

# DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO PARA A DETERMINAÇÃO SIMULTÂNEA DE FÁRMACOS ANTINEOPLÁSICOS POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE-UV) EM MATRIZES NÃO BIOLÓGICAS.

LILIANE MARY ALVES VENUTO

Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, UNIFAL-MG. Gabriel Monteiro da Silva, 714, CEP 37130-000, Alfenas, MG.

E-mail: lilianevenuto@yahoo.com.br

Trabalho vencedor do Prêmio Jayme Torres 2008 na categoria "Jovens Farmacêuticos" na Área de atuação Análises Clínicas e Toxicológicas

## INTRODUÇÃO

O termo neoplasia é originário do grego *neo*, que significa novo, e *plasia*, algo formado e é usado como sinônimo para todo o crescimento celular anormal. Esta anomalia da multiplicação celular (malignidade celular) tem como característica principal o crescimento desordenado de células que invadem os tecidos e órgãos, podendo espalhar-se (metástases) para outras regiões do corpo. Dividindo-se rapidamente, estas células tendem a ser muito agressivas e incontroláveis, determinando a formação de tumores (acúmulo de células cancerosas) ou neoplasias malignas (16). Por outro lado, um tumor benigno significa simplesmente uma massa localizada de células que se multiplicam vagarosamente e se assemelham ao seu tecido original, raramente constituindo um risco de morte (12).

Segundo Chu & Sartorelli (2005), a incidência, a distribuição geográfica e o comportamento de tipos específicos de câncer estão relacionados a múltiplos fatores, tais como sexo, idade, raça, predisposição genética e a exposição à carcinógenos ambientais.

Estatisticamente, em pesquisa realizada pela Organização Mundial de Saúde, o câncer é a terceira causa de óbitos no mundo com 12%, matando cerca de 6,0 milhões de pessoas por ano. Atualmente, é a segunda causa de mortes por doença no Brasil estimando-se em 2002, 337.535 casos novos e 122.600 óbitos (3).

O controle do câncer pode ser obtido por meio de detecção precoce e terapêutica cirúrgica e/ou quimioterapia; quando detectadas em sua fase inicial é potencialmente curável, daí a importância da vigilância a saúde para detecção precoce. É importante neste processo identificar as pessoas com risco aumentado de desenvolver

câncer como consequência da exposição a fatores ambientais bem como devido a fatores predisponentes individuais (por exemplo: albinismo e câncer de pele) (16).

Existem três tipos principais de tratamento para o câncer: cirurgia, radioterapia e quimioterapia (8).

A quimioterapia antineoplásica é uma modalidade de tratamento sistêmico que consiste na utilização de agentes químicos, isolados ou em combinação com o objetivo de tratar tumores malignos. Atualmente, a poliquimioterapia (Tabela 1 na página seguinte) é utilizada em substituição ao uso de um único agente antineoplásico, uma vez que possibilita uma melhor resposta do tumor ao tratamento e possui vantagens diversas, tais como: retardo da resistência tumoral e a possibilidade de administração de doses menores decorrentes do sinergismo que ocorre entre os diferentes fármacos, o que diminui a toxicidade celular (22).

O principal objetivo de qualquer esquema empregado no tratamento do câncer é procurar proporcionar uma quantidade de fármaco suficiente às células tumorais por um tempo suficiente para obter uma destruição razoável dessas células e evitar que o tratamento adquira toxicidade (16).

Nove fármacos citostáticos e duas combinações quimioterápicas foram incluídas pela International Agency for the Research on Cancer (IARC) no grupo 1 (ação carcinógena aos seres humanos); doze agentes são classificados como prováveis (Grupo 2A) e nove possíveis (grupo 2B) carcinógenos para humanos. Entre os doze agentes constituintes do grupo 1 encontra-se a ciclofosfamida. Além disso, muitos desses fármacos são teratogênicos e mutagênicos para humanos. Tendo como base o conhecimento científico atual, não se pode ajustar nenhum nível seguro de exposição a tais agentes (12).

**Tabela 1.** Neoplasias malignas responsivas a quimioterapia (6)

Diagnóstico	Tratamento atual de escolha	Outros fármacos valiosos
Carcinoma de mama	(1) Quimioterapia adjuvante ou tamoxifeno após cirurgia de mama primária (2) Poliquimioterapia ou manipulação hormonal para cada recidiva tardia	ciclofosfamida, doxorubicina, vincristina, metotrexato, fluorouracil, paclitaxel, mitoxantrona, prednisona <sup>1</sup> , megestrol, androgênios <sup>1</sup> , aminoglutetimida, trastuzumab
Carcinoma de colo uterino	Radioterapia mais cisplatina (localizado), cisplatina, carboplatina (metastático)	lomustina, ciclofosfamida, doxorubicina, metotrexato, mitomicina, bleomicina, vincristina, interferon, ácido 13-cis-retinóico
Carcinoma de pulmão	Cisplatina mais taxano	metotrexato, vincristina, vimblastina, doxorubicina, mitomicina C
Carcinoma de próstata	Agonista do GnRH mais antagonista dos androgênios	aminoglutetimida, doxorubicina, cisplatina, prednisona <sup>1</sup> , estramustina, fluorouracil, progestinas, suramina <sup>2</sup>
Carcinoma do estômago	fluorouracil mais cisplatina	hidroxiuréia, lomustina
Outros sarcomas	doxorubicina mais decarbazina	metotrexato, dactinomicina, ifosfamida mais mesna, <sup>1</sup> vincristina, vimblastina

<sup>1</sup> Fármaco de suporte, não-oncolítico;

<sup>2</sup> Fármaco em fase de investigação. Tratamento disponível através de pesquisadores qualificados e centros autorizados pelo *National Cancer Institute and Cooperative Oncology Groups*.

A quimioterapia antineoplásica tem como fator limitante a toxicidade dos fármacos em tecidos saudáveis, especialmente os que têm taxa de proliferação rápida, como a medula óssea, epitélio gastrointestinal, folículos pilosos da pele e epitélio germinativo. Por este motivo os efeitos adversos mais frequentes incluem mielossupressão, náusea, vômito, diarreia, alopecia e diminuição da fertilidade. As substâncias químicas antineoplásicas mais efetivas promovem experiências traumáticas para pacientes tratados e com vários sintomas de toxicidade direta. Tais agentes podem ainda promover o aparecimento de câncer secundário após cessado o tratamento quimioterápico, pois muitos são mutagênicos, carcinogênicos e teratogênicos em vários sistemas experimentais em humanos (10) (9) (17) (5).

A ciclofosfamida (CF) é um pró-fármaco e é utilizada no tratamento de diversos tipos de câncer, isolada ou em combinação com outros fármacos antineoplásicos. Este fármaco é ainda considerado como um modelo de indicador de exposição durante o trabalho com fármacos antineoplásicos (24).

A ifosfamida (IF) é um análogo estrutural da CF possuindo atividade alquilante após ativação enzimática. Apesar da ifosfamida apresentar carcinogenicidade em animais, não há evidências desta propriedade em humanos sendo assim classificada pela IARC como constituinte do grupo 3. Entretanto, devido a sua semelhança estrutural com a CF a IF pode ser considerada como um suspeito carcinógeno (27).

A doxorubicina (DOXO) é um antibiótico citotóxico do grupo das antraciclínas, isolado a partir de culturas de *Sreptomycetes peucetius* e, presume-se que este fármaco se ligue a ácidos nucleicos por intercalação específica no

núcleo planar da antraciclina com a dupla hélice do DNA. De acordo com a IARC, os derivados de antraciclínas são provavelmente carcinógenos para humanos, sendo classificado no grupo 2 A isto é, suficientes evidências de carcinogenicidade em animais mas, insuficientes em humanos (28)

Os antimetabólitos disfarçados como construtores de DNA e outros componentes vitais as células impedem que o DNA se replique adequadamente levando à morte celular. (20). A 5-fluoruracila (5-FU) pertencente a classe dos antimetabólitos, age bloqueando a síntese de timidina com ação específica na fase S do ciclo de divisão celular (2).

O metotrexato é um análogo estrutural do ácido fólico utilizado na terapia de tumores e leucemias. Recentemente está sendo utilizado como agente imunossupressor em transplantes de órgãos, tratamento de doenças auto-imunes e na terapia contra asma crônica (23). Atua inibindo a diidrofolato redutase, enzima necessária para a síntese de nucleotídeos e aminoácidos. Assim, reduz a síntese de DNA, inibe a mitose e a proliferação de células de divisão rápida, como são as da epiderme e da medula óssea (15).

É recomendado que alguns destes fármacos sejam monitorados, sob o ponto de vista toxicológico, especialmente aqueles que estão classificados como carcinógenos. Por outro lado, outros fármacos também podem ser monitorizados dependendo da frequência e da dose em que são utilizados (29).

No âmbito ocupacional, durante a fase de preparação dos fármacos algumas operações são particularmente de risco: a abertura da ampola, a extração da agulha do frasco (pode formar aerossol), a expulsão de ar da serin-

ga, a transferência do fármaco de um frasco a outro ou a uma bolsa de infusão por meio da seringa ou agulha e o descarte incorreto do frasco parcialmente utilizado. Na fase de administração do fármaco, a exposição pode ser verificada durante a sua inserção no defluxor e/ou durante a expulsão do ar da seringa, por formação de aerossol ou por contato cutâneo direto (4).

Os fármacos antineoplásicos podem ser absorvidos pela inalação dos aerossóis formados e dispersos no ambiente de trabalho e através da via dérmica, que é considerada uma das principais vias de introdução, pelo contato prolongado com superfícies e/ou indumentárias contaminadas. Tratando-se de fármacos dotados de ação genotóxica, não é possível estabelecer uma relação dose-efeito, porém é notório que a exposição dos trabalhadores, mesmo em baixas doses, é considerada indevida (1).

A contaminação por CF foi detectada em ambientes hospitalares como, por exemplo, em farmácias e em setores que manipulam fármacos antineoplásicos. "Wipe sampling" é uma maneira comum de monitorar superfícies contaminadas. Um grande número de métodos, utilizando "wipe sampling", está sendo utilizado e a CF foi detectada como um contaminante de superfícies em vários locais de trabalho onde esta foi investigada. Os "pads" são também bastante utilizados para a monitorização de exposição. Estes são tecidos semelhantes à gaze colocados sobre e sob as vestimentas, para verificar a possível contaminação de zonas específicas do corpo do trabalhador (24).

A determinação dos fármacos antineoplásicos em diferentes matrizes requer métodos validados principalmente quanto ao limite de detecção e quantificação, já que a exposição, algumas vezes, é a baixas concentrações (26) (4). A maioria dos métodos para a determinação dos antineoplásicos ainda não está validada adequadamente (28). E, ainda, poucos fármacos têm sido monitorados apesar do protocolo de tratamento quimioterápico estar em constante evolução.

Larson, Khazaeli & Dilon (2002) sugerem que o método por cromatografia líquida de alta eficiência pode ser utilizado para a determinação de antineoplásicos em amostras *wipe test*. Paralelo a isto, Larson *et al.* (2003) discutem a existência de numerosos métodos para a detecção e a quantificação de fármacos antineoplásicos, todavia, sendo a maioria destes, capaz de analisar o fármaco isoladamente, sendo reduzido o número de métodos eficientes para a determinação simultânea destes agentes, característica esta importante analiticamente em vista da crescente utilização da terapia combinada para o tratamento do câncer.

Esses mesmos autores desenvolveram um método de determinação simultânea para cinco antineoplásicos (5-FU, CF, IF, DOXO e paclitaxel (taxol)), por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Com eluição gradiente, houve separação cromatográfica e os limites de detecção

(LD) obtidos foram para 5-FU, CF, IF e DOXO de aproximadamente 0,5 µg/mL e para o paclitaxel de 2 µg/mL (13).

Minoia *et al* (1998) determinaram por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrometria de massas (CLAE-MS/MS) e utilizando solução de acetato de etila para limpeza da superfície de trabalho, CF, em filtros de ar, e IF em "wipe sampling", "pads" e luvas. Obtiveram, respectivamente, LD de 2 ng/m<sup>3</sup> de filtros e 1 ng/dm<sup>2</sup> de "wipe sampling" e "pads" e 0,02 µg/ par de luva.

Schumaus *et al.* (2002) analisaram simultaneamente CF e IF em "wipe sampling" por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-MS/MS) utilizando 30 mL de acetato de etila para extração de filtros de ar e obtiveram recuperação de 60 a 100% para os analitos.

McDevitt, Lees & Mcdiarmid (1993) utilizaram solução de metanol: água (40: 60) na extração de CF de filtros de ar e "wipe sampling" e analisando as amostras por CLAE-UV, conseguindo LD de 0,06-03 µg/m<sup>3</sup> em amostras de ar e 0,003-0,025 µg/cm<sup>2</sup> em amostras de superfícies de 100-900 cm<sup>2</sup>.

Na determinação de MTX e 5-FU por CLAE-UV, Ses-sink *et al.* (1992) utilizaram solução de NaOH 0,03 M e obtiveram como LD para a 5-FU um valor de 0,1 ng/cm<sup>3</sup> de "wipe sampling" colocados no chão, 0,04 ng/cm<sup>2</sup> em "wipe sampling" dispostos sobre a superfície de trabalho, 0,3 µg em "wipe sampling" em pisos e embalagens dos fármacos e 0,7 µg/par de luva analisado. Para o MTX obteve-se limites de detecção maiores, de 1,0 ng/cm<sup>2</sup> de "wipe sampling" colocados no piso e 4,0 ng/cm<sup>2</sup> em "wipe sampling" dispostos sobre a superfície de trabalho, 3 µg em "wipe sampling" colocados nas embalagens dos fármacos e 6 µg/par de luva analisado.

Connor *et al.* (1999) também utilizaram solução de NaOH 0,03 M para limpeza de superfície e detecção de CF, IF, por cromatografia gasosa com espectrômetro de massa (CG-MS/MS) obtiveram limite de detecção de 0,1 ng/mL de extrato para os dois analitos e na determinação de 5-FU por CLAE-UV, obteve-se limite de detecção de 20 ng/mL de extrato.

A partir da revisão da literatura foi possível observar que é crescente a utilização de fármacos antineoplásicos na prática clínica e, em terapia combinada entre duas ou mais destas substâncias químicas. Em contrapartida, isto constitui importante risco químico tanto para os pacientes, pois podem levar a uma neoplasia secundária, quanto para o pessoal envolvido no preparo e na administração destas substâncias aos pacientes com câncer.

Assim, este trabalho tem como objetivo desenvolver, otimizar e validar método analítico para a determinação simultânea dos fármacos antineoplásicos doxorubicina, ciclofosfamida, 5-fluoruracila, ifosfamida e metotrexato em matrizes não biológicas (superfícies) visando sua aplicação na avaliação da exposição ocupacional e ambiental a tais agentes.

### 2.1. REAGENTES SOLVENTES E APARELHAGEM

Para o desenvolvimento do método utilizamos padrões dos fármacos, 5-fluoruracila e metotrexato (Aldrich®), doxorubicina (Adriplastina®), ciclofosfamida (Endoxan®) e ifosfamida (Holoxan®). Os padrões foram reconstituídos em metanol numa solução de trabalho na concentração 1g/L, a partir da qual foram preparadas novas concentrações da faixa analítica.

O equipamento analítico utilizado foi o cromatógrafo a líquido da Shimadzu® 10Avp, com detector de UV e DAD, forno com controle de temperatura e injeção automática com loop máximo de 50µL.

Na otimização da técnica cromatográfica testamos diversos reagentes, acetonitrila (ACN), metanol (MeOH) e acetato de etila (grau HPLC), n-hexano (grau resíduo), isopropanol, diclorometano, hidróxido de sódio (NaOH) 0,03M. Fases móveis com diversas contituições e proporções: Água: metanol(MeOH) (80:20), Tampão acetato de amônio 10mM: acetonitrila(ACN): MeOH (70:15:15), Água: MeOH: ACN (70:15:15); (55:15:30); (35:25:40); (35:15:50); (65:15:20); (70:10:20); (35:15:50) com pH variando de 3 a 6. Fluxos isocráticos de 0,5 e 0,7 mL/minuto, e diferentes gradientes de vazão da fase móvel, 0,4 mL/min até 10 min e após 0,9 mL/min, 0,4 mL/min até 13 min e após 1,0 mL/min, 0,5 mL/min até 7 min e após 0,9 mL/min. Colunas cromatográficas da Shim-pak® CLC-ODS(M) (250 mm x 4,6mm, 5µm) e SupelcosilTM LC-18 (150mm x 4,6mm,5µm). Temperatura do forno variando em 35°C, 40°C e a temperatura ambiente. Utilizamos para filtração da superfície de limpeza NaOH 0,03M filtro de solvente aquoso Millipore® GSWPO 1300 (0,22 µm x 13 mm).

### 2.2. MÉTODOS

Desenvolvemos a principio uma técnica de extração líquido-líquido para a extração dos analitos do líquido de limpeza das superfícies, a qual denominamos de matriz. Posteriormente buscando maior concentração dos analitos e diminuições dos custos desenvolvemos a injeção direta da matriz.

Testamos para a extração líquido-líquido dos analitos NaOH 0,03M (líquido de limpeza de superfícies utilizado por Sessink *et al.* (2003) (1992) e Connor *et al.* (1999)) ajustada em pH 3 a 9. Utilizando solventes extratores isolados, acetato de etila, n-Hexano e diclorometano, e misturas de solventes, tampão fosfato 10mM pH 4,0 + acetato de etila (1+5), tampão fosfato 10mM pH 7,0 + acetato de etila (1+5), tampão fosfato 10mM pH 8,0 +

acetato de etila (1+5), acetato de etila: isopropanol (10:1) e (7: 3), como líquido extrator. Após vários testes, a técnica de extração dos cinco analitos otimizada está descrita a seguir:

Em um tubo de extração (15 mL), colocou-se 1 mL de solução NaOH 0,03 M fortificada com CF, DOXO, IF, 5-FU e MTX, na concentração de 20µg/mL e ajustada a pH 4. Adicionou-se 2,5 mL da mistura extratora acetato de etila: isopropanol (7: 3). Em seguida, o tubo foi agitado no vórtex por 2,5 minutos havendo então separação das fases orgânica e inorgânica. A fase orgânica foi então transferida para um bêquer afunilado enquanto a fase aquosa passou por mais um processo de extração adicionando-se a ela, outra alíquota de 2,5 mL de mistura extratora e agitação por 2,5 minutos. No final foi desprezada a fase aquosa. A fase orgânica resultante das extrações foi então levada a secura em N<sub>2</sub>. O resíduo foi ressuspenso em 200 µL de fase móvel e 50 µL foram injetados para análise no cromatógrafo.

Testou-se também a injeção direta da matriz (NaOH 0,003M como líquido de limpeza de superfícies) contaminada com os analitos. Foi avaliado ajuste de pH com HCl 0,1M para 4 e 8, filtração em filtro de solvente aquoso Millipore® GSWPO 1300 (0,22 µm x 13mm) e 50µL foram diretamente injetados no CLAE. Um outro líquido, todavia orgânico, constituído de acetonitrila: metanol (50: 50) foi testado, podendo ser utilizado para a limpeza das superfícies. Como esse já apresentava pH ácido, em torno de 5,5, foi fortificado diretamente com os analitos, seco sob nitrogênio, ressuspenso em fase móvel e injetou-se 50µL no cromatógrafo.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Dentre as condições testadas às consideradas satisfatórias para a técnica de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) foram: comprimento de onda de 195 nm; coluna Shim-Pak® CLC-ODS(M) C18 (250 mm x 4,6mm, 5µm); temperatura ambiente (21°C); fase móvel constituída de água pH 4,0: metanol: acetonitrila (70:13:17) e gradiente de vazão de 0,4 mL/min até 13 min e após 1mL/min obtendo tempo de corrida de 31 min para os cinco analitos.

Para comprovação de que estas foram condições otimizadas para os analitos, aplicou-se os parâmetros de conformidade do sistema (número de pratos teóricos, resolução, assimetria 10% e fator de capacidade) no cromatograma obtido com os cinco analitos nestas condições (Figura 1, Figura 2 e Tabela 2). A seletividade da técnica pode ser comprovada comparando a Figura 2b com a Figura 2a, que representa a injeção de fase móvel onde não se observa picos interferentes no tempo de retenção dos analitos.

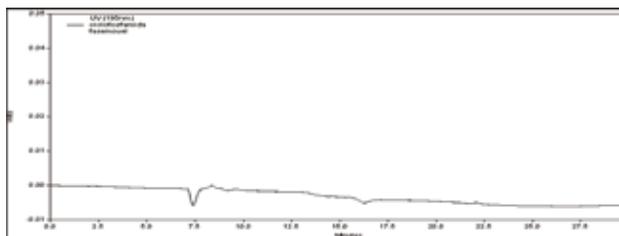


Figura 1. Cromatogramas obtidos a partir da injeção da fase móvel constituída de água pH 4,0: metanol: acetonitrila (70: 13: 17).

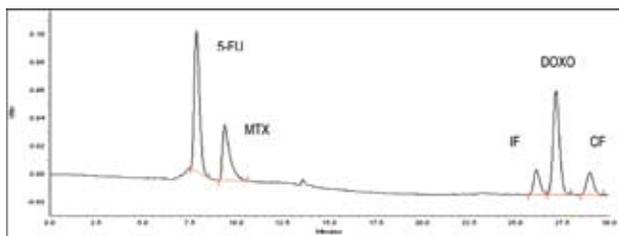


Figura 2. Cromatograma do sistema obtidos com os analitos 5-fluoruracila (5-FU) e metotrexato (MTX) na concentração de 5 µg/mL e ifosfamida (IF), doxorubicina (DOXO), ciclofosfamida (CF) na concentração de 100 µg/mL identificados por CLAE-UV nas condições otimizadas.

O parâmetro resolução foi calculado em relação aos picos à esquerda de cada analito, o que justifica o valor zero para os analitos 5-FU e IF, conforme pode ser observado na tabela 2.

Dentre as condições testadas com a extração líquido-líquido, a que extraiu os cinco analitos na concentração de 20 µg/mL e com resolução dos picos satisfatórios foi a mistura extratora acetato de etila: isopropanol (7: 3) com ajuste de pH da matriz para 4, obtendo-se as seguintes porcentagens de recuperação, em triplicata, para os analitos: CF 103%, DOXO 119%, IF 79%, 5-FU 88% e MTX 112%.

Resultados satisfatórios foram obtidos para a extração líquido-líquido, no entanto esta não foi validada devido ao desenvolvimento simultâneo da técnica de injeção direta que requer menor custo e de rápida execução.

Na técnica de injeção direta testou-se uma matriz aquosa, NaOH, e uma matriz orgânica, acetonitrila: metanol (50: 50), como líquido de limpeza de superfícies. Dentre elas foi obtido melhor resultado de separação dos analitos MTX e 5-FU com a matriz orgânica.

Estudos feitos por Larson *et al.* (2003) para a avaliação da contaminação de superfícies demonstrou que a melhor solução para extração dos analitos foi a mistura de 10% acetonitrila 25% de metanol e 65% de água milli-Q tamponada para pH 6,0. 4 mL desta mistura era adicionada a filtros de ar e extraídas por agitação por 30 minutos, resultando em porcentagem de extração dos analitos de 100% para CF, IF, 5-FU e paclitaxel e 60% para DOXO. McDevitt *et al.* 1999 utilizaram solução de metanol e água (40:60) para extrair seus analitos de filtros de ar. Minoia *et al* (1998) e Schumaus *et al* (2002) utilizam acetato de etila para extração dos analitos de “wipe sampling” e filtros de ar.

Para determinar o efeito das matrizes, aquosa ou orgânica, no desenvolvimento do método comparou-se estatisticamente a curva de calibração dos analitos extraídos de sua matriz (acetonitrila: metanol (50: 50)) com a curva dos analitos puros (secos e ressuspensos em fase móvel). As curvas foram construídas com as médias das áreas das sextuplicatas das 6 concentrações. O teste estatístico utilizado foi o teste “t” (com 95% de confiança) cujo objetivo é testar a igualdade entre duas médias, no caso, a média dos valores dos coeficientes angulares (a) e lineares (b). Conforme pode ser observado na Tabela 3, para os fármacos MTX e 5-FU, os valores de *p* foram menores que 0,05, demonstrando assim diferença estatisticamente significativa entre os coeficientes angulares das retas. Isso evidencia que a natureza da matriz, aquosa ou orgânica, interfere nos resultados obtidos. Em vista da maior possibilidade de concentração dos analitos e obtenção de melhores resultados, em termos de detecção dos analitos, quando comparado a outros métodos com utilização de matrizes aquosas, optou-se por utilizar a matriz orgânica para a determinação simultânea dos analitos e validação do método.

**Tabela 2.** Parâmetros de conformidade do sistema\* obtidos com os analitos 5-fluoruracila (5-FU) e metotrexato (MTX) na concentração de 5 µg/mL e ifosfamida (IF), doxorubicina (DOXO), ciclofosfamida (CF) na concentração de 100 µg/mL identificados por CLAE-UV nas condições otimizadas.

Analitos	Tempo retenção	Pratos teóricos (N)	Resolução (Rs)	Assimetria (T)	Fator de capacidade (K)
5-FU	7,8	3456	0,0	1,4	6,8
MTX	9,4	3388	2,6	2,1	8,4
IF	26,1	27719	0,0	1,1	25,1
DOXO	27,1	28566	1,6	1,1	26,9
CF	28,9	26807	2,7	1,2	27,9

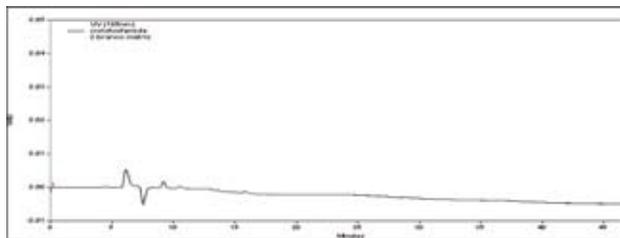
\*Valores de referência: N ≥ 2000; Rs ≥ 2; 0,5 ≤ T ≤ 2; k > 2 (21).

**Tabela 3.** Comparação entre os coeficientes angulares das retas obtidas para os fármacos antineoplásicos diluídos em diferentes matrizes.

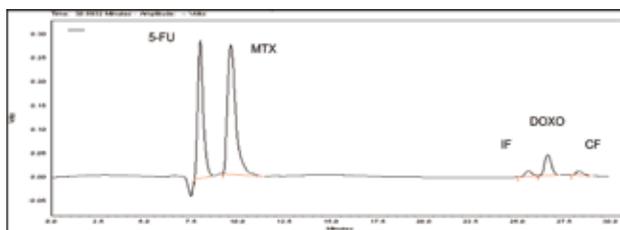
Fármaco	Coefficiente angular Matriz aquosa	Coefficiente angular Matriz orgânica	Valor de p*
metotrexato	838,1	521,66	0,0178
5- fluoruracila	532241	299408	0,0463
doxorubicina	50639	51983	0,8772
ciclofosfamida	10692	11559	0,3482
ifosfamida	10991	12821	0,0885

\* teste t, 95% de confiança

A seletividade da técnica com ausência picos interferentes nos tempos de retenção dos analitos e a resolução dos picos podem ser observado nos cromatogramas representados na Figura 3 e 4 respectivamente. Uma vez que esta foi a condição considerada satisfatória e mais rápida execução que a extração líquido-líquido optou-se por validar o método utilizando-a.



**Figura 3.** Cromatograma do branco de extração da injeção direta da Matriz ACN: MeOH(50:50).

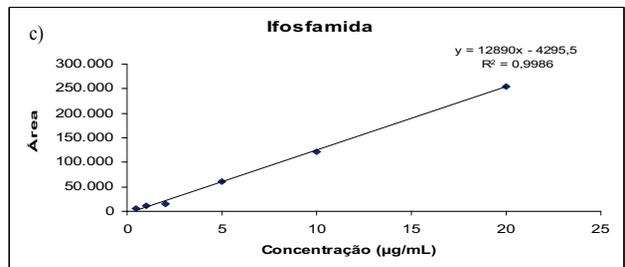
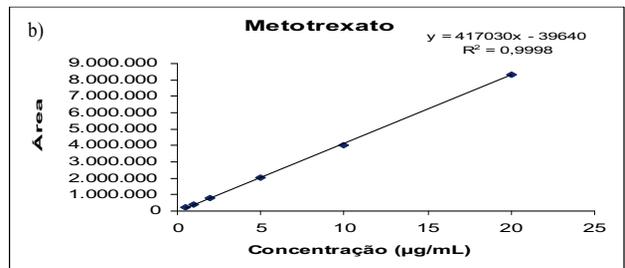
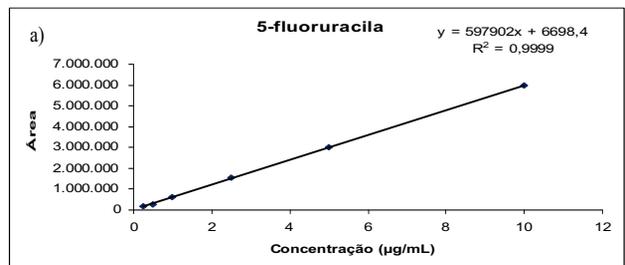


**Figura 4.** Cromatograma da injeção direta da matriz ACN: MeOH(50: 50) obtidos com os analitos 5-fluoruracila (5-FU) e metotrexato (MTX) na concentração de 10 µg/mL e ifosfamida (IF), doxorubicina (DOXO), ciclofosfamida (CF) na concentração de 20 µg/mL identificados por CLAE-UV nas condições otimizadas.

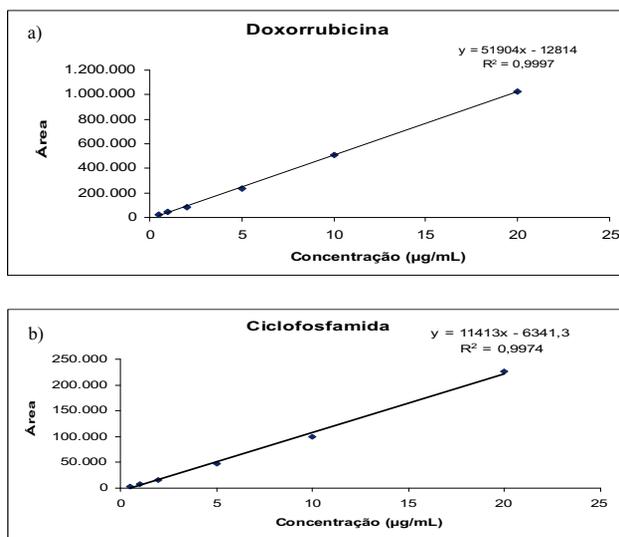
Para o estudo de linearidade foi realizada a contaminação da matriz acetonitrila: metanol (50: 50) com os analitos CF, DOXO, 5-FU, IF e MTX. Devido a maior resposta no detector UV os analitos 5-FU e MTX foram estudados no intervalo de 0,25 a 10 µg/mL e CF, DOXO e IF contemplando o intervalo de 0,5 a 20 µg/mL. Obtivemos para os cinco analitos valores satisfatórios de coeficiente de correlação linear que podem ser observados nas Figuras 5 e 6. Este parâmetro permite uma estimativa da qualidade da curva obtida, pois quanto mais próxi-

mo de 1,0, menor a dispersão do conjunto de pontos experimentais e menor a incerteza dos coeficientes de regressão estimados.

O limite de detecção (LD) e quantificação (LQ) para os analitos estudados foram determinados a partir da curva analítica em que os valores do desvio padrão do branco (DP) e o coeficiente angular da curva (b) são inseridos na fórmula  $LD = (DP \times 3) / b$  calculando-se assim o limite de detecção, e o limite de quantificação, determinado



**Figura 5.** Gráficos de linearidade obtidos com a injeção direta da matriz acetonitrila:metanol (50:50) em sextuplicata para os analitos 5-FU (a) e MTX (b) contemplando o intervalo de 0,25 a 10µg/mL e IF (c), contemplando o intervalo de 0,5 a 20µg/mL.



**Figura 6.** Gráficos de linearidade obtidos com a injeção direta da matriz acetonitrila:metanol (50:50) em sextuplicata para os analitos DOXO (a) e CF (b) contemplando o intervalo de 0,5 a 20µg/mL.

seguindo o mesmo procedimento adotado para o limite de detecção. Sendo que o LQ corresponde a dez vezes o desvio padrão do branco ( $LQ = (DP \times 10) / b$ ). Os resultados obtidos podem ser observados na Tabela 3.

Larson *et al.* (2003) desenvolveu um método de determinação simultânea para cinco antineoplásico (5-FU, CF, IF, DOXO e paclitaxel (taxol)), por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e os limites de detecção obtidos pelos autores foram para 5-FU, CF, IF e DOXO,

de aproximadamente 0,5 µg/mL e para o paclitaxel de 2 µg/mL, com um loop de 500 µL, injetava-se no cromatógrafo uma massa de 0,25 µg para 5-FU, CF, IF e DOXO e 1 µg para o paclitaxel. O método desenvolvido apresentou menores limites de detecção e quantificação, contemplando o intervalo de 0,25 a 10µg/mL para 5-FU e MTX e 0,5 a 20µg/mL para CF, DOXO e IF e com loop de 50 µL foram injetados no cromatógrafo massas dez e vinte vezes menores para 5-FU, MTX e CF, IF e DOXO respectivamente. É de grande importância que métodos de determinação de contaminações os LD e LQ sejam os menores possíveis.

Para determinar a precisão intra-corrida (repetibilidade) foram analisadas a injeção direta da matriz (acetonitrila: metanol) contaminada com os analitos conforme estudo da linearidade. Sendo analisadas as concentrações 1, 5 e 20 µg/mL para CF, IF, e DOXO e 0,5, 2,5 e 10 µg/mL para 5-FU e MTX. Cada concentração foi analisada em sextuplicata. Forneceram coeficientes de variação (CV) inferiores ou igual a 15% para as concentrações baixa, média e alta para quase todos os cinco analitos; e para o limite de quantificação, os CVs foram menores que 20%, como demonstrado pela Tabela 4.

A precisão intercorrida (precisão intermediária) que indica o efeito das variações dentro do laboratório devido a eventos como diferentes dias ou diferentes analistas ou diferentes equipamentos ou uma combinação destes fatores, foi conforme a repetibilidade, em triplicata, em dias diferentes (no decorrer de dezessete dias). Forneceram coeficientes de variação (CV) inferiores ou

**Tabela 3.** Limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) dos analitos ciclofosfamida (CF), doxorubicina (DOXO), 5-fluoruracila (5-FU), Ifosfamida (IF) e metotrexato (MTX) obtidos através da a curva analítica da injeção direta da matriz ACN: MeOH (50:50).

Analitos	CF	DOXO	5-FU	IF	MTX
LD (µg/mL)	0,03	0,07	0,04	0,3	0,4
LQ (µg/mL)	0,1	0,2	0,1	0,9	0,1

**Tabela 4.** Tabela dos coeficientes de variação obtidos através da sextuplicata da injeção direta da matriz acetonitrila:metanol (50:50) para os analitos 5-FU e MTX contemplando o intervalo de 0,25 a 10µg/mL e CF, DOXO e IF contemplando o intervalo de 0,5 a 20µg/mL.

Coeficiente de variação (%CV)						
Concentração (µg/mL)	Analitos			Concentração (µg/mL)	Analitos	
	CF	DOXO	IF		5-FU	MTX
1	13,3	15,4	14,3	0,5	8,6	8,8
5	7,1	4,4	14,6	2,5	2,1	4,3
20	4,3	2,0	5,7	10	3,1	3,2

igual a 15% para as concentrações baixa, média e alta para os cinco analitos; e para o limite de quantificação, os CVs foram menores que 20%, como demonstrado pela Tabela 5.

Foi escolhido o método da recuperação para determinação da exatidão do método devido a dificuldade em se obter materiais de referência certificados. Este método consiste na fortificação de uma quantidade conhecida do analito em estudo na matriz pré-determinada. No nosso caso, a matriz, constituída de acetonitrila: metanol (50:50). Analisou-se a matriz fortificada com concentrações 1, 5 e 20 µg/mL para CF, IF e DOXO e 0,5, 2,5 e 10 µg/mL para 5-FU e MTX (concentrações alta, média e baixa). Foram obtidas assim, a partir da equação da reta das curvas analíticas, as concentrações experimentais que foram então comparadas as concentrações teóricas obtendo-se assim a percentagem de exatidão para cada concentração. Obtendo-se valores entre 85 e 115% para as concentrações altas e médias para todos os analitos, e para as concentrações baixas apenas os analitos ciclofosfamida, ifosfamida apresentaram valores maiores que 120% (Tabela 6).

Os valores de LD, LQ, precisão e exatidão foram considerados satisfatórios tendo em vista o desenvolvimento de um método de determinação simultânea e a maioria dos métodos similares não estarem adequadamente validados.

Foi realizados testes de estabilidade com a técnica de injeção direta da matriz orgânica acetonitrila: metanol (50:50) para os cinco analitos, no auto-injetor, freezer e geladeira.

O teste de estabilidade no auto-injetor foi realizado injetando-se novamente, ao fim de oito horas de trabalho, as primeiras amostras, na concentração de 2 µg/mL, que foram injetadas no início das análises. Este teste foi feito já que todas as amostras são preparadas inicialmente e colocadas no auto-injetor. O teste visa então verificar se as últimas amostras a serem analisadas em um somatório de corridas analíticas de duração média total de dez horas não sofreriam influência em sua constituição devido às condições de armazenagem e temperatura.

Os testes de estabilidade no freezer e na geladeira analisam a estabilidade a longo prazo, ou seja, avalia se as amostras prontas para serem injetadas no CLAE (já ressuspensas em fase móvel) sofrem alterações de suas propriedades quando armazenadas em freezer e em geladeira durante dezessete dias. Após uma corrida analítica são guardados "vials" nas concentrações 5 µg/mL (em triplicata) em freezer e em geladeira. Estes mesmos "vials", após dezessete dias, foram então injetados novamente e a área obtida é comparada a área de dezessete dias atrás. Estas amostras foram armazenadas bem fechadas e com proteção a luz.

**Tabela 5.** Tabela dos coeficientes de variação obtidos com as sextuplicatas da injeção direta da matriz acetonitrila:metanol (50:50) para os analitos 5-FU e MTX contemplando o intervalo de 0,25 a 10µg/mL e CF, DOXO e IF contemplando o intervalo de 0,5 a 20µg/mL.

Coeficiente de variação (%CV)						
Concentração (µg/mL)	Analitos			Concentração (µg/mL)	Analitos	
	CF	DOXO	IF		5-FU	MTX
1	15,3	6,1	9,6	0,5	7,9	7,6
5	3,4	1,8	4,1	2,5	2,1	1,5
20	1,8	1,7	0,8	10	1,0	1,9

**Tabela 6.** Valores de exatidão obtidos através da sextuplicata da injeção direta da matriz acetonitrila:metanol (50:50) para os analitos ciclofosfamida (CF), doxorubicina (DOXO), 5-fluoruracila (5-FU), ifosfamida (IF) e metotrexato (MTX).

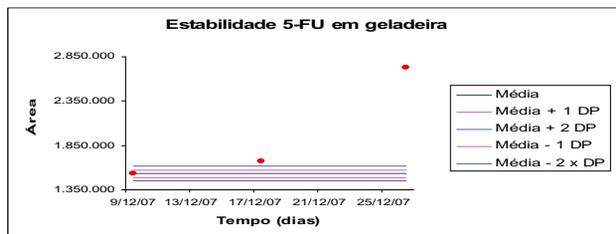
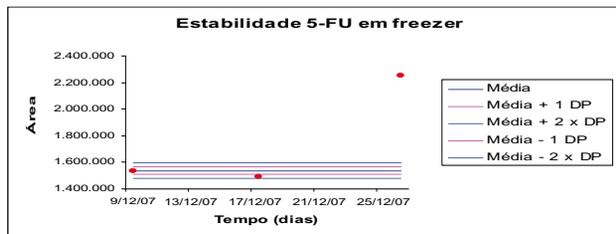
% Exatidão						
Concentração (µg/mL)	Analitos			Concentração (µg/mL)	Analitos	
	CF	DOXO	IF		5-FU	MTX
1	122,1	110,4	126,3	0,5	118,5	97,2
5	95,1	96,8	101,5	2,5	97,5	100,6
20	101,8	100,2	100,7	10	100,3	100,3

Com relação a estabilidade o metotrexato e a ciclofosfamida não se mostraram estáveis após oito dias guardados em freezer e após oito dias guardados em geladeira a 5-fluoruracila e doxorubicina não demonstra-

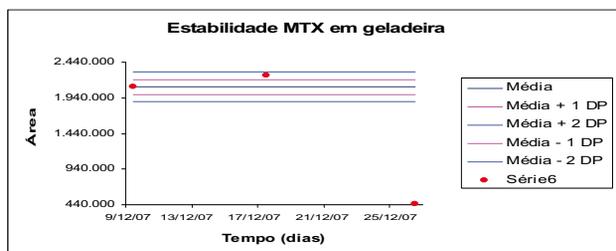
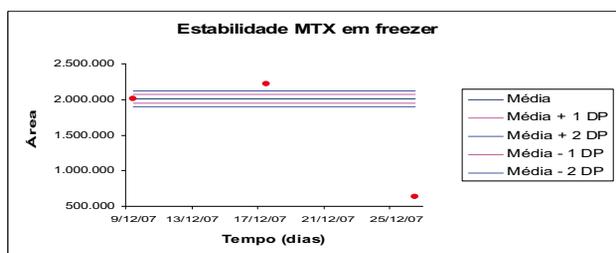
ram estáveis. Apenas a ifosfamida demonstrou-se estável por oito horas em contato com a fase móvel e mantida a temperatura ambiente, conforme observado na Tabela 7 e Figuras 7 a 15.

**Tabela 7.** Dados de estabilidade obtidos com os analitos na concentração de 5µg/mL em freezer, geladeira e de 2µg/mL no auto-injetor.

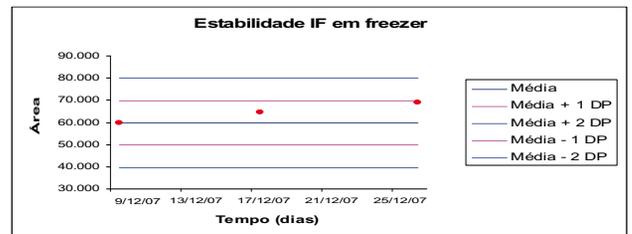
ANALITO	FREEZER	GELADEIRA	OUTO-INJETOR
5-FU	8 dias	< 8 dias	< 8 horas
MTX	< 8 dias	8 dias	< 8 horas
IF	17 dias	17 dias	estável
DOXO	17 dias	< 8 dias	< 8 horas
CF	< 8 dias	8 dias	< 8 horas



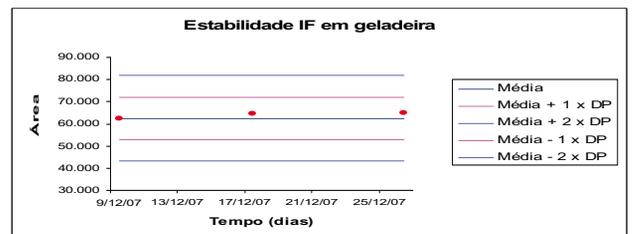
**Figura 7.** Gráficos de estabilidade em freezer e geladeira da 5-fluoruracila na concentração de 5µg/mL.



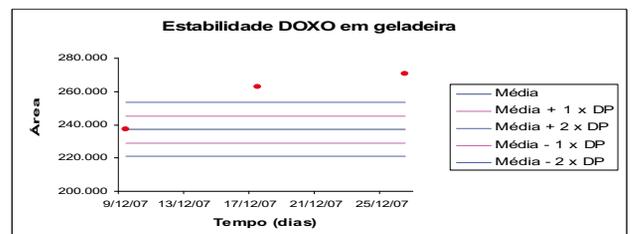
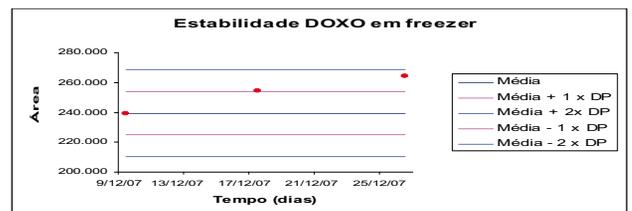
**Figura 8.** Gráficos de estabilidade em freezer e geladeira do metotrexato na concentração de 5µg/mL.



**Figura 9.** Gráficos de estabilidade em freezer da ifosfamida na concentração de 5µg/mL.



**Figura 10.** Gráficos de estabilidade em geladeira da ifosfamida na concentração de 5µg/mL.



**Figura 11.** Gráficos de estabilidade em freezer e geladeira da doxorubicina na concentração de 5µg/mL.

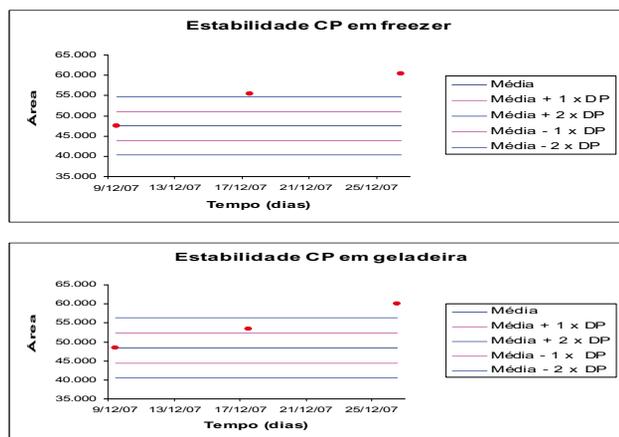


Figura 12. Gráficos de estabilidade em freezer e geladeira da ciclofosfamida na concentração de 5 µg/mL.

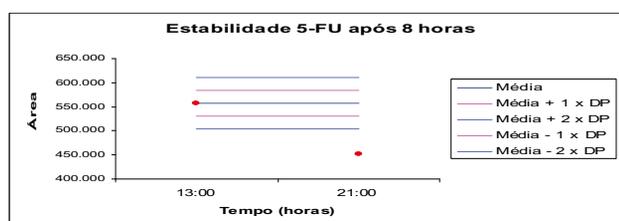


Figura 13. Gráfico de estabilidade no auto-injetor da 5-fluoruracila na concentração de 2 µg/mL, após oito horas de trabalho.

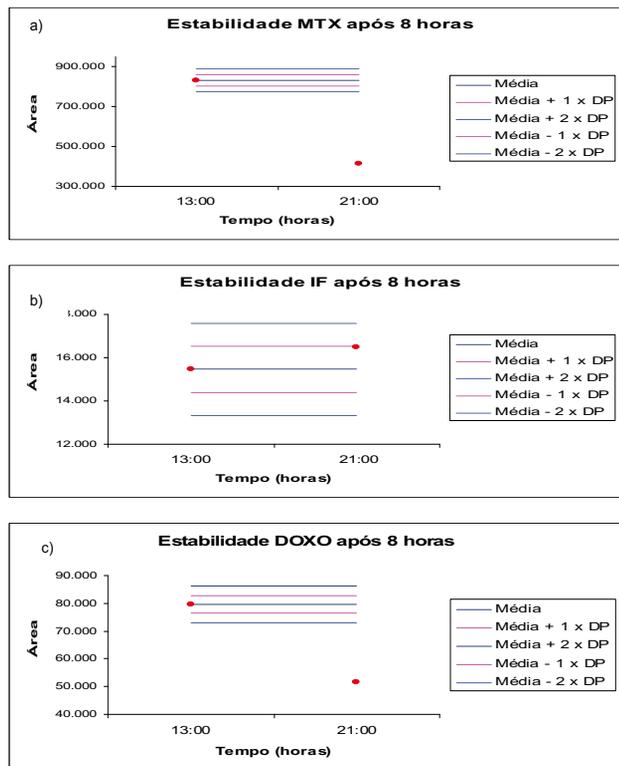


Figura 14. Gráfico de estabilidade no auto-injetor dos analitos metotrexato (a), ifosfamida (b), doxorubicina (c) na concentração de 2 µg/mL, após oito horas de trabalho.

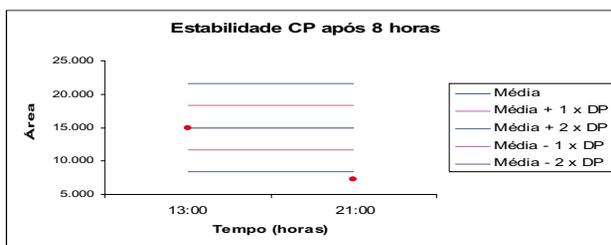


Figura 15. Gráfico de estabilidade no auto-injetor da ciclofosfamida na concentração de 2 µg/mL, após oito horas de trabalho.

Com os testes de estabilidade pode-se concluir que na utilização do método desenvolvido as amostras devem ser analisadas até oito horas após contato com a matriz orgânica acetonitrila: metanol (50;50), se mantidas a temperatura ambiente, ou quando conservadas, esta deve ser preferencialmente em freezer, onde obtivemos maior número de analitos conservados por maior tempo.

## CONCLUSÕES

As condições otimizadas para o método analítico utilizando a cromatografia líquida (CLAE) foram: detecção a 195 nm (UV), coluna Shimpak® CLC-ODS(M) C18 (25 cm x 4,6 mm, 5µm), fase móvel constituída de água pH 4,0: acetonitrila: metanol (70:17:13, v/v), vazão de 0,4 mL/min até 13 minutos e 1 mL/min até o fim da corrida cromatográfica.

Foram obtidos resultados satisfatórios para a determinação simultânea dos fármacos estudados, com a extração líquido-líquido utilizando-se com acetato de etila: isopropanol (7:3), quando se utilizou matriz aquosa (NaOH) ajustada a pH 4,0, para a limpeza das superfícies de trabalho, como bancada.

Quando foi utilizada a matriz orgânica, acetonitrila: metanol (50:50), para a limpeza de superfícies de trabalho, e a injeção direta dessa, sem prévia extração, os resultados também foram satisfatórios, em relação aos parâmetros estudados, podendo esse ser utilizado para aplicações em amostras reais.

O método demonstrou-se linear para a 5-FU e MTX no intervalo de 0,25 a 10 µg/mL e para DOXO, CF e IF no intervalo de 0,5 a 20 µg/mL, com coeficientes de correlação linear superiores a 0,99. A exatidão variou de 85 a 120% para quase todos os analitos. A repetibilidade e a precisão intermediária apresentaram coeficientes de variação inferiores a 15% para a maioria dos analitos.

O método validado é rápido, de fácil execução e baixo custo e pode ser empregado na avaliação da exposição ocupacional e ambiental dos fármacos antineoplásicos, metotrexato, 5-fluoruracila, ifosfamida, doxorubicina e ciclofosfamida.

## AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Alfenas – UNIFAL-MG pela estrutura concedida para a realização deste trabalho.

À Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup>. Isarita Martins, orientadora, pela oportunidade, dedicação, conhecimentos transmitidos e confiança depositada na realização deste trabalho.

Aos professores, alunos e técnica do laboratório de análises toxicológicas da UNIFAL-MG, pela troca de conhecimento, ensinamentos, companheirismo e compreensão durante a elaboração deste trabalho.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALESSIO, L. *et al.* Prevenzione dei rischi da esposizione professionale a chemioterapici antiblastici. Documento di consenso. **Med. Lav., Fidenza**, v.87, n.3, 1996. p.194-200.
- ALMEIDA, J.R.C de – **Farmacêuticos em Oncologia – Uma Nova Realidade**. São Paulo: Atheneu, 2004. p.358.
- ALMEIDA, V. L. *et al.* Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-celular específicos e ciclo-celular não específicos que interagem com o DNA: uma introdução. **Química Nova**, Belo Horizonte, v. 28, n. 1, 2005. p.118-129.
- APOSTOLI, P.; FACCO, P.; ALESSIO, L. **Convenzione ISPEL pelo studio**: Messa a punto di una lista di controllo per valutare l'esposizione degli adetti alla preparazione dei chemioterapici antiblastici. Brescia: Università degli Studi di Brescia, 2001. p.48. [Folheto]
- BERTRAM, J.S. The molecular biology of cancer. **Mol. Aspects Med.**, Oxford, v.21, 2001. p.167-223.
- CHU, E.; SARTORELLI, A. C. Fármacos Antineoplásicos. In: KATZUNG, B. G. **Farmacologia Básica & Clínica Quimioterapia do Câncer**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, c. 55, 2005. p. 751-777.
- CONNOR, T. H. *et al.* Surface contamination with antineoplastic agents in six cancer treatment centers in Canada and the United States. **Am. J. Health.**, Syst Pharm, v.56, n.15, 1999. p.1427.
- FOYE, W. O. *et al.* **Principles of Medicinal Chemistry**. Williams & Wilkins: Baltimore, 1996. p. 822-845.
- FERGUSON, L.R.; PEARSON, A.E. The clinical use of mutagenic anticancer drugs. **Mutat. Res.**, v.355, p.1-12, 1996.
- FORNI, A. Rischi chimici genotossici per il personale ospedaliero. In: CONGRESSO NAZIONALE DI MEDICINA PREVENTIVA DEI LAVORATORI DELLA SANITÀ, **Atti.**, Brescia, v.2, 1994. p.178-192.
- [INCa] Instituto Nacional do Câncer. **O que é câncer?** Disponível em: <<http://www.inca.gov.br/cancer>>. Acesso em: 15 de set. 2008.
- International Agency for Research on Cancer, 2004. **Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans: Pharmaceutical Drugs**. Disponível em: <<http://www.iarc.fr>>. Acesso em: 11 abr. 2007.
- LARSON, R. R.; KHAZAELI, M. B.; DILLON, H. K. Development of an HPLC Method for Simultaneous Analysis of Five Antineoplastic Agents. **Appl. Occup. Envir. Hyg.**, Alabama, v. 18, n. 2, 2003. p.109-119.
- LARSON, R.R.; KHAZAELI, M.B.; DILON, H.K. Monitoring method for surface contamination caused by selected antineoplastic agents. **Am. J. Health-Syst. Pharm.**, Bethesda, v.59, n.3, 2002. p.270-277.
- BRUNTON, L. L.; LAZO, J. S.; PARKER, K. L. **As bases farmacológicas da terapêutica**. Rio de Janeiro: McGraw-Hill Interamericana do Brasil, 2006. p. 1204.
- LIMA, D. R. **Manual de Farmacologia Clínica, Terapêutica e Toxicologia**. São Paulo: Medsi, v.1, 2003. p.516-550.
- MALUF, S.W.; ERDTMANN, B. Follow-up study of the genetic damage in lymphocytes of pharmacists and nurses handling antineoplastic drug evaluated by cytokinesis-block micronuclei analysis and single cell gel electrophoresis assay. **Mutat. Res.**, Amsterdam, v.471, 2000. p.21-27.
- MCDEVITT, J. J.; LEES, P. S. J.; MCDIARMID, M. A. Exposure of hospital pharmacists and nurses to antineoplastic agents. **J. Occup. Med.**, v.35, 1993. p.57-60.
- MINOIA, C. *et al.* Application of HPLC/Tandem MS in Environmental and Biological Monitoring of Health Care Personnel Occupationally Exposed to Cyclophosphamide and Ifosfamide. **Rapid Commun. Mass Spectrom.** v.12, 1998. p.1485-1493.
- PRADO, F.C.; RAMOS, J. A.; VALLE, J.R. **Atualização terapêutica 2003**. São Paulo: Artes Médicas, 2003.
- RIBANI, M. *et al.* Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, Curitiba, v. 27, n. 5, 2004. p.771-780.
- ROCHA, F. R. L. Perigos potenciais a que estão expostos os trabalhadores de enfermagem na manipulação de quimioterápicos antineoplásicos: conhecê-los para preveni-los. Ribeirão Preto, 2002. 93p. **Dissertação de Mestrado – Faculdade de Enfermagem de Ribeirão Preto** – Universidade de São Paulo.
- RUBINO, F.M. Separation methods for metotrexate, its structural analogues and metabolites. **J. Chromatogr. B**, v.764, 2001. p.217-254.
- SCHMAUS, G.; SCHIERL, R.; FUNCK, S. Monitoring surface contamination by antineoplastic drug using gas chromatography-mass spectrometry and volumetry. **Am L. Health-Syst.Pharm.**, Bethesda, v.59, n.10, 2002. p.956-961.

- SESSINK, P. J. M. *et al.* Occupational exposure to antineoplastic agents at several departments in a hospital. **Int. Arch. Occup. Envir. Health.** v.64, n.12, 1992. p.105.
- SESSINK, P.J.M.; BOS, R.P. Drug hazardous to healthcare workers: evaluation of methods for monitoring occupational exposure to cytostatic drugs. **Drug Saf.**, Auckland, v.20, n.4, 1999. p.347-359.
- TEW, K.D.; COLVIN, M., CHABNER, B.A. in: Chabner, Longo (Eds.), *Cancer Chemother, Biother*, Lippincot-Raven: Philadelphia, 2.ed., 1996. p.297.
- TURCI, R. *et al.* Biological and environmental monitoring of hospital personnel exposed to antineoplastic agents: a review of analytical methods. **J. Chromatogr. B**, v.789, 2003. p.169-209.
- TURCI, R. *et al.* Validation protocol and analytical quality in biological monitoring of occupational exposure to antineoplastic drugs. **Toxicol. Letters**, v.162, n.2-3, 2006. p.256-262.