

Renata Lopes da Silva Lima

**Monitorização terapêutica da carbamazepina**

Universidade Fernando Pessoa

Porto, 2016



Renata Lopes da Silva Lima

**Monitorização terapêutica da carbamazepina**

Universidade Fernando Pessoa

Porto, 2016

Renata Lopes da Silva Lima

**Monitorização terapêutica da carbamazepina**

Trabalho apresentado à Universidade Fernando  
Pessoa como parte dos requisitos para obtenção do  
grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas

---

Universidade Fernando Pessoa

Porto, 2016

## **Resumo**

A epilepsia é uma patologia que afeta o sistema nervoso, caracterizada por crises imprevisíveis com ou sem convulsões associadas. Atualmente sabe-se que a epilepsia tem origem em descargas súbitas anormais que ocorrem no cérebro e que afeta mais de cinquenta milhões de pessoas em todo o mundo.

O tratamento da epilepsia passa pela utilização de fármacos antiepiléticos e anticonvulsivantes. A escolha da terapêutica medicamentosa deve ser feita de acordo com o tipo de crise, a eficácia e efeitos adversos dos fármacos disponíveis, tendo como objetivo controlar as convulsões sem causar efeitos secundários. No mercado, está disponível uma variedade de fármacos, que são divididos em antiepiléticos clássicos e novos antiepiléticos. Os fármacos clássicos têm uma grande variabilidade farmacocinética, janelas terapêuticas estreitas, efeitos adversos e interações medicamentosas frequentes. Por outro lado, os fármacos antiepiléticos mais recentes têm perfis de segurança melhorados, janelas terapêuticas mais alargadas, são bem tolerados e apresentam menor variabilidade farmacocinética e menos interações medicamentosas.

Devido às características intrínsecas destes fármacos, nomeadamente no que concerne as interações com outros fármacos e as janelas terapêuticas estreitas, surge a necessidade de se realizar a sua monitorização terapêutica cujo principal objetivo é a individualização posológica. Assim, a quantificação da concentração do fármaco numa amostra biológica permite assegurar uma terapêutica individualizada aumentando a sua eficácia e diminuindo os efeitos adversos. Este doseamento pode ser efetuado por imunoensaios ou recorrendo a métodos cromatográficos. Os primeiros são utilizados em exames de rotina pois permitem uma avaliação rápida e precisa da concentração do fármaco. Por outro lado, os métodos cromatográficos são processos mais caros e morosos mas têm a vantagem de detetar e quantificar vários fármacos em simultâneo, para além de analisarem os seus metabolitos.

Palavras-chave: epilepsia; fármacos antiepiléticos; carbamazepina; carbamazepina-10,11-epóxido, oxcarbazepina; monitorização terapêutica; métodos de quantificação; imunoensaios; métodos cromatográficos.

## **Abstract**

Epilepsy is a condition which affects the nervous system, characterized by unpredictable seizures, with or without associated convulsions. Currently it is known that epilepsy seizures are caused by abnormal discharges in the electrical activity of the brain and that it affects more than fifty million people around the world.

Epilepsy treatment involves the use of antiepileptic and anticonvulsant drugs. The choice of drug therapy should be made according to the type of seizure, efficacy and adverse effects and the goal of therapy is to control seizures without causing side effects. There are several antiepileptic drugs available in the market, which are divided into classical and new antiepileptics. The classic drugs have high pharmacokinetic variability, narrow therapeutic range and significant adverse effects and drug interactions. On the other hand, the newer antiepileptic drugs, have better safety profiles, larger therapeutic range, better tolerability and alower pharmacokinetic variability and fewer drug interactions.

Due to the intrinsic characteristics of these drugs, namely those regarding interactions with other drugs and the narrow therapeutic windows, its is necessary to perform its therapeutic monitoring whose main purpose is to individualize dosage. Thus, quantification of the concentration of a drug in a biological sample and can ensure an individualized therapy by increasing effectiveness and reducing side effects. This determination can be carried out using immunoassays or chromatographic procedures. Immunoassays are used in routine exams because they allow a quick and accurate assessment of drug concentration. On the other hand, chromatographic methods are more expensive and time consuming process but have the advantage of detecting and quantifying multiple drugs simultaneously in addition to examining their metabolites.

Keywords: epilepsy; antiepileptic drugs; carbamazepine; carbamazepine-10,11-epoxide; oxcarbazepine; therapeutic drug monitoring; analytical techniques; immunoassays; chromatographic techniques.

## **Agradecimentos**

À minha orientadora, Professora Doutora Renata Souto, e à minha co-orientadora Professora Doutora Adriana Pimenta, por todo o apoio e ajuda durante a elaboração desta monografia, pela disponibilidade, sugestões e conhecimentos transmitidos, motivação e simpatia.

À minha família, amigos e colegas que estiveram presentes ao longo do meu percurso académico, que contribuíram para que esta etapa fosse concretizada. Obrigada pela amizade, pela paciência em dias difíceis e pelos momentos partilhados com todos.

Obrigada!

## Índice

Resumo .....	I
Abstract.....	II
Agradecimentos .....	III
Índice de Figuras .....	VI
Índice de Tabelas .....	VII
Lista de abreviaturas .....	VIII
I. Introdução.....	1
II. Abordagem farmacológica no tratamento da epilepsia .....	6
1. Classificação das crises epiléticas .....	6
2. Classificação dos antiepiléticos e anticonvulsivantes .....	11
3. Principais mecanismos de ação dos antiepiléticos .....	16
a) Inibição dos canais de sódio dependentes da voltagem.....	16
b) Facilitar a neurotransmissão inibitória do ácido gama-aminobutírico (GABA).....	17
c) Bloqueadores do glutamato .....	18
4. Monitorização terapêutica de fármacos .....	19
III. Carbamazepina e sua aplicação farmacológica .....	25
1. Mecanismo de ação .....	26
2. Características farmacocinéticas.....	27
3. Oxcarbazepina .....	30
4. Determinação dos níveis séricos da carbamazepina e oxcarbazepina.....	32
IV. Principais métodos de análise da carbamazepina .....	34
1. Imunoensaios .....	38
a) Imunoensaio de fluorescência polarizada (FPIA) .....	39
b) Imunoensaio multiplicado por enzima (EMIT).....	40



2.	Métodos cromatográficos .....	40
a)	Cromatografia gasosa (GC) .....	41
b)	Cromatografia líquida.....	43
	Cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC).....	43
	Cromatografia líquida de ultra eficiência (UHPLC ou UPLC) .....	45
	Cromatografia líquida de camada fina de alta eficiência (HPTLC) .....	46
i.		
ii. c)	Cromatografia capilar eletrocínética micelar (MECK) .....	47
Vii.	Conclusões e perspectivas futuras .....	49
VI.	Bibliografia.....	51

## Índice de Figuras

**Figura 1.** Classificação dos principais tipos de crises epiléticas (adaptada de Epilepsy Action Australia, s.d.).

**Figura 2:** Sintomas característicos das convulsões parciais simples de acordo com o local do cérebro afetado (adaptada de Epilepsia – Psiquiatria Geral, s.d.).

**Figura 3.** Mecanismo de ação dos AEDs bloqueadores dos canais de sódio (retirada de Shah *et al*, 2015).

**Figura 4.** Mecanismos de ação dos AEDs que envolvem o GABA (retirada de Shah *et al*, 2015).

**Figura 5.** Conceito de janela terapêutica (adaptada de Kang e Lee, 2009).

**Figura 6.** Estrutura química da carbamazepina (retirada de Patsalos, 2013).

**Figura 7.** Mecanismo de ação da carbamazepina (canal de sódio dependente da voltagem) (retirada de Ochoa, 2016).

**Figura 8.** Metabolismo da carbamazepina (adaptada de Breton *et al*, 2005).

**Figura 9.** Estrutura química da oxcarbazepina (retirada de Breton *et al*, 2005).

**Figura 10.** Metabolismo da oxcarbazepina (adaptada de Breton *et al*, 2005).

## Índice de Tabelas

**Tabela 1.** Classificação dos tipos de crises epiléticas de acordo com a ILAE (adaptada de Goldenberg, 2010; Epilepsy Foundation, 2013).

**Tabela 2.** Fármacos antiepiléticos utilizados para os vários tipos de crises epiléticas (adaptada de Goldenberg, 2010; Caramona, 2012).

**Tabela 3.** Classificação dos fármacos antiepiléticos comercializados em Portugal (adaptada de Caramona, 2012).

**Tabela 4.** Características dos AEDs clássicos (adaptada de Kang e Lee, 2009; Krasowski, 2013).

**Tabela 5.** Indicações para a TDM (adaptada de Kang e Lee, 2009; Patsalos e Berry, 2013).

**Tabela 6.** Características químicas de alguns antiepiléticos (adaptada de Krasowski, 2011; Krasowski, 2013).

**Tabela 7.** Métodos analíticos utilizados para a TDM da CBZ, CBZ-E e OXC (adaptada de Breton *et al*, 2005; Dasgupta e Datta, 2008; Patsalos e Berry, 2013; Datar, 2015).

**Lista de abreviaturas**

AACC – Associação Americana de Química Clínica (do inglês *American Association for Clinical Chemistry*)

AANS – Associação Americana de Cirurgiões Neurológicos (do inglês *American Association of Neurological Surgeons*)

AEDs – fármacos antiepiléticos (do inglês *antiepileptic drugs*)

AMPA – ácido alfa-amino-3-hidroxi-5-metilisoxazol-4-propiónico

CBZ – carbamazepina

CBZ-E – carbamazepina-10,11-epóxido

CYP450 – citocromo P450 (do inglês *cytochrome P450*)

DAD - detetor de arranjo de fotodiodos

EMA – Agência Europeia da Medicina (do inglês *European Medicines Agency*)

EMIT - imunoensaio multiplicado por enzima (do inglês *Enzyme Multiplied Immunoassay Technique*)

FDA – *US Food and Drug Administration*

FPIA - imunoensaio de fluorescência polarizada (do inglês *Fluorescence Polarization Immunoassay*)

GABA – ácido gama-aminobutírico (do inglês *gamma aminobutyric acid*)

GABA-T – GABA Transaminase

GAD – ácido glutâmico descarboxilase

GC – cromatografia gasosa (do inglês *Gas Chromatography*)

GC-MS - cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa

GC-MS/MS - cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas em modo tandem ou sequencial (do inglês *gas chromatography-tandem mass spectrometry*)

HPLC – cromatografia líquida de alta eficiência (do inglês *High Performance Liquid Chromatography*)

HPTLC – cromatografia de camada fina de alta eficiência (do inglês *High Performance Thin Layer Chromatography*)

ILAE – Liga Internacional contra a Epilepsia (do inglês *International League Against Epilepsy*)

LC – cromatografia líquida (do inglês *liquid chromatography*)

MECK – cromatografia micelar eletrocínética (do inglês *micellar electrokinetic chromatography*)

MEPS - microextração por sorvente empacotado (do inglês *microextraction by packed sorbent*)

MHD – 10-monohidroxi (do inglês *10-monohydroxy*)

MS – espectroscopia de massa (do inglês *mass spectrometry*)

NMDA – N-metil-D-aspartato

OXC – oxcarbazepina

SNC – sistema nervoso central

TDM – monitorização terapêutica de fármacos (do inglês *therapeutic drug monitoring*)

UHPLC - cromatografia líquida de ultra eficiência (do inglês *ultra-high performance liquid chromatography*)

UV - ultravioleta

WHO – Organização Mundial de Saúde (do inglês *World Health Organization*)

## I. Introdução

A epilepsia é uma condição neurológica que afeta o sistema nervoso, caracterizada pela recorrência periódica de crises com descarga neuronal, associadas ou não a convulsões. Estas convulsões são causadas por distúrbios na atividade elétrica do cérebro (Epilepsy Foundation, 2013). A palavra “epilepsia” deriva da palavra grega *epilambanein* que significa ser possuído, atacado ou dominado (Goldenberg, 2010). Foi usada pela primeira vez na Grécia Antiga altura em que se pensava que estas crises tinham origem em forças sobrenaturais e que para os doentes serem tratados era necessário recorrer ao exorcismo e outras crenças sociais e religiosas. Apenas em 400 a.C., Hipócrates concluiu que esta condição tinha causas e características específicas (Reynolds, 2005) e, só muito mais tarde, Galeno (175 d.C.) corroborou esta teoria avançando que a epilepsia teria origem em anomalias no cérebro que se traduziam em alterações comportamentais, desmitificando assim a crença de que a sua origem era mágica ou sobrenatural. No entanto, naquela época estas teorias não conseguiram alterar a crença popular, e durante a Idade Média, a Santa Inquisição perseguiu e condenou à morte muitos epiléticos por pensarem ser loucos e hereges (Fernandes, 2013).

Apenas nos séculos XVII e XVIII o conceito hipocrático de epilepsia passou a ter alguma relevância (Reynolds, 2005). Nesta altura, deu-se uma revolução a nível científico, com novas descobertas e avanços, surgindo algumas teorias de que a epilepsia tinha origem a nível cerebral. Um dos pioneiros nesta área foi John Hughlings Jackson, neurologista, que se dedicou ao estudo da anatomia e fisiologia do cérebro. A partir do século XIX, os avanços neurológicos tornaram-se cada vez mais claros e consensuais, encarando-se a epilepsia como uma doença de foro neurológico (Fernandes, 2013). Já no século XX desenvolveram-se alguns conceitos de epilepsia. Em 1949, Gareiso & Escardó definiram a epilepsia como: “A epilepsia é um quadro clínico produzido por uma descarga elétrica súbita, anormal e desordenada dos neurónios. Essas descargas podem compreender uma, várias ou todas as categorias e níveis do sistema nervoso; assim fala-se de descargas psíquicas, descargas motoras, descargas sensitivas, descargas sensoriais e descargas neurovegetativas, todas as quais são expressão de epilepsia como conceito patogénico e constituem clinicamente as epilepsias.” Mais tarde, em 1973, Gastaut definiu epilepsia como “uma desordem

crónica do cérebro por várias etiologias, caracterizada por crises recorrentes devido à descarga de neurónios cerebrais (...). Crises epiléticas isoladas ou ocasionais, ocorrendo em doenças agudas, não devem ser classificadas como epilepsia.” (Moreira, 2004).

Sendo uma das doenças mais comuns a nível neurológico, estima-se que afete mais de cinquenta milhões de pessoas em todo o mundo, sendo diagnosticados mais de dois milhões de novos casos por ano (Ferreira *et al*, 2014; WHO<sup>a</sup>, 2016). Na Europa, mais de 6 milhões de pessoas sofrem de epilepsia (WHO<sup>b</sup>, 2016) e em Portugal o número de pessoas afetadas por esta doença atinge cerca de 90 mil (Bial, 2013). Tem uma maior incidência em crianças, jovens adolescentes e idosos mas, apesar disto, afeta todas as idades tendo uma maior prevalência nos homens (existem entre 1,1 e 1,7 vezes mais homens que mulheres) (Goldenberg, 2010).

As crises epiléticas não controladas estão relacionadas com um aumento considerável da taxa de mortalidade, incluindo morte súbita e problemas no âmbito social relacionado com a discriminação e preconceito (Perucca, 2001).

O tratamento da epilepsia tem por finalidade evitar as crises convulsivas, idealmente sem que apareçam efeitos secundários, assegurando condições de uma vida social o mais próximo possível da normal, preservando a qualidade de vida do doente (Kwan e Brodle, 2005). Baseia-se fundamentalmente na administração de medicamentos (fármacos antiepiléticos) cuja escolha é efetuada com base na classificação das crises epiléticas. Assim sendo, a intervenção farmacológica, tem como objetivo abolir as crises sem induzir toxicidade e sem interferir com a função cognitiva. Alguns medicamentos estão indicados apenas num tipo de crise e contra-indicados noutros, podendo mesmo agravá-los (Caramona, 2012).

O primeiro fármaco descrito utilizado no tratamento da epilepsia foi o brometo de potássio (1857), sendo atualmente usado ocasionalmente em epilepsias refratárias nas crianças. Em 1912 surgiu o fenobarbital que ainda hoje é prescrito devido à sua eficácia e baixo custo (Brodie, 2010). Desde então, foram sendo introduzidos inúmeros fármacos, como a gabapentina, levetiracetam, oxcarbazepina e pregabalina, com características melhoradas, nomeadamente no que concerne a sua farmacocinética,

janelas terapêuticas, redução de efeitos adversos e interações medicamentosas (Perucca, 2001).

Os fármacos antiepiléticos (AEDs, do inglês *Antiepileptic Drugs*) diferem em muitos aspetos nomeadamente no que diz respeito ao tipo de convulsões para os quais são eficazes, os efeitos adversos que registam e extensão das interações farmacocinéticas. Devem ser escolhidos analisando as características do doente designadamente no que concerne a síndrome epilética, a idade, o género, outras doenças e medicação. O tratamento deve ser sempre iniciado com um único AED (Kwan e Brodle, 2005). Quando a monoterapia falha, deve recorrer-se a uma combinação de drogas para uma melhor eficácia tendo sempre em atenção as interações entre os fármacos e efeitos adversos que possam surgir (Ferreira *et al*, 2014).

A carbamazepina (CBZ) foi descoberta na década de 50 por um químico suíço (Patsalos, 2013). Aquando a sua descoberta era utilizada em doentes psicomaníacos e foi comercializada em 1962 para o tratamento da nevralgia do trigémeo. Apenas dois anos mais tarde é que começou a ser utilizada como anticonvulsivante e antiepilético (Datar, 2015) e desde então é um fármaco de primeira escolha no tratamento de crises parciais simples ou complexas e nas crises generalizadas tónico-clónicas (Kang *et al*, 2011; Patsalos e Berry, 2013). Como apresenta baixa toxicidade e efeitos adversos graves pouco frequentes é um fármaco de eleição no tratamento da epilepsia (Caramona, 2012).

Face ao exposto, neste trabalho pretendeu-se realizar um estudo sobre o uso da CBZ no tratamento da epilepsia. Além deste fármaco foi referido ao longo do trabalho a oxcarbazepina (OXC) (análogo da CBZ) que pertence ao grupo dos novos antiepiléticos, pois existem evidências de que tem grande relevância no tratamento da epilepsia e também necessita de ser monitorizado. Foi efetuada uma revisão bibliográfica do tema com os seguintes objetivos: estabelecer a sua importância clínica na realidade atual, conhecer as vantagens associadas à monitorização terapêutica desta substância e verificar quais as principais metodologias usadas para a sua quantificação. Este trabalho aborda ainda a fisiopatologia e epidemiologia da doença e os principais mecanismos de ação de alguns outros agentes antiepiléticos.



Em termos metodológicos e com base nos objetivos delineados, procedeu-se à pesquisa de artigos científicos e outras publicações, num período compreendido entre os meses de outubro de 2015 e junho de 2016, utilizando como fontes de pesquisa científicas motores de busca como a PubMed, a Science Direct e a b-On e outras fontes credíveis de informação científica como o Infarmed. A utilização destas fontes de informação prende-se ao facto de conterem artigos relacionados com a área da saúde, importando estes para o tema que apraz desenvolver.

Inicialmente foi introduzida a palavra-chave “*epilepsy*”. Surgiu um grande número de artigos relacionados com o tema. De modo a reduzir as opções foram selecionadas apenas os artigos e estudos científicos de revisão sem custos associados. Com a primeira pesquisa conseguiu-se obter informações gerais sobre a epilepsia, que vão desde o mecanismo de desencadeamento da doença até ao seu tratamento. Para restringir a pesquisa ao tema foram sendo utilizadas palavras-chave relacionadas com o mesmo. De seguida, utilizou-se a palavra-chave “*antiepileptic drugs*” para recolher informações sobre a farmacocinética e farmacodinâmica deste grupo de medicamentos e verificar a necessidade de realizar a sua monitorização terapêutica. Com as opções que surgiram foram selecionados os de maior interesse de acordo com o título e com a leitura dos resumos. Para direccionar a pesquisa para o tema principal, ou seja monitorização terapêutica de fármacos, as próximas palavras-chave utilizadas foram “*therapeutic drug monitoring*”. Com estas palavras, os resultados obtidos permitiram entender os conceitos gerais sobre a monitorização terapêutica de medicamentos. Foi também utilizada a palavra-chave “*carbamazepine*” para se obter a informação necessária sobre este fármaco e todos as suas características moleculares. As próximas palavras utilizadas foram: “*antiepileptic drugs + therapeutic monitoring*”, “*newer antiepileptic drugs*”, “*oxcarbazepine*”, “*carbamazepine-10,11-epoxide*”, entre outras, que surgiram após análise dos artigos pesquisados anteriormente. Para a segunda parte do trabalho pesquisou-se informação relativa aos métodos de quantificação da carbamazepina, utilizando-se como palavras-chave “*analytical techniques*”, “*immunoassays*” e “*chromatographic techniques*”, o que permitiu obter informação geral sobre os métodos de quantificação utilizados na monitorização terapêutica. No sentido de aprofundar os conhecimentos sobre cada uma das técnicas utilizaram-se

palavras-chave como: “*gas chromatography*”, “*high performance liquid chromatography*”, entre outras. Em fevereiro do corrente ano iniciou-se a escrita do presente trabalho, mantendo sempre a pesquisa em paralelo, pois durante o processo de redação surgiram assuntos que necessitavam de maior aprofundamento.

Globalmente, a informação e os dados que conduziram à escrita desta tese foram retirados dos artigos e estudos científicos resultantes da pesquisa adotando, também, como critérios de seleção o facto de estarem escritos em inglês, português e espanhol e terem data de publicação não inferior a 2000. Em algumas situações foram também considerados artigos de anos anteriores cujo conteúdo era muito relevante para a elaboração do trabalho.

## II. Abordagem farmacológica no tratamento da epilepsia

### 1. Classificação das crises epiléticas

Conforme referido anteriormente, a epilepsia é uma doença crónica do sistema nervoso, com sintomatologia variada, caracterizada pela existência de crises de intensidade e duração variável. As crises epiléticas são o resultado de descargas neuronais anómalas e podem manifestar-se de diferentes maneiras. De um modo geral, as causas da epilepsia são desconhecidas, mas, fatores genéticos, ambientais, patológicos ou fisiológicos podem potenciar o desenvolvimento desta patologia, assim como, lesões cerebrais (tumores, traumatismos, febre alta e enfartes) (Sander, 2005; Goldenberg, 2010). Em algumas situações, são necessários acionadores para que as convulsões ocorram, como por exemplo, ler, piscar de luzes, *stress*, álcool, entre outros (Mukhopadhyay *et al*, 2012).

A génese das crises epiléticas está relacionada com a instabilidade elétrica das membranas celulares de um ou mais neurónios. Este excesso de excitabilidade propaga-se localmente originando crises parciais, ou globalmente, originando crises generalizadas. A causa do aumento da condutividade da membrana tem sido atribuída a diferentes mecanismos moleculares, todos passíveis de modificação farmacológica, nomeadamente: alterações da condutância do sódio, defeito nos canais de cálcio dependentes da voltagem ou uma deficiência nas ATPases membranares necessárias ao transporte iónico (Caramona, 2012).

As células do cérebro utilizam reações químicas para produzir descargas elétricas. Normalmente, os neurónios, células do sistema nervoso responsáveis pela condução do impulso nervoso, estão constantemente a enviar informação através de mensagens elétricas para todas as partes do corpo (Goldenberg, 2010). Diferentes partes do cérebro controlam diferentes partes e funções do organismo. Cada célula excita ou inibe outras células cerebrais com as suas descargas. Quando o balanço da inibição/excitação é desequilibrado em direção à excitação, ocorre uma convulsão. Os sintomas característicos de cada tipo de crise epilética dependem da zona onde ocorrem as

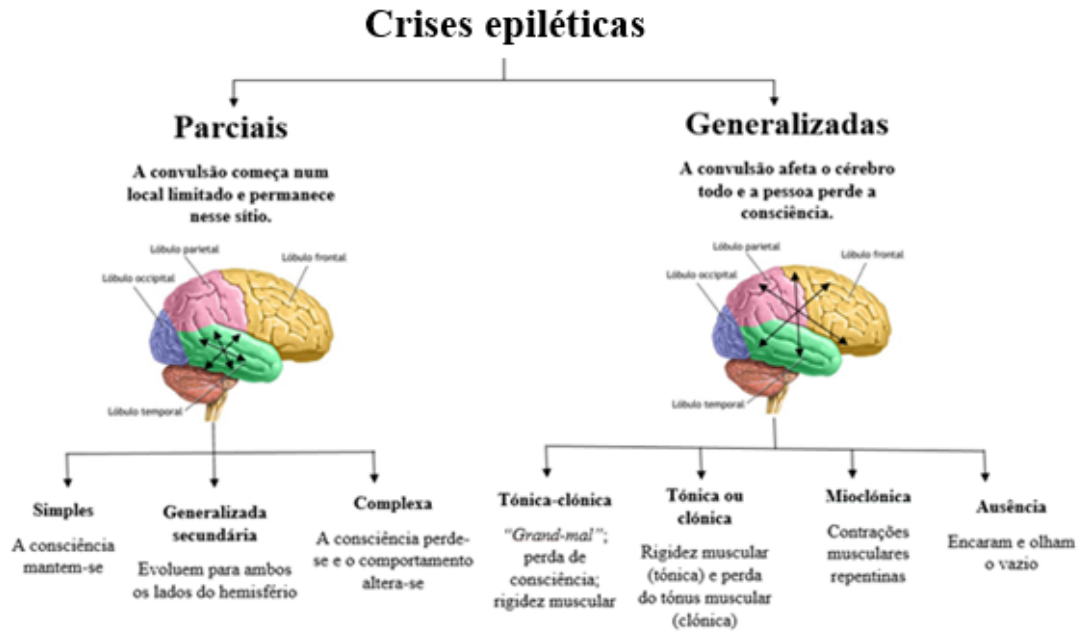
alterações das atividades elétricas, a rapidez com que os impulsos são difundidos e o seu grau de propagação (Sharma e Dixit, 2013).

Segundo a Liga Internacional contra a Epilepsia (ILAE) as crises epiléticas podem ser classificadas em diferentes tipos (Tabela 1).

**Tabela 1.** Classificação dos tipos de crises epiléticas de acordo com a ILAE (adaptado de Goldenberg,2010; Epilepsy Foundation, 2013).

Tipos de crises epiléticas	Subtipos das crises epiléticas
<b>Parciais</b>	Simple (sintomas motores, sensoriais, psíquicos e autonómicos; sem perda de consciência)
	Complexas (perda de consciência)
	Generalizadas secundárias (convulsões parciais que evoluem para convulsões generalizadas)
<b>Generalizadas</b>	Ausência (pequeno mal)
	Tónico-clónicas (grande mal)
	Clónicas
	Tónicas
	Mioclónicas
	Atónicas
<b>Não classificadas</b>	Convulsões neonatais e espasmos infantis

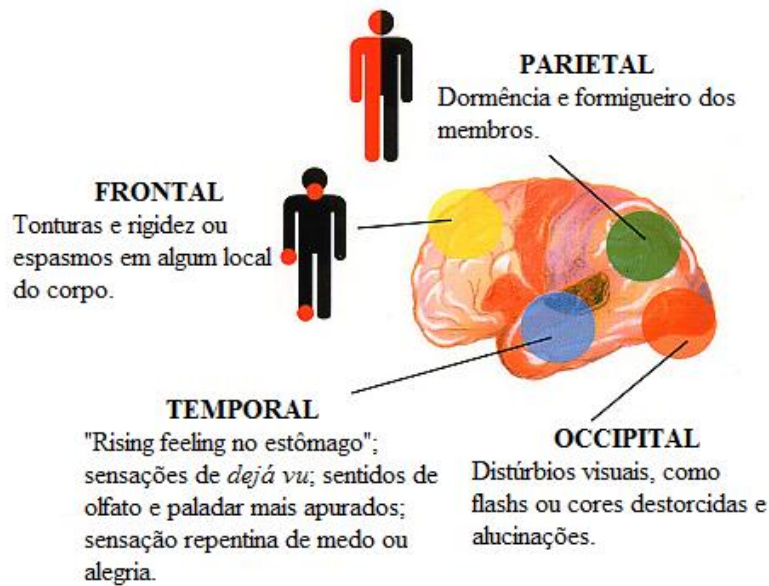
Deste modo, as crises epiléticas estão, geralmente, divididas em duas categorias principais: crises epiléticas parciais (ou focais) e crises epiléticas generalizadas. A diferença entre as duas prende-se com a localização das mesmas (Figura 1). As crises epiléticas parciais começam com uma descarga neuronal anormal num local limitado, enquanto que as generalizadas envolvem ambas as partes do cérebro (AANS, 2015).



**Figura 1.** Classificação dos principais tipos de crises epiléticas (adaptado de Epilepsy Action Australia, s.d.).

Nas crises epiléticas parciais simples, os impulsos atingem temporariamente apenas um grupo específico de neurónios, não havendo perda de consciência (Sharma e Dixit, 2013). Os sintomas característicos variam consoante a região, ou regiões afetadas, e podem ocorrer a nível motor, dos órgãos dos sentidos ou das funções cerebrais superiores (efeitos sobre o humor e o comportamento) (Figura 2) (Rang *et al*, 2007). Embora as crises possam ser isoladas e sempre de curta duração, podem repetir-se com alguma frequência e têm consequências dependentes da atividade que está a ser realizada na altura da manifestação (Sharma e Dixit, 2013).

As crises parciais mais comuns são as motoras, provocadas por descargas nos neurónios do lobo frontal, dando origem a alterações dos movimentos musculares. O tipo mais frequente é a denominada progressão jacksoniana e caracteriza-se pelo brusco aparecimento de uma série de contrações musculares que começam numa parte do corpo e se vão estendendo progressivamente às zonas adjacentes (por exemplo de um dedo a todo o braço ou desde a boca a toda à cara e pescoço) (Epilepsy Foundation, 2013).



**Figura 2:** Sintomas característicos das convulsões parciais simples de acordo com o local do cérebro afetado. (adaptado de Epilepsia – Psiquiatria Geral, s.d.).

Por outro lado, as crises parciais complexas levam à perda de consciência e da memória do indivíduo (Sharma e Dixit, 2013). Estas convulsões afetam uma área do cérebro mais extensa que as convulsões parciais. Podem resultar em distúrbios como a comportamentos estranhos e incontroláveis, perda da capacidade de julgamento, ou mesmo a perda de consciência. Depois de alguns segundos, os doentes podem começar a realizar movimentos repetitivos como mastigar ou trincar os lábios. Por norma, duram cerca de 2 minutos (Epilepsy Foundation, 2013).

Quando as convulsões parciais evoluem de um lado do cérebro para ambos os hemisférios são designadas de convulsões generalizadas secundárias, porque começa como uma convulsão parcial e progride para situações em que há comprometimento parcial ou total da consciência, atingindo as convulsões generalizadas. Quando isto acontece, a pessoa fica inconsciente e normalmente tem uma convulsão tónico-clónica (Epilepsy Society, 2015).

Nas crises generalizadas, as descargas têm geralmente origem nos núcleos cinzentos da base do cérebro, permitindo a rápida propagação dos impulsos anómalos a todo o córtex cerebral, o que provoca a perda de consciência, mesmo que apenas por uns segundos, não tendo a pessoa afetada percepção da ocorrência (Epilepsy Society, 2015). A forma mais típica corresponde às denominadas crises de grande mal ou tónico-clónica, que se caracterizam por perda de consciência acompanhada de convulsões. Numa primeira fase, chamada de fase tónica, há uma contração repentina dos músculos (provocando a queda da pessoa) e perda da consciência. Quando é atingida a segunda fase da convulsão, chamada de clónica, os músculos alternam de forma ritmada entre o relaxamento e a rigidez, podendo a convulsão durar cerca de 2-3 minutos, tempo durante o qual o paciente permanece inconsciente. No final da convulsão os pacientes sentem-se cansados e confusos (Rang *et al*, 2007; Epilepsy Society, 2015).

Outra forma comum das convulsões generalizadas denomina-se crise de pequeno mal ou de ausência, frequentes na infância e adolescência. Há uma alteração do estado de consciência sem problemas motores evidentes. Correspondem a perdas súbitas e breves de consciência (10 a 30 segundos), ficando o paciente geralmente olhar de “forma vazia”, podendo as pálpebras vibrar (Rang *et al*, 2007; Epilepsy Society, 2015). Este tipo de crises, que podem ocorrer várias vezes ao dia (entre 50-100 vezes num dia) pode ser confundido com crises parciais simples ou complexas mas, por norma, são mais rápidas e têm, também, uma recuperação mais rápida (Sharma e Dixit, 2013).

As convulsões generalizadas mioclónicas são episódios de contrações involuntárias de determinado grupo de músculos, como os da cara ou tronco (Goldenberg, 2010).

As convulsões generalizadas atónicas (conhecidas como “*drop attack*”) são caracterizadas pela perda do tónus muscular, fazendo com que a pessoa caia por não se segurar (Epilepsy Society, 2015).

As convulsões generalizadas podem ser simplesmente tónicas ou clónicas. Nas crises tónicas, há contração dos músculos e a consciência é perdida durante 10 segundos, mas as convulsões não evoluem para a fase clónica ou “*jerking phase*”. As convulsões clónicas são muito raras, e normalmente acontecem em crianças, sendo caracterizadas

pelos espasmos musculares sem a rigidez característica da fase tónica (Epilepsy Society, 2015).

Existe ainda um terceiro tipo de crise epilética designada como “não-classificada” que abrangem todas as crises que por dados incompletos ou inadequados não podem ser incluídas em alguma das categorias descritas anteriormente. Incluem síndromes especiais e condições em que convulsões estão relacionadas com situações específicas (como convulsões febris) (Mukhopadhyay *et al*, 2012).

## **2. Classificação dos antiepiléticos e anticonvulsivantes**

O desenvolvimento e utilização de AEDs constituiu um marco importante para o tratamento da epilepsia que, até então, era tratada utilizando meios invasivos, como a lobotomia, ou recorrendo a terapias de choque, responsáveis por um elevado número de mortes (Magiorkinis *et al*, 2014). A designação para este grupo de fármacos é antiepiléticos, contudo o termo mais correto seria anticonvulsivantes pois estes não alteram o curso da doença, apenas se consegue controlar ou diminuir a frequência das convulsões, mantendo a qualidade de vida dos pacientes (Goldenberg, 2010).

A primeira substância utilizada como antiepilético foi o brometo de potássio em 1857 (Bartolini *et al*, 2009). Contudo, a era farmacológica da terapia antiepilética começou, de facto, com a introdução do fenobarbital em 1912, que é até hoje um dos fármacos antiepiléticos mais prescritos em todo o mundo devido à sua elevada eficácia e baixo custo (Brodie, 2010). Em 1938, foi introduzido no tratamento da epilepsia o fármaco anticonvulsivante fenitoína apesar de já ser conhecido desde 1908. A partir dessa data foram introduzidos vários AEDs até aos anos 70, como é o caso da carbamazepina (1953), primidona (1954), etossuximida (1958) e ácido valpróico (1963) (Magiorkinis *et al*, 2014 e Perucca, 2001). Nos anos 70, novos fármacos do grupo das benzodiazepinas foram descobertos e usados como anticonvulsivantes, nomeadamente, clobazam e clonazepam. Para além das benzodiazepinas também foi descoberto na mesma altura o piracetam. Alguns destes fármacos têm ainda lugar na terapêutica e são designados por AEDs clássicos (Brodie, 2010 e Magiorkinis *et al*, 2014).



Nas últimas décadas foram introduzidos uma série de drogas, conhecidas como os novos AEDs que foram aprovados pela FDA (do inglês *US Food and Drug Administration*) e/ou EMA (do inglês *European Medicines Agency*): vigabatrina (1989), lamotrigina (1990), oxcarbazepina ou oxcarbamazepina (1990), gabapentina (1993), felbamato (1993), topiramato (1995), tiagabina (1998), zonisamida (2000), levetiracetam (2000), stiripentol (2002), pregabalina (2004), rufinamida (2004), lacosamida (2008), eslicarbazepina (2009) e perampanel (2012) (Bailer, 2012; Magiorkinis *et al*, 2014). Quando comparados com os antiepiléticos clássicos, os novos AEDs são mais seguros e bem tolerados pelos pacientes, têm janelas terapêuticas mais alargadas, menor variabilidade farmacocinética, menos interações inter e intra-individuais e menos efeitos adversos graves. Devido a estas vantagens têm tido uma boa aceitação na terapêutica (Bailer, 2012; Krasowski, 2013).

Hoje em dia, o tratamento da epilepsia tem como objetivos principais: controlar ou diminuir a frequência das crises, reduzir os efeitos adversos causados pelo tratamento crónico desta patologia e ajudar os pacientes a manter ou reconstruir as suas atividades vocacionais e psicossociológicas, mantendo a qualidade de vida (Goldenberg, 2010).

Sempre que possível o tratamento deve ser iniciado em monoterapia e a escolha medicamentosa é feita em função do doente e de acordo com o tipo de crise, a eficácia do fármaco e efeitos colaterais. A maioria dos efeitos adversos está dependente da dose, o que significa que quando esta é reduzida esses efeitos também diminuem, sem necessidade de suspender a terapia. A prescrição do antiepilético adequado requer o conhecimento da farmacocinética do fármaco (Maranhão *et al*, 2011).

A classificação das crises epiléticas é pois importante porque a escolha do(s) AEDs é feita com base no tipo de convulsão. Os medicamentos eficazes no controlo das crises mais comuns (isto é, as parciais e as generalizadas tónico-clónicas) atuam por promover o estado inativado dos canais de sódio ou por potenciar a transmissão inibitória mediada pelo neurotransmissor ácido gama-aminobutírico (GABA). Os medicamentos úteis no controlo das crises menos frequentes interferem com os canais de cálcio dependentes da voltagem, tipo T (Caramona, 2012).

Apesar dos avanços tecnológicos e da introdução no mercado dos novos AEDs, os designados de clássicos continuam a ser prescritos para o tratamento da epilepsia, sendo a fenitoína e a CBZ os mais prescritos. Isto deve-se ao facto de terem uma eficácia estabelecida com um perfil de segurança e de efeitos adversos conhecidos e ao custo que é consideravelmente mais baixo quando comparado com os novos antiepiléticos (Loring *et al*, 2007).

Contudo, a utilização de AED clássicos leva, com frequência, a interações farmacocinéticas e farmacodinâmicas complexas e imprevisíveis. Adicionalmente o facto de as terapias com AEDs serem profiláticas e, frequentemente, para a toda vida e de a relação entre a dose e concentração plasmática destes fármacos ser imprevisível, leva a que seja necessário recorrer à monitorização terapêutica destes fármacos (Ferreira *et al*, 2014).

Na Tabela 2 estão listados os AEDs existentes no mercado, agrupados consoante o tipo de crise epilética. Algumas destas substâncias podem, ainda, ser administradas noutras situações clínicas diferentes, como em casos de nevralgia do trigémeo, fibromialgia e enxaquecas (Krasowski, 2011).

**Tabela 2.** Fármacos antiepiléticos utilizados para os vários tipos de crises epiléticas (adaptado de Goldenberg, 2010; Caramona, 2012;).

<b>Fármacos antiepiléticos utilizados para os vários tipos de crises epiléticas</b>			
<b>Crises epiléticas generalizadas tónico-clónicas</b>	<b>Crises epiléticas parciais</b>	<b>Crises epiléticas generalizadas de ausência</b>	<b>Crises epiléticas generalizadas mioclónicas e atónicas</b>
<b>Fármacos de primeira linha</b>			
Ácido valpróico Lamotrigina Topiramato	Carbamazepina Fenitoína Oxcarbazepina Ácido valpróico	Ácido valpróico Etosuximida	Ácido valpróico Lamotrigina Topiramato
<b>Fármacos alternativos</b>			
Zonisamida Fenitoína Carbamazepina Oxcarbazepina Fenobarbital Primidona Felbamato	Levetiracetam Topiramato Tiagabina Zonisamida Gabapentina Fenobarbital Primidona Felbamato Eslicarbazepina Vigabatrina Lacosamida Pregabalina Rufinamida	Lamotrigina Clonazepam	Clonazepam Felbamato

A Tabela 3 inclui a classificação dos fármacos antiepiléticos comercializados em Portugal de acordo com a classe, via de administração e concentrações terapêuticas encontradas no plasma (Caramona, 2012).

**Tabela 3.** Classificação dos fármacos antiepiléticos comercializados em Portugal (adaptado de Krasowski, 2011; Caramona, 2012)

Classificação dos fármacos antiepiléticos comercializados em Portugal				
Classes	Exemplos de fármacos	Via de administração	Dose diária	Janela terapêutica (mg/L)
<b>Fenitoína</b>	Fenitoína	Oral	100 mg	10-20
<b>Barbitúricos</b>	Fenobarbital	Oral	15-200 mg	10-25
	Primidona	Oral	250 mg	8-12
<b>Iminostilbenos</b>	Carbamazepina	Oral	20 mg/ml 200-400 mg	4-10
	Oxcarbazepina	Oral	300-600 mg	3-35
	Eslicarbazepina	Oral	400-800 mg	Não estabelecida
<b>Ácido valpróico/ valproato semisódico</b>	Ácido valpróico	Oral	40-200 mg/ml 100-1000 mg/ 250-500 mg	30-100
<b>Benzodiazepinas</b>	Clonazepam	Oral	2,5 mg/ml 0,5-2 mg	0,005-0,07
<b>Outros</b>	Topiramato	Oral	15-200 mg	5-20
	Pregabalina	Oral	25-300 mg	2,8-8,3
	Gabapentina	Oral	100-800 mg	2-20
	Lamotrigina	Oral	2-200 mg	3-14
	Vigabatrina	Oral	25-100 mg	0,8-36
	Levetiracetam	Oral	100 mg/ml 250-1000 mg	12-46

### **3. Principais mecanismos de ação dos antiepiléticos**

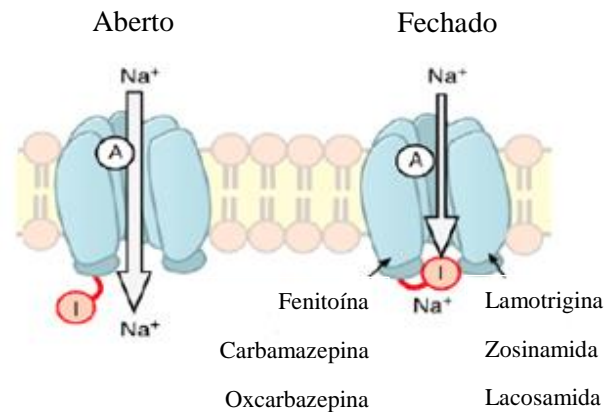
Várias estruturas estão envolvidas no desenvolvimento de uma convulsão, incluindo neurónios, canais iónicos, recetores, células de glia e sinapses inibitórias ou excitatórias. Os AEDs foram desenvolvidos para modificar estes processos favorecendo a inibição sobre a excitação com o objetivo de evitar e prevenir as convulsões (Ochoa, 2016).

De acordo com o seu mecanismo de ação os fármacos podem ser divididos nas seguintes categorias principais:

#### a) Inibição dos canais de sódio dependentes da voltagem

Os canais de sódio podem apresentar-se em 3 estados diferentes: estado de repouso em que é permitido a passagem de sódio (ião existente em maior concentração fora da célula) para o interior da célula; estado ativo em que o canal permite o aumento do influxo de sódio para dentro da célula por ter havido um aumento na negatividade no interior da célula (hiperpolarização); e estado inativo em que não há passagem do sódio para o interior da célula (os canais de sódio dependentes da voltagem, adotam um estado inativo e permanecem refratários a uma nova abertura durante um determinado período de tempo após uma despolarização). Enquanto estes canais estão impedidos de reabrir, as descargas sucessivas estão diminuídas e a difusão da atividade elétrica para regiões adjacentes do cérebro é suprimida (Ochoa, 2016).

Os AEDs pertencentes ao grupo dos bloqueadores dos canais de sódio tem como alvo esses canais e o mecanismo de ação primário (Figura 3) tem como objetivo evitar que os canais de sódio regressem ao estado ativo, estabilizando e prolongando a forma inativa. Os fármacos com este mecanismo são a fenitoína, carbamazepina, oxcarbazepina, lamotrigina, zonisamida, lacosamida e são efetivos no controlo das convulsões epiléticas generalizadas (tónico-clónicas) ou parciais (Sharma e Dixit, 2013).



**Figura 3.** Mecanismo de ação dos AEDs bloqueadores dos canais de sódio (retirada de Shah *et al*, 2015).

b) Facilitar a neurotransmissão inibitória do ácido gama-aminobutírico (GABA)

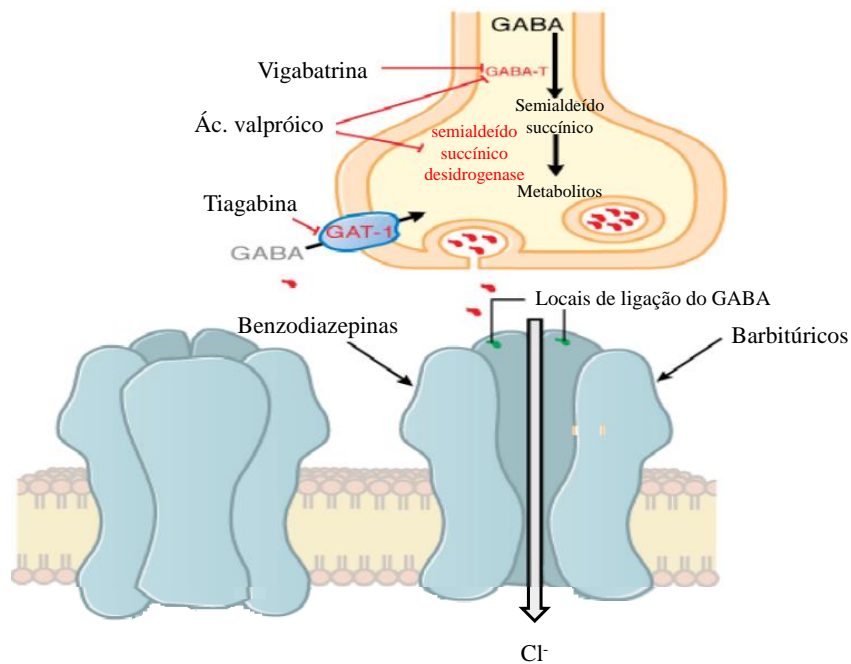
Alguns medicamentos antiepiléticos aumentam a inibição mediada pelo GABA, um neurotransmissor inibitório, ou afetam a sua concentração (Figura 4). O sistema GABA pode ser potenciado ligando-se diretamente aos recetores GABA-A, bloqueando a captação pré-sináptica do GABA, inibindo o metabolismo do GABA (através da GABA transaminase (GABA-T)) e aumentando a síntese do GABA (Ochoa, 2016).

O GABA liga-se a dois recetores (recetores A e B). O recetor A está presente nos canais iónicos do cloreto e a ligação do neurotransmissor provoca um influxo de iões cloreto (ião de carga negativa). Este influxo aumenta a carga negativa da célula, levando a que a célula tenha uma dificuldade acrescida em atingir o seu potencial de ação. As benzodiazepinas (lorazepam, diazepam, midazolam, clonazepam, clorazepato e clobazam), barbitúricos e possivelmente o topiramato acentuem a ação do GABA neste recetor (Sharma e Dixit, 2013; Ochoa, 2016).

O GABA é transportado desde o espaço sináptico até aos neurónios e células gliais, onde é metabolizado. Os fármacos que inibem este transporte fazem com que o GABA esteja em maior concentração na fenda sináptica e, assim, prolongam a inibição dos potenciais pós-sinápticos. A tiagabina atua desta forma diminuindo a recaptação do GABA (Sharma e Dixit, 2013; Ochoa, 2016).

O GABA é metabolizado pela enzima GABA-T. A vigabatrina inibe a enzima GABA-T o que leva ao aumento da concentração extracelular do GABA (Sharma e Dixit, 2013; Ochoa, 2016;).

A enzima ácido glutâmico descarboxilase (GAD) catalisa a descarboxilação do glutamato para GABA. Alguns fármacos tem o mesmo efeito, tendo a capacidade de exercer a função da enzima, aumentando a síntese de GABA. Exemplos disto são: gabapentina, ácido valpróico e pregabalina (Sharma e Dixit, 2013; Ochoa, 2016).



**Figura 4.** Mecanismos de ação dos AEDs que envolvem o GABA (retirada de Shah *et al*, 2015).

#### c) Bloqueadores do glutamato

O glutamato e o aspartato são dois dos mais importantes neurotransmissores excitatórios no cérebro. O glutamato vai atuar sob vários recetores macromoleculares com diferentes locais de ligação: ácido alfa-amino-3-hidroxi-5-metilxazole-4-propionico (AMPA), kainato, N-metil-D-aspartato (NMDA), glicina e locais metabotrópicos. A ativação destes recetores por ligandos abre os canais celulares, promovendo o influxo de cálcio e sódio e o efluxo de potássio, facilitando deste modo a despolarização. O bloqueio do

recetor NMDA pelo felbamato ou do recetor AMPA/kainato pelo fenobarbital e topiramato inibem a despolarização. Os grupos de fármacos com estes mecanismos tem vários efeitos adversos, como por exemplo, psicoses e alucinações, daí que o seu uso seja limitado (Sharma e Dixit, 2013; Ochoa, 2016).

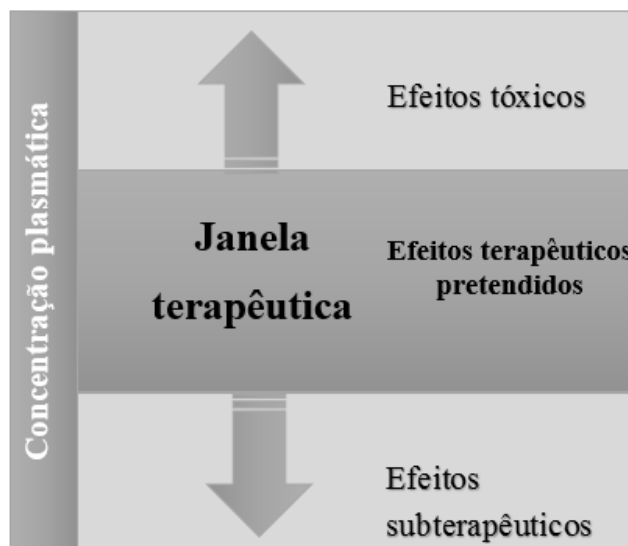
#### **4. Monitorização terapêutica de fármacos**

A quantificação dos fármacos antiepiléticos no sangue como ajuda na personalização da terapêutica está, nos dias de hoje, estabelecida como uma prática habitual no tratamento da epilepsia e estão publicadas guias terapêuticas contendo as características da doença e propriedades dos AEDs que tornam esta prática tão benéfica (Patsalos e Berry, 2013).

A monitorização terapêutica de fármacos (TDM, do inglês *therapeutic drug monitoring*) envolve a quantificação da concentração plasmática de um fármaco numa amostra e tem como objetivo a otimização da terapêutica farmacológica dos doentes através da implementação de regimes posológicos adequados que mantêm a concentração pretendida dentro de um intervalo terapêutico adequado (Ghiculescu, 2008). Tem sido um instrumento valioso para assegurar uma terapia individualizada com o máximo de eficácia e o mínimo de efeitos tóxicos, uma vez que os efeitos terapêuticos e tóxicos são melhores relacionados com a concentração plasmática do que à dose administrada (Ghiculescu, 2008; Kang e Lee, 2009).

A janela terapêutica (ou intervalo terapêutico) é definida como o intervalo de concentrações no qual o fármaco exerce os efeitos terapêuticos pretendidos com um mínimo de efeitos secundários. Concentrações plasmáticas superiores às estabelecidas para o fármaco levam a que este tenha um risco aumentado de exercer efeitos tóxicos enquanto que níveis inferiores estão associados a efeitos subterapêuticos (Figura 5) (Kang e Lee, 2009).





**Figura 5.** Conceito de janela terapêutica (adaptado de Kang e Lee, 2009).

Assim, o controlo terapêutico justifica-se e deve ser instituído em terapias com fármacos com margem terapêutica estreita, fármacos com elevada variabilidade farmacocinética e em grupos de doentes particulares, como neonatos ou insuficientes renais. Acresce que atualmente a melhoria dos cuidados de saúde cria situações clínicas complexas que tornam a TDM relevante na decisão e gestão terapêutica também em politerapias (Frank *et al*, 2002; Ghiculescu, 2008; Kang e Lee, 2009).

Os estudos na área da TDM aplicada a AEDs tiveram início no final da década de 50, início da década de 60, com um grupo de investigadores que relacionaram as concentrações plasmáticas da fenitoína e do fenobarbital com o controlo das convulsões e a sua toxicidade para o sistema nervoso central (SNC), e a sua utilização vulgarizou-se com a evolução das técnicas analíticas e dos conhecimentos dos fundamentos farmacocinéticos da ação dos fármacos (Patsalos *et al*, 2008).

Os fármacos mais frequentemente monitorizados pertencem ao grupo dos AEDs, dos antibacterianos, dos antidepressivos, dos imunossuppressores, dos antineoplásicos, dos cardiotónicos e antiarrítmicos e dos antiasmáticos havendo margens terapêuticas estabelecidas para todos eles (Patsalos *et al*, 2008; AACC, 2014). No entanto, estes intervalos não são vinculativos já que pode existir eficácia terapêutica para

concentrações plasmáticas abaixo da margem terapêutica da população em geral. Assim, para um indivíduo em particular a melhor dose de fármaco será aquela que garanta eficácia com o mínimo de toxicidade (Patsalos e Berry, 2013). No caso dos AEDs, o verdadeiro intervalo terapêutico é definido para cada paciente como a concentração que previne a ocorrência de episódios epiléticos sem causar efeitos secundários (Patsalos *et al*, 2008).

A monitorização das concentrações séricas dos AEDs tem desempenhado um importante papel na otimização da terapêutica dos doentes epiléticos, sendo esta uma das áreas onde a TDM mais se tem destacado. Este facto é justificado, não só pela natureza imprevisível deste distúrbio neurológico, mas também pelas características apresentadas pelos fármacos disponíveis para o seu tratamento (Patsalos *et al*, 2002; Kang e Lee, 2009).

Na generalidade, os AEDs apresentam farmacocinética variável e imprevisível, ocorrendo alterações a nível da absorção, distribuição, metabolização e excreção. A metabolização está diretamente implicada com as funções renal e hepática, fatores genéticos ou interações medicamentosas. A grande maioria dos AEDs é metabolizada pelo sistema enzimático citocromo P450 (CYP450), que é também responsável pela biotransformação de outros fármacos. Esta característica faz com que os AEDs sejam muitas vezes implicados em interações farmacocinéticas, capazes de originar situações clínicas graves que podem ser evitadas através da aplicação de medidas de correção dos regimes posológicos. Adicionalmente, alguns AEDs são potentes indutores do CYP450, o que significa que a sua toma concomitante pode levar a concentrações plasmáticas baixas sendo necessário um reajuste, conseguido através da TDM. Outro exemplo, desta interação está relacionada com a ligação às proteínas, em que um fármaco que tenha elevada ligação às proteínas plasmáticas vai ter disponível uma quantidade muito baixa de fármaco livre, sendo necessário um aumento da dosagem para atingir um nível terapêutico (Krasowski, 2011; Krasowski, 2013).

Sendo a abordagem terapêutica essencialmente profilática, com o objetivo de prevenir a ocorrência das crises que sucedem de forma irregular, é difícil encontrar a dose que controla a longo termo o aparecimento destas crises (Patsalos *et al*, 2008). Como a implementação de regimes terapêuticos adequados com base apenas na resposta clínica

do doente é difícil e dado que os sintomas e sinais de intoxicação são difíceis de detetar e interpretar, particularmente em doentes que sofrem simultaneamente de outros distúrbios (nomeadamente em doentes com deficiência mental) a correlação entre a concentração plasmática do AED e os sinais clínicos é melhor do que aquela entre a dose e o efeito (Patsalos e Berry, 2013).

A TDM é aplicada, tradicionalmente, aos AEDs clássicos (carbamazepina, fenobarbital, fenitoína, primidona e ácido valpróico) devido ao índice terapêutico reduzido (ou seja, uma janela terapêutica estreita), à variabilidade e complexidade da sua farmacocinética (absorção, distribuição, metabolização e excreção) (Krasowski, 2013). A TDM não está ainda bem estabelecida para os novos fármacos, mas sabe-se que é útil para alguns dos novos fármacos que, tal como os clássicos, possuem janela terapêutica estreita, têm elevada variabilidade inter e intraindividual associada a fatores como a idade, gravidez, doença ou medicação concomitante, entre outros (Tabela 4) (Kang e Lee, 2009).

**Tabela 4.** Características dos AEDs clássicos (adaptado de Kang e Lee, 2009; Krasowski, 2013).

<b>Características dos AEDs clássicos</b>
<b>Margem terapêutica estreita</b>
<b>Elevada variabilidade farmacocinética</b>
<b>Correlação entre a concentração do fármaco e seus efeitos farmacológicos (terapêuticos e tóxicos)</b>
<b>Exibem elevada variabilidade inter e intraindividual (associadas a fatores como doenças concomitantes, idade, interações fármaco-fármaco).</b>

A TDM está também indicada em doentes polimedicados, na epilepsia de controlo, nas faixas etárias limite, em grávidas ou na suspeita de toxicidade. Para além disto, pode dizer-se que todos os AEDs beneficiam da TDM quando se pretende avaliar a adesão à terapêutica ou confirmar se a toxicidade exibida num dado tratamento se deve ao fármaco administrado. Os ajustes são necessários quando se suspeita de incumprimento da terapêutica como motivo para a ineficácia no controlo de crises, ou ainda quando

surge determinado estado fisiológico ou patológico capaz de alterar a cinética do fármaco (por exemplo, no caso de gravidez). A TDM está indicada em várias situações resumidas na tabela a seguir apresentada (Tabela 5) (Kang e Lee, 2009).

**Tabela 5.** Indicações para a TDM (adaptada de Kang, 2009; Patsalos e Berry, 2013).

<b>Indicações para a TDM</b>
<b>Avaliar a eficácia da terapêutica</b>
<b>Após iniciar terapêutica com AEDs ou após reajuste da dose</b>
<b>Para determinar a dose terapêutica ótima</b>
<b>Quando é de esperar variações farmacocinéticas</b>
<b>Diagnosticar doses subterapêuticas</b>
<b>Evitar reações adversas/toxicidade</b>
<b>Monitorizar/detetar interações entre fármacos</b>
<b>Detetar incumprimento da terapêutica</b>
<b>Adequar a terapêutica ao estado fisiológico do indivíduo</b>

As janelas terapêuticas para os principais AEDs encontram-se publicadas e constam das Tabelas 3 e 6 (Krasowski, 2011). Estes valores são difíceis de estabelecer devido, em primeiro lugar, aos efeitos terapêuticos que se podem manifestar num amplo intervalo de concentrações dependendo do paciente, não sendo apenas eficazes naquele intervalo definido e, em segundo lugar, porque evidências clínicas que revelam que alguns pacientes mostram resposta eficaz a níveis abaixo ou acima do intervalo definido (Krasowski, 2013).

**Tabela 6.** Características farmacológicas de alguns antiepiléticos (adaptado de Krasowski, 2011; Krasowski, 2013).

Fármaco	Ligação às proteínas (%) <sup>a</sup>	Tempo de semi-vida (h) <sup>b</sup>	Janelas terapêuticas (mg/L)
<b><u>Carbamazepina</u></b>	75	10-20	4-10
Clonazepam	85	20-26	0.005-0.07
Gabapentina	0	5-9	2-20
Levetiracetam	0	6-8	12-46
<b><u>Oxcarbazepina</u></b>	40	8-15	3-35
Fenitoína	>95	6-24	10-20
Fenobarbital	50	90-110	10-25
Ácido valpróico	>90	11-17	30-100
Zonisamida	50	50-70	10-40

a) A ligação às proteínas é um parâmetro importante pois apenas a fração livre do fármaco exerce efeitos terapêuticos

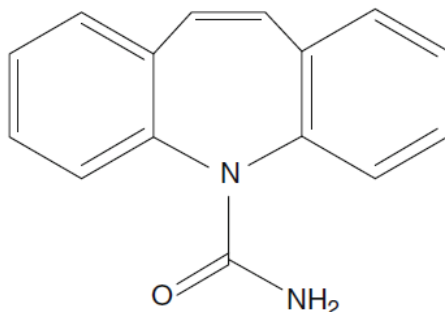
b) O tempo de semi-vida de um fármaco representa o tempo necessário para que a sua concentração no plasma diminua para metade de seu valor original

De um modo geral, as análises de TDM são efetuadas em amostras de soro ou plasma sendo, mais recentemente, também efetuadas em amostras de saliva (Kang e Lee, 2009). As técnicas comerciais (imunoensaios) têm particular destaque nestas análises por serem rápidas e de baixo custo, no entanto, podem originar reações cruzadas e, ao contrário das técnicas cromatográficas, não permitem a quantificação simultânea de vários AEDs e seus metabolitos. Os métodos cromatográficos são, por isso, particularmente úteis devido aos regimes de politerapias e aos metabolitos ativos, pois são capazes de detetar vários fármacos e os seus metabolitos ao mesmo tempo (Kang *et al*, 2011).

### III. Carbamazepina e sua aplicação farmacológica

A CBZ é um dos fármacos antiepiléticos mais utilizados no tratamento da epilepsia. Este fármaco é um derivado tricíclico do iminostilbeno, composto químico com a estrutura de uma amina secundária tricíclica, e possui um grupo carbamoil no anel central, essencial para a sua ação antiepilética (Figura 6) (Ambrósio *et al*, 2002; Bialer, 2012). Tem a designação química de 5H-Dibenzo[b,f]azepina-5-carboxamida e foi descoberta em 1953 pelo químico *Walter Schindler*, na Suíça, sendo sintetizada quimicamente em 1960 (Patsalos, 2013). Apresenta-se sob a forma de cristal de cor branca amarelada, quase inodoro, praticamente insolúvel em água e éter, mas solúvel em acetona, álcool, tetracloreto de carbono, clorofórmio, dimetilformamida e propileno glicol. O seu pKa é de 13,9 (PubChem, 2005). Quanto à estabilidade, é necessário armazená-la abaixo dos 40°C (preferencialmente entre os 15 e os 30°C) e protegido da luz (Índice, 2016).

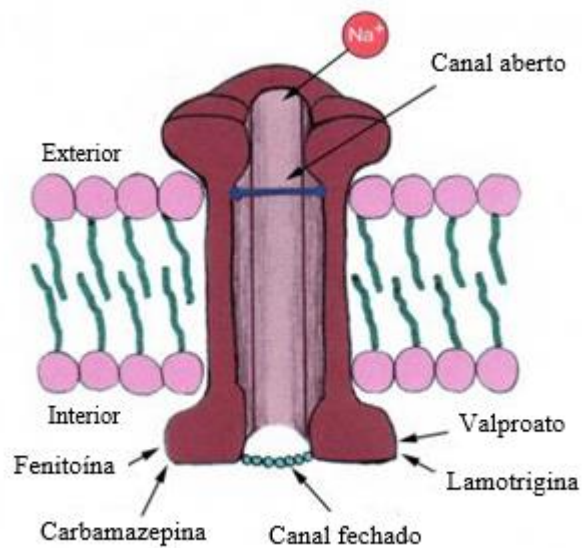
Inicialmente a CBZ era indicada para controlar doentes psicomaníacos e foi comercializada como um fármaco para o tratamento de nevralgia do trigêmeo em 1962. Apenas em 1965, começou a ser utilizada com anticonvulsivante e antiepilético no Reino Unido sendo um fármaco de primeira escolha em muitas terapias de combinação e em muitas doenças na população geriátrica (Datar, 2015). Desde então tem sido um fármaco de primeira linha no tratamento de crises parciais simples ou complexas e nas crises generalizadas tónico-clónicas (Kang *et al*, 2011; Patsalos e Berry, 2013). É também utilizado no tratamento da doença bipolar, como estabilizador de humor, e como diurético e anticolinérgico (Datar, 2015).



**Figura 6.** Estrutura química da carbamazepina (retirada de Patsalos, 2013).

### 1. Mecanismo de ação

O principal modo de ação da CBZ é através do bloqueio dos canais de sódio regulados por voltagem (Figura 7). A sua estrutura química permite-lhe ligar-se, logo após a sua abertura, impedindo o influxo de iões de sódio. Consequentemente, as membranas neuronais excitadas são estabilizadas, as descargas neuronais repetitivas são inibidas e a propagação sináptica dos impulsos excitatórios em neurónios despolarizados é restringida (Ambrósio *et al*, 2002; Sills, 2015). Além de alterar a excitabilidade neuronal, pode atuar na atividade pré-sináptica para bloquear a libertação de neurotransmissores através do bloqueio dos canais de sódio pré-sinápticos e inibindo o potencial de ação, que por sua vez diminui a transmissão sináptica. A sua ação no alívio da dor está associada ao bloqueio das transmissões sinápticas no núcleo do trigémeo e a ação no controlo das convulsões deve-se à redução da potenciação pós-tetânica da transmissão sináptica na espinhal medula (Datar, 2015).



**Figura 7.** Mecanismo de ação da carbamazepina (canal de sódio dependente da voltagem) (retirada de Ochoa, 2016).

Para concentrações plasmáticas acima do limite superior da janela terapêutica (10mg/L) e a par com os efeitos no SNC, observam-se irritação gastrointestinal, propriedades

arritmogénicas e ação anti-diurética, por redução das concentrações da hormona anti-diurética no plasma. O diagnóstico definitivo de intoxicação por este fármaco não é fácil e demonstra-se através da quantificação dos níveis elevados de CBZ e do seu metabolito carbamazepina-10,11-epóxido no soro (Soderstrom *et al*, 2006; Goktas *et al*, 2010).

## **2. Características farmacocinéticas**

As características farmacocinéticas da CBZ são complexas e influenciadas pela sua baixa solubilidade em meio aquoso (Datar, 2015) e pela capacidade de aumentar a sua conversão hepática em metabolitos ativos (Patsalos, 2013).

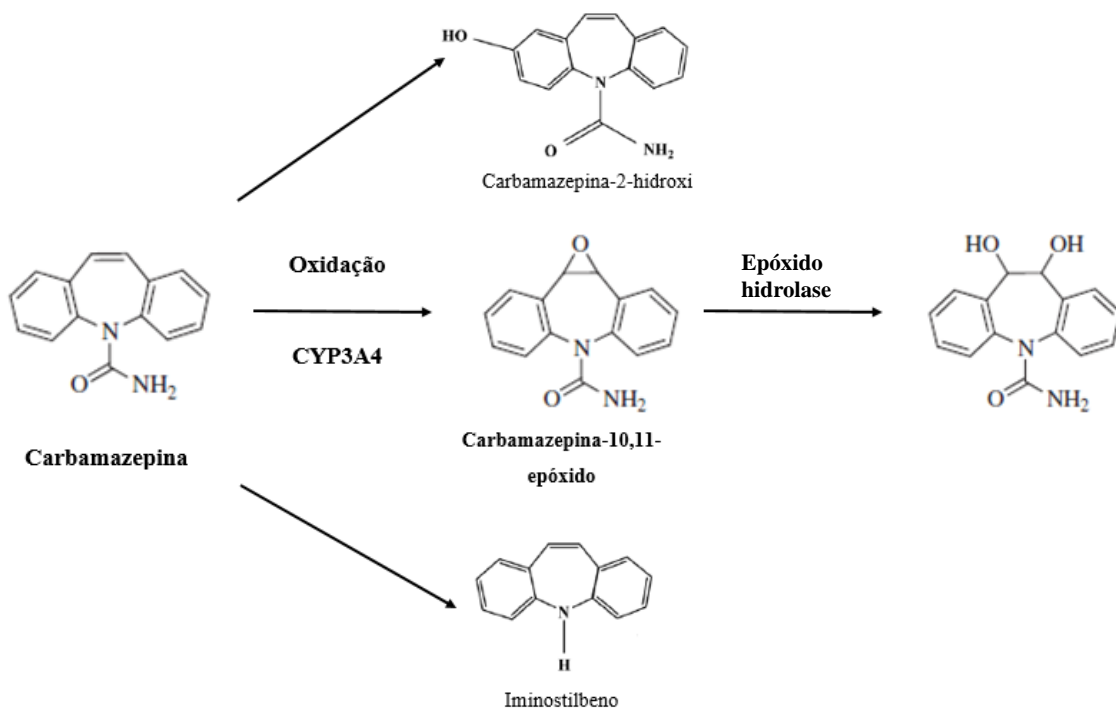
A via de administração utilizada para a CBZ é a via oral, sendo rapidamente absorvida com uma biodisponibilidade de 75-85% (Patsalos, 2013). O pico plasmático médio da substância inalterada ocorre em até 12 horas, após a ingestão de uma dose única de um comprimido, e em até 2 horas, para a suspensão oral. A ingestão de alimentos não influencia significativamente a velocidade e a extensão da absorção. Após absorção no trato gastrointestinal o fármaco distribui-se rapidamente pelos tecidos. Apresenta um volume aparente de distribuição de 0,8-2,0 L/kg e uma ligação às proteínas plasmáticas de 75% (Patsalos e Berry, 2013).

As concentrações plasmáticas no estado de equilíbrio da carbamazepina (altura em que a taxa de eliminação do fármaco é igual à taxa de biodisponibilidade, ou seja, é quando o fármaco se encontra em concentração constante no sangue) são atingidas após uma ou duas semanas, dependendo da autoindução, da hetero-indução das enzimas metabolizadoras hepáticas por outros fármacos, posologia e duração da terapêutica (Emc, 2015).

A metabolização CBZ (Figura 8) é complexa e tem sido amplamente estudada em modelos humanos e animais, tendo sido identificados mais de trinta metabolitos. É maioritariamente metabolizada no fígado pela ação da isoenzima CYP3A4 formando um metabolito que é farmacologicamente tão ativo como o composto original, a carbamazepina-10,11-epóxido (CBZ-E). Este metabolito fixa-se às proteínas numa extensão de 50%, acumula-se no plasma e tem atividade anticonvulsivante, sendo também responsável pela maior parte dos efeitos secundários associados à terapêutica.



As suas concentrações no plasma podem chegar a ser 50% da concentração da CBZ. A CBZ-E é, por sua vez, é convertida quase na sua totalidade num metabolito inativo, a trans-10,11-dihidroxi-10,11-dihidrocarbamazepina, por uma epóxido hidrolase, antes de ser excretado na urina sob a forma de um glicuronídeo biologicamente inativo (Datar, 2015). Apenas cerca de 2% da CBZ é excretada na forma inalterada na urina. O tempo de semi-vida da CBZ é 18-55 h e do seu metabolito ativo é cerca de 34 h (Patsalos, 2013). Para além desta via principal existem outras duas vias de metabolização. Uma das vias origina compostos hidroxilados e a outra via secundária leva à produção de iminostilbeno (Breton *et al*, 2005).



**Figura 8.** Metabolismo da carbamazepina (adaptada de Breton *et al*, 2005).

A CBZ, bem como outros AEDs como o fenobarbital e a fenitoína, tem a capacidade de induzir a sua própria metabolização já que é um potente indutor das enzimas hepáticas do CYP450, incluindo a CYP3A4. Assim, a CBZ representa um exemplo de um fármaco que mostra autoindução, ou seja, o seu metabolismo está aumentado quando a terapia é crónica. A autoindução surge em média após 2-3 semanas, levando a um aumento da clearance (cerca de 3x) sendo necessário um ajuste na dose de CBZ para

atingir concentrações plasmáticas terapêuticas (Krasowski, 2011; Patsalos e Berry, 2013).

Esta circunstância justifica também que durante a terapia com indutores do CYP3A4 haja uma diminuição do efeito de contraceptivos orais que contenham estrogénio dado que o metabolismo do etinil estradiol é acelerado sendo, por isso, as pacientes aconselhadas a utilizarem um método contraceptivo não hormonal (Krasowski, 2011; Emc, 2015).

A coadministração de fármacos que potenciem a ação da isoenzima CYP3A4 leva a uma diminuição da concentração de CBZ no sangue, diminuindo por isso o seu efeito terapêutico. O mesmo acontecerá como outros fármacos que sejam metabolizados por este sistema enzimático e que podem, também, ver a sua concentração plasmática reduzida. Por outro lado, a administração de fármacos que diminuam a ação do CYP450 leva ao aumento da concentração da CBZ, potenciando a ocorrência de efeitos adversos e toxicidade (Emc, 2015).

A CBZ apresenta baixa toxicidade e efeitos adversos graves pouco frequentes. Contudo, a toma deste fármaco está associada a algumas reações adversas, nomeadamente ao nível do tubo digestivo, pele e SNC (Caramona, 2012). Como outros antiepiléticos clássicos, os efeitos neurológicos adversos surgem com doses elevadas de CBZ, em alguns casos quando a concentração excede os 9 mg/L já são observados efeitos adversos. O metabolito ativo CBZ-E tem propriedades anticonvulsivantes e é responsável por reações cutâneas idiossincráticas raras como a síndrome de Stevens-Johnson, necrose tóxica epidermolítica ou *rash* cutâneo (Krasowski, 2011). Podem ocorrer graves reações na pele, como o eritema multiforme, e distúrbios hematológicos, como a anemia aplástica e a agranulocitose, que estão relacionadas com uma elevada mortalidade (Caramona, 2012; Emc, 2015). Estima-se que estas reações ocorram 1-6 casos em cada 10 mil novos tratamentos em populações caucasianas, contudo o risco é 10 vezes mais elevado na população asiática devido a uma variação no alelo do antígeno leucocitário humano (HLA, do inglês *human leukocyte antigen*) (Emc, 2015; Krasowski, 2011). A população asiática possui o alelo HLA-B\*1502 que está associado ao desenvolvimento da síndrome de Stevens-Johnson aquando o tratamento com CBZ.

A prevalência deste alelo na comunidade caucasiana é negligenciável (menos de 1%) (Emc, 2015).

A CBZ também possui alguma ação anticolinérgica, podendo desencadear ou agravar situações de glaucoma. Esta ação pode desencadear síndromes confusionais em idosos (Caramona, 2012).

As formas comerciais da CBZ disponíveis no mercado são Carbamazepina Wynn<sup>®</sup>, Carbamazepina Labesfal<sup>®</sup>, Carbamazepina Alter<sup>®</sup>, Carbamazepina Generis<sup>®</sup>, Carbamazepina Mylan<sup>®</sup> e Tegretol<sup>®</sup> (Infarmed, 2016).

### **3. Oxcarbazepina**

A OCX (Figura 9), de nome químico 10,11-dihidro-10-oxo-5H-dibenz[b,f] azepina-5-carboxamida, é um análogo cetónico estrutural da CBZ, semelhante a nível químico e terapêutico à CBZ. Está incluída nos antiepiléticos de nova geração e tem vindo a substituir a CBZ em protocolos terapêuticos recentes (Bialer, 2012).

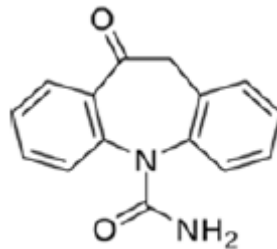
O seu desenvolvimento teve como objetivo recriar o efeito benéfico da CBZ mas sem os seus efeitos secundários indesejáveis, como seja a autoindução enzimática hepática, ou o perfil de interações medicamentosas a ela associadas (Bialer, 2012). A OXC têm um mecanismo de ação idêntico à da CBZ. Produz um bloqueio nos canais de sódio dependentes da voltagem, estabilizando as membranas neuronais hiperexcitadas, inibindo o repetitivo bombardeio neuronal e diminuindo a propagação de impulsos sinápticos (Goldenberg, 2010; Shah *et al*, 2015).

Assim, hoje em dia, a OXC substitui frequentemente a CBZ em pacientes que são intolerantes à CBZ. É tão eficaz quanto a CBZ, porém com um melhor perfil de tolerabilidade, porque, ao contrário da CBZ, não é metabolizado para um derivado epóxido, responsável por algumas das reações adversas da CBZ (Kang *et al*, 2011). Os efeitos adversos mais comuns são: cansaço, dores de cabeça, náuseas e ataxia (Shorvon, 2000).

A OXC, ao contrário da CBZ, não induz o sistema enzimático CYP3A4 o que se traduz numa grande vantagem relativamente à CBZ (Krasowski, 2011; Bialer, 2012). A janela terapêutica para a OXC é 3-35 mg/L (Patsalos e Berry, 2013).

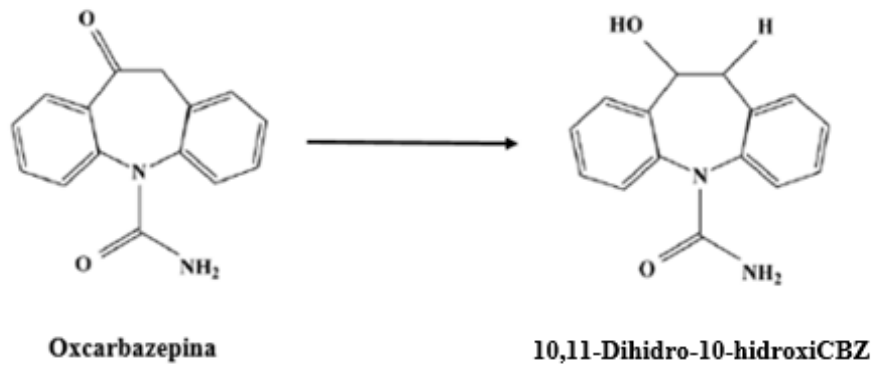
É utilizada como primeira linha de tratamento em caso de convulsões parciais e como fármaco alternativo em casos de convulsões tónico-clónicas generalizadas (Goldenberg, 2010). Recentemente, este fármaco passou também a ser utilizado no tratamento da doença bipolar (Krasowski, 2013).

Foi, pela primeira vez, sujeita a ensaios clínicos na década de 80 na Dinamarca (Shorvon, 2000).



**Figura 9.** Estrutura química da oxcarbazepina (retirada de Breton *et al*, 2005).

A OXC é essencialmente um pró-fármaco, e após administração oral, é totalmente absorvida no trato gastrointestinal ( $\approx 96-98\%$ ) e convertida por uma enzima citosólica das células hepáticas, num metabolito ativo não tóxico de nome químico 10-hidroxi-10,11-dihidrocarbamazepina (10-OH-CBZ), também conhecido por 10-monohidroxi (MHD, do inglês *10-monohydroxy*) ou licarbazepina (Shorvon, 2000; Breton *et al*, 2005; Kang e Lee, 2011), responsável pela atividade farmacológica do fármaco OXC (Figura 10) (Patsalos e Berry, 2013; Shah *et al*, 2015). A licarbazepina liga-se às proteínas com uma extensão de cerca de 38% e atravessa com relativa facilidade a membrana hematoencefálica (Shorvon, 2000).



**Figura 10.** Metabolismo da oxcarbapazepina (adaptada de Breton *et al*, 2005).

É essencialmente excretada através da urina pela conjugação com o ácido glucurónico, (apenas 1% da molécula é excretada sem alteração) e tem um tempo de semi-vida de 8-15 horas (Shorton, 2000; Patsalos e Berry, 2013). O seu pico plasmático médio ocorre até 3-6 horas após administração, tendo uma biodisponibilidade de 100% (Patsalos e Berry, 2013).

Não estão descritas características de autoindução nem de interações com outros fármacos, relativamente à OXC e ao seu metabolito ativo. Assim, pode ser administrada em monoterapia e em politerapia em associação com outros AEDs (Krasowski, 2011; Bialer, 2012).

Tal como a CBZ, a OXC também necessita de TDM com o objetivo de individualizar a terapêutica, ou seja, determinar a concentração plasmática ideal que controle o aparecimento de convulsões e que não potencie efeitos adversos (Phelps e Wheless, 2005).

#### **4. Determinação dos níveis séricos da carbamazepina e oxcarbapazepina**

Conforme referido anteriormente, a monitorização da concentração dos AEDs e seus metabolitos ativos no soro ou no plasma é útil para personalizar a terapia de cada paciente e está estabelecida na prática do tratamento da epilepsia, tendo como objetivo melhorar a evolução clínica do paciente, apoiando a gestão do regime de medicação

com a ajuda da quantificação da concentração do fármaco (Kang *et al*, 2011; Patsalos e Berry, 2013). Os resultados das concentrações de fármaco quantificados na amostra biológica são combinados com conhecimentos farmacológicos, interpretados e influenciam diretamente a prescrição médica (Kang e Lee, 2009).

A consideração mais importante a ter em conta na interpretação dos resultados das concentrações plasmáticas é a adaptação do tratamento às necessidades fisiológicas do paciente. Deve ter-se em conta não só a concentração mas todos os aspetos clínicos que possam influenciar a relação entre a concentração e os efeitos terapêuticos. Assim, deve interpretar-se o resultado no contexto da condição fisiopatológica do paciente e não de uma forma isolada. Fatores como a idade, estado patológico, etnia e outras características de variabilidade inter-individual da farmacodinâmica e farmacocinética devem ser tidas em conta (Kang e Lee, 2009).

No caso da CBZ, que tem uma janela terapêutica estreita, a relação entre a dose e a concentração plasmática desta molécula pode ser imprevisível devido a diferenças entre os indivíduos como fatores genéticos, idade, género, absorção, autoindução e estados patológicos. Além disso, apresenta um número significativo de interações com outros fármacos o que também leva a que seja necessário fazer a TDM (Datar, 2015).

O tempo de colheita da amostra é importante para a interpretação do resultado pois a concentração do fármaco varia ao longo do intervalo terapêutico (Ghiclescu, 2008). Para a avaliação da farmacocinética é essencial que as amostras sejam colhidas nos tempos corretos, de forma a evitar erros na interpretação dos resultados (Kang e Lee, 2009). As amostras recolhidas para realizar uma análise de TDM devem ser recolhidas após ser atingido o estado de equilíbrio, ou seja, após 5 tempos de semi-vida de administração do fármaco, altura em que mais de 95% do fármaco está acumulado e, na prática, o estado de equilíbrio foi atingido (Ghiclescu, 2008; Kang e Lee, 2009). No caso da CBZ, tal como para a maioria dos fármacos, o tempo de amostragem mais adequado é o que corresponde à concentração mínima do estado de equilíbrio (vale), que é a que se correlaciona melhor com a concentração plasmática em equilíbrio, sendo que devem ter decorrido pelo menos 2-4 semanas desde o início do tratamento. Assim, a recolha da amostra deve ser feita antes da primeira dose do dia administrada (Kang *et al*, 2011).

A análise TDM da CBZ pode ser efetuada através de imunoensaios que têm elevada especificidade para o fármaco e pouca afinidade para o seu metabolito. Quando é necessária a quantificação da CBZ e do metabolito CBZ-E recorre-se a métodos cromatográficos como a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC, do inglês *High Performance Liquid Chromatography*) por não existir imunoensaios disponíveis para a sua quantificação (Krasowski, 2011; Burianová e Bořecká, 2015).

Quanto à OXC, ela é detetada no sangue em reduzidas concentrações num intervalo de tempo muito curto (apenas algumas horas) antes da sua conversão em metabolito MHD. Assim, a monitorização dos 2 compostos pode por isso ser útil mas, por norma, apenas se quantifica o metabolito (Patsalos e Berry, 2013). O MHD representa o principal metabolito ativo da OXC e é responsável pela atividade anticonvulsivante (Ferreira *et al*, 2014). De acordo com as atuais evidências, TDM de MHD pode ser benéfica na otimização do controle de crises em idosos, durante a gravidez, em casos de insuficiência renal, ou para determinar potenciais interações medicamentosas e como forma de excluir não conformidades do paciente na terapia (Patsalos e Berry, 2013).

Há várias metodologias para a medição de OXC e MHD em fluídos biológicos por HPLC e cromatografia gasosa (GC, do inglês *Gas Chromatography*) (Kang *et al*, 2011).

#### **IV. Principais métodos de análise da carbamazepina**

Os métodos analíticos utilizados para a determinação e quantificação de anticonvulsivantes são os imunoensaios (métodos usados na clínica laboratorial) e os procedimentos cromatográficos (Frank *et al*, 2002).

Nas décadas de 50 e 60, a TDM de AEDs era efetuada essencialmente por GC e HPLC, sendo esta última a técnica cromatográfica mais promissora. A partir da década de 70, a disponibilidade de imunoensaios para a determinação de vários fármacos em soro e no plasma, revolucionou as análises de TDM. Estes métodos são hoje em dia amplamente utilizados em laboratórios clínicos para a monitorização de rotina de AEDs por causa da facilidade, simplicidade e velocidade de operação (Glauser e Pippenger, 2000).

São técnicas muito sensíveis que, no entanto, podem originar reações cruzadas (com metabolitos) devido aos anticorpos subjacentes ao fundamento da própria técnica. O imunoensaio multiplicado por enzima (EMIT, do inglês *Enzyme Multiplied Immunoassay Technique*) e o imunoensaio de fluorescência polarizada (FPIA, do inglês *Fluorescence Polarization Immunoassay*) são as técnicas mais utilizadas (Kang *et al*, 2009).

Contudo, os métodos cromatográficos continuam a ser a referência na validação de ensaios de TDM, pela elevada sensibilidade e seletividade, tendo vantagem de poder quantificar numa mesma amostra, vários fármacos e os respetivos metabolitos (Aldaz *et al*, 2011).

Na Tabela 7 encontram-se listados os principais métodos analíticos utilizados para a TDM da CBZ, CBZ-E e OXC e que serão alvo de análise posterior.

Quanto ao tipo de amostra, a TDM é normalmente realizada em soro ou plasma, podendo, em alguns casos, utilizar-se outro tipo de amostras biológicas como a saliva ou líquido cerebrospinal (Krasowski, 2011; Krasowski, 2013).



**Tabela 7.** Métodos analíticos utilizados para a TDM da CBZ, CBZ-E e OXC (adaptada de Breton *et al*, 2005; Dasgupta e Datta, 2008; Patsalos e Berry, 2013; Datar, 2015).

Métodos analíticos	Fármacos analisados	Amostras utilizadas
<b>FPIA<sup>a)</sup></b>	CBZ	Soro/plasma
<b>EMIT<sup>b)</sup></b>	CBZ	Soro/plasma
<b>HPLC-MS ou GC-MS<sup>c)</sup></b>	CBZ e CBZ-E; OXC	Soro/plasma
<b>HPLC-MS/MS<sup>d)</sup></b>	CBZ, OXC e seus metabolitos	Soro
<b>HPLC-UV ou HPLC-DAD<sup>e)</sup></b>	CBZ e CBZ-E e outros AEDs, incluindo OXC e MH	Plasma
<b>HPTLC<sup>f)</sup></b>	CBZ	Plasma
<b>MECK<sup>g)</sup></b>	CBZ e seus metabolitos	Plasma

a) Imunoensaio de fluorescência polarizada

b) Imunoensaio de multiplicado por enzima

c) Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrometria de massa ou Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa

d) Cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massa sequencial

e) Cromatografia líquida de alta eficiência com detetor ultravioleta ou Cromatografia líquida de alta eficiência com detetor de arranjo de fotodiodos

f) Cromatografia líquida de camada fina de alta eficiência

g) Cromatografia capilar eletrocinética micelar

Idealmente, os métodos deveriam quantificar a concentração livre do fármaco (dado que apenas a quantidade livre do fármaco atravessa a barreira hematoencefálica e produz efeitos terapêuticos) (Patsalos *et al*, 2008; Patsalos e Berry, 2013). Porém, a maior parte dos ensaios quantifica a concentração total de fármaco, que se correlaciona com a atividade terapêutica, porque existe equilíbrio entre a fração de fármaco na forma livre (farmacologicamente ativa) e a fração ligada às proteínas plasmáticas (Ghiculescu, 2008; Epilepsy Society, 2015). No entanto, há várias situações em que este equilíbrio está perturbado e a fração livre do fármaco pode estar significativamente aumentada, especialmente para fármacos com ligação extensa às proteínas plasmáticas (> 80%) como é o caso da CBZ. Assim, quando há uma diminuição dos níveis séricos de proteínas em situações como: na hipoalbuminemia (que ocorre em situações de doença

renal ou hepática, na gravidez, na idade avançada, desnutrição entre outros), na uremia, e quando há competição dos locais de ligação às proteínas por outros fármacos podem-se observar efeitos tóxicos pois a concentração da fração do fármaco livre é superior ao esperado (Patsalos *et al*, 2008; Kang e Lee, 2009; Patsalos e Berry, 2013).

De facto, em situações em que a concentração de fármaco livre aumenta, a determinação da concentração total do fármaco irá fornecer uma subestimativa da quantidade do fármaco livre, observando-se efeitos tóxicos para concentrações totais inferiores ao previsto (Patsalos e Berry, 2013).

Assim, para ser possível determinar a concentração livre do fármaco em amostras de soro ou plasma é necessário recorrer a métodos prévios que separam os componentes ligados às proteínas dos livres designadamente: diálise equilibrada, ultrafiltração e ultracentrifugação, sendo esta última a mais utilizada (Patsalos e Berry, 2013).

Neste enquadramento torna-se muito útil a quantificação em líquido cerebrospinal já que neste tipo de amostra as concentrações obtidas refletem a concentração de fármaco livre no sangue. Também a saliva, filtrado natural do soro, é uma boa matriz para a quantificação da concentração livre do fármaco (Patsalos e Berry, 2013). Esta amostra tem sido bastante estudada por refletir a concentração de fármaco livre no sangue e por a colheita da mesma ser simples e não invasiva (Epilepsy Society, 2015). No entanto, pode apresentar algumas limitações como: resultados incorretos devido a contaminações, diferença na concentração consoante a amostra recolhida é produzida naturalmente ou é estimulada, volume insuficiente de saliva, dificuldade na colheita devido à viscosidade da saliva, reduzida concentração do AED o que inviabiliza a sua quantificação (Patsalos e Berry, 2013).

A análise de AEDs numa amostra de saliva utiliza os mesmos métodos analíticos aplicados ao soro e plasma, isto inclui os imunoensaios e procedimentos cromatográficos. Devido à concentração na saliva ser semelhante à concentração livre de AED, a zona de calibração deve ser consideravelmente mais baixa para fármacos que se ligam extensivamente às proteínas plasmáticas. Além disto, para métodos cromatográficos é necessário ter uma maior alíquota de saliva, quando comparada com o soro/plasma para adequar a sensibilidade. Nos imunoensaios, é necessário adaptar as

condições de operação e aumentar os tempos de incubação para se ajustar valores à gama de calibração. Em alguns casos pode ser necessário efetuar passos adicionais para retirar possíveis resíduos da alimentação, de modo a não interferir no processo (Patsalos e Berry, 2013).

Outro aspeto a considerar no doseamento e interpretação da concentração plasmática de um fármaco é a possibilidade de interações medicamentosas (Patsalos *et al*, 2002). Embora o risco de interação farmacológica, particularmente por indutores ou inibidores enzimáticos, seja amplamente reconhecido, continuam a ser descritos casos de intoxicação por carbamazepina, que ocupa o segundo lugar das intoxicações por fármacos antiepiléticos (Cálix *et al*, 2011). No caso da CBZ, para além da alteração na sua concentração plasmática, a coadministração de ácido valpróico, aumenta a concentração do metabolito ativo (CBZ-E) por inibição da epóxido hidrolase (Patsalos *et al*, 2002). Outros fármacos que aumentam a concentração do metabolito são a quetiapina, primidona, entre outros (Emc, 2015). Os primeiros sinais visíveis de intoxicação por CBZ ocorrem principalmente a nível do SNC e alterações neuromusculares e cardiovasculares (Araújo *et al*, 2011).

### **1. Imunoensaios**

Os métodos comercializados para a monitorização terapêutica dos AEDs são os imunoensaios por serem mais simples e rápidos que as técnicas cromatográficas, pelo que são opção na rotina clínica laboratorial (Frank *et al*, 2002). No entanto, além de não conseguirem detetar mais do que um composto em simultâneo apresentam também a limitação de apresentarem reações cruzadas devido à existência de outros compostos na amostra a analisar que interferem na medição (Härtter *et al*, 1998). A determinação da concentração da CBZ pode ser obtida através do FPIA e do EMIT que permitem avaliar de uma forma rápida e precisa a concentração do fármaco em fluídos biológicos (Kang *et al*, 2011).

a) Imunoensaio de fluorescência polarizada (FPIA)

O FPIA é uma técnica de imunofluorescência, também chamado de fluoroimunoensaio do tipo homogêneo (o que significa que a interação entre os reagentes utilizados ocorre no mesmo meio, sem a necessidade de etapas de lavagem/separação), empregue no controlo de fármacos e drogas de abuso (Boehl, 2011).

Nesta técnica, os antigénios são marcados com fluorocromos (moléculas fluorescentes que absorvem luz de um determinado comprimento de onda e emitem a outro comprimento de onda) e vão competir com um antigénio não-marcado presente na amostra (neste caso o fármaco) pelo sítio de ligação ao anticorpo (Smith e Eremin, 2008). Quando há uma grande quantidade de fármaco na amostra, este vai ligar-se ao anticorpo e deixar livres os antigénios marcados que se movimentam rapidamente em solução e, quando são excitadas por uma luz com o comprimento de onda apropriado, emitem menos luz. Pelo contrário, quando há uma menor quantidade de fármaco não marcados na amostra ocorre a ligação dos antigénios marcados com os anticorpos e a formação de um imunocomplexo, que possui uma movimentação limitada devido ao seu elevado tamanho, o que leva a que a quantidade de luz emitida seja maior (Oberleitner *et al*, 2015). A quantidade de fármaco na amostra é inversamente proporcional à quantidade de luz detetada. Os fluorocromos mais utilizados são a fluoresceína, a rodamina e a ficoeritrina (Boehl, 2011). Esta metodologia simples tem sido muito utilizada mas, tem sido progressivamente substituída por outros imunoensaios enzimáticos, devido a fatores como a subjetividade de leitura, impossibilidade de automação e precisão com que os reagentes têm de adicionados (Smith e Eremin, 2008).

Um estudo sobre a quantificação da CBZ pelo método FPIA (Frank *et al*, 2002) obteve como limite de deteção para a CBZ 0,3 µg/mL e limite de quantificação de 1,8 µg/mL. A comparação dos resultados obtidos para um conjunto de amostra usando este método e HPLC revelou algumas discrepâncias em amostras que continham quantidades significativas de CBZ-E e que apresentavam valores de concentração de CBZ aumentados em comparação com a técnica cromatográfica, revelando assim a existência de interferência do metabolito no imunoensaio.

b) Imunoensaio multiplicado por enzima (EMIT)

Assim como o FPIA, o EMIT é um imunoensaio do tipo homogêneo, que se baseia na competição entre o fármaco (antigénio) existente na amostra (no caso, a CBZ) e antigénio ligado a uma enzima (denominado conjugado) pelos sítios de ligação do anticorpo (Beckman Coulter, 2010). A atividade da enzima diminui após ligação ao anticorpo, pelo que a concentração da droga na amostra pode ser medida em termos de atividade enzimática. Incubam-se quantidades conhecidas de conjugado (antigénio-enzima) e de amostra com os anticorpos específicos, promovendo-se, assim, uma competição entre o fármaco (presente na amostra) e o conjugado pelos sítios de ligação do anticorpo (Luo *et al*, 2011). Quando não há antigénio na amostra, o anticorpo livre liga-se ao conjugado inativando a enzima, que não vai conseguir agir sobre o substrato. Quando há antigénio presente na amostra, este liga-se ao anticorpo, deixando o conjugado livre o que mantém a enzima na sua forma ativa para atuar sobre o substrato, gerando assim, um produto mensurável, facilmente quantificado por um espectrofotómetro. Desta forma, a relação entre a quantidade de produto formado é diretamente proporcional à quantidade de fármaco livre na amostra (Darwish, 2006). Nestes ensaios, as enzimas mais frequentemente utilizadas são a lisozima, a glicose-6-fosfato desidrogenase e a beta-galactosidase (Boehl, 2011).

O EMIT, além de não apresentar etapas de lavagem, possui vantagens como rapidez, facilidade de execução e possibilidade de automação. No entanto, como nestes ensaios a amostra está presente no momento de leitura do sinal há uma maior probabilidade de interferências (Boehl, 2011).

## 2. Métodos cromatográficos

Nas análises de TDM, pode-se recorrer a métodos cromatográficos por GC e HPLC que são processos mais demorados, trabalhosos e caros que estão frequentemente associados com técnicas de deteção de ultravioleta (UV) ou espectrometria de massa (MS, do inglês *Mass Spectrometry*) (Kang *et al*, 2011). Pode-se ainda utilizar cromatografia em camada fina de alta eficiência (HPTLC, do inglês *high performance thin layer chromatography*) e cromatografia micelar eletrocinética (MEKC, do inglês *micellar electrokinetic chromatography*) (Datar, 2015). Quando comparadas com os imunoensaios, as técnicas

cromatográficas apresentam baixos limites de deteção e quantificação e têm a vantagem de conseguir detetar outros AEDs e o metabolito ativo da CBZ, o CBZ-E (Kang *et al*, 2011).

No entanto, a injeção de amostras biológicas em sistemas de cromatografia, quer gasosa quer líquida, exige um passo de extração com o objetivo de eliminar potenciais interferentes da amostra (ou seja, purificar a amostra) e concentrar os analitos de interesse, para que seja minimizado o efeito de matriz (Jardim, 2010). No caso de amostras biológicas este traduz-se maioritariamente em proteínas e outros constituintes celulares, que interferem diminuindo a sensibilidade dos aparelhos, podendo mesmo tornar impossível a deteção dos analitos de interesse, sobretudo quando se utilizam sistemas muito sensíveis (Queiroz *et al*, 2001). Os procedimentos mais comuns são a extração líquido-líquido, precipitação de proteínas e, mais recentemente, a microextração por sorvente empacotado (MEPS, do inglês *microextraction by packed sorbent*), compatível com a miniaturização e automação, que se tem revelado bastante eficaz na determinação dos AEDs e seus metabolitos (Ferreira *et al*, 2014).

a) Cromatografia gasosa (GC)

A GC é uma técnica comum na análise de compostos que consigam passar ao estado de vapor sem se decomporem e que mantenham a sua estabilidade a temperaturas elevadas (Bak, 2011). A instrumentação básica de um GC inclui um controlador de fluxo da fase móvel, um injetor, uma coluna, um detetor e um sistema de tratamento de dados (computador) onde ficam armazenados os resultados (Christian, 2014).

Como a própria designação indica, na GC a fase móvel é um gás transportador normalmente inerte (como o hélio) ou um gás não reativo (como é o caso do azoto) (Datar, 2015). A fase estacionária é uma camada microscópica de líquido ou polímero num suporte sólido inerte que reveste as paredes de uma coluna. A amostra pode ser líquida ou gasosa mas ao ser injetada no sistema ocorre a sua vaporização. Os compostos volatilizados interatuam de forma diferenciada com a fase móvel e a fase estacionária (de acordo com as suas polaridades e pontos de ebulição) o que leva a que cada composto seja eluído a diferentes tempos, característicos de cada espécie e que se

designam por tempo de retenção (Dasgupta e Datta, 2008). A resposta do detector a cada componente é registada na forma de um cromatograma (intensidade relativa vs. tempo). Os dados são depois processados com recurso a ferramentas informáticas específicas para o efeito (Christian, 2014).

Atualmente um dos métodos mais utilizados é a cromatografia gasosa acoplada à espetrometria de massa (GC-MS). Após separação dos componentes da amostra no sistema cromatográfico, eles são transferidos e analisados individualmente no MS. No espetrómetro são ionizados, fragmentados e dão origem a iões com uma razão massa/carga ( $m/z$ ) característicos de cada composto. Estes iões são depois separados pelo analisador de massa de acordo com a sua razão  $m/z$ , detetados por um multiplicador de eletrões, dando origem a um sinal elétrico que é convertido num processador de dados num espetro de massa, que permitem a identificação e quantificação dos compostos (Kang, 2012).

O aparecimento da cromatografia gasosa acoplada à espetrometria de massas em modo tandem ou sequencial (GC-MS/MS, do inglês *gas chromatography-tandem mass spectrometry*) possibilitou um aumento de sensibilidade e especificidade da metodologia analítica, sendo hoje muito usada como técnica de confirmação na identificação e quantificação de compostos químicos (Christian, 2014). Após separação cromatográfica os compostos são sujeitos a uma primeira separação pelo MS com o intuito de isolar o ião de interesse (ião principal) que, em seguida, é sujeito a uma segunda fragmentação e separação no segundo MS. Relativamente a outras técnicas cromatográficas, esta metodologia assegura uma identificação com maior exatidão e permite atingir baixos limites de deteção e quantificação (Chiaradia *et al*, 2008).

A quantificação de fenitoína, alprazolam, OXC e CBZ foi descrita por Rani e Malik (2012) utilizando GC-MS em amostras de plasma. Como é um método de elevada especificidade, cada composto é facilmente identificado pelo ião molecular e interferências de outros compostos que existam na amostra são reconhecidas. O efeito da matriz foi estudado através da injeção de 3 alíquotas padrão contendo os analitos em elevadas concentrações seguido de 3 alíquotas branco do plasma e verificou-se que os efeitos da matriz não são significativos (Rani e Malik, 2012).

b) Cromatografia líquida

As técnicas de separação por cromatografia líquida (LC, do inglês *liquid chromatography*) têm uma elevada capacidade de resolução, bons limites de deteção e quantificação, bem como grande rapidez e aplicabilidade a diferentes tipos de amostras (Datar, 2015).

Tal como a GC assentam no princípio básico de separação dos vários componentes de uma mistura, quando passa através de uma coluna analítica (constituída por um enchimento - fase estacionária - que deve ser adequado à análise a efetuar, e que é composto por partículas microporosas com diâmetros da ordem dos micrómetros) por ação de um fluxo de fase móvel que, neste caso, é um líquido. É necessária uma bomba de alta pressão para fazer passar a fase móvel através da coluna (Christian, 2014). O processo cromatográfico começa com a injeção da amostra no início da coluna e a separação dos componentes ocorre porque interagem de maneira ligeiramente diferente com as duas fases, processo que vai retardar o seu movimento ao longo da coluna. Eventualmente, cada componente será separado, eluido da coluna e o seu sinal registado na forma de um pico, a um determinado tempo de retenção (Khan *et al* 2015). A maior versatilidade desta técnica, comparativamente à GC, prende-se com o facto de a separação não ter de ser efetuada a elevadas temperaturas (permitindo a análise de compostos de reduzida volatilidade ou termicamente instáveis) e de o poder de separação do sistema (resolução) poder ser mais facilmente ajustado (Bak, 2011).

Atualmente estão descritas na literatura vários tipos de cromatografias líquidas, que têm sofrido uma grande evolução nos últimos anos.

i.

Cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)

O sistema HPLC têm sido o mais amplamente utilizado dentro das técnicas cromatográficas. Tal como referido, compostos que sejam termolábeis (como a CBZ e a OXC) e/ou compostos de elevado peso molecular que dificilmente são analisados por GC, são geralmente determinados por HPLC (Breton *et al*, 2008; Bak, 2011).

Esta técnica está frequentemente associada a métodos de deteção UV ou MS (Breton *et al*, 2005; Siddiqui *et al*, 2013). A técnica com detetor UV (HPLC-UV) é bastante



utilizada na monitorização convencional, e é capaz de recolher informação a vários comprimentos de onda assegurando que, se estiverem presentes em quantidades suficientes, se podem quantificar vários componentes (Siddiqui *et al*, 2013). O detetor UV mede a quantidade de luz UV absorvida durante a passagem do efluente por uma pequena célula de fluxo colocada no fim da coluna cromatográfica. A atenuação da intensidade inicial do feixe de luz com um determinado comprimento de onda é avaliada pelo detetor e o valor de absorvância obtido correlacionado com a concentração de analito na amostra (Khan *et al*, 2015).

Mais recentemente surgiu no mercado um novo sistema de deteção UV, designado de detetor de arranjo de fotodiodos (DAD). As técnicas de HPLC-DAD têm sido desenvolvidas com o objetivo de melhorar a sensibilidade, rapidez e qualidade da ferramenta analítica permitindo a determinação em simultâneo de vários componentes. Neste tipo de sistema, radiação policromática incide na amostra e só depois é colocada uma rede de difração que a separa em diferentes comprimentos de onda que são monitorizados pelos vários fotodiodos que constituem o detetor. Cada fotodiodo ao ser irradiado produz uma corrente elétrica (cuja magnitude depende da intensidade da radiação) que, posteriormente, é transformada em absorvância resultando num espetro de absorção (Ferreira *et al*, 2014; Khan *et al*, 2015).

Contudo o uso do detetor MS tem vindo a aumentar pois apresenta uma sensibilidade e especificidade aumentada relativamente às técnicas de deteção espetroscópica. Assim, apesar de dispendioso o detetor MS é hoje uma boa alternativa para a deteção e quantificação de AEDs e seus metabolitos (Aldaz *et al*, 2011; Datar, 2015). Tal como na cromatografia gasosa, estão descritos vários procedimentos por HPLC-MS/MS, técnica que combina o poder de separação elevado de um HPLC com o poder de deteção de dois espetrómetros de massa (Datar, 2015).

São metodologias altamente seletivas, sensíveis, rápidas, com baixos limites de deteção, com capacidade de gerar informação estrutural que abrangem a análise de uma vasta gama de analitos com diferentes polaridades (Datar, 2015; Khan *et al*, 2015). Segundo o estudo de Burianová e Bořecká, através da TDM por HPLC demonstrou-se que a razão entre CBZ-E/CBZ aumentou significativamente quando há coadministração de CBZ com outros AEDs (fenitoína, fenobarbital, primidona e ácido valpróico). Isto prende-se

com o facto de todos estes fármacos citados (à exceção do ácido valpróico) serem potentes indutores do CYP450, fazendo com que a CBZ-E resultante da metabolização da CBZ aumente a sua concentração. No caso do ácido valpróico inibe a enzima epóxido hidrólase que é responsável pela inativação do metabolito (Burianová e Bořecká, 2015).

Estudos revelaram que a concentração de CBZ quantificada por HPLC é maior do que por um imunoensaio. Assim, o método cromatográfico demonstrou elevada sensibilidade, especificidade e precisão pois não é influenciado por reações cruzadas ou outros interferentes nem pela matriz que é eliminada no método de HPLC que são o problema dos imunoensaios (Burianová e Bořecká, 2015).

O estudo de Ferreira *et al* permitiu a quantificação da CBZ, lamotrigina, OXC, fenobarbital, fenitoína e os metabolitos ativos CBZ-E e MH através da técnica de HPLC-DAD. Para isso, utilizou-se amostras de plasma de pacientes em tratamento da epilepsia recolhidas de manhã antes da administração dos AEDs. Segundo esta análise verificou-se que não existem interferências apesar de alguns pacientes fazerem politerapias. Na generalidade a concentração dos vários AEDs quantificados encontra-se dentro das janelas terapêuticas da literatura. Assim, a técnica de HPLC-DAD é apropriada para a TDM dos AEDs e seus metabolitos em estudo (Ferreira *et al*, 2014).

ii.

#### Cromatografia líquida de ultra eficiência (UHPLC ou UPLC)

Recentemente a cromatografia líquida sofreu uma grande evolução com o desenvolvimento da cromatografia líquida de ultra eficiência (do inglês *ultra-high performance liquid chromatography*) tem por base os mesmos princípios da separação por HPLC e é considerada uma evolução desta técnica que ao longo dos últimos anos tem incorporado melhorias, permitindo que análises mais rápidas e mais eficientes sejam alcançadas, de modo a satisfazer as atuais necessidades de um aumento do número de análises e redução de custos (Karsten *et al*, 2009). Permite a separação e análise de amostras complexas e as principais diferenças entre os sistemas de UHPLC e os de HPLC prendem-se com as reduzidas dimensões das colunas cromatográficas empregues (5-10 cm de comprimento e diâmetros internos de 1-2,1 mm em UHPLC), e

o facto de essas colunas cromatográficas estarem preenchidas com partículas de  $\leq 2 \mu\text{m}$  (em vez de  $5 \mu\text{m}$ , mais comuns para sistemas de HPLC) o que permite efetuar análises mais rápidas e eficientes. Este sistema permite também atingir pressões da ordem dos 15000 psi (acima de 1000 bar), consideravelmente superiores às com conseguidas nos HPLC, onde a pressão máxima ronda os 2000 – 6000 psi (Maldaner e Jardim, 2012).

A introdução desta técnica registou um rápido crescimento dado as suas vantagens: diminuição considerável no tempo de análise, melhor resolução e detetabilidade, economia de fase estacionária e fase móvel, pequeno volume de amostra, facilidade de transferência de um método desenvolvido por HPLC para UHPLC, grande variedade de colunas e equipamentos disponíveis e menor produção de resíduos (Karsten *et al*, 2009; Maldaner e Jardim, 2012).

#### Cromatografia líquida de camada fina de alta eficiência (HPTLC)

<sup>i</sup>A HPTLC é uma forma modificada da cromatografia de camada fina (TLC, do inglês *thin layer chromatography*), que surgiu com o avanço da técnica e o desenvolvimento de equipamento específico para a pressurização do fluxo de solvente ao longo da placa e que, hoje em dia, é um importante instrumento de análise qualitativa e quantitativa. Consiste numa técnica de rápida separação e tem a capacidade de analisar uma grande variedade de compostos (Siddiqui *et al*, 2013; Datar, 2015). É um processo relativamente simples, de curta duração e de custo reduzido sendo utilizado em análises de rotina em alternativa ao método de HPLC (Patel *et al*, 2011).

Este processo tem a capacidade de analisar várias amostras e os padrões em simultâneo, em cada placa, usando uma quantidade pequena de fase móvel, o que faz com que seja uma vantagem pois reduz o tempo e custos da análise (Siddiqui *et al*, 2013; Datar, 2015). Além disto, não apresenta restrições na escolha dos solventes e da fase móvel e normalmente não requer um pré-tratamento da amostra, pois os excipientes não interferem com este método (Patel *et al*, 2011).

Neste procedimento existe uma fase sólida, o adsorvente, que reveste uma superfície sólida em camada fina, normalmente, de vidro, plástico ou alumínio. O adsorvente deve ser extremamente seletivo relativamente às substâncias que se pretende separar, para

que se consigam distinguir umas das outras (Siddiqui *et al*, 2013). Os compostos migram ao longo da fase estacionária, sendo que o sólido retém cada componente de forma diferente de acordo com a afinidade para a fase estacionária e fase móvel. (Patel *et al*, 2011).

Um estudo de Patel e colaboradores (2011) sobre a quantificação da CBZ através do método de HPTLC revelou que esta técnica possui uma precisão e exatidão satisfatórias, uma elevada sensibilidade e especificidade e é reprodutível, fazendo com que possa ser utilizada em análises de rotina para a quantificação de CBZ.

c) Cromatografia capilar eletrocinética micelar (MECK)

Para além das técnicas cromatográficas, as técnicas eletroforéticas conquistaram um espaço na separação e identificação de compostos. A cromatografia capilar eletrocinética micelar (MEKC) (do inglês, *micellar electrokinetic capillary chromatography*) é um processo cromatográfico semelhante à eletroforese capilar, técnica de separação analítica muito sensível, capaz da análise de quantidades muito reduzidas de amostra (Alagar *et al*, 2014).

O princípio de separação numa eletroforese capilar é a migração diferencial dos componentes de uma amostra num capilar de sílica fundida, preenchido com uma solução condutora denominada "eletrólito", sob a influência de um campo elétrico. A corrente aplicada faz com que o eletrólito de suporte e as espécies iónicas presente na amostra se movimentem de um eléctrodo para o outro a uma velocidade que depende das suas características, tais como a carga molecular, tamanho e/ou mobilidade (Mocherniuk, 2008). Características como a velocidade de análise, a alta eficiência, o reduzido consumo de amostra e reagentes, elevada resolução e o equipamento analítico ser automático, fizeram com que a eletroforese capilar tivesse ganho impulso na análise farmacêutica, sendo considerada como uma alternativa e também uma técnica complementar ao HPLC (Hancu *et al*, 2013). No entanto, estes métodos eletroforéticos apresentam a limitação de só poderem ser aplicados na separação de espécies iónicas (Mocherniuk, 2008).

No caso da MEKC, é possível a separação de compostos iónicos e neutros. São adicionados ao eletrólito, agentes tensioativos em condições apropriadas à formação de micelas, passando assim a haver uma fase micelar dispersa no eletrólito existente no interior do capilar (Hancu *et al*, 2013). As amostras são separadas através do diferencial de partição entre a fase micelar (fase pseudo-estacionária) e o eletrólito (fase móvel), tal como acontece num processo cromatográfico comum (Datar, 2015). A MEKC possui, curtos tempos de análise, requer pequeno volume de amostra e o consumo muito reduzido de solvente (Silva *et al*, 2007).

O estudo de Härtter *et al* (1998) descreve a técnica de MEKC acoplada ao detetor DAD para análise qualitativa e quantitativa da CBZ e do seu metabolito. A comparação dos resultados obtidos com os de HPLC permitiu concluir que as concentrações para a CBZ e os seus metabolitos são idênticas. A MEKC mostrou uma precisão e linearidade suficiente para ser um método válido na quantificação destes compostos. É um método mais rápido e menos poluente que a HPLC, constituindo uma boa alternativa a esta determinação (Härtter *et al*, 1998).

## V. Conclusões e perspectivas futuras

A epilepsia é uma doença do foro neurológico caracterizada por crises imprevisíveis com ou sem convulsões associadas. Afeta uma parte significativa da população mundial e, por isso, é alvo de especial atenção por parte de agentes e autoridades de saúde pública e pela comunidade científica.

O tratamento da epilepsia tem como objetivo controlar as convulsões, mantendo ou melhorando a qualidade de vida dos pacientes.

O tratamento farmacológico desta patologia remonta a 1857 quando foi utilizado pela primeira vez o brometo de potássio como antiepilético. Desde então com os avanços tecnológicos e da área da saúde foram introduzindo no mercado uma variedade de outros fármacos anticonvulsivantes estando atualmente disponíveis no mercado mais de duas dezenas. Neste contexto, a carbamazepina é um dos fármacos mais antigos (pertencendo à classe dos antiepiléticos designados de clássicos). Começou a ser comercializado a partir de 1962 e continua a ser um dos antiepiléticos mais utilizados na terapêutica da epilepsia. É um fármaco de primeira linha no tratamento de crises parciais simples ou complexas, tónico-clónicas e ataques generalizados em crianças e adultos e é também utilizado no tratamento de espasmos musculares e nevralgias do trigémeo. Sofre metabolização no fígado dando origem a um metabolito (carbamazepina-10,11-epóxido) que é farmacologicamente tão ativo, como o composto original e é responsável por parte da atividade anticonvulsivante e pelos efeitos secundários associados à terapêutica com a CBZ. Estes efeitos adversos ocorrem essencialmente ao nível do tubo digestivo, pele e sistema nervoso central. Apesar da sua comprovada eficácia, os efeitos secundários associados à terapêutica, o facto de ser um potente indutor das enzimas hepáticas, aumentando a sua própria metabolização bem como a de fármacos coadministrados e exibir uma variabilidade farmacocinética grande levou a que fossem desenvolvidos novos antiepiléticos, dentro dos quais se inclui a oxcarbazepina, com melhores características a nível farmacocinético. Este novo fármaco é um análogo da CBZ, que a substitui em pacientes intolerantes, e que exhibe melhor perfil de tolerabilidade pois não apresenta a autoindução característica da CBZ nem as interações medicamentosas a ela associadas. A metabolização da OXC origina um metabolito ativo (10-hidroxi-10,11-dihidrocarbamazepina) responsável pela sua

atividade farmacológica deste fármaco cujo mecanismo de ação é semelhante ao da CBZ.

Tanto a CBZ como a OXC necessitam de monitorização terapêutica (TDM) devido a possuírem uma janela terapêutica estreita, elevada variabilidade inter e intraindividual associada a fatores como a idade, gravidez, doença ou medicação concomitante, entre outros.

Assim, a TDM tem-se revelado uma técnica imprescindível no tratamento da epilepsia pois assegura a individualização da terapêutica de cada doente, ajustando a dose do fármaco de acordo com as necessidades do doente através da implementação de regimes posológicos adequados que mantêm a concentração dentro de um intervalo terapêutico aumentando a sua eficácia e diminuindo os efeitos adversos.

Os métodos de quantificação utilizados pela TDM podem ser imunoensaios e métodos cromatográficos. Os imunoensaios (como a FPIA) são utilizados em análises de rotina pois são técnicas rápidas e simples, no entanto podem dar origem a reações cruzadas resultantes de outros compostos presentes na amostra, dando falsos resultados. Além disso não conseguem detetar mais do que um composto em simultâneo o que é uma limitação dado que frequentemente é importante quantificar não só o AED como também os seus metabolitos, pois estes também são responsáveis pela atividade anticonvulsivante e pelos efeitos secundários. Assim, pode-se recorrer a métodos cromatográficos que são processos mais sensíveis, específicos e precisos, sendo a sua principal vantagem a quantificação de vários compostos em simultâneo. No entanto as técnicas cromatográficas apresentam desvantagens como o maior tempo de análise, dificuldade de execução, necessidade de pessoal qualificado e maior custo, razões pelas quais não são utilizadas em análises de rotina.

Se é verdade que a monitorização de AEDs continuará a ser uma realidade a acompanhar o tratamento dos doentes com epilepsia, é também uma realidade que se espera que haja um desenvolvimento acelerado das técnicas de quantificação destes fármacos no sentido de melhorar a sua qualidade quer em termos de número de compostos a determinar em cada análise quer em termos de seletividade, rapidez e custo.

## VI. Bibliografia

Alagar, M.R. *et al.* (2014). Updated Review on Micellar Electrokinetic Chromatography. *Chromatography Separation Techniques*, 5 (3), pp. 1-6.

Aldaz, A. *et al.* (2011). Pharmacokinetic Monitoring of Antiepileptic Drugs. *Farmacia Hospitalaria*, 35 (6), pp. 326-339.

Ambrósio, A.F *et al.* (2002). Mechanismos of Action of Carbamazepine and Its Derivatives, Oxcarbazepine, BIA 2-093, and BIA 2-024. *Neurochemical Research*, 27 (1/2), pp. 121-130.

American Association of Neurological Surgeons (AANS) - Epilepsy. [Em linha]. Disponível em <http://www.aans.org/Patient%20information/conditions%20and%20treatments/epilepsy.aspx>. [Consultado em 20/04/2016].

American Association for Clinical Chemistry (AACC) – Therapeutic Drug Monitoring. [Em linha]. Disponível em <https://labtestsonline.org/understanding/analytes/therapeutic-drug/start/2>. [Consultado em 27/04/2016].

Araújo, D.S., Silva, H.R.R. e Freitas, R.M. (2011). Carbamazepina: Uma Revisão da Literatura. *Revista Eletrônica de Farmácia*, VII (4), pp. 30-45.

Bailer, M. (2012). Chemical properties of antiepileptic drugs (AEDs). *Advanced Drug Delivery Reviews*, 64, pp. 887-895.

Bak, I. (2011). *Modern analytical techniques in the pharmaceutical and bioanalysis*. Budapeste, Kezirat lezarva.

Bartolini, L. *et al* (2009). Efeitos endócrinos e metabólicos das drogas antiepiléticas. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia*, 53 (7), pp. 795-803.

Beckman Coulter. (2010). Emit<sup>®</sup> 2000 Carbamazepine Assay. [Em linha]. Disponível em [https://www.beckmancoulter.com/wsrportal/techdocs?docname=/cis/4F052/%25%25/EN\\_CARBAMAZEPINE.pdf](https://www.beckmancoulter.com/wsrportal/techdocs?docname=/cis/4F052/%25%25/EN_CARBAMAZEPINE.pdf). [Consultado 11/06/2016].



- Bial. (2013). 11 de Março: Dia Nacional da Epilepsia. [Em linha]. Disponível em <[https://www.bial.com/download/epilepsia\\_11.03.2013.pdf](https://www.bial.com/download/epilepsia_11.03.2013.pdf)>. [Consultado em 15/03/2016].
- Bialer, M. (2012). Chemical properties of antiepileptic drugs (AEDs). *Advanced Drug Delivery Reviews*, 64, pp. 887-895.
- Boehl, P.O. (2011). A utilização de imunoensaios na detecção de substâncias psicoactivas. *Universidade Federal do Rio Grande do Sul*, Porto Alegre, pp. 1-62.
- Breton, H *et al.* (2005). Liquid chromatography-electrospray mass spectrometry determination of carbamazepine, oxcarbazepine and eight of their metabolites in human plasma. *Journal of Chromatography B*, 828 (1-2), pp. 80-90.
- Brodie, M.J. (2010). Antiepileptic drug therapy the story so far. *Seizure*, 19, pp. 650-655.
- Burianová, I. e Bořecká, K. (2015). Routine therapeutic monitoring of the active metabolite of carbamazepine: Is it really necessary?. *Clinical Biochemistry*, 48 (13-14), pp. 866-869.
- Cálix, M.J. *et al.* (2011). Hemoperfusão com carvão ativado na intoxicação grave por carbamazepina. *Nascer e Crescer – Revista do Hospital de crianças Maria Pia*, XX (1), pp. 23-25.
- Caramona, M. (2012). Prontuário Terapêutico N.º 11. *INFARMED – Autoridade Nacional do Medicamento e Produtos de Saúde, IP/Ministério de Saúde*, pp. 88-103.
- Chiaradia, M.C., Collin, C.H. e Jardim, I.C.S.F. (2008). O Estado da arte da cromatografia associada à espectrometria de massas acoplada à espectrometria de massas na análise de compostos tóxicos em alimentos. *Química Nova*, 31 (3), pp. 623-636.
- Christian, G. D. (2014). *Analytical Chemistry*. 7ª ed., John Wiley & Sons.
- Darwish, I.A. (2006). Immunoassay Methods and their Applications in Pharmaceutical Analysis: Basic Methodology and Recent Advances. *International Journal of Biomedical Science*, 2 (3), pp. 217-235.

Dasgupta, A. e Datta, P. (2008). Analytical Techniques for Measuring Concentrations of Therapeutic Drugs in Biological Fluids. In: Dasgupta, A. (Ed.). *Handbook of Drug Monitoring Methods (Therapeutics and Drugs of Abuse)*. Humana Press, New Jersey, pp. 67-86.

Datar, P.A. (2015). Quantitative bioanalytical and analytical method development of dibenzazepine derivative, carbamazepine: A review. *Journal of Pharmaceutical Analysis*, 5, pp. 213-222.

Emc (2015). *Tegretol Tablets 100mg, 200mg e 400mg*. [Em linha]. Disponível em <<https://www.medicines.org.uk/emc/medicine/1328>>.  
<<https://www.medicines.org.uk/emc/medicine/1328>>. [Consultado em 15/03/2016].

Epilepsy Action Australia. [Em linha]. Disponível em <<http://www.epilepsy.org.au/>>. [Consultado em 15/03/2016].

Epilepsy Foundation. [Em linha]. Disponível em <<http://www.epilepsy.com/>>. [Consultado em 15/03/2016].

Epilepsia – Psiquiatria Geral. [Em linha]. Disponível em <<http://www.psiquiatriageral.com.br/epilepsia/crise.htm>>. [Consultado em 20/04/2016].

Epilepsy Society. [Em linha]. Disponível em <<https://www.epilepsysociety.org.uk/epileptic-seizures#.V2MZsvkrLIW>>. [Consultado em 21/04/2016].

Fernandes, M. (2013). Epilepsia do lobo temporal: mecanismos e perspectivas. *Estudos Avançados*, 27 (77), pp. 85-96.

Ferreira, A. *et al* (2014). Liquid chromatography assay based on /microextraction by packed sorbent for therapeutic drug monitoring of carbamazepine, lamotrigine, oxcarbazepine, Phenobarbital, phenytoin and the active metabolites carbamazepina-10,11-epoxide and licarbazepine. *Journal of Chromatography B*, 971, pp.20-29.

Frank, E.L. *et al* (2002). Performance Characteristics of Four Immunoassays for Antiepileptic Drugs on the IMMULITE 2000 Automated Analyzer. *American Society for Clinical Pathology*, 118, pp.124-131.

Ghiculescu, R.A. (2008). Therapeutic Drug monitoring: which drugs, why, when and how to do it. *Australian Prescriber*, 31 (2), pp. 42-44.

Glauser, T.A. e Pippenger, C.E. (2000). Controversies in Blood-level Monitoring: Reexamining Its Role in the Treatment of Epilepsy. *Epilepsy*, 41 (8), pp. 56-515.

Goktas, U., Kati, I. e Yuce, H.H. (2010). Management of a severe carbamazepine overdose with continuous venovenous hemodiafiltration. *The American Journal of Emergency Medicine*, 28, pp. 260.e1-260.e2.

Goldenberg, M. (2010). Overview of Drugs Used for Epilepsy and Seizures. *Pharmacy and Therapeutics Community*, 35 (7), pp. 392-415.

Hancu, G. *et al.* (2013). Principles of Micellar Electrokinetic Capillary Chromatography Applied in Pharmaceutical Analysis. *Advanced Pharmaceutical Bulletin*, 3 (1), pp. 1-8.

Härtter, S. *et al.* (1998). Micellar electrokinetic capillary chromatography for therapeutic drug monitoring of carbamazepine and its main metabolites. *Journal of Chromatography B*, 712 (1-2), pp. 253-258.

Índice. *Carbamazepina*. (2016). [Em linha]. Disponível em <<https://www.indice.eu/pt/INDICEonline/DCI/carbamazepina/>>. [Consultado em 05/05/2016].

Infarmed – Autoridade Nacional do Medicamento e Produtos de Saúde I.P. [Em linha]. Disponível em <<http://www.infarmed.pt/portal/page/portal/INFARMED>>. [Consultado em 20/04/2016].

Jardim, I.C.S.F. (2010). Extração em Fase Sólida: Fundamentos Teóricos e Novas Estratégias para Preparação de Fases Sólidas. *Scientia Chromatographica*, 2 (1), pp. 13-25.

Kang, J. e Lee, M. (2009). Overview of Therapeutic Drug Monitoring. *The Korean Journal of Internal Medicine*, 24 (1), pp. 1-10.

Kang, J. *et al.* (2011). Modern Methods for Analysis of Antiepileptic Drugs in the Biological Fluids for Pharmacokinetics, Bioequivalence and Therapeutic Drug Monitoring. *The Korean Journal of Physiology and Pharmacology*, 15, pp. 67-81.

Kang, J.S. (2012). Principles and Applications of LC-MS/MS for the Quantitative Bioanalysis of Analytes in Various Biological Samples. In: Prasain, J. (Ed.). *Tandem Mass Spectrometry – Applications and Principles*. Intech, Croatia, pp. 441-492.

Karsten, M. *et al.* (2009). Speeding Up Pharmaceutical UHPLC Method Development With an Integrated, Ultrafast and Automated Method Scouting Solution. [Em linha]. Disponível em <<http://www.dionex.com/en-us/webdocs/84889-PO-HLPC-UHPLC-LPN2289-01.pdf>>. [Consultado em 24/06/2016].

Khan, I. *et al.* (2015). Analytical Techniques (Chromatography, Spectroscopy, Electrophoresis) in Pharmaceutical Analysis: A Review. *International Journal of Research in Pharmaceutical and Nano Sciences*, 4(1), pp. 19-27.

Krasowski, M.D. (2011). Therapeutic Drug Monitoring of Antiepileptic Medications. In: Foyaca-Sibata, H. (Ed.). *Novel Treatment of Epilepsy*. Croácia, InTech, pp. 133-158.

Krasowski, M.D. (2013). Therapeutic Drug Monitoring of the Newer Generation Drugs. [Em linha]. Disponível em <<https://www.aacc.org/publications/cln/articles/2013/june/antiepileptic-drugs>>. [Consultado em 10/03/2016].

Kwan, P. e Brodley, M.J. (2005). Epilepsy: the services. In: WHO. (Ed.). *Atlas – Epilepsy Care in the World*. Geneva, World Health Organization, pp 29-47.

Loring, D.W., Marino, S. e Meador, K.J. (2007). Neuropsychological and Behavior Effects of Antiepileptic Drugs. *Neuropsychology Review*, 17 (4), pp. 413-425.

Luo, X.H. *et al.* (2011). The clinical value of enzyme-multiplied immunoassay technique monitoring plasma concentrations of cyclosporine A after a renal transplantation. *Journal of Pharmaceutical Analysis*, 1 (2), pp. 139-142.

Maldaner, L. e Jardim, I.C.S.F. (2012). UHPLC – Uma abordagem atual: desenvolvimentos e desafios recentes. *Scientia Chromatographica*, 4 (3), pp. 197-207.

Magiorinis, E. *et al.* (2014). Highlights in the History of Epilepsy: The Last 200 Years. *Hindawi Publishing Corporation*, pp. 1-13.

- Maranhão, M., Gomes, E. e Carvalho, P. (2011). Epilepsia y Anestesia. *Revista Brasileira de Anestesiologia*, 61 (2), pp. 124-136.
- Mocherniuk, M.B. (2008). Aplicação da eletroforese capilar na determinação de princípio ativo de fármacos e ácidos orgânicos em amostras de água fortemente salina. *Universidade do Estado do Rio de Janeiro*, Rio de Janeiro, pp. 1-94.
- Moreira, S. (2004). Epilepsia: concepção histórica, aspectos conceituais, diagnóstico e tratamento. *Mental – ano II*, 3, pp. 107-122.
- Mukhopadhyay, H.K. *et al.* (2012). Epilepsy and its Management: A Review. *Journal of PharmaSciTech*, 1 (2), pp. 20-26.
- Oberleitner, L. *et al.* (2015). Fluorescence polarization immunoassays for carbamazepine – comparison of tracers and formats. *Royal Society of Chemistry*, 7, pp. 5854-5861.
- Ochoa, J. (2016). Antiepileptic Drugs. [Em linha]. Disponível em <<http://emedicine.medscape.com/article/1187334-overview#a2>>. [Consultado em 05/05/2016].
- Patel, R.B. *et al.* (2011). Development of HPTLC Method for Estimation of Carbamazepine in Formulations and Its In Vitro Release Study. *Chromatography Research International*, 2011, pp. 1-8.
- Patsalos, P.N. *et al.* (2002). The Importance of Drug Interactions in Epilepsy Therapy. *Epilepsy*, 43 (4), pp. 365-385.
- Patsalos, P.N. (2013). Carbamazepine. In: Patsalos, P.N. (2ª edição). *Antiepileptic Drug Interactions*. Londres, Springer, pp. 11-21.
- Patsalos, P.N. e Berry, D.J. (2013). Therapeutic Drug Monitoring of Antiepileptic Drugs by Use of Saliva. *Ther Drug Monit*, 35 (1), pp. 4-29.
- Patsalos *et al.* (2008). Antiepileptic drugs – best practice guidelines for therapeutic drug monitoring: A position paper by the subcommission on therapeutic drug monitoring, ILAE Commission on Therapeutic Strategies. In: Patsalos *et al.* (Ed). *Epilepsia*. Reino Unido, Wiley Periodicals, pp. 1239-1276.

Perucca, E. (2001). Clinical pharmacology and therapeutic use of the new antiepileptic drugs. *Fundamental & Clinical Pharmacology*, 15, pp. 405-417.

Phelps, S.J. e Wheless, J.W. (2005). Oxcarbazepine: A Brief Review. *J Pediatr Pharmacol Ther*, 10 (4), pp. 248-253.

PubChem. *Carbamazepine* (2005). [Em linha]. Disponível em <<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/carbamazepine#section=Top>>. [Consultado em 20/04/2016].

Queiroz, S.C.N., Collins, C.H. e Jardim, I.C.S.F. (2001). Métodos de extração e/ou concentração de compostos encontrados em fluidos biológicos para posterior determinação cromatográfica. *Química Nova*, 24 (1), pp. 68-76.

Rani, S. e Malik, A.K. (2012). A novel microextraction by packed sorbent-gas chromatography procedure for the simultaneous analysis of antiepileptic drugs in human plasma and urine. *Journal of Separation Science*, 35 (21), pp. 2970-2977.

Rang, H.P. *et al.* (2007). Fármacos antiepilépticos. In: Rang, H.P. *et al.* (Ed.). *Rang & Dale Farmacologia*, Rio de Janeiro, Elsevier, pp. 575-587.

Reynolds, E. H. (2005). Epilepsy: the disorder. In: Reynolds, E. H. (Ed.). *Atlas: Epilepsy Care in the World*. Geneva, World Health Organization, pp. 15-27.

Sander, J.W. (2005). Epilepsy: the disorder. In: Reynolds, E. H. (Ed.). *Atlas: Epilepsy Care in the World*. Geneva, World Health Organization, pp. 15-27.

Shah, k., Rana, D. e Patel, V. (2015). Newer antiepileptic drugs. *NHL Journal of Medical Sciences*, 4 (1), pp. 75-82.

Sharma, S. e Dixit, V. (2013). Epilepsy – A comprehensive Review. *International Journal of Pharma Research & Review*, 2 (12), pp. 61-80.

Shorvon, S. (2000). Oxcarbazepine: a review. In: Shorvon, S. (Ed). *Seizure 2000*, Reino Unido, BEA Trading, pp. 75-79.

Siddiqui, M.R., AlOtheman, Z.A. e Rahman, N. (2013). Analytical techniques in pharmaceutical analysis: A review. *Arabian Journal of Chemistry*. [Em linha].

Disponível em <[http://ac.els-cdn.com/S1878535213001056/1-s2.0-S1878535213001056-main.pdf?\\_tid=7eba334e-7385-11e6-a1ae-00000aacb35e&acdnat=1473092967\\_6cc5e02cff0853762a8f91d904bd9073](http://ac.els-cdn.com/S1878535213001056/1-s2.0-S1878535213001056-main.pdf?_tid=7eba334e-7385-11e6-a1ae-00000aacb35e&acdnat=1473092967_6cc5e02cff0853762a8f91d904bd9073)>.

[Consultado em 30/06/2016].

Sills, G.J. (2015). Mechanisms of action of antiepileptic drugs. *Epilepsy Society*, 25, pp. 1-8.

Silva, J.A.F.S. *et al.* (2007). Terminologia para as técnicas analíticas de eletromigração em capilares. *Química Nova*, 30 (3), pp. 740-744.

Smith, D.S. e Eremin, A.S. (2008). Fluorescence polarization immunoassays and related methods for simple, high-throughput screening of small molecules. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 391 (5), pp. 1499-1507.

Soderstrom, J., Murray, L. e Daly, F.F.S. (2006). Toxicology case of the month: carbamazepine overdose. *Emergency Medicine*, 23, pp. 869-871.

WHO<sup>a</sup> (World Health Organisation) – Epilepsy. [Em linha]. Disponível em <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs999/en/>>. [Consultado em 05/05/2016].

WHO<sup>b</sup> - Fostering Epilepsy Care in Europe. [Em linha]. Disponível em <[http://www.who.int/mental\\_health/neurology/epilepsy/euro\\_report.pdf](http://www.who.int/mental_health/neurology/epilepsy/euro_report.pdf)>. [Consultado em 05/05/2016].