 2004* (FLYNN *et al.*, 2006).

Mesmo dentro da população pediátrica podemos observar diferenças farmacocinéticas de acordo com a idade. Desta forma, crianças com peso corporal similar ao de adultos apresentam também uma farmacocinética similar. Por outro lado, crianças com baixo peso corporal, neonatos e crianças menores de 06 anos apresentam diferenças significativas nos parâmetros farmacocinéticos *clearance* e do volume de distribuição em relação ao peso, necessitando de terapia dose ajustada para atingir o beta-bloqueio. Um outro fator importante que afeta os parâmetros farmacocinéticos é que estas crianças apresentam uma maior razão entre o tamanho hepático e o corporal (FLYNN *et al.*, 2006).

O crescimento durante o primeiro ano de vida é extraordinário: observa-se um aumento de peso em aproximadamente 200% e crescimento de aproximadamente 50%. Muitas mudanças biológicas complexas ocorrem durante o desenvolvimento e podem ter consequências profundas na sensibilidade aos agentes exógenos (SCHEYPLEIN *et al.*, 2002). Da mesma forma, antes e após o nascimento, mudanças complexas ocorrem na habilidade do corpo de absorver, distribuir, metabolizar e

eliminar substâncias. A Tabela 1 mostra as alterações observadas na absorção, distribuição e metabolismo durante o desenvolvimento.

As consequências das diferenças fisiológicas citadas na Tabela 1 afetam a farmacocinética dos possíveis agentes terapêuticos utilizados pela população pediátrica. Desta forma pode-se esperar que (GINSBERG *et al.*, 2002; MCNAMARA & ALCORN, 2002; SCHEYPLEIN *et al.*, 2002; BRUCKNER, 1999):

- o pH gástrico elevado em neonatos resulte em uma absorção reduzida de bases fracas;
- o aumento do tempo de esvaziamento gástrico, peristaltismo irregular e redução da motilidade intestinal modifiquem a absorção do produto;
- a diferença na flora intestinal influencie a absorção de vitamina K;
- a presença no epitélio intestinal de enzimas metabólicas, como a P450 3A, e de transportadores, como as P-glicoproteínas, reduza a biodisponibilidade dos fármacos. Por outro lado, a mucosa do epitélio gastrointestinal encontra-se imatura permitindo a passagem de macromoléculas intactas incluindo proteínas e metais pesados;
- o metabolismo dos ácidos biliares não se encontra totalmente desenvolvido afetando a absorção de gorduras e substâncias lipofílicas;
- a absorção de glicose em crianças menores de 01 ano encontra-se reduzida;
- a pele dos neonatos é mais fina e permeável a agentes tópicos;
- crianças apresentam maior área alveolar (com base em peso corporal) e frequência respiratória do que os adultos, contribuindo para uma maior absorção através da via inalatória;

- no recém nascido pré-termo a albumina e a α -glicoproteína ácida encontram-se reduzidas, resultando em uma elevação na fração de fármaco livre e na distribuição nos compartimentos extravasculares. Adicionalmente, observa-se um aumento no volume do fluido extracelular resultando em um aumento no volume de distribuição de fármacos polares;
- a permeabilidade aumentada da barreira hemato-encefálica também contribui com o aumento no volume de distribuição
- tanto a Fase I quanto a Fase II de biotransformação encontram-se imaturas após o nascimento, alterando a cinética dos xenobióticos;

devido à capacidade diminuída de excreção através das vias biliar e renal (até os 06 meses), a concentração plasmática e o tempo de meia vida de alguns fármacos encontram-se elevados. Após os 06 meses o *clearance*, quando normalizado com o peso corpóreo, é o dobro do adulto.

Tabela 1 - Mudanças fisiológicas e bioquímicas observadas durante o desenvolvimento

Absorção	
<ul style="list-style-type: none"> • pH gástrico • Pepsina • Lipase • Tripsina • α-amilase • Secreção de ácido gástrico • Motilidade gastro-intestinal • Flora gastrintestinal 	<p>Neutro no nascimento, <4 em 2 a 4 dias e diminui gradativamente até valores encontrados em adultos</p> <p>Diminuída ao nascimento (3-13%), níveis adultos no 3º mês de vida</p> <p>Diminuída ao nascimento (3-22%), níveis adultos no 6º mês de vida</p> <p>Diminuída ao nascimento (13-30%), níveis adultos no 3º mês de vida</p> <p>Diminuída ao nascimento (0,2-3%), níveis adultos no 2 a 3º ano de vida</p> <p>Pequena em recém-nascidos, aumentando para níveis adultos no 3º mês</p> <p>Lenta e irregular em crianças até 1 anos</p> <p>Colonizada rapidamente após o nascimento; alta em neonatos</p>
Distribuição	
<ul style="list-style-type: none"> • Água extracelular • Gordura corpórea total • Proteína plasmática total • Volume de distribuição 	<p>40% do peso corporal em neonatos, 26 a 30% em crianças com 1 ano e 50-60% em adultos</p> <p>Elevada proporcionalmente em crianças</p> <p>Menor em neonatos do que em crianças. A composição é diferente em neonatos</p> <p>Tende a refletir o maior compartimento fluido</p>
Metabolismo	
<ul style="list-style-type: none"> • Fase 1 • Fase 2 • Biotransformação 	<p>Variação individual pronunciada</p> <p>A glucoronidação encontra-se deficiente no nascimento, alcançando níveis de adultos na 3 a 4ª semana. A sulfatação encontra-se ativa em neonatos e crianças pequenas.</p> <p>Alterada a taxas menores em neonatos</p>
Eliminação	
<ul style="list-style-type: none"> • Taxa de filtração glomerular • Secreção tubular renal • Função renal e depuração 	<p>Menor em neonatos, aumenta rapidamente durante o primeiro ano de vida</p> <p>Ocorre maturação tardiamente em relação à filtração glomerular, alcançando níveis adultos no primeiro ano de vida</p> <p>Maior quanto menor a idade</p>

Fonte: SCHEYPLEIN *et al.*, 2002.

2.4 A cirurgia cardíaca com Circulação Extra Corpórea

Uma vez que o coração tem suas funções interrompidas, a circulação extracorpórea apresenta a função de prover o oxigênio e o fluxo sanguíneo contínuo para os tecidos durante a cirurgia cardíaca. Tal procedimento tem por objetivo manter a perfusão sistêmica com oxigenação e eliminação do dióxido de carbono durante o período em que o coração e o pulmão estão incapacitados de exercer suas funções, preservando a homeostase sistêmica e reduzindo as complicações que possam comprometer o sucesso da cirurgia cardíaca. As disfunções cardíacas constituem um problema de alta prevalência no mundo. Cerca de 1.000.000 de pacientes com insuficiência coronariana são submetidos anualmente à cirurgia com circulação extracorpórea (CEC).

A circulação extracorpórea leva a mudanças profundas no organismo que acarretam alterações na cinética dos fármacos (BUYLAERT, *et al.*, 1989). É inicialmente acompanhada por uma diminuição da resistência vascular e da pressão arterial devido ao baixo fluxo e à hemodiluição, sendo os resultados equivalentes ao estado de choque (HOLLEY *et al.*, 1982). Uma redução na perfusão dos órgãos em aproximadamente 30%, é observada após a cirurgia cardíaca com CEC, levando a influência sobre a eliminação dos fármacos através do fígado e dos rins com conseqüências cinéticas; como por exemplo a redução do *clearance* total e prolongamento no tempo de meia vida de eliminação. Adicionalmente, a distribuição e o metabolismo hepático também se encontram alterados devido à hipotermia, levando a diminuição no volume de distribuição e no *clearance* plasmático (PEREIRA *et al.*, 2003; BUYLAERT *et al.*, 1989).

Primeiramente, a hemodiluição ocorre abruptamente, levando a redução na viscosidade sangüínea com proporcional redução na resistência vascular sistêmica e, conseqüente, diminuição na concentração plasmática do fármaco. Por outro lado, ocorre uma diminuição na fração de fármaco ligado às proteínas plasmáticas e um aumento aparente no volume de distribuição. As concentrações de proteínas plasmáticas sofrem uma diminuição de cerca de 40 a 50%. No caso do propranolol, este procedimento acarreta uma redução de 50% nas concentrações plasmáticas do beta-bloqueador (CARMONA *et al.*, 2005; HOLLEY *et al.*, 1982). A hipotermia, por sua vez, leva a diminuição do *clearance* renal e hepático com conseqüente diminuição na eliminação de alguns fármacos. O fígado tem suas funções metabólicas comprometidas devido à dependência da temperatura para a atividade enzimática comprometendo o processo de biotransformação de grande parte dos fármacos. Da mesma forma, as células tubulares renais envolvidas na função de secreção ou reabsorção também apresentam atividade temperatura-dependente, sendo que a taxa de filtração glomerular encontra-se significativamente reduzida na presença da hipotensão, hipotermia e outros fatores originários da cirurgia com CEC. No caso do propranolol, a hipotermia leva a um aumento nas concentrações plasmáticas o que é contrabalanceado, na CEC, pela hemodiluição (BUYALAERT, *et al.*, 1989; HOLLEY *et al.*, 1982).

Ainda durante a CEC, os pulmões são isolados da circulação modificando potencialmente seu papel no modelo multicompartmental e afetando significativamente os fármacos básicos, como é o caso do propranolol.

Além dos efeitos já descritos acima, podemos observar ainda a hemólise, respostas do organismo ao fluxo não pulsátil (aumento da pressão arterial, resistência

periférica, metabolismo anaeróbico, circulação capilar) e mudanças nas concentrações de eletrólitos (HOLLEY *et al.*, 1982).

Para muitas substâncias uma diminuição abrupta nas concentrações plasmáticas é observada no início da circulação extracorpórea, fato explicado pela hemodiluição e aumento na distribuição devido, principalmente, a uma diminuição nas ligações às proteínas. Um aumento gradual nas concentrações plasmáticas de alguns fármacos tem sido observado após a queda inicial e também no período após a CEC, sendo explicado através da redistribuição e diminuição na eliminação dos mesmos (PEREIRA, *et al.*, 2000) .

Por último, ao final da CEC observa-se o reaquecimento afetando tanto o fluxo sanguíneo quanto a atividade enzimática. Conforme a pressão sangüínea e a frequência cardíaca aumentam, a perfusão tecidual também se eleva. Assim, como no início da CEC, o *clearance* dos fármacos e o volume de distribuição podem se modificar rapidamente de acordo com estas alterações hemodinâmicas. A resposta do miocárdio à terapia medicamentosa também se encontra alterada.

As mudanças fisiológicas no período pós-operatório podem ser observadas através da frequência cardíaca e função pulmonar que podem ainda encontrar-se deprimidos. Alguns hormônios são liberados em decorrência do trauma cirúrgico e ocorrem mudanças nas alfa 1-glicoproteínas. Nos dias após a cirurgia o paciente apresentará um novo *steady-state* que pode ser diferente ao basal no pré-operatório (HOLLEY *et al.*, 1982).

A farmacoterapia destes pacientes também é complexa e envolve um arsenal de mais de 20 medicamentos nos períodos pré, intra e pós-operatório, levando a um aumento potencial no número de interações. Os principais medicamentos utilizados

cronicamente são beta-bloqueadores, nitratos, antihipertensivos, digoxina e diuréticos. A antibioticoprofilaxia geralmente é administrada no pré-operatório, sobre a forma de cefalosporinas de administração endovenosa. Para a realização da analgesia e anestesia geralmente utilizam-se narcóticos, hipnosedativos e fármacos anticolinérgicos. Anteriormente à instalação da CEC, altas doses de heparina são administradas e após a instalação da CEC a resistência vascular e a pressão arterial são reguladas por vasodilatadores (nitroprussiato) ou vasopressores (fenilefrina). Após o término de CEC os efeitos da heparina são revertidos através da protamina. Infusão de fármacos entrópicos (dopamina, dobutamina, epinefrina), vasodilatadores (nitroprussiato, nitroglicerina) e agentes antiarrítmicos podem ser necessários visando a otimização hemodinâmica do paciente. Durante o pós-operatório imediato (POI) os efeitos dos anestésicos intravenosos ainda persistem e narcóticos e sedativos podem ser administrados. A administração de digoxina e beta-bloqueadores pode ser importante para reduzir a incidência de taquiarritmias supraventricular pós-operatório (HOLLEY *et al.*, 1982).

Por sua vez, o propranolol apresenta alta variabilidade farmacocinética, afetando principalmente sua distribuição e eliminação; apresentando consequentemente resposta interindividual diferente. Durante a CEC, as concentrações plasmáticas de propranolol encontram-se alteradas, sugerindo que o ajuste da dose pode evitar efeitos indesejáveis no período pós operatório. Pereira e colaboradores (2003) observaram em pacientes obesos, que durante a CEC ocorre um aumento na distribuição e prolongamento da meia-vida biológica do fármaco, com o *clearance* plasmático sendo reduzido em menor proporção, levando a concentração plasmática maior nestes pacientes quando comparados aos não obesos.

2.5 Determinação do propranolol em plasma

A utilização de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) é a técnica padrão para garantir a detecção e quantificação dos fármacos em concentrações mínimas (WREN e TCHELITCHEFF, 2006). É muito utilizada no monitoramento terapêutico por ser mais eficiente, rápida, simples, seletiva, versátil, com custo relativo razoável e ter potencial para análises simultâneas de fármacos.

Na tentativa de determinar as concentrações plasmáticas do propranolol diferentes métodos têm sido desenvolvidos utilizando fluorimetria (BOUDOULAS *et al.*, 1978; RAO *et al.*, 1978; SHAND *et al.*, 1970), cromatografia gasosa (WALLE *et al.*, 1975), ou cromatografia líquida de alta eficiência com detecção de fluorescência, CLAE-F (DRUMMER *et al.*, 1981; FU *et al.*, 1989; HARRISON *et al.*, 1985; HEDEEN *et al.*, 1991; KOSHAKJI *et al.*, 1986; SOOD *et al.*, 1988).

Inúmeros métodos analíticos utilizando técnicas cromatográficas CLAE-F foram descritos para a quantificação do propranolol e seus metabólitos em fluídos biológicos. Muitos problemas relacionados principalmente com a seletividade, sensibilidade e a escolha do padrão interno para o método cromatográfico foram extensamente discutidos anteriormente (DRUMMER *et al.*, 1981; FU *et al.*, 1989; HARRISON *et al.*, 1985; HEDEEN *et al.*, 1991; KOSHAKJI *et al.*, 1986; SOOD *et al.*, 1988). Lo e Riegelman (1980) publicaram método utilizando 0,4mL de plasma e limite de detecção de 20ng/mL. Por sua vez, Drummer e colaboradores (1981), Harrison e colaboradores (1985) e Pereira e colaboradores (2000) apresentaram limites de detecção de 1 a 2ng/mL; sendo necessário volumes maiores de plasma para a

realização do ensaio. Adicionalmente, Pereira e colaboradores (2000) além de desenvolver e validar método analítico para a quantificação de propranolol, apresentou estudo do acúmulo do fármaco em pacientes adultos pós-cirúrgicos; apesar de o método mostrar-se seletivo, com boa linearidade, precisão e exatidão, o mesmo apresentou sensibilidade relativamente baixa para o propósito do presente estudo.

3 - OBJETIVOS

3.1 Principal

- Investigar os níveis plasmáticos de propranolol pela administração crônica para a prevenção das crises de hipóxia, durante e após a intervenção cirúrgica de correção da anormalidade nos pacientes pediátricos com Tetralogia de Fallot.

3.2 Secundários

- Desenvolver e validar micrométodo analítico sensível para quantificação do propranolol plasmático utilizando volumes reduzidos da matriz biológica
- Efetuar o monitoramento do propranolol plasmático no intra-operatório bem como no pós-operatório imediato da intervenção cirúrgica de correção.

4 - MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Etapa Clínica

O protocolo de estudo foi aprovado pelas Comissões de Ética em Pesquisa da Instituição envolvida no projeto (ANEXO I).

4.1.1 Critérios de inclusão no estudo

- Antes de serem incluídas no estudo, os pais ou representantes legais de todas as crianças fornecerão o consentimento informado por escrito (Apêndice 1) após receberem todas as informações referentes ao estudo, previamente aprovado pela Comissão de Ética em Pesquisa das Instituições envolvidas no projeto (ANEXO I).
- Pacientes portadores de Tetralogia de Fallot com idade entre 0,5 ano e 4 anos com indicação cirúrgica para correção da anomalia congênita
- Pacientes com indicação de terapia beta bloqueadora (propranolol)

4.4.2 Critérios de exclusão no estudo

- Pacientes fazendo uso de fármacos vasoativos (contra-indicação de propranolol)
- Doentes com crises de broncoespasmo, necessitando de intubação endotraqueal
- Pacientes com Tetralogia de Fallot sem indicação do beta-bloqueador

4.1.3 Casuística

Foram investigados seis pacientes pediátricos portadores de Tetralogia de Fallot, ambos os sexos, pesando em média (+/- desvio padrão) 11,5+/-3,9kg, com idade de 2,1+/-1,3 anos e Índice de Massa Corpórea (IMC) de 16,1+/-1,0 kg/m². As características individuais destes pacientes portadores de Tetralogia de Fallot com indicação cirúrgica para a correção da anomalia congênita e a dose total diária foram reunidos conforme abaixo indicado (Tabela 2).

Tabela 2. Características dos pacientes investigados, dose administrada no pré-operatório e valores de hematócrito no trans-operatório

Paciente	Sexo	Idade (anos)	Peso (kg)	Altura (m)	IMC (kg/m ²)	Dose/dia mg/kg/dia	Ht%	
							Início da cirurgia	Ht% CEC
1	M	0,6	9,9	0,8	17,6	9,0	43	23
2	M	2,7	13,2	0,9	16,3	1,5	38	21
3	F	2,2	12,9	0,9	16,7	4,5	40	22
4	M	4,0	7,25	0,7	14,8	1,8	46	27
5	M	2,6	11,3	0,9	15,2	5,4	34	15
6	F	0,5	5,0	0,6	15,9	3,0	50	19

Realizamos o monitoramento dos pacientes no intra e pós-operatório de cirurgia cardíaca com CEC, para a investigação do propranolol plasmático residual.

Todos os pacientes faziam uso crônico de propranolol, via oral, com doses variando de 0,5 a 3 mg/kg, 3 vezes ao dia. A ultima dose administrada no período que precedeu a cirurgia, o intervalo de tempo decorrido entre a última dose administrada e o

início da cirurgia, bem como a duração da cirurgia e a duração da circulação extracorpórea são sumarizadas na Tabela 3.

Tabela 3. Dados individuais dos pacientes investigados relativos a dose, intervalo de tempo entre a última administração de propranolol e o início da cirurgia, e a duração dos procedimentos de cirurgia e de circulação extracorpórea

	Ultima	Intervalo entre	Duração	Duração da
Paciente	dose	dose e inicio da	da cirurgia	CEC
alocação	(mg)	cirurgia (min)	(min)	(min)
1	10	600	360	120
2	10	720	240	110
3	10	636	230	100
4	10	720	241	100
5	5	1.362	190	116
6	5	618	438	138

4.1.3 Desenho do protocolo clínico

Para a realização do presente estudo investigaram-se pacientes pediátricos de ambos os sexos portadores de Tetralogia de Fallot com indicação cirúrgica para a correção da anomalia congênita, recebendo cronicamente propranolol na dose de 1 a 3 mg/kg , 3 vezes ao dia. O propranolol foi administrado sob a forma de comprimidos, 3 vezes ao dia (8:00, 16:00 e às 22:00 horas), iniciando-se a terapia beta-bloqueadora ambulatorial pela menor dose (1mg/kg); em alguns casos, de acordo com a necessidade, para atingir a eficácia clínica requerida a dose foi aumentada até o máximo de 3mg/kg. Previamente a administração, efetuou-se a

preparação extemporânea da suspensão de propranolol, quando o comprimido foi macerado, suspenso em água filtrada, homogeneizado e o conteúdo foi aspirado com dosador oral (Oral Pack, BD). Os pacientes se encontravam em terapia crônica beta bloqueadora durante os 6 meses que antecederam à correção cirúrgica. Uma vez selecionadas, as crianças deram entrada no hospital para a correção da anomalia, e seguiram-se os procedimentos de rotina para o paciente cirúrgico. O estudo foi desenvolvido em duas fases consecutivas conforme referido a seguir:

- Pré-operatório - O paciente foi internado, realizou os exames de rotina no pré-operatório: bioquímica de sangue (uréia, creatinina, sódio e potássio, glicemia), coagulação, hemograma e plaquetas, além de ECO, ECG e Raio X do tórax.

No dia que antecedeu a cirurgia, o paciente recebeu a dose da noite de propranolol as 22:00 horas, em jejum.

Ao serem admitidos na sala de cirurgia os pacientes foram monitorados com eletrocardiografia contínua na derivação DII e oximetria de pulso.

- Trans-operatório – transcorreu nos períodos intra (IOP) e no pós-operatório imediato (POI) e tardio (1º e 2º PO), onde foi efetuado o monitoramento dos níveis plasmáticos residuais do propranolol.

Para a realização da venóclise periférica utilizou-se o sevoflurano. Após venóclise realizou-se a monitorização invasiva da pressão arterial através da punção da artéria radial, utilizando-se transdutor de pressão e passagem de cateter venoso central através de punção da veia subclávia direita.

Após a pré-oxigenação, realizou-se a indução da anestesia com sevoflurano e manutenção com isoflurano. Utilizou-se ainda o midazolam na dose de 0,1mg/kg e/ou Cetamina na dose de 1 a 2 mg/kg para obtenção da hipnose; e fentanila na dose de 2 a 5 µg/kg para a analgesia.

O relaxamento muscular foi obtido com brometo de pancurônio na dose de 0,1mg/kg. Aplicou-se ventilação manual sob máscara e intubação traqueal com tubo de diâmetro adequado, instalando-se ventilação controlada mecânica. O posicionamento correto da cânula traqueal foi verificado através da ausculta pulmonar bilateral.

Todos os paciente foram submetidos ao procedimento de CEC utilizando oxigenador de membrana (braile, Brasil) com fluxo pulsátil.

Após anticoagulação com heparina sódica, 500UI/kg, iniciou-se a CEC utilizando a bomba de rolete ou bomba centrífuga, com oxigenador de membrana e perfusão inicial com solução de Ringer Lactato.

Ao final da cirurgia os pacientes foram transportados para a Unidade de Recuperação Cardíaca ainda intubados e sob efeito anestésico, sendo submetidos à assistência ventilatória no pós-operatório.

Sete amostras sangüíneas (2mL cada) foram coletadas nos períodos:

- início da cirurgia – aproximadamente 13 horas após a administração da última dose de propranolol;
- no início da CEC – ao redor de 01 hora após o início da cirurgia;
- durante a CEC – entre 01 e 03 horas do início da cirurgia;
- fim da CEC – ao redor de 03 horas após o início da cirurgia;
- fim da cirurgia – ao redor de 05 horas após o início da cirurgia;

- 24 horas após o início cirurgia;
- 48 horas após o início cirurgia de correção da anomalia.

As amostras foram coletadas em tubos contendo EDTA sódico (etilenodiaminotetracético sal sódico), centrifugadas a 3000g por 30 min e o plasma estocado a -20°C até o momento da análise. Cerca de 2 mL de sangue heparinizado foram requeridos por coleta , não excedendo volume de 20 mL, incluindo-se os exames do pré-operatório.

As amostras foram analisadas juntamente com os calibradores, controles internos (duplicata), utilizando o método descrito abaixo. Calculou-se a correção da concentração plasmático de propranolol pelo hematócrito através da equação referida a seguir:

$$Cp \text{ corrigida} = (Cp \times Ht\% \text{ basal}) / Ht\% \text{ período}$$

Onde:

Cp corrigida: concentração plasmática corrigida com o hematócrito no período

Cp: concentração obtida

Ht%basal: hematócrito colhido no período basal

Ht%período: hematócrito colhido no período de estudo

4. 2 Etapa analítica

4.2.1 Reagentes, soluções e padrões de referência

O propranolol sob a forma de cloridrato utilizado como padrão na análise quantitativa por cromatografia foi padrão USP (47850). A solução estoque (aquosa) de propranolol foi preparada na concentração inicial de 1mg/mL; a partir da solução padrão adição (100µg/mL) prepararam-se diluições em plasma para a obtenção dos

calibradores nas concentrações de 1000; 500; 100; 50; 25; 10; 5; 2,5; 1; 0,5; 0,1 e 0,05 ng/mL.

O verapamil padrão USP (71120-2) sob a forma de cloridrato foi utilizado como padrão interno, preparando-se inicialmente a solução padrão estoque (1mg/mL) e padrão intermediário 100µg/mL. O padrão de adição foi preparado diariamente a partir da diluição 1:100 de forma a obter 1µg/mL. A tomada foi de 200 µL por ensaio realizado equivalente a 200ng/tubo.

O propranolol plasmático foi determinado através da cromatografia líquida de alta eficiência após adição de padrão interno seguida de alcalinização e extração líquido-líquido com diclorometano. Assim sendo, alíquotas de plasma branco, calibradores, controles internos e amostras dos pacientes foram analisados em paralelo diariamente.

O nitrogênio utilizado na evaporação do solvente dos extratos orgânicos, e o hélio destinado a degaseificação da fase móvel da cromatografia apresentavam grau de pureza 99,99%, procedência Air Products Gases Industriais LTDA. Na filtração do tampão empregou-se membrana Millipore tipo HA e na filtração da fase móvel e extratos orgânicos utilizou-se a membrana de mesma procedência tipo FH.

Obteve-se água ultrapura através dos sistemas MilliDI® e Simplicity®, Millipore do Brasil, na preparação da solução tampão da fase móvel de cromatografia, na limpeza da tubulação e coluna analítica de separação bem como na regeneração do cromatógrafo líquido. Lavou-se toda a vidraria, e demais materiais utilizados na extração e na cromatografia pela imersão com água corrente e detergente, Extran Alcalino® Merck., seguida de solução ácida por imersão durante 2 horas, e posterior

enxágüe com água corrente e destilada. Previamente à análise, todo material foi lavado com o solvente empregado na extração das amostras de plasma.

4.2.2 Procedimento de Extração

A quantificação do propranolol plasmático, utilizando volume reduzido da matriz biológica, foi realizada através da cromatografia líquida de alta eficiência utilizando a detecção por fluorescência (CLAE-F) e empregando método desenvolvido e validado em nosso Laboratório, para o monitoramento das concentrações plasmáticas do beta-bloqueador durante o *washout* nos pacientes pediátricos submetidos à cirurgia de correção.

Para a determinação dos níveis plasmáticos de propranolol utilizou-se extração simples líquido-líquido. Desta forma, a alíquotas de 200 µL de plasma foram adicionados 200 µL de padrão interno solução de adição contendo cloridrato de verapamil 1µg/mL (200ng/ensaio), 200 µL de solução de hidróxido de sódio 1,25M e 3 mL de diclorometano. A mistura foi então agitada em *vortex* durante 1 minuto, seguida da centrifugação a 3.000g durante 30 minutos. O sobrenadante foi aspirado, desprezado e o tubo contendo a fase orgânica remanescente foi imerso em banho de nitrogênio líquido. Após congelamento da fase aquosa residual o extrato orgânico foi cuidadosamente transferido para tubo cônico e concentrado a secura sob fluxo de nitrogênio em banho-maria 37°C. Em seguida, o extrato seco foi dissolvido com 200 µL de fase móvel e volumes de 20 µL foram injetados automaticamente no cromatógrafo líquido (Fluxograma 1).

DETERMINAÇÃO DE PROPRANOLOL EM PLASMA

200 μ L de plasma
200 μ L de solução de NaOH 1,25M
3 mL de diclorometano
200 μ L de padrão interno
(verapamil **200 ng/ensaio**)

Vortex 1 min
Centrifugar a 3000g por 10 min
Imersão da fase orgânica em banho
de N₂ líquido
Descartar sobrenadante (aquosa)

FASE
ORGANICA

-Evaporação sob fluxo N₂ e banho-maria 37°C

Extrato Seco
Dissolver em 200 μ L de Solução de
Lavagem
Injetar 20 μ L no HPLC

Condições cromatográficas:

Cromatógrafo líquido SHIMADZU LC-10A; coluna de fase reversa Shimpack C18, 150x6mm; 5 micron.

Detector de fluorescência SHIMADZU RF 10 AXL; $\lambda_{\text{excitação}} = 290\text{nm}$; $\lambda_{\text{emissão}} = 358\text{nm}$

Fluxograma 1. Quantificação do propranolol plasmático através de CLAE-F

4.2.3 Análise Cromatográfica

As análises cromatográficas foram realizadas através de cromatografia líquida de alta eficiência e detector de fluorescência (CLAE-F), em cromatógrafo líquido LC-10A, Shimadzu (Kyoto, Japão) utilizando coluna de fase reversa tipo C18, (150x6.0mm, comprimento x diâmetro interno) ODS Shim-pack (Shimadzu, Kyoto, Japão) de 5 micra, adaptada a uma pré-coluna C8 (Waters Assoc. Miford, USA). A fase móvel binária foi constituída de tampão acetato 0,1M, pH 5,0 e acetonitrila (60:40 v/v), sob vazão de 0,7 mL/min, em sistema isocrático de eluição. Os picos referentes aos compostos de interesse foram monitorados através de um detector de fluorescência RF 10 AXL, Shimadzu (Kyoto, Japão) no comprimento de onda de excitação de 290 nm e no comprimento de onda de emissão de 358nm. A integração da área dos picos de propranolol e padrão interno foram realizados utilizando um registrador-integrador Chromatopac CR-6A, Shimadzu (Kyoto, Japão).

4.3 Validação do método analítico

Os parâmetro de validação para a análise quantitativa do propranolol são: especificidade, limite de detecção e quantificação, linearidade, curva de calibração, recuperação absoluta, precisão intra e inter-dias e exatidão intra e inter-dias, estabilidade, bem como a robustez do método analítico. Os resultados obtidos de acordo com o método proposto (fluxograma 1), foram expressos através da média, desvio padrão e, coeficiente de variação.

4.3.1 Especificidade

Analisaram-se amostras da matriz biológica (plasma) obtidas de seis indivíduos, sendo quatro amostras normais, uma lipêmica e uma hemolisada, sob condições controladas referentes ao tempo, alimentação e outros fatores importantes para o estudo. Cada amostra branco foi testada utilizando o procedimento e as condições cromatográficas propostas. Os resultados foram comparados aqueles obtidos com solução aquosa do analito, em concentração próxima ao LQ.

Qualquer amostra branco que apresentasse interferência significativa no tempo de retenção do fármaco, metabólito ou padrão interno, foi rejeitada. Caso uma ou mais das amostras analisadas apresentassem tal interferência, novas amostras de outros seis indivíduos devem ser testadas. Caso uma ou mais das amostras deste grupo apresentassem interferência significativa no tempo de retenção do fármaco, o método deveria ser alterado visando eliminá-la; uma vez que isso não ocorreu, o método

permaneceu sem alteração relativamente as condições de desenvolvimento e validação propostas.

A resposta de picos interferentes no tempo de retenção do fármaco deve ser inferior a 20% da resposta do LQ. 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 do analito.

4.3.2. Limite de Detecção e Quantificação

Limite de detecção é a menor quantidade do analito presente em uma amostra que pode ser detectado, porém não necessariamente quantificado, sob as condições experimentais estabelecidas, foi definido como 0,5 vezes o limite de quantificação. Por outro lado, limite quantificação representa a menor quantidade do analito em uma amostra que pode ser determinada com precisão e exatidão aceitáveis (<20%) sob as condições experimentais estabelecidas.

Os limites de detecção e quantificação foram determinados baseados na análise de 10 replicatas.

4.3.3 Linearidade

É a capacidade de uma metodologia analítica de demonstrar que os resultados obtidos são diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra, dentro de um intervalo especificado. Representa a faixa de concentração que evidencia boa correlação linear entre 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 ou biotransformado (X). A equação da reta: $Y=aX+b$ evidenciando boa correlação linear entre Y e X, $r \approx 1$, representa a curva de calibração construída diariamente. O critério mínimo aceitável do coeficiente de correlação (r) foi de 0,99.

Para verificar a faixa de linearidade do método foram adicionados ao pool de plasma, solução padrão de propranolol (1mg/mL) e realizadas diluições sucessivas para se obter as seguintes concentrações 1.000; 500; 100; 50; 25; 10; 5; 2,5; 1; 0,5; 0,1; 0,05ng/mL (n=3).

4.3.4 Curva de calibração

A curva de calibração foi preparada através da solução padrão de adição (100µg/mL), diluída a partir de solução estoque de propranolol (1mg/mL, aquoso) a alíquotas de plasma humano livre do fármaco (plasma branco) obtendo-se as seguintes concentrações 100; 50; 25; 10; 5; 2,5; 1; 0,5; 0,1; 0,05ng/mL, que foram estocadas a 20°C (negativos) até o momento do ensaio. O padrão interno, verapamil cloridrato (1µg/mL, solução de trabalho), foi preparado a partir das soluções estoque (1mg/mL) e intermediária (100µg/mL) distribuído em alíquotas e estocado a -20°C até o dia do ensaio.

Plotou-se o valor nominal para cada concentração plasmática de propranolol *versus* a respectiva razão da área do pico obtida do fármaco e seu padrão interno, obtendo-se o coeficiente de correlação linear ($r^2 = 0,99$) e sua equação respectiva ($Y = aX + b$). Ao menos cinco calibradores foram considerados para a construção diária da curva de calibração diária: 100; 50; 25; 10; 5; 2,5; 1; 0,5; 0,1; 0,05 ng/mL. Os

controles de qualidade internos (80, 40 e 0,5ng/mL) foram preparados em duplicata e analisados durante cada corrida analítica para garantir a aceitação da mesma. Uma corrida foi aceita quando pelo menos quatro dos seis controles mostraram um desvio comparado com o seu valor nominal menor que 15% (para os controles altos e médios) e menor que 20% (para o controle baixo). Uma vez aprovada, a curva de calibração foi utilizada para a quantificação de propranolol nas amostras coletadas dos pacientes estudados neste protocolo clínico.

4.3.5 Estudos de recuperação

A recuperação mede a eficiência do procedimento de extração de um método analítico dentro de um limite de variação. Porcentagens de recuperação do analito e do padrão interno próximos a 100% são desejáveis, porém, admite-se valores menores, desde que a recuperação seja precisa e exata.

Este teste deve ser realizado comparando-se os resultados analíticos de amostras extraídas a partir de três concentrações (baixa, média e alta), contemplando a faixa de linearidade do método, com os resultados obtidos com soluções padrão não extraídas, que representam 100% de recuperação.

O cálculo da recuperação deve ser feito em função da relação de área do padrão extraído e não extraído, tanto para o analito quanto para o padrão interno separadamente.

4.3.5.1 Recuperação absoluta

A recuperação absoluta foi determinada utilizando três concentrações do fármaco (80, 40 e 0,5ng/mL) em cinco replicatas, expresso em porcentagem. Adicionalmente, investigou-se a recuperação absoluta do padrão interno. Ela expressa a recuperação do analito e em separado do padrão interno após adição, extração seguida da análise quantitativa, comparando alíquotas extraídas (X%) versus não extraídas (100%). O resultado obtido é expresso em porcentagem.

$$\text{Recuperação absoluta (\%)} = \frac{(\text{Área do pico})_{\text{extraída}}}{(\text{Área do pico})_{\text{não extraída}}} \times 100$$

4.3.5.2 Recuperação relativa

A recuperação relativa foi determinada utilizando três concentrações do fármaco (80, 40 e 0,5ng/mL) adicionadas de padrão interno em cinco replicatas, expressando a recuperação do analito relativamente ao respectivo padrão interno, expresso em razão de área (RA) após extração seguida da análise quantitativa. O resultado obtido é expresso em porcentagem.

$$\text{Recuperação relativa \%} = \frac{RA_{\text{extraída}}}{RA_{\text{não extraída}}} \times 100$$

4.3.6 Exatidão

A exatidão intra-dias é avaliada pelo desvio entre o valor real da concentração do fármaco na amostra e o valor obtido pelo método analítico na corrida do dia, enquanto

que a exatidão inter-dias é avaliada pelo desvio entre o valor real da concentração do fármaco na amostra e o valor obtido pelo método analítico por três dias.

A exatidão do método foi avaliada utilizando três concentrações (baixo, médio e alto) em seis replicatas, e o erro sistemático do ensaio foi determinado baseado na porcentagem de inexatidão e calculado de acordo com a equação abaixo:

$$\text{Inexatidão\%} = \frac{\text{Valor obtido} - \text{Valor nominal}}{\text{Valor nominal}} \times 100$$

O desvio não deve exceder 15%, exceto para o limite de quantificação, para o qual se admite desvios menores ou iguais a 20%.

4.3.7 Precisão intra e inter-dia

Precisão representa a reprodutibilidade dos resultados obtidos pela análise quantitativa de três concentrações (baixa, média e alta) em replicatas. A precisão intradia foi avaliada baseada em análises de duplicatas das três concentrações, enquanto que para a determinação da precisão interdias, análise de duplicatas de três concentrações (80, 40 e 0,5ng/mL) foi realizada em três dias consecutivos totalizando dezoito ensaios. O resultado obtido é expresso em coeficiente de variação (%), não se admitindo valores superiores a 15%, exceto para o CQB, para o qual se admite valores menores ou iguais a 20%, de acordo com a fórmula abaixo:

$$\text{CV\%} = \frac{\text{DP} \times 100}{\text{CMD}}$$

Onde: DP é o desvio padrão e CMD a concentração média determinada.

4.3.8 Estabilidade

Para a determinação da estabilidade de propranolol no plasma, menos de 15% de variação foi adotado como um critério aceitável para todas as concentrações estudadas. A análise consiste na avaliação da estabilidade:

- após três ciclos de descongelamento do fármaco em matizes biológicas: amostras de duas concentrações de propranolol (250 e 15,6ng/mL) foram analisadas em triplicata em 3 dias consecutivos para a realização dos ciclos 1, 2 e 3 de congelamento e descongelamento. As amostras foram ser congeladas à -20°C 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 resultados foram comparados com aqueles obtidos da análise das amostras recém-preparadas.
- no tempo e condição da análise: foi determinada a partir de amostras extraídas (no mínimo três concentrações em replicatas, n=3) e mantidas a temperatura ambiente na bandeja do auto injetor, durante o tempo máximo ao qual a amostra poderá ficar sob esta condição.
- de curta duração da matriz biológica em bancada: amostras de duas concentrações de propranolol (250 e 15,6ng/mL). Cada amostra permaneceu à temperatura ambiente por 12 horas e foi analisada.

- de Longa duração da matriz biológica mantida em congelador (-20°C): foi determinada a partir de três concentrações em replicatas ($n=3$) em diferentes períodos de tempo, garantindo a estabilidade durante o cronograma do estudo.

Os resultados obtidos foram expressos em percentagem do valor nominal.

4.3.9 Robustez

A robustez do método analítica é a medida de sua capacidade em resistir a pequenas e deliberadas variações dos parâmetros analíticos, indicando sua confiança durante o uso normal. Foi determinada baseada na utilização de duas colunas analíticas C18 da mesma marca e lotes diferentes e pequenas variações na proporção dos constituintes e no fluxo da fase móvel, após análise de 6 replicatas, os resultados foram expressos como uma função do coeficiente de variação. A influência da variação da temperatura ambiente foi excluída do estudo uma vez que a temperatura do laboratório é monitorada duas vezes ao dia e mantida a $21\pm 2^{\circ}\text{C}$.

4.4 Análise Estatística e cálculo do tempo de residência média

As concentrações plasmáticas do propranolol corrigidas com o hematócrito foram plotadas em função de tempo de coleta. O tempo de residência média (MRT) do fármaco na fase de eliminação tardia (γ) e o AUC foram investigados utilizando o software *PK Solutions 2.0 (Non COMPARTMENT Data Analysis software, Ashland, OH, USA)*.

Utilizou-se para análise estatística o software *Graphpad Instat (v. 3.0 GRAPHPAD SOFTWARE INCORPORATED, San Diego, CA, USA)*, e realizou-se estatística para dados pareados (ANOVA, Wilcoxon e Friedman). Os resultados foram expressos através de média, mediana, Intervalo de confiança IC95% e erro padrão da média.

Durante o monitoramento terapêutico, utilizou-se o teste de Wilcoxon para estudo de correlação entre concentração obtida e corrigida com o hematócrito, enquanto que o teste de Friedman foi aplicado para a comparação entre os diferentes períodos da cirurgia de correção da anomalia.

5. RESULTADOS

5.1 Validação do método analítico

5.1.1 Especificidade

Flu
ore
scê

Figura 3. Perfil cromatográfico do plasma extraído. Cromatogramas: **(A)**Normal **(B)** Lipêmico **(C)** Hemolisado.

Avaliou-se a especificidade do método analítico para determinação de propranolol em matrizes biológicas através da injeção de extratos de plasma normal (n=2), lipêmicos (n=2) e hemolisados (n=2) no sistema cromatográfico. Os componentes endógenos eluídos da coluna cromatográfica não interferiram na análise nas condições descritas acima, uma vez que os picos de componentes endógenos no cromatograma diferiram dos tempos de retenção do propranolol e do padrão interno, o verapamil Figura 3.

5.1.2 Perfil cromatográfico

Os picos eluídos da coluna cromatográfica foram detectados nos tempos 8,4 e 17,5 minutos para o propranolol e o padrão interno respectivamente. O perfil cromatográfico da determinação do Propranolol em plasma é ilustrado na Figura 4, que registra a injeção de um branco de plasma contendo o padrão interno (PI), de um padrão (5ng/mL) de plasma contendo PI e uma amostra de paciente. A detecção que foi realizada por fluorescência (λ excitação de 290 nm e λ emissão de 358nm) demonstrou alta sensibilidade com boa seletividade. O tempo total requerido para cada corrida cromatográfica foi de 20 minutos.

Figura 4. Perfil cromatográfico do propranolol em plasma. Cromatogramas: **(A)** branco **(B)** extrato plasma de padrão (5ng/mL) com adição de PI. **(C)** extrato de plasma de paciente, com adição de PI. Picos/ tempo de retenção (minutos): 1) Propranolol: 8,4 minutos e, 2) Verapamil (PI) 17,5 minutos.

5.1.3 Limites de Confiança

A curva de calibração diária, Figura 5 evidenciou ótima linearidade, $r^2 > 0,99$. Desta forma, o estudo aqui apresentado descreve um método analítico CLAE-F seletivo e sensível para a determinação de propranolol em plasma, utilizando uma coluna de fase reversa C18 e uma fase móvel binária a baixo fluxo (0,7mL/min) em uma corrida de 20 minutos. Apenas 200µL de amostras biológicas foram necessários para realizar o procedimento analítico.

Figura 5. Curva de calibração diária para o fármaco em plasma, utilizando o verapamil como padrão interno. Plotaram-se as razões de área dos picos propranolol e seu

padrão interno versus as concentrações do propranolol nos calibradores (0,05 a 100 ng/mL).

O método desenvolvido mostrou ainda elevada sensibilidade (LQ= 0,05ng/mL e LD= 0,02 ng/mL), linearidade entre 0,05 a 1000ng/mL apresentando um coeficiente linear de 0,9998, boa recuperação (Absoluta: 95,0%; Relativa: 97,1%), precisão (Intradia 4,7% e Interdia 8,6%) e exatidão (-3,1%) aceitáveis; adicionalmente à estabilidade e a robustez garantidas que são referidas na Tabela 4. Além disto, os resultados de recuperação, precisão intra e inter-dias e exatidão apresentam-se graficamente através das Figuras 6, 7, 8 e 9.

Figura 6 . Estudo de linearidade do propranolol em plasma após extração das matrizes biológicas com solvente orgânico em meio alcalino. Plotaram-se as razões de área dos picos propranolol e seu padrão interno *versus* as concentrações do propranolol nos calibradores (0,05 a 1000 ng/mL, n=3).

Tabela 4 – Limites de confiança para o método analítico de determinação de propranolol plasmático

Parâmetros	Unidade	Propranolol
Linearidade	ng/mL	0,05-1000
Coeficiente de regressão linear, (r^2)		$r^2 : 0,9988$
Limite de detecção	ng/mL	0,02
Limite de quantificação	ng/mL	0,05
Recuperação (80, 40 e 0,5ng/mL)		
Absoluta	(%)	95,0
Relativa	(%)	97,1
Precisão (80, 40 e 0,5ng/mL)		
Inter-dias (média, DP)	(%)	8,6+/-3,9
Intra-dia	(%)	4,7+/- 4,3
Erro sistemático (inexatidão)	(%)	-3,1+/-2,9
(80, 40 e 0,5ng/mL)		
Robustez		Média
Diferentes colunas C18	(CV%)	1,5%
fluxo ($\cong$ 0,1mL, incremento)	(CV%)	2,4%
fase móvel (incremento 1% de acetonitrila na proporção)	(CV%)	6,4%

DP: desvio padrão da média; CV: coeficiente de variação

Figura 7. Curva da Recuperação Absoluta do propranolol, análise de três concentrações (n=5).

Figura 8. Curva de Recuperação Relativa do propranolol, análise de três concentrações (n=6).

Tabela 5. Estudos de precisão intra e inter-dias e exatidão do propranolol.

Concentração nominal (ng/mL)	Precisão (CV%)		Inexatidão (%)
	<i>Intra-dia</i>	<i>Inter-dias</i>	
80	3,3%	6,2%	-6,5%
40	0,3%	8,0%	-3,2%
0,5	10,6%	0,1%	0,3%

Figura 9. Curva da precisão intra-dia do propranolol, análise de três concentrações (n=6).

Figura 10. Curva do estudo da Precisão Inter-dia do propranolol, análise de três concentrações, em três dias (n=18).

Figura 11. Curva do estudo da Exatidão do propranolol, análise de três concentrações, (n=6).

A robustez do método foi avaliada através da utilização de diferentes colunas analíticas C18, variações de composição nos constituintes da fase móvel e no pH do tampão, forneceu resultados que foram expressos em função de coeficiente de variação sendo equivalentes a 1,5%; 2,4% e 6,4%, respectivamente. A influência da variação de temperatura ambiente foi desconsiderada uma vez que a temperatura no Laboratório é monitorizada duas vezes ao dia, sendo mantida em $21 \pm 2^\circ\text{C}$. Ressalta-se que foram realizados nos trabalhos reportados anteriormente estudos de estabilidade e de robustez.

5.1.4 Estabilidade do Propranolol

Para os estudos de estabilidade do propranolol em fluídos biológicos adotou-se como critério de aceitação variação inferior a 15%, para todas as concentrações avaliadas. No estudo de estabilidade de curta duração (ciclo de congelamento e descongelamento) verificou-se que o propranolol se manteve estável por no mínimo três ciclos congelamento/descongelamento, para duas concentrações (250; 15,6ng/mL) em triplicata com bom coeficiente de variação ($\text{CV}\% = 8,0\%$).

Tabela 6. Estabilidade do propranolol após ciclos de congelamento / descongelamento, concentração 15,6 ng/mL (n=3).

Ciclo	Concentração	Concentração	% variação
Congelamento/Descongelamento	Nominal	Obtida	
	(ng/mL)	(ng/mL)	
1	15,6	14,6	6,2
2	15,6	14,2	8,8
3	15,6	13,9	10,9

Tabela 7. Estabilidade do propranolol após ciclos de congelamento / descongelamento, concentração 250ng/mL. (n=3)

Ciclos	Concentração	Concentração	% variação
Congelamento/Descongelamento	Nominal	Obtida	
1	250	237,5	5,0
2	250	230,0	8,0
3	250	227,5	9,0

Analisaram-se a estabilidade de curta duração no tempo e condição da análise (temperatura ambiente, após a dissolução em fase móvel) o propranolol na matriz biológica permaneceu estável por no mínimo 18 horas, (tempo máximo que amostra permaneceu na bandeja do injetor automático, até ser analisada). O procedimento foi realizado para três concentrações (250; 62,5; 15,6ng/mL) em triplicata e obtivemos resultado de 3,8% (CV%).

Tabela 8. Estabilidade do propranolol no tempo e condição de análise, para três concentrações, amostras reais (250, 62,5 e 15,6ng/mL) (n=3).

Concentração obtida (tempo zero), (ng/mL)	Concentração obtida após 18hs ^(a) (ng/mL)	% variação
267,3	247,3	7,5
59,1	60,6	2,4
13,4	13,6	1,5

(a): após a dissolução do resíduo com fase móvel, durante o período de 18 horas, (tempo máximo que a amostra permaneceu na bandeja do injetor automático, até ser analisada).

Para o estudo de estabilidade de longa duração, os padrões de propranolol na matriz biológica mostraram-se estáveis após armazenamento em congelador (-20°C) por no mínimo 24 meses. Os estudos de estabilidade de longa duração foram realizados para duas concentrações de propranolol na matriz biológica (500 e 7,8 ng/mL) em triplicata com precisão de 0,7% (CV).

Tabela 9. Estabilidade de longa duração do propranolol (armazenamento por 24 meses a -20°C), concentração 7,8 ng/mL (n=3)

Replicata	Concentração Nominal (ng/mL)	Concentração Obtida (ng/mL)	% variação
1	7,8	8,1	3,8%
2	7,8	7,9	1,3%
3	7,8	7,7	-1,3%

Tabela 10. Estabilidade de longa duração do propranolol (armazenamento por 24 meses a -20°C), concentração 500ng/mL (n=3)

Replicata	Concentração Nominal (ng/mL)	Concentração Obtida (ng/mL)	% variação
1	500	494,5	-1,1%
2	500	512,1	2,4%
3	500	495,6	-0,9%

Complementarmente aos testes de estabilidade realizamos a estabilidade de curta duração das soluções padrões, onde os padrões de duas concentrações (7,8 e 500ng/mL) extraídos, mostraram-se estáveis quando mantidos a temperatura ambiente durante 6 horas previamente à extração. A condição de armazenamento sob refrigeração não foi avaliada uma vez que os padrões se armazenados, sempre permanecem congelados, -20° C. Por sua vez, a estabilidade do padrão congelado foi avaliada em duas diferentes condições, após ciclos de congelamento e descongelamento e durante o período que no mínimo envolveria desde a primeira coleta de amostra até a última análise, tais resultados foram apresentados anteriormente como estabilidade após ciclos de congelamento/descongelamento e estabilidade de longa duração.

Desta forma nas Tabelas 11 e 12, são apresentados os resultados obtidos para análise da solução padrão de propranolol mantida a temperatura ambiente por 6 horas previamente à extração.

Tabela 11. Estabilidade de curta duração da solução padrão de propranolol, concentração 7,8 ng/mL (n=5)

Replicata	Concentração (ng/mL)		Variação
	Valor nominal	Valor obtido	Percentual (*)
			%
1	7,8	7,9	1,3%
2	7,8	7,5	-3,8%
3	7,8	7,6	-2,6%
4	7,8	8,0	2,6%
5	7,8	7,8	0,0%

(*) variação percentual resulta da razão da diferença (nominal - obtido) e o valor nominal, expresso em percentagem

Tabela 12. Estabilidade de curta duração da solução padrão de propranolol, concentração 500ng/mL (n=5 replicatas, reportadas individualmente)

Replicata	Concentração (ng/mL)		Variação
	Valor nominal	Valor obtido	Percentual (*)
			%
1	500	518,1	3,6%
2	500	510,0	2,0%
3	500	507,8	1,6%
4	500	516,4	3,3%
5	500	502,3	0,5%

(*) variação percentual resulta da razão da diferença (nominal - obtido) e o valor nominal , expresso em percentagem

Por sua vez, o padrão interno também pode apresentar variabilidade em sua estabilidade nas mais variadas situações, assim sendo, a solução padrão de verapamil (100 µg/mL), utilizada como padrão interno (PI), foi preparada a cada dois dias devido à alta demanda das análises realizadas diariamente. Desta forma a estabilidade da solução padrão foi avaliada após a extração, a temperatura ambiente durante 6 horas, previamente a extração. Os resultados demonstram que o padrão interno é estável nas condições acima descritas, conforme Tabela 13.

Tabela 13. Estabilidade da solução do padrão interno (verapamil 100µg/mL), mantido a temperatura ambiente por 6 horas, previamente à extração, (n=5, mostrados individualmente)

Replicata	Concentração	($\mu\text{g/ mL}$)	Variação (*)
	Valor nominal	Valor obtido	Percentual %
1	100	94,0	6,0%
2	100	103,9	3,9%
3	100	94,5	5,5%
4	100	112,6	12,6%
5	100	103,1	3,1%

(*) variação percentual resulta da razão da diferença (nominal - obtido) e o valor nominal , expresso em percentagem

5.2 Monitoramento terapêutico de propranolol nos pacientes cirúrgicos

Aplicou-se o método analítico validado no monitoramento das concentrações plasmáticas do propranolol em seis pacientes submetidos à cirurgia cardíaca de correção da anomalia congênita (Tetralogia de Fallot). As análises foram realizadas diariamente utilizando seis calibradores, três controles internos (baixo, médio e alto em duplicata), e duplicatas das amostras dos pacientes. As características dos seis pacientes estudados encontram-se descritas na Tabela 14 e os resultados relativos à dose administrada na noite que precedeu a cirurgia, os intervalos de tempo decorridos entre a dose e o início da cirurgia e a duração da cirurgia e da CEC são reunidos na Tabela 15.

Tabela 14. Características da população de pacientes portadores da Tetralogia de Fallot

	Idade	Peso	Altura	IMC	Dose/dia
Paciente	(anos)	(kg)	(m)	(kg/m²)	mg/kg/dia
Média	2,1	9,9	0,8	16,1	4,2
DP	1,4	3,2	0,1	1,0	2,8
Mediana	2,4	10,6	0,8	16,1	3,8
LIIC95%	1,0	7,3	0,7	15,3	2,0
LSIC95%	3,2	12,5	0,9	16,9	6,4

De acordo com a Tabela 14, os pacientes pediátricos apresentaram idade média de 2,1 anos, variando entre 1,0 e 3,2 anos (intervalo de confiança 95%); peso médio 9,9kg (7,3 a 12,5kg); altura de 0,8 metros (0,7 a 0,9 m); índice de massa

corpórea (IMC, IC95%) média de 16,1kg/m² (IC95%:15,3 e 16,9kg/m²). Esses pacientes receberam propranolol em terapia crônica, dose diária de 4,2 mg/kg/dia, variando entre 2,0 e 6,4 mg/kg/dia (IC95%), até o dia que antecedeu a cirurgia.

A cirurgia para correção da anomalia teve duração média de 4,7 horas (283,2+/- 94,9 min), deste tempo total, durante 1,9 horas (114,0+/-14,3 min) o paciente encontrava-se em CEC. O início da cirurgia ocorreu 12,9 horas (776,0+/-291,6min) após a administração da última dose de propranolol (8,3+/-2,6mg) (Tabela 15).

Tabela 15. Última dose administrada na noite que precedeu a cirurgia, intervalo decorrido entre a administração da última dose de propranolol no pré-operatório e o início da cirurgia

Paciente	Última dose (mg)	Intervalo última dose- cirurgia (min)	Duração da cirurgia (min)	Duração da CEC (min)
Média	8,3	776,0	283,2	114,0
DP	2,6	291,6	94,89	14,3
Mediana	10,0	678,0	240,5	113,0
IIIC95%	6,3	542,6	207,2	102,5
IsIC95%	10,4	1009,3	359,1	125,4

A Tabela 16 reúne os resultados de concentrações plasmáticas do propranolol em seis pacientes no intra e pós-operatório de correção da Tetralogia de Fallot. Por sua vez, a Figura 11 ilustra as curvas de decaimento das concentrações plasmáticas do propranolol nos seis pacientes em tratamento crônico com propranolol recebendo dose média diária de 4,2mg/kg, fracionada em 3 administrações diárias (8/8h) até a véspera

da cirurgia. A última dose no pré-operatório de 8,3mg foi administrada na noite que precedeu a cirurgia de correção da anomalia. Realizamos a correção da concentração plasmática do propranolol com o hematócrito (Tabela 16 e Figuras 12, 13, 14, 15 e 165) em decorrência da hemodiluição causada pela CEC.

O efeito da hemodiluição, que ocorre durante a intervenção cirúrgica, nas concentrações plasmáticas de propranolol (com e sem correção com o Ht%) foi investigado por comparação. O início com o final da cirurgia não registrou diferença significativa uma vez que no início da cirurgia a concentração obtida foi de 7,09 e a corrigida 7,1 ($p=1.0000$) e no final foi de 2,7 e 2,9 ($p=0,1250$). Entretanto, registraram-se diferenças significativas entre as concentrações obtidas e corrigidas nos períodos intra-CEC (1,1 vs 2,1 ng/mL, $p=0,0313$) e pós-CEC (2,8 ng/mL vs 3,4 ng/mL, $p=0,0313$) (Tabela 17, Figuras 11 e 14).

Tabela 16. Comparação entre as concentrações plasmáticas do propranolol no transoperatório da cirurgia de pacientes com Tetralogia de Fallot, valor **obtido** *versus* valor **corrigido** com o hematócrito

Procedimento	Período	Mediana obtida (IC95%)	Mediana corrigida Ht (IC95%)	Probabilidade ^a (p)
Cirurgia	Início	7,1 (1,8-15,8)	7,1 (1,8-15,8)	p=1,0000
	Final	2,7 (1,3-5,7)	2,9 (1,2-4,4)	p=0,1250
CEC	início	2,7 (0,6-8,6)	2,9 (0,4-8,6)	p=0,5000
	intra	1,1 (0,5-8,9)	2,1 (0,2-4,3)	p=0,0313 ^b
	final	2,8 (1,3-11,6)	3,4 (1,4-8,5)	p=0,0313 ^b
Pós operatório tardio	1ºPO	0,6 (0,5-4,2)	2,38 (0,0-3,9)	p=0,4375
	2ºPO	0,03 (0,0-1,7)	0,03 (0,0-2,0)	p=0,9020

IC95% limites inferior e superior do intervalo de confiança (95%)

^aEstatística não paramétrica para dados pareados: teste de Wilcoxon,

^bsignificância $p < 0,05$, medianas, concentração obtida *versus* corrigida

As concentrações plasmáticas do propranolol corrigidas com o hematócrito, expressas através das medianas (IC95%) foram de 7,1 (1,8-15,8) ng/mL e 2,9 (1,3-5,7) ng/mL (IC95%), $p > 0,05$, no início e final da cirurgia, respectivamente. Pela instalação da CEC, evidenciaram-se as concentrações equivalente a 2,9 (0,6-8,6)

ng/mL, 2,1 (0,5-8,9) ng/mL e 3,4 (1,3-5,7) ng/mL respectivamente nos períodos início, durante e final da CEC. As concentrações plasmáticas foram de 7,1ng/mL para 2,9ng/mL ($p>0,05$), quando se compararam os períodos início da cirurgia versus início da CEC. Finalizada a circulação extracorpórea, as concentrações plasmáticas de 2,9 (0,6 – 8,6) ng/mL no final da cirurgia mostraram tendência à redução para 2,3 (0,5-4,2) ng/mL ($p>0,05$) no 1ºPO e para 0,03 (0,0-1,7)ng/mL, $p>0,05$, no 2ºPO. Finalmente, observa-se redução significativa nas concentrações plasmáticas de propranolol quando se compararam as concentrações corrigidas do 2ºPO com as do início da cirurgia (7,1ng/mL) e do final da CEC (3,4ng/mL), $p<0,05$ (Tabelas 17 e 18; Figuras 12, 13, 14, 15 e 16).

Além disto, a estimativa do tempo de residência média do propranolol com base na curva de decaimento plasmático no período de estudo foi de 35,8 horas.

Tabela 17 – Estatística da comparação entre concentrações plasmáticas **obtidas** para o propranolol nos diversos períodos no transoperatório

Probabilidade estatística obtida pela		
comparação entre períodos ^a		
Grupos	Valor de F*	P
G1 x G2	8,5	NS
G1 x G3	9,0	NS
G1 x G4	15,0	NS

G1 x G5	2,0	NS
G1 x G6	16,5	NS
G1 x G7	26,0	P<0,05
G3 x G4	6,0	NS
G3 x G5	-7,0	NS
G4 x G5	-13,0	NS
G2 x G5	6,5	NS
G2 x G6	8,0	NS
G2 x G7	17,5	NS
G5 x G7	24,0	P<0,05
G6 x G7	9,5	NS

^aEstatística: teste Friedman para dados não pareados

Abreviações: G1: início da cirurgia; G2: final da cirurgia; G3: pré CEC; G4: intra CEC; G5: pós-CEC; G6 e G7: 1º e 2º pós-operatório tardio, respectivamente.

* F: quando a diferença é maior que 24,270 o valor de P é menor que 0,05.

Tabela 18 – Estatística da comparação entre concentrações plasmáticas **corrigidas** para o propranolol nos diversos período no transoperatório

Grupos	Probabilidade estatística pela comparação entre períodos ^a	
	Teste de Friedman	P
	F	(p<0,05, F≥23,00)
G1 x G2	3,0	NS
G1 x G3	9,0	NS
G1 x G4	7,0	NS
G1 x G5	0,0	NS
G1 x G6	14,0	NS
G1 x G7	23,0	P<0,05
G3 x G4	-2,0	NS
G3 x G5	-9,0	NS
G4 x G5	-7,0	NS
G2 x G5	3,0	NS
G2 x G6	11,0	NS
G2 x G7	20,0	NS
G5 x G7	23,0	P<0,05
G6 x G7	9,0	NS

^aEstatística: teste Friedman para dados não pareados

Abreviações: G1: início da cirurgia; G2: final da cirurgia; G3: pré CEC; G4: intra CEC; G5: pós-CEC; G6 e G7: 1º e 2º pós-operatório tardio, respectivamente.

Figura 12. Curva de decaimento das concentrações plasmáticas (medianas) em 6 pacientes para o propranolol, após a última dose (8,7mg) no pré-operatório.

Figura 13. Concentrações plasmáticas de propranolol e curva do Hematócrito , função do tempo, expressa através de média +/- EPM.

Figura 14. Decaimento das concentrações plasmáticas do propranolol (medianas, $p > 0,05$) em seis pacientes no início e final da cirurgia.

Figura 15. Efeito da hemodiluição nas concentrações plasmáticas do propranolol (medianas) em seis pacientes durante a CEC. Teste de Wilcoxon (*): $p < 0,05$.

Figura 16. Curva de decaimento do propranolol (medianas) em seis pacientes no final da cirurgia *versus* 2ºPO (*): $p < 0,05$. Significância estatística, Teste de Friedman.

A variabilidade inter-pacientes é ilustrada através das curvas de concentração plasmática em função dos momentos de coleta (com e sem a correção do Hematócrito), normalizadas e não normalizadas com o peso corporal e ou a última dose pré-operatória na Figura 17. A Tabela 19, por sua vez, mostra esta variabilidade considerando-se a disponibilidade sistêmica no propranolol estimada através do AUC_{0-t} .

Tabela 19 – Disponibilidade sistêmica do propranolol no transoperatório da cirurgia de Tetralogia de Fallot, AUC obtido versus AUC corrigido com o hematócrito (ng.h/mL)

	AUC _{0-t}	AUC _{0-t}
Paciente	obtido	corrigido
1	19652,7	20113,4
2	4073,5	4283,1
3	10881,5	18759,6
4	2593,3	3126,6
5	17106,2	15263,7
6	5481,5	6112,2
Medianas	8182	10688^a
IC95%	2471-17458	3256 - 19297

AUC_{0-t}: área sobre a curva no período 0-t estimada a partir de concentrações sem correção (obtida) e concentração com correção do hematócrito.

^ap>0,05, estatística não paramétrica para dados pareados: teste de Wilcoxon.

OBTIDA

CORRIGIDA COM Ht

A)

B)

C)

Figura 17. Concentrações plasmáticas de propranolol *versus* Período, dados individuais. **A)** Concentrações plasmáticas em ng/mL. **B)** Concentrações plasmáticas normalizadas com a dose pré-operatória de cada paciente. **C)** Concentrações plasmáticas normalizadas com a dose pré-operatória e o peso corporal do paciente.

6. DISCUSSÃO

6.1 Validação do método analítico

Considerando a purificação da matriz biológica previamente a quantificação através de CLAE-F, Heeden (1991) descreveu um procedimento seletivo, porém de custo elevado utilizando extração sólida para o propranolol em plasma através de colunas Bond Elut em duas etapas de extração; a concentração mínima detectável foi 1,0ng em 1ml de plasma. No método desenvolvido, no presente estudo, uma simples extração líquido-líquido com diclorometano foi utilizada para quantificar os níveis plasmáticos do propranolol (LQ: 0,05ng/mL) garantindo baixo custo. A recuperação relativa obtida neste estudo é comparável às descritas previamente (DRUMMER *et al.*, 1981; HARRISON *et al.*, 1985; LO e RIEGELMAN, 1980). Lo e Riegelman (1980), Drummer *et al.* (1981), Harrison *et al.* (1985) alcançaram LQ equivalente a 2ng/mL, para tomadas de ensaio utilizando volumes de plasma variando entre 0,2mL a 1mL, enquanto que Pereira *et al.* (2000) obtiveram melhor limite de quantificação de 1ng/mL para tomada de 0,2mL de plasma. No presente estudo, a partir de pequeno volume de amostra biológica (0,2mL) obteve-se sensibilidade 20 vezes maior quando comparado com o método descrito por Pereira *et al.* (2000), evidenciando visível superioridade relativamente aos métodos anteriores reportados, uma vez que 0,05 ng/mL foram quantificados através de CLAE-F.

Considerando ainda os sistemas cromatográficos previamente descritos, a cromatografia líquida de fase iônica requer reagentes modificadores adicionados à fase móvel como alquilaminas (triethylamina) e ácidos sulfônicos além de um fluxo elevado requerido para eluição do analito. Por outro lado, a cromatografia líquida de fase reversa em sistema isocrático de eluição tem sido preferida às anteriores. Consequentemente, neste estudo o sistema binário utilizando a cromatografia de fase reversa apresenta-se como melhor alternativa relativamente aos mais complexos reportados anteriormente (MONDAMIO *et al.*, 1996; HEDEEN *et al.*, 1981; KOSHAKJI, WOOD, 1986; SOOD, GREEN, MASON, 1988).

Apesar da boa seletividade obtida utilizando sistemas complexos, uma evidente limitação dos métodos anteriores reside no alto fluxo (1,5-2,0mL/min) requerido para eluição do fármaco (ABDEL-HAMID *et al.*, 2000; BASCI *et al.*, 1998; DRUMMER *et al.*, 1981; FU, MASON, 1989; HARRISON *et al.*, 1985) pela redução considerável da vida útil da coluna.

Quando comparado ao reportado por Pereira e col. (2000), as modificações realizadas no presente método proporcionaram melhoria da sensibilidade possibilitando a investigação do *washout* do propranolol no transoperatório. As principais adaptações que justificam a melhora na sensibilidade foram a utilização de fase móvel constituída pela proporção de tampão acetato pH 5,0 e acetonitrila (60:40) em substituição a 65:35 (v/v), a redução da força iônica do meio utilizando tampão acetato 0,1M, pH 5,0 em substituição ao mesmo tampão 0,4M, e finalmente pelo emprego da coluna Shimpack ODS, 150 x 6mm, 5micra, Shimadzu, Kyoto, Japão, em substituição à Nova Pak C18 (150 x 3,9mm, 4micra, Waters, Milford, USA). Assim, justifica-se o aumento da sensibilidade, pelo ganho adicional de seletividade e da capacidade da coluna

Shimpack. O sistema binário de cromatografia de fase reversa descrito neste estudo parece ser a melhor escolha, pela seletividade, destacada sensibilidade, operação em baixo fluxo em sistema isocrático de eluição.

A robustez do método apresentou coeficiente de variação de 1,5%; 2,4% e 6,4% para a utilização de diferentes colunas analíticas C18, variações de composição nos constituintes da fase móvel e no pH do tampão, respectivamente. Além disto, o propranolol mostrou-se estável, nas condições analisadas, quando se considerou a estabilidade de curta duração (ciclo de congelamento e descongelamento, CV = 8,0%), estabilidade de tempo e condição da análise (CV=3,8%), e a estabilidade de longa duração (CV=0,7%), os resultados obtidos na avaliação desses parâmetros estão de acordo com a legislação vigente (BRASIL, 2004). É importante ressaltar que nenhum estudo de estabilidade ou de robustez foi reportado anteriormente.

6.2 Quantificação de propranolol no plasma de pacientes submetidos à correção da Tetralogia de Fallot

A idade ideal para a realização da correção da Tetralogia de Fallot ainda permanece controversa. Lee e colaboradores (2004) descreveram a realização do procedimento de correção em crianças com idade inferior a um ano, enquanto que outros autores sugerem a realização da intervenção em idades superiores à 2 anos (GIARDIN, *et al.*, 2006; NOLLERT *et al.*, 2003; BARAZZONE *et al.*, 1981; GARSON *et al.*, 1981). Os pacientes aqui estudados apresentaram em média idade de 2,10 +/- 1,35 anos, sendo tratados cronicamente com doses de 4,2 +/- 2,8 mg/kg/dia de propranolol até a noite que antecedeu a cirurgia.

As doses administradas a estes pacientes são semelhantes à faixa de dose preconizada anteriormente variando entre 0,8 e 5mg/kg/dia (BUCHHORN *et al.*, 2002; BARAZZONE *et al.*, 1988; GARDSON *et al.*, 1981; PONCE *et al.*, 1973). Por outro lado, pacientes com a anomalia (Tetralogia de Fallot: T4F), em uso crônico de propranolol devem apresentar níveis plasmáticos efetivos entre 40 e 90ng/mL (PONCE, 1973).

Adicionalmente, uma redução na dose de propranolol antes da cirurgia cardíaca é necessária para prevenir complicações durante a intervenção e o baixo débito cardíaco no período pós-operatório. Por outro lado, a administração de propranolol até o período que antecede a cirurgia evita os episódios de hipoxemia durante a indução da anestesia. Entretanto ainda é controverso o período recomendado para a descontinuação do fármaco previamente a cirurgia uma vez que Barazzone e colaboradores (1988) propõem 6-8 horas da última dose de propranolol, outros autores recomendam ainda período de 12 a 18 horas até um máximo de 24 horas, antes do início da intervenção cirúrgica (CARMONA, 2005; PEREIRA *et al.*, 2000).

As concentrações plasmáticas obtidas foram corrigidas com o hematócrito para fins de interpretação dos resultados e verificação do efeito da hemodiluição, pelo procedimento de CEC, sobre as concentrações de propranolol obtidas no transoperatório, tabela 16. Não registrou-se diferença significativa entre os valores de concentração ($p > 0,05$) obtida e corrigida tanto no início como no final da cirurgia. Entretanto, registrou-se significância estatística entre as concentrações obtidas e corrigidas (Ht%) nos períodos intra-CEC (1,1 vs 2,1 ng/mL, $p = 0,0313$) e final da CEC (2,8 ng/mL vs 3,4 ng/mL, $p = 0,0313$); fato esse justificado principalmente pela hemodiluição acentuada que ocorre desde o início da realização do procedimento de circulação extracorpórea e reaquecimento no final da CEC.

Adicionalmente, a Figura 13 ilustra as concentrações plasmáticas do propranolol no transoperatório; no início e durante o período do paciente em CEC. As concentrações corrigidas com o hematócrito permanecem inalteradas no início da cirurgia, enquanto que sem essa correção as concentrações obtidas se reduzem na instalação (início da CEC), se acentuando durante a CEC, principalmente em decorrência da hemodiluição. Pelo reaquecimento do paciente no final da CEC, as concentrações tanto obtida quanto corrigida voltam a se elevar. Segundo Barazzzone e colaboradores (1988), esta elevação se deve principalmente a redistribuição do fármaco dos pulmões para o plasma, a diminuição do metabolismo hepático, e também pela redução do volume de distribuição em função da hipotermia. Adicionalmente, a diminuição de proteínas no plasma eleva entre 6,6 a 13,5% a fração livre do fármaco, uma vez que o propranolol encontra-se 90% ligado às proteínas, principalmente a alfa-1-glicoproteína ácida. Por outro lado, quando a CEC é instalada e ocorre a hemodiluição, a concentração plasmática do propranolol se reduz em 50%; observa-se também que fármacos lipossolúveis, como é o caso do propranolol, são seqüestrados mais facilmente pelo circulador, contribuindo para uma diminuição dos níveis plasmáticos do propranolol durante a CEC. (CARMONA, 2005; MCNAMAR & ALCORN, 2002).

No presente estudo, iniciou-se a intervenção de correção da anomalia cerca de 13 horas após a administração da última dose da medicação pré-operatória. As concentrações plasmáticas do propranolol corrigidas com o hematócrito em cada período da cirurgia, expressas através das medianas (IC95%), foram comparadas, de acordo com o exposto abaixo:

No início e final da cirurgia as concentrações obtidas foram 7,1 (1,8-15,8) ng/mL e 2,9 (1,3-5,7) ng/mL (IC95%), $p>0,05$, respectivamente. Sabe-se que o propranolol é fármaco de alta variabilidade devido extensa metabolização e presença de efeito de primeira passagem; registrou-se maior variabilidade das concentrações plasmáticas do propranolol no final da cirurgia.

Pela instalação da CEC, evidenciaram-se concentrações corrigidas de 2,9 (0,6-8,6) ng/mL, 2,16 (0,5-8,9) ng/mL e 3,4 (1,3-11,6) ng/mL respectivamente nos períodos início, durante e final da CEC; ressalta-se que durante o procedimento, o efeito da hemodiluição foi eliminado pela correção da concentração obtida com o hematócrito, Figura 13, Tabela 17.

As concentrações plasmáticas sofreram redução de 7,1ng/mL para 2,9ng/mL ($p=0,0313$), quando se compararam os períodos início da cirurgia versus início da CEC, estatística Tabela 17. Barazzone e colaboradores (1988) investigaram pacientes com T4F recebendo propranolol PO de 8/8 horas previamente a cirurgia. Esses pesquisadores registraram no início da CEC concentração plasmática de 18,7ng/mL (3,4-61,5ng/mL) na 8ª hora após a administração do fármaco. Tal diferença pode ser justificada pelo tempo decorrido entre a última dose pré-operatória administrada e o início da circulação extra corpórea, após aproximadamente 15 horas no presente estudo contra 8 horas reportada por Barazzone e colaboradores (1988).

Por outro lado, McAllister e colaboradores (1979) investigando pacientes adultos, reportaram uma redução nas concentrações plasmáticas de propranolol da ordem de 50% no início do procedimento da CEC. Entretanto, após a instalação da CEC, as concentrações plasmáticas deste fármaco permaneceram inalteradas ou podem mostrar-se ligeiramente aumentadas. Finalmente, após o término da CEC e pelo

reaquecimento do paciente, as concentrações plasmáticas do propranolol aumentaram, voltando a atingir níveis plasmáticos semelhantes aos reportados no início da cirurgia. Ainda de acordo com estes autores, as concentrações plasmáticas do propranolol mostram-se aumentadas até quatro horas após o término da circulação extracorpórea, relativamente aos valores reportados no final da CEC. Sugere-se adicionalmente, que a hipotermia utilizada durante a CEC, altera a extensão de distribuição e a depuração plasmática do propranolol, responsável pelo aumento pronunciado das concentrações plasmáticas desse fármaco, que é contra-balanceado pelo efeito da hemodiluição ocorrida durante o processo de instalação da circulação extracorpórea. Este fenômeno de manutenção e/ou ligeiro aumento das concentrações plasmáticas de propranolol ao término da circulação extracorpórea, fruto principalmente da redistribuição do fármaco dos pulmões, foi também observada no presente.

Finalizada a circulação extra corpórea, as concentrações plasmáticas, Tabela 16, reduziram de 2,9 (1,3–5,7) ng/mL no final da cirurgia para 2,3 (0,5-4,2) ng/mL ($p=0,0938$, NS) no 1ºPO e para 0,03 (0,0-1,7)ng/mL, $p=0,0313$ no 2ºPO, conforme indica a estatística na Tabela 17. Barazzzone e colaboradores (1988) observaram no 1ºPO concentração plasmática ligeiramente superior às reportadas no presente trabalho, variando de 1,0 para 5,6ng/mL. Os resultados obtidos no 2º PO estão de acordo com Lacy (2004) uma vez que as concentrações plasmáticas (medianas) se reduziram a 0,03ng/mL na 66ª hora.

O propranolol é fármaco conhecido pela alta variabilidade disposicional (CARMONA *et al.*, 2005; PEREIRA, *et al.*, 2000). Considerando-se ainda a somatória dos vários procedimentos que são realizados no transoperatório, o parâmetro área sob a curva estimada no período (AUC_{0-t}) também mostra a variabilidade inter-pacientes. A

curva de tendência, da concentração plasmática do fármaco no período de estudo, ilustrada na Figura 16 mostra um decaimento exponencial desde a última dose pré-operatória até o início da CEC, decaimento este que é interrompido durante o procedimento de recirculação. É interessante notar que as concentrações da curva de tendência se elevam em decorrência do estresse cirúrgico associado ao reaquecimento do paciente ao final da CEC e também em função da recirculação do propranolol dos pulmões pela finalização do procedimento.

A variabilidade inter-individual é um componente multifatorial, composta por variação genética, seja nos ligantes farmacológicos (receptores, enzimas dentre outros), transportadores (glicoproteína P, alfa-1-glicoproteína) ou enzimas metabolizadoras (CYP), fatores ambientais (indução, remissão e inibição de todos os componentes ligados à disposição farmacológica), fatores fisiológicos como a idade e fisiopatológicos como as doenças associadas. Desta forma, pode-se justificar a variação de dose requerida para o propranolol bem como para muitos outros agentes terapêuticos (LU, 1998).

Além disto, as formulações sólidas disponíveis no mercado não são apropriadas para atender às necessidades dos pacientes pediátricos. Desta forma, a dosagem prescrita pelo Clínico exige hoje a trituração do comprimido, seguida da preparação de suspensão previamente à administração, uma vez que as formas farmacêuticas não foram desenvolvidas para atender a essa população. Ressalta-se ainda que este procedimento não garante uniformidade de dosagem, contribuindo assim para o aumento da variabilidade interindividual.

Finalmente, uma vez que as concentrações encontradas no presente estudo foram inferiores as recomendadas como efetivas (40-90ng/mL) pode-se afirmar que os

pacientes provavelmente não se encontravam beta bloqueados desde o início da cirurgia de correção da anomalia. Adicionalmente, com base na eliminação lenta (MRT ~36 horas) registrada para o propranolol, após a última dose pós-operatória, sugere-se que o *washout* do propranolol tenha se completado até o final do 2º PO.

Com base nos resultados obtidos pela realização desse estudo propõe-se a utilização de soluções orais magistrais, visando garantir a dosagem administrada a estes pacientes.

7. CONCLUSÃO

Pode-se afirmar que o método analítico validado demonstrou boa seletividade, linearidade, sensibilidade, exatidão e precisão suficientes para a determinação de propranolol em plasma durante o washout do beta bloqueador em crianças. Além disso, os estudos de robustez e estabilidade foram incluídos para o enriquecimento do estudo de validação.

Com base no monitoramento das concentrações plasmáticas do propranolol verifica-se que a hemodiluição, somada à hipotermia, ligação à proteína, seqüestro de fármaco pela máquina e isolamento do fármaco nos pulmões contribuem para a alteração das concentrações plasmáticas do fármaco; pelo reaquecimento pós-CEC registrou-se aumento das concentrações e finalmente o washout do propranolol foi completo até o 2º PO.

Como resultado desse estudo preliminar, o protocolo de administração do propranolol foi alterado na Unidade de Terapia Intensiva de Neonatos do Instituto do Coração do HC FMUSP. Finalmente, recomenda-se como relevante a padronização da dose e da formulação a ser administrada, considerando-se ainda o estágio da doença e a faixa etária.

8 - REFERÊNCIAS

1. ABDEL-HAMID, M.E. Comparative LC_MS and HPLC analysis of selected antiepileptics and beta-blocking drugs. *Il Farmaco*, v.55, p. 136-145, 2000.
2. BRASIL. ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RE nº 899, de 03 de junho de 2004. *Diário oficial da União*, 04 de junho de 2004.
3. BARAZZONE, C; JACCARD, C; BERNER, M.; DAYER, P.; ROUGE, J.C.; OBERHANSLI, I.; FRIEDLI, B. Propranolol treatment in children with tetralogy of Fallot alters the response to isoprenaline after surgical repair. *Br. Heart J.*, v.60, p.156-61, 1988.
4. BASCI, N.E.; TEMIZER, A.; BOZKURT, A; ISIMER, A. Optimization of mobile phase in the separation of b-blockers by HPLC. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v.18, p.745-750, 1998.
5. BOUDOULAS, H.; SNYDER, G.L.; LEWIS, R.P.; KATE, R.E.; KARAYANNCOS, P.E.; VASKO, J.S. Safety and efficacy of continue propranolol administration through coronary bypass surgery. *Am. J. Cardiol.*, New York, v.41, p.359, 1978.

6. BUCHHORN, R.; HULPKE-WETTE, M.; RUSCHEWSKI, W.; PREGLA, R.; FIELITZ, J.; HETZER, R.; REGITZ-ZAGROSEK, V. Beta-receptor downregulation in congenital heart disease: a risk factor for complications after surgical repair? *Ann Thoracic Surgery*. v. 73, n.2, p. 610-613, 2002.
7. BUYLAERT, W.A.; HERREGODS, L.L.; MORTIER, E.P.; BOGAERT, M.G; Cardiopulmonary bypass and the pharmacokinetics of drugs. An update. *Clinical Pharmacokinetics*, v.17, n.1, p 10-26, 1989.
8. CARMONA, MJC; MALBOUISSON, LMS; PEREIRA, VA; BERTOLINE, MA; OMOSAKO, CEK; LE BIHAN, KB; AULER JR, JOC; SANTOS, SRCJ. Cardiopulmonary bypass alters the pharmacokinetics of propranolol in patients undergoing cardiac surgery. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v.38, p.713-721, 2005.
9. CONN, R.D. Clinical usefulness of beta-adrenergic blocking agents. *Postgraduate medicine*. v.55, n.2, p.131-136, 1974.
10. CUMMING, G. R. Propranolol in Tetralogy of Fallot. *Circulation*, n.41, v.1, p. 13-15, 1970.
11. CUMMING, G. R.; CARR, W. Hemodynamic Effects of Propranolol in Patients with Fallot's Tetralogy. *Am. Heart J.*, v.74, n.1, p.29-36, 1967.

12. DRUMMER, O.H.; McNEIL, J.; PRITCHARD, E.; LOUIS, W.J. Combined high-performance liquid chromatographic procedure for measuring 4-hydroxypropranolol and propranolol in plasma: pharmacokinetic measurements following conventional and slow-release propranolol administration. *J. Pharm. Sci.*, v.70, p. 1030-1032, 1981.
13. ERIKSSON, B. O.; THOREN, C.; ZETTERQVIST, P. Long-term Treatment with Propranolol in Selected Cases of Fallot's Tetralogy. *Br. Heart J.*, v.31, n.1, p. 37-44, 1969.
14. FLYNN, JT; NAHATA, MC; MAHAN, JD; PORTMAN, RH. Population pharmacokinetics of amlodipine in hypertensive children and adolescents. *Journal of Clinical Pharmacology*, v.46, p.905-916, 2006.
15. FU, C.J.; MASON, W.D. Determination of propranolol and 4-hydroxypropranolol in human plasma by high-performance liquid chromatography. *Analyst*, v. 114, p. 1219-1223, 1989.
16. FURBERG, C.D. Beta-adrenergic receptor blocking drugs in hypertrophic cardiomyopathy, autonomically mediated cardiovascular functional disorders and Fallot's Tetralogy. *Drugs*. v.7, n.1, p.106-117, 1974.
17. GARSON, A.; GILLETE, P. C.; McNAMARA, D. G. Propranolol: The Preferred Palliation for Tetralogy of Fallot. *Am. J. Cardiol.*, v.47, n.5, p. 1098-1104, 1981.

18. GARSON, A.; GORRY, G. A.; McNAMARA, D. G.; COOLEY, D. A. The Surgical Decision in Tetralogy of Fallot: Weighing Risks and Benefits with Decision Analysis. *Am. J. Cardiol.*, n.45, p.108-116, 1980.
19. GIARDINI, A; SPECCHIA, S; COUTSOUMBAS, G; DONTI, A; FORMIGARI, R; FATTORI, R; OPPIDO, G; GARGIULO, G; PICCHIO, FM. Impact of pulmonary regurgitation and right ventricular dysfunction on oxygen uptake recovery kinetics in repaired tetralogy of Fallot. *The European Journal of Heart Failure*, in press, 2006.
20. GINSBERG, G; HATTIS, D; SONAWANE, B; RUSS, A; BANATI, P; KOZLAK, M; SMOLENSKI, S; GOBLE, R. Evaluation of child/adult pharmacokinetic differences from a database derived from the therapeutic drug literature. *Toxicological Sciences*, n.66, p.185-200, 2002.
21. HARDMAN, J. G.; GILMAN, A.G.; LIMBIRD, L. E. *Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics*, 10th ed., New York, McGraw-Hill, p.253-254 e p.1998, 2001.
22. HARRISON, P.M.; TONKIN, A.M.; CAHILL, C.M.; McLEAN, A.J. Rapid and simultaneous extraction of propranolol, its neutral and basic metabolites from plasma and assay by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.*, v. 343, p. 349-358, 1985.

23. HAY JR, W. W.; GROOTHUIS, J. R.; HAYWARD, A. R; LEVIN, M. J. *Current Pediatric Diagnosis and Treatment*, 11th ed., London: Prentice Hall International, p. 550-552, 1993.
24. HEDEEN, K.M.; TYCZKOWSKA, K.; AUCOIN, D.P.; NORTON, R.M. Rapid high-performance liquid chromatographic method for the determination of propranolol levels in canine and feline plasma. *J. Chromatogr.* v. 572, p. 239-245, 1991.
25. HERBERT, W. H.; FARNSWORTH, P. B. Cyanotic Episodes of Tetralogy of Fallot Pathogenesis and Management. *Clinical Pediatrics*, v. 10, n.2, p. 115-118, 1971.
26. HOLLEY, F.O.; PONGANIS, K.V.; STANSKI, D.R. Effect of cardiopulmonary bypass on the pharmacokinetic of drugs. *Clinical pharmacokinetics*. v. 7, n.3, p. 234-251, 1982.
27. KOSHAKJI, R.P.; WOOD, A.J.J. A modified, sensitive liquid chromatographic method for measurement of propranolol with fluorescence detection. *J. Pharm. Sci.*, Washington, v.75, p.87-89, 1986.
28. LACY, C. Drug Information Handbook. Disponível em: www.uptodate.com Acessado em: 10/12/2004.

29. LÄER, S; ELSHOFF, JP; MAIBOHM, B; WEIL, J; MIR, TS; ZANG, W; HULPKE-WETTE, M. Development of a safe and effective pediatric dosing regimen for sotalol based on population pharmacokinetics and pharmacodynamics in children with supraventricular tachycardia. *Journal of the American College of Cardiology*, v.46, n. 7, p.1322-30, 2005.
30. LEE, JR; KIM, JS; LIM, HG; HWANG, HY; KIM, YJ; RHO, JR; AHN, C. Complete repair of Tetralogy of Fallot in infancy. *Interactive cardiovascular and thoracic surgery*, v.3, p. 470-474, 2004.
31. LO, M. RIEGELMAN, S. Determination of propranolol and its major metabolites in plasma and urine by high-performance liquid chromatography without solvent extraction. *J. Chromatogr. Amsterdam*, v. 183, p. 213-220, 1980.
32. LOGGIE, J. M. H.; VAN MAANEN, E. F. The Autonomic Nervous System and Some Aspects of Use of Autonomic Drugs in Children. Part II. *J. Pediatrics*, v.81, n.3, p.432-45, 1972.
33. McALLISTER, RG JR; BOURNE, DW; TAN, TG; ERICKSON, JL; WACHTHEL, CC; TODD, EP. Effects of hypothermia on propranolol kinetics. *Clin. Pharmacol. Ther.* V. 25, p. 1 a 7, 1979.
34. McNAMARA, PJ; ALCORN, J. Protein binding predictions in Infants. *AAPS PharmSci*, v.4, n.1, p.1-8, 2002.

35. MODAMIO, P.; LASTRA, C.F.; MONTEJO, O.; MARIÑO, E.L. Development and validation of liquid chromatography methods for the quantitation of propranolol, metoprolol, atenolol and bisoprolol: application in solution stability studies. *International journal of pharmaceutics*. v.130, p.137-140, 1996.
36. NOLLERT, GDA; DABRITZ, SH; SCHMOECKEL M.; VICOL, C.; REICHART, B. Risk factors for sudden death after repair of Tetralogy of Fallot. *Ann of Thoracic Surgery*, v.76, n.6, p.1901-1905, 2003.
37. PEREIRA, V. A; BERTOLINE, M. A; CARMONA, M. J. C; AULER JR, J. O. C.; SANTOS, S. R. C. J. High Performance Liquid Chromatography to Determine Propranolol in Plasma. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, v.36, n.2, p.241-247, 2000.
38. PEREIRA. V;A; CARMONA, M.J.C.; OMOSAKO, C.E.K.; AULER Jr, J.O.C.; SANTOS, S.R.C.J. Obesity influences propranolol pharmacokinetics in patients undergoing coronary artery bypass grafting employing cardiopulmonary bypass. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, v.39, n.4, p.409-14, 2003.
39. PIGULA, F. A.; KHALIL, P. N.; MAYER, J. E.; DEL NIDO, P. J.; JONAS R. A. Repair of Tetralogy of Fallot in Neonates and Young Infants. *Circulation*, v.100, n. II, p.157-61, 1999.

40. PONCE, F. E.; WILLIAMS, L. C.; WEBB, H. M.; RIOPEL, D. A.; HAHN, A. R. Propranolol Palliation of Tetralogy of Fallot: Experience with Long-Term Drug Treatment in Pediatric Patients. *Pediatrics*, v.52, n.1, p.100-108, 1973.
41. RAO, O.S.; QUESADA L.V.; MUELLER H.S. A simple micromethod for simultaneous determination of plasma propranolol and 4-hydroxypropranolol. *Clin Chim Act*, v.88, n.2, p.355-61, 1978.
42. RITSCHER, W. A. & KEARNS, G.L. *Handbook and Basic Pharmacokinetics including clinical applications*, 6th ed., Washington, D.C., American Pharmacists Association (APhA), 2004.
43. ROSS, E. M.; ROBERTSON, P. G. C.; WATSON, H. Failure of Oral Propranolol to Maintain Relief from Paroxysmal Syncopal Attacks in Fallot's Tetralogy after its Successful Intravenous Use. *Lancet*, v.2, n.7470, p.945-946, 1966.
44. SCHEUPLEIN, R; CHARNLEY, G; DOURSON, M. Differential sensitivity of children and adults to chemical toxicity. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, v.35, p429-447, 2002.
45. SHAH, P. M.; KIDD, L. Circulation Effects of Propranolol in Children with Fallot's Tetralogy. Observation with Isoproterenol Infusion, Exercise and Crying. *Am. J. Cardiol.*, v.19, n.5, p.653-657, 1967.

46. SHAND, D.G.; NUCKOLLS, E.M.; OATES, J.A. Plasma propranolol levels in adults with observations in four children. *Clin. Pharmacol. Ther.*, v.11, n.1, p. 112-120, 1970.
47. SOOD, S.P.; GREEN, V.I.; MASON, R.P. Rotten methods in toxicology and therapeutic drug monitoring by high-performance liquid chromatography. IV. A rapid microscale method for determination of propranolol and 4-hydroxypropranolol in plasma. *Ther. Drug Monit.*, New York, v.10, p.224-230, 1988.
48. VAN ARSDELL, G. S.; MAHARAJ, G. S.; TOM, J.; RAO, V. K.; COLES, J. G.; FREEDOM, R. M.; WILLIAMS, W. G.; McCRINDLE, B. W. What is the Optimal Age for Repair of Tetralogy of Fallot. *Circulation*, v.102, n.III, p.123-9, 2000.
49. WALLE, T.; MORRISON, J.; WALLE, K.; CONRADI, E. Simultaneous determination of propranolol and 4-hydroxypropranolol in plasma by mass fragmentography. *J. Chromatogr.*, Amsterdam, v.114, p. 3511-359, 1975.
50. WALLE, T.; WEBB, J. G.; BAGWELL, E. E.; WALLE, U. K.; DANIELL, H. B.; GAFFNEY, T. E. Stereoselective Delivery and Actions of Beta Receptor Antagonists. *Biochemical Pharmacology*, v.37, n.1, p. 115-124, 1988.
51. WENSLEY, DF; KARL, T; DEANFIELD, JE; LEVAL, MR; MARCARTNEY, FJ; STARK, J. Assessment of Residual Right Ventricular outflow tract obstruction following surgery using the response to intravenous propranolol. *Ann Thoracic Surgery* v.44, n.6, p. 633-636, 1987.

52. WREN, S.A.C.; TCHELITCHEFF, P. UPLC/MS for the identification of beta-blockers.

J. Pharmaceutical and Biomedical Analysis, v.40, n.3, p.571-80. 2006.

Apêndices

Apêndice 1 – 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

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: "MONITORAMENTO DO PROPRANOLOL UTILIZADO NA PROFILAXIA DE CRISES DE HIPÓXIA EM CRIANÇAS COM TETRALOGIA DE FALLOT "

2. Pesquisador: CRISTINA SANCHES

Cargo/Função: FARMACÊUTICA .Inscrição Conselho Regional Nº:31954
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 consequência imediata ou tardia do estudo.)

4. Duração da Pesquisa: 18 a 24 meses

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

1. Justificativa e os objetivos da pesquisa:

A Tetralogia de Fallot é uma doença cardíaca congênita, na qual a criança apresenta um defeito que faz com que o sangue arterial (rico em oxigênio) se misture com o sangue venoso (pobre em oxigênio). Esta mistura de sangue venoso e arterial faz com que estas crianças sejam muitas vezes cianóticas (de coloração levemente azulada, acizentada), apresentando crises de dispnéia (falta de ar) e hipóxia (falta de oxigenação) constantemente, principalmente após a realização de algum exercício físico. Este defeito do coração deve ser corrigido através de uma cirurgia porém, enquanto a criança não apresentar idade e condições clínicas ideais para a realização da correção cirúrgica, o tratamento com o medicamento é requerido para a prevenção destas crises. Assim, as crianças portadoras desta doença fazem uso crônico de propranolol para controlar as crises de hipóxia enquanto aguardam a cirurgia para correção da patologia.

Este projeto de pesquisa pretende correlacionar os efeitos clínicos observados com as concentrações de propranolol encontradas no sangue para o melhor controle das crises de hipóxia. Além disso, verificaremos a influência do propranolol residual na função cardíaca durante a cirurgia corretiva.

2. Procedimentos que serão utilizados e propósitos; incluindo a identificação dos procedimentos que são experimentais:

Antes da cirurgia cardíaca, seu (sua) filho (a) fará uma nova avaliação médica, incluindo ecocardiograma, eletrocardiograma, e raio-X de tórax. Além disso, será coletada uma amostra de sangue para a realização de exames laboratoriais de rotina (uréia, creatinina, glicemia, coagulação, hemograma e plaquetas).

Durante a cirurgia, seu (sua) filho (a) também fará 6 coletas de amostra de sangue, de 2mL cada uma (aproximadamente 1 colher de chá). Além disso, os seguintes parâmetros serão monitorados de forma não evasiva: pressão arterial, frequência cardíaca e saturação de oxigênio arterial (através de um aparelho digital chamado oximetria de pulso).

A quantidade total de sangue coletado (antes e durante a cirurgia) será de no máximo 20mL (2 colheres de sopa).

3. Desconfortos e riscos esperados:

Os riscos decorrentes do estudo serão mínimos, relacionados apenas com a coleta de sangue, podendo haver a ocorrência de hematoma (mancha roxa) no local da coleta das amostras sanguíneas antes da cirurgia através de punção venosa. Durante a cirurgia, as amostras serão colhidas através de cateter venoso, não havendo o risco de ocorrer hematoma.

4. Benefícios que poderão ser obtidos:

Como benefício espera-se obter a redução ou ausência das crises de dispnéia (falta de ar) nas crianças com tetralogia de Fallot, melhorando a qualidade de vida destas crianças que aguardam a correção cirúrgica. Além disso, verificaremos também o efeito do propranolol residual na função cardíaca durante a cirurgia cardíaca.

5. Procedimentos alternativos que possam ser vantajosos para o indivíduo:

As crianças portadoras de tetralogia de Fallot fazem uso constante de propranolol com o intuito de prevenir as crises de dispnéia (falta de ar) devido à queda de oxigenação sanguínea, enquanto aguardam a correção cirúrgica. Assim, a administração do propranolol e a correção cirúrgica nestes pacientes fazem parte do tratamento padrão realizado nestes casos, não havendo tratamentos alternativos mais vantajosos.

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. Da indenização por parte do Patrocinador 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. Filomena Regina Gomes Galas – responsável clínico – Instituto do Coração HCFMUSP – Rua Enéas de Carvalho Aguiar, 44 – fone: (11) 3069-5339 ou 9931-7389

- Dr. José Otávio Costa Auler Jr. – coordenador clínico – médico chefe da UTI cirúrgica - Instituto do Coração HCFMUSP – Rua Enéas de Carvalho Aguiar, 44 – fone: (11) 9069-5232

- Dra. Anne Gerymaia Oliveira de Melo Silva – responsável clínico – pós graduanda FMUSP - Instituto do Coração HCFMUSP – Rua Enéas de Carvalho Aguiar, 44 – fone: (11) 3069-5339

VII – 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)

INSTRUÇÕES PARA PREENCHIMENTO DO TERMO DE CONSENTIMENTO PÓS-INFORMAÇÃO

1. Este termo conterá o registro das informações que o pesquisador fornecerá ao sujeito da pesquisa, em linguagem clara e acessível, evitando-se vocábulos técnicos não compatíveis com o grau de conhecimento do interlocutor.
2. A avaliação do grau de risco deve ser minuciosa, levando em conta qualquer possibilidade de intervenção e de dano à integridade física do sujeito da pesquisa.
3. O formulário poderá ser em letra de forma legível, datilografia ou meios eletrônicos.
4. Este termo deverá ser elaborado em duas vias, ficando uma via em poder do paciente ou seu representante legal e outra deverá ser juntada ao prontuário do paciente.
5. A via do Termo de Consentimento Pós-Informação submetida à análise do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP-FCF) deverá ser idêntica àquela que será fornecida ao sujeito da pesquisa.

Apêndice 2 – Valores individuais das concentrações plasmáticas (ng/mL) de propranolol no transoperatório.

	Início da pré		pós		Fim	24h	48h
Paciente	cirurgia	CEC	CEC	CEC	Cirurgia	PO	PO
1	24,65	13,32	1,55	2,64	4,03	4,03	0
2	6,58	4,04	0,44	2,75	1,29	0,15	0
3	7,6	7,36	6,51	12,86	5,53	0,7	0,05
4	1	0,85	0,72	1,29	1,36	0,55	0,23
5	1,18	0,11	0,22	7,55	5	5,94	4,07
6	11,68	1,33	4,16	2,82	0,48	0,1	0
Média	8,78	4,50	2,27	4,99	2,95	1,91	0,73
DP	8,77	5,08	2,53	4,41	2,16	2,47	1,64
Mediana	7,09	2,69	1,14	2,79	2,70	0,63	0,03
li IC95%	1,76	0,44	0,24	1,45	1,22	-0,06	-0,59
IsIC95%	15,80	8,56	4,29	8,52	4,68	3,89	2,04

Apêndice 3 – Dados descritivos dos valores de hematócrito (Ht) durante a cirurgia.

	Início da	pré		pós	Fim	24h	48h
Paciente	cirurgia	CEC	CEC	CEC	Cirurgia	PO	PO
1	43%	43%	23%	42%	42%	39%	39%
2	38%	21%	33%	32%	32%	41%	40%
3	40%	40%	22%	28%	28%	38%	40%
4	46%	40%	27%	34%	32%	43%	39%
5	34%	35%	15%	28%	34%	41%	41%
6	50%	39%	19%	41%	45%	42%	34%
Média	41,83%	36,33%	23,17%	34,17%	35,50%	40,67%	38,83%
DP	5,74%	7,94%	6,27%	6,15%	6,57%	1,86%	2,48%
Mediana	41,50%	39,50%	22,50%	33,00%	33,00%	41,00%	39,50%
li IC95%	37,24%	29,98%	18,15%	29,25%	30,25%	39,18%	36,85%
IsIC95%	46,43%	42,69%	28,19%	39,08%	40,75%	42,16%	40,82%

Anexos