

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS

ADÉLIA MARIA PIMENTA DE PÁDUA ALCÂNTARA

**DESENVOLVIMENTO DE MÉTODOS PARA A
DETERMINAÇÃO SIMULTÂNEA DE
ANTINEOPLÁSICOS EM SUPERFÍCIES E
LUVAS VISANDO A APLICAÇÃO NA
MONITORIZAÇÃO DA EXPOSIÇÃO
OCUPACIONAL**

Alfenas/MG

2009

ADÉLIA MARIA PIMENTA DE PÁDUA ALCÂNTARA

**DESENVOLVIMENTO DE MÉTODOS PARA A
DETERMINAÇÃO SIMULTÂNEA DE ANTINEOPLÁSICOS
EM SUPERFÍCIES E LUVAS VISANDO A APLICAÇÃO NA
MONITORIZAÇÃO DA EXPOSIÇÃO OCUPACIONAL**

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas pela Universidade Federal de Alfenas. Área de concentração: Desenvolvimento e avaliação microbiológica e físico-química de fármacos, toxicantes e medicamentos.

Orientadora: Isarita Martins Sakakibara.

Alfenas/MG

2009

Alcântara, Adélia Maria Pimenta de Pádua.

Desenvolvimento de métodos para a determinação simultânea de antineoplásicos em superfícies e luvas visando a aplicação na monitorização da exposição ocupacional / Adélia Maria Pimenta de Pádua Alcântara.- Alfenas, 2009.

103 f. : il.-

Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas)-Universidade Federal de Alfenas.
Bibliografia.

1. Antineoplásicos. 2. Cromatografia Líquida. 3. Exposição Ocupacional. 4. Estudos de Validação. I. Título.

CDD: 615.9

ADÉLIA MARIA PIMENTA DE PÁDUA ALCÂNTARA

**DESENVOLVIMENTO DE MÉTODOS PARA A
DETERMINAÇÃO SIMULTÂNEA DE ANTINEOPLÁSICOS
EM SUPERFÍCIES E LUVAS PARA APLICAÇÃO NA
MONITORIZAÇÃO DA EXPOSIÇÃO OCUPACIONAL**

A Banca examinadora abaixo-assinada, aprova a Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas pela Universidade Federal de Alfenas. Desenvolvimento e avaliação microbiológica e físico-química de fármacos, toxicantes e medicamentos.

Aprovada em 13 de março de 2009

Prof^a. Dr^a. Isarita Martins Sakakibara

Instituição: Universidade Federal de Alfenas Assinatura: _____

Prof^a. Dr^a. Cláudia Regina dos Santos

Instituição: Universidade Federal
de Santa Catarina Assinatura: _____

Prof^a. Dr^a. Gislaine Ribeiro Pereira

Instituição: Universidade Federal de Alfenas Assinatura: _____

Dedico este trabalho

Ao Menino Jesus de Praga e à Mãe Rainha.

A minha família pelo amor, compreensão, apoio e estímulo constante.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Alfenas pela oportunidade oferecida;

À Coordenação do Curso de Pós-Graduação pela política de incentivo à produção acadêmica;

À CAPES pela bolsa de estudos concedida;

Ao CNPq pelo financiamento concedido através do edital MCT-CNPq 54/2005, projeto nº 402630/2005;

Ao Oncominas pela doação do padrão de doxorubicina;

Ao Prof. Pietro Apostoli pela doação dos padrões de ciclofosfamida e ifosfamida;

Ao Conselho Federal de Farmácia e à Dendrix Consultoria pelos prêmios concedidos em mérito ao desenvolvimento do método de identificação dos fármacos em superfícies;

À Prof. Dra. Isarita Martins Sakakibara orientadora científica desta dissertação, agradeço o compromisso assumido, o empenho que colocou neste trabalho, os níveis de exigência dos desafios que me lançou e os suportes, formais e informais, que disponibilizou. Agradeço ainda, porque foi mesmo muito importante para mim, a análise rigorosa e afetuosa de cada capítulo, as sugestões, os esclarecimentos e os comentários sempre oportunos e que espero ter sabido aproveitar. Para agradecer a aliança, a confiança e a amizade as palavras serão sempre poucas.

Quero expressar o meu carinho especial aos professores Fábio, Maria Elisa, Elizabeth e à Patrícia pelas trocas de pontos de vista, entre os quais os científicos, e por todas as forças que deram, nos bons e os maus momentos deste processo.

Às professoras Claudia Regina dos Santos e Gislaine Ribeiro Pereira pelas importantes sugestões na pré-banca.

Ao meu grupo de trabalho (Ricardo, Liliane, Ananda, Jefferson, Suellen, Renata, Gabriela, Matheus, André e Marcela) e de vida acadêmica, agradeço toda a dedicação e colaboração nos vários momentos dos estudos, expresso o meu reconhecimento e faço votos que consigam realizar todos os seus projetos de vida.

Às minhas amigas Daniela, Lusiane e Helineide quero dizer o quanto valorizo a nossa amizade, o respeito e os bons sentimentos que nos unem.

À minha amiga Natália pelo auxílio na formatação;

À todo corpo docente, discente, funcionários técnicos e auxiliares (Márcia e Andressa) pelos ensinamentos, cooperação e amizade;

Aos funcionários de secretária de pós-graduação (Márcio e Marilúcia) e da biblioteca (Cecília e Ronan) pela ajuda valiosa.

Os meus sinceros agradecimentos

RESUMO

A importância terapêutica e os resultados promissores apresentados pelos antineoplásicos são inquestionáveis, porém a ampla e crescente utilização desses fármacos, em terapia combinada entre duas ou mais destas substâncias químicas, é considerada um importante risco químico para os profissionais expostos. São recomendadas várias medidas, dentre elas a monitorização, visando a proteção à saúde dos trabalhadores e o controle da exposição. Nesse contexto, é de suma importância o desenvolvimento de métodos capazes de identificar e /ou quantificar os fármacos simultaneamente. Assim, este trabalho teve como objetivo desenvolver métodos analíticos para determinação simultânea de antineoplásicos em superfícies e luvas, uma vez que a via dérmica é a principal para a absorção dessas substâncias. Após vários testes, as condições otimizadas para o método de determinação de CF (ciclofosfamida), doxorrubicina (DOX), 5-FU (5-fluoruracila), IFO (ifosfamida) e MTX (metotrexato), em superfícies, utilizando a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) foram: detecção a 195 nm (UV); coluna C18 (250 x 4,5 mm, 5 µm) com pré-coluna similar; fase móvel constituída de água pH 4,0: metanol: acetonitrila (70:13:17, v/v/v) com vazão de 0,4 mL min⁻¹ até 13 minutos e, 1 mL min⁻¹ até o final da corrida; solução de acetonitrila: metanol (50:50, v/v), como líquido de limpeza das superfícies de trabalho, sem extração prévia. Esse método demonstrou-se linear para a 5-FU e MTX, no intervalo de 0,25 a 20 µg mL⁻¹ e, para DOX, CF e IFO, de 0,5 a 20 µg mL⁻¹, com coeficientes de correlação linear superiores a 0,99. A recuperação obtida foi em torno de 74 a 106% e o coeficiente de variação foi inferior a 11%, na avaliação da repetibilidade. Para o método cromatográfico de determinação em luvas, as condições otimizadas foram, para os analitos 5-FU, MTX e paclitaxel (PAC): detecção em DAD (detector por arranjo de diodos) e quantificação em UV, sendo 195 nm, 265 nm e 302 nm, os comprimentos de onda utilizados para o PAC, 5-FU e MTX, respectivamente; coluna C18 (250 x 4,5 mm, 5 µM) com pré-coluna similar; fase móvel constituída de água pH 4,0: metanol: acetonitrila (35:15:50, v/v/v), com vazão de 1 mL min⁻¹. Recuperação satisfatória foi obtida, para os analitos 5-FU e PAC, quando a amostra foi submetida à ELL, com acetato de etila e, para o MTX, quando submetida ao procedimento de extração em fase sólida (SPE), utilizando-se sílica modificada com C18 e eluição com metanol. O método demonstrou-se linear no intervalo de 0,25 a 20 µg mL⁻¹, com coeficientes de correlação linear superiores a 0,99. A eficiência da extração foi em torno de 71 a 115% e a repetibilidade foi inferior a 15%. O método revelou-se eficiente na quantificação de amostras

com concentração igual ou superior a $0,25 \mu\text{g mL}^{-1}$ e, na detecção daquelas com valores abaixo do LQ, através da utilização do DAD. Os resultados sugerem que os métodos podem ser utilizados na determinação simultânea de antineoplásicos, nas matrizes estudadas, e constituem ferramentas úteis na monitorização da exposição ocupacional à tais substâncias.

Unitermos: antineoplásicos, determinação simultânea, superfícies e luvas, cromatografia líquida, detector ultra-violeta, detector arranjo de diodos, exposição ocupacional.

ABSTRACT

Therapeutic importance and benefits obtained from antineoplastic drugs are unquestionable. However, their side effects are not well-known and extensive use and exposure to multiple agents may put health care workers involved in the preparation and administration of these drugs at risk. Therefore, it is important to have accurate methods for simultaneous analysis and evaluation of the occupational exposure. The aim of this study was to develop methods for simultaneous determination of antineoplastics in surfaces and gloves since, in the occupational exposure, the main contamination route is dermal contact, which may occur by prolonged contact with contaminated surfaces or instruments/materials. The assay was performed by High Performance Liquid Chromatography (HPLC) and the optimized conditions for 5-fluorouracil (5-FU), methotrexate (MTX), doxorubicin (DOX), cyclophosphamide (CP) and ifosfamide (IFO), in surface samples, were: detection in 195 nm, C₁₈ column (5 µm, 250 x 4 mm) with a similar guard column; mobile phase was constituted by water, pH 4: methanol: acetonitrile (70:13:17, v/v/v) with a flow of 0.4 mL min⁻¹ up to 13 minutes and after this 1 mL min⁻¹ and cleaning of surfaces with acetonitrile: methanol (50:50), without previous extraction. The method presented a linear calibration range from 0.25 to 20 µg mL⁻¹ for 5-FU and MTX and from 0.5 to 20 µg mL⁻¹ for IFO, DOX and CP with determination coefficients (r^2) higher than 0.99. The repeatability, expressed in terms of percent relative standard deviation was ≤11% and extraction efficiency ranged from 74 to 106%. Optimized conditions for 5-FU, MTX and paclitaxel (PAC), in gloves, were: diode array (DAD) detection and UV quantification in 195 nm to PAC, 265 nm to 5-FU and 302 nm to MTX; C₁₈ column (5 µm, 250 x 4 mm) with a similar guard column; mobile phase was constituted by water, pH 4: methanol: acetonitrile (35:15:50, v/v/v) with a flow of 1 mL min⁻¹. The method presented a linear calibration range from 0.25 to 20 µg mL⁻¹ with determination coefficients (r^2) higher than 0.99. Extraction efficiency was between 71 to 115% and repeatability, expressed in terms of percent relative standard deviation was ≤15% and satisfactory extraction efficiency was obtained when liquid extraction, with ethyl acetate, was used for 5-FU and PAC and solid phase, with C18 cartridges and elution with methanol, for MTX. DAD detector allowed drugs detection at concentration below 0.25 µg mL⁻¹, in glove samples. The results obtained suggest that the developed methods can be applied for simultaneous determination of the drugs studied and are considered useful in exposure assessment for health care workers.

Uniterms: antineoplastic drugs, simultaneous determination, surfaces, gloves, liquid chromatography, ultra-violet detection, diode array detection, occupational exposure.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

| | | |
|------------------|--|----|
| Figura 1 | - Classificação dos antineoplásicos segundo ponto de interferência no mecanismo de ação das diferentes etapas da síntese de ADN, transcrição e transdução | 12 |
| Figura 2 | - Fórmula estrutural da ciclofosfamida.. | 17 |
| Figura 3 | - Fórmula estrutural da doxorrubicina | 21 |
| Figura 4 | - Fórmula estrutural da 5-fluoruracila | 24 |
| Figura 5 | - Fórmula estrutural da ifosfamida | 27 |
| Figura 6 | - Fórmula estrutural do metotrexato..... | 30 |
| Figura 7 | - Fórmula estrutural do paclitaxel | 33 |
| Figura 8 | - Aspectos da exposição ocupacional aos fármacos antineoplásicos.... | 38 |
| Figura 9 | - Espectros obtidos a partir da análise de: A) 5- fluoruracila, na concentração de 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$; B) metotrexato, concentração de 5 $\mu\text{g mL}^{-1}$; C) ifosfamida, na concentração de 20 $\mu\text{g mL}^{-1}$; D) ciclofosfamida, concentração de 20 $\mu\text{g mL}^{-1}$; E) doxorrubicina, concentração de 20 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e F) paclitaxel, na concentração 20 $\mu\text{g mL}^{-1}$, no detector DAD, coluna C18 (250 x 4,6 mm, 5 μm), fase móvel: água pH 4,0: metanol: acetonitrila (70:13:17, v/v/v)..... | 63 |
| Figura 10 | - Cromatogramas obtidos a partir da injeção de: A) solução de limpeza superfícies ACN: MeOH (50:50, v/v) e B) solução de limpeza de superfícies ACN: MeOH (50:50, v/v), contendo os analitos 5-fluoruracila (5- FU) e metotrexato (MTX), na concentração de 5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e ifosfamida (IFO), doxorrubicina (DOX) e ciclofosfamida (CF) na concentração de 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$, identificados por CLAE-UV nas condições otimizadas..... | 67 |
| Figura 11 | - Fluxograma de injeção direta da matriz acetonitrila:metanol (50:50, v/v) com os analitos 5-fluoruracila (5-FU), metotrexato (MTX), ifosfamida (IFO), doxorrubicina (DOX) e ciclofosfamida (CF) em superfícies..... | 69 |

| | | |
|------------------|--|----|
| Figura 12 | - Espectros obtidos a partir da análise de metotrexato, na concentração $20 \mu\text{g mL}^{-1}$, no detector DAD, coluna C18 (250 x 4,6 mm, 5 μm), fase móvel: água pH 4,0: metanol: acetonitrila (35:15:50, v/v/v) | 76 |
| Figura 13 | - Espectros obtidos a partir da análise de 5-fluoruracila, na concentração $20 \mu\text{g mL}^{-1}$, no detector DAD, coluna C18 (250 x 4,6 mm, 5 μm), fase móvel: água pH 4,0: metanol: acetonitrila (35:15:50, v/v/v) | 77 |
| Figura 14 | - Espectros obtidos a partir da análise de paclitaxel, na concentração $20 \mu\text{g mL}^{-1}$, no detector DAD, coluna C18 (250 x 4,6 mm, 5 μm), fase móvel: água pH 4,0: metanol: acetonitrila (35:15:50, v/v/v) | 77 |
| Figura 15 | - Cromatograma obtido a partir da injeção de solução padrão contendo os analitos metotrexato (MTX), 5-fluoruracila (5-FU) e paclitaxel (PAC) na concentração de $20 \mu\text{g mL}^{-1}$ identificados por CLAE-UV (195 nm) nas condições otimizadas | 79 |
| Figura 16 | - Cromatogramas obtidos a partir da injeção de solução-padrão contendo os analitos metotrexato (em verde, analisado em 302 nm), na concentração de $20 \mu\text{g mL}^{-1}$ e 5- fluoruracila (em azul, analisado em 265 nm), na concentração de $10 \mu\text{g mL}^{-1}$, identificados por CLAE-DAD nas condições otimizadas..... | 79 |
| Figura 17 | - Fluxograma da técnica de extração líquido-líquido (ELL) de antineoplásicos em luvas..... | 80 |
| Figura 18 | - Fluxograma da técnica de extração em fase sólida (SPE) de antineoplásicos em luvas..... | 81 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|--|----|
| Tabela 1 - Classificação dos antineoplásicos segundo Korolkovas..... | 13 |
| Tabela 2 - Acrônimos dos protocolos de quimioterapia, seus componentes e sua principal indicação | 14 |
| Tabela 3 - Classificação dos fármacos antineoplásicos, quanto à carcinogenicidade..... | 36 |
| Tabela 4 - Tipos de amostragem para avaliar a exposição dos trabalhadores da área da saúde, aos quimioterápicos antineoplásicos e as possíveis informações fornecidas..... | 40 |
| Tabela 5 - Avaliação dos antineoplásicos através de análise em superfície/ objeto pela técnica de amostragem <i>wipe</i> teste de 1992 a 2008 | 43 |
| Tabela 6 - Valores de pKa e solubilidade de diferentes fármacos antineoplásicos.. | 44 |
| Tabela 7 - Técnica de detecção, limites de detecção e de quantificação, faixa de trabalho dos métodos descritos na literatura para análise de ciclofosfamida, em matrizes não-biológicas, de 1992 a 2008..... | 45 |
| Tabela 8 - Técnica de detecção, limites de detecção e de quantificação, faixa de trabalho dos métodos descritos na literatura para análise de ifosfamida, em matrizes não-biológicas, de 1992 a 2008..... | 46 |
| Tabela 9 - Técnica de detecção, limites de detecção e de quantificação, faixa de trabalho dos métodos descritos na literatura para análise de doxorubicina, em matrizes não-biológicas, de 1992 a 2008..... | 47 |
| Tabela 10 - Técnica de detecção, limites de detecção e de quantificação, faixa de trabalho dos métodos descritos na literatura para análise de 5-f luoruracila, em matrizes não-biológicas, de 1992 a 2008..... | 47 |

| | |
|---|----|
| Tabela 11 - Técnica de detecção, limites de detecção e de quantificação, faixa de trabalho dos métodos descritos na literatura para análise de metotrexato, em matrizes não-biológicas, de 1992 a 2008..... | 49 |
| Tabela 12 - Técnica de detecção, limites de detecção e de quantificação, faixa de trabalho dos métodos descritos na literatura para análise de paclitaxel, em matrizes não-biológicas, de 1992 a 2008..... | 49 |
| Tabela 13 - Parâmetros de conformidade do sistema e recomendações..... | 58 |
| Tabela 14 - Parâmetros de conformidade do sistema* obtidos com os analitos 5-fluoruracila (5-FU), metotrexato (MTX), ifosfamida (IFO), doxorubicina (DOX) e ciclofosfamida (CF), identificados por CLAE-UV nas condições otimizadas | 69 |
| Tabela 15 - Linearidade, limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) do método de determinação simultânea de 5-fluoruracila (5-FU), metotrexato (MTX), ifosfamida (IFO), doxorubicina (DOX) e ciclofosfamida (CF) em superfícies, por CLAE-UV..... | 71 |
| Tabela 16 - Precisão intra-corrída (repetibilidade), avaliada pelo desvio padrão relativo (DPR%), obtida com as sextuplicatas da injeção direta da matriz acetonitrila: metanol (50:50, v/v), contendo os analitos 5-fluoruracila (5-FU), metotrexato (MTX), ifosfamida (IFO), doxorubicina (DOX) e ciclofosfamida (CF), nas concentrações baixa, média e alta | 72 |
| Tabela 17 - Precisão intercorrida (intermediária), avaliada pelo desvio padrão relativo (DPR%), obtida com as sextuplicatas da injeção direta da matriz acetonitrila: metanol (50:50, v/v), contendo os analitos 5-fluoruracila (5-FU), metotrexato (MTX), ifosfamida (IFO), doxorubicina (DOX) e ciclofosfamida (CF), nas concentrações baixa, média e alta | 73 |
| Tabela 18 - Recuperação do método de determinação simultânea de 5-fluoruracila (5-FU), metotrexato (MTX), ifosfamida (IFO), doxorubicina (DOX) e ciclofosfamida (CF) em superfícies (n=6), fortificadas com 2 µg mL ⁻¹ dos fármacos | 75 |

| | |
|---|----|
| Tabela 19 - Parâmetros de conformidade do sistema* obtidos com os analitos metotrexato (MTX), 5-fluoruracila (5-FU) e paclitaxel (PAC) na concentração de 10 µg mL ⁻¹ identificados por CLAE-DAD-UV, nas condições otimizadas | 83 |
| Tabela 20 - Linearidade, limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ) do método de determinação simultânea para 5-fluoruracila (5-FU), metotrexato (MTX) e paclitaxel (PAC), por CLAE-DAD-UV..... | 84 |
| Tabela 21 - Precisão intra-corrída (repetibilidade) e intercorrída (precisão intermediária), avaliada pelo desvio padrão relativo (DPR%), obtida na análise de amostras de luvas, contendo antineoplásicos (n=6), por CLAE-DAD-UV com prévia extração dos analitos | 84 |
| Tabela 22 - Recuperação do método de determinação simultânea de metotrexato (MTX), 5-fluoruracila (5-FU) e paclitaxel (PAC) em luvas (n=6), analisadas pelo método CLAE-DAD-UV, com prévia extração dos analitos..... | 86 |
| Tabela 23 - Concentração de antineoplásicos em amostras de luvas utilizadas por pesquisadores, determinadas por CLAE-DAD-UV, nas condições otimizadas | 86 |

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

1 A - classificação de grupo segundo IARC

2 B - classificação de grupo segundo IARC

5-FU - 5-fluoruracila

5-FdUMP - 5- fluoro-desoxiuridina

α - fator de separação ou seletividade

μg - micrograma

μL - microlitro

a - coeficiente angular

ACN - acetonitrila

ADN - ácido desoxirribonucléico

ARN - ácido ribonucléico

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária

BCG - *Bacillus Camett Guérin*

°C - grau Celsius

C-18 - fase sólida lipofílica usada em cartuchos para SPE

CAS - Chemical Abstracts Service

CEP - Comitê de Ética em Pesquisa

CF - ciclofosfamida

CG-EM - cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa

CLAE - cromatografia líquida de alta eficiência

CLAE-DAD-UV - cromatografia líquida de alta eficiência com detector por arranjo de diodos e ultra-violeta

CLAE-EM-EM - cromatografia líquida de alta eficiência a acoplada à espectrometria de massa acoplada à espectrometria de massa

cm² - centímetro ao quadrado

CV- coeficiente de variação

CYP2B - isoenzimas do citocromo P450 subfamília 2B

CYP2C - isoenzimas do citocromo P450 subfamília 2C

CYP3A - isoenzimas do citocromo P450 subfamília 3A

DAD - detector de arranjo diodo

DHFR - dihidrofolato redutase

DOX - doxorubicina

DP - desvio padrão

DPb - desvio padrão do branco

DPR %- desvio padrão relativo (percentual)

dTMP - monofosfato de desoxitimidina

dUMP - monofosfato de desoxiuridina

EBCTCG - Early Breast Cancer Trialists Collaborative Group

ECC - específicos do ciclo celular

ELL - extração líquido-líquido

EPI - equipamento de proteção individual

FAN - fármaco antineoplásico

g - unidade de medida da força centrífuga relativa, sendo 1 g equivalente à aceleração da gravidade na superfície da terra.

G₀ - fase da mitose

G₁ - fase da mitose

G₂ - fase da mitose

IARC - International Agency for Research on Cancer

ICC - inespecíficos do ciclo celular

IFO - ifosfamida

k - fator de retenção ou capacidade

kg - kilograma

L - litro

LD - limite de detecção

LQ - limite de quantificação

M - fase da mitose

m² - metro ao quadrado

MeOH - metanol

MESNA - 2-mercaptano sulfonato sódico

mg - miligrama

mL - mililitro

mm - milímetro

mm³ - milímetro cúbico

mM - milimol

MTX - metotrexato

n= - número de réplicas

N - número de pratos teóricos

NaOH - hidróxido de sódio

ng - nanograma

NIOSH - National Institute for Occupational Safety and Health

OSHA - Occupational Safety and Health Administration

pKa - constante de dissociação ácida

pH - potencial hidrogeniônico

pg - picograma

QT - quimioterapia

r² - coeficiente de determinação

S - fase da mitose

SNC - sistema nervoso central

SPE - extração em fase sólida

SOBRAFO - Sociedade Brasileira de Farmacêuticos em Oncologia

PAC – paclitaxel

PALA – n-fosfonoacetil-L-aspartato

Rs - resolução

TA 98 - linhagem de *Salmonella typhimurium*

TA 100 - linhagem de *Salmonella typhimurium*

TF - fator de cauda ou assimetria

THF - tetrahydrofolato

tm - tempo de retenção de um composto não retido (tempo morto)

TMP – monofosfato de timidina

TNT - tecido não tecido

U.S. FDA - United States Food and Drug Administration

UV - ultravioleta

v - volume

SUMÁRIO

| | | |
|----------|---|-----------|
| 1 | INTRODUÇÃO | 1 |
| 2 | REVISÃO DA LITERATURA | 8 |
| 2.1 | ASPECTOS TEÓRICOS DO CÂNCER | 8 |
| 2.2 | QUIMIOTERAPIA | 11 |
| 2.2.1 | Classificação dos fármacos antineoplásicos | 11 |
| 2.2.2 | Quimioterapia de combinação ou poliquimioterapia | 14 |
| 2.2.3 | Fármacos utilizados na quimioterapia | 16 |
| 2.2.3.1 | Ciclofosfamida (CF) | 16 |
| 2.2.3.2 | Doxorrubicina (DOX) | 20 |
| 2.2.3.3 | Fluoruracila (5-FU) | 24 |
| 2.2.3.4 | Ifosfamida (IFO) | 26 |
| 2.2.3.5 | Metotrexato (MTX) | 29 |
| 2.2.3.6 | Paclitaxel (PAC) | 32 |
| 2.2.4 | Neoplasias induzidas pela quimioterapia | 35 |
| 2.3 | MONITORIZAÇÃO DA EXPOSIÇÃO OCUPACIONAL AOS ANTINEOPLÁSICOS | 37 |
| 2.4 | ANÁLISE DOS ANTINEOPLÁSICOS EM MATRIZES NÃO-BIOLÓGICAS | 40 |
| 3 | OBJETIVOS | 50 |
| 4 | MATERIAIS E MÉTODOS | 51 |
| 4.1 | MATERIAIS | 51 |
| 4.1.1 | Padrões, reagentes e solventes | 51 |
| 4.1.2 | Equipamentos e acessórios | 51 |
| 4.1.3 | Soluções-padrão | 52 |
| 4.2 | OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS E DE EXTRAÇÃO DOS ANALITOS EM SUPERFÍCIES..... | 52 |
| 4.2.1 | Otimização das condições cromatográficas | 52 |
| 4.2.2 | Otimização da extração líquido-líquido | 53 |
| 4.2.3 | Injeção direta da matriz | 54 |
| 4.2.4 | Teste de superfícies intencionalmente fortificada com os analitos | 54 |
| 4.3 | OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS E DE EXTRAÇÃO DOS ANALITOS EM LUVAS..... | 55 |
| 4.3.1 | Otimização das condições cromatográficas | 55 |
| 4.3.2 | Otimização das condições de extração | 56 |

| | | |
|---------|---|-----|
| 4.3.3 | Aplicação do método em amostras de luvas | 57 |
| 4.4 | CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO DOS MÉTODOS..... | 57 |
| 5 | RESULTADOS E DISCUSSÃO | 61 |
| 5.1 | OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS E DE EXTRAÇÃO DOS ANALITOS EM SUPERFÍCIES | 62 |
| 5.1.1 | Otimização das condições cromatográficas | 62 |
| 5.1.2 | Otimização das condições de extração líquido-líquido | 68 |
| 5.1.3 | Injeção direta | 68 |
| 5.1.3.1 | Características de desempenho do método de injeção direta | 69 |
| 5.1.3.2 | Aplicação do método de injeção direta em superfícies intencionalmente fortificadas com os analitos..... | 74 |
| 5.2 | OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS E DE EXTRAÇÃO DOS ANALITOS EM LUVAS | 75 |
| 5.2.1 | Otimização das condições cromatográficas | 75 |
| 5.2.2 | Otimização das técnicas de extração | 80 |
| 5.2.3 | Características de desempenho do método | 82 |
| 5.2.4 | Aplicação do método validado em amostras de luvas | 86 |
| 6 | CONCLUSÕES | 88 |
| | REFERÊNCIAS | 90 |
| | ANEXO I | 101 |
| | ANEXO II | 103 |

1 INTRODUÇÃO

Câncer é o nome dado a um conjunto de mais de 100 doenças que têm em comum o crescimento desordenado de células que invadem os tecidos e órgãos, podendo espalhar-se 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. Entre as características que diferenciam os diversos tipos de câncer estão a velocidade de multiplicação das células e a capacidade de invadir tecidos e órgãos vizinhos ou distantes, formando as metástases (INCA, 2008).

Os tipos de câncer responsáveis pelas maiores taxas de incidência e mortalidade no Brasil são: para homens, próstata, pulmão, estômago; para mulheres, mama, colo de útero e reto (INCA, 2008).

Menos de um quarto desses pacientes terá prognóstico satisfatório somente com cirurgia e/ou radiação local. A maioria, no entanto, receberá quimioterapia sistêmica em algum momento da enfermidade. Em uma pequena parcela (cerca de 10%) dos pacientes com neoplasias específicas, a quimioterapia pode resultar em cura ou remissão prolongada. Contudo, na maioria dos casos, o tratamento farmacológico só produz regressão da doença, sendo mais comum os pacientes apresentarem complicações ou recidivas que podem eventualmente levar a morte (HOWLAND; MYCEK, 2007).

Os carcinógenos podem, portanto, ser de três tipos: radiações (induzem lesões no ADN (ácido desoxirribonucléico), como por exemplo a radiação ultravioleta e a radiação ionizante); vírus (seu papel não é bem conhecido, uma vez que decorre tempo longo entre a infecção viral e o desenvolvimento do câncer, exemplo: o vírus da hepatite B); e os agentes químicos (MACHADO; SANTELLI, 2008).

A indução de tumores em seres humanos por agentes químicos é bem estabelecida (VENEGAS et al., 1995). Os agentes químicos de atuação direta são normalmente compostos eletrofílicos, isto é, reagem com regiões carregadas negativamente de outros compostos. A maioria, entretanto, age indiretamente, necessitando ser biotransformada para adquirir potencial carcinogênico. Neste caso, a conversão em carcinógeno ocorre pela introdução de centros eletrofílicos na molécula inativa. Essa ativação ocorre paradoxalmente em consequência da ação do sistema de destoxificação do organismo, que tem a função de tornar

as substâncias hidrofílicas para que sejam eliminadas pela urina (MACHADO; SANTELLI, 2003).

O termo quimioterapia (QT) é utilizado na área da saúde para designar tratamento de neoplasias, porém a sua definição correta é de uma substância química, isolada ou em combinação, que tem por objetivo tratar uma patologia tumoral ou não. Tem como finalidade: curar, melhorar a sobrevida e/ou promover efeito paliativo (CHU; SARTORELLI, 2007).

Seu objetivo primário é destruir as células neoplásicas, preservando as normais. Entretanto, a maioria dos agentes quimioterápicos atua de forma não-específica, lesando tanto células malignas quanto normais (MURAD; KATZ, 1996; ALMEIDA, 2004; CHU; SARTORELLI, 2007). É a modalidade terapêutica oncológica que mais tem progredido nos últimos tempos. Pode-se hoje curar ou assegurar longas sobrevidas, com este tipo de tratamento, a uma variedade de tumores até há pouco tempo rapidamente mortais (CHU; SARTORELLI, 2007).

Um dos fatores limitantes é a toxicidade dos fármacos em tecidos sadios, especialmente os que têm taxa de proliferação rápida, como a medula óssea, epitélio gastrointestinal, folículos pilosos e epitélio germinativo, isto explica a maior parte dos efeitos colaterais da quimioterapia: náuseas e vômitos, diarreia, alopecia, diminuição da fertilidade e susceptibilidade maior às infecções (MACHADO, 2000; OLIVEIRA; ALVES, 2002; CHU; SARTORELLI, 2007). Porém, o corpo recupera-se destes inconvenientes após o tratamento, e o uso clínico desses fármacos exige que os benefícios sejam confrontados com a toxicidade, na procura de um índice terapêutico favorável (FOYE et al., 1996; MURAD; KATZ, 1996; CHU; SARTORELLI, 2007).

Os fármacos antineoplásicos (FAN) constituem um grupo heterogêneo de substâncias químicas capazes de inibir o crescimento e/ou os processos vitais das células tumorais com uma toxicidade tolerável sobre as células normais (MINOIA; PERBELLINI, 2000).

Assim, praticamente todos os FAN têm uma curva dose-resposta muito íngreme para os efeitos tóxicos e terapêuticos (HOWLAND; MYCEK, 2007); ou seja, as substâncias químicas antineoplásicas mais efetivas terapeuticamente promovem efeitos tóxicos em função de sua toxicidade. Tais agentes podem promover o aparecimento de câncer secundário depois de cessado o tratamento, pois muitos são mutagênicos, carcinogênicos e teratogênicos em vários sistemas experimentais em animais e humanos (FORNI, 1994; FERGUSON; PEARSON, 1996; MALUF; ERDTMANN, 2000; BERTRAM, 2001).

Os FAN podem ser administrados por várias vias, tais como oral, intramuscular, subcutânea, intra-arterial, intrapleural, intratumoral, intracística e por infusão intravenosa. Estes agentes podem ser administrados isoladamente ou em terapia combinada (DEL GAUDIO; MENONNA-QUINN, 1998).

A terapia combinada também chamada de poliquimioterapia é a modalidade de tratamento utilizada para superar a destruição celular logarítima limitada ao uso de um único FAN. Seu diferencial está em recorrer a associações de fármacos diferentes toxicidades e mecanismos de ação, podendo-se assim obter efeitos citotóxicos aditivos e/ou sinérgicos, sendo atualmente a abordagem padrão para o tratamento curativo e paliativo do câncer (CHU; SARTORELLI, 2007).

Ensaio clínicos demonstraram que a administração de esquemas poliquimioterápicos é mais efetiva que a administração de fármacos de forma isolada, pois a combinação de dois ou mais agentes pode frequentemente, levar à redução da dose de cada um, quando comparada às doses que seriam administradas isoladamente (EARLY BREAST CANCER TRIALISTS COLLABORATIVE GROUP, 1998; CARRICK et al., 2005; JONES; GHERSI; WILCKEN, 2006).

Face ao exposto acima, os trabalhadores, tais como farmacêuticos (manipulação em indústrias, farmácias e clínicas oncológicas), enfermeiros, médicos, pessoal envolvido na limpeza e pesquisadores, estão em contato com vários antineoplásicos na jornada diária de trabalho, em locais de preparo e administração dessas substâncias.

A exposição ocupacional aos FAN tem sido reconhecida como potencialmente perigosa à saúde desde a década de 70, quando foi demonstrada a associação entre o contato com essas substâncias e o aumento da atividade mutagênica em amostras de urina. Paralelamente a estes resultados muitos estudos têm relatado o aparecimento de efeitos teratogênicos secundários à exposição profissional (VENEGAS et al., 1995). Em 1975, Sieber e Adamson relataram que a exposição aos FAN pode levar à formação de aberrações cromossômicas, malformações congênitas e efeitos na fertilidade.

Embora o potencial mutagênico/ carcinogênico dos FAN esteja baseado em estudos com exposição intensa e a altas doses, estudos sobre a exposição ocupacional têm mostrado a presença de níveis baixos, porém detectáveis, de FAN no ar ambiente das unidades de preparação de quimioterapia (MEDKOVA, 1991; SESSINK et al., 1992).

Cefaléia, tontura, náuseas, irritação da pele/mucosas e reações alérgicas são os sintomas mais frequentemente relatados em pessoas expostas ocupacionalmente a FAN, principalmente quando esses são manipulados em unidades inadequadamente equipadas (VENEGAS et al., 1995).

Em 1992, Sessink e colaboradores avaliaram a presença de metotrexato (MTX), 5-fluoruracila (5-FU), ifosfamida (IFO), ciclofosfamida (CF) e seus produtos de biotransformação na urina de enfermeiras e farmacêuticos de unidades de quimioterapia e, demonstraram que níveis apreciáveis de ciclofosfamida e ifosfamida, não somente, foram encontrados na urina de profissionais que estavam ativamente envolvidos no preparo e na administração dos fármacos, mas também, naqueles que apenas estavam presentes nos mesmos locais, sem contato direto.

Um estudo desenvolvido por Sessink et al. (1994a), mostrou a presença de ciclofosfamida em luvas de algodão, sob as luvas de látex, utilizadas pelos trabalhadores que preparavam o fármaco. Os autores sugeriram que a ciclofosfamida pode permear luvas de látex o que, em condições normais de trabalho, pode resultar em penetração dérmica.

Em outro estudo foi demonstrado que profissionais não paramentados com luvas e máscaras, nas unidades de preparo de FAN, tinham um nível 50% mais alto de quebras de ADN ($p < 0,005$), em relação aos que estavam paramentados (MILKOVIC-KRAUS; HORVAT, 1991; GOLONI et al., 1992).

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 (ALESSIO et al., 1996).

É evidente na literatura a divergência de opiniões quanto à extensão do risco relacionado ao contato com FAN (JOCHIMSEN, 1992; LEE, 1993). Entretanto, deve ser mencionado que a exposição diária por períodos prolongados expõe o trabalhador a um constante risco e, a ausência de sintomas imediatos não é evidência de ausência de efeitos à longo prazo (WILSON; SOLIMANDO, 1981; VENEGAS et al., 1995).

No âmbito ocupacional, os FAN podem ser absorvidos através da via respiratória, pela inalação dos aerossóis formados e dispersos no ambiente de trabalho, e através da via dérmica, que é considerada a principal via de introdução, pelo contato prolongado com superfícies e/ou indumentárias contaminadas (ALESSIO et al., 1996).

As modalidades de exposição são bem identificáveis. Durante a fase de preparação algumas operações são particularmente de risco: a abertura da ampola, a extração da agulha do frasco (pode formar aerossol), a expulsão de ar da seringa, a transferência do fármaco de um frasco a outro ou a uma bolsa de infusão, por meio da agulha da seringa e o descarte incorreto do frasco, parcialmente utilizado. Na fase de administração, a exposição pode ser verificada durante a inserção no defluxor e/ou durante a expulsão do ar da seringa, por formação de aerossol ou por contato cutâneo direto (APOSTOLI, FACCO, ALESSIO, 2001).

As práticas hospitalares rotineiras, o contato com material biológico ou roupa íntima utilizada pelos pacientes, tratados com estes tipos de fármacos, representam uma possível fonte de exposição (FORNI, 1994; PRIANTE, ALESSANDRO, CLONFERO 1994; PALAZZO et al., 1996; APOSTOLI, FACCO, ALESSIO, 2001).

Além disso, o uso crescente dos antineoplásicos pode acarretar um futuro problema ambiental, pois, até o momento, não existem normativas para o tratamento do descarte e das excreções dos pacientes sob terapia com estes fármacos.

Em 1998, Guedes traçou um perfil dos trabalhadores expostos aos FAN em hospitais do Distrito Federal. A maioria dos trabalhadores era do sexo feminino, faixa etária de 31 a 45 anos, portanto em idade fértil. Grande parte trabalhava a menos de dois anos com antineoplásicos, contudo um quarto desses trabalhadores manuseava esses agentes a mais de seis anos. Muitos deles já haviam manipulado os antineoplásicos sem utilizar qualquer técnica de segurança ou equipamento de proteção. Aproximadamente metade dos trabalhadores já havia sofrido algum tipo de acidente com antineoplásico, sendo que, em torno de 95% não fizeram comunicação.

Embora as condições de manuseio e segurança dos trabalhadores com antineoplásicos tenham melhorado consideravelmente, nos últimos 10 anos, Guedes sugeriu a existência de muitas deficiências quanto ao treinamento e vigilância à saúde desse grupo de trabalhadores. Por essa razão, alguns órgãos nacionais e internacionais, destinados à segurança dos trabalhadores, têm publicado documentos com a finalidade de fornecer indicações precisas para a redução dos riscos durante a manipulação de FAN (GUEDES, 1998).

Em geral, as recomendações prevêem avaliação periódica da exposição, utilização de dispositivos de proteção coletiva e individual, vigilância à saúde e programas de formação e informação a fim de garantir níveis de exposição cada vez mais baixos, uma vez que, não

existem limites de exposição recomendados para essas substâncias (DEMENT; CROMER, 1992; PALAZZO et al., 1996; MINOIA; PERBELLINI, 2000; NIOSH, 2004).

Para a avaliação da exposição aos FAN deve-se fazer um levantamento da exposição ambiental e biológica determinando em que matrizes esses fármacos poderão ser encontrados (MARTINS, 2003). Segundo estudos realizados foi prevista seguinte hierarquia: (a) determinação em superfícies; (b) determinação em material biológico e (c) determinação no ar (ALESSIO et al., 1996; APOSTOLI, FACCO, ALESSIO, 2001).

Esta hierarquia se deve ao conhecimento da quantidade de substância manipulada, a modalidade de difusão dos fármacos no ambiente, caracterização da área de maior contaminação, conhecimento das principais vias de absorção do quimioterápico em questão e verificação da eficiência dos equipamentos de proteção coletiva (cabine de fluxo laminar) e individual (máscaras, luvas, avental) (BAKER; CONNOR, 1996; APOSTOLI, FACCO, ALESSIO, 2001).

Segundo o NATIONAL INSTITUTE FOR OCCUPATIONAL SAFETY AND HEALTH (NIOSH), em seu manual de métodos analíticos o *wipe* teste é uma maneira comum de monitorar superfícies contaminadas. O objetivo desse procedimento é proporcionar uma metodologia uniforme e reprodutível para a coleta de amostras representativas de superfície contaminadas com partículas sedimentadas e/ou líquidos de baixa volatilidade. O sistema de coleta dependerá da natureza do solvente de extração e do agente químico a ser coletado, o principal cuidado é que este tenha o mínimo impacto sobre as amostras (NIOSH, 1994).

No caso de coleta de FAN em superfícies, o solvente mais adequado é a solução de hidróxido de sódio (NaOH) $0,03 \text{ mol L}^{-1}$ (SESSINK et al., 1992; MINOIA; PERBELLINI, 2000; CASTIGLIA et al., 2008).

Vários métodos, utilizando *wipe* teste, vêm sendo utilizados e a ciclofosfamida (CF) é o principal analito investigado, para demonstrar a contaminação das superfícies em vários locais de trabalho.

A determinação dos antineoplásicos em diferentes matrizes requer métodos validados, principalmente quanto aos limites de detecção e de quantificação, sendo a maioria dos métodos publicados, até o momento, capazes de analisar o fármaco isoladamente.

A técnica de detecção e quantificação dos FAN por cromatografia líquida de alta eficiência é comumente empregada, apesar da significativa diferença na estrutura química e

nas propriedades físico-químicas destes agentes (SPARREBOOM et al., 1999; ZAO; DASH, 1999; LARSON; KHAZAELI; DILON, 2003; TURCI et al., 2006; LI et al., 2007).

Assim, o objetivo deste trabalho foi desenvolver métodos analíticos para determinação simultânea de antineoplásicos, em superfícies e luvas, uma vez que a via dérmica é a principal para a absorção dessas substâncias e, é reduzido o número de métodos que determinem simultaneamente esses agentes, característica essa importante, sob o ponto de vista analítico, uma vez que é crescente a utilização da poliquimioterapia.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 ASPECTOS TEÓRICOS DO CÂNCER

Os fatores de risco de câncer podem ser encontrados no meio ambiente ou podem ser hereditários (SPENCE; JONHSTON, 2001). A maioria dos casos (cerca de 80%) está relacionada ao meio ambiente, onde se encontra um grande número de fatores de risco.

Entende-se por ambiente, o meio em geral (água, solo e ar), o ambiente ocupacional (quando insalubre), o ambiente social e cultural (estilo e hábitos de vida) e o ambiente de consumo (alimentos e medicamentos, entre outros). As mudanças provocadas no meio ambiente pelo próprio homem, os hábitos e estilos de vida adotados pelas pessoas podem determinar os diferentes tipos de câncer (ALMEIDA et al., 2005).

As alterações que geram as neoplasias podem ocorrer em genes especiais denominados protooncogenes, que a princípio são inativos em células normais. Quando ativados, os protooncogenes transformam-se em oncogenes, responsáveis pela malignização (transformação) das células normais. Essas células diferentes são então denominadas tumorais. As células alteradas passam então a se comportar de forma anormal, multiplicando-se de maneira descontrolada. Com a constante multiplicação celular, há a necessidade de que novos vasos sanguíneos sejam formados para que haja a nutrição destas células, em um processo denominado angiogênese (INCA, 2008).

A manutenção e o acúmulo de massa dessas células formam os tumores malignos. Elas também podem adquirir a capacidade de se desprenderem do tumor e migrarem, invadindo inicialmente os tecidos vizinhos, podendo chegar ao interior de um vaso sanguíneo ou linfático e, através desses, disseminarem-se, chegando a órgãos distantes do local onde o tumor se iniciou, formando as metástases (SPENCE; JONHSTON, 1996; INCA, 2008).

As células cancerosas são, geralmente, menos especializadas nas suas funções que as suas correspondentes normais. Conforme essas células vão substituindo as normais, os tecidos invadidos vão perdendo suas funções, assim, por exemplo, a invasão neoplásica dos pulmões gera alterações respiratórias, com isso há a disfunção orgânica que pode levar à falência do órgão ou, em casos mais graves à morte (ALMEIDA et al., 2005).

O câncer é classificado de acordo com o tipo de célula normal que o originou, e não de acordo com os tecidos para os quais se espalhou. Isso é o que se pode chamar de classificação primária (FOYE et al., 1996; ALMEIDA et al., 2005; INCA, 2008).

Segundo Murad e Katz (1996), quase todos os tipos podem ser colocados em um dos seguintes grupos, onde o sufixo *-oma* significa literalmente tumor:

- **carcinomas:** são os tipos mais comuns de câncer, originando-se de células que revestem o corpo, incluindo a pele (ectodermais) e uma série de revestimentos internos (endodermais), como os da boca, garganta, brônquios, esôfago, estômago, intestino, bexiga, útero e ovários, e os revestimentos dos ductos mamários, próstata e pâncreas.

Há também os carcinosarcomas, tumores geralmente de alta malignidade, derivados de dois tipos de tecidos embrionários e os teratomas, derivados de três tipos de tecidos embrionários (INCA, 2008).

- **sarcomas:** originam-se de tecidos de suporte, tais como ossos, tecido gorduroso, músculo e tecido fibroso de reforço, encontrados na maior parte do corpo;

- **linfomas:** originam-se dos linfócitos, encontradas em todo o organismo, particularmente em glândulas linfáticas e sangue. Os linfomas são divididos em Hodgkin e não Hodgkin, de acordo com o tipo de célula afetada;

- **leucemia:** origina-se dos leucócitos, com alterações na sua concentração, que passa a ser de 50.000 a 1.000.000 células por microlitro, causando problemas nos quais as células anormais não funcionam apropriadamente, além de restringirem o espaço da medula óssea, para que novas células sejam produzidas;

- **mielomas:** malignidades nas células plasmáticas da medula óssea que produzem os anticorpos;

- **tumores das células germinativas:** desenvolvem-se a partir de células dos testículos e/ou ovários;

- **melanomas:** originam-se dos melanócitos;

- **gliomas:** originam-se a partir de células do tecido de suporte cerebral ou da medula espinhal e, raramente ocorre metástase;

- **neuroblastomas:** tumor geralmente pediátrico (atinge cerca de 8 milhões de crianças até 15 anos de idade por ano; 80% dos casos com até 4 anos de idade) derivado de células

malignas embrionárias advindas de células neuronais primordiais, desde gânglios simpáticos até medula adrenal e outros pontos.

Existem três tipos principais de tratamento para o câncer: cirurgia, radioterapia e quimioterapia (FOYE et al., 1996; MURAD; KATZ, 1996). Mais recentemente tem-se usado a terapia de fotoradiação com derivados hematoporfirínicos (HTP) e a imunoterapia, sendo que o objetivo de cada um destes tratamentos é erradicar o câncer, normalmente por meio da terapia combinada, onde é associado mais de um tipo de tratamento (MACHADO, 2000; CHU; SARTORELLI, 2007).

A técnica cirúrgica pode levar à remoção de tumores com eficácia, se não houver metástase; no caso da leucemia, por exemplo, costuma ser necessário o uso de outros tipos conjuntos de terapia, incluindo o transplante de medula (MURAD; KATZ, 1996).

A radioterapia (geralmente raios gama, radioisótopos como cobalto-60, raios-X e até prótons e mésons pi negativos) é usada comumente em conjunto com a cirurgia, com incremento da eficiência do tratamento. Mesmo isoladamente, a radioterapia pode diminuir tumores grandes, diminuir a recorrência e a chance de metástase, sendo uma metodologia antineoplásica muito usada; entretanto, mesmo que sejam usados os sensitizadores (que diminuem os efeitos colaterais) o tratamento por radiação é sujeito a severas limitações (MURAD; KATZ, 1996).

A técnica antineoplásica de fotoradiação é um importante avanço, pois permite a localização e a destruição com maior seletividade pelo uso de radiação específica com fluorescência (l de 620-640 nm), para detecção e destruição de tumores com uso de fibras óticas. Contudo, pelo acúmulo de porfirinas em órgãos normais ainda não se obtém uso clínico interno, só em tumores superficiais (MACHADO, 2000).

O tratamento antineoplásico também tem usado o estímulo das próprias defesas do organismo pela imunoterapia, com o uso de interferona, interleucina-2 e mesmo o BCG (*Bacillus Calmette Guérin*) (MACHADO, 2000).

Com esses métodos de tratamento citados, um terço dos pacientes consegue ser curado através de medidas locais (cirurgia ou radioterapia), que são eficazes quando o tumor ainda não sofreu metástase por ocasião do tratamento. Todavia, nos demais casos, a neoplasia caracteriza-se pelo desenvolvimento precoce de micrometástases, indicando a necessidade de uma abordagem sistêmica, que pode ser efetuada, em cerca de 60-70% dos casos com a quimioterapia (MACHADO, 2000; CHU; SARTORELLI, 2007).

2.2. QUIMIOTERAPIA

O objetivo primário da quimioterapia é destruir as células neoplásicas, preservando as normais. Entretanto, a maioria dos agentes quimioterápicos atua de forma não-específica, lesando tanto células malignas quanto normais (MURAD; KATZ, 1996; CHU; SARTORELLI, 2007), o que explica a maior parte dos efeitos colaterais (MACHADO, 2000; OLIVEIRA, 2002).

Segundo Grahame e Smith-Aronson (2004) a resposta do tumor à quimioterapia pode ser classificada em três categorias:

- **tumores altamente quimiossensíveis:** são aqueles que exibem uma elevada taxa de resposta completa (desaparecimento completo de toda a doença detectável clínica e radiologicamente por, no mínimo, quatro semanas). Em geral, mostram-se sensíveis a diversos fármacos, e prefere-se a poliquimioterapia;

- **tumores moderadamente quimiossensíveis:** apresentam baixa taxa de resposta completa à quimioterapia (cerca de 10%), porém uma elevada taxa de resposta parcial (redução de mais de 50% da soma dos produtos dos dois maiores diâmetros perpendiculares, de todas as lesões mensuráveis por um período mínimo de quatro semanas) (cerca de 50%). A quimioterapia mostra-se útil como adjuvante para a cirurgia e radioterapia;

- **tumores quimiorresistentes:** apresentam uma taxa de resposta em torno de 20% e as respostas completas são raras, embora a quimioterapia possa desempenhar um papel auxiliar no caso de certos tipos de tumores. A quimioterapia de combinação raramente é mais eficaz do que o tratamento com apenas um único fármaco. Os agentes citotóxicos também podem ser utilizados para aliviar os sintomas, quando as medidas locais não têm êxito.

2.2.1 Classificação dos fármacos antineoplásicos

A importância clínica dos agentes antineoplásicos induz à necessidade de um estudo sistemático, o que primeiramente deveria ser feito com o uso de classificações químicas, levando-se em conta os diferentes grupos funcionais presentes na estrutura das moléculas. Contudo, a variedade de tipos de compostos utilizados em quimioterapia oncológica é tão grande, que tal classificação só pode ser feita indiretamente (ALMEIDA et al., 2005).

Chabner e Calabresi (1995) descreveram uma classificação conveniente dos fármacos antineoplásicos onde o critério baseia-se no mecanismo de ação das diferentes etapas da síntese de ADN, transcrição e transdução (Figura 1).

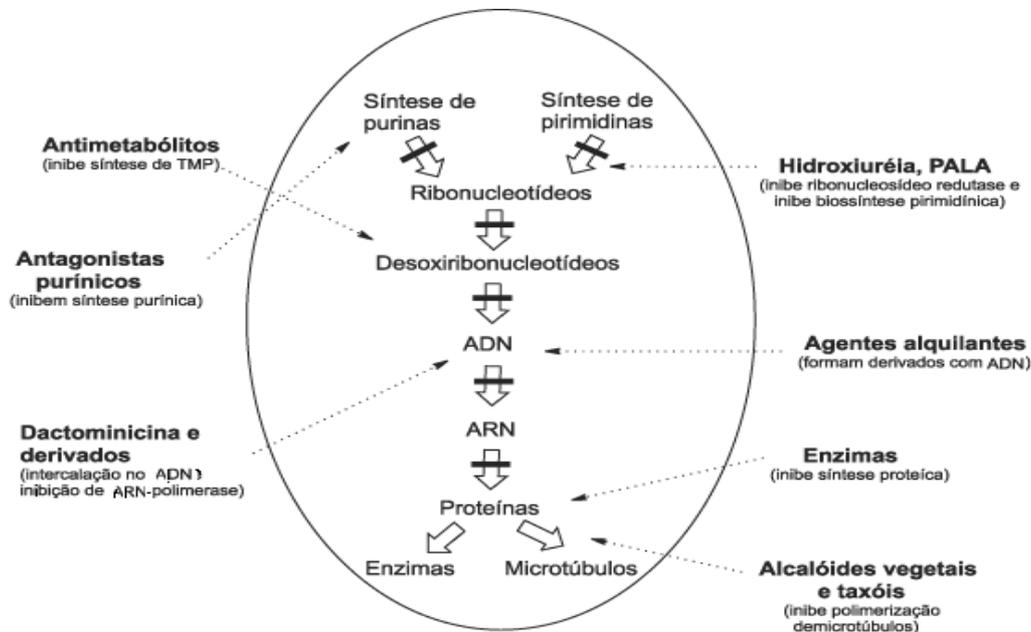


Figura 1- Classificação dos antineoplásicos segundo ponto de interferência no mecanismo de ação das diferentes etapas da síntese de ADN, transcrição e transdução
Fonte: CHABNER; CALABRESI, 1995

De fato, existem diversos mecanismos que estão envolvidos na evolução de uma célula normal para uma célula potencialmente maligna (HAHN; WEINBERG, 2002), mas a maior parte deles interfere na divisão celular e, assim, os conhecimentos do ciclo celular ou dos seus mecanismos são importantes para que haja a compreensão da etiologia do câncer (CHU; SARTORELLI, 2007).

Muitos fármacos efetivos contra o câncer, exercem sua ação sobre as células que se encontram no ciclo celular, razão pela qual são denominados fármacos específicos do ciclo celular (ECC) (MIGUEL JÚNIOR, 2007).

A pós-mitose é o período ativo que se pode chamar de crescimento celular e constitui a fase denominada G₁ (G de *gap* em inglês, que significa lacuna ou intervalo) ou interfase, em que enzimas necessárias à duplicação do ADN, síntese de proteínas e ARN são produzidas. A fase G₁ é seguida da fase S ou de síntese do ADN, dando seqüência ao período pré-mitótico da fase G₂, em que cessa a síntese do ADN, e continua a síntese do ARN, proteínas e são

produzidos os precursores dos microtúbulos e do fuso mitótico. Imediatamente, segue-se a fase M (mitose), em que as taxas de proteínas e de síntese do ARN diminuem abruptamente, enquanto o material genético é segregado para as células-filhas, e estas entram novamente na fase G₁. Esta fase é antecedida por uma fase G₀ (descanso celular), em que a síntese macromolecular é inativa, sendo a célula, nesse período, resistente à ação da maioria dos agentes antineoplásicos (MIGUEL JÚNIOR, 2007).

Um segundo grupo de fármacos, denominados fármacos inespecíficos do ciclo celular (ICC), tem a capacidade de esterilizar as células tumorais, independentemente de estarem atravessando o ciclo ou de se encontrarem em repouso no compartimento G₀ (MURAD; KATZ, 1996; CHABNER; CALABRESI, 1995; CHU; SARTORELLI, 2007).

Outra classificação elaborada por Korolkovas, 2005 engloba os hormônios e análogos, conforme demonstrado na Tabela 1.

Tabela 1- Classificação dos antineoplásicos, segundo Korolkovas

| Classe de fármacos | Exemplos |
|-----------------------------|---|
| agentes alquilantes | ciclofosfamida, clorambucila, ifosfamida, melfalano, carmustina, fotemustina, lomustina, bussulfano, dacarbazina |
| antimetabólitos | metotrexato, raltitrexato, capecitabina, citarabina, 5-fluoruracila, gencitabina, cladribina, fludarabina, mercaptopurina, tioguanina |
| compostos de platina | carboplatina, cisplatina, oxaliplatina |
| antibióticos | bleomicina, doxorubicina, daunorrubicina, dactinomicina, epirubicina, idarrubicina, mitomicina |
| produtos vegetais | vincristina, vimblastina, etoposido, teniposido |
| hormônios e análogos | dexametasona, prednisona, tamoxifeno |
| agentes diversos | aminoglutetimida, asparaginase, tretinoína, procarbazona, interferona α e β , interleucina-2 |

Fonte: Korolkovas, 2005

Nos esquemas quimioterápicos muitas doses são expressas em miligramas (mg) por metro quadrado (m²) de área de superfície corporal. Essa forma de expressão deve-se ao fato dos experimentos em animais demonstrarem uma relação mais estreita entre dose e efeito, quando a dose é corrigida pela área de superfície corporal, do que quando corrigida pelo peso

corporal. Aproximadamente, a área de superfície de um homem de 70 kg é geralmente considerada como cerca de 1,73 m² (GRAHAME; SMITH-ARONSON, 2004).

2.2.2 Quimioterapia de combinação ou poliquimioterapia

As combinações de quimioterápicos são particularmente eficazes nos tumores quimiossensíveis (GRAHAME; SMITH-ARONSON, 2004). É possível obter uma maior eficácia global do tratamento com toxicidade aceitável; por exemplo, a vincristina e a prednisolona não possui acentuada mielotoxicidade e podem ser combinadas com sucesso com a doxorrubicina, no tratamento da leucemia linfoblástica aguda (GRAHAME; SMITH-ARONSON, 2004).

Vários protocolos de tratamento de câncer foram desenvolvidos, e cada um é aplicável a um estado neoplásico em particular. O tratamento é intermitente para permitir a recuperação do tecido normal e do sistema imune do paciente, que também é afetado pelos fármacos, reduzindo assim, o risco de infecção grave (HOWLAND; MYCEK, 2007).

Os protocolos para tratamento na quimioterapia são identificados por acrônimos, identificando os agentes usados na combinação. A Tabela 2 exemplifica os protocolos mais usados e suas indicações (CHU; SARTORELLI, 2005; KOROLKOVAS, 2005).

Tabela 2 - Acrônimos dos protocolos de quimioterapia, seus componentes e sua principal indicação (*continua*)

| Acrônimo do protocolo | Componentes | Principal Indicação |
|------------------------------|--|----------------------------|
| ABVD | adriamicina (doxorrubicina), bleomicina, vimblastina, dacarbazina | linfoma de Hodgkin |
| AC | adriamicina, ciclofosfamida | câncer de mama |
| BEACOPP | bleomicina, etoposida, adriamicina, ciclofosfamida, oncovin [®] (vincristina), procarbazona, prednisona | linfoma de Hodgkin |

Tabela 2 - Acrônimos dos protocolos de quimioterapia, seus componentes e sua principal indicação (*continua*)

| Acrônimo do protocolo | Componentes | Principal Indicação |
|------------------------------|---|---|
| BEP | bleomicina, etoposida, cisplatina | câncer testicular, tumor de células germinais |
| CAF | ciclofosfamida, adriamicina, fluoruracila | câncer de mama |
| CAV | ciclofosfamida, adriamicina, vincristina | câncer de pulmão |
| CBV | ciclofosfamida, BCNU (carmustina), VP-16 (etoposida) | linfoma |
| ChIVPP/EVA | clorambucil, vincristina, procarbazina, prednisona, etoposida, vimblastina, adriamicina | linfoma de Hodgkin |
| CHOP | ciclofosfamida, hidroxidorrubicina (doxorubicina), oncovin [®] , prednisona | linfoma não - Hodgkin |
| CHOP ou CVP | ciclofosfamida, oncovin [®] (vincristina), prednisona | linfoma não - Hodgkin |
| CMF | ciclofosfamida, metotrexato, fluoruracila | câncer de mama |
| COPP | ciclofosfamida, oncovin [®] , procarbazina, prednisona | linfoma não - Hodgkin |
| EC | epirrubicina, ciclofosfamida | câncer de mama |
| ECF | epirrubicina, cisplatina, fluoruracila | câncer do estômago e câncer esofágico |
| FEC | fluoruracila, epirrubicina, ciclofosfamida | câncer de mama |
| FOLFOX | fluoruracila, leucovorina (ácido folínico), oxaliplatina | câncer colorretal |
| m-BACOD | metotrexato, bleomicina, adriamicina, ciclofosfamida, oncovin [®] dexametasona | linfoma não - Hodgkin |
| MACOP-B | metotrexato, ácido folínico, adriamicina, ciclofosfamida, oncovin [®] , prednisona, bleomicina | linfoma não - Hodgkin |
| MOPP | mecloretamina, oncovin [®] , procarbazina, prednisona | linfoma de Hodgkin |
| PCV | procarbazina, CCNU (lomustina), vincristina | tumor cerebral |

Tabela 2 - Acrônimos dos protocolos de quimioterapia, seus componentes e sua principal indicação (*conclusão*)

| Acrônimo do protocolo | Componentes | Principal Indicação |
|------------------------------|--|------------------------------------|
| ProMACE-CytaBOM | prednisona, adriamicina, ciclofosfamida, etoposida, citarabina, bleomicina, oncovin [®] , metotrexato, leucovorina (ácido folínico) | linfoma não- Hodgkin |
| R-FCM | rituximabe, fludarabina, ciclofosfamida, mitoxantrona | linfoma não- Hodgkin das células B |
| Stanford V | doxorubicina, mecloretamina, bleomicina, vimblastina, vincristina, etoposida, prednisona | linfoma de Hodgkin |
| VAD | vincristina, adriamicina, dexametasona | mieloma múltiplo |

Fontes: KOROLKOVAS, 2005; CHU; SARTORELLI, 2007

2.2.3 Fármacos utilizados na quimioterapia

Dentre os fármacos utilizados nos protocolos de quimioterapia, destacam-se: ciclofosfamida, doxorubicina, 5-fluoruracila, ifosfamida, metotrexato e paclitaxel, em vista da frequência da utilização e/ou da toxicidade. Abaixo, estão descritos alguns aspectos dessas substâncias, dentre eles a importância na prática clínica e a toxicidade.

2.2.3.1 Ciclofosfamida (CF)

a. Propriedades

É um agente antineoplásico sintético, pertencente à classe dos agentes alquilantes, no grupo das mostardas nitrogenadas. As tentativas de modificar a estrutura química da mecloretamina a fim obter maior seletividade para os tecidos neoplásicos levaram ao seu desenvolvimento (CHABNER; CALABRESI, 1995).

Constitui-se de um pó branco ou quase branco, cristalino e inodoro. É solúvel em água e álcool, fracamente solúvel em benzeno, etilenoglicol, tetracloreto de carbono e dioxano, pouco solúvel em éter e em acetona (MERCK INDEX, 2001).

Apresenta ponto de fusão de 49,9-53°C e a solução aquosa tem atividade por poucas horas, à temperatura ambiente (25°C), ocorrendo hidrólise a temperaturas acima de 30°C, com liberação de átomos de cloro e outros fumos tóxicos, tais como óxido de fósforo e fosfina. A relativa solubilidade em meio aquoso implica no aumento no tempo de exposição (ANDERSON et al., 1995; MINOIA; PERBELLINI, 2000). Deve ser estocada em recipientes herméticos com a temperatura de 2 a 8°C (MERCK INDEX, 2001).

Sua forma molecular é $C_7H_{15}Cl_2N_2O_2P$. H_2O e possui peso molecular de 279,1. Seu nome químico é 2- [bis (2-cloroetil) amino]tetrahydro-2H-1,3,2-oxazafosforina 2-óxido monohidrato e seu número de registro no Chemical Abstracts Service (CAS) é 50-18-0 (MARTINDALE, 1996). A Figura 2 mostra sua fórmula estrutural.

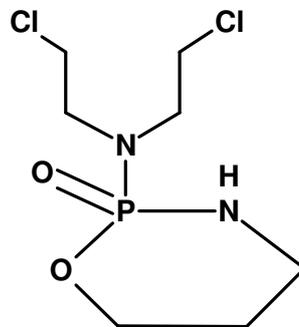


Figura 2- Fórmula estrutural da ciclofosfamida

Fonte: adaptado de CHU; SARTORELLI, 2007

b. Farmacocinética

A ciclofosfamida pode ser absorvida por via dérmica e inalatória. Sua meia-vida plasmática, após administração oral ou endovenosa, é de cerca de 6 a 8 horas e, nas primeiras 24 horas, há um rápido declínio da concentração. O pico plasmático dos produtos de biotransformação ativos é em torno de 3 a 6 horas, com meia-vida de eliminação de cerca de 9 horas (MINOIA; PERBELLINI, 2000). Estudos têm demonstrado que a cinética deste fármaco é linear e não dose-dependente (ANDERSON et al., 1995; MINOIA; PERBELLINI, 2000).

A via renal é a principal via de excreção do fármaco e de seus produtos de biotransformação. Na urina pode ser determinada 2/3 da dose administrada, sendo cerca de

10% excretada na forma inalterada. Sua concentração nas fezes não é elevada, entretanto, sua presença em grande quantidade na bile sugere a passagem pelo ciclo entero-hepático (MINOIA; PERBELLINI, 2000).

A atividade biológica da ciclofosfamida, bem como do restante dos integrantes do grupo das mostardas nitrogenadas, baseia-se na presença do grupo bis-(2-cloroetil) o qual sofre hidroxilação no fígado pelo grupo CYP2B, sendo assim convertida em 4-hidroxi-ciclofosfamida (CHABNER; CALABRESI, 1995).

A hidroxi-ciclofosfamida fica em equilíbrio dinâmico com seu tautômero acíclico aldofosfamida. A bioativação da aldofosfamida ocorre espontaneamente formando a acroleína e a mostarda de fosforamida, a qual se converte em mostarda nitrogenada. A acroleína se liga covalentemente às proteínas e causa cistite hemorrágica. A hidroxi-ciclofosfamida pode ainda ser oxidada pela aldeído oxidase no fígado ou no tecido tumoral e, talvez por outras enzimas, produzindo a carboxifosfamida e a 4-cetociclofosfamida, que não possuem atividade biológica significativa. Aparentemente, a lesão hepática é minimizada por essas reações secundárias, enquanto quantidades significativas dos metabólitos ativos, como a 4-hidroxifosfamida e a aldofosfamida são transportadas até o sítio alvo através do sangue (CHABNER; CALABRESI, 1995). Atravessa parcialmente a barreira hematoencefálica e placentária (KOROLKOVAS, 2005).

c. Farmacodinâmica

É um pró-fármaco necessitando de processo de ativação complexo (no fígado e tecidos) antes de exercer função antitumoral (KOROLKOVAS, 2005). A classe dos agentes alquilantes, a qual essa substância pertence, tem a propriedade de se tornar um eletrólito forte pela formação de intermediários de íon carbônio ou de complexos com a molécula de ácido dextrorribonucleico (ADN). Essas reações resultam na formação de ligações covalentes entre o ADN e componentes nucleofílicos, formados pela alquilação, tais como grupos fosfato, amino, sulfidril, hidroxila, carboxila e imidazol, causando danos estruturais ao ácido nucléico (BELIZÁRIO; GARAY; DELUCIA, 2004).

d. Indicações clínicas

O espectro clínico de atividade da ciclofosfamida é muito amplo. Entre as vantagens de seu uso estão a disponibilidade oral e a possibilidade de administração de doses durante períodos prolongados, possuindo, portanto, grande versatilidade de ação. Apesar de ser eficaz como único fármaco no tratamento de malignidades susceptíveis, é frequentemente usada em associação com outros fármacos antineoplásicos, em vista de sua toxicidade (CHABNER; CALABRESI, 1995).

Entre as principais indicações citam-se as desordens mieloproliferativas e linfoproliferativas (linfomas malignos, mieloma múltiplo, leucemias e micose fungóide); tumores malignos sólidos frequentemente sensíveis (neuroblastoma, adenocarcinoma de ovário e retinoblastoma); tumores malignos raramente sensíveis (carcinoma de mama e neoplasias malignas do pulmão).

Em virtude de suas potentes propriedades imunossupressoras, esse fármaco recebeu considerável atenção para o uso no controle da rejeição de órgãos após transplante, bem como em distúrbios não-neoplásicos associados a alterações de reatividade imune (CHABNER; CALABRESI, 1995; MARTINDALE, 1996).

e. Efeitos tóxicos

Os efeitos mais comumente observados são de alopecia, náuseas, vômitos e diarréias, leucocitose e cistite hemorrágica, podendo levar à fibrose da bexiga (HOWLAND; MYCEK, 2007).

Esse efeito pode ser atenuado através do aumento da ingestão de líquidos e administração de compostos doadores de sulfidril, como N-acetilcisteína ou MESNA [2-mercaptoetano sulfonato sódico]. Esses agentes interagem especificamente com a acroleína, formando compostos detoxificados (RANG et al., 2004).

Outros efeitos incluem aqueles observados nas células germinativas, resultando em amenorréia, atrofia testicular e esterilidade. Doença venoclusiva do fígado é verificada em cerca de 25% dos pacientes. Tumores secundários podem aparecer anos após o tratamento (HOWLAND; MYCEK, 2007).

A International Agency for Research on Cancer (IARC) classifica a ciclofosfamida no Grupo 1 (agente reconhecidamente carcinogênico, mutagênico e teratogênico para animais e humanos) (IARC, 2008).

Quanto à mutagenicidade, verificou-se que a ciclofosfamida induz mutações nos pares de bases de linhagem de *Salmonella typhimurium* na presença de ativação metabólica, testes estes negativos para *Escherichia coli*. Em células somáticas produz mutações nos genes, aberrações cromossômicas e troca de cromátides-irmãs. É demonstrada a formação de adutos de ADN, em vários sistemas *in vitro*, e o risco genético estimado é de 1 mg de ciclofosfamida por Kg de peso corpóreo, sob condições agudas de exposição (ANDERSON et al., 1995).

Em relação à carcinogenicidade, foi demonstrado que pacientes tratados com ciclofosfamida apresentam maior risco de desenvolver leucemia e outros tipos de câncer. Em um estudo realizado com 1349 pacientes, com doenças não-malignas, tratados com azatioprina, ciclofosfamida ou clorambucila por um período de 3 meses, foi demonstrado que houve um aumento de 5 vezes na incidência de carcinomas nas células escamosas epiteliais, de 9 vezes de câncer hepático e de 1,4 vezes de outros carcinomas (TURCI et al., 2003). Os principais órgãos-alvos da carcinogenicidade da ciclofosfamida são a medula óssea e o sistema urinário (TOMATIS, 2000).

2.2.3.2. Doxorrubicina (DOX)

a. Propriedades

Em muitos países o nome “adriamicina” é sua marca registrada. É um antibiótico antitumoral da classe das antraciclinas, produto da fermentação de um fungo denominado *Streptomyces peucetius*, variedade *caesius* (MARTINDALE, 1996).

Os antibióticos doxorrubicina, daunorrubicina e seus derivados estão entre os mais importantes agentes antitumorais, introduzidos na quimioterapia do câncer há cerca de duas décadas. Embora existam marcantes diferenças no uso clínico da doxorrubicina e daunorrubicina, suas estruturas químicas se diferem apenas pela presença de um grupo hidroxila no carbono 14 (BELIZÁRIO; GARAY; DELUCIA, 2004).

Apresenta-se na forma de cloridrato como pó cristalino de cor laranja a vermelho, higroscópico (MARTINDALE, 1996). Devido a sua forte ação irritante e vesicante ao contato com a pele, olhos e mucosas em geral, sua manipulação deve ser efetuada com a máxima cautela (MINOIA ; PERBELLINE, 2000).

É solúvel em água, metanol e cloreto de sódio 0,9%; insolúvel em acetona, benzeno, clorofórmio, éter etílico e em éter de petróleo (MERCK INDEX, 2001). Soluções aquosas possuem cor laranja em pH ácido e cor violeta em pH alcalino. Seu ponto de fusão, com decomposição, é de 204 a 205°C. Sua estocagem deve ser em recipientes herméticos e protegidos da luz (MERCK INDEX, 2001).

Sua fórmula molecular é $C_{27}H_{29}NO_{11}$. HCl com peso molecular de 580,0. Seu nome químico é 14-hidroxi-daunomicina com número de registro no Chemical Abstracts Service igual a 25316-40-9 (MARTINDALE, 1996). A Figura 3 demonstra sua fórmula estrutural.

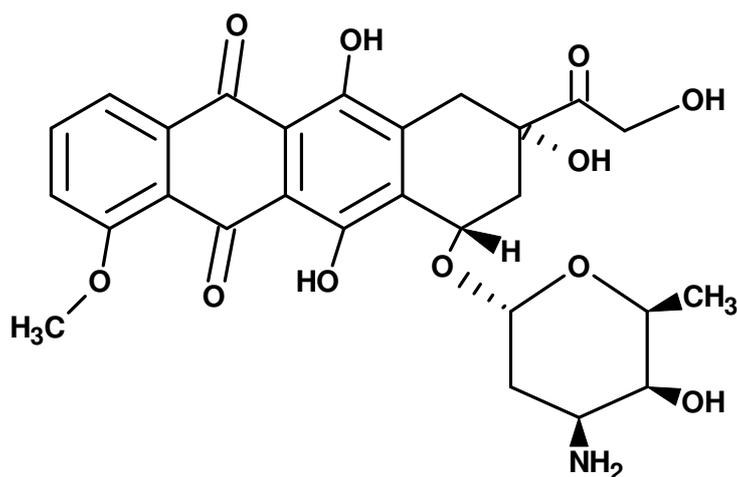


Figura 3- Fórmula estrutural da doxorubicina

Fonte: adaptado de CHU; SARTORELLI, 2007

b. Farmacocinética

O fármaco que necessita ser administrado por via intravenosa, pois é inativado no trato gastrointestinal, todavia o extravasamento pode levar à necrose tissular (CHU; SARTORELLI, 2007). A doxorubicina é metabolizada extensamente no fígado, e em outros tecidos pela enzima aldoceto redutase, resultando em doxorubicinol (adriamicinol), seu principal metabólito, o qual tem atividade antineoplásica, os outros metabólitos que são terapeuticamente inativos, incluem doxorubicinona (adriamicinona), agliconas e conjugados. O metabólito hidroxilado é a espécie ativa, enquanto a aglicona é inativa.

Até 50% do fármaco são eliminados nas fezes por excreção biliar; por conseguinte, é necessário reduzir a dose na presença de disfunção hepática. Embora as antraciclina sejam habitualmente administradas em um esquema a cada 3 semanas, foi constatado que esquemas alternativos de administração, como uma dose baixa semanalmente ou infusões contínuas de 72 a 96 h, produzem eficácia clínica equivalente com redução da toxicidade global (CHU; SARTORELLI, 2007). O fármaco confere coloração vermelha à urina (HOWLAND; MYCEK, 2007).

c. Farmacodinâmica

Exerce sua ação citotóxica por meio de quatro mecanismos principais: (1) inibição da topoisomerase II; (2) ligação de alta afinidade ao ADN através de intercalação, com o conseqüente bloqueio da síntese do ADN e ARN, bem como a ruptura dos filamentos de ADN; (3) ligação às membranas celulares, alterando a sua fluidez, assim como o transporte de íons; e (4) produção de radicais livres de semiquinona e de oxigênio por um processo redutor mediado por enzima e radicais de oxigênio. Esse mecanismo de radicais livres foi estabelecido como causa da cardiotoxicidade associada às antraciclina (CHU; SARTORELLI, 2007).

d. Indicações Clínicas

É um dos fármacos antineoplásicos de maior importância, com grande atividade clínica nos cânceres de mama, endométrio, ovário, testículo, tireóide, estômago, bexiga e pulmão; nos sarcomas de tecido mole e em vários cânceres infantis como o neuroblastoma, osteossarcoma e rabdomiossarcoma. Além disso, é amplamente utilizada em neoplasias malignas hematológicas, como a leucemia linfoblástica aguda, mieloma múltiplo e linfomas de Hodgkin e não Hodgkin (CHU; SARTORELLI, 2007).

e. Efeitos tóxicos

A doxorubicina causa mielossupressão temporária, mucosite (estomatite), as quais representam a toxicidade aguda, dose-limitante, desse agente. Além disso, são observados ainda, distúrbios do trato gastrointestinal, aumento da pigmentação da pele, alopecia intensa (BELIZÁRIO; GARAY; DELUCIA, 2004; HOWLAND; MYCEK, 2007). Efeitos pronunciados são observados sobre o sistema cardíaco, em vista da cardiotoxicidade dose-dependente e irreversível, resultante da geração de radicais livres e lipoperoxidação. Há algum sucesso na proteção a esses efeitos com a utilização do ferro, como quelante. A irradiação do tórax aumenta o risco de cardiotoxicidade. Uma nova formulação de doxorubicina encapsulada em lipossomos é apontada como menos cardiotóxica do que a formulação usual (HOWLAND; MYCEK, 2007). Está demonstrado que pacientes tratados com antraciclinas apresentam um maior risco de desenvolverem neoplasias secundárias (SCHMAHL et al (1982); TUCKER et al (1988) apud MINOIA; PERBELLINE, 2000)

A IARC classifica a doxorubicina (adriamicina) no grupo 2A, como provável carcinógeno humano, ou seja, há evidências inadequadas sobre a carcinogenicidade em humanos, mas evidências suficientes em animais (IARC, 2008).

2.2.3.3. 5-Fluoruracila (5-FU)

a. Propriedades

É um agente antineoplásico pertencente à classe dos antimetabólitos. Constitui-se de um pó branco ou quase branco, cristalino com leve odor. É pouco solúvel em água, solúvel em álcool, praticamente insolúvel em clorofórmio e éter (MARTINDALE, 1996). Seu ponto de fusão é de 282 a 283 °C sublimando a 190 a 200°C (NIOSH, 2004).

Sua estocagem deve ser em recipientes herméticos e protegidos da luz (MARTINDALE, 1996). Sua forma molecular é $C_4H_3FN_2O_2$ com peso molecular de 130,08. Seu nome químico é 5-fluor-1*H*-pirimidina-2,4-diona, e seu número de registro no Chemical Abstracts Service é 51-21-8 (MARTINDALE, 1996). A Figura 4 demonstra sua fórmula estrutural.

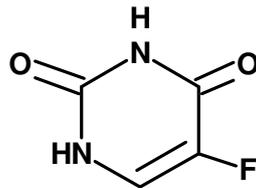


Figura 4- Fórmula estrutural da 5-fluoruracila

Fonte: adaptado de CHU; SARTORELLI, 2007

b. Farmacocinética

Estudos de Minoia; Perbellini, (2000) sugerem a absorção da 5-fluoruracila por via dérmica e inalatória. Não é administrada por via oral, visto que a sua biodisponibilidade é comprometida pela presença de altos níveis da enzima de degradação, a dihidropirimidina desidrogenase, na mucosa intestinal. Até 85% da dose de 5-FU são catabolizados por essa enzima (CHU; SARTORELLI, 2007).

Por via tópica, a absorção sistêmica é mínima (6%), com início de ação em 2 a 3 dias. Todavia, após administração intravenosa, é distribuído nos tecidos e fluidos extracelulares, incluindo tecidos neoplásicos, mucosa intestinal, medula óssea, fígado e cérebro. Atravessa a

barreira hematoencefálica e placentária, sendo seu volume de distribuição de $0,12 \text{ L Kg}^{-1}$. A biotransformação é rápida (em torno de uma hora) nos tecidos, produzindo os produtos 5-monofosfato de fluoruridina e monofosfato de floxuridina. A meia-vida plasmática é de 8 a 14 minutos (KOROLKOVAS, 2005).

A eliminação se dá principalmente por via respiratória (aproximadamente 90%, como dióxido de carbono em 8 a 12 horas) e em menor proporção por via renal dentro de 6 horas, aproximadamente de 7 a 20% na forma inalterada, sendo 90% na primeira hora (CHU; SARTORELLI, 2007; KOROLKOVAS, 2005).

c. Farmacodinâmica

A 5-fluoruracila, um análogo da pirimidina, tem um átomo estável de fluoreto no lugar de um átomo de hidrogênio na posição 5 do anel uracila. O fluoreto interfere na conversão do ácido desoxiuridílico a ácido timidílico, privando assim a célula de um dos precursores essenciais da síntese de ADN (HOWLAND; MYCEK, 2007).

Na sua forma inalterada a 5-FU não possui atividade antineoplásica. Ela entra na célula por um sistema de transporte com carregador e é convertida ao desoxinucleotídeo correspondente (monofosfato de 5-fluor-desoxiuridina (5-FdUMP)), que compete com o monofosfato de desoxiuridina (dUMP) pela timidilato-sintetase. A síntese de ADN diminui, levando ao crescimento celular desequilibrado e morte celular.

d. Indicações clínicas

É indicado para o tratamento do carcinoma colo-retal, gástrico, pancreático e de mama, em pacientes considerados incuráveis por cirurgia ou outros tratamentos. Ainda, para carcinoma prostático, de bexiga, do epitélio ovariano, cervical, endometrial, anal, esofágico e tumores metastáticos de carcinoma de pele, hepáticos, de cabeça e pescoço e hepatoblastoma, carcinoma adrenocortical, vulvar, peniano, tumores carcinóides gastrintestinais e neuroendócrinos em terapia combinada (BOENTE; SAMPAIO-FILHO; DelGIGLIO, 2002).

Na forma tópica o fármaco é indicado para tratamento de condições pré-cancerosas da pele e carcinoma de célula basal não sensível a outros tratamentos (CHABNER; CALABRESI, 1995; BRASIL, 2000).

e. Efeitos tóxicos

Além de náuseas e vômitos, a diarreia e a alopecia são frequentemente verificados, como também ulcerações graves da mucosa oral e gastrintestinal, depressão da medula óssea (com a injeção em *bolus*) e anorexia. Dermopatia denominada “síndrome mãos-pés” é encontrada depois de infusões prolongadas (HOWLAND; MYCEK, 2007).

A 5-FU é classificada no grupo 3 da IARC, ou seja, um agente não carcinógeno em humanos (IARC, 2008), entretanto existem controvérsias. TURCI et al. (2003), sugerem que esta classificação foi baseada em evidências inadequadas sobre carcinógenos em humanos e animais. A 5-FU é um agente mutagênico e teratogênico bem como a maioria dos fármacos antineoplásicos (FALCK et al. 1979; SORSA, HEMMINK, VAINIO, 1985; MICOLI et al. 2001). Larson, Khzaeli e Dilon (2003) sugerem que a 5-FU é um fármaco com probabilidade de causar efeitos teratogênicos durante a gravidez.

A administração por via tópica pode ocasionar reações na pele normal adjacente. Deve-se evitar exposição prolongada à radiação UV (ultravioleta), pois podem ocorrer reações de fotossensibilidade (KOROLKOVAS, 2005).

2.2.3.4. Ifosfamida (IFO)

a. Propriedades

É um agente antineoplásico, pertencente à classe dos agentes alquilantes, no grupo das mostardas nitrogenadas e é um análogo da ciclofosfamida, diferindo dessa pela substituição por um grupo 2-cloroetil no átomo de nitrogênio do anel da ciclofosfamida, como demonstrado na Figura 5 (BELIZÁRIO, GARAY, DELUCIA, 2004). Apresenta-se como pó cristalino, branco e, é solúvel em água, álcool metílico, álcool isopropílico, acetato de etila

e cloreto de metila. Seu pH a 10% em água é de 4 a 7 (MARTINDALE, 1996) e seu ponto de fusão é de 39 a 40°C (MERCK INDEX, 2001). Deve ser estocado em recipientes herméticos e protegido da luz, de preferência sob refrigeração (NIOSH, 2004).

Seu nome químico é 3-(2-cloroetil)-2-(2-cloroetil)-amino)tetrahidro-2H-1,3,2-oxazafosforina 2-óxido (Figura 5) e sua fórmula molecular é: $C_7 H_{15} Cl_2 N_2 O_2 P$ com peso molecular de 261,09. Seu registro no Chemical Abstracts Service (CAS) é nº 3778-73-2 (MARTINDALE, 1996).

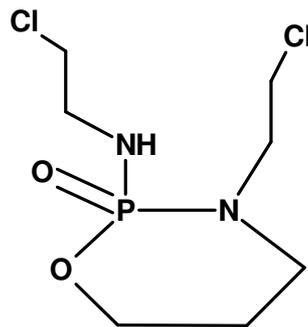


Figura 5- Fórmula estrutural da ifosfamida

Fonte: adaptado de CHU; SARTORELLI, 2007

b. Farmacocinética

Estudos de Minoia; Perbellini, (2000) sugerem a absorção da ifosfamida por via dérmica e inalatória. Ao contrário da maioria dos fármacos alquilantes, a ifosfamida é administrada preferencialmente pela via oral. *In vivo* é ativado pelas enzimas microssômicas hepáticas ao metabólito citotóxico (HOWLAND; MYCEK, 2007).

Sofre hidroxilação, formando o intermediário instável 4-hidroxi-ifosfamida; este se degrada rapidamente, originando o metabólito urinário estável, 4-cetoifosfamida; forma-se também o metabólito estável 4-carboxifosfamida, não sendo, esses metabólitos urinários citotóxicos. A oxidação enzimática das cadeias laterais e a desalquilação, subsequente, produzem os metabólitos urinários principais, ifosfamida descloroetila e ciclofosfamida descloroetila (KOROLKOVAS, 2005).

Para se tornar ativo, o composto também requer alteração metabólica no fígado, onde é transformado em 4-hidroxiifosfamida, a qual está em equilíbrio com a aldofosfamida. A aldofosfamida sofre então transformação espontânea em mostarda fosforamida, pela

eliminação da acroleína. O composto antitumoral ativo é a mostarda fosforamida, enquanto a acroleína é responsável pela urotoxicidade (BELIZÁRIO; GARAY; DELUCIA, 2004).

Em doses de 3,8 a 5 g m⁻² por dia, as concentrações plasmáticas decaem bifasicamente e a meia-vida de eliminação terminal é de cerca de 20 horas. Em doses de 1,6 a 2,4 g m⁻² por dia, as concentrações plasmáticas decaem exponencialmente e a meia-vida de eliminação é de cerca de 7 horas. Após doses de 5 g m⁻², é eliminada pela urina, na proporção de 70 a 86%, sendo em torno de 61% na forma inalterada. Após doses de 1,6 a 2,4 g m⁻² só 12 a 18% são excretados pela urina na forma inalterada, dentro de 72 horas (KOROLKOVAS, 2005).

Quantidades mínimas do fármaco são excretadas nas fezes após o transporte biliar (HOWLAND; MYCEK, 2007).

c. Farmacodinâmica

A classe dos agentes alquilantes, a qual essa substância pertence, tem a propriedade de se tornar um eletrólito forte pela formação de intermediários de íon carbônio ou de complexos com a molécula de ácido desoxirribonucleico (ADN). Essas reações resultam na formação de ligações covalentes entre o ADN e componentes nucleofílicos, formados pela alquilação, tais como grupos fosfato, amino, sulfidríla, hidroxila, carboxila e imidazol, causando danos estruturais ao ácido nucléico (BELIZÁRIO; GARAY; DELUCIA, 2004).

d. Indicações Clínicas

Apresenta um amplo espectro de atividade antitumoral quando usado isolado ou em combinação com outros fármacos citostáticos, especialmente em pacientes refratários a outros regimes terapêuticos. Os melhores resultados foram observados em tumores de testículo, câncer de pulmão, ovário, sarcomas de partes moles e também em linfomas (BELIZÁRIO; GARAY; DELUCIA, 2004).

e. Efeitos tóxicos

A ifosfamida faz parte de vários esquemas alternativos e apresenta toxicidade hematológica mais pronunciada que a ciclofosfamida (BOENTE; FILHO-SAMPAIO; Del GIGLIO, 2002). A toxicidade da ifosfamida é marcada pelo aparecimento de náuseas, vômitos, alopecia e moderada mielossupressão, elevação das enzimas hepáticas, nefrotoxicidade e urotoxicidade (BELIZÁRIO; GARAY; DELUCIA, 2004).

O fator dose-limitante em vista disso é a urotoxicidade que se caracteriza pelo aparecimento de cistite hemorrágica, e no esforço para prevenir a cistite hemorrágica, várias medidas têm sido empregadas, incluindo grande ingestão de líquidos, alcalinização da urina, a administração de diuréticos e instilação vesical de compostos como N-acetilcisteína e MESNA (BELIZÁRIO; GARAY; DELUCIA, 2004).

A ifosfamida tem demonstrado ser carcinogênica em animais, não havendo evidências de carcinogenicidade em humanos. Por este motivo, a IARC a classifica no grupo 3 (não carcinógena para humanos) (IARC, 2008). Entretanto devido a sua similaridade estrutural com a ciclofosfamida, a ifosfamida deve ser considerada um suspeito carcinógeno (TURCI et al., 2003; CHABNER; CALABRESI, 1996).

2.2.3.5. Metotrexato (MTX)

a. Propriedades

É um agente antineoplásico da classe dos antimetabólitos (HOWLAND; MYCEK, 2007). Apresenta-se como um pó cristalino, de cor amarela a laranja, higroscópica, não contendo mais que 13% de água (MERCK INDEX, 2001). É praticamente insolúvel em água, álcool, clorofórmio, éter e diclorometano, solúvel em soluções diluídas de ácidos minerais, soluções alcalinas de hidróxidos e carbonatos. Possui ponto de fusão de 185 a 204°C (MARTINDALE, 1996).

Sofre degradação se exposto à luz direta, com perda de aproximadamente 11,0% do fármaco, após 7 horas (MARTINDALE, 1996). Seu nome químico é (S)-2-(4-(((2,4-

diaminopteridino-6-il) metil) metilamino) benzamido) ácido pentanodióico, ou 4 -amino-4-deoxi-10-metilpteroil-L-glutâmico e seu registro no Chemical Abstracts Service é nº 59-05-02.

Sua forma molecular é $C_{20}H_{22}N_8O_5$, com peso molecular de 454,44 (MARTINDALE, 1996). Sua fórmula estrutural está representada na Figura 6.

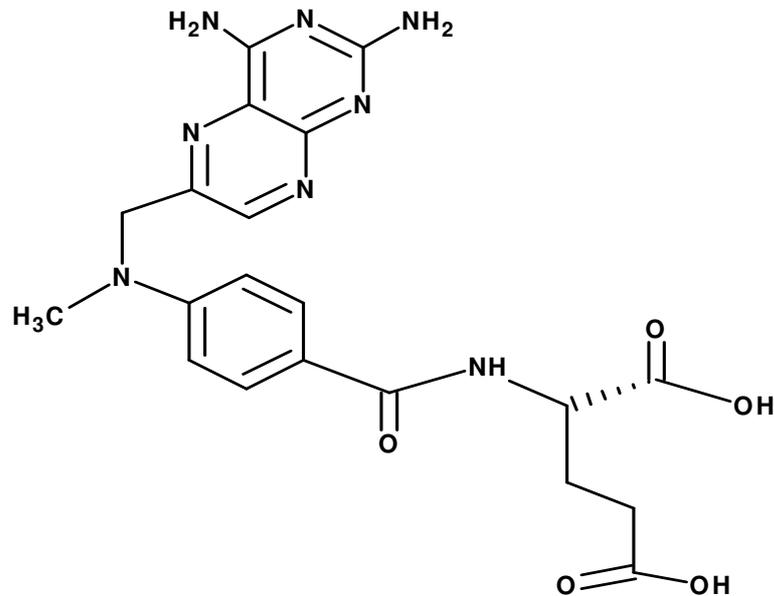


Figura 6- Fórmula estrutural do metotrexato

Fonte: adaptado de CHU; SARTORELLI, 2007

b. Farmacocinética

Estudos de Minoia; Perbellini, (2000) sugerem a absorção do metotrexato, por via dérmica e inalatória. A absorção oral é considerada elevada em doses inferiores a 30 mg m⁻²; em doses maiores, é incompleta. A biodisponibilidade oral é de 90% em doses até 30 mg m⁻² e diminui à medida que a dose é aumentada, sendo que o pico plasmático ocorre de 0,6 a 4 horas após administração oral. É absorvido completamente por via intramuscular e a biodisponibilidade é de 76 a 100%, não variando com a dose, com pico plasmático de 0,5-2 horas (KOROLKOVAS, 2005).

A taxa de ligação a proteínas é de 50% e seu volume de distribuição é de 0,4- 0,9 L por Kg de peso corpóreo. Atravessa a placenta e se distribui no epitélio intestinal, fígado e rins. É observado em líquido de ascite e derrames pleurais. A meia-vida de eliminação é de 8-

15 horas para altas doses e de 3-10 horas, em doses baixas. É pouco metabolizado (<10%) no fígado com produção de 7-hidroxi-metotrexato e poliglutamatos. É excretado pelos rins na forma inalterada (80 - 90%) e pela bile (0 - 10%), não podendo ser removido por diálise (CHABNER; CALABRESI, 1995).

c. Farmacodinâmica

Por ser um agente antimetabólito e antagonista do ácido fólico está estruturalmente relacionado com compostos normais encontrados do interior da célula. Estes compostos geralmente interferem na disponibilidade de precursores nucleotídeos de purina ou pirimidina, por inibirem a síntese de ADN ou de ARN (HOWLAND; MYCEK, 2007).

O MTX inibe competitivamente a enzima dihidrofolato redutase (DHFR) que é responsável pela conversão do ácido fólico em tetra-hidrofolato (THF). O THF é um co-fator necessário para a transferência de carbono de muitas reações metabólicas, incluindo a síntese de bases púricas e timidilato sintetase. A proliferação celular é afetada porque diminui a síntese de timidilato sintetase e conseqüentemente de precursores de nucleotídeos (bases púricas) que integram o ADN e ARN; afeta reparação e replicação dos ácidos nucléicos (HOWLAND; MYCEK, 2007).

Os tecidos com maior atividade metabólica e com maior crescimento celular são mais afetados pelo MXT e, nesses incluem-se os tecidos com células cancerígenas, folículos capilares, células epiteliais, do trato gastrointestinal e células de medula óssea, o que explica alguns efeitos farmacológicos e tóxicos (HOWLAND; MYCEK, 2007).

d. Indicações Clínicas

É indicado na terapia de tumores sólidos e leucemias, e mais recentemente como agente imunossupressor em transplante de órgãos, no tratamento de doenças auto-imunes, assim como psoríase, reumatismo e terapia severa da asma (RUBINO, 2001).

e. Efeitos tóxicos

Além de náuseas, vômitos e diarreias, os efeitos tóxicos mais frequentes ocorrem em tecidos que estão em permanente renovação. Assim, o MTX causa mucosite (estomatite) mielossupressão, eritema, urticária e alopecia (KOROLKOVAS, 2005).

De acordo com a IARC, o metotrexato não é classificado como um carcinógeno para humanos (grupo 3) (IARC, 2008), com controvérsias entre os autores. TURCI et al.(2003) considera o MTX como um agente mutagênico e teratogênico para humanos. A *United States Food and Drug Administration* (US-FDA) alerta para que o MTX seja evitado nas seguintes condições: gravidez, aleitamento, insuficiência hepática e renal (US- FDA, 2008).

2.2.3.6 Paclitaxel (PAC)

a. Propriedades

Denominado também como taxol, pertence à classe dos taxanos, é um alcalóide extraído da casca do teixo oriental, *Taxus brevifolia* (KOROLKOVAS, 2005). Apresenta-se como pó cristalino branco, altamente lipofílico, muito solúvel em acetato de etila, clorofórmio, metanol, solúvel em isopropranol e insolúvel em água. Possui ponto de fusão entre 216- 217° C (MARTINDALE, 1996).

A solução injetável é viscosa, incolor ou ligeiramente amarelada, contendo óleo polietoxilado de castor e álcool absoluto, como veículos (TURCI et al., 2003). Deve ser armazenado em recipientes herméticos sobre refrigeração e ao abrigo da luz (MERCK INDEX, 2001).

O paclitaxel é um triterpeno polidroxilado e possui também uma cadeia lateral ligada ao C-13 do sistema terpênico, que é essencial para a atividade biológica, conforme demonstrado na Figura 7 (SOUZA, 2004), sendo seu número de registro no CAS 33-069.62.4, com fórmula molecular $C_{47}H_{51}NO_{14}$ e peso molecular de 853,9 ((MARTINDALE, 1996).

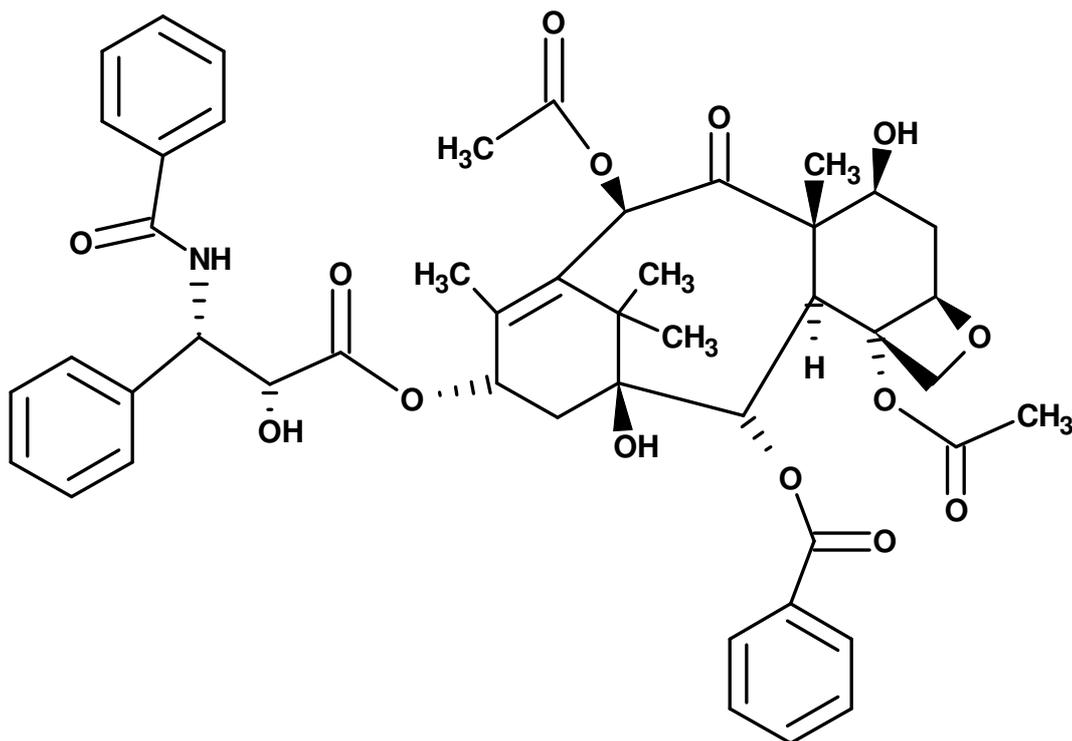


Figura 7- Fórmula estrutural do paclitaxel

Fonte: adaptado de CHU; SARTORELLI, 2007

b. Farmacocinética

Estudos de Minoia; Perbellini, (2000) sugerem a absorção do paclitaxel, por via dérmica e inalatória. A absorção pelo trato gastrointestinal é elevada e o pico plasmático é atingido entre 4 e 7 horas, após administração oral. Concentrações de equilíbrio são atingidas em 4 a 6 semanas. Por via intravenosa, a concentração apresenta declínio bifásico (HOWLAND; MYCEK, 2007). A meia-vida de eliminação é de 7 a 14 dias. Sofre intenso metabolismo hepático mediado pelo citocromo P450 (isoenzimas CYP3A e CYP2C) originando o 6 α -hidroxipaclitaxel e dois metabólitos menores, o 3-p-hidroxipaclitaxel e o 6- α ,3'-p-diidroxipaclitaxel. Em torno de 80% é excretado nas fezes, pela via hepatobiliar. Por conseguinte, é necessário efetuar uma redução da dose na presença de disfunção hepática (GRAHAME-SMITH; ARONSON, 2004; CHU; SARTORELLI, 2007).

c. Farmacodinâmica

É um taxano diterpênico anelar complexo, atuando como agente antimicrotúbulo. Os microtúbulos formados, excessivamente estáveis, não são funcionais, e não ocorre desagregação dos cromossomos, resultando na morte celular. Os efeitos inibitórios interrompem o ciclo celular na fase G₂ final ou na mitose (GRAHAME; SMITH-ARONSON, 2004; KOROLKOVAS, 2005).

d. Indicações Clínicas

É indicado para o tratamento de tumores sólidos, sarcoma de Kaposi, carcinoma de ovário, carcinoma de mama metastático e carcinoma de pulmão (CHU; SARTORELLI, 2007).

e. Efeitos tóxicos

Como efeitos decorrentes da toxicidade aguda, podem ser observados: náuseas, vômitos, hipotensão, arritmias e reações de hipersensibilidade (CHU; SARTORELLI, 2007). A neutropenia é um efeito tóxico limitante para a dose e, pacientes com menos de 1.500 neutrófilos mm⁻³ não devem receber este fármaco. Devido a graves reações de hipersensibilidade o paciente é pré-medicado com dexametasona e difenidramina, bem como bloqueadores H₂ (CHABNER; CALABRESI, 1995; CHU; SARTORELLI, 2007).

Os sintomas de toxicidade tardia são a depressão da medula óssea e a neuropatia sensorial periférica (CHU; SARTORELLI, 2007). Os fármacos antimetabólitos e inibidores do fuso mitótico são classificados no grupo 3, pela IARC, ou seja, não carcinógenos para humanos (IARC, 2008).

Devido ao seu uso ser recente, não é possível classificá-lo como um agente carcinogênico, mutagênico e teratogênico. Entretanto é possível considerá-lo como um agente potencialmente tóxico e medidas de precaução devem ser tomadas durante a manipulação, preparação e administração do paclitaxel (TURCI et al., 2003).

Segundo orientações do *United States Food and Drug Administration* (US-FDA), o paclitaxel apresenta classificação D na categoria de risco, ou seja, não deve ser usado durante a gravidez, pois pode causar danos ao feto (US-FDA, 2008).

2.2.4. Neoplasias induzidas pela quimioterapia

São indiscutíveis os efeitos benéficos da terapia antineoplásica. Todavia, as substâncias antineoplásicas mais efetivas também promovem vários efeitos tóxicos, que podem ser classificados como leves, moderados ou graves. Tais agentes podem promover o aparecimento de câncer secundário, depois de cessado o tratamento quimioterápico, pois muitos são mutagênicos, carcinogênicos e teratogênicos em vários sistemas experimentais e em humanos (FORNI, 1994; FERGUSON; PEARSON, 1996; BERTRAM, 2001).

Dados epidemiológicos sobre a associação de neoplasia secundária com o tratamento quimioterápico específico estão disponíveis para cerca de 30 agentes, e no caso das provas globais 10 compostos tem sido avaliados como conclusivos (SORSA; ANDERSON, 1996).

Foi relatado por Jackson, Stack, Waters, que pacientes que receberam tratamento por radiação seguido de quimioterapia apresentaram maior risco de desenvolver câncer secundário em relação aos pacientes que receberam primeiro a quimioterapia seguida de radiação (JACKSON; STACK; WATERS, 1996).

O estudo das propriedades carcinogênicas dos fármacos antineoplásicos é complexo e não uniforme, como o teste de mutagenicidade em bactérias. Na literatura é encontrada uma multiplicidade de métodos e modelos animais, envolvendo várias espécies, doses, esquemas e vias de administração, bem como várias maneiras de se analisar a capacidade de induzir a formação de tumores (WALKER; BOLE; 1973; VENEGAS et al., 1995).

Tal fato torna difícil a interpretação e comparação dos resultados, porém tem sido discutido que, apesar dos diferentes métodos utilizados, os resultados tomados como um todo são relativamente uniformes, e mostram que as ações carcinogênicas observadas em animais podem ser extrapoladas para seres humanos (WEISBURGER, 1977; VENEGAS et al., 1995).

A IARC tem reconhecido haver evidências suficientes de carcinogenicidade para alguns fármacos, como demonstrado na Tabela 3 (IARC, 2008).

O risco de tumor, após o tratamento com estes fármacos, é confirmado pela constatação da maior incidência de neoplasias em indivíduos que recebem tais substâncias como parte do tratamento, após o transplante de órgãos. Também nos pacientes com neoplasia e tratados com esses fármacos, foi documentado o desenvolvimento de câncer secundário que não faziam parte da história natural da patologia tumoral primitiva, tal como elevada incidência de leucemia mielóide aguda em indivíduos com tumores sólidos. Efeitos sobre o sistema reprodutivo, que consistem em aumento da indução ao aborto e malformações, foram também documentados (ALESSIO et al. 1996).

Tabela 3 - Classificação dos fármacos antineoplásicos, quanto à carcinogenicidade

| <i>Grupo</i> | <i>Fármaco</i> |
|---|---|
| 1 carcinógenos para o ser humano | - ciclofosfamida - N,N-bis(2-cloroetil)-2-naftilamina - 1,4-butanodiol dimetansulfonato - clorambucila - 1-(2-cloroetil)-3-(4-metlcicloexil)-1-nitrosouréia - melfalano - terapia composta por mostarda nitrogenada, vincristina, procarbazina e prednisona |
| 2A prováveis carcinógenos para o ser humano | - adriamicina - biscloroetilnitrosouréia - 1-(2-cloroetil)-cicloexil-1-nitrosouréia - cisplatina - N-metil-N-nitrosouréia - mostarda nitrogenada - cloridrato de procarbazina - azacitidina e clorozotocina |
| 2B possíveis carcinógenos para o ser humano | - mostarda nitrogenada N-óxido - dacarbazina - daunorrubicina e mitomicina c |
| 3 não classificados com relação à carcinogenicidade humana | - ifosfamida - 5- fluoruracila - prednisona - metotrexato - vincristina e vimblastina |

Fonte: IARC, 2008

2.3 MONITORIZAÇÃO DA EXPOSIÇÃO OCUPACIONAL AOS ANTINEOPLÁSICOS

Falck et al. (1979) foram os primeiros autores a evidenciar a atividade mutagênica em amostras de urina de enfermeiras que manipulavam fármacos antineoplásicos. A urina dessas trabalhadoras foi coletada no início e no final da semana de trabalho, e os resultados obtidos foram comparados, concluindo-se que o risco de mutagenicidade aumenta quando se eleva o tempo de exposição.

A ocorrência de perdas fetais e malformações entre os filhos de profissionais da área de saúde em contato com antineoplásicos foram estudadas por Selevan et al. (1985). Nesse estudo foi relatado que a ocorrência desses efeitos poderia estar associada à exposição à ciclofosfamida, doxorubicina e vincristina, sendo a chance de perda fetal duas vezes maior nas enfermeiras expostas no primeiro trimestre. Estudos evidenciam a redução de riscos quando medidas efetivas de proteção são adotadas (SORSA; HEMMINK; VAINIO, 1985, CASTIGLIA et al., 2008).

Os trabalhadores expostos aos FAN são aqueles que não só manuseiam os agentes durante o preparo e a administração aos pacientes mas também, aqueles envolvidos na fabricação dos fármacos em indústrias farmacêuticas e na limpeza, pelo contato com as excretas do pacientes. Os pesquisadores também podem ser considerados como um grupo exposto (ALMEIDA, 2004).

Para a avaliação da exposição aos antineoplásicos deve ser planejada uma diretriz que compreenda os cuidados com o ambiente de trabalho, com a manipulação dos fármacos e com os profissionais envolvidos. Neste planejamento, revestem-se de grande importância os procedimentos de monitorização ambiental e biológica.

A avaliação da exposição ocupacional aos antineoplásicos pode ser realizada através da monitorização ambiental, da análise de superfícies, luvas e máscaras e da monitorização biológica. Biologicamente, pode ser efetuada a determinação dos agentes ou de seus produtos de biotransformação, testes de atividade mutagênica em amostras de urina, testes citogenéticos, determinação de tio éteres urinários, ensaio da hipoxantina guanina fosfororiboxitranferase, avaliação de danos ao ADN e determinação dos níveis de ácido D-glicárico (BAKER; CONNOR, 1996; SORSA; ANDERSON, 1996).

A Figura 8 resume os aspectos da avaliação da exposição ocupacional aos antineoplásicos.

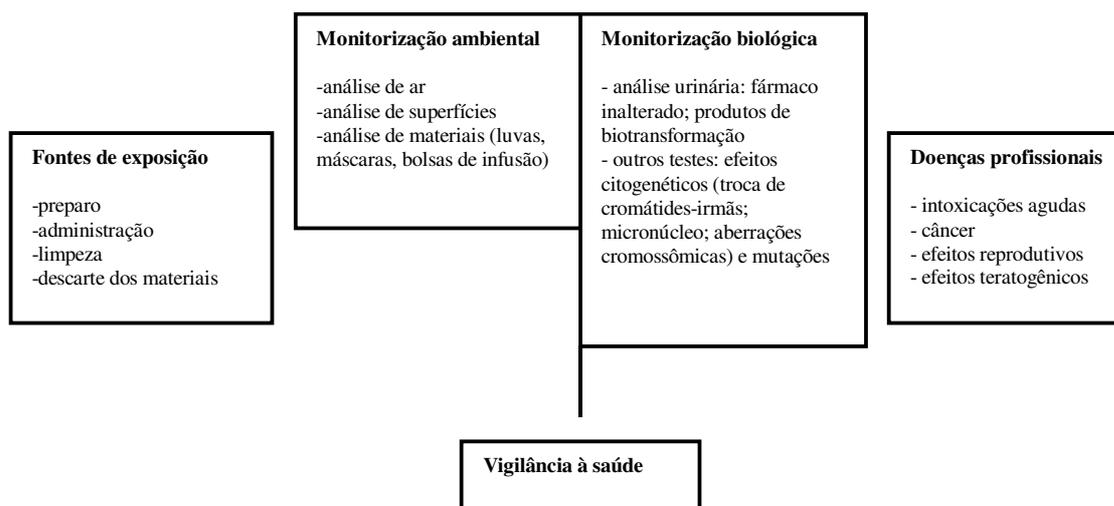


Figura 8- Aspectos da exposição ocupacional aos fármacos antineoplásicos

Fonte: adaptado de SORSA; ANDERSON, 1996

Para a obtenção das informações deve ser utilizado um questionário para caracterizar toda a atividade pertinente ao emprego e ao contato com os fármacos. O modelo padronizado se divide em quatro sessões: ambiente, pessoal, fármacos e descarte (APOSTOLI; FACCO; ALESSIO, 2001).

Este questionário, além de fornecer dados sobre as condições de trabalho, garante uma correta aplicação da monitorização ambiental e biológica.

A determinação dos antineoplásicos no ambiente e nos fluídos biológicos (sangue e urina) requer métodos validados quanto à sensibilidade, já que a exposição é a baixas concentrações. Parâmetros como a precisão e exatidão são, também, quesitos essenciais na validação de um método analítico confiável (SESSINK; BOS, 1999; APOSTOLI; FACCO; ALESSIO, 2001).

Partindo do pressuposto que na população em geral estes fármacos não são encontrados, exceto compostos com platina, os resultados biológicos, ainda que baixos (em particular das classes 1, 2A, 2B, segundo a IARC) fornecem indicações úteis sobre os procedimentos adotados na manipulação de tais substâncias (APOSTOLI; FACCO; ALESSIO, 2001).

Para a monitorização biológica dos FAN, os métodos podem ser divididos em dois grupos: seletivos e não-seletivos. Para os métodos seletivos, a concentração da substância ou

do seu produto é determinada. Já para os não seletivos, neste caso os mais utilizados, são determinadas as propriedades em comum a um determinado grupo químico, tais como mutagenicidade e eletrofilicidade (SESSINK; BOS, 1999).

Durante a última década foram desenvolvidos novos métodos para a avaliação da exposição ocupacional aos agentes antineoplásicos que detectam efeitos biológicos precoces. Entre estes efeitos, a frequência de aberrações cromossômicas, troca de cromátides-irmãs, presença de micronúcleos, são os mais estudados e propostos. Convém ressaltar que, nos estudos realizados em grupos de trabalhadores que adotam medidas de proteção, os indicadores citogenéticos mostraram-se negativos (SESSINK et al., 1993; ALESSIO et al., 1996; FORNI; BONATTI; MERLER, 1996; SESSINK; BOS, 1999).

Os testes de atividade mutagênica em amostras de urina são afetados por diversos fatores tais como a dieta, o hábito de fumar ou o manuseio de outras substâncias mutagênicas. Há muita controvérsia entre laboratórios que testam a mesma substância. TUFFNEL et al. (1986) avaliaram a sensibilidade do teste de Ames. Os autores utilizaram a bactéria *Salmonella typhimurium*, linhagens TA98 e TA 100, e 17 antineoplásicos. A avaliação na urina dos pacientes tratados demonstrou que 11 dos 17 fármacos não apresentaram atividade mutagênica, todavia muitos destes foram considerados tóxicos aos organismos. A urina dos pacientes tratados com ciclofosfamida e doxorubicina mostrou atividade mutagênica dose-dependente, não sendo detectada em indivíduos que trabalham com medidas de proteção. Os autores sugeriram que devido à baixa sensibilidade do teste de Ames e à interferência do ambiente nos resultados, advindos de vários outros fatores, esse teste não deveria ser utilizado rotineiramente na avaliação da exposição ocupacional aos FAN.

2.4 ANÁLISE DE ANTINEOPLÁSTICOS EM MATRIZES NÃO-BIOLÓGICAS

Para avaliar a exposição potencial a uma mistura de FAN, são considerados individualmente a ciclofosfamida, a 5-fluoruracila, o metotrexato e os compostos de coordenação de platina. Em uma escala de prioridade, as amostras obtidas de superfícies de trabalho devem ser as primeiras a serem coletadas e analisadas, seguidas de amostras biológicas, tais como sangue e urina (APOSTOLI; FACCO; ALESSIO, 2001).

A monitorização dos antineoplásicos aerodispersos não fornece indicações úteis sobre o nível de exposição dos trabalhadores. Quando esta informação se faz necessária, a amostragem da área e pessoal deve ser realizada, individualizando pontos significativos e dispendendo particular atenção à área caracterizada como a de maior contaminação (SESSINK; BOS, 1999; APOSTOLI; FACCO; ALESSIO, 2001).

A Tabela 4 apresenta diversos tipos de amostragem ambiental utilizados para a avaliação da exposição ocupacional aos antineoplásicos.

Tabela 4 - Tipos de amostragem para avaliar a exposição dos trabalhadores da área da saúde, aos quimioterápicos antineoplásicos e as possíveis informações fornecidas

| Tipo de amostragem | Informações fornecidas |
|--|--|
| -ambiental, do tipo pessoal | concentração aerodispersa do fármaco na zona respiratória do trabalhador |
| -ambiental, no centro do local de trabalho | concentração aerodispersa difusa no ambiente de trabalho |
| -ambiental, na saída do filtro da cabine de exaustão | verifica o sistema de filtração da cabine a fluxo laminar |
| - <i>wipe</i> teste, na bancada da cabine de exaustão | nível de contaminação dos quimioterápicos sobre a superfície de trabalho, vidro e parede lateral da cabine |
| - <i>wipe</i> teste, no pavimento próximo à cabine de exaustão | presença de resíduos de quimioterápicos fora da cabine com fluxo laminar ou nas vestimentas de trabalho contaminadas |
| - <i>wipe</i> teste, em diversos pontos do local de manipulação do fármaco | verifica a possível contaminação difusa interna e externamente no local de preparação do fármaco |
| - <i>wipe</i> teste, nos objetos e maçanetas de portas | procedimento de trabalho não efetuado em condições de segurança |

Fonte: APOSTOLI; FACCO; ALESSIO, 2001

O método mais empregado para a obtenção de informações sobre a exposição é o *wipe* teste, que avalia a presença de resíduos sobre uma superfície específica ou objetos, coletados com auxílio de tecido. A análise da superfície é mais útil, sensível, reproduzível, em relação à análise ambiental e, a técnica para efetuar-la é de baixo custo e relativamente acessível. Do mesmo modo, a análise de materiais, tais como luvas e máscaras, pode ser útil, quando corretamente padronizada (MARTINS, 2003).

Utilizando esta técnica para monitorizar a superfície de trabalho, no local de preparação dos fármacos, é possível adquirir diversos tipos de informações. O número de *wipe* teste pode ser aumentado ou diminuído em função da exigência específica. Por exemplo, para verificar a eficiência do procedimento de descontaminação da parede interna da cabine (incluindo a superfície de trabalho), é recomendável a execução de dupla amostragem: uma primeira série de *wipe* teste é feita ao final da atividade de preparação do fármaco, antes da descontaminação, sucessivamente se procede à segunda amostragem, no mesmo ponto anterior, após a limpeza da superfície. A análise do *wipe* teste pode ser limitada a 1 ou 2 fármacos (em geral, aqueles mais usados) ou extensiva a todas as substâncias utilizadas (APOSTOLI; FACCO; ALESSIO, 2001).

Considerando a estrutura molecular e o estado físico dos quimioterápicos mais empregados e sua lenta degradação, o *wipe* teste pode evidenciar o acúmulo de tais agentes sobre a superfície (APOSTOLI et al., 1996). Levando-se em conta a via transcutânea como uma das mais importantes para a absorção destes agentes, a demonstração do grau de contaminação da superfície parece ser perfeitamente justificável.

Para o *wipe* teste é necessário delimitar uma superfície, utilizar um sistema de coleta (por exemplo, uma gaze de algodão estéril de 1 a 2g) previamente embebido em uma solução ou em solvente de extração. A superfície é esfregada realizando-se ligeira pressão com a gaze, posteriormente colocada em frasco, com tampa de teflon. Esse procedimento pode ser utilizado também para análise de materiais (luvas, máscaras), modificando para isto alguns procedimentos de coleta (APOSTOLI et al., 1996).

Os *wipe* teste são geralmente constituídos de tecido de algodão, sobrepostos em número variável de 2 a 5, umedecidos com solvente de extração ou solução tampão a pH adequado. Todavia, pode ser observada interferência entre as partículas do tecido de algodão e os analitos e, por este motivo, é aconselhado o uso de TNT (tecido não tecido) que não deixa partículas. Para limpar as superfícies e os objetos de trabalho, utilizam-se tecidos embebidos

em solução, geralmente, de hidróxido de sódio. Em particular, para os pavimentos, o tecido não é umedecido sendo a solução de NaOH colocada diretamente sobre a superfície (MINOIA; PERBELLINI, 2000).

Os possíveis pontos de amostragem de *wipe* teste nos locais de preparação dos FAN são a cabine com fluxo laminar, bancadas, maçanetas, pavimento próximo a cabine e próximo às bancadas, entre outros. Analogamente ao que foi exposto para a unidade de preparação do fármaco, deve ser avaliada com atenção a possibilidade de transferência de micro quantidades residuais à área externa de trabalho. Por este motivo, deve ser realizada amostragem *wipe* teste em diversos locais, tais como maçanetas, leitos dos pacientes, bolsas de infusão entre outros (APOSTOLI; FACCO; ALESSIO, 2001).

Luvas e bolsas de infusão também podem ser ferramentas importantes para a monitorização da exposição ocupacional aos FAN. As bolsas podem ser contaminadas pelo contato com luvas, utilizadas durante a preparação dos fármacos e são importantes fontes de contaminação para os trabalhadores e outras pessoas presentes nos locais de administração, já que em muitos hospitais o acesso não é restrito.

Em estudo realizado em 1992, SESSINK et al. obtiveram concentrações em torno de 11 e 21 µg de ciclofosfamida por par de luvas. Priante; Alessandro; Clonfero (1994) sugeriram que com a análise de luvas utilizadas pelos trabalhadores pode ser estimada a exposição cutânea aos FAN.

Em investigação conduzida por Minoia et al. (1998), em hospitais italianos a determinação de ciclofosfamida na parte interna de luvas forneceu uma positividade superior a 50%. Os resultados encontrados por esses autores sugerem significativa introdução do fármaco pela via dérmica, quando as luvas utilizadas pelos trabalhadores são de vinil ou de látex, pois foi evidenciado que a ciclofosfamida é permeável às luvas confeccionadas com estes dois tipos de materiais.

Na Tabela 5 podem ser verificados os estudos nos quais a técnica de amostragem *wipe* teste foi utilizada para a avaliação da exposição aos antineoplásicos.

Tabela 5 - Avaliação dos antineoplásicos através de análise em superfície/objeto pela técnica de amostragem *wipe* teste de 1992 a 2008

| Princípio Ativo | Superfície / Objeto | Referência |
|--|---|---|
| ciclofosfamida, 5-fluoruracila, metotrexato | pavimento, mesa, superfície da cabine | SESSINK et al. (1992) |
| ciclofosfamida | pavimento, cabine, superfície de trabalho | McDEVITT; LEES, McDIARMID (1993) |
| ciclofosfamida | balança, mesa de trabalho, maçaneta da porta, pavimento, telefone | SESSINK et al. (1993) |
| 5-fluoruracila | balança, pavimento, maçaneta da porta | SESSINK et al. (1994b) |
| ciclofosfamida, ifosfamida, 5-fluoruracila, metotrexato | cabine, mesa de trabalho, pavimento, telefone, maçaneta da porta e geladeira, sola do calçado dos trabalhadores | MINOIA et al. (1998) |
| ciclofosfamida e ifosfamida | maçaneta da porta, superfície da cabine, superfícies próximas ao filtro da cabine, pavimento | MINOIA et al. (1999) |
| ciclofosfamida, ifosfamida e 5-fluoruracila | cabine e pavimento | CONNOR et al. (1999) |
| metotrexato | cabine, pavimento, telefone, maçaneta, janelas | FLORIDIA et al. (1999a) |
| 5-fluoruracila | cabine, pavimento, telefone, maçaneta, janelas | FLORIDIA et al. (1999b) |
| ciclofosfamida, ifosfamida, 5-fluoruracila, platina | pavimento, bancadas, caixas, frascos | SCHMAUS; SCHIERL; FUNCK, (2002) |
| ciclofosfamida | cabine, pavimento, maçaneta, luvas, bolsas de infusão | MARTINS ; APOSTOLI; DELLA ROSA, (2008) |

Em estudo conduzido por Martins; Apostoli; Della Rosa (2004), de 42 bolsas de infusão analisadas, somente 6 apresentaram ciclofosfamida abaixo do limite de detecção do método. As outras 36, revelaram contaminação em níveis quantificáveis, sendo o valor máximo encontrado em torno de 42 µg. Já, em 2008 esses mesmos autores, analisaram *wipe* testes provenientes de superfícies de trabalho, luvas e bolsas de infusão e demonstraram contaminação com níveis de até 141 µg de ciclofosfamida, com valores altos e inesperados, mesmo após os procedimentos de descontaminação das superfícies.

As técnicas instrumentais empregadas para a determinação de antineoplásicos em matrizes não-biológicas variam em função do material utilizado para a coleta e da característica do composto a ser analisado.

O limite de detecção é um requisito fundamental para os métodos empregados na análise dos antineoplásicos. Como consequência da adoção de medidas preventivas e protetivas, os níveis de exposição devem ser baixos e, assim, a metodologia empregada deve ser capaz de revelar o analito na ordem de traços (ng) e, em alguns casos, como na análise de platina, ultratraços (pg) (MARTINS, 2003).

Larson; Khazaeli; Dilon (2002) sugeriram que o método por cromatografia líquida de alta eficiência pode ser utilizado para a determinação de antineoplásicos em amostras *wipe* teste, pois em estudo realizado por estes autores, os resultados foram suficientemente exatos e precisos nas áreas de manipulação destes fármacos em hospitais.

Para a análise dos antineoplásicos são escassos métodos que os determinem simultaneamente, visto que apresentam diferentes propriedades físico-químicas. Na Tabela 6 podem ser verificados os valores de pKa (constante de dissociação ácida) e solubilidade de diferentes fármacos, demonstrando a diversidade entre eles e, conseqüentemente a dificuldade em determiná-los simultaneamente.

Tabela 6 - Valores de pKa e solubilidade de diferentes fármacos antineoplásicos

| Fármaco | Peso Molecular | pKa | Solubilidade |
|----------------|-----------------------|----------------|---|
| ciclofosfamida | 279 | 2,84 | água, álcool e levemente em éter |
| doxorubicina | 580 | 7,35/8,68 | água, cloreto de sódio 0,9%, metanol |
| 5-fluoruracila | 130 | 7,68 | pouco solúvel em água, solúvel em álcool |
| ifosfamida | 261 | 1,45 | água, álcool e levemente em éter |
| metotrexato | 454 | 3,54/5,09 | soluções diluídas de ácidos minerais e alcalinas de hidróxidos e carbonatos |
| paclitaxel | 854 | não disponível | insolúvel em água, solúvel em isopropanol |

Fonte: Martindale, 1996; Merck Index, 2001; SciFinder, 2006.

A determinação de CF e IFO em superfícies, máscaras, luvas, entre outras matrizes, geralmente é efetuada através de cromatografia à gás, com detector de nitrogênio-fósforo ou acoplada à espectrometria de massa. Ressalta-se que por serem isômeros, geralmente, esses dois fármacos são determinados em uma única análise, que pode ser realizada por CLAE,

conforme demonstram as Tabelas 7 e 8. Apesar dessa técnica apresentar maior limite de detecção, os autores dos estudos discutem que ainda assim, ela é válida pois, na maioria das vezes, é suficiente para detectar os compostos em locais contaminados.

Para esses analitos, quando se utiliza a CLAE (cromatografia líquida de alta eficiência), o comprimento de onda varia de 193 a 207 nm e as colunas de fase reversa, C18, são as mais empregadas, sendo a constituição da fase móvel, predominantemente aquosa e tamponada (MINOIA; PERBELLINI, 2000; TURCI et al., 2003).

Tabela 7- Técnica de detecção, limites de detecção e de quantificação, faixa de trabalho dos métodos descritos na literatura para análise de ciclofosfamida, em matrizes não-biológicas, de 1992 a 2008 (*continua*)

| Amostra | Técnica de Detecção | Limite de Detecção | Limite de Quantificação | Faixa de Trabalho | Referência |
|---------------------|---------------------|---|-------------------------|-----------------------------|----------------------------------|
| superfícies e luvas | CG-EM | 0,01 ng cm ⁻² 0,1 µg por par de luvas | não especificado | não especificado | SESSINK et al. (1992) |
| superfícies | CLAE-UV | 0,003 µg cm ⁻² | não especificado | não especificado | McDEVITT; LEE; McDIARMID, (1993) |
| luvas | CG-EM | 0,08 µg por par de luvas | não especificado | não especificado | SESSINK et al. (1994a) |
| luvas | CG-EM | 0,13 µg por par de luvas | não especificado | não especificado | SESSINK et al. (1997) |
| superfícies e luvas | CLAE-EM/EM | 1 ng dm ⁻² 20 ng (par de luvas) | não especificado | não especificado | MINOIA et al. (1998) |
| superfícies | CG-EM/EM | 0,1 ng mL ⁻¹ | não especificado | não especificado | CONNOR et al. (1999) |
| superfícies | CG-EM | 2,5 pg cm ⁻² | 7,5 pg cm ⁻² | não especificado | SCHMAUS, SCHIERL; FUNCK, (2002) |
| superfícies | CLAE-UV | 0,5 µg mL ⁻¹ | não especificado | 0,5- 10 µg mL ⁻¹ | LARSON, KHAZAELI; DILON, (2003) |
| superfícies e luvas | CG-EM/EM | 0,1 ng cm ⁻² | não especificado | não especificado | CRAUSTE-MANCIET et al. (2005) |
| superfícies | CLAE - EM/EM | 0,05 pg cm ⁻² | 0,2 pg cm ⁻² | 0,1- 2000 ng | HEDMER et al. (2005) |

Tabela 7 - Técnica de detecção, limites de detecção e de quantificação, faixa de trabalho dos métodos descritos na literatura para análise de ciclofosfamida, em matrizes não-biológicas, de 1992 a 2008 (*conclusão*)

| Amostra | Técnica de Detecção | Limite de Detecção | Limite de Quantificação | Faixa de Trabalho | Referência |
|-------------|---------------------|-----------------------------|--------------------------|-------------------------------|-------------------------|
| superfícies | CG-EM/EM | 0,1-0,5 ng mL ⁻¹ | não especificado | 0,1ng -1µgmL ⁻¹ | SCHULZ et al. (2005) |
| superfícies | CLAE-UV | 2,5 µg mL ⁻¹ | 10 µg mL ⁻¹ | 10- 700 µgmL ⁻¹ | ROBERTS et al. (2006) |
| superfícies | CG-EM/EM | 0,012 µg dm ⁻² | 0,02 µg dm ⁻² | 0, 156-10 µg dm ⁻² | CASTIGLIA et al. (2008) |

Tabela 8- Técnica de detecção, limites de detecção e de quantificação, faixa de trabalho dos métodos descritos na literatura para análise de ifosfamida, em matrizes não-biológicas

| Amostra | Técnica de detecção | Limite de detecção | Limite de quantificação | Faixa de trabalho | Referência |
|---------------------|---------------------|---|-------------------------|-----------------------------|---------------------------------|
| superfícies e luvas | CLAE-EM/EM | 0,1 ng dm ⁻² 20 ng por par de luvas | não especificado | não especificado | MINOIA et al. (1998) |
| superfícies | CG-EM/EM | 0,1 ng mL ⁻¹ | não especificado | não especificado | CONNOR et al. (1999) |
| superfícies | CG-EM | 2,5 pg cm ⁻² | 7,5 pg cm ⁻² | não especificado | SCHMAUS SCHIERL; FUNCK, (2002) |
| superfícies | CLAE-UV | 0,5 µg mL ⁻¹ | não especificado | 0,5- 10 µg mL ⁻¹ | LARSON; KHAZAELI; DILON, (2003) |
| superfícies | CLAE-EM/EM | 0,1 pg cm ⁻² | 0,1 pg cm ⁻² | 0,1- 2000 ng | HEDMER et al. (2005) |
| superfícies e luvas | CG-EM/EM | 0,1 ng cm ⁻² | não especificado | não especificado | CRAUSTE- MANCIET et al. (2005) |
| superfícies | CG-EM/EM | 0,060 µg dm ⁻² | 0,1 µg dm ⁻² | 0,156-10µgdm ⁻² | CASTIGLIA et al. (2008) |

São escassos na literatura métodos para a determinação de antraciclinas em matrizes não-biológicas, cuja finalidade seja avaliar a exposição ocupacional, todavia nos dois trabalhos encontrados, na revisão realizada no presente estudo, os métodos utilizam a CLAE, com detector de UV, para amostras de superfície, conforme demonstrado na Tabela 9.

Tabela 9 - Técnica de detecção, limites de detecção e de quantificação, faixa de trabalho dos métodos descritos na literatura para análise de doxorrubicina, em amostras de superfícies.

| Amostra | Técnica de Detecção | Limite de Detecção | Limite de Quantificação | Faixa de Trabalho | Referência |
|-------------|---------------------|----------------------------|-------------------------|------------------------------|--------------------------------------|
| superfícies | CLAE-UV | 0,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ | não especificado | 0,5-10 $\mu\text{g mL}^{-1}$ | LARSON KHAZAELI; DILON, (2003) |
| superfícies | CLAE-UV | 0,25 $\mu\text{g mL}^{-1}$ | 1 $\mu\text{g mL}^{-1}$ | 1 - 20 $\mu\text{g mL}^{-1}$ | ROBERTS et al. (2006) |

Já, para a 5-FU, a técnica comumente utilizada é a CLAE-UV, conforme demonstra a Tabela 10, com comprimento de onda em torno de 265 nm, coluna de fase reversa e fase móvel aquosa (MINOIA; PERBELLINI, 2000).

Tabela 10- Técnica de detecção, limites de detecção e de quantificação, faixa de trabalho dos métodos descritos na literatura para análise de 5-fluoruracila, em matrizes não-biológicas (*continua*)

| Amostra | Técnica de Detecção | Limite de Detecção | Limite de Quantificação | Faixa de Trabalho | Referência |
|---------------------|---------------------|---|-------------------------|-------------------|---------------------------|
| superfícies e luvas | CLAE-UV | 0,04 ng cm^{-2} 0,7 μg por par de luvas | não especificado | não especificado | SESSINK et al. (1992) |
| luvas | CG-EM | 4,0 μg por par de luvas | não especificado | não especificado | SESSINK et al. (1994a) |
| luvas | CG-EM | 2 μg por par de luvas | não especificado | não especificado | SESSINK et al. (1997) |
| superfícies | CLAE-UV | 20 ng mL^{-1} | não especificado | não especificado | CONNOR et al. (1999) |

Tabela 10- Técnica de detecção, limites de detecção e de quantificação, faixa de trabalho dos métodos descritos na literatura para análise de 5-fluoruracila, em matrizes não-biológicas (*conclusão*)

| Amostra | Técnica de Detecção | Limite de Detecção | Limite de Quantificação | Faixa de Trabalho | Referência |
|---------------------|----------------------------|-----------------------------|--------------------------------|--------------------------------|---------------------------------|
| superfícies | CLAE-UV | 4 - 30 $\mu\text{g m}^{-2}$ | não especificado | não especificado | FLORIDIA et al. (1999b) |
| superfícies | CLAE-UV | 1 μg | 3 μg | 1-32 μg | MICOLI et al. (2001) |
| superfícies | CG-EM | 0,25 pg cm^{-2} | 2,5 pg cm^{-2} | não especificado | SCHMAUS; SCHIERL; FUNCK, (2002) |
| superfícies | CLAE-UV | 0,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ | não especificado | 0,5 - 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$ | LARSON KHAZAELI; DILON, (2003) |
| superfícies e luvas | CLAE-UV | 20 ng cm^{-2} | não especificado | não especificado | CRAUSTE-MANCIET et al. (2005) |
| superfícies | CLAE-UV | 0,2 $\mu\text{g mL}^{-1}$ | 0,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ | 0,5 - 30 $\mu\text{g mL}^{-1}$ | ROBERTS et al. (2006) |
| superfícies | CLAE-UV | 0,440 $\mu\text{g m}^{-2}$ | 0,740 $\mu\text{g dm}^{-2}$ | 0,78-50 $\mu\text{g dm}^{-2}$ | CASTIGLIA et al. (2008) |

A técnica mais comumente empregada para análise de MTX é a CLAE-UV, com comprimento de onda em torno de 300 nm, coluna de fase reversa e fase móvel predominante aquosa e tamponada (MINOIA; PERBELLINI, 2000). A Tabela 11 demonstra os métodos cromatográficos para análise dessa substância.

Tabela 11 - Técnica de detecção, limites de detecção e de quantificação, faixa de trabalho dos métodos descritos na literatura para análise de metotrexato, em matrizes não-biológicas

| Amostra | Técnica de detecção | Limite de detecção | Limite de quantificação | Faixa de Trabalho | Referência |
|---------------------|----------------------------|--|--------------------------------|------------------------------|-------------------------|
| superfícies e luvas | CLAE/UV | 4,0 ng cm ⁻² 6,0 µg por par de luvas | não especificado | não especificado | SESSINK et al. (1992) |
| luvas | CG-EM | 20 µg por par de luvas | não especificado | não especificado | SESSINK et al. (1994a) |
| luvas | CG-EM | 10 µg por par de luvas | não especificado | não especificado | SESSINK et al. (1997) |
| superfícies | CLAE/UV | 47 ng mL ⁻¹ | não especificado | 62,5- 1000 ngL ⁻¹ | FLORIDIA et al. (1999a) |

São escassos na literatura os estudos que determinaram o PAC em amostras de luvas e superfícies, todavia, a técnica mais comumente empregada é CLAE (Tabela 12), com detector de UV ou acoplado à espectrometria de massa (MINOIA; PERBELLINI, 2000).

Tabela 12 - Técnica de detecção, limites de detecção e de quantificação, faixa de trabalho dos métodos descritos na literatura para análise de paclitaxel, em matrizes não-biológicas

| Amostra | Técnica de detecção | Limite de detecção | Limite de quantificação | Faixa de Trabalho | Referência |
|----------------|----------------------------|---------------------------|--------------------------------|------------------------------|---|
| luvas | CLAE-EM/EM | 0,2 µg por par luvas | não especificado | não especificado | SOTTANI et al. (2000) |
| superfícies | CLAE/UV | 2.0 µg mL ⁻¹ | não especificado | 2,0 - 20 µg mL ⁻¹ | LARSON KHAZAELI; DILON, (2003) |

3 OBJETIVOS

A partir da revisão da literatura foi possível observar que é crescente a utilização de fármacos antineoplásicos na prática clínica e, principalmente em terapia combinada. Em contrapartida, isto constitui importante risco químico e sanitário tanto para os pacientes, pois podem levar a uma neoplasia secundária, como para as populações ocupacionalmente expostas. Nesse contexto, é de suma importância a monitorização da exposição ocupacional, através da determinação dessas substâncias em superfícies e materiais. Entretanto, a maioria dos métodos disponíveis na literatura não foram devidamente validados e, geralmente, não determinam mais de um fármaco em uma mesma análise.

Assim, este trabalho teve como objetivo desenvolver e validar métodos para determinação simultânea de ciclofosfamida, doxorrubicina, 5-fluoruracila, ifosfamida, metotrexato e paclitaxel em superfícies e luvas, por cromatografia líquida de alta eficiência, como também avaliar a aplicação desses em situação de exposição aos fármacos. Ressalta-se que os fármacos foram escolhidos em função de sua dose/ frequência de utilização na prática oncológica e de sua toxicidade.

Os objetivos específicos foram:

-testar diferentes condições cromatográficas, tais como: coluna, fase móvel, vazão da fase móvel, volume de injeção, comprimento de onda, de forma a determinar os fármacos na mesma corrida analítica;

-otimizar as condições cromatográficas para a determinação simultânea dos analitos que apresentarem condições de serem determinados na mesma corrida analítica;

-otimizar o procedimento de extração dos analitos, que apresentarem condições de serem determinados na mesma corrida analítica;

-validar o método constituído das técnicas de extração e de identificação/quantificação, por cromatografia líquida de alta eficiência para a determinação dos analitos, que apresentarem condições de serem determinados na mesma corrida analítica;

-aplicar o método em amostras reais, isto é, superfícies e luvas de trabalhadores que manipulam os fármacos estudados.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 MATERIAIS

4.1.1 Padrões, reagentes e solventes

Foram utilizados os seguintes padrões: ciclofosfamida, 5-fluoruracila, metotrexato e paclitaxel (Aldrich[®]); doxorubicina (Adriblastina[®]), doado por um Hospital Oncológico e ifosfamida (Holoxan[®]), doado por um laboratório de Higiene Industrial e Toxicologia.L

Os solventes e reagentes usados no preparo de soluções e nos testes de otimização das condições cromatográficas foram: metanol, grau CLAE J.T. Baker[®]; etanol grau CLAE Nuclear[®]; acetonitrila, grau CLAE Merck[®]; diclorometano Mallinckrodt[®], isopropanol, grau CLAE, Vetec[®]; ácido acético, p.a., Merck[®]; acetato de sódio triidratado, p.a., Vetec[®]; acetato de etila p.a. Vetec[®], n-hexano, p.a., J.T. Baker[®]; cloreto de sódio, p.a., Merck[®]; hidróxido de sódio, p.a., Vetec[®]. Todos os ajustes de pH foram feitos com ácido clorídrico 1% e hidróxido de sódio 1% assim, sempre que nesse estudo for citado o pH de uma solução ou fase móvel, refere-se ao ajuste com tais soluções.

4.1.2 Equipamentos e acessórios

Foram utilizados nesse estudo, cromatógrafo líquido de alta eficiência Shimadzu[®] LC-10ATvp, controladora SCL-10Avp, sistema de bombas LC-10ATvp, forno de colunas CTO-10ASvp, injetor automático SIL-10AF, detector UV SPD-10Avp e detector DAD (arranjo de diodos) SPD-M10Avp. A aquisição e tratamento de dados foram feitos com auxílio de software Class-VP software (Shimadzu[®]). As colunas analíticas testadas foram Shim-pak[®] CLC-ODS(M) (250 x 4,6 mm, 5 µm); Supelcosil[®] TM LC-18 (150 x 4,6 mm, 5µm) e pré-coluna LC-18 (Shimadzu[®]).

Ainda, empregou-se sistema de purificação de água Milli-Q Plus, Millipore[®]; banho de ultrassom Unique[®]; peagâmetro digital Marte[®]; balança eletrônica de precisão BG 440,

Gehaka[®]; balança analítica Kern 410[®]; agitador mecânico tipo vórtex MA 162, Marcon[®]; centrífuga NT-811, Nova Técnica[®]; sistema de suporte e extração *manifold* da Supelco[®]; micropipetas Gilson[®] e Digipet[®].

4.1.3 Soluções-padrão

Foram preparadas soluções-padrão na concentração de 1 g L⁻¹, em metanol, denominadas solução-estoque, dos analitos: ciclofosfamida, doxorrubicina, 5-fluoruracila, ifosfamida e paclitaxel. A solução de metotrexato foi preparada em metanol acidificado, com ácido clorídrico 1%. A partir dessas, foram obtidas as soluções de trabalho, a 100 mg L⁻¹ e dessas, foram realizadas as diluições, para os estudos de otimização e validação analítica. Todas as soluções-estoque e de trabalho foram acondicionadas em frascos de vidro âmbar e mantidas a -20°C, por tempo determinado pelo teste de estabilidade, todavia as diluições foram preparadas diariamente.

4.2 OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS E DE EXTRAÇÃO DOS ANALITOS EM SUPERFÍCIES

4.2.1 Otimização das condições cromatográficas

Para se obter a condição otimizada foram testados os seguintes parâmetros:

- coluna cromatográfica: C18 (150 x 4,6 mm; 5 µm) e C18 (250 x 4,6 mm; 5 µm);
- fase móvel (testadas em modo isocrático): água: MeOH (80:20, v/v); tampão acetato de amônio 10 mmol L⁻¹: MeOH: ACN (70:15:15, v/v/v); água: MeOH: ACN (70:15:15, v/v/v); (70:13:17, v/v/v) (70:10:20, v/v/v); (65:15:20, v/v/v); (55:15:30, v/v/v); (35:25:40, v/v/v) e (35:15:50, v/v/v);
- faixa de pH para a fase móvel: de 3 a 6;
- temperatura da coluna: ambiente, 35°C e 40°C;
- vazão da fase móvel:

a) constante: 0,5 mL min⁻¹ e 0,7 mL min⁻¹;

b) com modificações durante a corrida cromatográfica: 0,5 mL min⁻¹ até 7 min e 0,9 mL min⁻¹ até fim da corrida; 0,4 mL min⁻¹ até 10 min e 0,9 mL min⁻¹ até fim da corrida; 0,4 mL min⁻¹ até 13 min e 1 mL min⁻¹, até fim da corrida.

4.2.2 Otimização da extração líquido-líquido

As condições testadas para a extração líquido-líquido foram:

- matriz: NaOH 0,03 mol L⁻¹ (líquido de limpeza de superfícies utilizado por Sessink et al. 1992, Connor et al. 1999 e Martins et al. 2008a), cujo pH foi ajustado na faixa de 4 a 8;

- solvente extrator: n-hexano, diclorometano, acetato de etila e acetato de etila: isopropanol (3:7, v/v), (7:3, v/v) e (10:1, v/v);

Após vários testes, a técnica de extração otimizada para os analitos, 5-FU, MTX, IFO, DOX e CF, foi:

- em um tubo de 15 mL, colocou-se 1 mL de solução NaOH 0,03 mol L⁻¹ fortificada com os analitos e ajustada a pH 4;

- adicionou-se 2,5 mL de acetato de etila: isopropanol (7:3, v/v). Em seguida, o tubo foi agitado por 2,5 minutos;

- após a separação das fases, a fase orgânica foi transferida para um béquer afunilado e a fase aquosa foi re-extraída com outra alíquota de 2,5 mL de acetato de etila: isopropanol (7:3, v/v), com agitação por 2,5 minutos;

- na fase aquosa restante foi realizado um novo ajuste de pH para 8, e repetiu-se o processo de extração com acetato de etila: isopropanol (7:3, v/v), sendo a fase orgânica transferida para o mesmo béquer afunilado, onde estava contida a fase orgânica, proveniente da extração ácida;

- a fase orgânica foi levada à secura sob fluxo de N₂, sendo o resíduo ressuspensão em 200 µL de fase móvel e 50 µL foram injetados no cromatógrafo.

4.2.3 Injeção direta da matriz

Testou-se também a injeção direta da matriz (NaOH 0,03 mol L⁻¹, como líquido de limpeza de superfícies) fortificada com os analitos. Foi avaliado, o ajuste de pH para 4 e 8, filtração em filtro de solvente aquoso Millipore[®] GSWPO 1300 (0,22 µm x 13 mm) e 50 µL foram diretamente injetados no CLAE. Um outro líquido constituído de metanol: acetonitrila (50:50, v/v) também foi testado, como líquido de limpeza das superfícies e, nesse caso, injetou-se diretamente no cromatógrafo, sem extração prévia, 50 µL dessa solução fortificada com os analitos.

4.2.4 Teste de superfícies intencionalmente fortificadas com os analitos

Foram realizados diversos contatos com unidades de quimioterapia para a obtenção da permissão para a coleta de amostras reais, nesses ambientes, visando à aplicação do presente método. Não houve retorno por parte das autoridades responsáveis por esses locais contatados e, como não seria ético fortificar as bancadas de trabalho, do laboratório de pesquisa, expondo intencionalmente vários indivíduos, optou-se por realizar o estudo em superfícies em miniatura, as quais poderiam ser descartadas com segurança, após o teste.

O teste foi feito de acordo com o estudo desenvolvido por Roberts et al. (2006), através de cortes em uma seringa de 10 mL, em intervalos de 5 cm. Os anéis resultantes foram cortados transversalmente, de modo que foram obtidas superfícies retangulares de 3,5 x 3 cm. O polipropileno, uma superfície inerte, foi usado com objetivo de eliminar qualquer interferência externa.

O teste foi realizado em sextuplicata e 20 µL da solução a 100 µg mL⁻¹, de cada fármaco, foram adicionados ao lado côncavo da superfície e, paralelamente foi realizado um não adicionado (n=6), que consistiu na análise de superfície não fortificada com os analitos, nas mesmas condições.

Todas as superfícies foram secas à temperatura ambiente e, essas foram lavadas com 2 mL de metanol: acetonitrila: (50: 50, v/v), em um tubo de centrífuga. Os tubos foram centrifugados por 5 minutos a 580 g e, 50 µL do sobrenadante foram injetados no

cromatógrafo. A recuperação foi calculada comparando-se a área obtida nesse teste com aquela obtida pela injeção de solução padrão, não sujeita a essas condições.

Extrapolando esse teste para uma superfície de trabalho, a técnica de determinação dos analitos estudados, pode ser descrita como:

- delimitar a superfície de trabalho a ser analisada;
- colocar sobre ela, quantidade suficiente de solução de metanol:acetonitrila (50:50, v/v), em torno de 5 mL (em uma superfície de 400 cm²);
- esfregar as superfícies com TNT ou lenços de papel Kleenex[®];
- colocar o TNT ou os lenços, em um tubo de centrifuga graduado completar o volume, para 18 mL, com a solução metanol:acetonitrila (50:50, v/v);
- centrifugar e recolher o sobrenadante para a detecção/ quantificação dos analitos.

4.3 OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS E DE EXTRAÇÃO DOS ANALITOS EM LUVAS

4.3.1 Otimização das condições cromatográficas

Para se obter a condição otimizada foram testados os seguintes parâmetros:

- coluna cromatográfica: C18 (150 x 4,6 mm; 5 µm) e C18 (250 x 4,6 mm; 5 µm);
- fase móvel (testadas em modo isocrático): água: MeOH (80:20, v/v), tampão acetato de amônio 10 mmol L⁻¹: MeOH: ACN (70:15:15, v/v/v), tampão fosfato 10 mmol L⁻¹ pH 6,0: MeOH:ACN (40:30:30, v/v/v), água:MeOH:ACN: (70:15:15, v/v/v); (70:13:17: v/v/v); (70:10:20: v/v/v); (65:15:20, v/v/v); (55:15:30, v/v/v); (40:15:45: v/v/v); (35:25:40, v/v/v) e (35:15:50, v/v/v);
- ajuste do pH da água da fase móvel: de 4,0 a 6,0;
- gradiente de fases: água ajustada a pH 4,0 (bomba A), MeOH (bomba B) e ACN (bomba C), nas condições: a) tempo zero até 10 min, proporção de 70:15:15, v/v/v e, após 10 minutos até final da corrida, proporção de 55:15:30:, v/v/v e b) tempo zero até 10 min,

proporção de 70:15:15, v/v/v e, após 10 minutos até fim da corrida, proporção de 55: 25:40, v/v/v;

- temperatura da coluna: ambiente, 35°C e 40°C;

- vazão da fase móvel:

a) constante: 0,5 mL min⁻¹ ; 0,7 mL min⁻¹ e 1 mL min⁻¹

b) com modificações no decorrer da corrida: 0,4 mL min⁻¹ até 10 min e após 0,9 mL min⁻¹, até fim da corrida; 0,4 mL até 13 min e após 1 mL min⁻¹, até fim da corrida; 0,5 mL min⁻¹ até 7 min e 0,9 mL min⁻¹, até fim da corrida;

- comprimento de onda: 195 e 265 nm e varredura no DAD.

4.3.2 Otimização das condições de extração

Para a lavagem da luvas foram testadas as seguintes variáveis:

- tempo de agitação (shaker): 5, 15, 30 e 90 min;

- tempo de banho ultrassônico: 15, 30 e 90 min;

- tempo de centrifugação a 580 g: 15 e 30 min;

- pH da matriz: de 4 a 8.

Para a extração líquido-líquido (ELL) foram:

- solvente extrator: n-hexano, diclorometano, acetato de etila e acetato de etila: isopropanol, nas proporções 3:7, 7:3, e 10:1, v/v, acetato de etila: octanol, na proporção 1:1, v/v, acetato de etila: butanol, nas proporções 5:3, 7:3 e 8:2, v/v;

Para a extração em fase sólida (SPE), utilizou-se o sistema de extração a vácuo *manifold* da Supelco[®] e cartuchos com fase C18/ 200 mg (Applied Separations[®]). Para a retenção dos interferentes, foram testados a terra de diatomácea (Merck[®]) e o florisil (Sigma[®]), em cartuchos empacotados no laboratório com 700 mg, dessas fases.

Em todos os testes foram utilizados diversos solventes, para otimizar cada uma das etapas de extração: condicionamento, carregamento, lavagem e eluição.

4.3.3 Aplicação do método em amostras de luvas

As amostras de luvas foram coletadas em um laboratório de pesquisa do sul de Minas Gerais. Os usuários dessas luvas trabalharam com o MTX, a 5-FU e o PAC, em projetos de pesquisa, expondo-se a esses fármacos de maneira diversa. Sendo assim, não foi possível precisar a quantidade manipulada pelos pesquisadores, durante a jornada de trabalho.

Estes indivíduos estavam cientes sobre o procedimento operacional padrão (POP), para a manipulação e manejo de FAN. Para tal, conforme explícito no POP, a descontaminação das luvas após o contato com estes fármacos deve ser feita, primeiramente, esfregando-se as mãos enluvadas com álcool etílico comercial e, logo em seguida com hipoclorito de sódio. Segundo literaturas específicas, tanto o álcool etílico como o hipoclorito de sódio inativam os antineoplásicos (CASTEGNARO et al., 1997; MORITA et al., 2000, KIURA et al., 2002; NAKAJIMA et al., 2004; HIROSE et al., 2005; ROBERTS et al., 2006). O hipoclorito de sódio utilizado trata-se de uma solução que contém 2,5% de cloro ativo em água, segundo descrito em seu rótulo.

Até o momento da análise as luvas foram acondicionadas em saco plástico, com fecho hermético e mantidas no freezer (-20° C).

4.4. CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO DOS MÉTODOS

Para avaliar o desempenho dos métodos foram realizados testes de conformidade do sistema e validação analítica. Abaixo são descritos os parâmetros avaliados:

- **conformidade do sistema** (*system suitability*), que pode ser definida como um conjunto de testes para garantir que o equipamento utilizado está apto a gerar resultados de exatidão e precisão aceitáveis. Os parâmetros avaliados foram: fator de retenção ou capacidade (k); resolução (Rs); fator de cauda ou assimetria (T) e o número de pratos teóricos (N).

As recomendações para esse teste, de acordo com o Shabir et al., (2003), podem ser observadas na Tabela 13. Tipicamente, no mínimo dois destes critérios são requeridos para garantir a conformidade do sistema.

Tabela 13 - Parâmetros de conformidade do sistema e recomendações

| Parâmetro | Recomendação |
|-------------------------------|--|
| fator de retenção (k) | o pico deve estar bem separado de outros picos e do pico correspondente ao tempo de retenção de um composto não retido (t_M), $k > 1$ para garantir que o primeiro pico de interesse está bem separado do solvente |
| resolução (Rs) | $R_s > 2$ entre o pico de interesse e o interferente potencial mais próximo (impureza, produto de degradação) |
| fator de assimetria (T) | $T \leq 2$ |
| número de pratos teóricos (N) | em geral deve ser > 2000 |

Fonte: Shabir et al. (2003)

- **limite de detecção (LD)** é definido como a menor concentração de uma substância que o método analítico consegue diferenciar do ruído de fundo. É estabelecido por meio da análise de soluções de concentrações conhecidas e decrescentes, até o menor nível detectável (BRASIL, 2003). Também pode ser calculado através da curva de analítica, pela equação (RIBANI et al., 2004):

$$LD = \frac{3,3 \times DPb}{a}$$

Onde: DPb = desvio padrão do branco (intercepto) e a= coeficiente angular

- **limite de quantificação (LQ)** é definido como a menor concentração do analito que pode ser quantificada com precisão e exatidão aceitáveis, geralmente constitui o primeiro ponto da curva de calibração (BRASIL, 2003).

Pode ser calculado utilizando a razão de 10:1 entre o sinal e o ruído da linha de base (PETERS; DRUMMER; MUSSHOF, 2007). Deve ser identificável e reproduzível com precisão de 20% e exatidão de 80 a 120%, através de análise de padrões (BRASIL, 2003).

Também pode ser calculado através da curva de analítica, pela equação (RIBANI et al., 2004):

$$LD = \frac{10 \times DPb}{a}$$

Onde: DPb = desvio padrão do branco (intercepto) e a= coeficiente angular

Nesse estudo, foi obtido de através de diluições sucessivas das amostras contendo os analitos, até os valores de aceitação supracitados.

- **linearidade** é definida como a capacidade do método de gerar resultados diretamente proporcionais à concentração do analito. Foi determinada através da análise, em sextuplicata, de amostras contendo os analitos e submetidas às técnicas otimizadas, no intervalo de 0,25 a 20 µg mL⁻¹. O coeficiente de determinação (r²) foi utilizado para avaliação deste parâmetro (BRASIL, 2003).

- **precisão** é expressa em função do desvio padrão relativo (DPR%), sendo determinada em termos de repetibilidade e precisão intermediária, através da análise de amostras contendo os analitos, nas concentrações baixa, média e alta, mediante a determinação no mesmo dia (precisão intra-corrida, n=6) e em três dias diferentes (precisão intercorrida) (BRASIL, 2003).

- **eficiência da extração** visa avaliar a recuperação dos analitos após o procedimento de extração. Nesse estudo, as amostras contendo os fármacos, nas concentrações baixa, média e alta, foram analisadas em sextuplicata e os resultados (áreas) foram confrontados com aqueles obtidos quando os analitos foram adicionados ao extrato de amostra não fortificada (BRASIL, 2003).

- **robustez da técnica cromatográfica** é a medida da capacidade do método em resistir a pequenas e deliberadas variações dos parâmetros analíticos (BRASIL, 2003). Esse teste foi realizado com relação à variação na composição e pH da fase móvel e temperatura da coluna.

- **estabilidade:** para gerar resultados confiáveis e reprodutíveis, as amostras, os padrões e reagentes usados devem ser estáveis por um período razoável (por ex. um dia, uma semana, um mês, dependendo da necessidade). Frequentemente, em equipamentos automatizados, as corridas cromatográficas são realizadas durante a noite. Esta prática requer

maior estabilidade das soluções (MARTINS, 2008). Nesse estudo, para esse parâmetro, foram realizados 3 testes:

a) estabilidade no auto-injetor: foram analisadas amostras nas concentrações baixa e alta, em triplicata, sendo que a resposta da primeira injeção, considerada como tempo zero, foi comparada com as respostas obtidas após 4 e 8 horas de permanência no auto-injetor;

b) estabilidade em geladeira: foram analisadas amostras nas concentrações baixa e alta, em triplicata, sendo que a resposta da primeira análise, considerada como tempo zero, foi comparada com as respostas obtidas após 8 e 17 dias de permanência na geladeira (4°C);

c) estabilidade em freezer: foram analisadas amostras nas concentrações baixa e alta, em triplicata, sendo que a resposta da primeira análise, considerada como tempo zero, foi comparada com as respostas obtidas após 8 e 17 dias, de permanência em freezer (-20°C).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Não obstante a utilização de medidas protetivas, é necessário avaliar se, efetivamente, há exposição ocupacional aos antineoplásicos nos diversos locais de manipulação. Em saúde ocupacional, muitas técnicas para monitorizar a exposição são disponíveis e, a análise de superfícies e materiais, tais como luvas, máscaras e maçanetas, entre outros tem sido utilizada pelos pesquisadores, para avaliar tal exposição, conforme demonstrado anteriormente na Tabela 5.

É também reconhecido que luvas e bolsas de infusão podem propagar a contaminação, aumentando a probabilidade de exposição para trabalhadores, não originalmente envolvidos no preparo e na administração dos fármacos, fazendo com que, como consequência, a análise desses objetos seja de suma importância. SESSINK et al. (1997), detectaram a presença de ciclofosfamida na urina de farmacêuticos e enfermeiros, não diretamente envolvidos na manipulação de FAN.

Uma vez que os trabalhadores estão expostos a uma variedade de fármacos, faz-se necessário identificar algumas substâncias que possam ser consideradas indicadores da exposição, tais como a ciclofosfamida e a 5-fluoruracila. Todavia, são escassos na literatura métodos que determinem esses fármacos simultaneamente, o que é considerado uma vantagem por representar de maneira global a exposição ocupacional.

As técnicas de amostragem e de análise empregadas fornecem uma estimativa aproximada da exposição real, no ambiente de trabalho, e dependem da confiança na metodologia utilizada. No entanto, os métodos analíticos relatados na literatura apresentam dados incompletos da etapa de validação.

Nesse estudo, foram desenvolvidos métodos capazes de detectar simultaneamente a presença de antineoplásicos, amplamente utilizados na prática clínica, em superfícies e luvas, visando sua aplicação na monitorização da exposição ocupacional. Ressalta-se que esse estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (Anexo 1).

5.1 OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS E DE EXTRAÇÃO DOS ANALITOS EM SUPERFÍCIES

5.1.1 Otimização das condições cromatográficas

As condições otimizadas para a determinação dos antineoplásicos estudados, 5-fluoruracila, metotrexato, ifosfamida, doxorubicina e ciclofosfamida, em superfícies foram:

- comprimento de onda: 195 nm;
- coluna: Shim-Pak[®] CLC-ODS(M) C18 (250 x 4,6 mm, 5 μ m);
- temperatura do forno: ambiente (21°C);
- fase móvel: água pH 4,0: MeOH: ACN (70:13:17, v/v/v), com vazão de 0,4 mL min⁻¹ até 13 min e, após esse tempo, 1 mL min⁻¹, até o final da corrida cromatográfica.

Vários comprimentos de onda foram utilizados para a detecção desses fármacos, em estudos anteriores, variando de 193 a 302 nm (NEAL; WADDEN; CHIOU, 1983; PYY; SORSA; HAKALA, 1988; BENVENUTO et al., 1993). No presente estudo, as soluções-padrão foram avaliadas pelo detector por arranjo de diodos (DAD) e, após essa análise optou-se por utilizar o detector UV a 195 nm, uma vez que esse é um comprimento de onda capaz de detectar todos os analitos, conforme demonstra a Figura 9. Além disso, foi anteriormente utilizado por Larson; Khazaeli; Dilon (2003).

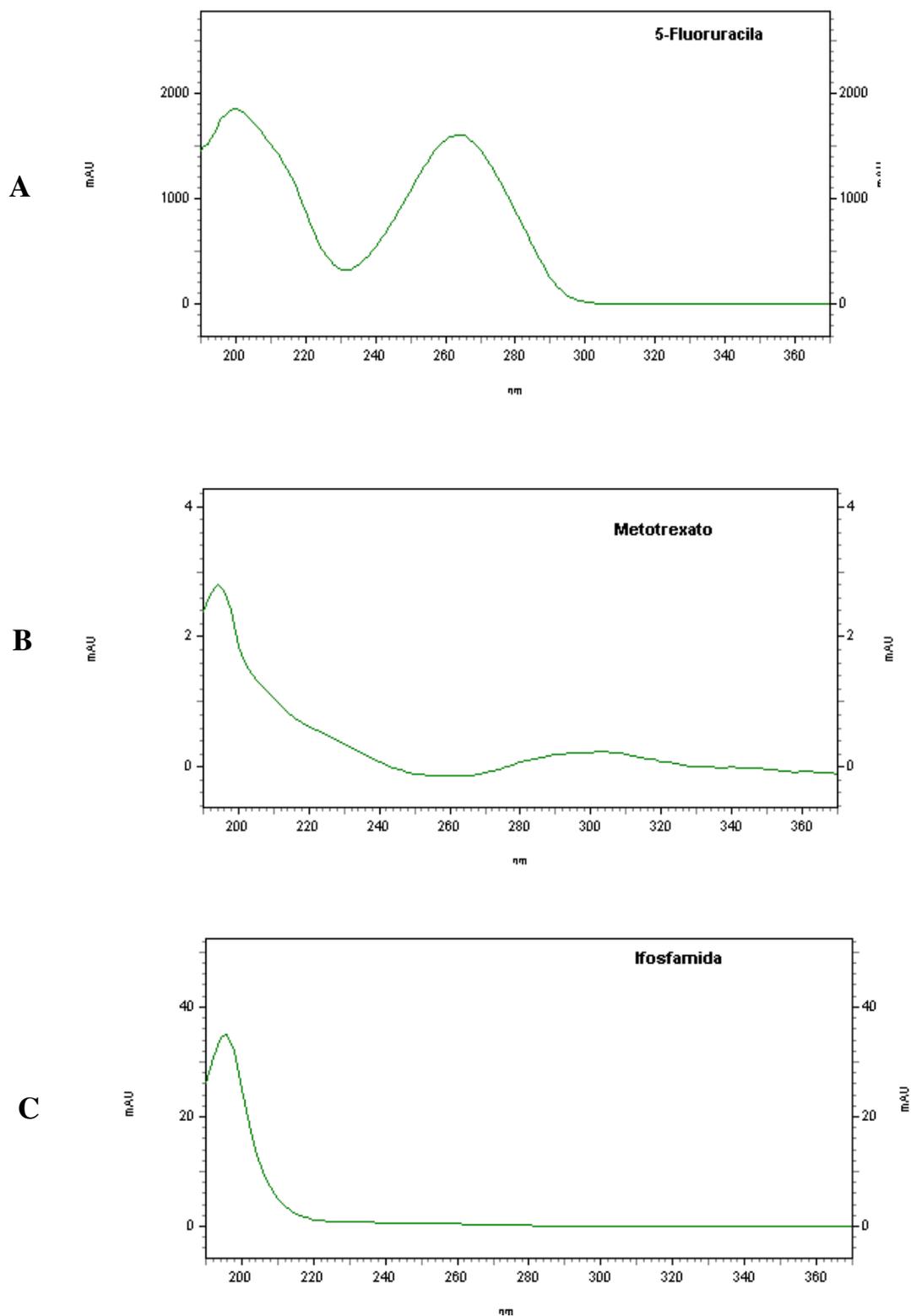


Figura 9- Espectros obtidos a partir da análise de: A) 5- fluoruracila, na concentração de $100 \mu\text{g mL}^{-1}$, B) metotrexato, na concentração de $5 \mu\text{g mL}^{-1}$ C) ifosfamida, na concentração $20 \mu\text{g mL}^{-1}$ D) ciclofosfamida, na concentração $20 \mu\text{g mL}^{-1}$ E) doxorubicina, na concentração $20 \mu\text{g mL}^{-1}$ e F) paclitaxel, na concentração $20 \mu\text{g mL}^{-1}$, no detector DAD, coluna C18 (250 x 4,6 mm, 5 μm), fase móvel constituída de água pH 4,0: metanol: acetonitrila (70:13:17, v/v/v). (continua)

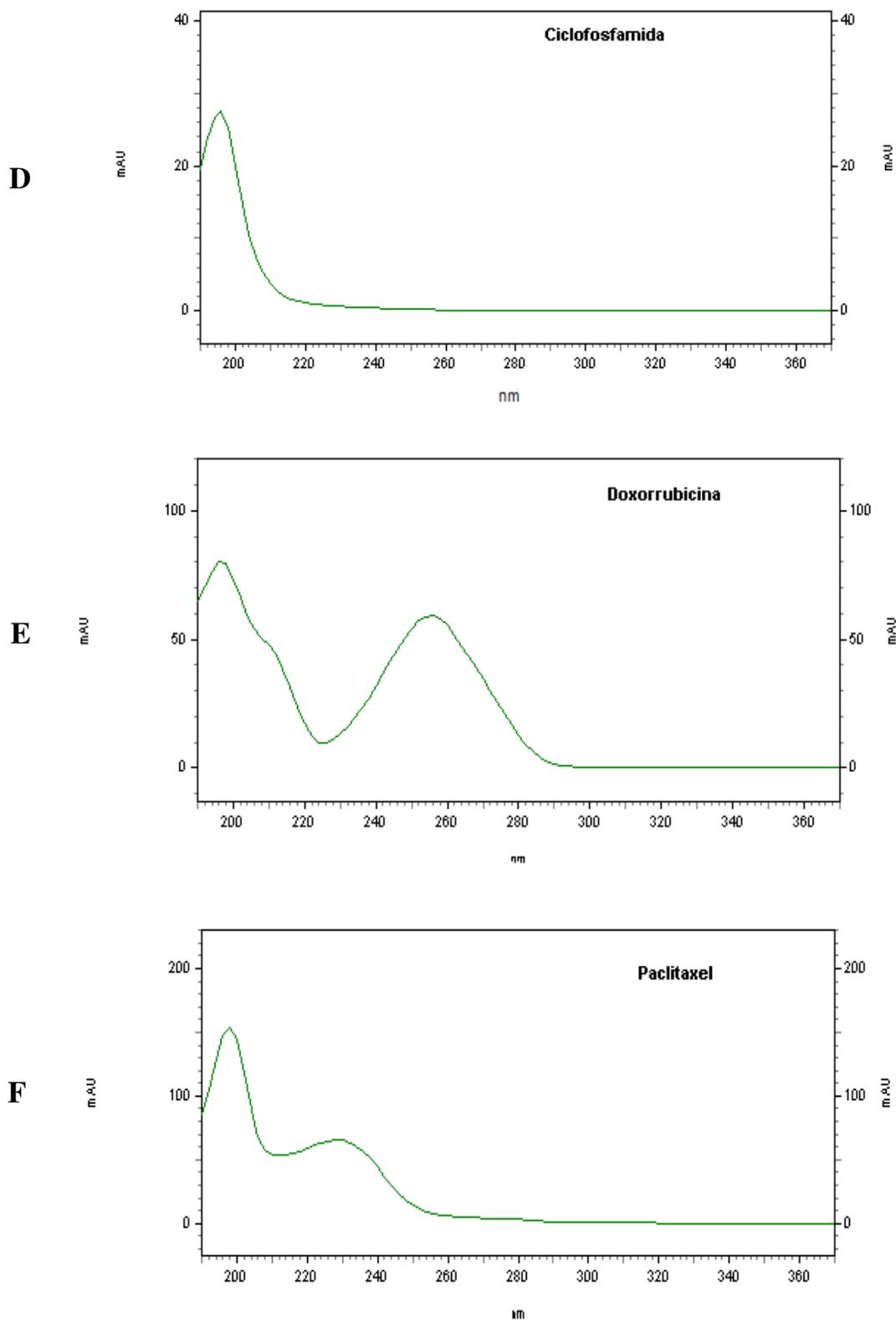


Figura 9- Espectros obtidos a partir da análise de: A) 5- fluoruracila, na concentração de $100 \mu\text{g mL}^{-1}$, B) metotrexato, na concentração de $5 \mu\text{g mL}^{-1}$ C) ifosfamida, na concentração $20 \mu\text{g mL}^{-1}$ D) ciclofosfamida, na concentração $20 \mu\text{g mL}^{-1}$ E) doxorubicina, na concentração $20 \mu\text{g mL}^{-1}$ e F) paclitaxel, na concentração $20 \mu\text{g mL}^{-1}$, no detector DAD, coluna C18 (250 x 4,6 mm, $5 \mu\text{m}$), fase móvel constituída de água pH 4,0: metanol: acetonitrila (70:17:13, v/v/v). (conclusão)

Nesse estudo, foi utilizado o detector por arranjo de diodos (DAD), o qual é o segundo tipo de detector espectrofotométrico mais comum. De modo simplificado, um arranjo de diodos consiste em uma série de detectores fotodiodo posicionado lado a lado em um cristal de silício, de modo que cada comprimento de onda, difratado pela grade, atinge um ponto desse arranjo, e conseqüentemente um detector. Deste modo, a radiação que atravessa a amostra é integral e, instantaneamente, analisada determinando-se, portanto, a absorvância em todos os comprimentos de onda, de modo simultâneo (ATVARS; MARTELLI, 1996).

Um fator importante é que os detectores por arranjo de diodos têm sensibilidades diferentes, aos diversos comprimentos de onda, de modo que é necessário que se especifique a região de trabalho do espectro. Além disso, a qualidade do instrumento, em termos de sua resolução espectral, depende do tipo e do número de diodos que compõe o arranjo (ATVARS; MARTELLI, 1996).

Esse detector associado à CLAE permite a leitura de uma mesma amostra, em vários comprimentos de onda, simultaneamente, com prévia separação cromatográfica dos analitos. Os componentes de uma mistura podem ser identificados pelo espectro de absorção, quando se analisa padrão puro, nas mesmas condições cromatográficas otimizadas, associado ao tempo de retenção e à pureza dos picos, o que fornece confiança nos resultados analíticos.

As condições cromatográficas inicialmente testadas foram: coluna C18 com comprimento de 150 mm, fase móvel constituída de tampão fosfato pH 6,0: acetonitrila (77,25: 22,75v/v) na vazão de 1 mL min⁻¹, na tentativa de reproduzir o estudo realizado por Larson; Khazaeli; Dilon (2003). Esses autores publicaram um método para determinação simultânea de cinco antineoplásicos: 5-FU, IFO, CF, DOX e PAC por CLAE-UV, nas seguintes condições: comprimento de onda de 195 nm, coluna C18 (150 x 4,6 mm, 3,5 µm) e fase móvel constituída de tampão fosfato pH 6,0: acetonitrila (77,25: 22,75, v/v), para a eluição da 5-FU, IFO, CF e DOX e, reversão da fase (22,75: 77,25, v/v), para a eluição do PAC. De acordo com os autores, por esse último analito ser extremamente apolar, a fase móvel deveria conter maior proporção de solventes orgânicos apolares. Os tempos de retenção foram: 2,89 minutos para a 5-FU, 8,64 minutos para a IFO, 9,70 minutos para a CF, 17,50 minutos para a DOX e 39,47 minutos para o PAC. Ressalta-se que esses autores não avaliaram o MTX.

No presente estudo, nas condições semelhantes às de Larson; Khazaeli; Dilon (2003), com a coluna cromatográfica de comprimento de 150 mm, não foi possível separar o MTX e a

5-FU. Assim, testou-se a coluna C18 de comprimento de 250 mm e outras constituições para a fase móvel, em diferentes vazões.

Esses testes demonstraram que não seria necessário tamponar a fase móvel, pois somente com o ajuste do pH da água, para 4 com HCl 1%, sem a adição de sal, a eficiência e a resolução cromatográfica foram satisfatórias todavia, foi necessário a adição de MeOH. Com a vazão da fase móvel de $0,4 \text{ mL min}^{-1}$, observou-se a eluição do MTX e da 5-FU e, com o aumento da vazão para 1 mL min^{-1} , foram eluídos os analitos mais apolares, IFO, DOX e CF, nas condições otimizadas. Apesar do cromatógrafo disponível no laboratório operar em sistema gradiente, não foram obtidas respostas satisfatórias para o PAC, em nenhuma das condições testadas e, assim, optou-se pela retirada desse fármaco, do método de determinação de antineoplásicos em superfícies.

Com as condições estabelecidas realizou-se a injeção direta da fase móvel, de MeOH: ACN (50:50, v/v) e de NaOH $0,03 \text{ mol L}^{-1}$ (soluções de limpeza de superfícies) e, não foram observados interferentes, nos tempos de retenção dos analitos, em nenhuma das 3 análises.

Os resultados dos analitos serão discutidos segundo a ordem de eluição na corrida cromatográfica. Separação cromatográfica satisfatória, de 5-FU, MTX, IFO, DOX e CF, conforme demonstrado na Figura 10, foi obtida isocraticamente e, nas condições otimizadas foi possível detectar os cinco analitos, em um tempo de 30 minutos, demonstrando a aplicação rotineira da técnica desenvolvida. Os tempos de retenção obtidos estão descritos na Tabela 14.

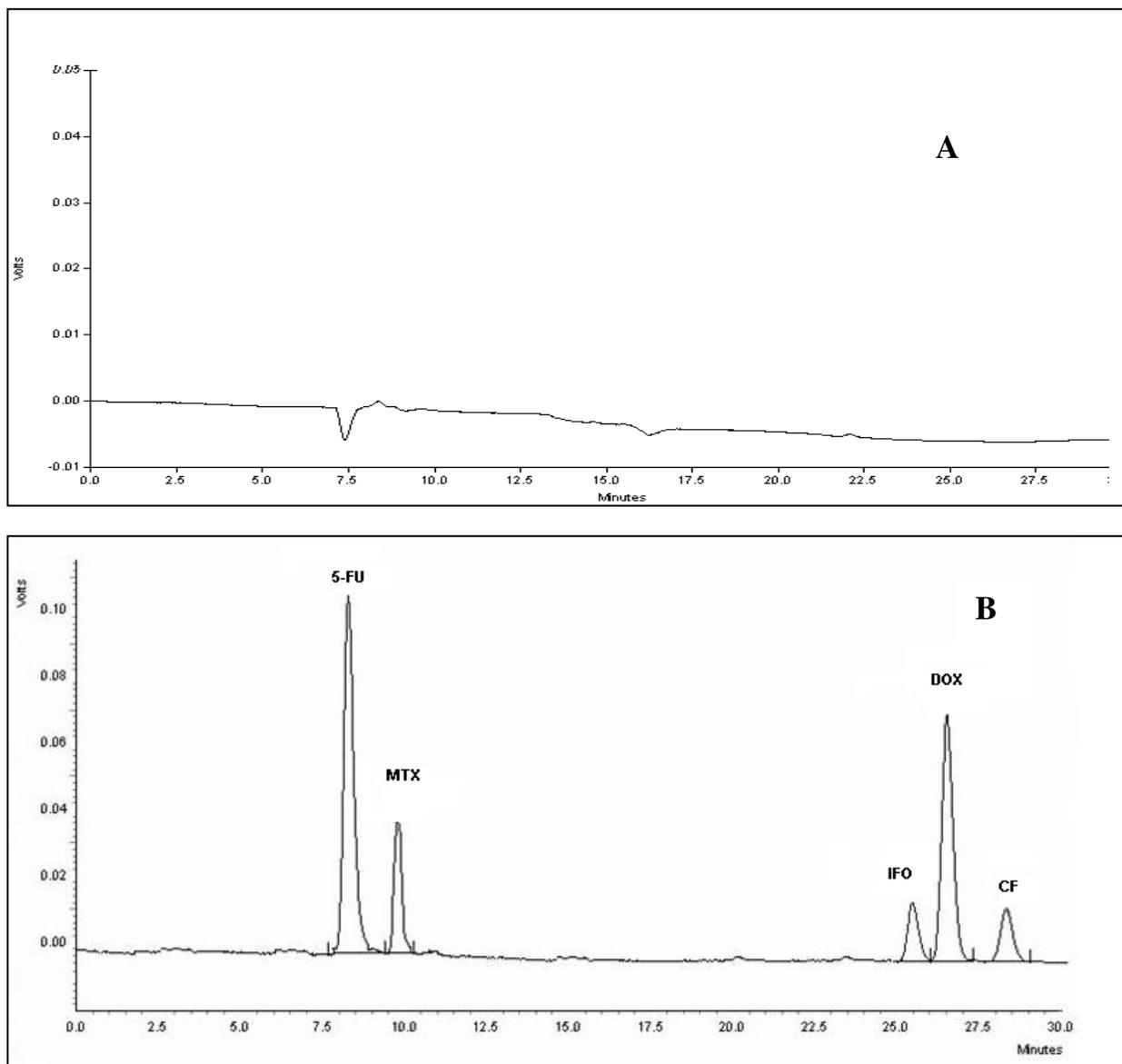


Figura 10- Cromatogramas obtidos a partir da injeção de: A) solução de limpeza de superfícies MeOH:ACN (50:50, v/v) e B) solução de limpeza de superfícies MeOH:ACN (50:50, v/v) contendo os analitos 5-fluoruracila (5-FU) e metotrexato (MTX), na concentração de $5 \mu\text{g mL}^{-1}$ e ifosfamida (IFO), doxorrubicina (DOX) e ciclofosfamida (CF) na concentração de $100 \mu\text{g mL}^{-1}$, identificados por CLAE-UV nas condições otimizadas.

5.1.2 Otimização das condições de extração líquido-líquido

Dentre os solventes testados para a extração líquido-líquido, aquele que apresentou melhor desempenho, para os cinco analitos foi a solução de acetato de etila: isopropanol (7:3, v/v), com ajuste de pH da matriz para 4, obtendo-se as seguintes porcentagens de recuperação: 88% para a 5-FU, 112% para o MTX, 79% para a IFO, 119 % para a DOX e 103% para a CF.

Apesar dessa técnica ser promissora, não foi validada pois, testou-se a injeção direta do líquido de limpeza, que apresentou resultados satisfatórios.

5.1.3 Injeção direta

A solução de NaOH 0,03 mol L⁻¹ é utilizada em diversos estudos (SESSINK et al., 1992; McDEVITT; LEES; McDIARMID, 1993; FLORIDIA et al., 1999a; MARTINS; APOSTOLI; DELLA ROSA, 2008) para a limpeza de superfícies, todavia quando se analisou diretamente essa solução fortificada, com os analitos, nas condições desse estudo, os picos de MTX e 5-FU não se separaram cromatograficamente. Assim, como Larson; Khazaeli; Dillon (2003) sugeriram a limpeza de superfícies com soluções orgânicas, avaliou-se a solução de metanol: acetonitrila (50:50, v/v) e, foram obtidas separação e eficiência cromatográficas satisfatórias.

Em face ao exposto, optou-se por validar o método de injeção direta de metanol: acetonitrila (50:50, v/v), uma vez que não requer extração prévia, sendo então uma técnica simples, de baixo custo e limpa ambientalmente, pois não gera descarte de solventes.

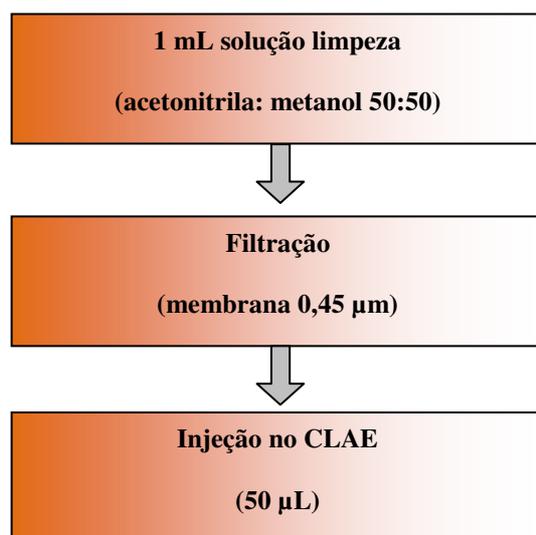


Figura 11- Fluxograma de injeção direta da matriz acetonitrila:metanol (50:50, v/v) com os analitos 5-fluoruracila (5-FU), metotrexato (MTX), ifosfamida (IFO), doxorubicina (DOX) e ciclofosfamida (CF) em superfícies

5.1.3.1 Características de desempenho do método de injeção direta

Anteriormente à validação, o teste de conformidade do sistema foi realizado, e os seguintes parâmetros foram avaliados: número de pratos teóricos (N), resolução (Rs), assimetria 10% (T) e fator de capacidade (k), sendo que esse teste indica que as condições cromatográficas são apropriadas para a sua finalidade. Os resultados obtidos no presente estudo foram considerados satisfatórios de acordo Shabir et al. (2003), conforme mostra a Tabela 14. Somente entre a DOX e a IFO, a resolução foi abaixo do preconizado, todavia isso não afetou a quantificação dos analitos.

Tabela 14- Parâmetros de conformidade do sistema* obtidos para os analitos 5-fluoruracila (5-FU), metotrexato (MTX), ifosfamida (IFO), doxorubicina (DOX) e ciclofosfamida (CF), identificados por CLAE-UV nas condições otimizadas (*continua*)

| analitos | tempo retenção (min) | Pratos teóricos (N) | resolução** (Rs) | assimetria (T) | fator de capacidade (k) |
|----------|----------------------------|---------------------------|---------------------|-------------------|-------------------------------|
| 5-FU | 7,8 | 3456 | 0 | 1,4 | 6,8 |

Tabela 14- Parâmetros de conformidade do sistema* obtidos para os analitos 5-fluoruracila (5-FU), metotrexato (MTX), ifosfamida (IFO), doxorubicina (DOX) e ciclofosfamida (CF), identificados por CLAE-UV nas condições otimizadas (*conclusão*)

| analitos | tempo retenção (min) | Pratos teóricos (N) | resolução** (Rs) | assimetria (T) | fator de capacidade (k) |
|----------|----------------------------|---------------------------|---------------------|-------------------|-------------------------------|
| MTX | 9,4 | 3388 | 2,6 | 2,1 | 8,4 |
| IFO | 26,1 | 27719 | 0 | 1,1 | 25,1 |
| DOX | 27,1 | 28566 | 1,6 | 1,1 | 26,9 |
| CF | 28,9 | 26807 | 2,7 | 1,2 | 27,9 |

Nota:* $N \geq 2000$; $R_s \geq 2$; $0,5 \leq T \leq 2$; $k > 2$, de acordo com Shabir et al. (2003)

** parâmetro calculado entre MTX and 5-FU; DOX e IFO; CF e DOX

A linearidade foi demonstrada no intervalo de concentrações de 0,25 a 20 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para 5-FU e MTX e, de 0,5 a 20 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para IFO, DOX e CF. Esses resultados podem ser observados na Tabela 15.

O método demonstrou robustez, uma vez que as variações estudadas, na constituição e na vazão da fase móvel e, ainda na temperatura da coluna, não promoveram variações maiores que 1% nos resultados analíticos.

Larson; Khazaeli; Dillon (2003), para a 5-FU, no intervalo de 0,5 a 5 $\mu\text{g mL}^{-1}$, obtiveram um r^2 de 0,9439. Para a CF e IFO, no intervalo de 0,5 a 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$, os valores de r^2 foram 0,9906 e 0,9703, respectivamente. Para a DOX, no intervalo de 0,5 a 5 $\mu\text{g mL}^{-1}$, o valor de r^2 foi de 0,9883. Floridia et al. (1999a), em análise realizada para o MTX, no intervalo de 62,5 a 1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$, obtiveram um r^2 de 0,9991.

Tabela 15 - Linearidade, limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) do método de determinação simultânea de 5-fluoruracila (5-FU), metotrexato (MTX), ifosfamida (IFO), doxorubicina (DOX) e ciclofosfamida (CF) em superfícies, por CLAE-UV

| parâmetros | 5-FU | MTX | IFO | DOX | CF |
|--|--------------------|-------------------|-------------------|------------------|-------------------|
| linearidade (r^2) | 0,9999 | 0,9996 | 0,9986 | 0,9997 | 0,9974 |
| intervalo ($\mu\text{g mL}^{-1}$) | 0,25- 20 | 0,25-20 | 0,5-20 | 0,5-20 | 0,5-20 |
| equação de regressão linear | 597902x- 6698,4 | 417030x- 39640 | 12890x- 4295,5 | 35185x- 48324 | 5805,9x- 14542 |
| LD ($\mu\text{g mL}^{-1}$) | 0,1 | 0,1 | 0,3 | 0,3 | 0,3 |
| LQ ($\mu\text{g mL}^{-1}$) | 0,25 | 0,25 | 0,5 | 0,5 | 0,5 |

Com base nos resultados obtidos, considerados na Tabela 15, o limite de detecção do método foi $0,1 \mu\text{g mL}^{-1}$ para a 5-FU e MTX e, $0,3 \mu\text{g mL}^{-1}$ para IFO e DOX. A ciclofosfamida, um dos agentes de maior interesse nesse estudo, devido a sua frequência de utilização e carcinogenicidade, apresentou um limite de detecção de $0,3 \mu\text{g mL}^{-1}$. O limite de quantificação foi $0,25 \mu\text{g mL}^{-1}$ para 5-FU e MTX e $0,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ para IFO, DOX e CF, quando $50 \mu\text{L}$ foram injetados na cromatógrafo.

Esses limites foram determinados pela equação de regressão linear, uma vez que o ruído do branco, foi muito elevado, o que poderia levar a erros no estabelecimento da relação sinal ruído.

Segundo Ribani et al. (2004), apesar do método para a determinação do LD, mais utilizado, ser o da relação sinal-ruído, em geral, em técnicas analíticas de separação, como as cromatográficas e eletroforéticas, a medição do ruído não é trivial e às vezes é subjetiva (já que a curva analítica é construída com a área e não somente o sinal do detector). Além disso, tanto o LD quanto o LQ podem ser afetados pelas condições cromatográficas. Picos maiores aumentam a relação sinal-ruído, resultando em LD e LQ mais baixos. A determinação

cromatográfica desses parâmetros deve considerar tanto o tipo quanto o tempo de uso da coluna. O melhor caminho para resolver esse problema, do cálculo do LD e LQ, é utilizar o método baseado nos parâmetros da curva analítica, que é estatisticamente mais confiável.

Roberts et al. (2006) investigaram a eficiência da descontaminação de superfícies de trabalho. Os três fármacos utilizados, como indicadores de contaminação, foram: 5-fluoruracila, ciclofosfamida e doxorubicina. Todavia, para tal estudo, foram utilizadas três diferentes condições cromatográficas e, os limites de detecção e de quantificação foram, respectivamente, para 5-FU, 0,2 e 0,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$; para a CF, 2,5 e 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e para DOX, 0,3 e 1 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

Sessink et al. (1992), obtiveram limites de detecção, para 5-FU e MTX, de 0,3 e 3 $\mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente, quando CLAE-UV foi utilizada na análise não simultânea de superfícies de embalagens e parte externa de ampolas. A diferença entre as análises foi a fase móvel, constituída de tampão acetato de sódio para a 5-FU e, para o MTX foi necessário usar uma solução desse mesmo tampão com metanol.

Ainda que o LD e o LQ, para a CF e para a IFO, tenham sido superiores aos obtidos em estudos que utilizaram a espectrometria de massas, o método apresentou detectabilidade suficiente para os demais analitos estudados, confirmando os achados anteriores.

A precisão é um critério importante na avaliação de um método, pois determina os erros aleatórios da análise e, nesse trabalho, foi expressa como desvio padrão relativo.

Os resultados de repetibilidade podem ser considerados satisfatórios, para as concentrações média e alta (Tabela 16). Todavia, os níveis mais baixos apresentaram desvios altos, em torno de 8%, para a 5-FU e MTX, e 10% para IFO.

Tabela 16 - Precisão intra-corrída (repetibilidade), avaliada pelo desvio padrão relativo (DPR%), obtida com as sextuplicatas da injeção direta da matriz metanol: acetonitrila (50:50, v/v), contendo os analitos 5-fluoruracila (5-FU), metotrexato (MTX), ifosfamida (IFO), doxorubicina (DOX) e ciclofosfamida (CF), nas concentrações baixa, média e alta

| desvio padrão relativo (DPR%) | | | | | | |
|-------------------------------|---------|-----|-----|---------------------------|---------|-----|
| concentração | analito | | | concentração | analito | |
| ($\mu\text{g mL}^{-1}$) | IFO | DOX | CF | ($\mu\text{g mL}^{-1}$) | 5-FU | MTX |
| 1 | 9,6 | 6,1 | 5,5 | 0,5 | 7,9 | 7,6 |
| 5 | 4,6 | 4,4 | 7,1 | 2,5 | 2,1 | 4,3 |
| 20 | 5,7 | 2,0 | 4,3 | 10 | 3,1 | 3,2 |

Os ensaios de precisão intercorrida, ou intermediária, forneceram resultados de DPR superiores a 5% para as concentrações baixas, para os cinco analitos, como demonstrado pela Tabela 17. No estudo conduzido por Larson; Khazaeli; Dilon (2003), os valores de DPR obtidos foram de até 9%, quando as soluções-padrão foram analisadas em quadruplicata.

Tabela 17- Precisão intercorrida (intermediária), avaliada pelo desvio padrão relativo (DPR%), obtida com as sextuplicatas da injeção direta da matriz metanol: acetonitrila (50:50, v/v) contendo os analitos 5-fluoruracila (5-FU), metotrexato (MTX), ifosfamida (IFO), doxorubicina (DOX) e ciclofosfamida (CF), nas concentrações baixa, média e alta

| desvio padrão relativo (DPR%) | | | | | | |
|---|---------|-----|-----|---|---------|-----|
| concentração ($\mu\text{g mL}^{-1}$) | Analito | | | concentração ($\mu\text{g mL}^{-1}$) | analito | |
| | CF | DOX | IFO | | 5-FU | MTX |
| 1 | 10,7 | 6,0 | 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 |

A estabilidade é um parâmetro importante para a geração de resultados confiáveis e reprodutíveis. É importante em termos de temperatura e tempo. A estabilidade determinada para um tipo de matriz e de material de acondicionamento específico não pode ser extrapolada para outros (MARTINS, 2008).

O critério de avaliação da estabilidade utilizado nesse estudo, foi a comparação entre os resultados obtidos na primeira análise e, após o armazenamento, sendo que a resposta obtida não poderia variar 2 desvios-padrão, em relação à resposta inicial.

Mimetizando as condições de trabalho durante todo desenvolvimento deste experimento, optou-se por avaliar as condições de maior ocorrência durante a rotina laboratorial. Para isto, avaliou-se a estabilidade da solução no auto-injetor do CLAE durante os tempos zero, 4 e 8 horas. A solução permaneceu no auto-injetor e decorrido o tempo previsto, a mesma amostra era re-injetada no CLAE e, os resultados foram comparados. Em relação a esse teste, apenas a ifosfamida e o paclitaxel demonstraram serem estáveis após oito horas, quando a amostra foi mantida a temperatura em torno de $21 \pm 2^\circ\text{C}$.

Foi determinada a estabilidade das amostras quando submetidas ao armazenamento em geladeira e freezer, no intervalo de tempo previsto. Em relação a esse teste, a 5-FU e o MTX demonstraram serem estáveis após oito dias, quando a amostra foi acondicionada em freezer, não sendo estáveis em geladeira, após esse mesmo período.

A ifosfamida demonstrou ser estável após dezessete dias em geladeira e em freezer, a doxorubicina demonstrou ser estável, somente quando armazenada em freezer, após dezessete dias e, a ciclofosfamida foi estável quando condicionada em geladeira e em freezer, após oito dias. Finalmente, o paclitaxel foi estável após 8 dias em geladeira, ressaltando-se que o teste de estabilidade em freezer não foi realizado para esse analito.

Schmaus; Schierl; Funck (2002) obtiveram estabilidade de um dia, quando a amostra contendo ciclofosfamida foi conservada à temperatura ambiente (22°C), e quatro dias, quando conservada a 4°C.

Larson; Khazaeli; Dillon (2003) analisando as soluções-padrão, a temperatura ambiente, observaram perdas de 20% da 5-FU, após a primeira semana e 41%, após 31 dias. Para os analitos, CF e IFO as perdas foram de 32%, após 14 dias e para a DOX, após 17 dias, foram observadas perdas de 75%. Esses autores discutem que esse analito é extremamente instável em superfícies e, quando em contato com outras substâncias, tais como a 5-fluoruracila.

5.1.3.2 Aplicação do método de injeção direta em superfícies intencionalmente fortificadas com os analitos

Para o *wipe* teste, a verificação da eficiência da amostragem e do método desenvolvido pode ser efetuada através de uma prova que consiste em depositar, sobre uma superfície definida, micro quantidades de solução-padrão do fármaco de interesse (isolado ou em misturas). Após a evaporação, efetua-se o recolhimento com vários solventes, verificando, assim, em que condições é obtida maior porcentagem de recuperação (MINOIA; PERBELLINI, 2000).

O método foi aplicado nas superfícies fortificadas, sendo a recuperação superior a 70%, para todos os analitos. Esse estudo foi considerado preciso, com um desvio padrão relativo de 5%, conforme demonstra a Tabela 18.

Tabela 18- Recuperação do método de determinação simultânea de 5-fluoruracila (5-(FU), metotrexato (MTX), ifosfamida (IFO), doxorubicina (DOX) e ciclofosfamida (CF) em superfícies (n=6), fortificadas com 2 µg mL⁻¹

| Fármaco | Recuperação (%) | Precisão (DPR %) |
|-----------------|------------------------|-------------------------|
| 5- fluoruracila | 103,0 | 4,0 |
| metotrexato | 81,0 | 5,0 |
| ifosfamida | 106,0 | 4,0 |
| doxorubicina | 99,0 | 4,0 |
| ciclofosfamida | 74,0 | 1,0 |

Apesar do presente método não ter sido aplicado em amostras reais, esse teste permitiu avaliar o desempenho do método. Os resultados obtidos foram satisfatórios e sugerem que, por sua capacidade de detecção simultânea, o presente método pode ser utilizado como triagem na avaliação global da exposição ocupacional aos antineoplásicos.

5.2 OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS E DE EXTRAÇÃO DOS ANALITOS EM LUVAS

5.2.1 Otimização das condições cromatográficas

O método para determinação dos antineoplásicos em superfícies foi testado em luvas, uma vez que esses analitos podem permear o látex e assim, serem absorvidos pela via dérmica. Esses materiais constituem ferramentas importantes para a monitorização da exposição ocupacional aos FAN.

Foi considerada de suma importância a análise do PAC, tendo em vista que nos levantamentos realizados, observou-se que é um dos fármacos mais utilizados na prática oncológica e, ainda pouco estudado. Assim, foram testadas condições, a fim de otimizar método que fosse capaz de detectá-lo, simultaneamente aos outros analitos.

As condições otimizadas para a determinação de 5-fluoruracila, metotrexato e paclitaxel, em luvas, foram:

- comprimento de onda: 302 nm, para o metotrexato; 265 nm, para a 5-fluoruracila e 195 nm para o paclitaxel;

- coluna Shim-Pak[®] CLC-ODS(M) C18 (250 x 4,6 mm, 5 µm);

- temperatura do forno: 35°C;

- fase móvel: água pH 4,0: metanol: acetonitrila (35:15:50 v/v), com vazão de 1 mL min⁻¹, durante toda corrida cromatográfica.

Nas condições acima, não foi possível separar cromatograficamente os analitos CF, DOX, IFO então, optou-se por excluí-los do estudo em luvas. Corroborou para essa decisão, os altos limites de detecção e de quantificação obtidos quando se utiliza CLAE-UV, para a análise dessas substâncias químicas.

As Figuras 11, 12 e 13 demonstram os espectros obtidos para os três analitos contidos em uma mesma solução, porém submetidos a comprimentos de ondas diferentes na condição cromatográfica otimizada.

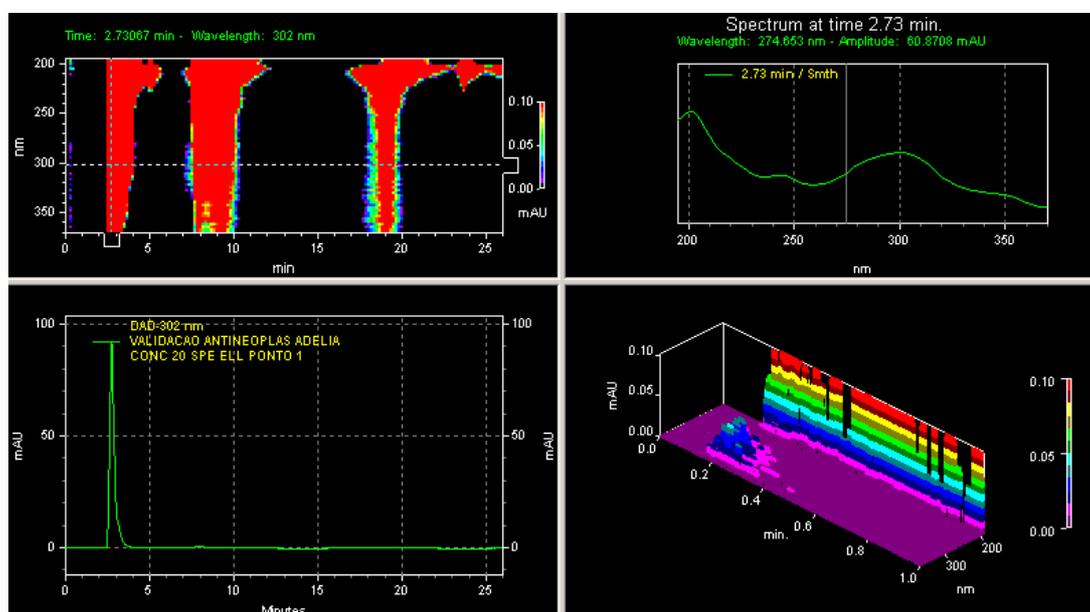


Figura 12- Espectros obtidos a partir da análise de metotrexato, na concentração 20 µg mL⁻¹ no detector DAD, coluna C18 (250 x 4,6 mm, 5 µm), fase móvel: água pH 4,0: metanol: acetonitrila (35:15:50, v/v/v)

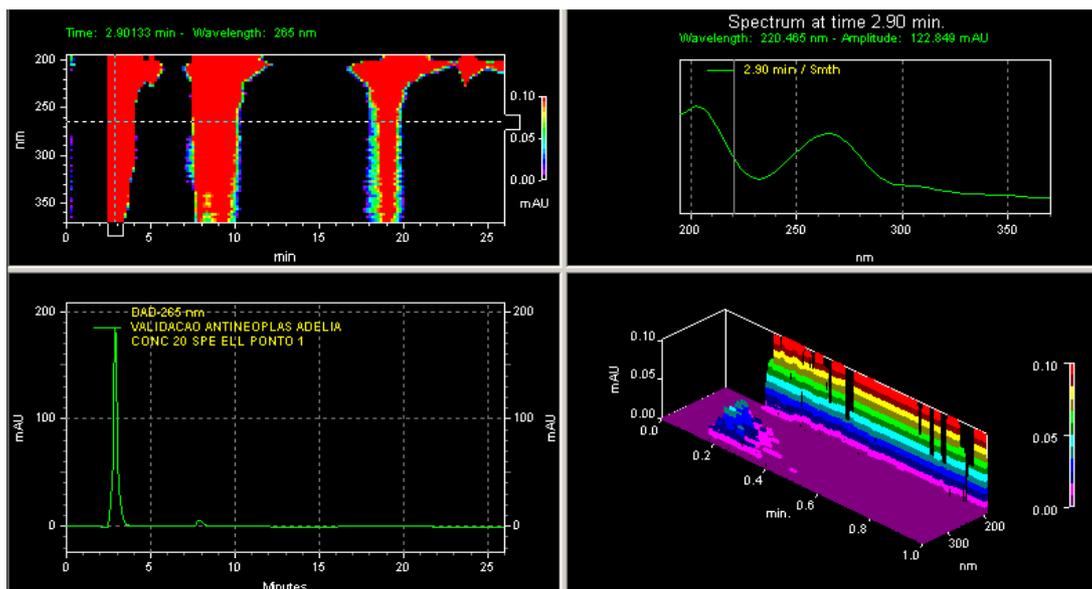


Figura 13- Espectros obtidos a partir da análise de 5-fluoruracila, na concentração $20 \mu\text{g mL}^{-1}$, no detector DAD, coluna C18 (250 x 4,6 mm, 5 μm), fase móvel: água pH 4,0: metanol: acetonitrila (35:15:50, v/v/v)

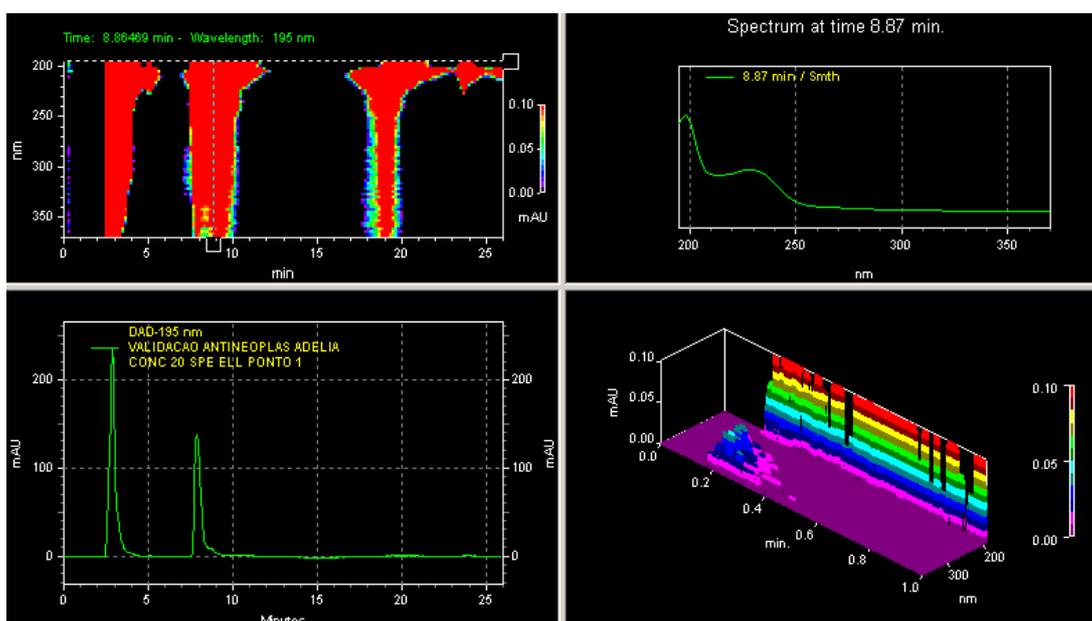


Figura 14- Espectros obtidos a partir da análise de paclitaxel, a $20 \mu\text{g mL}^{-1}$, no detector DAD, coluna C18 (250 x 4,6 mm, 5 μm), fase móvel: água pH 4,0: metanol: acetonitrila (35:15:50, v/v/v)

As quatro vistas (telas), demonstradas nas Figuras 11, 12 e 13 podem ser descritas como:

a) *Mixed View* (superior esquerda), que corresponde a uma visão superior dos picos. Nessa tela é possível ajustar o comprimento de onda de absorção máxima, relacionando-o ao tempo de retenção;

b) *Spectrum* (superior direita), que corresponde ao espectro de absorção (varredura) do pico, no tempo de retenção selecionado;

c) Cromatograma (inferior esquerda), que corresponde ao comprimento de onda selecionado no *Mixed View*;

d) 3D (inferior direita), que corresponde a visualização do cromatograma em três dimensões.

Após a eluição da solução contendo os três analitos, selecionou-se o pico de interesse, pelo tempo de retenção e, esse era então, comparado com uma biblioteca criada, a partir da análise de soluções-padrão dos analitos, nas mesmas condições cromatográficas otimizadas nesse estudo. Considerou-se como 98% o valor mínimo de similaridade todavia, não foi possível encontrar na literatura dados que corroborassem esse critério.

O detector utilizado permitiu a seleção de comprimentos de onda diferentes, dependendo somente da maior absorção dos analitos. Assim, é possível observar na Figura 11 que, para o MTX, o comprimento de onda de maior absorção é 302 nm, o que está de acordo com os valores descritos por Rubino (2001). Já, para a 5-FU, o comprimento de onda de maior absorção foi 265 nm (Figura 12), apesar da revisão de Turci et al. (2003) referenciar estudos que utilizaram comprimentos de onda de 254 e 260 nm. Para o PAC, o comprimento de onda de maior absorção foi 195 nm (Figura 13), o qual fora anteriormente utilizado por Larson; Khazaeli; Dillon (2003).

Quanto à coluna cromatográfica, utilizou-se a mesma já utilizada no método para superfícies, todavia em uma temperatura do forno maior, o que proporcionou uma melhor definição dos picos. O sistema em fase reversa é o mais utilizado para esses três analitos, de acordo com Larson; Khazaeli; Dillon (2003) e Turci et al. (2003).

Conforme demonstrado na Figura 14, não houve separação cromatográfica, em 195 nm, entre o MTX e a 5-FU, pois esses co-eluíram, sendo satisfatório somente para o PAC.

Esse comprimento de onda foi otimizado no método para análise dos fármacos em superfícies, em UV e, também, utilizado por Larson; Khazaeli; Dillon (2003).

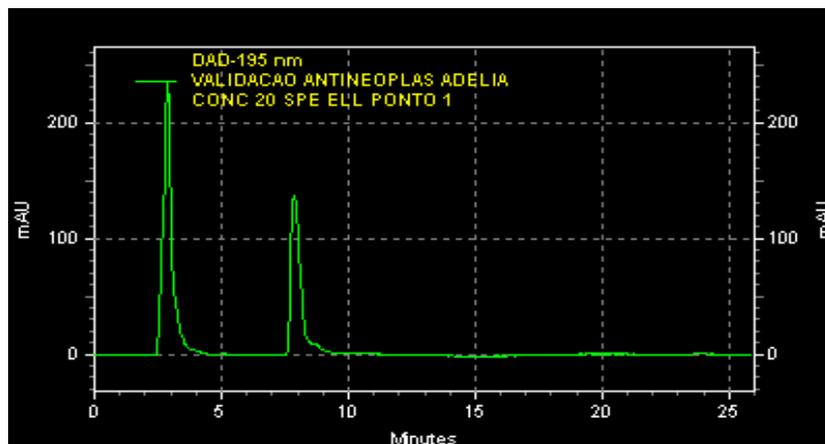


Figura 15- Cromatograma obtido a partir da injeção de solução padrão contendo os analitos: metotrexato (MTX), 5-fluoruracila (5-FU) e paclitaxel (PAC) na concentração de $20 \mu\text{g mL}^{-1}$, identificados por CLAE-UV(195 nm) nas condições otimizadas

Quando a mesma amostra foi analisada em diferentes comprimentos de onda, simultaneamente, em função do pico de maior absorção de cada um, foi possível detectá-los separadamente, conforme demonstra a Figura 15.

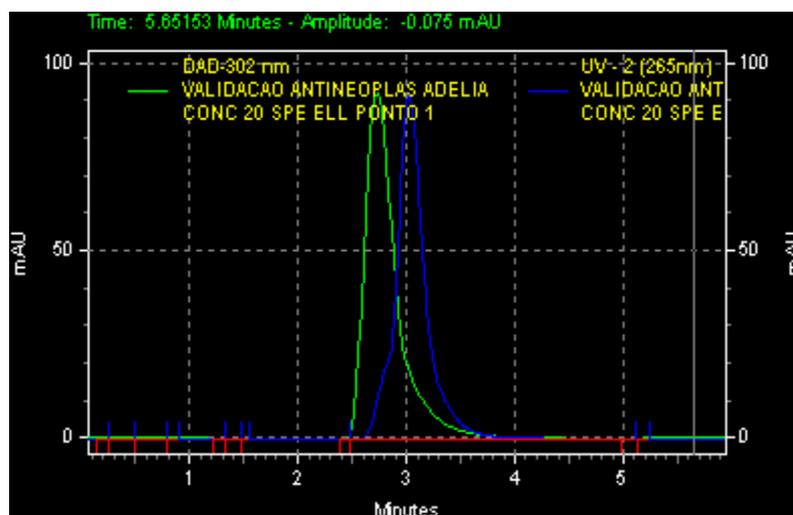


Figura 16- Cromatogramas obtidos a partir da injeção de solução-padrão contendo os analitos metotrexato (em verde, analisado em 302 nm), na concentração de $20 \mu\text{g mL}^{-1}$ e 5-fluoruracila (em azul, analisado em 265 nm), na concentração de $10 \mu\text{g mL}^{-1}$, identificados por CLAE-DAD nas condições otimizadas

5.2.2 Otimização das técnicas de extração

Após vários testes, otimizou-se a técnica para a análise das luvas, que consistiu em acrescentar-se 18 mL de NaOH 0,03 mol L⁻¹ ao par de luvas, de modo que esse volume escorresse por toda a superfície, em recipiente apropriado. Em seguida, o recipiente foi levado ao banho ultrassônico por 30 minutos. Recolheu-se então 15 mL do líquido, o qual foi submetido à centrifugação por 30 min a 580 g. O sobrenadante foi utilizado para a ELL (Figura 16) e para a SPE (Figura 17) destacando-se que o produto de cada extração foi reunido em um mesmo tubo e seco, antes de ser ressuspensão na fase móvel.

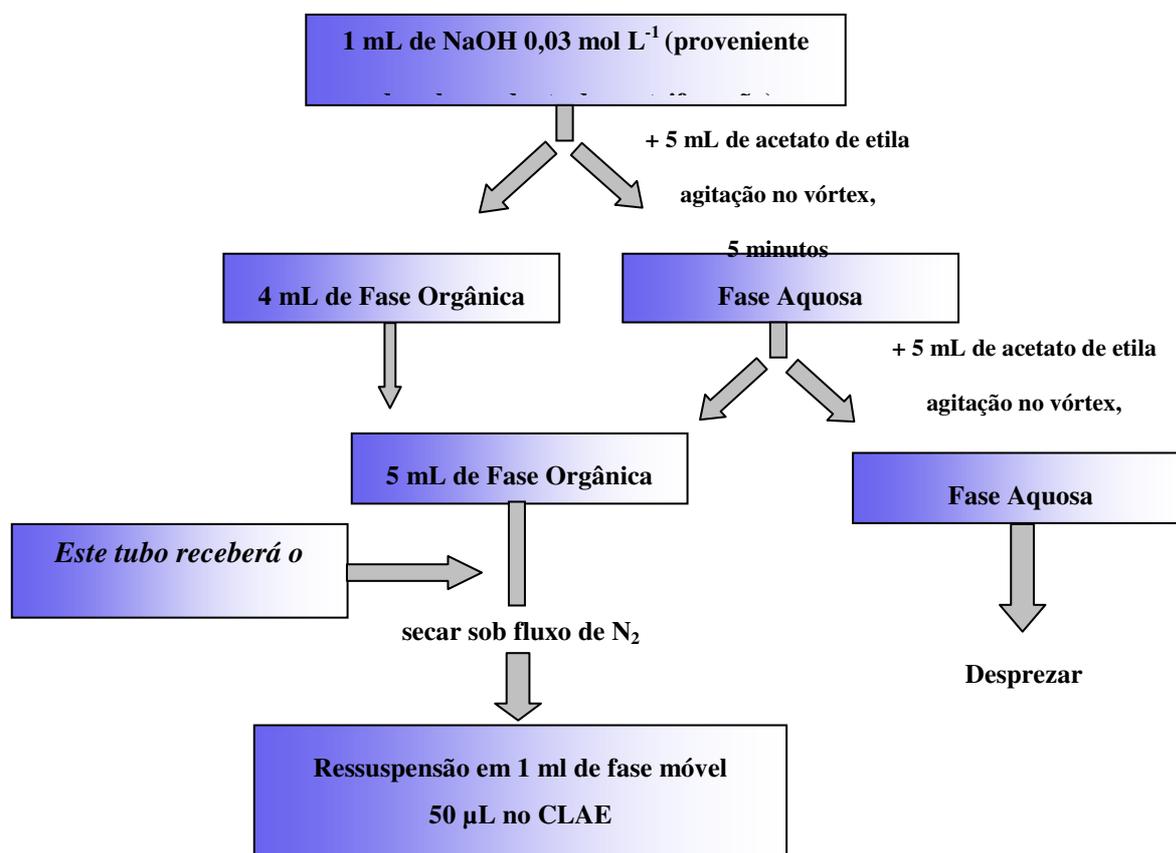


Figura 17 - Fluxograma da técnica de extração líquido-líquido (ELL) de antineoplásicos em luvas

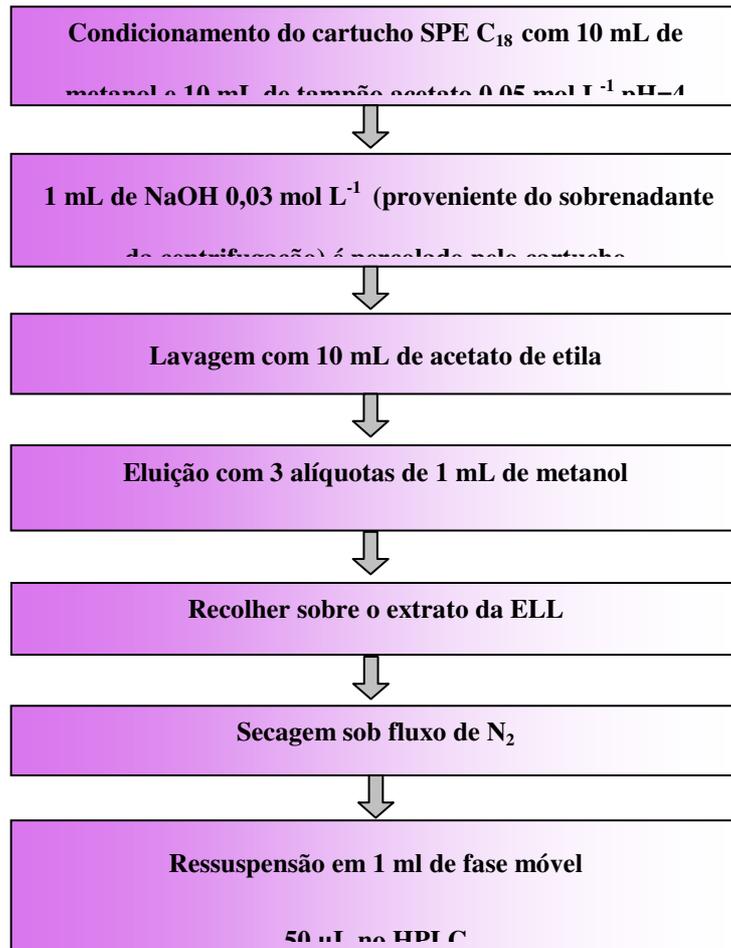


Figura 18- Fluxograma da técnica de extração em fase sólida (SPE) de antineoplásico em luvas

Ressalta-se que, primeiramente foram realizados testes de injeção direta tendo como líquido de limpeza a solução de acetonitrila: metanol (50:50, v/v), todavia esta solução reagiu com o látex das luvas, por este motivo considerada como inadequada.

Outra solução de limpeza investigada foi a solução de NaOH 0,03 mol L⁻¹; contudo, os resultados não foram satisfatórios, pois o MTX, o primeiro analito a eluir, começou a apresentar integração insatisfatória. Além disso, analisando-se os resultados provenientes de luvas não fortificadas foi possível observar picos nos tempos de retenção dos analitos. Assim, concluiu-se que para as luvas teria que ser realizada a etapa de extração.

O preparo de amostra num processo analítico, tipicamente, consiste na extração de componentes de interesse da matriz e o procedimento varia no grau de seletividade, velocidade e conveniência e sua otimização, para cada situação, é de importância relevante no

procedimento analítico. A escolha de um processo deve ser fundamentada na compreensão dos princípios fundamentais que governam a transferência de massa dos analitos em sistemas multifásicos. O pré-tratamento de amostras é a etapa mais crítica e trabalhosa da análise cromatográfica (QUEIROZ; COLLINS; JARDIM, 2001). Admite-se que um preparo de amostra apropriado afeta grandemente a exatidão e confiança na análise (FLANAGAN et al., 2006).

A técnica de extração primeiramente estudada foi a líquido-líquido e, os resultados de recuperação foram satisfatórios somente para a 5-FU e para o PAC, nas condições representadas na Figura 16. Esses analitos têm afinidade por solventes orgânicos e, assim o acetato de etila foi o solvente adequado para ambos. Porém, a técnica não apresentou recuperação satisfatória para o MTX.

Diferentemente dos outros dois analitos, o MTX é solúvel em solventes polares, o que dificultaria sua extração líquido-líquido, já que as luvas foram lavadas com solução de NaOH.

Assim, optou-se por testar a extração em fase sólida e, após revisão da literatura foi possível observar que a fase octadecila (C18), usando MeOH para a eluição do analito, foi a condição mais adequada e, é uma das mais utilizadas para esse fármaco, conforme verificado na revisão de Minoia e Perbellini (2000).

De fundamental importância ressaltar que o processo de extração reúne em um mesmo tubo, os produtos das técnicas de extração líquido-líquido (fase orgânica) e da extração em fase sólida (eluato) como demonstram os fluxogramas (Figura 16 e Figura 17).

5.2.3 Características de desempenho do método

Na Tabela 19 podem ser observados os parâmetros de conformidade do sistema, avaliados nesse estudo. Os resultados foram considerados satisfatórios, de acordo com Shabir et al. (2003). O MTX apresentou fator de capacidade menor que 2, o que não afetou a quantificação desse analito.

Tabela 19 - Parâmetros de conformidade do sistema* obtidos com os analitos metotrexato (MTX), 5-fluoruracila (5-FU) e paclitaxel (PAC) na concentração de $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ identificados por CLAE-DAD-UV nas condições otimizadas

| analitos | tempo retenção (min) | pratos teóricos (N) | resolução** (Rs) | assimetria (T) | fator capacidade (K) |
|-----------------|-------------------------------------|--------------------------------|-----------------------------|---------------------------|---------------------------------|
| MTX | 2,0 | 2323 | 0 | 1,3 | 1 |
| 5-FU | 2,8 | 5987 | 2,5 | 1,4 | 2 |
| PAC | 7,7 | 16052 | 12,6 | 1,2 | 7 |

Nota:* $N \geq 2000$; $R_s \geq 2$; $0,5 \leq T \leq 2$; $k > 2$, de acordo Shabir et al. (2003)

** parâmetro calculado entre MTX and 5-FU e entre o 5-FU e o PAC

Crauste-Manciet et al. (2005), em seu estudo de detecção de FAN em superfícies e luvas, obtiveram o LD para 5-FU de $0,02 \mu\text{g mL}^{-1}$ e, para o MTX de $0,01 \mu\text{g mL}^{-1}$. Para o PAC, Larson; Khazaeli; Dilon (2003) obtiveram o LD de $2,0 \mu\text{g mL}^{-1}$. Ao compararmos os limites de detecção, referenciados nas Tabelas 9, 10 e 11 com o presente estudo, verifica-se que os resultados obtidos estão de acordo com outros autores.

A linearidade foi estudada no intervalo de $0,25$ a $20 \mu\text{g mL}^{-1}$ para os três analitos e, os resultados estão demonstrados na Tabela 20.

As equações de regressão linear foram obtidas pelo método dos mínimos quadrados e, os coeficientes de determinação (r^2) superiores a $0,99$, foram considerados satisfatórios, de acordo com a RE 899/03, da ANVISA (BRASIL, 2003).

Com base nos resultados obtidos, o limite de detecção do método foi $0,1 \mu\text{g mL}^{-1}$ para a PAC e , $0,2 \mu\text{g mL}^{-1}$ para 5-FU e MTX. O limite de quantificação foi $0,25 \mu\text{g mL}^{-1}$ para 5-FU, MTX e PAC.

Esses limites foram determinados pela equação de regressão linear, uma vez que o ruído do branco, quando submetido ao processo de extração foi muito elevado, o que poderia levar a erros no estabelecimento da relação sinal ruído.

Tabela 20 - Linearidade, limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ) do método de determinação simultânea para 5- fluoruracila (5-FU), metotrexato (MTX) e paclitaxel (PAC), por CLAE-DAD-UV

| parâmetros | 5-FU | MTX | PAC |
|--|-----------------------|------------------------|------------------------|
| linearidade (r²) | 0,9986 | 0,9966 | 0,9990 |
| faixa trabalho (µg mL⁻¹) | 0,25 – 20 | 0,25 – 20 | 0,25 - 20 |
| equação de regressão linear | y = 180915x+ 33007 | y = 107739x- 1936,8 | y = 159801x+ 9124,5 |
| LD (µg mL⁻¹) | 0,2 | 0,1 | 0,2 |
| LQ (µg mL⁻¹) | 0,25 | 0,25 | 0,25 |

A precisão é um critério que determina os erros aleatórios da análise. Nesse trabalho, foi expressa como desvio padrão relativo, cujos valores são apresentados na Tabela 21.

Tabela 21 - Precisão intra-corrída (repetibilidade) e intercorrída (precisão intermediária), avaliada pelo desvio padrão relativo (DPR%), obtida na análise de luvas, contendo antineoplásicos (n=6), por CLAE-DAD-UV com prévia extração dos analitos

| DPR % | | | | | | |
|--|----------------------|---------------------|----------------------|---------------------|----------------------|---------------------|
| *conc. (µg mL⁻¹) | MTX | | 5-FU | | PAC | |
| | intra-corrída | intercorrída | intra-corrída | intercorrída | intra-corrída | intercorrída |
| 0,25 | 8,0 | 9,0 | 8,0 | 12,0 | 9,0 | 14,0 |
| 2 | 13,0 | 2,0 | 13,0 | 7,0 | 15,0 | 2,0 |
| 20 | 14,0 | 14,0 | 13,0 | 11,0 | 9,0 | 8,0 |

Nota: *conc = concentração.

Segundo recomenda a ANVISA (BRASIL, 2003), a repetibilidade do método, pode ser considerada satisfatória se valores obtidos possuírem um desvio menor ou igual a 20%, em relação a concentração nominal, para o LQ e, desvio menor ou igual a 15%, em relação à concentração nominal, para as outras concentrações da curva de calibração.

Os resultados obtidos no presente trabalho foram satisfatórios para esse parâmetro da validação. Convém ressaltar que esses valores, na referida resolução, são preconizados para métodos bioanalíticos, que passam pela etapa de preparo de amostra. Assim, apesar desse estudo não utilizar amostras biológicas, a técnica de preparo de amostra foi fundamental para a otimização do método.

No estudo de Florida et al. (1999a), que analisaram a parte interna de toucas, e superfícies de trabalho, tais como pavimento, prateleiras, maçanetas, valores obtidos para a precisão foram de 2 a 15%, no intervalo estudado para o MTX. Larson; Khazaeli; Dillon (2003) relataram dados sobre precisão, para a 5-FU, de 0,19 a 2,0% e de 3,5 a 19,7%, para o PAC, quando foram injetadas solução-padrão, diretamente no CLAE.

Castiglia et al. (2008), na análise de luvas, obtiveram um DPR intra-dia de até 8,5% e interdia de até 13,1%, para a 5-FU. Ressalta-se que, nesse trabalho, os autores usaram a técnica de *wipe* teste, com terra de diatomácea como sorvente para a extração do analito.

A recuperação mede a eficiência do procedimento de extração de um método analítico dentro de um limite de variação. Porcentagens de recuperação próximas a 100% são desejáveis, porém, admite-se valores diferentes, desde que seja precisa e exata (BRASIL, 2003).

A porcentagem de recuperação (Tabela 22) foi obtida a partir da relação entre as respostas (áreas) das amostras extraídas e não-extraídas. Para tanto, foram analisadas três concentrações em sextuplicata, contemplando a faixa de linearidade do método, e as áreas obtidas nas amostras não extraídas ou seja, quando se extraiu a solução de NaOH 0,03 mol L⁻¹, sem adição de analitos e, ao extrato adicionou-se os padrões nas respectivas concentrações, que representam 100% de recuperação, foram comparadas àquelas obtidas quando a amostra foi submetida ao procedimento de extração. Dessa forma, além de observar a eficiência do processo de extração, levou-se em conta o efeito da matriz. Sottani et al. (2000), obtiveram recuperação superior a 80% quando extraíram o PAC de amostras de luvas, com acetato etila e detecção por CLAE-EM.

Tabela 22 - Recuperação do método de determinação simultânea de metotrexato (MTX), 5-fluoruracila (5-FU) e paclitaxel (PAC) em luvas (n=6), analisadas pelo método CLAE-DAD-UV, com prévia extração dos analitos

| concentração | MTX | 5-FU | PAC |
|--------------|-----|------|-----|
|--------------|-----|------|-----|

| ($\mu\text{g mL}^{-1}$) | (%) | (%) | (%) |
|---------------------------|-------|-------|------|
| 1 | 115,0 | 90,0 | 89,0 |
| 2 | 115,0 | 103,0 | 71,0 |
| 20 | 86,0 | 94,0 | 96,0 |

5.2.4 Aplicação do método em amostras de luvas

Foram coletadas 6 amostras de indivíduos que trabalhavam em um laboratório de pesquisa, sendo que somente as amostras 5 e 6 foram submetidas ao processo de descontaminação, efetuado conforme procedimento do laboratório. Os resultados, demonstrados na Tabela 23, indicam que o MTX e o PAC foram detectados e quantificados em três, das seis, amostras analisadas. Já, a 5-FU foi detectada em todas as amostras porém, quantificada somente em três delas.

Tanto a detecção quanto a quantificação dos analitos sugerem que os procedimentos de manipulação, dos FAN, precisam ser revisados pois, as luvas podem disseminar a contaminação no ambiente de trabalho. Ainda, é preocupante o fato da 5-FU ter sido detectada em luvas que foram supostamente descontaminadas, apesar de não ter sido possível sua quantificação pois, as áreas obtidas foram menores do que as do LQ desse método. Isso sugere que o processo utilizado para descontaminação não foi eficiente, apesar de ser o recomendado na literatura.

Tabela 23 - Concentração de antineoplásicos em amostras de luvas utilizadas por pesquisadores, determinadas por CLAE-DAD-UV, nas condições otimizadas (*continua*)

| amostra | metotrexato ($\mu\text{g mL}^{-1}$) | 5-fluoruracila ($\mu\text{g mL}^{-1}$) | paclitaxel ($\mu\text{g mL}^{-1}$) |
|---------|--|---|---|
| 1 | 3,0 | 0,5 | 0,5 |
| 2 | 4,8 | D** | ND* |
| 3 | 3,2 | 0,7 | 0,8 |

Tabela 23 - Concentração de antineoplásicos em amostras de luvas utilizadas por pesquisadores, determinadas por CLAE-DAD-UV, nas condições otimizadas (*conclusão*)

| amostra | metotrexato ($\mu\text{g mL}^{-1}$) | 5-fluoruracila ($\mu\text{g mL}^{-1}$) | paclitaxel ($\mu\text{g mL}^{-1}$) |
|---------|--|---|---|
|---------|--|---|---|

| | | | |
|---|-----|-----|-----|
| 4 | ND* | 0,4 | 0,3 |
| 5 | ND* | D** | ND* |
| 6 | ND* | D** | ND* |

Nota: ND*= não detectado pelo método; D**= detectado porém, não quantificado pelo método

Conforme pode ser observado na Tabela 23, os resultados obtidos sugerem que a exposição dos voluntários foi a diferentes concentrações, não controladas, uma vez que o objetivo desse teste foi aplicar o método desenvolvido em situação de real exposição. Todavia, existem alguns fatores, tais como a concentração manuseada, o tempo e/ou a frequência de exposição, que aumentam a probabilidade de absorção, com conseqüente aumento do risco. Desde 1979, existem relatos que o risco de mutagenicidade aumenta quando se eleva o tempo/ frequência de exposição (Falck et al., 1979).

Roberts et al. (2006) após estudarem a descontaminação de superfícies, demonstraram que a 5-FU não foi degradada, mesmo após exposição durante 1 hora a detergentes fortemente alcalinos, ácidos e neutros. Martins; Apostoli e Della Rosa (2008), demonstraram a permanência da ciclofosfamida nas superfícies, mesmo após a descontaminação.

Apesar dos achados do presente trabalho não serem suficientes para delimitar a real dimensão da contaminação do ambiente com os FAN, reforçam os achados anteriores e, demonstram que o presente método pode ser utilizado para a monitorização da exposição ocupacional a tais substâncias, simultaneamente.

6 CONCLUSÕES

De acordo com os resultados obtidos no presente trabalho foi possível concluir que, para a determinação em superfícies:

a) as condições otimizadas para o método analítico de determinação simultânea dos antineoplásicos, 5-fluoruracila, metotrexato, ifosfamida, doxorubicina e ciclofosfamida, utilizando a cromatografia líquida de alta eficiência, foram: detecção a 195 nm (UV), coluna C18 (250 x 4,6 mm, 5 μ m) com pré-coluna similar, fase móvel constituída de água pH 4,0: metanol: acetonitrila (70:13:17, v/v/v), vazão de 0,4 mL min⁻¹ até 13 minutos e 1 mL min⁻¹, até o fim da corrida cromatográfica;

b) foram obtidos valores de recuperação satisfatórios para a determinação simultânea dos fármacos estudados, utilizando NaOH 0,03 mol L⁻¹, como líquido de limpeza das superfícies, e extração líquido-líquido com acetato de etila: isopropanol (7:3, v/v);

c) foram obtidos resultados satisfatórios para determinação simultânea dos fármacos estudados, utilizando metanol: acetonitrila (50:50, v/v), como líquido de limpeza de superfícies, e injeção direta, sem prévia extração. O método demonstrou-se linear para a 5-FU e MTX, no intervalo de 0,25 a 20 μ g mL⁻¹ e, para IFO, DOX e CF, no intervalo de 0,5 a 20 μ g mL⁻¹, com coeficientes de determinação superiores a 0,99. A recuperação obtida foi em torno de 74 a 106%, para todos os analitos e a repetibilidade foi inferior ou igual a 11%;

d) método desenvolvido é de fácil execução, de baixo custo e, pode ser empregado na avaliação da exposição ocupacional dos fármacos antineoplásicos estudados.

De acordo com os resultados obtidos no presente trabalho foi possível concluir que, para a determinação em luvas:

a) as condições otimizadas para o método analítico de determinação simultânea dos antineoplásicos, metotrexato, 5-fluoruracila e paclitaxel, utilizando a cromatografia líquida de alta eficiência, foram: detecção em DAD e quantificação em UV, sendo 195 nm, 265 nm e 302 nm, os comprimentos de onda utilizados para o PAC, 5-FU e MTX, respectivamente, coluna C18 (250 x 4,6 mm, 5 μ m) com pré-coluna similar, fase móvel constituída de água pH 4,0: metanol: acetonitrila (35:15:50, v/v/v) na vazão de 1 mL min⁻¹;

b) a porcentagem de recuperação foi satisfatória, para os analitos 5-FU e PAC, quando a amostra foi submetida a extração líquido-líquido, com acetato de etila, com valores em torno de 71 a 103%;

c) porcentagem de recuperação satisfatória foi obtida, para o analito MTX, quando a amostra foi submetida ao procedimento de extração em fase sólida, em cartuchos C18 e eluição com MeOH, com valores de 86 a 115%;

d) o método demonstrou-se linear no intervalo de 0,25 a 20 $\mu\text{g mL}^{-1}$, com coeficientes de determinação superiores a 0,99 e, a repetibilidade foi inferior ou igual a 15%, para todos os analitos;

e) o método revelou-se eficiente para ser aplicado em situações de exposição ocupacional pois, permitiu quantificar os analitos, em amostras reais, com valores iguais ou acima de 0,25 $\mu\text{g mL}^{-1}$. O uso do detector por arranjo de diodos permitiu a detecção, por comparação da similaridade (pureza do pico), ainda que a concentração dos analitos, nas amostras, estivessem abaixo do LQ do método.

REFERÊNCIAS

ALESSIO, L. et al. Prevenzione dei rischi da esposizione professionale a chemioterapici antiblastici. Documento di consenso. **La Medicina del Lavoro**, Fidenza, v.87, p.194-200, 1996.

ALMEIDA, J. R. C. **Farmacêuticos em oncologia - uma nova realidade**. São Paulo: Atheneu, 358 p, 2004.

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**, São Paulo, v.28, p.118-129, 2005.

ANDERSON, R. W. et al. Cyclophosphamide: review of its mutagenicity for assessment of potential germ cell risks. **Mutation Research**, Amsterdam, v.330, p.115-181, 1995.

APOSTOLI, P. et al. Criteri e metodi per lo studio dell'esposizione occupazionale a chemioterapici antiblastici. **La medicina del Lavoro**, Fidenza, v.87, n.3, p.230-254, 1996.

APOSTOLI, P. ; FACCO, P. ; ALESSIO, L. **Convenzione ISPESL pelo studio: Messa a punto di una lista di controllo per valutare l'esposizione degli adetti alla preparazione dei chemioterapici antiblastici** [tesis]. Brescia: Universidade degli Studi di Brescia, Dipartimento di Medicina Sperimentale ed Applicata, Cattedra di Medicina del Lavoro, Cattedra di Igiene Industriale; [Folheto], 2001.

ATVARAS, T.D.Z.; MARTELLI, C. **Espectroscopia eletrônica de absorção**. 1996. Disponível em: < <http://www.chemkeys.com/artigo/7/73/#> >. Acesso em: 15 jan. 2009.

BAKER, E. S.; CONNOR, T. H. Monitoring occupational exposure to cancer chemotherapy drugs. **American Journal of Health-System Pharmacy**, Bethesda, v.53, n.22, p. 2713 - 2723, 1996.

As referências estão de acordo com o manual de normalização para elaboração de trabalhos acadêmicos, dissertações e teses da UNIFAL- MG

BELIZÁRIO, J.E.; GARAY, M.; DELUCIA, R. Fármacos antineoplásicos. In: DELUCIA, R. ; OLIVEIRA-FILHO, R. M. **Farmacologia Integrada**. 2 ed. Rio de Janeiro: Revinter, p.502-525, 2004.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária-**Banco de Dados de Medicamentos**. 2000. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/medicamentos/base>>, Acesso em: 20 jun. 2007

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução n. 899, de 29/05/2003. **Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos**. Visalegis. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/2003/re/899_03re>. Acesso em: 20 jun. 2007.

BERTRAM, J. S. The molecular biology of cancer. **Molecular Aspects of Medicine**, Elmsford, v.21, p.167-223, 2001.

BENVENUTO, J. A. et al. Degradation and inactivation of antitumor drugs. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, Washington, v.82, p. 988–991, 1993.

BOENTE, P. C. ; SAMPAIO FILHO, C. A. ; DEL GIGLIO, A. Agentes Antineoplásicos. In: SILVA, P. **Farmacologia**. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 1111-1117, 2002.

CARRICK S. et al. Single agent versus combination chemotherapy for metastatic breast cancer. **Cochrane Database of Systematic Reviews**, Sydney, Artigo nº CD003372, 2005.

CASTEGNARO, M. et al. Chemical degradation of wastes of antineoplastics agents 2: six anthracyclines: idarubicin, doxorubicin, epirubicin, pirarubicin, aclarubicin and daunorubicin. **International Archives of Occupational and Environmental Health**, Berlim, v.70, p. 378-384; 1997.

CASTIGLIA, L. et al. Evaluation of occupational exposure to antineoplastic drugs in an Italian hospital oncological department. **Journal of Occupational Health**, Tokio, v. 50, p. 46-48, 2008.

CHABNER, B. A.; CALABRESI, P. Quimioterapia das Doenças Neoplásicas In: GOODMAN, L. S.; GILMAN, A. **Bases Farmacológicas da Terapêutica**. 8. ed. São Paulo: McGraw-Hill, p. 903-949, 1995.

CHU, E.; SARTORELLI, A. C. Quimioterapia do Câncer. In: KATZUNG, B. G.; **Farmacologia Básica e Clínica**. 10. ed. São Paulo: McGraw-Hill, p.897-823, 2007.

CONNOR, T. H. et al. Surface contamination with antineoplastic agents in six cancer treatment centers in Canada and United States. **American Journal of Health-System Pharmacy**, Bethesda, v. 56, p.1427-1432, 1999.

CRAUSTE-MANCIET, S. et al. Environmental contamination with cytotoxic drugs in healthcare using positive air pressure isolators. **Annals of Occupational Hygiene**, Oxford, v. 47, p. 619-628, 2005

DEL GAUDIO, D.; MENONNA-QUINN, D. Chemotherapy: occupational potential hazards. **American Journal of Nursing**, New York, v. 98, n. 11, p.59-65, 1998.

DEMENT, J. M.; CROMER, J. R. Cancer and reproductive risks among chemists and laboratory workers: a review. **Applied Occupational and Environmental Hygiene**, Basingstoke, v. 7, n. 2, p.120-126, 1992.

EARLY BREAST CANCER TRIALISTS COLLABORATIVE GROUP (EBCTCG). Polychemotherapy for early breast cancer: an overview of the randomized trials. **Lancet**, London, v. 352, p. 930-42, 1998.

FALCK, K. et al. Mutagenicity in urine of nurses handling cytostatic drugs. **Lancet**, London, p.1250-1251, 1979.

FERGUSON, L. R.; PEARSON, A. E. The clinical use of mutagenic anticancer drugs. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 355, p.1-12, 1996.

FLANAGAN et al. Micro-extraction techniques in analytical toxicology: short review. **Biomedical Chromatography**, Londres, v. 20, p. 530-538, 2006.

FLORIDIA, L. et al. High-performance liquid chromatography of metotrexate for environmental monitoring of surface contamination in hospital departments and assessment of occupational exposure. **Journal of Chromatography B**, Amsterdam, v.726, n. 12, p. 95-103, 1999a.

FLORIDIA, L. et al. Measurement of surface contamination from nucleoside analogue antineoplastic drug by high-performance liquid chromatography in occupational hygiene studies of oncologic hospital departments. **Journal of Chromatography B**, Amsterdam, v.724, p. 325-334, 1999b.

FORNI, A. Rischi chimici genotossici per il personale ospedaliero. In: CONGRESSO NAZIONALE DI MEDICINA PREVENTIVA DEI LAVORATORI DELLA SANITÀ, 2, Brescia. **Atti**, p. 178-192, 1994.

FORNI, A.; BONATTI, S.; MERLER, E. Indicatori citogenetici di genotossicità in soggetti professionalmente esposti a chemioterapici antineoplastici. **La Medicina del Lavoro**, Fidenza, v. 87, n. 3, p. 222-229, 1996.

FOYE, W. O. et al. **Principles of medicinal chemistry**. Baltimore: Williams Wilkins, p. 822-845, 1996.

GOLONI, B. E. M. et al. Sister chromatid exchanges and chromosome aberrations in lymphocytes of nurses handling antineoplastic drugs. **International Journal of Cancer**, New York, v. 50, p. 341-344, 1992.

GRAHAME-SMITH, A.; ARONSON, J. K. **Tratado de Farmacologia Clínica e Farmacoterapia**. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 398-546, 2004.

GUEDES, M. H. A. **Condições de manuseio, saúde e segurança dos trabalhadores com antineoplásicos em hospitais do Distrito Federal**. 1998. 132 f. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde)-Universidade de Brasília, Brasília, 1998.

HAHN, W. C.; WEIBERG, R. A. Reviews Cancer. **Nature**, Massachusetts, v.2, n. 331, 2002.

HEDMER, M. et al. Surface contamination of cyclophosphamide packaging and surface contamination with antineoplastic drugs in a hospital pharmacy in Sweden. **Annals of Occupational Hygiene**, New York, v. 49, p. 629-637, 2005.

HIROSE, J. et al. Inactivation of antineoplastics in clinical wastewater by electrolises. **Chemosphere**, Oxford, v. 60, p. 1018-1024, 2005.

HOWLAND, R. D.; MYCEK, M. J. **Farmacologia ilustrada**. Porto Alegre: Artmed, cap. 39, p. 453-484, 2007.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER-INCA. **O que é câncer?** Disponível em: <<http://www.inca.gov.br/cancer>>. Acesso em: 04 nov. 2008.

INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER. **IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans**. Disponível em: <http://www.novetas.net/IARC%20Monographs-%20Classifications%20-%20Group1.pdf>. Acesso em: 19 fev. 2008.

JACKSON, M. A.; STACK, H. F.; WATERS, M. D. Genetic activity profiles of anticancer drugs. **Mutation Research**, Amsterdam, v.355, p.171-208, 1996.

JOCHIMSEN, P. R.: Handling of cytotoxic drugs by health workers: a review of the risks of exposure. **Drug Safety**, Auckland, v. 7, n. 5, p. 374-80. 1992.

JONES D.; GHERSI D.; WILCKEN N. Addition of drug/s to a chemotherapy regimen for metastatic breast cancer. **Cochrane Database of Systematic Reviews**, Belfast, 2006.

KIURA, H. et al. Bactericidal activity of electrolyzed acid water from solution containing sodium chloride at low concentration, in comparison with that at high concentration. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, v. 49, p.285-293, 2002.

KOROLKOVAS, A.; KOROLKOVAS, F. F. A. C.; CUNHA, B.C.A. **Dicionário terapêutico Guanabara**: 2005/2006. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005.

LARSON, R. R.; KHAZAELI, M. B.; DILON, H. K. Monitoring method for surface contamination caused by selected antineoplastic agents. **American Journal of Health-System Pharmacy**, Philadelphia, v.59, n.3, p. 270-277, 2002.

LARSON, R. R.; KHAZAELI, M. B.; DILON, H. K. Development of an HPLC method for simultaneous analysis of five antineoplastic agents. **Applied Occupational and Environmental Hygiene**, Birmingham, v.18, n.2, p.109-119, 2003.

LEE, L. The risks of handling cytotoxic therapy. **Nursing Standard**, Londres, v. 7, p. 25-28, 1993.

LI, H. et al. Method for the determination of blood methotrexate by high performance liquid chromatography with online post-column electrochemical oxidation and fluorescence detection. **Journal of Chromatography B**, Amsterdam, v. 845, p.164-168, 2007.

MACHADO, A. E. D. Radicais livres de oxigênio. **Química Nova**, São Paulo, v.23, n.2, p. 267- 269, 2000.

MACHADO-SANTELLI, G. M. Mutagênese e carcinogênese. In: OGA, S. **Fundamentos de Toxicologia**, 3.ed. São Paulo: Atheneu, p.77-89, 2008.

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. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 471, p. 21-27, 2000.

MARTINS, I. **Avaliação da exposição dos profissionais da área da saúde à ciclofosfamida**.132 f.. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas)-Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.

MARTINS, I.; APOSTOLI, P.; DELLA ROSA, H.V. Cyclophosphamide identification in wipe test by GC-MS and solid phase extraction. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, São Paulo, v. 40, n.1, p. 67-73, 2004.

MARTINS, I. Validação Analítica. In: MOREAU, R. L. M., SIQUEIRA, M. E. P. B. **Toxicologia Analítica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, cap.3, p. 20-39. 2008.

MARTINS, I. ; APOSTOLI, P. ; DELLA ROSA, V. H. Cyclophosphamide levels in sites of preparation and administration of antineoplastic drugs. **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 27, n. 2, p. 217-223, 2008.

MARTINDALE, **The Extra Pharmacopoeia**. 31 ed. London: Royal Pharmaceutical Society, p.512-608, 1996.

McDEVITT, J. J.; LEES, P. S. J.; McDIARMID, M. A. Exposure of hospital pharmacists and nurses to antineoplastic agents. **Journal of Occupational and Environmental Medicine**, Chicago, v. 35, n.1, p.57-60, 1993.

MEDKOVA, J. Analysis of the health condition of the children born to the personnel exposed to cytostatics at an oncology unit. **Acta Universitatis Palackianae Olomucensis Facultatis Medicae**, Olomuc, v.130, p. 323-332, 1991.

MERCK index.12. ed. Rahway: Whitehouse Station, p. 479, 606, 740, 878, 1071 e 1251, 2001.

MICOLI, G. et al. Determination of 5-fluorouracil in environmental samples by solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection. **Journal of Chromatography B**, Amsterdam, v. 750, p. 25-32, 2001.

MIGUEL JÚNIOR, A. **Dicionário de Geriatria**, 2007. Disponível em:
< <http://www.geriatria.com.br/2007/03/saúde>>. Acesso em: 10 jan.2009.

MILKOVIC-KRAUS, S.; HORVAT, D. Chromosomal abnormalities among nurses occupationally exposed to antineoplastic drugs. **American Journal of Industrial Medicine**, New York, v.19, p. 771-774, 1991.

MINOIA, C. et al. Application of high-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry in the environmental and biological monitoring of health care personnel occupationally exposed to cyclophosphamide and ifosfamide. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, Chichester, v.12, p.1485-1493, 1998.

MINOIA, C. et al Monitoraggio ambientale e biologico nell'esposizione professionale a chemioterapici antitumorali. In: CONVEGNO NAZIONALE "PROGRESSI NELLA VALUTAZIONE DEL RISCHIO ESPOSITIVO A CHEMOTERAPICI ANTITUMORALI", Pavia, **Atti Pavia**, Bologna: Monduzzi; 1999.

MINOIA, C.; PERBELLINI, L. **Monitoraggio ambientale e biologico dell'esposizione professionale a xenobiotici**: chemioterapici antitumorali. Milano: Morgan, v.3, 265 p,2000.

MORITA, C. et al. Disinfection potential of electrolyzed solutions containing sodium chloride at low concentrations; **Journal of Virological Methods**, Amsterdam, v.57, p. 163-174, 2000.

MURAD, A. M.; KATZ, A. **Oncologia bases clínicas do tratamento**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 435 p. 1996.

NAKAJIMA, N. et al. Evaluation of disinfective potential of reacted free chlorine in pooled tap water by electrolysis. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, v.57, p.163-173, 2004.

NEAL, A. D.; WADDEN, R. A.; CHIOU, W. L. Exposure of hospital workers to air-borne antineoplastic agents. **American Journal of Hospital Pharmacy**, New York, v. 40, p. 597-601, 1983.

NATIONAL INSTITUTE FOR OCCUPATIONAL SAFETY AND HEALTH (NIOSH). **Manual of Analytical Method**, Washington, Fourth edition, Method 9100: Lead in surface wipe samples, 8/15/94.

NATIONAL INSTITUTE FOR OCCUPATIONAL SAFETY AND HEALTH (NIOSH). **Preventing Occupational Exposures to Antineoplastic and Other Hazardous Drugs in Health Care Settings**. DHHS (NIOSH) Publication N° 2004-165. Washington DC: US Department of Health and Human Services, Public Health Service, Centers for Disease Control and Prevention. 2004.

OLIVEIRA, R. B.; ALVES, R. J. Agentes antineoplásicos biorredutíveis: uma nova alternativa para tratamento de tumores sólidos. **Química Nova**, São Paulo, v. 25, p. 976, 2002.

PALAZZO, S. et al. Linee guida per la tutela della salute e per la sicurezza dei lavoratori esposti a chemioterapici antitumorali. **La Medicina del Lavoro**, Fidenza, v. 87, n. 3, p. 255-264, 1996.

PETERS, F. T.; DRUMMER, O. H.; MUSSHOF, F. Validation of new methods; **Forensic Science International**, Lausanne, v.165, p. 216-224, 2007.

PRIANTE, E.; ALESSANDRO, G.; CLONFERO, E. Esposizione dei lavoratori ospedalieri a farmaci citostatici. In: CONGRESSO NAZIONALE DI MEDICINA PREVENTIVA DEI LAVORATORI DELLA SANITÀ, 2, Brescia, **Atti**. p. 156 -167, 1994

PYY, L.; SORSA, M.; HAKALA, E. Ambient monitoring of cyclophosphamide in manufacture and hospitals. **Journal American Industrial Hygiene Association**, Akron, v.49, p.314-317, 1988.

QUEIROZ, S. C. N.; COLLINS, C. H.; JARDIM, C.S.F. Métodos de extração e/ou concentração de compostos encontrados em fluidos biológicos para posterior determinação cromatográfica. **Química Nova**, São Paulo, v. 24, p.68-6, 2001.

RANG, H.P. et al. **Farmacologia**. 5. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, p.789-809, 2004.

RIBANI, M. et al. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, São Paulo, v. 27, n. 5, p.771-780, 2004.

ROBERTS, S. et al. Studies on the decontamination of surfaces exposed to cytotoxic drugs in chemotherapy workstations. **Journal of Oncology Pharmacy Practice**, Londres, v.12, n.2, p. 95-104, 2006.

RUBINO, F. M.; Separation methods for metotrexate, its structural analogues and metabolites. **Journal of Chromatography B**, Amsterdam, v. 764, p. 217-254, 2001.

SCHMAHL, D. et al. Occurrence of second tumors in man after anticancer drug treatment. **Cancer Treat. Rev.** vol.9, p.167-194, 1982

SCHMAUS, G.; SCHIERL, R.; FUNCK, S. Monitoring surface contamination by antineoplastic drugs using gas chromatography-mass spectrometry and voltammetry. **American Journal of Health-System Pharmacy**, Bethesda, v. 59, n.10, p. 956-961, 2002.

SCHULZ, H. et al. Antineoplastic agent workplace contamination study: the Alberta Cancer board pharmacy perspective. **Journal of Oncology Pharmacy Practice**, Londres, v. 11, p.101-109, 2005.

SCIFINDER Scholar. American Chemical Society. **Copyright@2005. Versão 2006.**

SELEVAN, S. G. et al. A study of occupational exposure to antineoplastic drugs and fetal losses in nurses. **New England Journal of Medicine**, Waltham, v. 313, p.1173-8, 1985.

SESSINK, P. J. M. et al. Occupational exposure to antineoplastic agents at several departments in a hospital. Environment contamination and excretion of cyclophosphamide and ifosfamide in urine of exposed workers. **International Archives of Occupational and Environmental Health**, Berlim, v. 64, p.105-112, 1992.

SESSINK, P. J. M. et al. Occupational exposure of animal caretakers to cyclophosphamide. **Journal of Occupational Medicine and Toxicology**, Chicago, v. 35, p. 45-52, 1993.

SESSINK, P. J. M. et al.. Environmental contamination and assessment of exposure to antineoplastic agents by determination of cyclophosphamide in urine of exposed pharmacy technicians: is skin absorption an important exposure route? **Archives of Environmental & Occupational Health**, Washington, v. 49, p.165-169, 1994a.

SESSINK, P.J.M. et al. Assessment of occupational exposure of pharmaceutical plant workers to 5-fluorouracil. Determination α -Fluoro- β - alanine in urine. **Journal of Occupational and Environmental Medicine**, Chicago, v. 36, p. 79-83, 1994b.

SESSINK, P. J. M. et al. Exposure of pharmacy technicians to antineoplastic agents: reevaluation after additional protective measures, **Archives of Environmental & Occupational Health**, Washington, v. 52, n. 3, p. 240-244, 1997.

SESSINK, P. J. M.; BOS, R. P. Drug hazardous to healthcare workers: evaluation of methods for monitoring occupational exposure to cytostatic drugs. **Drug Safety**, Auckland, v. 20, n. 4, p. 347-359, 1999.

SHABIR G. A. J. et al. Validation of high-performance liquid chromatography methods for pharmaceutical analysis. Understanding the differences and similarities between validation requirements of the US Food and Drug Administration, the US Pharmacopeia and the International Conference on Harmonization. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 987, p.57-66, 2003.

SIEBER, S. M.; ADAMSON, H. R. Toxicity of antineoplastic agents in man: chromosomal aberrations, antifertility effects, congenital malformations, and carcinogenic potential. **Advances in Cancer Research**; Baltimore, v. 22, p. 57-155, 1975.

SORSA, M.; HEMMINK, K.; VAINIO, H.; Occupational exposure to anticancer drugs – potential and real hazards. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 154, p.135-49, 1985.

SORSA, M.; ANDERSON, D. Monitoring of occupational exposure to cytostatic anticancer agents. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 355, p. 253-261, 1996.

SOTTANI, C. et al. Rapid and sensitive determination of paclitaxel (taxol) in environmental samples by high-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry (HPLC-MS/MS). **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, Chichester, v. 14, p. 930-935, 2000.

SOUZA, M. V. N. Novos produtos naturais capazes de atuar na estabilização de microtúbulos, um importante alvo no combate ao câncer. **Química Nova**, São Paulo, v. 27, mar./abr., 2004.

SPARREBOOM, A. et al. Liquid chromatographic analysis and preliminary pharmacokinetics of methotrexate in cancer patients co-treated with docetaxel. **Journal of Chromatography B**, Amsterdam, v. 735, p. 111–119, 1999.

SPENCE, R. A. J.; JONHSTON, P. G. Cancer chemotherapy and biotherapy. In: JONHSTON, P.G. **Oncology**. Oxford: Oxford University Press, p.1-14,121-132, 2001.

TOMATIS, L. The identification of human carcinogens and primary prevention of cancer. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 462, p. 407-421, 2000.

TUCKER, M. A. et al. Risk of second cancers after treatment for Hodgkin`s disease. **New Engl. J. Med.**v.318, p.76-81, 1988.

TUFFNELL, P.G. eta al. Limitations of urinary mutagen assays for monitoring occupational exposure to antineoplastic drug. **American journal of Hospital Pharmacy**, Whashington,v.43, p.344-348, 1986.

TURCI, R. et al. Biological and environmental monitoring of hospital personnel exposed to antineoplastic agents: a review of analytical methods. **Journal of Chromatography B**, Amsterdam, v.789, p. 169 - 209, 2003.

TURCI, R. et al. Validation protocol and analytical quality in biological monitoring of occupational exposure to antineoplastic drugs. **Toxicology Letters**, Amsterdam, v. 162, p. 256-262, 2006.

UNITED STATES FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (US-FDA). **Links and Resources**: Drugs Supplements. Disponível em:< <http://www.fda.com> > Acesso em: 20 nov. 2008.

VENEGAS, L. F. P. et al. Exposição ocupacional a drogas antineoplásicas: condutas para manipulação segura. **Revista da Associação Médica do Rio Grande do Sul**, Porto Alegre, v. 39, n. 4, p.269-276, 1995.

WALKER, S. E.; BOLE G. G. Augmented incidence of neoplasia in NZB/NZW mice treated with longterm cyclophosphamide. **Journal of Laboratory and Clinical Medicine**, Saint Louis, v. 82, p. 619-629, 1973.

WEISBURGER, E. K. Bioassay program for carcinogenic hazards of cancer chemotherapeutic agents. **Cancer**, Philadelphia, v.40, p.1935 -1949, 1977.

WILSON, J. P.; SOLIMANDO, D. A. Antineoplastics: a safety hazard? **American Journal of Hospital Pharmacy**, Bethesda, v.38, p. 624, 1981.

ZHAO, P.; DASH, A. K. A simple HPLC method using a microbore column for the analysis of doxorubicin. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, Amsterdam, v. 20, p.543-548, 1999.

ANEXO I

Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
Universidade Federal de Alfenas . UNIFAL-MG
Rua Gabriel Monteiro da Silva, 714 . Alfenas/MG . CEP 37130-000
Fone: (35) 3299-1000 . Fax: (35) 3299-1063



DECLARAÇÃO

O Comitê de ética em Pesquisa da Universidade Federal de Alfenas declara para os fins que se fizerem necessários que o projeto de pesquisa DETERMINAÇÃO DE ANTINEOPLÁSICOS EM URINA E EM LUVAS VISANDO A AVALIAÇÃO DA EXPOSIÇÃO OCUPACIONAL A ESSES FÁRMACOS da Profa. Dra. Isarita Martins e Adélia Maria Pimenta de Pádua Alcântara foi apreciado e **aprovado** por este Comitê, com protocolo nº 23087.002048/2007-20.

Por ser expressão da verdade, firmo a presente Declaração.

Alfenas, 17 de setembro de 2007.


Prof. Elisabeth Pizzamiglio Vieira
Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa

ANEXO II

Confirmação de recebimento e submissão do artigo ao Journal of Occupational & Environmental Hygiene

Manuscript Central Account Created - Journal of Occupational & Environmental Hygiene

De: **onbehalfof@scholarone.com** em nome de **ccarol@u.washington.edu**

Enviada: quarta-feira, 12 de novembro de 2008 20:00:07

Para: **adeliamppa@hotmail.com**

12-Nov-2008

Dear Mrs. Alcântara:

Welcome to the Journal of Occupational & Environmental Hygiene.

An account has been created for you on our manuscript review website, Manuscript Central. Your account information is as follows:

URL: <http://mc.manuscriptcentral.com/joeh>

User ID: adeliamppa@hotmail.com

Click to create password:

http://mc.manuscriptcentral.com/joeh?URL_MASK=ZrjDrc4GCZ5sKtccx8Zt

When you log on for the first time, would you kindly enter your full address information and keyword(s) describing your particular areas of expertise.

You may update your name, salutation, affiliation, physical address, User ID, password, email address, and keyword information by logging onto Manuscript Central and clicking on "Edit Account" at the top of the webpage.

If you require assistance using Manuscript Central, you may telephone their Helpdesk at +1 434-817-2040 (option 1), Monday-Friday 3:00 am - 8:30 pm Eastern Time (USA); email the Helpdesk by clicking on "Get Help Now" at the top of the Manuscript Central webpage; or email the Editorial Office at ccarol@u.washington.edu.

You may check the status of submitted manuscripts or submit a new manuscript by logging onto Manuscript Central and clicking on your "Author Center."

If you have any questions or comments, or if you already have a Journal of Occupational & Environmental Hygiene account on Manuscript Central, would you kindly contact me at ccarol@u.washington.edu. Thank you for your participation.

Sincerely,

Cathi Carol
Editorial Office
Journal of Occupational & Environmental Hygiene

Fwd: JOEH-08-0175 Has Been Submitted to the Journal of Occupational & Environmental Hygiene]

De: **isarita@unifal-mg.edu.br**

Enviada:sábado, 21 de fevereiro de 2009 19:02:13

Para: **adeliamppa@hotmail.com**

----- Mensagem Original -----
Assunto: JOEH-08-0175 Has Been Submitted to the Journal of Occupational & Environmental Hygiene
De: ccarol@u.washington.edu
Data: Qua, Novembro 12, 2008 4:58 pm
Para: isarita@unifal-mg.edu.br

12-Nov-2008

Dear Dr. Martins:

Thank you for submitting manuscript "A LIQUID CHROMATOGRAPHIC METHOD FOR SIMULTANEOUS DETERMINATION OF ANTINEOPLASTIC DRUGS IN SURFACES" to the Journal of Occupational & Environmental Hygiene.

The ID number for this manuscript is "JOEH-08-0175". Please reference this ID number in all future correspondence with the Editorial Office regarding this manuscript.

You may track the Manuscript Central operational status of this manuscript in your Author Center. If you have any questions about the review of your manuscript, please email me at ccarol@u.washington.edu.

We welcome feedback about our manuscript submission and review process. If you have any comments or suggestions for our consideration, you may email them to me at ccarol@u.washington.edu.

You may contact me if you have any questions about your manuscript submission now or in the future.

Thank you again for your submission to the Journal of Occupational & Environmental Hygiene.

Sincerely,

Cathi Carol
Editorial Office
ccarol@u.washington.edu

