

## Determination of plasma salbutamol concentrations after nebulization in a pediatric emergency department

### *Determinação das concentrações plasmáticas de salbutamol pós-nebulização em serviço de emergência pediátrica*

Eloni T. Rotta<sup>1</sup>, Sérgio L. Amantéa<sup>2</sup>, Pedro E. Froehlich<sup>3</sup>, Adriana Becker<sup>4</sup>

#### Resumo

**Objetivos:** Validar parcialmente a metodologia para determinação do salbutamol em plasma humano por cromatografia líquida de alta eficiência (detecção por fluorescência). Analisar as concentrações plasmáticas de salbutamol em um grupo de pacientes pediátricos com indicação de nebulizações em sala de emergência.

**Método:** Estudo transversal, analítico, prospectivo, do tipo série de casos. Foram selecionados consecutivamente 15 pacientes com idade entre 12 e 37 meses, com diagnóstico de crise aguda de asma, atendidos no Serviço de Emergência Pediátrica do Hospital da Criança Santo Antônio – Complexo Hospitalar Santa Casa, Porto Alegre, Brasil. Os pacientes foram tratados conforme a rotina da unidade para manejo de crise aguda de asma: nebulização (fluxo 6-8 L/min) com salbutamol (0,15 mg/kg) diluído em 4 mL de NaCl 0,9%. A nebulização era administrada seqüencialmente, em intervalos de 20 minutos, por três vezes. Concomitantemente às nebulizações, todos os pacientes recebiam prednisolona via oral (1 mg/kg).

**Resultados:** As concentrações plasmáticas evidenciaram grande variabilidade em portadores de crise aguda de asma que receberam três nebulizações com salbutamol (0,15 mg/kg). Níveis plasmáticos médios foram de  $12,09 \pm 10,8$  ng/mL, com mediana de 8,9 (IQ25-75% 2,75-17,65) e coeficiente de variação da amostra de 92,4%.

**Conclusões:** As concentrações plasmáticas após inalação de salbutamol apresentam grande dispersão na população pediátrica, a exemplo de outros estudos. As possíveis causas e implicações relacionadas ao achado permanecem alvo de controvérsias e avaliações complementares.

*J Pediatr (Rio J). 2007;83(5):481-484: Concentrações, plasmáticas, salbutamol.*

#### Abstract

**Objectives:** To partially validate the methodology for determining salbutamol in human plasma through high-efficiency liquid chromatography and fluorescence detection. To analyze plasma salbutamol concentrations in a group of pediatric patients with indication for nebulization in the emergency room.

**Method:** Analytical, prospective cross-sectional case series. Fifteen patients aged 12 to 37 months with a diagnosis of acute asthma crisis were selected at the Pediatric Emergency Service at Hospital da Criança Santo Antônio – Complexo Hospitalar Santa Casa, Porto Alegre, Brazil. The patients were treated following the unit's routine for the management of acute asthma crises: nebulization with salbutamol (flow rate of 6-8 L/min) (0.15 mg/kg) suspended in 4 mL of 0.9% saline solution. Nebulization was administered sequentially, three times, at 20 minute intervals. All patients were given prednisolone orally (1 mg/kg) concurrently with the nebulizations.

**Results:** Plasma concentrations exhibited great variability in acute asthma crisis patients given three nebulizations of salbutamol (0.15 mg/kg). The mean level in plasma was  $12.09 \pm 10.8$  ng/mL, with a median of 8.9 ng/mL (IQ25-75% 2.75-17.65). The sample's coefficient of variation was 92.4%.

**Conclusions:** Post-inhalation plasma salbutamol concentrations exhibit great variation in the pediatric population, as seen in other studies. The possible causes and implications of this finding remain the subject of disagreements and of further assessments.

*J Pediatr (Rio J). 2007;83(5):481-484: Plasma concentration, salbutamol.*

#### Introdução

Os  $\beta_2$ -agonistas de curta duração, administrados por via inalatória, são o tratamento de escolha para crise aguda de

asma na população pediátrica. Tal opção é justificada não só por sua eficácia clínica, mas também por uma menor ocorrência de efeitos adversos, quando comparada a outras rotas de

1. Farmacêutica, Serviço de Farmácia, Hospital São Lucas, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS), Porto Alegre, RS.

2. Professor adjunto, Departamento de Pediatria, Fundação Faculdade Federal de Ciências Médicas de Porto Alegre (FFFCMPA), Porto Alegre, RS. Chefe, Serviço de Emergência Pediátrica, Hospital da Criança Santo Antônio (HCSA), Complexo Hospitalar Santa Casa, Porto Alegre, RS.

3. Professor associado, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS.

4. Médica assistente, Serviço de Emergência Pediátrica, HCSA, Complexo Hospitalar Santa Casa, Porto Alegre, RS.

**Como citar este artigo:** Rotta ET, Amantéa SL, Froehlich PE, Becker A. Determining salbutamol plasma concentrations after nebulization in Pediatric Emergency Department. *J Pediatr (Rio J)*. 2007;83(5):481-484.

Artigo submetido em 04.04.07, aceito em 14.05.07.

doi 10.2223/JPED.1689

administração<sup>1-3</sup>. Dentre os  $\beta_2$ -agonistas (terbutalina, salbutamol e fenoterol), o salbutamol tem sido a opção terapêutica mais utilizada para tratamento de crises agudas de asma<sup>4</sup>. Embora a farmacodinâmica do salbutamol seja bem documentada, informações sobre sua farmacocinética são limitadas devido à dificuldade de se mensurar a droga em concentrações terapêuticas. Sendo assim, poucos estudos têm sido delineados procurando determinar os níveis plasmáticos da droga, principalmente em crianças<sup>5</sup>.

Atualmente, a cromatografia líquida é um dos métodos mais utilizados para análise de drogas em matrizes biológicas. Variantes técnicas têm sido descritas procurando estabelecer um padrão para determinação do salbutamol em plasma e urina<sup>1,2</sup>; no entanto, o limite de detecção de alguns desses métodos não é adequado, principalmente nas menores concentrações plasmáticas (ng/mL), como o que ocorre no salbutamol administrado por via inalatória<sup>1</sup>.

O objetivo do estudo é descrever o processo de validação parcial de um método de cromatografia de alta eficiência (CLAE) com detecção por fluorescência, proposto por Hutchings et al.<sup>6</sup>, adaptado a condições locais. A partir dessas adequações bioanalíticas, procuramos determinar as concentrações plasmáticas de salbutamol em uma série de pacientes com indicação terapêutica de receberem a medicação por via inalatória.

## Métodos

### **Validação parcial da metodologia (CLAE com detecção por fluorescência)**

#### *Equipamento e reagentes*

Cromatógrafo líquido, modelo Shimadzu (bomba LC-10AD, coluna analítica Phenomenex®-Gemini- C18-5 $\mu$ -150 x 4,60 mm, pré-coluna C18, detector fluorimétrico Shimadzu-RF551) e um processador de dados Shimadzu CBM 10A. Fase móvel (FM) composta de 3% de acetonitrila, 0,5% de ácido ortofosfórico 85% e 96,5% de água ultrapura.

O salbutamol foi detectado com excitação de 275 nm e emissão de 309 nm (fluxo de 0,8 mL/min).

Para a validação parcial do método, foi utilizado salbutamol padrão secundário validado. Para extração, utilizamos: Di(2-etilhexil)fosfato (DEHP) (Sigma®) e clorofórmio (Merck®). O tampão fosfato (pH = 7,2) foi utilizado com uma força de 0,42 M. A FM utilizou acetonitrila (Vetec®) e ácido ortofosfórico (Merck®).

#### *Curva de calibração*

Para validação parcial da técnica, foi necessária a determinação de uma curva de calibração, com diferentes diluições do fármaco a serem adicionadas em plasma humano (amostra padrão). As concentrações utilizadas para determinação da curva foram: 3,125; 6,25; 12,5; 25 e 50 ng/mL.

Para desenvolvimento da fase analítica, o salbutamol foi extraído por processo de pareamento iônico. Este consistiu

em colocar cada amostra padrão em diferentes tubos de centrífuga contendo 200  $\mu$ L de tampão fosfato (pH = 7,2), extraído com a adição de 6 mL de uma solução de DEHP (0,1 M em clorofórmio), através de agitação (2 minutos em vortex) e centrifugação por 10 minutos. Desses tubos, foram coletadas as fases clorofórmio e transferidas para outros tubos de centrífuga contendo 500  $\mu$ L de ácido clorídrico 0,5 M. O salbutamol foi extraído por agitação (2 minutos com vortex) e 5 minutos de centrifugação. A fase ácida foi coletada, e uma alíquota de 50  $\mu$ L foi injetada no CLAE para a determinação do salbutamol.

#### *Validação parcial da metodologia*

O objetivo de uma validação analítica é demonstrar que o método é apropriado para a determinação quantitativa de um fármaco ou outra substância<sup>7,8</sup>. As alterações realizadas na técnica original ocorreram basicamente no sistema cromatográfico (modelo de equipamento e de coluna analítica, fluxo, FM e nos intervalos de excitação e emissão do sistema de detecção).

Para a validação parcial do método bioanalítico, foram determinadas suas características de seletividade, linearidade, exatidão e precisão<sup>7,8</sup>.

O salbutamol foi isolado do plasma com um tempo de retenção de 7,8 minutos e, nesse intervalo, não sofreu interferência com outros picos presentes no plasma controle (Figura 1). Tal característica documenta a seletividade do método.

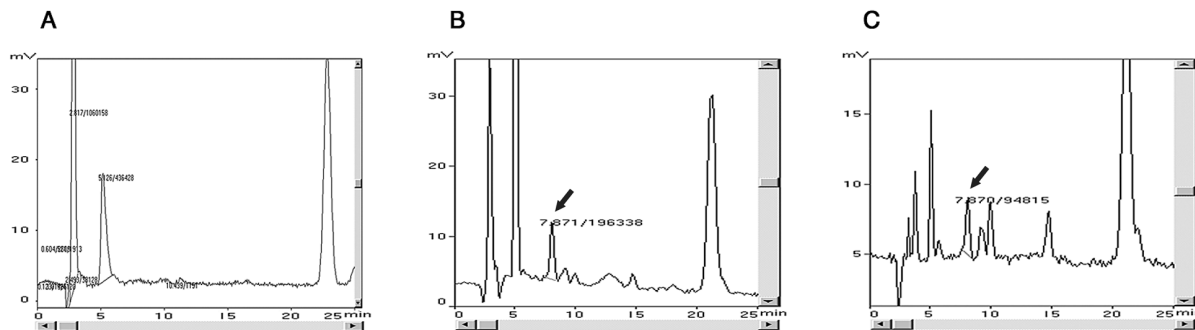
A linearidade do método foi demonstrada pela construção de uma curva de calibração com as concentrações no intervalo de 3,125 a 50 ng/mL. A curva forneceu um gráfico de área *versus* concentração, com respectivas equações da reta e coeficiente de determinação ( $R^2$ ), assim como suas inclinações e interceptos.

Os  $R^2$  obtidos foram iguais ou superiores a 0,98, indicando a linearidade entre a razão da área do salbutamol e a concentração teórica deste<sup>7,8</sup>.

A linearidade do método analítico foi confirmada pela regressão linear através do método estatístico ANOVA. Os resultados evidenciaram não haver desvio significativo da linearidade ( $p \leq 0,05$ ).

A precisão foi avaliada pela repetibilidade (precisão interdia) e pela reprodutibilidade (precisão intradia) do método, empregando-se duas amostras definidas como controle de qualidade nas concentrações de 7,5 e 20 ng/mL. Os desvios padrão relativos (DPR) que caracterizam a precisão do método não excederam 15%<sup>7,8</sup>.

A exatidão para essas concentrações foi avaliada pela relação entre as concentrações médias determinadas e as concentrações teóricas correspondentes. A legislação preconiza que a variação entre o valor real e o teórico das amostras deve ser em torno de 15%. Para a concentração de 7,5 ng/mL, a



**Figura 1** - Cromatogramas obtidos de plasma: A) branco; B) amostra padrão contendo 25 ng/mL de salbutamol; C) amostra de plasma de paciente

variação encontrada foi de 85,4 a 113,4%; para a concentração de 20 ng/mL, foi de 104,5 a 114,6%, demonstrando a exatidão do método<sup>7,8</sup>.

**Desenho do estudo**

Delineou-se estudo transversal, analítico, prospectivo do tipo série de casos. Foram selecionados consecutivamente, no período de fevereiro a maio de 2006, 15 pacientes com faixa etária entre 12 e 37 meses de idade, com diagnóstico de crise aguda de asma, atendidos no Serviço de Emergência Pediátrica do Hospital da Criança Santo Antônio – Complexo Hospitalar Santa Casa, Porto Alegre, Brasil. O diagnóstico clínico foi estabelecido pela equipe médica da unidade, sem envolvimento dos pesquisadores.

Os pacientes foram tratados conforme a rotina da unidade para manejo de crise aguda de asma: nebulização (fluxo 6-8 L/min) com salbutamol (0,15 mg/kg) diluídos em 4 mL de NaCl 0,9%. A nebulização era administrada seqüencialmente, em intervalos de 20 minutos, por três vezes. Concomitantemente às nebulizações, todos os pacientes recebiam prednisolona via oral (1 mg/kg).

Foram excluídos da amostra pacientes que tivessem recebido qualquer tipo de droga  $\beta_2$ - agonista nas 12 horas que antecediam ao atendimento.

Após 10 minutos do término do tratamento, coletava-se uma amostra sanguínea de todos os pacientes para determinação do salbutamol. O material era imediatamente encaminhado para o laboratório, seu plasma separado por centrifugação, e o material estocado e congelado a -80 °C para posterior análise.

Todos os pais e/ou responsáveis firmaram consentimento informado, e o estudo teve aprovação do Comitê de Ética e Pesquisa da Instituição (nº 763/03).

Os resultados obtidos foram expressos por médias e seus respectivos desvios padrão, nos casos de assimetria por mediana e percentis 25-75% (IQ25-75%). O coeficiente de

variação (CV) da amostra foi calculado a partir da média e desvio padrão. Um CV superior a 30% caracterizaria a amostra como muito dispersa<sup>9</sup>.

**Resultados**

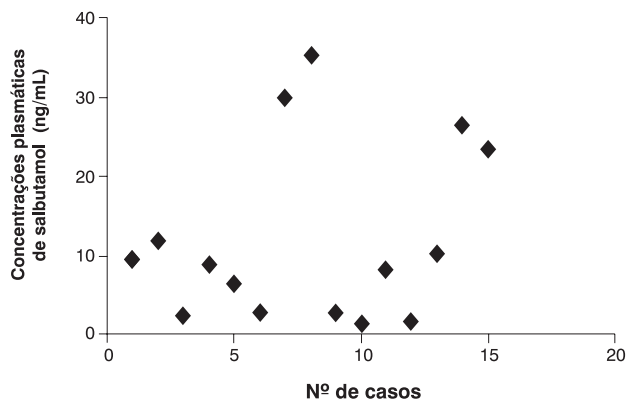
A faixa etária média dos 15 pacientes atendidos foi de 22,4 meses ( $\pm 6,8$  meses), com mediana de 21 meses (IQ25-75% 19-25).

Na Figura 2, podemos observar a distribuição das concentrações de salbutamol (ng/mL) encontradas em nossa série. Os níveis plasmáticos médios foram de  $12,09 \pm 10,8$  ng/mL, com um desvio padrão de 11,18 e mediana de 8,9 (IQ25-75% 2,75-17,65).

Ao analisarmos o CV de Pearson encontrado (92,4%), constatamos forte dispersão nos níveis plasmáticos de salbutamol mensurados<sup>9,10</sup>.

**Discussão**

Os resultados da validação parcial demonstraram que as especificações bioanalíticas foram atendidas e que o método



**Figura 2** - Concentrações plasmáticas de salbutamol pós-atendimento inicial de crise asmática

pode ser utilizado com segurança na quantificação de pequenas concentrações de salbutamol em plasma humano. Outras metodologias têm sido descritas, introduzindo modificações no processo de extração<sup>11</sup>. Pela ausência de picos interferentes, tal alteração não se justificou em nossa amostra. O rígido critério de elegibilidade por nós estabelecidos, excluindo a utilização de outras medicações associadas, pode ter contribuído para tal achado.

Ao analisarmos as concentrações obtidas pós-nebulização, observamos uma grande variabilidade individual, com concentrações oscilando entre 1,6 e 35,3 ng/mL, com elevado CV. Tal fato é de extrema importância, visto que todos os pacientes selecionados não recebiam qualquer outra droga  $\beta_2$ -agonista há pelo menos 12 horas e receberam as mesmas doses de salbutamol, ajustadas em função do peso corporal.

Respostas clínicas favoráveis têm sido descritas com concentrações de salbutamol oscilando entre 20-40 ng/mL<sup>12</sup>. Entretanto, concentrações plasmáticas variáveis têm sido descritas na dependência de doses administradas, com respostas igualmente efetivas. Utilizando doses consideradas padronizadas (0,15 mg/kg administradas em intervalos de 20 minutos), Schuh et al.<sup>13</sup> encontraram concentrações de 4,4-16 ng/mL (média de 9,4 ng/mL), ao passo que doses mais elevadas resultaram em concentrações de 8,9-40 ng/mL (média de 24 ng/mL). Cabe ressaltar que tais pacientes apresentavam faixa etária mais elevada (5-17 anos), o que agrega potencial fator de confusão para comparação dos achados.

Em função de tamanha variabilidade, é possível inferir que outros fatores devam interferir nas concentrações plasmáticas do salbutamol inalatório na população pediátrica. Nossa população apresenta dados com grande variabilidade, com mediana de 8,9 (IQ25-75% 2,75-17,65 ng/mL). Tal achado poderia se justificar por dados que apontam para uma menor aceitação e maior dificuldade técnica de se administrar medicação inalatória (nebulização) em pacientes de baixa idade<sup>14,15</sup>. Nosso pequeno número amostral não nos permitiu identificar individualmente fatores que pudessem estar associados à variabilidade encontrada, o que se constitui em uma limitação do estudo.

As concentrações plasmáticas após inalação de salbutamol apresentam grande dispersão na população pediátrica, a exemplo de outros estudos. As possíveis causas e implicações relacionadas ao achado permanecem alvo de controvérsias e merecedoras de avaliações complementares direcionadas para um melhor entendimento da farmacocinética de tal medicação quando administrada por via inalatória.

## Referências

- Grupta RN, Fuller HD, Dolovich MB. [Optimization of a column liquid chromatographic procedure for the determination of plasma salbutamol concentration](#). *J Chromatogr B Biomed Appl*. 1994;654:205-11.
- Le Roux AM, Wium CA, Joubert JR, Van Jaarsveld PP. [Evaluation of a high-performance thin-layer chromatographic technique for the determination of salbutamol serum levels in clinical trials](#). *J Chromatogr*. 1992;581:306-9.
- Amantea SL, Sanchez I, Piva JP, Garcia PC. [Controvérsias no manejo farmacológico da asma aguda infantil](#). *J Pediatr (Rio J)*. 2002;78 Supl 2:S151-60.
- Global Initiative for Asthma (GINA). *Global strategy for asthma management and prevention*. Bethesda (MD): National Institutes of Health. 2002. <http://www.ginasthma.com>. Acesso: 07/12/2006.
- Tan YK, Soldin SJ. [Determination of salbutamol in human serum by reversed-phase high performance liquid chromatography with amperometric detection](#). *J Chromatogr*. 1984;311:311-7.
- Hutchings MJ, Paull JD, Morgan DJ. [Determination of salbutamol in plasma by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection](#). *J Chromatogr*. 1983; 277:423-6.
- Brasil. Resolução – RE nº 899, de 29 de maio de 2003. Dispõe sobre a validação de métodos analíticos. Brasília: Diário Oficial da República Federativa do Brasil; 02 jun 2003.
- The International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use (ICH) (Q2-R1). *Text on validation of analytical procedures methodology*. October 1994. <http://www.ich.org>. Acesso:17/06/2004.
- Datalyzer Spectrum. Coeficiente de variação. <http://www.datalyzer.com.br>. Acesso: 04/05/2007.
- Callegari-Jacques SM. *Bioestatística: princípios e aplicações*. Porto Alegre: Artmed; 2003.
- Koh YM, Saleh MI, Tan SC. [Selective extraction of salbutamol from human plasma with the use of phenylboronic acid](#). *J Chromatogr A*. 2003;987:257-67.
- Browne GJ, Penna AS, Phung X, Soo M. [Randomised trial of intravenous salbutamol in early management of acute severe asthma in children](#). *Lancet*. 1997;349:301-5.
- Schuh S, Reider MJ, Canny G, Pender E, Forbes T, Tan YK, et al. [Nebulized albuterol in acute childhood asthma: comparison of two doses](#). *Pediatrics*. 1990;86:509-13.
- Plouin D, Chapuis FR, Stamm D, Robert J, David L, Chatelain PG, et al. [High-dose albuterol by metered-dose inhaler plus a spacer device versus nebulization in preschool children with recurrent wheezing: a double-blind, randomized equivalence trial](#). *Pediatrics*. 2000;106:311-31.
- Chong Neto HJ, Chong-Silva DC, Marani DM, Kuroda F, Olandosky M, Noronha L. [Diferentes dispositivos inalatórios na crise aguda de asma: um estudo randomizado, duplo-cego e controlado com placebo](#). *J Pediatr (Rio J)*. 2005;81:298-304.

Correspondência:

Sérgio L. Amantéa  
Avenida Iguazu, 463/503  
CEP 90470-430 – Porto Alegre, RS  
Tel.: (51) 3334.0146  
E-mail: samantea@terra.com.br