



Veterinária Técnica Fev. 1992

Produção Animal p. 14

Higiene e Tec. Alim. p. 18

Clínica e Patologia p. 30

Sanidade Animal p. 36

Pesquisa e Quantificação do Agonista β_2 -Adrenérgico Salbutamol (Albuterol) no Plasma Sanguíneo

TEXTO: José H. R. Dias Correia *
José A. Mestre Prates *

* Secção de Bioquímica,
Departamento de Tecnologia e Sanidade Animal,
Faculdade de Medicina Veterinária,
Rua Gomes Freire,
1199 LISBOA CODEX

Introdução

A utilização de agonistas β_2 -adrenérgicos (por exemplo, clenbuterol, salbutamol, ractopamina, etc.) para fins ilegais, de aceleração do crescimento em animais de talho, é um gravíssimo problema da Saúde Pública Veterinária. Recentemente, uma fábrica clandestina que produzia clenbuterol foi descoberta na Holanda, tendo as autoridades policiais e do Ministério da Agricultura holandeses agido de imediato (2). Também no nosso país a Direção Geral da Pecuária, por meio do Instituto Nacional de Veterinária, têm relatado a presença de animais tratados ilegalmente com compostos β_2 -agonistas, segundo estudos realizados por amostragens aleatórias em matadouros nacionais (Prof. Dr. A.A. Dias Correia, comunicação pessoal).

Várias e sofisticadas tecnologias laboratoriais podem ser empregues para efectuar a detecção e quantificação de drogas β_2 -agonistas no sangue e na urina dos animais, estando entre as mais populares a HPLC ("high performance liquid chromatography"), a GC-MS ("gas chromatography-mass spectrometry"), e a ELISA ("enzyme-linked immunosorbant assay"). Estas tecnologias são muito exigentes em instrumentação. Recentemente foi relatada uma tecnologia extremamente simples, rápida e exacta, para efectuar a detecção e quantificação do salbutamol no plasma e urina humanos (1). A técnica recorre a cromatografia em camada delgada de alta eficiência (HPTLC ou "high performance thin layer chromatography") para separar um corpo corado que surge após uma reacção química de derivatização, específica para o salbutamol. A quantidade de salbutamol que reagiu é subseqüentemente medida sobre as próprias placas de HPTLC, recorrendo a densitometria por raios laser na região vermelha do espectro luminoso. No presente relatório apresentamos resultados da quantificação de salbutamol em plasma de bovino com concentrações variando entre 1 e 100 nanogramas de salbutamol por mililitro.

Materiais e Métodos

Plasma de bovino, obtido com EDTA, foi adicionado de salbutamol para se obterem concentrações finais de 1, 10 e 100 ng/ml. O plasma foi então submetido a um processo de extracção por adsorção em fase reversa com mini-colunas de Sep-Pak C18 (Millipore Waters Associates, E.U.A.), e o composto adsorvido eluído com metanol (Merck, LiChrosolv, Alemanha). A reacção de derivatização (figura 3) processou-se com N,N-dimetil-p-fenilenodiamina, em meio oxidante e à temperatura ambiente, num espaço livre de luz. Para contornar o aparecimento de produtos secundários, não desejáveis, que eventualmente surgissem por causa do reagente de derivatização, presente sempre em excesso, 4-(2-dimetilaminoetil) fenol sulfato foi junto ao meio de reacção. A indoanilina obtida pela reacção de derivatização específica do salbutamol era então extraída com clorofórmio (Merck, LiChrosolv, Alemanha), e alíquotas de 6 μ l aplicadas em placas de HPTLC (Sílica gel 60, Merck, Alemanha) (figura 1). Um sistema de

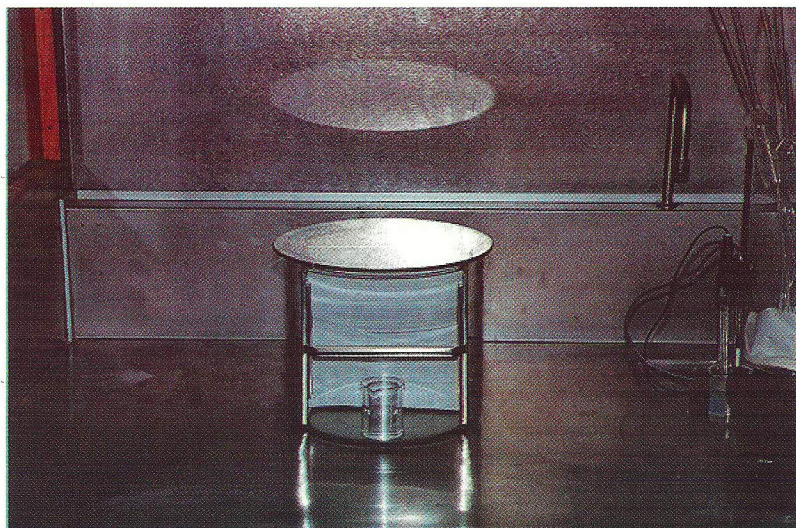


Fig. 1 - Câmara cromatográfica com a placa de HPTLC em desenvolvimento, no respectivo suporte metálico

solventes (fase móvel) composto por etil- acetato:clorofórmio:metanol (todos os reagentes Merck, LiChrosolv, Alemanha) (60:40:1 (v/v)) deslocava-se 3,5 cm a partir da linha de aplicação das amostras. Menos de cinco minutos eram suficientes para a frente do solvente progredir esta distância. Após secagem das placas numa "hotte" à temperatura ambiente, a leitura das absorvâncias da luz monocromática a 633 nm era efectuada num densitómetro LKB 2202 (LKB Produkter AB, Suécia), com fonte de luz laser (figura 2). O sinal de saída foi processado por um registador integrador HP3390A (Hewlett-Packard Company, E.U.A.) (figura 2), e as áreas abaixo dos picos correspondentes ao salbutamol nos cromatogramas, usadas para construir uma curva de calibração.

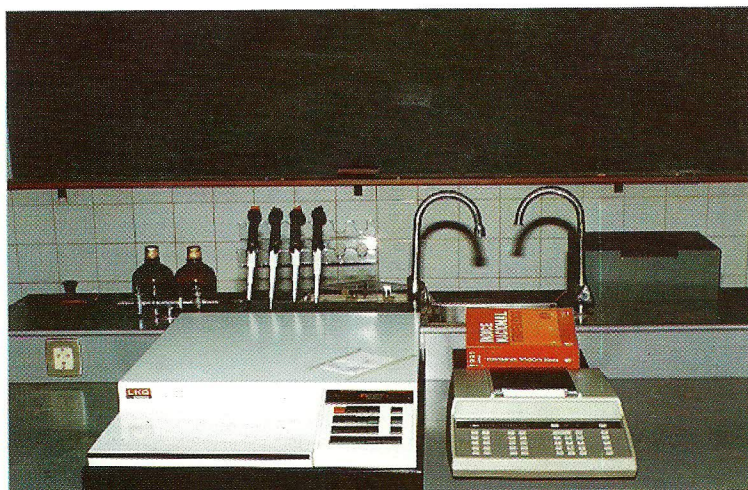


Fig. 2 - Densitómetro laser LKB 2202 (à esquerda) e registador-integrador HP 3390A (à direita)

Resultados

A figura 4 apresenta os picos integrados correspondentes aos cromatogramas para as quatro concentrações de salbutamol presentes no plasma de bovino.

As observações foram feitas em duplicado (excepto para a concentração de 1ng/ml), e as médias tratadas por regressão linear. Na sequência, uma fórmula preliminar para a nossa curva padrão é:

$$Y = 850809 + 201013 * X$$

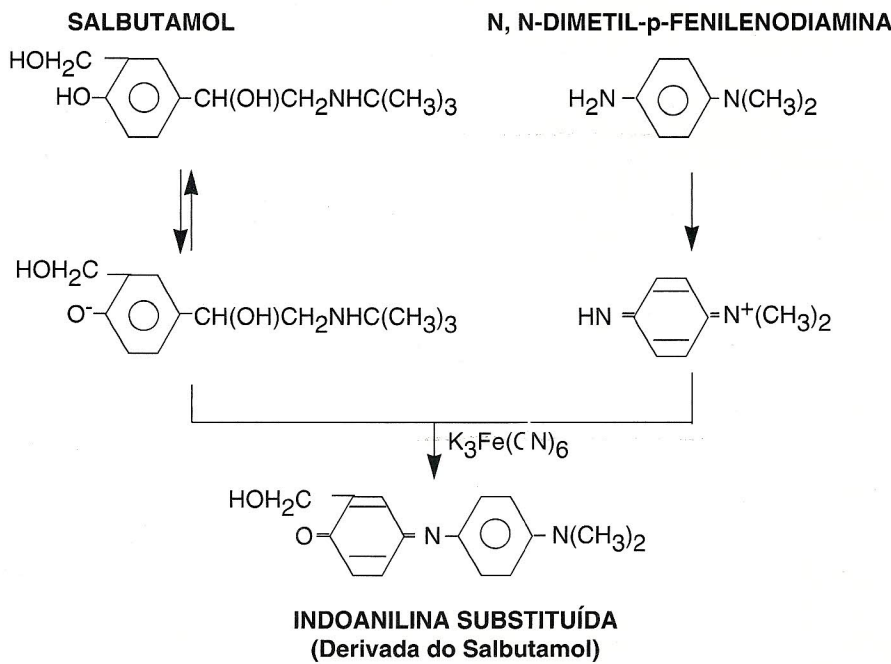
com um coeficiente de correlação linear $r=0.9963$, e probabilidade para a hipótese nula de $H_0: P<0,01$. Esta regressão é a das áreas absolutas do picos, sobre as várias concentrações utilizadas expressas em ng/ml. Os picos sobre os cromatogramas apresentam um perfil perfeito, devido à elevada absorvibilidade molar do composto cromóforo, e falta de interferência de outras substâncias sobre a absorção da luz laser. Embora o cromóforo também absorva luz ultra-violeta, um grande nível de interferência de vários componentes seria então passível de ser notado sobre os cromatogramas (vide resultados na referência 1).

Discussão

A técnica que foi implementada na Secção de Bioquímica da FMV, UTL, tem uma sensibilidade de 1 ng/ml, com o plasma de um animal de talho. A linearidade da resposta obtida, em função das concentrações ensaiadas, é patente. O tempo de cromatografia é extremamente curto (muito inferior a cinco minutos), quando comparado com os tempos para a separação analítica em HPLC ou GC-MS. Por outro lado, uma única placa de HPTLC permite processar até vinte amostras simultaneamente, naquele breve intervalo de tempo. As próprias leituras densitométricas são extremamente rápidas, na medida em que a sonda laser percorre 3,5 cm, ou menos (mas sempre uma distância fixa), sobre cada amostra, e o densitómetro LKB 2202 memoriza programas ajustados pelo operador, podendo processar as leituras e integração de dados automaticamente.

Para o processamento dos seus dados de cromatografia os autores do relatório inicial, aplicado ao plasma humano, usaram da medição da altura dos picos, correspondentes ao salbutamol, sobre os cromatogramas (1). Porém, no nosso caso trabalhamos com as áreas abaixo dos picos de interesse, sendo seguramente este um método mais exacto de efectuar os cálculos. O facto de trabalharmos com radiação laser, monocromática, de intensa energia, na região vermelha do espectro luminoso, permite evitar interferências secundárias sobre os cromatogramas, e consequentemente estes apresentam um perfil ideal (figura 4).

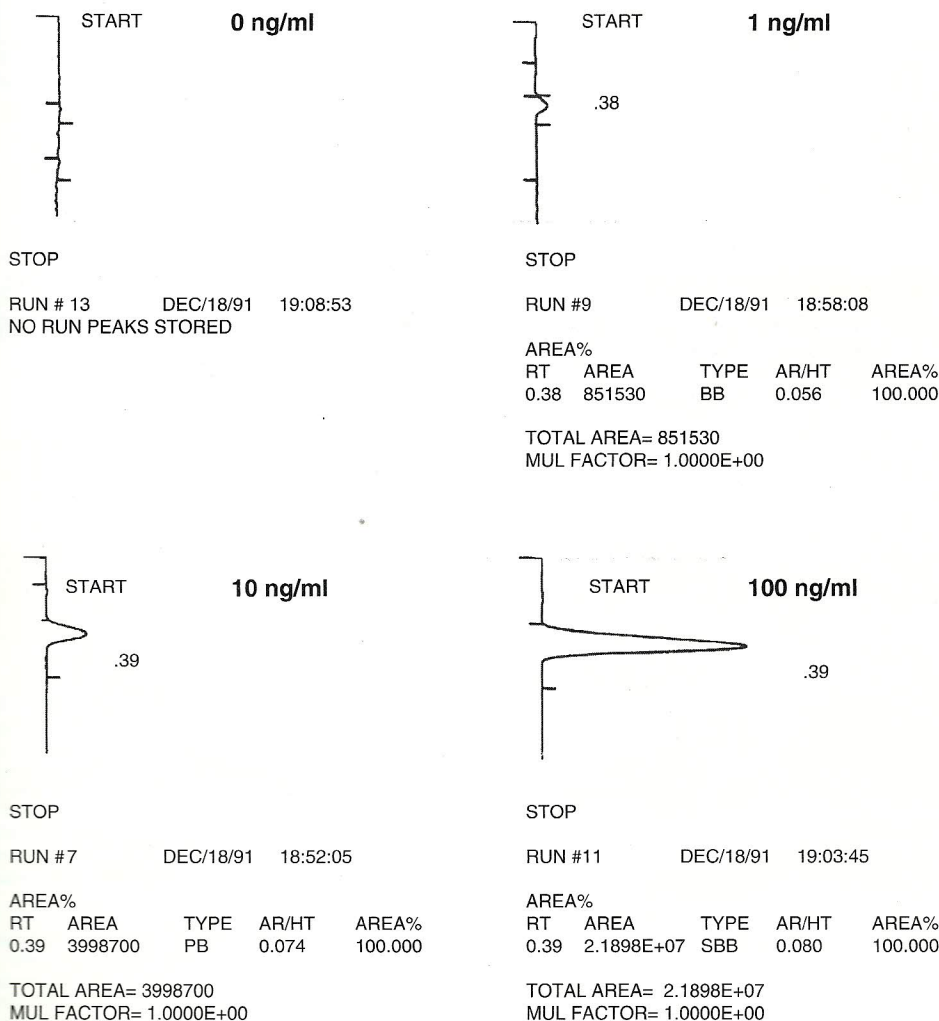
Fig. 3 - Reacção de Derivatização proposta por Colthup e Colaboradores (1).



Num estudo comparativo entre a HPTLC e a GC-MS efectuado quando este tipo de tecnologia foi primeiramente desenvolvido, constatou-se que a precisão (coeficientes de variação inter e intra ensaios) dos dois métodos era sobreponível (1). Mas com a concentração mais baixa (1 ng/ml) ambos os coeficientes têm tendência a aumentar. Todavia, é de notar que a amplitude máxima para a absorvência, ajustada no densitómetro, aparentemente pode influenciar desfavoravelmente a precisão para valores de absorvência superiores a 2,0 por causa da natureza logarítmica da escala. Por outro lado, as recuperações de salbutamol obtidas com a análise por HPTLC e densitometria laser, foram numericamente superiores na maioria das observações relatadas no primeiro desenvolvimento deste tipo de tecnologia, quando comparadas com as de GC-MS. Não há dúvida que qualquer espectro de massa, com múltiplas espécies iónicas fragmentadas de carga +1, é muito complexo para ser processado, principalmente se surgirem espécies de fragmentação do composto derivatizado. Talvez que este último aspecto tenha prejudicado de algum modo as recuperações com o método de GC-MS. A reacção de derivatização ilustrada na figura 3 é específica para o salbutamol na forma de base livre, e qualquer dos seus catabolitos sulfatados ou glucoronocjugados não podem interferir nesta reacção (1). Por outro lado, não está ainda definitivamente esclarecido se reacções como esta, ou nela baseadas, poderão ser usadas com outros compostos β 2-agonistas empregues ilegalmente. A obtenção dum cromóforo adequado será sempre o problema principal.

O processamento inicial das amostras recorre à adsorção em fase reversa. Este é o processo cromatográfico actualmente mais específico para separar analitos a partir de matrizes biológicas extremamente complexas (3). Adicionalmente, é um processo extremamente simples e prático. As mini-colunas estão disponíveis no mercado pré-empacotadas, e a sua activação, e a eluição do analito, são obtidas com solventes a baixa pressão.

Fig. 4 - Cromatogramas de Amostras de Plasma de Bovinos Adicionadas de Salbutamol nas Concentrações Finais de 0, 1, 10 e 100 ng/ml.



Conclusão

Em conclusão, esta técnica de separação por HPTLC associada à quantificação por densitometria laser, é fidedigna, exacta e precisa. No aspecto de instrumentação apenas requer aparelhagem pouco dispendiosa e de fácil manutenção. As características de rapidez do processo de extracção dos analitos das amostras, separação cromatográfica muito célere, e leitura densitométrica fácil, com possibilidade de integração dos cromatogramas, tornam toda a técnica extremamente competitiva. Sublinhamos que é muito desejável estender este género de tecnologia para a detecção e quantificação de outros agonistas β_2 -adrenérgicos.

Bibliografia

(1) Colthup, P.V.; Dallas, F.A.A.; Saynor, D.A.; Carey, P.F.; Skidmore, L.F.; Martin, L.E.; Wilson, K. (1985). Determination of salbutamol in human plasma and urine by high-performance thin-layer chromatography. *Journal of Chromatography Biomedical Applications*. 345, 11-118.

(2) Doyle, C. (1991). Dutch manufacturer at centre of new clenbuterol scandal. *Animal Pharm*, 236, 1-2.

(3) Zief, M.; Kiser, R. (1988). *Solid Phase Extraction for Sample Preparation*. J.T. Baker, Inc. Phillipsburg, Nova Jérsei.

Agradecimentos

Este trabalho tem recebido o patrocínio do Centro de Farmacologia e Toxicologia Veterinária do Instituto Nacional de Investigação Científica na Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Técnica de Lisboa. Ao Professor Doutor Alfredo Jorge Silva um sincero agradecimento pelo grande encorajamento à realização deste trabalho. À Glaxo Farmacêutica Portuguesa agradecemos a generosa oferta de salbutamol.

José H.R. Dias Correia é

Professor Auxiliar da Secção de Bioquímica da FMV, UTL. Licenciado em Medicina Veterinária pela FMV, UTL, em 1982; Diplomado em Produção Animal pelo IAMZ, Espanha, em 1983; Doutorado em Ciências Veterinárias pela FMV, UTL, em 1989.

José A. Mestre Prates é

Assistente Estagiário da Secção de Bioquímica da FMV, UTL. Licenciado em Farmácia pela FFUL, UL, em 1989.



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
GABINETE DO SECRETÁRIO DE ESTADO
DO ENSINO SUPERIOR

Assunto: Pedido de informação para efeitos curriculares do Prof. Doutor José H.R. Dias Correia

A colaboração que o Doutor José Dias Correia prestou, numa linha de investigação própria e por si conduzida no âmbito do Centro de Farmacologia e Toxicologia Veterinária do então Instituto Nacional de Investigação Científica (ex-INIC), desenvolveu-se com total empenhamento e proficiência, tendo demonstrado em todos os momentos um grande empenhamento e entrega, com demonstração enequívoca da sua capacidade para desenvolver um projecto de investigação de forma autónoma.

A. Jorge Silva


(Prof. Catedrático)