

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS- MG

CARLA BRIGAGÃO PACHECO DA SILVA

**EXPOSIÇÃO OCUPACIONAL AOS FÁRMACOS ANTINEOPLÁSICOS:
DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO PARA APLICAÇÃO NO MONITORAMENTO
DE SUPERFÍCIES**

Alfenas/MG

2015

CARLA BRIGAGÃO PACHECO DA SILVA

**EXPOSIÇÃO OCUPACIONAL AOS FÁRMACOS ANTINEOPLÁSICOS:
DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO PARA APLICAÇÃO NO MONITORAMENTO
DE SUPERFÍCIES**

Dissertação apresentada como parte dos requisitos do Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Alfenas para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas. Área de concentração: Toxicologia e Análises Toxicológicas.

Orientadora: Isarita Martins Sakakibara.

Alfenas/MG

2015

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
Biblioteca Central da Universidade Federal de Alfenas

Silva, Carla Brigagão Pacheco da.

Exposição ocupacional aos fármacos antineoplásicos:
desenvolvimento de método para aplicação no monitoramento de
superfícies. / Carla Brigagão Pacheco da Silva. -- Alfenas/MG, 2015.
99 f.

Orientadora: Isarita Martins Sakakibara.
Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) -
Universidade Federal de Alfenas, 2015.
Bibliografia.

1. Antineoplásicos. 2. Exposição Ocupacional. 3. Cromatografia
Líquida. 4. Espectrometria de Massas em Tandem. I. Sakakibara,
Isarita Martins. II. Título.

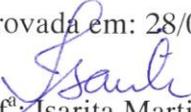
CDD-615.9

CARLA BRIGAGÃO PACHECO DA SILVA

**EXPOSIÇÃO OCUPACIONAL AOS FÁRMACOS ANTINEOPLÁSICOS:
DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO PARA APLICAÇÃO NO
MONITORAMENTO DE SUPERFÍCIES**

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. Área de concentração: Toxicologia e análise toxicológica.

Aprovada em: 28/07/2015


Prof^a: Isarita Martins Sakakibara

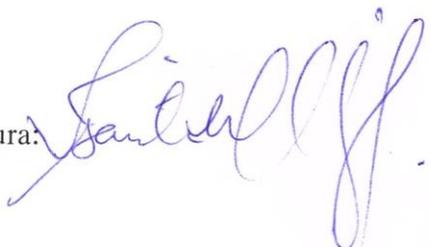
Instituição: Universidade Federal de Alfenas

Prof^a: Larissa Helena Lobo Torres Pacheco

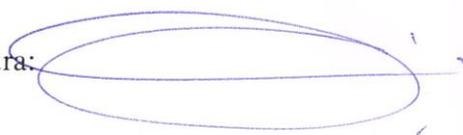
Instituição: Universidade Federal de Alfenas

Prof^a: Virgínia Martins Carvalho

Instituição: Universidade Federal do Rio de Janeiro

Assinatura: 

Assinatura: 

Assinatura: 

Dedico este trabalho

A Deus.

À minha família pelas bênçãos e pelos ensinamentos ao longo da vida, uns mais perto, outros distantes, mas todos dentro do coração.

“Que a bondade do Senhor venha sobre nós e abençoe a obra de nossas mãos.” (Salmo 90:17)

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos que contribuíram para o sucesso deste trabalho, especialmente:

A Deus por ter iluminado meus passos até aqui;

“Não teme nem desanima quem se convence que é mantido pelo poder divino podendo ter a certeza de que Deus o auxiliará em todas as suas necessidades. Quem ama Deus nada lhe falta.” (Santa Teresa de Jesus)

À Universidade Federal de Alfenas pela oportunidade oferecida;

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas e à Pró-Reitoria de Pós-Graduação e Pesquisa desta Universidade;

À CAPES pela concessão da bolsa de mestrado;

À Prof^ª. Dr^ª. Isarita Martins Sakakibara pela orientação, dedicação, amizade, confiança depositada na realização deste trabalho e conhecimentos transmitidos;

“Não deixe o barulho da opinião dos outros abafar sua voz interior. É mais importante, tenha a coragem de seguir seu coração e sua intuição. Eles de alguma forma já sabem o que você realmente quer se tornar. Tudo o mais é secundário.” (Steve Jobs)

Aos professores Eduardo Costa de Figueiredo e Marcello Garcia Trevisan e às professoras Larissa Helena Lobo Torres Pacheco e Virgínia Martins Carvalho pelas importantes sugestões nas bancas do exame de qualificação e da defesa, respectivamente;

“Que os vossos esforços desafiem as impossibilidades, lembrai-vos de que as grandes coisas do homem foram conquistadas do que parecia impossível.” (Charles Chaplin)

À Prof^ª. Vanessa Bergamin Boralli Marques pela amizade e colaboração nos vários momentos dos estudos;

“A alegria está na luta, na tentativa, no sofrimento envolvido. Não na vitória propriamente dita.” (Mahatma Gandhi)

Aos colegas e amigos do Laboratório de Análises de Toxicantes e Fármacos (LATF) (Patrícia, Taila, Lidiane, Gabriella, André, Lailah, Mariane, Juliana, Alberto, Henrique, Alessandra), agradeço toda a dedicação e colaboração durante o desenvolvimento do trabalho;

“Cada novo amigo que ganhamos no decorrer da vida aperfeiçoa-nos e enriquece-nos, não tanto pelo que nos dá, mas pelo que nos revela de nós mesmos.” (Miguel Unamuno)

Aos amigos, por participarem das minhas alegrias e tristezas, e estarem presentes em meus pensamentos e atitudes;

“Mesmo que as pessoas mudem e suas vidas se reorganizem, os amigos devem ser amigos para sempre, mesmo que não tenham nada em comum, somente compartilhar as mesmas recordações.” (Vinícius de Moraes)

Aos centros com tratamento de oncologia Hospital Santa Paula, Hospital Ascomcer, Hospital Universitário Gaffrée e Guinle, Hospital São Francisco de Assis, Centro de Referência da Saúde da Mulher, Hospital Regional do Câncer Santa Casa de Misericórdia de Passos e à Ingrid (farmacêutica no INCA) pela disponibilidade e atenção dadas ao levantamento sobre os principais antineoplásicos utilizados na quimioterapia.

Minha eterna gratidão

RESUMO

O presente estudo objetivou desenvolver um método para determinação simultânea de fármacos antineoplásicos por cromatografia líquida de ultra performance acoplada ao espectrômetro de massas em *tandem* (UHPLC-MS/MS), para ser aplicado no monitoramento de superfícies de trabalho, em locais de manipulação dessas substâncias químicas. Os compostos alvos foram a ciclofosfamida (CP), a doxorubicina (DOXO), o docetaxel (DOC) e a 5-fluoruracila (5-FU), escolhidos em função do seu uso e/ou considerados indicadores de exposição aos antineoplásicos. O metotrexato (MTX) também foi avaliado, todavia não foram obtidos resultados satisfatórios para esse composto, nas condições otimizadas para os outros analitos. As análises foram realizadas no modo de ionização positivo, exceto para a 5-FU, e monitoramento de reação múltipla (MRM). A separação cromatográfica foi realizada em 15 minutos, utilizando coluna Shim-pack® XR-ODS C18 (100 x 3,0 mm, 2,2 µm) e uma pré-coluna similar, gradiente de eluição, para a fase móvel, ácido fórmico 0,1% em água e acetonitrila, em uma vazão de 0,3 mL min⁻¹. As transições de massa, utilizadas para quantificação, seletivamente monitoradas para cada composto, foram: 261,0 > 140,0 m/z para CP; 830,3 > 304,0 m/z para DOC; 544,1 > 396,9 m/z para DOXO e 129,1 > 42,1 m/z para o 5-FU. O método analítico validado foi linear, apresentando $r^2 \geq 0,9939$, no intervalo avaliado de 5 a 300 µg L⁻¹, para CP e de 10 a 300 µg L⁻¹, para DOC, DOXO e 5-FU; preciso, com valores de desvios-padrão relativos menores que 15%, para todas as concentrações e todos os analitos estudados. Os limites de detecção e de quantificação foram determinados entre 0,5-1,3 ng mL⁻¹ e 1,7-4,3 ng mL⁻¹, respectivamente. Após análise de 54 superfícies, adicionadas com os analitos, em uma quantidade de 150, 250 e 500 ng, as recuperações médias obtidas foram entre 59,9-104,8%, com erros-padrão relativos de até ±6%. Os resultados obtidos, no presente estudo, sugerem que o método desenvolvido é adequado para identificar, simultaneamente, quatro, dos cinco, antineoplásicos estudados, constituindo uma promissora e importante ferramenta analítica para o monitoramento da exposição ocupacional a tais fármacos.

Palavras-chave: Fármacos antineoplásicos. Determinação simultânea. Monitoramento de superfícies. Exposição ocupacional. UHPLC-MS/MS.

ABSTRACT

The present study aimed to develop a method for simultaneous determination of antineoplastic drugs by ultra performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometer (UHPLC-MS/MS), to be applied in monitoring work surfaces, in handling locations of these chemicals. The targeted compounds were the cyclophosphamide (CP), the docetaxel (DOC), the doxorubicin (DOXO) and the 5-fluorouracil (5-FU), chosen according to their use and/or considered exposure indicators to antineoplastics. The methotrexate (MTX) was also evaluated, but satisfactory results were not obtained for this compound, under optimized conditions for other analytes. The analyses were carried out in the positive ionization mode, except for the 5-FU, and multiple reaction monitoring (MRM). The chromatographic separation was performed in 15 minutes using Shim-pack® XR-ODS C18 column (100 x 3,0 mm, 2,2 µm) and a similar pre-column, gradient elution, to the mobile phase, formic acid 0,1% and acetonitrile, at a flow rate of 0,3 mL min⁻¹. The mass transitions used to quantify selectively monitored for each compound, were: m/z 261,0 > 140,0 for CP; m/z 830,3 > 304,0 for DOC; m/z 544,1 > 396,9 for DOXO and m/z 129,1 > 42,1 for 5-FU. The validated analytical method was linear, with $r^2 \geq 0,9939$, in the assessed range of 5 to 300 ng mL⁻¹, for CP and of 10 to 300 ng mL⁻¹, for DOC, DOXO and 5-FU; accurate, with relative standard deviations lower than 15%, for all concentrations and all studied analytes. The limits of detection and quantification were determined from 0,5-1,3 ng mL⁻¹ and 1,7-4,3 ng mL⁻¹, respectively. After analysis of 54 surfaces, spiked with the analytes, in a quantity of 150, 250 and 500 ng, the obtained mean recoveries were between 59,9-104,8%, with relative standard errors of up to ±6%. The obtained results, in this study, suggest that the developed method is suitable to identify, simultaneously, four, of the five, studied antineoplastics, becoming a promising and important analytical tool for the occupational exposure monitoring to these drugs.

Keywords: Antineoplastic drugs. Simultaneous determination. Surfaces monitoring. Occupational exposure. UHPLC-MS/MS.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 -	Placas de fórmica utilizadas para contaminação com antineoplásicos e realização de <i>wipe sampling</i>	52
Figura 2 -	Espelhos de fechaduras de portas utilizados para contaminação com antineoplásicos e realização de <i>wipe sampling</i>	52
Figura 3 -	Luvas de látex utilizadas para contaminação com antineoplásicos e realização de <i>wipe sampling</i>	53
Figura 4 -	Fluxograma do <i>wipe</i> teste, que foi a técnica otimizada de limpeza das superfícies contaminadas com antineoplásicos com posterior extração líquido-líquido.....	54
Figura 5 -	Espectro de massas do íon precursor da ciclofosfamida no modo de ionização positivo, obtido por infusão direta de 10 µL da solução de 1 µg mL ⁻¹	62
Figura 6 -	Espectro de massas dos íons produtos da ciclofosfamida, e a representação da transição 261 > 140 m/z, obtido por infusão direta de 10 µL da solução de 1 µg mL ⁻¹	63
Figura 7 -	Espectro de massas do íon precursor da doxorubicina no modo de ionização positivo, obtido por infusão direta de 10 µL da solução de 1 µg mL ⁻¹	63
Figura 8 -	Espectro de massas dos íons produtos da doxorubicina, e a representação da transição 544 > 397 m/z, obtido por infusão direta de 10 µL da solução de 1 µg mL ⁻¹	64
Figura 9 -	Espectro de massas do íon precursor da 5-fluoruracila no modo de ionização negativo, obtido por infusão direta de 10 µL da solução de 1 µg mL ⁻¹	64
Figura 10 -	Espectro de massas dos íons produtos da 5-fluoruracila, e a representação da transição 129 > 42 m/z, obtido por infusão direta de 10 µL da solução de 1 µg mL ⁻¹	65
Figura 11 -	Espectro de massas do íon precursor do docetaxel no modo de ionização positivo, obtido por infusão direta de 10 µL da solução de 1 µg mL ⁻¹	65

Figura 12 -	Espectro de massas dos íons produtos do docetaxel, e a representação da transição 830 > 304 m/z, obtido por infusão direta de 10 µL da solução de 1 µg mL ⁻¹	66
Figura 13 -	Espectro de massas do íon precursor do metotrexato no modo de ionização positivo, obtido por infusão direta de 10 µL da solução de 1 µg mL ⁻¹	66
Figura 14 -	Espectro de massas dos íons produtos do metotrexato, e a representação da transição 455 > 308 m/z, obtido por infusão direta de 10 µL da solução de 1 µg mL ⁻¹	67
Figura 15 -	Cromatograma obtido, no modo MRM, de uma solução-padrão, contendo CP (261,0>140,0 m/z), DOC (830,3>304,0 m/z), DOXO (544,1>396,9 m/z), MTX (455,1>308,0 m/z) e 5-FU (129,1>42,1 m/z), na concentração de 75 ng mL ⁻¹	75
Figura 16 -	Recuperação obtida para CP, DOC, DOXO, MTX e 5-FU, utilizando ácido fórmico 0,1% em água como solvente extrator.....	76
Figura 17 -	Recuperação obtida para CP, DOC, DOXO, MTX e 5-FU, utilizando ácido fórmico 0,1% em água: acetonitrila (7:3, v/v) como solvente extrator.....	77
Figura 18 -	Recuperação obtida para CP, DOC, DOXO, MTX e 5-FU, utilizando acetato de etila: metanol (2:1, v/v) como solvente extrator.....	77
Figura 19 -	Recuperação obtida para MTX, CP e 5-FU por Sabatini et al. (2005)	78
Figura 20 -	Cromatograma obtido, no modo MRM, de uma amostra <i>wipe</i> extraída, contendo CP (261,0>140,0 m/z), DOC (830,3>304,0 m/z), DOXO (544,1>396,9 m/z), MTX (455,1>308,0 m/z) e 5-FU (129,1>42,1 m/z), na concentração de 30 ng mL ⁻¹	79
Figura 21 -	Cromatograma obtido, no modo MRM, de uma amostra de <i>wipe</i> branco, contendo CP (261,0>140,0 m/z), DOC (830,3>304,0 m/z), DOXO (544,1>396,9 m/z), MTX (455,1>308,0 m/z) e 5-FU (129,1>42,1 m/z).....	81
Figura 22 -	Dispersão dos resíduos padronizados com relação aos níveis de concentração de ciclofosfamida.....	82

Figura 23 -	Dispersão dos resíduos padronizados com relação aos níveis de concentração do docetaxel.....	83
Figura 24 -	Dispersão dos resíduos padronizados com relação aos níveis de concentração da doxorrubicina.....	83
Figura 25 -	Dispersão dos resíduos padronizados com relação aos níveis de concentração da 5-fluoruracila.....	83
Quadro 1 -	Fórmula estrutural e molecular, massa molecular, pKa, log Kow e solubilidade dos analitos em estudo.....	44

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Tipos de amostragem para avaliar a exposição de profissionais aos antineoplásicos e as possíveis informações adquiridas.....	27
Tabela 2 -	Trabalhos publicados, no período de 2002 a 2014, sobre o desenvolvimento de métodos para determinação de antineoplásicos, em diferentes matrizes.....	31
Tabela 3 -	Técnica de detecção, faixa de trabalho, limites de detecção e quantificação dos métodos descritos na literatura para análise de docetaxel.....	36
Tabela 4 -	Diferentes composições e proporções de fases móveis testadas para estabelecer as condições de MS/MS.....	47
Tabela 5 -	Diferentes composições e tipo de eluição das fases móveis testadas para estabelecer as condições cromatográficas.....	48
Tabela 6 -	Descrição dos materiais utilizados para aplicação do método para a determinação de antineoplásicos.....	53
Tabela 7 -	Parâmetros analíticos e variações para avaliação da robustez do método cromatográfico para quantificação de antineoplásicos.....	57
Tabela 8 -	Combinação fatorial dos parâmetros analíticos e fórmula do efeito de variação para avaliação da robustez da metodologia pelo teste de Youden.....	58
Tabela 9 -	Áreas dos picos dos íons precursores, obtidas no modo SIM, com alteração da fase móvel para otimização das condições de MS/MS.....	61
Tabela 10 -	Parâmetros otimizados para MS/MS, com a fase móvel formiato de amônio 10 mmol L ⁻¹ : acetonitrila (30:70, v/v), para os antineoplásicos estudados.....	61
Tabela 11 -	Transições m/z e energias de colisão encontradas na literatura para a CP.....	68
Tabela 12 -	Transições m/z e energias de colisão encontradas na literatura para o DOC.....	69
Tabela 13 -	Transições m/z e energias de colisão encontradas na literatura para a DOXO.....	69

Tabela 14 -	Transições m/z e energias de colisão encontradas na literatura para o MTX.....	70
Tabela 15 -	Transições m/z e energias de colisão encontradas na literatura para a 5-FU.....	70
Tabela 16 -	Resultados referentes ao cromatograma de íon total dos picos dos íons precursores da CP, do DOC, da DOXO e da 5-FU, obtidos por diferentes proporções de formiato de amônio 10 mmol L ⁻¹ e metanol...	71
Tabela 17 -	Programa do gradiente de eluição testado, com base no estudo desenvolvido por Nussbaumer et al. (2010)	73
Tabela 18 -	Programa de eluição em gradiente empregado no presente estudo.....	73
Tabela 19 -	Linearidade, limites de detecção e de quantificação do método UHPLC-MS/MS de determinação de determinação de CP, DOXO, DOC, MTX e 5-FU.....	82
Tabela 20 -	Precisão e exatidão intradia e interdias para os analitos (n=18, 6 replicatas por dia, por 3 dias).....	84
Tabela 21 -	Porcentagens s de recuperação média dos analitos após deposição em superfícies (n=54).....	85
Tabela 22 -	Efeito matriz para CP, DOC, DOXO e 5-FU nas concentrações de 30, 60 e 100 ng mL ⁻¹	87
Tabela 23 -	Análise dos antineoplásicos CP, DOC, DOXO e 5-FU pelo método LC-MS/MS em amostras reais coletadas no laboratório de pesquisa do LATF-UNIFAL.....	88

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

%	- porcentagem
µg	- microgramas
µL	- microlitros
4OHCP	- 4-hidroxiciclofosfamida
5-FU	- 5-fluoruracila
a	- coeficiente angular da reta obtido pelo método de regressão linear dos mínimos quadrados
a.C.	- antes de Cristo
ANVISA	- Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AZA	- azatioprina
b	- coeficiente linear da reta obtido pelo método de regressão linear dos mínimos quadrados
°C	- graus Celsius
C18	- grupo octadecil
CE	- energia de colisão (<i>collision energy</i>)
cm	- centímetro
cm²	- centímetro quadrado
CP	- ciclofosfamida
CTB	- citarabina
CV	- coeficiente de variação
CYF	- ciprofloxacino
DAD	- detector de arranjo de diodos
DNA	- ácido desoxirribonucléico
DNR	- daunorrubicina
DOC	- docetaxel
DOXO	- doxorrubicina
DP	- desvio padrão
DPb	- desvio padrão do intercepto com o eixo y da curva analítica
DPR	- desvio padrão relativo
ELL	- extração líquido-líquido

EM	- efeito matriz absoluto
EPB	- epirrubicina
EPI	- equipamento(s) de proteção individual
EPR	- erro padrão relativo
ESI	- fonte de ionização <i>electrospray</i>
FAN	- fármaco antineoplásico
FI	- forma inalterada
FL	- fluorescência
g	- gramas
GCA	- gencitabina
GC-MS	- cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (<i>gas chromatography coupled to a mass spectrometry</i>)
HPLC	- cromatografia líquida de alta eficiência (<i>high performance liquid chromatography</i>)
IARC	- Agência Internacional de Pesquisa em Câncer (<i>International Agency for Research on Cancer</i>)
IF	- ifosfamida
INMETRO	- Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia
INCA	- Instituto Nacional de Câncer
IRT	- irinotecano
IUPAC	- União Internacional de Química Pura e Aplicada (<i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i>)
Kg	- quilogramas
L	- litro
LATF	- Laboratório de Análises de Toxicantes e Fármacos
LC-DAD	- cromatografia líquida com detector de arranjo de diodos (<i>liquid chromatography with diode array detector</i>)
LC-FL	- cromatografia líquida com detector de fluorescência (<i>liquid chromatography with fluorescence detector</i>)
LC-MS/MS	- cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas em tandem (<i>liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry</i>)

LC-UV	- cromatografia líquida com detector de ultravioleta (<i>liquid chromatography with ultra-violet detector</i>)
LD	- limite de detecção
Log Kow	- logaritmo decimal do coeficiente de partição octanol/água
LQ	- limite de quantificação
min	- minutos
mg	- miligramas
mL	- mililitros
mm	- milímetros
mmol	- milimol
MRM	- monitoramento de reação múltipla (<i>multiple reaction monitoring</i>)
MTX	- metotrexato
m/z	- razão massa/carga
NaOH	- hidróxido de sódio
ng	- nanogramas
OHMTX	- hidroximetotrexato
PAC	- paclitaxel
pg	- picogramas
pH	- potencial de hidrogênio
pKa	- coeficiente de dissociação
ppb	- partes por bilhão
ppt	- partes por trilhão
QT	- quimioterapia
QT-an	- quimioterapia antineoplásica
r²	- coeficiente de determinação
s	- segundos
SIM	- monitoramento seletivo de íon (<i>selected ion monitoring</i>)
SPE	- extração em fase sólida
SRM	- monitoramento seletivo de reação (<i>selected reaction monitoring</i>)
TAM	- tamoxifeno
THF	- tetra-hidrofolato
UHPLC	- cromatografia líquida de ultra performance (<i>ultra-high-performance liquid chromatography</i>)

UHPLC-MS/MS - cromatografia líquida de ultra performance acoplada a detector de espectrometria de massas em *tandem* (*ultra-high-performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry*)

UPLCQqLit - cromatografia líquida de ultra performance acoplada a espectrômetro híbrido do tipo triplo quadrupolo-ion *trap* linear (*ultra-high-performance liquid chromatography coupled to triple quadrupole-linear ion trap spectrometry*)

UV - ultravioleta

V - volts

VC - vincristina

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	18
2	GENERALIDADES E REVISÃO DA LITERATURA	20
2.1	CÂNCER	20
2.1.1	Patogênese e tratamento do câncer	21
2.2	FÁRMACOS ANTINEOPLÁSICOS	24
2.3	EXPOSIÇÃO OCUPACIONAL.....	26
3	JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS	38
4	EXPERIMENTAL	40
4.1	MATERIAL	40
4.1.1	Substâncias químicas e reagentes.....	40
4.1.2	Equipamentos e acessórios.....	41
4.1.3	Preparo dos padrões	41
4.2	MANIPULAÇÃO E DESCARTE SEGUROS DOS ANTINEOPLÁSICOS	42
4.3	DESENHO DO ESTUDO.....	43
4.4	MÉTODOS	46
4.4.1	Método analítico.....	46
4.4.2	<i>Wipe</i> teste e ELL	51
4.4.3	Validação e aplicação da análise de antineoplásicos em superfícies	54
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	59
5.1	OTIMIZAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO PARA DETERMINAÇÃO DE ANTINEOPLÁSICOS EM SUPERFÍCIES	59
5.1.1	Otimização das condições de espectrometria de massas.....	59
5.1.2	Otimização das condições cromatográficas	70
5.1.3	Otimização da técnica de preparo de amostras	75
5.2	VALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO PARA DETERMINAÇÃO DE ANTINEOPLÁSICOS EM SUPERFÍCIES	80
6	CONCLUSÕES	89
	REFERÊNCIAS	91

1 INTRODUÇÃO

Fármacos, substâncias de estrutura química definida, são utilizados na prevenção e/ou tratamento de enfermidades tanto na medicina humana quanto na veterinária (RODRIGUES, 2011). Na quimioterapia (QT), uma das modalidades de tratamento de neoplasias malignas, esses compostos são utilizados, isoladamente ou em combinação, com a finalidade de inibir alguma das fases de reprodução celular e, conseqüentemente, interferir no crescimento de tumores, sendo a cura, a melhora da sobrevida e/ou a promoção de efeito paliativo, objetivos do tratamento oncológico (ALCÂNTARA, 2009; ALMEIDA, 2004; EDUARDO; DIAS; SANTOS, 2012).

Todavia, a utilização de fármacos antineoplásicos (FAN) apresenta como fator limitante sua toxicidade, em vista do seu ataque indiscriminado às células de rápida proliferação, cancerosas ou normais, incluindo especialmente tecidos sadios como os da medula óssea, epitélios gastrointestinal e germinativo, e folículos pilosos (RICARDO NETTO; SANTOS, 2010; VENUTO, 2009).

Antineoplásicos têm mostrado carcinogenicidade e/ou efeitos mutagênicos e teratogênicos em humanos. Uma variedade de FAN tem sido usada em hospitais e centros de tratamento de pacientes com câncer, sendo que muitos desses agentes são potencialmente perigosos à saúde de trabalhadores envolvidos na sua preparação e administração, tais como farmacêuticos, enfermeiros, médicos, pessoal envolvido na limpeza e, além desses, os pesquisadores, em universidades e centros de pesquisa. Esses indivíduos podem absorver essas substâncias através de inalação dos aerossóis formados e dispersos no ambiente de trabalho ou pelo contato com a pele, sendo essa última a principal via de exposição (ALCÂNTARA, 2009; LARSON; KHAZAELI; DILLON, 2003; SOTTANI et al., 2007).

Tal exposição tem levado muitos pesquisadores a desenvolverem métodos para determinação de substâncias consideradas indicadores de exposição, tais como a ciclofosfamida (CP), a 5-fluoruracila (5-FU), o metotrexato (MTX) e compostos de coordenação de platina (BOBIN-DUBIGEON et al., 2013; MARTINS, 2003; NUSSBAUMER et al., 2010; SABATINI et al., 2005). Estes fármacos podem ser determinados em diferentes matrizes segundo estratégia que prevê a seguinte hierarquia: a) determinação em superfícies; b) determinação em material biológico e c) determinação no ar (ALESSIO et al., 1996; APOSTOLI; FACCO; ALESSIO, 2001).

A análise dos FAN nessas matrizes requer métodos analíticos validados e que apresentem baixos limites de detecção (LD), da ordem de partes por bilhão (ppb), e até partes por trilhão (ppt), uma vez que a exposição, geralmente, é a baixas doses e específica do ambiente de trabalho (LARSON; KHAZAELI; DILLON, 2003; VENUTO, 2009). Ainda, métodos abrangentes, ou seja, aqueles que possam ser utilizados na determinação simultânea de diferentes analitos são considerados de extrema importância científica na prática clínica pois os trabalhadores estão rotineiramente expostos a mais de uma substância (LARSON; KHAZAELI; DILLON, 2003).

Assim, este trabalho objetivou desenvolver um método analítico para a determinação simultânea de fármacos antineoplásicos, em superfícies, visando sua aplicação na avaliação da exposição ocupacional de trabalhadores em contato com tais substâncias.

2 GENERALIDADES E REVISÃO DA LITERATURA

A seguir é descrita uma breve revisão de literatura sobre os principais temas deste projeto, que são: câncer, fármacos antineoplásicos e exposição ocupacional.

2.1 CÂNCER

Segundo Silva (2003), a palavra câncer de origem latina (*cancro*) significando “caranguejo” foi empregada em analogia ao modo como o crustáceo aprisiona com potentes garras a sua vítima e não a solta até o fim, a menos que seja feita uma forte intervenção para libertá-la. O primeiro a descrever e definir o câncer como uma doença de mau prognóstico foi Hipócrates, em 500 a.C. na Grécia (RICARDO NETTO; SANTOS, 2010).

O câncer, definido como um tumor maligno, não é uma doença única e sim um conjunto de mais de 200 enfermidades distintas com variedade de causas e história natural, caracterizado por uma alteração nos mecanismos que regulam a sobrevivência, proliferação e diferenciação das células, resultando numa multiplicação e disseminação desordenada dessas células que invadem tecidos e órgãos, podendo sofrer metástase – migração e colonização de locais distantes no corpo (ALCÂNTARA, 2009; ALMEIDA, 2004; CHU; SARTORELLI, 2007; EDUARDO; DIAS; SANTOS, 2012; RICARDO NETTO; SANTOS, 2010).

Os tumores malignos são gerados por alterações, herdadas ou adquiridas, em genes que controlam o crescimento celular, tais como os oncogenes, os promotores do crescimento, os genes de supressão tumoral e os genes responsáveis pelos reparos em erros de replicação. Os protooncogenes, genes que controlam a divisão, apoptose e diferenciação celular, a princípio, estão inativos em células normais e, quando ativados, convertem-se em oncogenes, que são responsáveis pela malignização das células saudáveis, originando células cancerígenas ou tumorais (ALMEIDA, 2004; ALMEIDA et al., 2005). Outra importante mudança genética é a inativação de genes supressores tumorais, também conhecidos como antioncogenes, que têm a capacidade, em células normais, de suprimir mudanças malignas (BORGES-OSÓRIO; ROBINSON, 2013).

A inativação de antioncogenes ou a ativação de protooncogenes podem conferir autonomia de crescimento a uma célula e, assim, resultar em proliferação descontrolada ao produzir alterações em diversos sistemas celulares, incluindo fatores de crescimento, transdutores do ciclo celular, mecanismo apoptótico, expressão da telomerase, além das mudanças em vasos sanguíneos locais (BORGES-OSÓRIO; ROBINSON, 2013).

Ao diferenciar-se e proliferar-se rapidamente, estas células tendem a ser muito agressivas e incontroláveis, determinando a formação de tumores locais, que podem comprimir ou invadir estruturas normais adjacentes. Por outro lado, um tumor benigno significa simplesmente uma massa localizada de células que se multiplicam vagarosamente e se assemelham ao seu tecido original, raramente constituindo risco de morte (CHU; SARTORELLI, 2007; INCA, 2015; MARTINS, 2003).

A incidência, distribuição geográfica e comportamento dos tipos de cânceres estão relacionados com múltiplos fatores, incluindo idade, sexo, raça, predisposição genética e exposição aos carcinógenos ambientais (CHU; SARTORELLI, 2007). Cerca de 80% dos casos está relacionada ao meio ambiente – ocupacional, social e cultural – no qual encontramos um grande número de fatores de risco (ALMEIDA et al., 2005).

Dentre os tipos de cânceres existentes, os responsáveis pelas maiores taxas de incidência e mortalidade, no país, são cânceres de pele não melanoma – maior incidência em ambos os sexos –, seguidos de próstata, mama feminina, cólon e reto, pulmão, estômago e colo do útero (INCA, 2014).

2.1.1 Patogênese e tratamento do câncer

O processo de carcinogênese, ou seja, de formação de câncer, em geral ocorre lentamente, podendo levar vários anos para que uma célula cancerosa prolifere e dê origem a uma neoplasia detectável (LARSON; KHAZAELI; DILLON, 2003). Esse processo passa por vários estágios antes de chegar ao câncer, em geral envolvendo mais de uma mudança genética, bem como outros fatores epigenéticos (hormonais, cocarcinogênicos e efeitos de promoção tumoral, etc.) que por si só não causam o tumor maligno, mas aumentam a probabilidade de que mutações genéticas acabem por resultar em câncer. Esses estágios são, segundo Almeida (2004):

- a) iniciação, no qual as células sofrem ação de agentes carcinógenos (agente oncoiniciador), provocando alterações em alguns de seus genes que aumentam a habilidade das células de proliferar e evitar a apoptose, resultando em células geneticamente alteradas – células iniciadas; porém, ainda não é possível detectar um tumor clinicamente. Os carcinógenos podem ser classificados em três principais tipos: agentes físicos, tais como as radiações (induzem lesões no ácido desoxirribonucléico (DNA)); microrganismos, como, por exemplo, os vírus; e os agentes químicos, tais como os antineoplásicos;
- b) promoção, no qual os agentes oncopromotores atuam na célula já alterada, sendo esta transformada em célula maligna, de forma lenta e gradual. Esses agentes levam a alterações nas vias de sinalização e/ou no ambiente extracelular, permitindo a proliferação das células, a invasão de tecidos circundantes e a angiogênese (BYRNS; PENNING, 2011). Para que essa transformação ocorra é necessário um longo e continuado contato com o agente promotor. Além disso, nosso organismo apresenta mecanismos de defesa, tais como apoptose, sistema imunológico íntegro e sistema íntegro de reparo de DNA, que têm a finalidade de evitar a proliferação celular descontrolada, podendo interromper a carcinogênese nos estágios de iniciação e/ou promoção (AMORIM, 2002). Alguns componentes da alimentação e a exposição excessiva e prolongada a hormônios são exemplos de fatores que promovem a transformação de células iniciadas em malignas;
- c) progressão, caracterizado pela multiplicação descontrolada e irreversível da célula. O câncer já está instalado, evoluindo até o surgimento das suas primeiras manifestações clínicas.

Existem três tipos principais de tratamento de neoplasias: a cirurgia, a radioterapia e a quimioterapia, sendo o valor relativo de cada um deles dependente do tipo e do estágio do desenvolvimento do câncer (ALCÂNTARA, 2009).

Os objetivos gerais do tratamento oncológico são erradicar o câncer (eliminação completa da doença), sobrevida prolongada e controle do crescimento da célula maligna ou diminuição dos sintomas associados à doença, normalmente por meio da terapia combinada, onde é associado mais de um tipo de tratamento (ALCÂNTARA, 2009; ALMEIDA et al., 2005; RICARDO NETTO; SANTOS, 2010).

A cirurgia que remove todo o câncer continua sendo uma das principais modalidades de tratamento dentro da oncologia para a maioria dos tumores sólidos (ALMEIDA, 2004; RICARDO NETTO; SANTOS, 2010). O procedimento cirúrgico indicado no início da

doença tem dois objetivos: controle ou eliminação da doença (RICARDO NETTO; SANTOS, 2010).

A radioterapia consiste na destruição de células através da radiação ionizante, utilizando, por exemplo, raios gama, radioisótopos como cobalto-60 ou raios-X (ALMEIDA, 2004; ALMEIDA et al., 2005). Constitui-se de um tratamento localizado podendo ser utilizada para controlar a doença, amenizar os sintomas da doença metastática, diminuir o tamanho das neoplasias, diminuir ou estancar hemorragias, ou atuar sobre outros sintomas, como a dor. Atinge mais facilmente os tecidos corporais que sofrem divisão celular. Os tecidos de crescimento mais lento ou tecidos em repouso – muscular, cartilaginoso e conjuntivo – são mais resistentes à radioterapia, quando comparados aos tecidos corporais que sofrem divisão celular. O indivíduo pode estar fazendo aplicação de quimioterapia simultaneamente a radioterapia, onde os agentes quimioterápicos podem agir como radiosensibilizadores (ALMEIDA, 2004; RICARDO NETTO; SANTOS, 2010).

A QT é o método que utiliza compostos químicos, chamados quimioterápicos, no tratamento de doenças causadas por agentes biológicos, todavia quando aplicada ao câncer, é chamada de quimioterapia antineoplásica (QT-an) ou quimioterapia antilástica (ALMEIDA, 2004; SILVA, 2003).

A QT-an tem como objetivo causar uma lesão citotóxica letal que possa impedir a progressão do tumor (HARVEY; CHAMPE; MYCEK, 1998), idealmente, com destruição das células neoplásicas, preservando as normais. Contudo, a maioria dos agentes quimioterápicos atua de forma não-específica nos processos de divisão celular, lesando tanto células malignas quanto normais, o que explica grande parte dos efeitos colaterais (ALCÂNTARA, 2009; SILVA, 2003), como a mielossupressão – com queda na produção de leucócitos e, portanto, queda na resistência a infecções –, comprometimento da cicatrização, dano ao epitélio gastrointestinal, náusea, vômito, diarreia, perda de pelos/cabelo (alopecia), diminuição da fertilidade, teratogenicidade e alterações no crescimento de crianças em tratamento (ALMEIDA, 2004; VENUTO, 2009).

Atualmente, a poliquimioterapia é utilizada em substituição ao uso de um único agente antineoplásico, uma vez que possibilita uma melhor resposta, decorrente do sinergismo que ocorre entre os diferentes fármacos, com diminuição de doses de fármacos de alta toxicidade e ainda retardo da resistência tumoral (VENUTO, 2009).

2.2 FÁRMACOS ANTINEOPLÁSICOS

Os antineoplásicos são classificados de acordo com sua estrutura bioquímica, mecanismo de ação ou origem biológica. Levando em consideração o mecanismo de ação, podem ser classificados em: fármacos ciclo-específicos, os quais agem contra as células que se encontram em divisão; e fármacos inespecíficos, os quais agem em qualquer fase do ciclo celular (RICARDO NETTO; SANTOS, 2010).

Segundo Chabner (2011), os principais FAN podem ser divididos, do ponto de vista biológico e considerando a estrutura bioquímica, nas seguintes categorias:

- a) agentes alquilantes, como a CP, ifosfamida (IF);
- b) antimetabólitos análogos do ácido fólico, piridina e purina, como 5-FU, MTX, gencitabina (GCA);
- c) compostos de platina, como oxaliplatina, cisplatina;
- d) antibióticos, como a doxorrubicina (DOXO);
- e) produtos naturais, como alcalóides da vinca – vincristina (VC) –, taxanos – paclitaxel (PAC), docetaxel (DOC);
- f) hormônios e antagonistas, como dexametasona, prednisona, GnRH análogo;
- g) agentes diversos classificados como miscelânea, incluindo inibidores da proteína tirosina quinase, interferona α , interleucina-2, anticorpos monoclonais, imunomoduladores.

Sabe-se que os antineoplásicos agem especialmente em células que estão em processo de divisão ativa; portanto, são mais eficazes quando utilizados precocemente, pois o tumor maligno ainda é pequeno e cresce exponencialmente. Ademais, os tumores de rápido desenvolvimento são os mais suscetíveis à destruição pela QT-an, pois, nesses casos, mais células estão em divisão, havendo, por conseguinte, mais células sensíveis a estes fármacos (SILVA, 2003).

Os FAN não são específicos para células tumorais, sendo tóxicos para células que proliferam rapidamente (TURCI et al., 2003), levando aos efeitos adversos como imunossupressão, leucopenia, febre, calafrios, falta de ar, tonturas, cefaléia, colite hemorrágica e fibrose pulmonar, além dos já citados anteriormente (CHU; SARTORELLI, 2007; HARVEY; CHAMPE; MYCEK, 1998; LIN et al., 2013; TURCI et al., 2003;). Algumas reações são mais específicas de certos antineoplásicos, como a nefrotoxicidade causada pela precipitação de MTX e/ou de seus metabólitos nos túbulos renais; a neutropenia,

retenção hídrica resistente (sobretudo edema dos membros inferiores) e hipersensibilidade ao DOC, que requer pré-tratamento com corticosteróides e anti-histamínicos (YAMAGUCHI et al., 2012); a cardiotoxicidade causada por doxorubicinol (DOL), um metabólito da DOXO (AHMAD et al., 2011; AHMED et al., 2009; LICATA et al., 2000; ZHOU; CHOWBAY, 2002); e a mutagenicidade e teratogenicidade da CP, da 5-FU e do MTX (HARVEY; CHAMPE; MYCEK, 1998; SABATINI et al., 2005; TURCI et al., 2003).

Os fármacos citotóxicos não apresentam a mesma toxicidade, sendo classificados pela *International Agency for Research on Cancer* (IARC) em grupos de acordo com a avaliação de risco usando humanos, animais e dados mecânicos (BYRNS; PENNING, 2011). Os compostos no Grupo 1 são conhecidos como carcinógenos para humanos, como, por exemplo, a CP; o Grupo 2A inclui substâncias que são prováveis carcinógenos para o ser humano, como a DOXO; o Grupo 2B, os possíveis carcinógenos para humanos; o Grupo 3 inclui aqueles que não são classificados com relação à carcinogenicidade humana, como a 5-FU, o DOC e o MTX; e o Grupo 4 são aqueles com dados indicando que eles são improváveis carcinógenos (BOBIN-DUBIGEON et al., 2013; BYRNS; PENNING, 2011; MARTINS, 2003; SABATINI et al., 2005; TURCI et al., 2003; VENUTO, 2009).

Alguns antineoplásicos, como a CP e a 5-FU, são administrados como pró-fármacos (GRIVICICH, 1999; TURCI et al., 2003), sendo necessária uma bioativação, a qual é realizada pelo sistema enzimático citocromo P450, para obtenção dos produtos responsáveis pelos efeitos terapêuticos e/ou citotóxicos (DE JONGE et al., 2004; MARTINS, 2003; TURCI et al., 2003).

A eliminação dos FAN é feita por diferentes vias, como, por exemplo, a via renal que é a principal via de excreção da CP e do MTX, sendo cerca de 10-15% e 60-95% excretados na forma inalterada (FI), respectivamente (ALCÂNTARA, 2009; MARTINS, 2003; TURCI et al., 2003). A via respiratória é a principal para a eliminação da 5-FU, e uma pequena proporção é eliminada por via renal, correspondendo a 15% na FI (ALMEIDA, 2004). Ainda, o DOC e a DOXO são excretados principalmente por via fecal, sendo uma quantidade muito baixa eliminada como FI (MOFFAT; OSSELTON; WIDDOP, 2011; YAMAGUCHI et al., 2012). Na urina coletada em um período de 24 horas, encontra-se até 6% da dose administrada do DOC, sendo, aproximadamente, 5 a 20% eliminada na FI (ALMEIDA, 2004; TURCI et al., 2003).

2.3 EXPOSIÇÃO OCUPACIONAL

A contaminação por FAN é considerada uma das principais causas de enfermidades de cunho ocupacional em hospitais e/ou clínicas oncológicas (MONTEIRO; CHAVES; FIGUEIREDO, 2013; SILVA, REIS, 2010), portanto sua manipulação deve ser vista como uma questão de saúde pública. Os profissionais responsáveis por essa prática precisam utilizar medidas de prevenção para evitar o contato com o fármaco, pois o seu uso indevido pode levar a efeitos tóxicos decorrentes dessa exposição, até mesmo ocasionar o câncer (MONTEIRO; CHAVES; FIGUEIREDO, 2013; OLIVEIRA et al., 2013). A absorção dessas substâncias ocorre pela inalação dos aerossóis formados e dispersos no ambiente de trabalho e pela via dérmica, que é considerada uma das principais vias de introdução, pelo contato prolongado com superfícies, indumentárias e/ou equipamentos contaminados (SUSPIRO; PRISTA, 2012; VENUTO, 2009).

Na rotina hospitalar, o contato nas primeiras 48 horas com material biológico ou roupas íntimas contaminadas com fluidos corpóreos de pacientes tratados com estes fármacos representa outra fonte possível de exposição (MARTINS; DELLA ROSA; APOSTOLI, 2004; RICARDO NETTO; SANTOS, 2010; SUSPIRO; PRISTA, 2012), considerando a meia-vida de eliminação dos FAN, que varia em torno de 6 a 48 horas (MOFFAT; OSSELTON; WIDDOP, 2011; SOTTANI et al., 2012; TURCI et al., 2003).

Os riscos ocasionados pela manipulação dos antineoplásicos são observados pela toxicidade inerente ao fármaco e pelo tempo de exposição dos indivíduos a esses agentes. A exposição é de alto risco para os fetos, uma vez que muitas dessas substâncias são teratogênicas; portanto, é recomendável especial atenção às mulheres em contato com esses agentes, durante a gestação (HARVEY; CHAMPE; MYCEK, 1998; LIMA et al., 2011; SABATINI et al., 2005). Os profissionais de saúde ficam expostos a riscos durante o preparo, administração e descarte (MONTEIRO; CHAVES; FIGUEIREDO, 2013).

A não utilização de equipamentos de proteção individual (EPI) por parte dos profissionais da saúde pode estar relacionada ao desconhecimento e/ou inexperiência do trabalhador; pressa em realizar os procedimentos devido à falta de recursos humanos; desestímulo profissional e extensas cargas horárias de trabalho. Contudo, a adesão ao uso do EPI está intimamente relacionada à percepção que os profissionais têm acerca dos riscos aos quais estão expostos (MONTEIRO; CHAVES; FIGUEIREDO, 2013).

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, seja considerada indevida (VENUTO, 2009).

A avaliação da exposição ocupacional aos antineoplásicos pode ser realizada através do monitoramento de superfícies, tais como bancadas, pavimentos e materiais – bolsas de infusão, luvas e máscaras –, biológico e ambiental (ALCÂNTARA, 2009; MARTINS; DELLA ROSA; APOSTOLI, 2004). Na Tabela 1 podem ser verificados alguns tipos de amostragem ambiental e em superfícies para avaliar a exposição dos profissionais da área de saúde em um ambiente de trabalho.

Tabela 1 – Tipos de amostragem para avaliar a exposição de profissionais aos antineoplásicos e as possíveis informações adquiridas

Tipo de amostragem	Informações adquiridas
Ambiental, do tipo pessoal	Concentração aerodispersa do FAN na zona respiratória do trabalhador
Ambiental, no centro do local de trabalho	Concentração aerodispersa difusa no ambiente de trabalho
<i>Wipe sampling</i> , na bancada	Nível de contaminação dos FAN sobre a superfície
<i>Wipe sampling</i> , em diferentes pontos do local de manipulação	Possível contaminação difusa interna e externamente no local de preparo
<i>Wipe sampling</i> , nos objetos e maçanetas de portas	Procedimento de trabalho não efetuado em condições de segurança

Fonte: Adaptado de ALCÂNTARA, 2009

Um grande número de métodos empregando a amostragem denominada *wipe sampling* (ALCÂNTARA; MARTINS, 2012; MARTINS; APOSTOLI; DELLA ROSA, 2008; MARTINS; DELLA ROSA; APOSTOLI, 2004; RESENDE et al., 2011; SOTTANI et al., 2007) tem sido utilizado para o monitoramento de superfícies ou objetos contaminados, uma vez que o contato direto com a pele é considerado a principal via de exposição (SOTTANI et al., 2007). Assim, o *wipe* teste permite a avaliação da presença ou não de resíduos sobre uma determinada superfície ou materiais, através de coleta *wipe sampling* feita com auxílio de um tecido, filtro ou um lenço de papel. Porém, gazes de algodão não são recomendadas, pois podem liberar fibras que interferem no processo de extração. Para a limpeza de superfícies, as quais devem ser delimitadas como, por exemplo, uma área de 100 cm² (10 x 10 cm), pode-se utilizar tecidos embebidos em solução, como, por exemplo, hidróxido de sódio, ou colocar essa solução diretamente sobre a superfície (ALCÂNTARA, 2009; SOTTANI et al., 2010; TURCI et al., 2003). A amostragem deve ser realizada sistematicamente, em duas direções

diferentes – de cima para baixo, e da direita para esquerda – de maneira que toda a superfície seja limpa (SOTTANI et al., 2010; SOTTANI et al., 2011). O tipo de solução para umidificar não influencia sobre a recuperação, uma vez que os contaminantes são carreados das superfícies independentes da composição ou o pH da solução propriamente dita. Contudo, a escolha da solução de dessorção do(s) analito(s) é o passo crucial (TURCI et al., 2003).

Os *pads*, tecidos semelhantes à gaze, são também bastante utilizados, colocando-os sobre e sob as vestimentas para verificar a possível contaminação de zonas específicas do corpo do trabalhador, com particular referência ao tórax, às pernas e aos braços (MARTINS; DELLA ROSA; APOSTOLI, 2004; VENUTO, 2009).

A determinação biológica do agente ou de seus produtos de biotransformação é também uma ferramenta para a avaliação da exposição, visto que se o fármaco for encontrado em amostras biológicas do trabalhador é indicativo de exposição ocupacional indevida e, conseqüentemente, as práticas de manipulação deverão ser revistas, a fim de evitar uma doença profissional. A determinação desses agentes em fluidos biológicos avalia o grau de exposição e absorção por todas as vias, independente da via de introdução (MARTINS; DELLA ROSA; APOSTOLI, 2004). Para a análise de FAN e/ou seus metabólitos por métodos bioanalíticos, utilizando, por exemplo, a urina como amostra, deve-se levar em consideração suas propriedades farmacocinéticas, incluindo meia-vida de eliminação e porcentagem excretada das formas inalteradas ou dos produtos de biotransformação. Além disso, métodos com detectabilidade da ordem de pico/fentograma são requeridos, uma vez que a maioria dos antineoplásicos, como, por exemplo, a CP, a DOXO e a 5-FU, apresentam excreções relativamente baixas, sendo cerca de 5-25% eliminados na FI (MOFFAT; OSSELTON; WIDDOP, 2011).

A determinação de antineoplásicos aerodispersos (monitoramento ambiental) não é um método particularmente sensível e, assim, não fornece indicações úteis sobre o nível de exposição de trabalhadores. Por exemplo, a análise de superfícies num ambiente de trabalho com frequência apresenta resultados positivos, enquanto amostras de ar coletadas nesse mesmo espaço não mostram qualquer contaminação. Quando essa informação se faz necessária, a amostragem da área e de pessoal deve ser realizada, individualizando os pontos significativos, e particular atenção deve ser dispensada à área caracterizada como a de maior contaminação (MARTINS; DELLA ROSA; APOSTOLI, 2004).

Outros meios para a avaliação de trabalhadores expostos a agentes genotóxicos incluem a determinação de mutágenos e tio ésteres (metabólitos conjugados à glutatona de agentes alquilantes) em amostras de urina, teste de micronúcleos em linfócitos de sangue

periférico, métodos citogenéticos – análise de aberrações cromossômicas, frequência de trocas de cromátides irmãs e o ensaio cometa, que avalia danos ao DNA, detectando lesões genômicas e não mutações (ALCÂNTARA, 2009; RANDON, 2006; TURCI et al., 2003). Porém, os métodos que avaliam esses bioindicadores de efeito, apesar de serem muito utilizados, são inespecíficos da exposição aos FAN e ao ambiente de trabalho.

Segundo Apostoli; Facco; Alessio (2001), a avaliação dos FAN pode ser assim sintetizada:

- a) coleta padronizada de informações necessárias para a individualização dos riscos e possíveis intervenções;
- b) monitoramento de superfícies e materiais manipulados pelos trabalhadores e monitoramento biológico, escolhendo alguns fármacos como indicadores de exposição;
- c) classificação dos trabalhadores expostos quanto ao tempo de exposição, número de preparações ou administrações por dia; tipo de fármaco em contato e outros;
- d) finalização da atividade de avaliação, com estudo da eficiência do emprego das medidas de segurança;
- e) elaboração e adequação periódica da diretriz de práticas de manipulação segura de citotóxicos.

Essa coleta de informações é obtida por meio de 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 (ALCÂNTARA, 2009; APOSTOLI; FACCO; ALESSIO, 2001).

Se a contaminação no local de trabalho não pode ser totalmente evitada, é de grande importância a redução dos níveis de exposição. Para esta finalidade, não só a educação e treinamento dos indivíduos expostos desempenham um importante papel, como também o desenvolvimento de técnicas de amostragem e de métodos analíticos confiáveis (TURCI et al., 2003). A técnica de monitoramento deverá ser capaz de refletir a exposição e, para tanto, depende da confiabilidade do método empregado, sendo de fundamental importância que esse seja previamente validado (MARTINS; DELLA ROSA; APOSTOLI, 2004). Tanto a detectabilidade (exposição a baixas concentrações) quanto a seletividade e a abrangência (exposição a várias substâncias simultaneamente) são parâmetros que devem ser cuidadosamente avaliados no método. Ainda, a linearidade, a precisão e a exatidão são também quesitos essenciais na validação de um método analítico confiável, quando esse for

empregado para a quantificação dos analitos presentes, em qualquer que seja a matriz (ALCÂNTARA, 2009).

Uma série de trabalhos tem sido publicada para a determinação de FAN, principalmente em superfícies, por vários métodos analíticos, incluindo a cromatografia gasosa acoplada a um detector de espectrometria de massas (GC-MS) (MARTINS; DELLA ROSA; APOSTOLI, 2004) ou a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) acoplada a diferentes detectores, como o detector de ultravioleta (LC-UV) (AHMAD et al., 2011; CASALE et al., 2002; LARSON, KHAZAELI; DILLON, 2003; MARTINS et al., 2009; VENUTO, 2009), o detector de arranjo de diodos (LC-DAD) (ALCÂNTARA et al., 2010; RESENDE et al., 2011; SANSON et al., 2011), com detecção por fluorescência (LC-FL) (KATZENMEYER; EDDY; ARRIAGA, 2010; PIERI et al., 2010), quimioluminescência (AHMED et al., 2009) e por espectrometria de massas (LC-MS) (BARBIERI et al., 2006; BOBIN-DUBIGEON et al., 2013; CZERNYCH et al., 2014; KATZENMEYER; EDDY; ARRIAGA, 2010; NUSSBAUMER et al., 2010; PEER et al., 2012; PISANO et al., 2005; REMAUD et al., 2005; SABATINI et al., 2005; SOTTANI et al., 2005; SOTTANI et al., 2007; SOTTANI et al., 2008; SOTTANI et al., 2013; TURCI et al., 2002). Alguns dados obtidos em estudos desenvolvidos de 2002 até 2014 podem ser observados na Tabela 2.

A cromatografia líquida (LC) é a técnica mais frequentemente empregada, como pode ser verificado na Tabela 2, em consequência da seletividade proporcionada pela separação cromatográfica, sem a necessidade de derivatizar as moléculas, o que é requerido, para tais substâncias, se empregada a cromatografia em fase gasosa. A técnica de separação de LC pode ser acoplada a diferentes detectores, todavia, quando acoplada a um detector de espectrometria de massas proporciona níveis de detecção, da ordem de ppb ou ppt (BARBIERI et al., 2006; BOBIN-DUBIGEON et al., 2013; NUSSBAUMER et al., 2010; PEER et al., 2012; PISANO et al., 2005; RABII et al., 2014; REMAUD et al., 2005; SABATINI et al., 2005; SOTTANI et al., 2005; SOTTANI et al., 2007; SOTTANI et al., 2008; SOTTANI et al., 2013; TURCI et al., 2002).

Tabela 2 – Trabalhos publicados, no período de 2002 a 2014, sobre o desenvolvimento de métodos para determinação de antineoplásicos, em diferentes matrizes

(continua)

Amostra	Analitos	Padrão Interno	Técnica de detecção	Faixa de Trabalho	Limite de detecção	Limite de quantificação	Referência
Urina	CP, IF, MTX	7-OHMTX	LC-MS/MS	0,2-3,2 $\mu\text{g L}^{-1}$	0,05 $\mu\text{g L}^{-1}$ (CP e IF) 0,20 $\mu\text{g L}^{-1}$ (MTX)	0,20 $\mu\text{g L}^{-1}$ (CP e IF) 0,5 $\mu\text{g L}^{-1}$ (MTX)	TURCI et al. (2002)
Superfícies	CP, IF, 5-FU, PAC, DOXO	não especificado	LC-UV	500-10000 $\mu\text{g L}^{-1}$ (CP, IF, 5-FU, DOXO) 2000-20000 $\mu\text{g L}^{-1}$ (PAC)	500 $\mu\text{g L}^{-1}$ (CP, IF, 5-FU, DOXO) 2000 $\mu\text{g L}^{-1}$ (PAC)	não especificado	LARSON; KHAZAEI; DILLON (2003)
Superfícies	CP	IF	GC-MS	1-100 $\mu\text{g L}^{-1}$	0,4 $\mu\text{g L}^{-1}$	1,0 $\mu\text{g L}^{-1}$	MARTINS; DELLA ROSA; APOSTOLI (2004)
Plasma e tecidos	5-FU	5-clorouracil	LC-MS/MS	5-18000 $\mu\text{g L}^{-1}$ (plasma) 10-20000 $\mu\text{g Kg}^{-1}$ (tecidos)	não especificado	5 $\mu\text{g L}^{-1}$ (plasma) 10 $\mu\text{g Kg}^{-1}$ (tecidos)	PISANO et al. (2005)
Plasma	5-FU	5-clorouracil	LC-MS/MS	5-500 $\mu\text{g L}^{-1}$	não especificado	2,5 $\mu\text{g L}^{-1}$	REMAUD et al. (2005)

Tabela 2 – Trabalhos publicados, no período de 2002 a 2014, sobre o desenvolvimento de métodos para determinação de antineoplásicos, em diferentes matrizes

(continuação)

Amostra	Analitos	Padrão Interno	Técnica de detecção	Faixa de Trabalho	Limite de detecção	Limite de quantificação	Referência
Superfícies e objetos	5-FU, MTX, CP	trofosfamida	LC-MS/MS	33,3-3333,3 $\mu\text{g L}^{-1}$ (5FU) 1,1-3333,3 $\mu\text{g L}^{-1}$ (CP, MTX)	33,3 $\mu\text{g L}^{-1}$ (5-FU) 1,1 $\mu\text{g L}^{-1}$ (MTX e CP)	não especificado	SABATINI et al. (2005)
Urina	CP, IF	trofosfamida	LC-MS/MS	0,02-0,4 $\mu\text{g L}^{-1}$	0,01 $\mu\text{g L}^{-1}$ (CP) 0,02 $\mu\text{g L}^{-1}$ (IF)	0,02 $\mu\text{g L}^{-1}$ (CP) 0,04 $\mu\text{g L}^{-1}$ (IF)	SOTTANI et al. (2005)
Urina	CP e MTX	trofosfamida	LC-MS/MS	0,4-50 $\mu\text{g L}^{-1}$ (MTX) 0,08-50 $\mu\text{g L}^{-1}$ (CP)	0,2 $\mu\text{g L}^{-1}$ (MTX) 0,04 $\mu\text{g L}^{-1}$ (CP)	0,4 $\mu\text{g L}^{-1}$ (MTX) 0,08 $\mu\text{g L}^{-1}$ (CP)	BARBIERI et al. (2006)
Superfícies	GCA, PAC, CP, IF	trofosfamida e cefalomanina	LC-MS/MS	0-1000 ng wipe^{-1}	12,5 ng wipe^{-1} (GCA, PAC) 6,25 ng wipe^{-1} (CP, IF)	25 ng wipe^{-1} (GCA, PAC) 12,5 ng wipe^{-1} (CP, IF)	SOTTANI et al. (2007)
Urina	CP, IF, EPB, DOXO, DNR	trofosfamida	LC-MS/MS	0,2-4,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ (CP, IF, EPB, DOXO) 0,15-2,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ (DNR)	não especificado	0,15 $\mu\text{g L}^{-1}$ (DNR) 0,2 $\mu\text{g L}^{-1}$ (CP, IF, EPB) 0,3 $\mu\text{g L}^{-1}$ (DOXO)	SOTTANI et al. (2008)

Tabela 2 – Trabalhos publicados, no período de 2002 a 2014, sobre o desenvolvimento de métodos para determinação de antineoplásicos, em diferentes matrizes

(continuação)

Amostra	Analitos	Padrão Interno	Técnica de detecção	Faixa de Trabalho	Limite de detecção	Limite de quantificação	Referência
Superfícies	5-FU, MTX, DOXO, CP, IF	não especificado	LC-UV	250-10000 $\mu\text{g L}^{-1}$ (5-FU, MTX) 500-20000 $\mu\text{g L}^{-1}$ (CP, DOXO, IF)	30 $\mu\text{g L}^{-1}$ (CP) 40 $\mu\text{g L}^{-1}$ (5-FU, MTX) 70 $\mu\text{g L}^{-1}$ (DOXO) 300 $\mu\text{g L}^{-1}$ (IF)	100 $\mu\text{g L}^{-1}$ (CP, 5-FU, MTX) 200 $\mu\text{g L}^{-1}$ (DOXO) 900 $\mu\text{g L}^{-1}$ (IF)	VENUTO (2009)
Luvas	PAC, 5-FU, MTX	não especificado	LC-DAD	250-20000 $\mu\text{g L}^{-1}$	100 $\mu\text{g L}^{-1}$ (MTX) 200 $\mu\text{g L}^{-1}$ (5-FU, PAC)	250 $\mu\text{g L}^{-1}$	ALCÂNTARA et al. (2010)
Superfícies e formulações farmacêuticas	CP, IF, GCA, IRT, VC, CTB, MTX, fosfato de etoposido, DOXO, EPB	[^{13}C , $^2\text{H}_3$]-MTX	LC-MS/MS	1-200 $\mu\text{g L}^{-1}$ (CP, GCA, IRT, IF, CTB, MTX, VC, etoposido) 2-200 $\mu\text{g L}^{-1}$ (DOXO, EPB)	0,01 $\mu\text{g L}^{-1}$ (MTX) 0,025 $\mu\text{g L}^{-1}$ (CTB, IRT) 0,25 $\mu\text{g L}^{-1}$ (GCA, IF, CP, VC) 0,5 $\mu\text{g L}^{-1}$ (etoposido, DOXO, EPB)	0,25 $\mu\text{g L}^{-1}$ (MTX, CTB) 0,5 $\mu\text{g L}^{-1}$ (GCA, CP) 1 $\mu\text{g L}^{-1}$ (etoposido, IF, IRT, VC) 2 $\mu\text{g L}^{-1}$ (DOXO, EPB)	NUSSBAUMER et al. (2010)

Tabela 2 – Trabalhos publicados, no período de 2002 a 2014, sobre o desenvolvimento de métodos para determinação de antineoplásicos, em diferentes matrizes

(continuação)

Amostra	Analitos	Padrão Interno	Técnica de detecção	Faixa de Trabalho	Limite de detecção	Limite de quantificação	Referência
Urina	DOXO, EPB	idarrubicina	LC-FL	não especificado	0,6-1,2 $\mu\text{g L}^{-1}$	1,1 - 2,0 $\mu\text{g L}^{-1}$	PIERI et al. (2010)
Superfícies	5-FU	5-bromouracila	LC-DAD	25000-100000 $\mu\text{g L}^{-1}$	5000 $\mu\text{g L}^{-1}$	25000 $\mu\text{g L}^{-1}$	RESENDE et al. (2011)
Plasma	5-FU	5-FU deuterado	LC-MS/MS LC-UV	8-200 $\mu\text{g L}^{-1}$	5 $\mu\text{g L}^{-1}$	8 $\mu\text{g L}^{-1}$	PEER et al. (2012)
Efluentes urbanos e hospitalares	CP, IF, DOC, PAC, MTX, VC, TAM, AZA, CYF, etoposido	[$^2\text{H}_4$]-CP, [$^{13}\text{C}_6$]-citrato de TAM, [$^2\text{H}_3$]-etoposido, [$^2\text{H}_3$]-sulfato de VC, [$^{13}\text{C}_4$]-AZA, [$^2\text{H}_8$]-CYF	UPLCQqLit	0,1-80 $\mu\text{g L}^{-1}$ (CP, IF, DOC, PAC, MTX, VC, TAM etoposido) 0,1-100 $\mu\text{g L}^{-1}$ (AZA, CYF)	0,0011 $\mu\text{g L}^{-1}$ (CP), 0,0017 $\mu\text{g L}^{-1}$ (IF), 0,0075 $\mu\text{g L}^{-1}$ (DOC), 0,0055 $\mu\text{g L}^{-1}$ (PAC), 0,0018 $\mu\text{g L}^{-1}$ (MTX), 0,0074 $\mu\text{g L}^{-1}$ (VC), 0,0008 $\mu\text{g L}^{-1}$ (TAM), 0,0038 $\mu\text{g L}^{-1}$ (AZA), 0,0024 $\mu\text{g L}^{-1}$ (CYF), 0,024 $\mu\text{g L}^{-1}$ (etoposido)	0,0036 $\mu\text{g L}^{-1}$ (CP), 0,0058 $\mu\text{g L}^{-1}$ (IF), 0,0209 $\mu\text{g L}^{-1}$ (DOC), 0,0184 $\mu\text{g L}^{-1}$ (PAC), 0,0059 $\mu\text{g L}^{-1}$ (MTX), 0,0245 $\mu\text{g L}^{-1}$ (VC), 0,0027 $\mu\text{g L}^{-1}$ (TAM), 0,0127 $\mu\text{g L}^{-1}$ (AZA), 0,0081 $\mu\text{g L}^{-1}$ (CYF), 0,080 $\mu\text{g L}^{-1}$ (etoposido)	FERRANDO-CLIMENT; RODRIGUEZ-MOZAZ; BARCELÓ (2013)

Tabela 2 – Trabalhos publicados, no período de 2002 a 2014, sobre o desenvolvimento de métodos para determinação de antineoplásicos, em diferentes matrizes

(conclusão)

Amostra	Analitos	Padrão Interno	Técnica de detecção	Faixa de Trabalho	Limite de detecção	Limite de quantificação	Referência
Superfícies	5-FU, CP, DOXO	5'-deoxi-5-fluorocitidina	LC-MS	10-500 ng wipe ⁻¹ (5-FU, DOXO) 1-100 ng wipe ⁻¹ (CP)	5 ng wipe ⁻¹ (5-FU, DOXO) 0,5 ng wipe ⁻¹ (CP)	10 ng wipe ⁻¹ (5-FU, DOXO) 1 ng wipe ⁻¹ (CP)	BOBIN-DUBIGEON et al. (2013)
Plasma	DOXO, DOL	trofosfamida	LC-MS/MS	1-1000 µg L ⁻¹	0,03 µg L ⁻¹ (DOL) 0,01 µg L ⁻¹ (DOXO)	1 µg L ⁻¹	SOTTANI et al. (2013)
Águas superficiais	CP	não especificado	LC-MS/MS	0,00936 - 0,09360 µg L ⁻¹	0,0049 µg L ⁻¹	0,0146 µg L ⁻¹	CZERNYCH et al. (2014)
Águas residuais	CP, GCA, IF, MTX, IRT, EPB	atrazina- ¹³ C	LC-MS/MS	13-300 µg L ⁻¹ (CP), 60-300 µg L ⁻¹ (GCA), 14-300 µg L ⁻¹ (IF), 36-300 µg L ⁻¹ (MTX), 19-300 µg L ⁻¹ (IRT), 54-300 µg L ⁻¹ (EPB)	4 µg L ⁻¹ (CP, IF), 20 µg L ⁻¹ (GCA), 12 µg L ⁻¹ (MTX), 6 µg L ⁻¹ (IRT), 18 µg L ⁻¹ (EPB)	13 µg L ⁻¹ (CP), 60 µg L ⁻¹ (GCA), 14 µg L ⁻¹ (IF), 36 µg L ⁻¹ (MTX), 19 µg L ⁻¹ (IRT), 54 µg L ⁻¹ (EPB)	RABII et al. (2014)

Notas: AZA= azatioprina; CTB= citarabina; CYF= ciprofloxacino; DNR= daunorrubicina; EPB= epirrubicina; IRT= irinotecano; OHMTX= hidróxi-metotrexato; TAM= tamoxifeno; LC-MS/MS= cromatografia líquida acoplada a um detector de espectrometria de massas em *tandem*; UPLCQqLit= cromatografia líquida de ultra performance acoplada a um espectrômetro híbrido do tipo triplo quadrupolo-ion trap linear.

Para o docetaxel, a maioria dos trabalhos publicados, até o momento, envolvem estudos clínicos (CORONA et al., 2011; GROZAV et al., 2004; HENDRIKX et al., 2011; MORTIER et al., 2005; YAMAGUCHI et al., 2012) ou avaliação de toxicidade (YAMADA et al., 2013). Em alguns estudos publicados, esse fármaco é usado como padrão interno para seu análogo estrutural, o paclitaxel (FERNÁNDEZ-PERALBO et al., 2014; JIN et al., 2013; LIAN; SUN; ZHANG, 2013; ZHANG et al., 2010; ZHANG et al., 2011). Conforme pode ser verificado na Tabela 3, vários métodos utilizam a LC-MS/MS, o que pode ser explicado pela seletividade e detectabilidade inerentes a essa técnica, representando uma ferramenta analítica preferencial para a detecção e/ou quantificação desse e de outros fármacos, quando esses estão presentes em baixas concentrações, em matrizes complexas (CORONA et al., 2011).

Tabela 3 – Técnica de detecção, faixa de trabalho, limites de detecção e quantificação dos métodos descritos na literatura para análise de docetaxel

Amostra	Técnica de detecção	Faixa de trabalho	Limite de detecção	Limite de quantificação	Referência
Plasma	LC-MS/MS	1-3000 $\mu\text{g L}^{-1}$	não especificado	1 $\mu\text{g L}^{-1}$	GROZAV et al. (2004)
Saliva e Plasma	LC-MS/MS	4-1000 $\mu\text{g L}^{-1}$ (plasma) 0,25-62,5 $\mu\text{g L}^{-1}$ (soro)	não especificado	4 $\mu\text{g L}^{-1}$ (plasma) 0,25 $\mu\text{g L}^{-1}$ (soro)	MORTIER et al. (2005)
Plasma	LC-MS/MS	0,15-1500 $\mu\text{g L}^{-1}$	não especificado	0,15 $\mu\text{g L}^{-1}$	CORONA et al. (2011)
Plasma	LC-MS/MS	0,5-500 $\mu\text{g L}^{-1}$	não especificado	0,5 $\mu\text{g L}^{-1}$	HENDRIKX et al. (2011)
Plasma	LC-MS/MS	5-5000 $\mu\text{g L}^{-1}$	não especificado	5 $\mu\text{g L}^{-1}$	YAMAGUCHI et al. (2012)
Efluentes urbanos e hospitalares	UPLCQqLit	0,1-80 $\mu\text{g L}^{-1}$	0,0075 $\mu\text{g L}^{-1}$	0,0209 $\mu\text{g L}^{-1}$	FERRANDO-CLIMENT; RODRIGUEZ-MOZAZ; BARCELÓ (2013)

Dentre os fármacos utilizados na clínica, a 5-FU, a cisplatina, a CP, o fosfato de etopósido, a GCA, a carboplatina, o irinotecano, a DOXO, a citarabina, a EPB, o PAC, o MTX, a oxaliplatina, o DOC, a mitomicina, a IF, a azacitidina, a VC, o bortezomib e a fludarabina estão entre os antineoplásicos mais manipulados no Hospital da Universidade de Genebra, segundo estudo feito por Nussbaumer et al. (2010), os quais desenvolveram um método, empregando LC-MS/MS, que permitiu a determinação de dez analitos selecionados, a partir desses 20 fármacos, levando em consideração a frequência de preparo e considerações analíticas e de toxicidade dessas substâncias.

Dentre os trabalhos encontrados, na revisão realizada no presente estudo, não existe um método para determinação simultânea de CP, 5-FU, MTX, que são substâncias consideradas indicadores de exposição, juntamente com DOXO e DOC – fármaco que vem sendo amplamente utilizado para cânceres de pescoço e cabeça (AHMADLOO et al., 2012), de mama (CHU; SARTORELLI, 2007) e câncer de pulmão de células não pequenas (ALMEIDA, 2004), para a aplicação no monitoramento de superfícies para a avaliação da exposição ocupacional. Portanto, um método desenvolvido para analisar esses cinco antineoplásicos simultaneamente, em superfícies, por cromatografia líquida de ultra performance acoplada a um detector de espectrometria de massas em *tandem* (UHPLC-MS/MS), é considerado inovador para aplicação no monitoramento da exposição dos trabalhadores que manipulam tais substâncias.

3 JUSTIFICATIVA E 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 como para as populações ocupacionalmente expostas.

O grupo de pesquisa da UNIFAL-MG, “Análise de Toxicantes e Fármacos”, apresenta trabalhos publicados com esse tema (MARTINS; DELLA ROSA; APOSTOLI, 2004; MARTINS; APOSTOLI; DELLA ROSA, 2008; ALCÂNTARA, 2009; ALCÂNTARA et al., 2009; ALCÂNTARA et al., 2010; ALCÂNTARA; MARTINS, 2012; RESENDE et al., 2011; SANSON et al., 2011), sendo esses em matrizes não-biológicas, utilizando técnicas de CG-MS, com derivatização da ciclofosfamida e da ifosfamida e de LC-DAD.

Os métodos que utilizam a cromatografia líquida acoplada a um detector de espectrometria de massas em *tandem* permitem a obtenção de baixos limites de detecção, além de evitar uma etapa de derivatização, requerida em métodos que utilizam a cromatografia gasosa como técnica de separação, uma vez que os agentes antineoplásicos são compostos não voláteis (SABATINI et al., 2005). Portanto, um método de cromatografia líquida de ultra performance acoplada ao espectrômetro de massas em *tandem* possibilita uma análise mais rápida, menos laboriosa, em termos de preparo de amostra, além de permitir o alcance de limites a níveis de ng mL^{-1} (ppb) ou pg mL^{-1} (ppt).

Por conseguinte, este trabalho tem como objetivo desenvolver um método analítico, composto pelas técnicas de extração líquido-líquido (ELL) e de detecção/quantificação UHPLC-MS/MS, através das etapas de otimização, validação e aplicação em amostras de superfícies, para a determinação simultânea de fármacos antineoplásicos frequentemente utilizados na prática clínica, visando a obtenção de uma ferramenta analítica a ser aplicada, rotineiramente, no monitoramento da exposição ocupacional.

Os objetivos específicos são:

- a) otimizar as condições cromatográficas e espectrométricas, tais como: fase móvel, vazão da fase móvel, volume de injeção, energia de colisão, entre outras, de forma a otimizar uma técnica de separação/ detecção/ quantificação simultânea dos analitos;
- b) otimizar as condições de preparo de amostras, de forma a otimizar uma técnica de

extração simultânea dos analitos;

- c) validar o método analítico, constituído das técnicas de preparo de amostra e de detecção/ quantificação otimizadas, para determinação simultânea de FAN, por meio dos seguintes parâmetros: seletividade, robustez, efeito matriz, linearidade, eficiência de extração, limites de detecção e de quantificação, exatidão e precisão;
- d) aplicar o método em amostras de superfícies, visando avaliar o desempenho do método otimizado e validado.

4 EXPERIMENTAL

O capítulo “Experimental” abrange os materiais utilizados no desenvolvimento do projeto, bem como a manipulação e descartes seguros dos FAN, desenho do estudo e metodologia empregada.

4.1 MATERIAL

A seguir são descritos as substâncias químicas, reagentes, equipamentos e acessórios utilizados, bem como o preparo das soluções-padrão, soluções-estoque e soluções de trabalho.

4.1.1 Substâncias químicas e reagentes

Foram utilizados os seguintes padrões: 5-fluoruracila (pureza 99%, lote 11121MQ), docetaxel (pureza 97%; lote BCBLT370V) e doxorubicina (pureza 98-102%, lote SLBH4977V), sendo todos Sigma-Aldrich[®] (São Paulo, Brasil); e os padrões de ciclofosfamida (pureza não informada, lote 075K161) e metotrexato (pureza 98%, lote 016K16432), Sigma[®] (Saint Louis, USA).

Para a realização da otimização, validação e aplicação do método analítico desenvolvido foram utilizados os seguintes solventes e reagentes: água obtida pelo sistema Milli Q 18,2 Ω M.cm, Millipore[®] (São Paulo, Brasil); metanol, grau HPLC, Panreac[®] (Barcelona, Espanha); acetonitrila, grau HPLC, LiChrosolv[®] (Darmstadt, Alemanha) e Proquimios[®] (Rio de Janeiro, Brasil); acetato de amônio e acetato de etila, ambos Vetec[®] (Rio de Janeiro, Brasil); formiato de amônio, Sigma-Aldrich[®] (São Paulo, Brasil); ácido fórmico, Biotec[®] (Pinhais, Brasil). A correção de pH foi realizada utilizando hidróxido de amônio, Merck[®] (Rio de Janeiro, Brasil), ácido acético, Furlab[®] (Campinas, Brasil) ou ácido fórmico, descrito acima.

Para lavagem das vidrarias e limpeza das bancadas, a fim de inativar os fármacos, foram utilizadas soluções de hidróxido de sódio (NaOH) 3 mol L⁻¹ e álcool 70%. Para o

preparo dessas soluções foram utilizados NaOH, Vetec[®] (Rio de Janeiro, Brasil), e etanol, Merck[®] (Rio de Janeiro, Brasil).

4.1.2 Equipamentos e acessórios

Foi utilizado nesse estudo, o cromatógrafo líquido, Shimadzu[®] (Kyoto, Japão), equipado com fonte de ionização *electrospray* (ESI) e detector MS/MS triplo quadrupolo LCMS-8030. O sistema é composto pelos módulos: controladora CBM-20A, bomba binária LC-20AD, degaseificador DGU-20A3R, injetor automático SIL-20AHT, forno da coluna CTO-20A, detector de UV/VIS SPD-20A e uma válvula FCV-20AH2. A aquisição e tratamento dos dados foram feitos com auxílio de software LabSolutions (Shimadzu[®]). Para o espectrômetro de massas, as condições aplicadas foram: voltagem do spray = 4,5 kV; vazão do gás de nebulização = 1,5 L min⁻¹; vazão do gás de secagem = 15 L min⁻¹; pressão do gás de colisão (argônio) = 230 kPa; temperatura do bloco de aquecimento = 400°C; temperatura da linha de dessolvatação = 250°C. Para a otimização das condições cromatográficas utilizou-se coluna Shim-pack[®] XR-ODS C18 (100 x 3 mm, 2,2 µm) e pré coluna Shim-pack[®] G-ODS C18 (10 x 4 mm, 5 µm), ambas Shimadzu[®].

Ainda, empregou-se balança analítica Kern 410[®]; sistema de purificação de água Milli Q, Millipore[®]; banho ultrassônico, modelo USC2800A, da Unique[®]; peagâmetro digital, Marte[®]; agitador mecânico tipo vórtex MA 162, Marcon[®], e sistema de filtração a vácuo, Millipore[®]; filtros de membrana, Millipore[®]; micropipetas, Digipet[®]. Para o *wipe sampling*, utilizou-se lenços de papel (21 x 14,8 cm), Melhoramentos CMPC Ltda[®].

4.1.3 Preparo dos padrões

Foram preparadas soluções-padrão individuais na concentração 1 g L⁻¹ dos analitos CP e 5-FU, em metanol, e do MTX, em metanol: ácido fórmico 1% (7:3, v/v). As soluções de DOXO e DOC foram preparadas em metanol na concentração de 100 mg L⁻¹. A partir dessas soluções-estoque, armazenadas por um período de até três meses, foram obtidas as soluções de trabalho, as quais foram preparadas mensalmente, e dessas, foram realizadas as diluições

necessárias, no dia da análise, para os estudos de otimização e validação do método analítico. Todas as soluções-padrão e de trabalho foram acondicionadas em frascos âmbar, tampados e lacrados com papel parafilm, da marca Bemis[®], e mantidas a -20°C.

4.2 MANIPULAÇÃO E DESCARTE SEGUROS DOS ANTINEOPLÁSICOS

Os profissionais que entram em contato com os FAN devem ter conhecimento sobre os riscos potenciais, que dependem de algumas variáveis, como toxicidade inerente, tempo e frequência de exposição (VENEGAS et al., 1995) e sobre uma manipulação segura desses agentes, incluindo a forma correta de se utilizar os equipamentos de proteção individual (MARTINS, 2003; ANDRADE, 2009).

Os antineoplásicos têm sido referidos como genotóxicos, carcinogênicos e teratogênicos, portanto, devem ser manipulados em condições ideais – sala ventilada, com cabine de fluxo laminar –, e principalmente utilizando os EPI, como luvas, máscara, jaleco, gorro e óculos de proteção (VENEGAS et al., 1995; MARTINS, 2003; SOBRAFO, 2003; ANDRADE, 2009).

Durante a manipulação dos FAN, as bancadas foram forradas com papel pardo e limpas, após cada utilização, com álcool a 70%. Foram utilizadas duas luvas de látex, sendo que a luva mais externa era isenta de talco, além dos demais EPI requeridos.

As medidas de segurança incluem lavagem demorada com água e sabão neutro em caso de contaminação de pele e mucosas; lava-olhos ou solução salina isotônica por pelo menos 15 minutos no caso de contaminação dos olhos. E, em casos de derramamento das soluções dos antineoplásicos, o manipulador calçou as luvas e removeu o líquido com toalha ou papel adequado e a área do acidente foi limpa, no mínimo, três vezes com solução de limpeza – NaOH 3 mol L⁻¹ e álcool 70% –, segundo Venegas et al. (1995), SOBRAFO (2003) e Andrade (2009).

Todo material, soluções dos padrões e soluções de limpeza, foram recolhidos em um lixo para descarte de material contaminado com os FAN, sendo posteriormente eliminado por incineração, assim como recomendado por Andrade (2009).

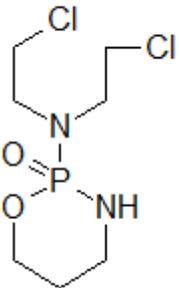
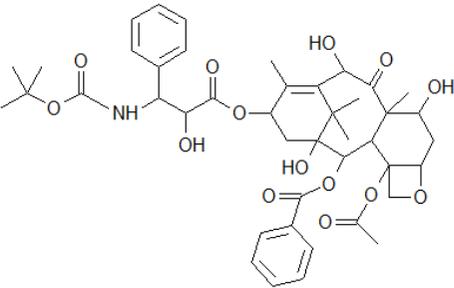
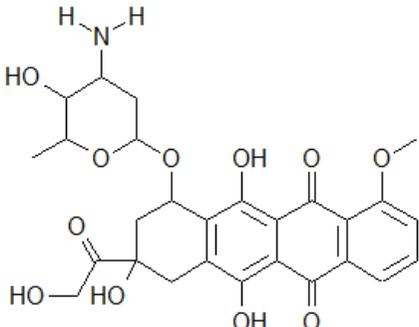
4.3 DESENHO DO ESTUDO

Em uma primeira etapa, foi feito o reconhecimento das situações reais de exposição ocupacional aos fármacos antineoplásicos, em hospitais com setor de oncologia, de cidades da região Sudeste, incluindo Hospital Santa Paula (São Paulo, São Paulo), Hospital Ascomcer (Juiz de Fora, Minas Gerais), Hospital Universitário Gaffrée e Guinle (Rio de Janeiro, Rio de Janeiro), Hospital São Francisco de Assis (Belo Horizonte, Minas Gerais), Centro de Referência da Saúde da Mulher (São Paulo, São Paulo), Hospital Regional do Câncer Santa Casa de Misericórdia de Passos (Passos, Minas Gerais) e Instituto Nacional de Câncer (INCA) (Rio de Janeiro, Rio de Janeiro), através de contato eletrônico e/ou telefônico com os responsáveis. Esse reconhecimento visou coletar as informações necessárias para a escolha dos fármacos que seriam incluídos nesse estudo e para uma avaliação dos níveis de detectabilidade, do método a ser desenvolvido. Isso foi feito por meio de questionamento quanto aos principais fármacos utilizados, os quais os trabalhadores estariam em contato, número de preparações e/ou administrações por dia.

Dentre os FAN utilizados na prática clínica, a CP, o DOC, a DOXO, o MTX e a 5-FU estavam entre os fármacos citados como os mais comumente usados no tratamento do câncer. Assim, eles foram escolhidos para esse trabalho, devido à sua importância terapêutica e tóxica e a sua influência nos riscos potenciais aos trabalhadores. No Quadro 1, podem ser observadas a fórmula estrutural e molecular dos compostos alvo, assim como algumas de suas propriedades físico-químicas, como massa molecular, pKa, log Kow e solubilidade.

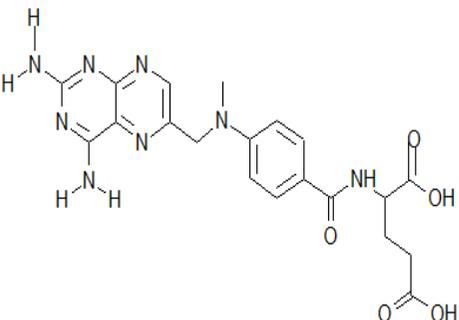
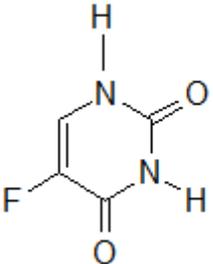
Quadro 1 – Fórmulas estrutural e molecular, massa molecular, pKa, log Kow e solubilidade dos analitos em estudo

(continua)

Composto alvo	Fórmula estrutural	Fórmula molecular ^{1,2}	Massa molecular (g mol ⁻¹) ^{2,3}	pKa ^{1,2,3}	log Kow ^{2,3}	Solubilidade ^{1,2}
CP		C ₇ H ₁₅ Cl ₂ N ₂ O ₂ P	260,1	pKa=2,84	0,63	Solúvel em água, álcool; fracamente solúvel em benzeno, etilenoglicol, tetracloreto de carbono e dioxano; levemente solúvel em éter e acetona
DOC		C ₄₃ H ₅₃ NO ₁₄	807,9	pKa ₁ =10,6 pKa ₂ =12,0 pKa ₃ =13,3 pKa ₄ =14,0 pKa ₅ =14,8	2,92	Insolúvel em água, solúvel em isopropanol e muito solúvel em acetato de etila, clorofórmio e metanol
DOXO		C ₂₇ H ₂₉ NO ₁₁	543,5	pKa ₁ =7,35 pKa ₂ =8,68	1,3	Solúvel em água, cloreto de sódio 0,9%, metanol; praticamente insolúvel em acetona, benzeno, clorofórmio, éter etílico, éter de petróleo, éter e outros solventes orgânicos

Quadro 1 – Fórmulas estrutural e molecular, massa molecular, pKa, log Kow e solubilidade dos analitos em estudo

(conclusão)

Composto alvo	Fórmula estrutural	Fórmula molecular ^{1,2}	Massa molecular (g mol ⁻¹) ^{2,3}	pKa ^{1,2,3}	log Kow ^{2,3}	Solubilidade ^{1,2}
MTX		C ₂₀ H ₂₂ N ₈ O ₅	454,4	pKa ₁ =3,54 pKa ₂ =5,09	-1,85	Praticamente insolúvel em água, etanol, éter, diclorometano e clorofórmio; solúvel em soluções diluídas de ácidos minerais e alcalinas de hidróxidos e carbonatos
5-FU		C ₄ H ₃ FN ₂ O ₂	130,1	pKa=7,68	-1,0	Pouco solúvel em água, solúvel em álcool e praticamente insolúvel em clorofórmio e éter

Fonte: ¹ ALCÂNTARA, 2009; ² MOFFAT; OSSELTON; WIDDOP, 2011; ³ FERRANDO-CLIMENT; RODRIGUEZ-MOZAZ; BARCELÓ, 2013; ⁴ RABII et al., 2014

4.4 MÉTODOS

Nesta seção são descritas todas as metodologias testadas para cada fase de desenvolvimento do projeto.

4.4.1 Método analítico

O desenvolvimento do método analítico constituiu o principal objetivo desse estudo, sendo a otimização, a validação e a aplicação em amostras de superfícies, etapas executadas no Laboratório de Análises de Toxicantes e Fármacos (LATF), da UNIFAL-MG. A determinação dos fármacos ciclofosfamida, docetaxel, doxorubicina, metotrexato e 5-fluoruracila foi realizada baseando-se principalmente nos estudos descritos por Sabatini et al. (2005), Sottani et al. (2007), Nussbaumer et al. (2010), Alcântara; Martins (2012), Bobin-Dubigeon et al. (2013), utilizando-se um método de cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada com detector de espectrometria de massas do tipo triplo quadrupolo.

Para o desenvolvimento do método analítico foi necessário otimizar as condições cromatográficas, os parâmetros de espectrometria de massas e as condições de limpeza e extração dos analitos das superfícies. Para isso foram testados diferentes tipos de solventes, materiais e reagentes.

Após análise dos resultados obtidos nos testes apresentados na Tabela 4, as condições do espectrômetro de massas otimizadas foram:

- a) Fonte de Ionização: ESI;
- b) Modo de ionização: positivo (CP, DOC, DOXO e MTX) e negativo (5-FU);
- c) Modo de operação: monitoramento de reação múltipla (MRM); Fase móvel: formiato de amônio 10 mmol L⁻¹: acetonitrila (30:70, v/v);
- d) Transições monitoradas para quantificação: 261,0 > 140,0 m/z para CP; 830,3 > 304,0 m/z para DOC; 544,1 > 396,9 m/z para DOXO; 455,1 > 308,0 m/z para MTX; 129,1 > 42,1 m/z para 5-FU;
- e) Dwell time: 0,30 s.

Tabela 4 – Diferentes composições e proporções de fases móveis testadas para estabelecer as condições de MS/MS

Composição da fase móvel	Proporção (v/v)
água: metanol	30:70, v/v
	50:50, v/v
	70:30, v/v
ácido fórmico 0,1% em água: metanol	30:70, v/v
	50:50, v/v
	70:30, v/v
ácido fórmico 0,1% em água: acetonitrila	30:70, v/v
	50:50, v/v
	70:30, v/v
ácido fórmico 0,1% em água	100
ácido fórmico 0,5% em água	100
ácido fórmico 0,5% em acetonitrila	100
ácido fórmico 0,5% em água: acetonitrila	50:50, v/v
ácido fórmico 0,5% em água: ácido fórmico 0,5% em acetonitrila	50:50, v/v
formiato de amônio 10 mmol L ⁻¹ : acetonitrila	30:70, v/v
	50:50, v/v
	70:30, v/v
formiato de amônio 10 mmol L ⁻¹ : metanol	30:70, v/v
	50:50, v/v
	70:30, v/v
ácido fórmico 0,2% em formiato de amônio 10 mmol L ⁻¹ : ácido fórmico 0,2% em acetonitrila	30:70, v/v
	50:50, v/v
	70:30, v/v

Fonte: Do autor

Para se obter as condições cromatográficas otimizadas foram testados os seguintes parâmetros:

- Fase móvel: testadas em modos isocrático e gradiente, conforme os ensaios apresentados na Tabela 5;
- Faixa de pH da fase móvel: de 2,6 a 6;
- Vazão da fase móvel: 0,1 mL min⁻¹, 0,2 mL min⁻¹ e 0,3 mL min⁻¹;
- Volumes de injeção: 10 µL, 25 µL, 50 µL, 75 µL e 100 µL.

Tabela 5 – Diferentes composições e tipo de eluição das fases móveis testadas para estabelecer as condições cromatográficas

(continua)

Composição	Tipo de eluição
formiato de amônio 10 mmol L ⁻¹ (pH 6): acetonitrila	Isocrático: 10:90, v/v 30:70, v/v 50:50, v/v
ácido fórmico 0,2% em formiato de amônio 10 mmol L ⁻¹ : acetonitrila	Isocrático: 30:70, v/v 40:60, v/v 50:50, v/v
formiato de amônio 10 mmol L ⁻¹ (pH 6): ácido fórmico 0,2% em Acetonitrila	Isocrático: 30:70, v/v 50:50, v/v 70:30, v/v
ácido fórmico 0,2% em formiato de amônio 10 mmol L ⁻¹ : ácido fórmico 0,2% em acetonitrila	Isocrático: 30:70, v/v 50:50, v/v
formiato de amônio 10 mmol L ⁻¹ (pH 6) (A): metanol (B)	Isocrático: 10:90, v/v 20:80, v/v 30:70, v/v 50:50, v/v 80:20, v/v

Gradiente 1: 2 min de modo isocrático com 2% de B; aumento de 2 a 21% em 0,5 min; 7,5 min de modo isocrático com 21% de B; aumento de 21 a 30% em 3 min; aumento de 30 a 50% em 0,5 min; 2 min de modo isocrático com 50% de B; redução de 50 a 2% em 0,5 min; seguido por 5 min de modo isocrático

Gradiente 2: 2 min de modo isocrático com 30% de B; aumento de 30 a 50% em 5 min; aumento de 50 a 80% em 2 min; seguido por redução de 80 a 30% em 6 min

Tabela 5 – Diferentes composições e tipo de eluição das fases móveis testadas para estabelecer as condições cromatográficas

(continuação)

Composição	Tipo de eluição
formiato de amônio 10 mmol L ⁻¹ (pH 6) (A): metanol (B)	Gradiente 3: 1 min de modo isocrático com 15% de B; aumento de 15 a 50% e, 0,5 min; aumento de 50 a 65% em 15 min; redução de 65 a 15% em 0,5 min; seguido de 8 min de modo isocrático
formiato de amônio 10 mmol L ⁻¹ (pH 4) (A): metanol (B)	Gradiente 1: 1 min de modo isocrático com 15% de B; aumento de 15 a 50% e, 0,5 min; aumento de 50 a 65% em 15 min; redução de 65 a 15% em 0,5 min; seguido de 8 min de modo isocrático
formiato de amônio 10 mmol L ⁻¹ (pH 5) (A): metanol (B)	Gradiente 1: 1 min de modo isocrático com 15% de B; aumento de 15 a 50% e, 0,5 min; aumento de 50 a 65% em 15 min; redução de 65 a 15% em 0,5 min; seguido de 8 min de modo isocrático
formiato de amônio 2 mmol L ⁻¹ (pH 4) (A): metanol (B)	Gradiente 1: 1 min de modo isocrático com 15% de B; aumento de 15 a 50% e, 0,5 min; aumento de 50 a 65% em 15 min; redução de 65 a 15% em 0,5 min; seguido de 8 min de modo isocrático
formiato de amônio 2 mmol L ⁻¹ (pH 6): metanol	Isocrático: 10:90, v/v
formiato de amônio 5 mmol L ⁻¹ (pH 6): metanol	Isocrático: 10:90, v/v
ácido fórmico 0,2% em formiato de amônio 10 mmol L ⁻¹ : metanol	Isocrático: 10:90, v/v 30:70, v/v 50:50, v/v
acetonitrila	100%
metanol	100%
água: metanol	Isocrático: 10:90, v/v 50:50, v/v

Tabela 5 – Diferentes composições e tipo de eluição das fases móveis testadas para estabelecer as condições cromatográficas

(continuação)

Composição	Tipo de eluição
água (A): acetonitrila/ metanol (70:30, v/v) (B)	Gradiente 1: 2,5 min de modo isocrático com 20% de B; aumento de 20 a 80% em 8 min; 4,5 min de modo isocrático; redução de 80 a 20% de B em 2 min; seguido de 6 min de modo isocrático
ácido fórmico 0,1% em água: metanol	Isocrático: 3:97, v/v 30:70, v/v
ácido acético 0,1% em água: metanol	Isocrático: 10:90, v/v 30:70, v/v 50:50, v/v
ácido acético 0,2% em metanol	100%
ácido acético 0,1% em água: acetonitrila	Isocrático: 10:90, v/v 20:80, v/v
acetato de amônio 20 mmol L ⁻¹ (pH 4) (A): metanol (B)	Isocrático: 10:90, v/v 50:50, v/v
	Gradiente 1: 1 min de modo isocrático com 15% de B; aumento de 15 a 50% e, 0,5 min; aumento de 50 a 65% em 15 min; redução de 65 a 15% em 0,5 min; seguido de 8 min de modo isocrático
ácido fórmico 0,1% em acetato de amônio 10 mmol L ⁻¹ : acetonitrila	Isocrático: 20:80, v/v
ácido fórmico 0,1% em água: ácido fórmico 0,2% em acetonitrila	Isocrático: 10:90, v/v 30:70, v/v 50:50, v/v 70:30, v/v

Tabela 5 – Diferentes composições e tipo de eluição das fases móveis testadas para estabelecer as condições cromatográficas

Composição	Tipo de eluição
ácido fórmico 0,1% em água: acetonitrila/ metanol (50:50, v/v)	Isocrático: 50:50, v/v
ácido fórmico 0,1% em água (pH 2,7) (A): acetonitrila (B)	Isocrático: 20:80, v/v 30:70, v/v 50:50, v/v
	Gradiente 1: 2 min de modo isocrático com 2% de B; aumento de 2 a 21% em 0,5 min; 7,5 min de modo isocrático com 21% de B; aumento de 21 a 30% em 3 min; aumento de 30 a 50% em 0,5 min; 2 min de modo isocrático com 50% de B; redução de 50 a 2% em 0,5 min; seguido por 5 min de modo isocrático
	Gradiente 2: 1 min de modo isocrático com 50% de B; aumento de 50 a 80% de B em 5 min; redução de 80 a 50% de B em 2 min; seguido por 1 min de modo isocrático
	Gradiente 3: 2 min de modo isocrático com 30% de B; aumento de 30 a 50% de B em 5 min; aumento de 50 a 80% de B em 2 min; redução de 80 a 30% de B em 1 min
	Gradiente 4: 2 min de modo isocrático com 30% de B; aumento de 30 a 50% de B em 5 min; aumento de 50 a 80% de B em 2 min; redução de 80 a 30% de B em 6 min

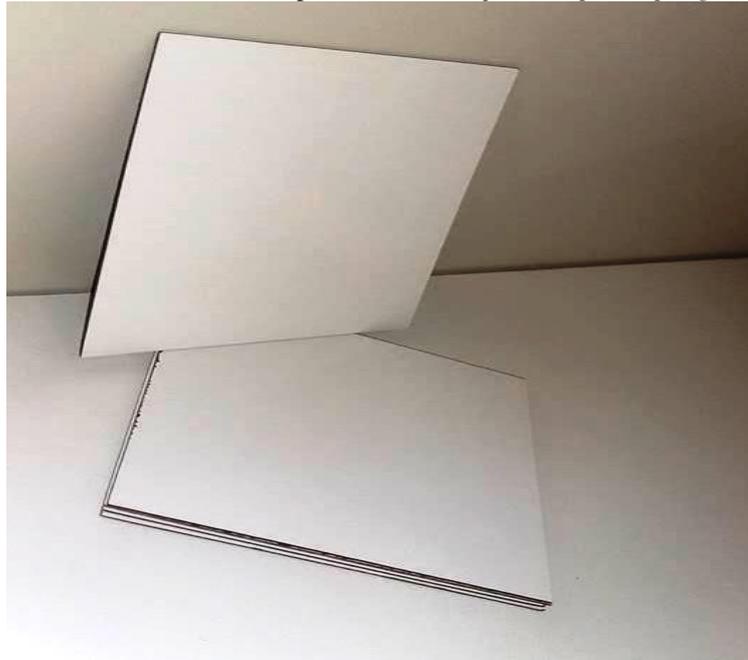
Fonte: Do autor

4.4.2 Wipe teste e ELL

Para a aplicação do método, por meio de limpeza das superfícies, a amostragem do tipo *wipe sampling* foi utilizada. Os ensaios foram realizados em superfícies, tais como

placas de fórmica (Figura 1), além de espelhos de fechaduras (Figura 2), sendo ambas obtidas no almoxarifado da UNIFAL-MG, e luvas (Figura 3), as quais foram adquiridas no comércio de Alfenas. Após o *wipe* teste, esses materiais foram descartados em lixo especial, para descarte de material contaminado, o qual foi, posteriormente, encaminhado para incineração. Esses materiais encontram-se descritos na Tabela 6.

Figura 1 – Placas de fórmica utilizadas para contaminação com antineoplásicos e realização de *wipe sampling*



Fonte: Do autor

Figura 2 – Espelhos de fechaduras de portas utilizados para contaminação com antineoplásicos e realização de *wipe sampling*



Fonte: Do autor

Figura 3 – Luvas de látex utilizadas para contaminação com antineoplásicos e realização de *wipe sampling*



Fonte: Do autor

Tabela 6 – Descrição dos materiais utilizados para a aplicação do método para determinação de antineoplásicos

Material	Descrição
Espelhos de fechaduras de portas	alumínio; área superficial de 18 x 3,5 cm e 8,5 x 1,8 cm
Material de superfície de bancadas	fórmica; brancas; área superficial de 10 x 10 cm
Luvas	látex; laranjas; da marca Sanro®

Fonte: Do autor

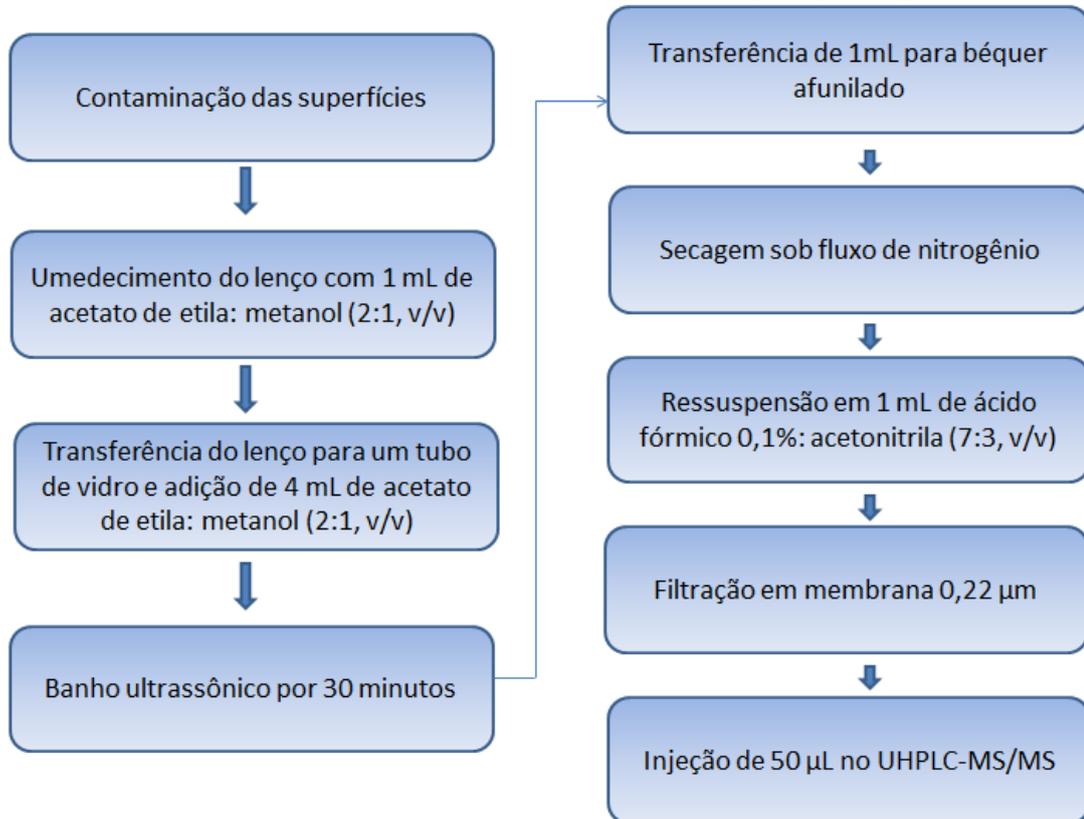
O teste foi feito de acordo com o estudo desenvolvido por Nussbaumer et al. (2010). Inicialmente, as superfícies foram contaminadas com 150, 250 e 500 ng wipe⁻¹, as quais correspondem, após extração, às concentrações de 30, 50 e 100 ng mL⁻¹, de cada fármaco e, paralelamente foi realizado a *wipe sampling*, em superfícies limpas, não contaminadas com os fármacos (n=6).

Após a adição das soluções dos fármacos, as superfícies foram secas à temperatura ambiente e, para o *wipe sampling* foram limpas sistematicamente, cinco vezes em duas direções diferentes – de cima para baixo, e da direita para esquerda –, com lenço Kleenex (21 x 14,8 cm), os quais foram umedecidos com 1 mL das soluções extratoras testadas – ácido fórmico 0,1% em água, acetonitrila pura, ácido fórmico 0,1%: acetonitrila (7:3, v/v) e

acetato de etila: metanol (2:1, v/v). Esses lenços foram transferidos para tubos de centrifuga de vidro, nos quais foram adicionados 4 mL da solução extratora. Os tubos foram levados ao banho ultrassônico por 30 minutos. Após esse tempo, 1 mL da solução foi transferido para um béquer afunilado e o extrato foi seco sob fluxo de nitrogênio. O resíduo foi ressuspensionado com ácido fórmico 0,1%: acetonitrila (7:3, v/v), sendo 50 μ L injetados no cromatógrafo.

E, após vários testes, a técnica otimizada para os analitos, CP, DOXO, DOC e 5-FU, em superfícies, pode ser observada na Figura 4.

Figura 4 – Fluxograma do *wipe* teste, que foi a técnica otimizada de limpeza das superfícies contaminadas com antineoplásicos com posterior extração líquido-líquido



Fonte: Do autor

4.4.3 Validação e aplicação da análise de antineoplásicos em superfícies

O método foi validado adotando-se como guias a Resolução RE n° 899, de 29 de maio de 2003, da ANVISA (ANVISA, 2003), as normas DOQ-CGCRE-008 do INMETRO

(INMETRO, 2011) e trabalhos realizados por Ribani et al. (2004), Paschoal et al. (2008) e Cassiano et al. (2009), e aplicado em amostras de maçanetas das portas das salas D202 e D301, da UNIFAL-MG, alça do freezer do LATF-UNIFAL e de luvas que haviam sido utilizadas após um dia de trabalho. As figuras analíticas de mérito validadas foram a seletividade, a robustez, o efeito matriz, a linearidade, os limites de quantificação e detecção, a precisão, a exatidão e a eficiência da extração.

- Seletividade

Segundo ANVISA (2003) e Ribani et al. (2004), a seletividade do método, que avalia a capacidade deste de diferenciar e/ou quantificar os analitos em estudo na presença de interferentes, foi demonstrada pela injeção de seis amostras de *wipe* teste, sem a adição de antineoplásicos, ou seja, amostras “branco”, obtidas sob as condições demonstradas na técnica de limpeza de superfícies (Figura 4), excluindo-se a etapa de contaminação das superfícies. Ainda foi avaliada a pureza de pico, garantindo que os picos cromatográficos fossem exclusivamente dos compostos de interesse.

- Linearidade

O teste de linearidade foi feito de acordo com ANVISA (2003), e reflete a relação entre a resposta do instrumento e a concentração conhecida do analito. Este ensaio foi feito por meio da análise em sextuplicata de soluções-padrão de ciclofosfamida nas concentrações de 5, 10, 25, 50, 80, 150 e 300 ng mL⁻¹, e para doxorubicina, docetaxel e 5-fluoruracila nas concentrações de 10, 25, 50, 80, 150 e 300 ng mL⁻¹. Sendo que a análise estatística dos dados foi obtida pelo método de regressão linear dos mínimos quadrados e expressa pela equação de primeira ordem $y = ax + b$, onde (y) corresponde à resposta medida (área do pico), (x) corresponde à concentração, (a) corresponde ao coeficiente angular, dado pela inclinação da reta, e (b) corresponde ao coeficiente linear, dado pelo ponto de intersecção da reta com o eixo das ordenadas. A faixa linear foi calculada usando o coeficiente de determinação (r^2), com critério mínimo aceitável de $r^2 \geq 0,99$. Porém, cabe ressaltar que para avaliar a linearidade do método, os cálculos da regressão linear não são suficientes, portanto, também realizou-se a análise dos valores dos resíduos da regressão linear. Se esses valores de resíduos estiverem aleatoriamente distribuídos ao longo da linha da regressão, então a linearidade está confirmada (PASCHOAL et al., 2008).

- Limites de quantificação e detecção

O limite de quantificação (LQ), definido como a menor concentração do analito, que pode ser quantificada na amostra, com exatidão e precisão aceitáveis, sob as condições

experimentais adotadas, e o LD, que representa a menor quantidade do analito presente em uma amostra que pode ser detectado, porém não necessariamente quantificado, foram determinados pela curva de acordo com ANVISA (2003), sendo calculados utilizando as seguintes equações:

$$LQ = (10 \times DPb)/a$$

$$LD = (3 \times DPb)/a$$

onde “DPb” é o desvio padrão do intercepto com o eixo y da curva analítica e “a” é a média da inclinação da curva analítica.

- Precisão

A precisão é a avaliação da proximidade dos resultados obtidos por repetidas aferições. E as precisões intra e interdias foram avaliadas, seguindo o guia do INMETRO (2011) e a revisão feita por Ribani et al. (2004), através da análise de soluções-padrão de todos os analitos nas concentrações de 10, 50 e 300 ng mL⁻¹, em sextuplicata e em três dias consecutivos. A precisão pode ser expressa como coeficiente de variação (CV) ou desvio padrão relativo (DPR) das áreas dos picos para cada nível de concentração, não se admitindo valores fora da faixa de ± 15%, exceto para o LQ, para o qual se admite valores iguais ou menores a 20%, segundo a fórmula a seguir:

$$DPR = CV = (\text{desvio padrão} \times 100) / \text{concentração média experimental}$$

- Exatidão

A exatidão reflete a proximidade entre o valor medido e um valor de referência considerado verdadeiro, e relaciona-se com o erro absoluto de uma medida. Neste ensaio, foram avaliadas as exatidões intra e interdias, seguindo o guia do INMETRO (2011) e a revisão feita por Ribani et al. (2004), por meio da análise de soluções-padrão de todos os analitos nas concentrações de 10, 50 e 300 ng mL⁻¹ e de amostras de superfícies adicionadas com quantidades conhecidas dos analitos – 150, 250 e 500 ng –, que equivalem às concentrações de 30, 50, e 100 ng mL⁻¹, analisadas também em sextuplicata, no mesmo dia e em três dias consecutivos. Este ensaio foi avaliado pelo cálculo da concentração de cada amostra, usando a curva analítica que foi feito no mesmo dia, e expressa como erro padrão relativo (EPR), pelo cálculo da diferença entre as concentrações nominal e experimental para cada nível de concentração de cada amostra de controle de qualidade, não se admitindo valores fora da faixa de ± 15%, exceto para o LQ, para o qual se admite valores iguais ou menores a 20%, segundo a fórmula a seguir:

$$\text{EPR} = \frac{((\text{concentração média experimental} - \text{concentração nominal}) \times 100)}{\text{concentração nominal}}$$

- Recuperação

A recuperação que avalia a eficiência do procedimento de extração de um método analítico foi estimada, seguindo-se o guia do INMETRO (2011), pela análise em sextuplicata de amostras de superfícies – espelhos de fechaduras, bancadas e luvas – adicionadas com quantidades conhecidas dos analitos – 150, 250 e 500 ng –, que equivalem às concentrações de 30, 50, e 100 ng mL⁻¹ após extração, sendo que as áreas obtidas de amostras extraídas são comparadas às áreas de soluções-padrão não extraídas, que representam 100% de recuperação. Porcentagens de recuperação próximas a 100% são desejáveis, contudo, admitem-se valores menores, desde que o método seja exato e preciso.

- Robustez

A robustez de um método, que mede a capacidade em resistir a pequenas variações nas condições analíticas, foi determinada, segundo INMETRO (2011), aplicando-se o teste de Youden (INMETRO, 2003), o qual permite não só avaliar a robustez do método, como também a influência de cada parâmetro nos resultados finais. Para este teste, foram realizados oito ensaios com uma combinação fatorial dos efeitos e verificou-se qual o efeito ou combinação de efeitos que apresentaram variações (TABELAS 7 e 8).

Tabela 7 – Parâmetros analíticos e variações para avaliação da robustez do método cromatográfico para quantificação de antineoplásicos

Parâmetros analíticos	Nominal	Variação
	(+)	(-)
Volume de solvente extrator (A)	5,0 mL	5,1 mL
Tempo de banho ultrassônico (B)	30 min	40 min
pH do ácido fórmico (C)	2,7	2,6
Fase móvel inicial do gradiente (D)	70:30	68:32
Forno da coluna (E)	30°C	33°C
Vazão da fase móvel (F)	0,3 mL min ⁻¹	0,27 mL min ⁻¹
Marca da acetonitrila (G)	LiChrosolv [®]	Proquimios [®]

Fonte: Do autor

Notas: (+) = condições nominais; (-) = condições variadas

Tabela 8 – Combinação fatorial dos parâmetros analíticos e fórmula do efeito de variação para avaliação da robustez da metodologia pelo teste de Youden

Parâmetro analítico	Combinação fatorial								Fórmula do efeito de variação
	1	2	3	4	5	6	7	8	
A	+	+	+	+	-	-	-	-	$(a+b+c+d)/4 - (e+f+g+h)/4$
B	+	+	-	-	+	+	-	-	$(a+b+e+f)/4 - (c+d+g+h)/4$
C	+	-	+	-	+	-	+	-	$(a+c+e+g)/4 - (b+d+f+h)/4$
D	+	+	-	-	-	-	+	+	$(a+b+g+h)/4 - (c+d+e+f)/4$
E	+	-	+	-	-	+	-	+	$(a+c+f+h)/4 - (b+d+e+g)/4$
F	+	-	-	+	+	-	-	+	$(a+d+e+h)/4 - (b+c+f+g)/4$
G	+	-	-	+	-	+	+	-	$(a+d+f+g)/4 - (b+c+e+h)/4$
	a	b	c	d	e	f	g	h	

Fonte: Adaptado de INMETRO, 2003

Notas: A = volume de solvente extrator; B = tempo de banho ultrassônico; C = pH do ácido fórmico; D = fase móvel inicial do gradiente; E = forno da coluna; F = vazão da fase móvel; G = marca da acetonitrila; (+) = condições nominais; (-) = condições variadas

- Efeito matriz

De acordo com Cassiano et al. (2009), o efeito matriz deve ser avaliado por adição pós-extração. Para tanto utilizou-se três níveis de calibradores – 30, 60 e 100 ng mL⁻¹ –, em triplicata, sendo calculado pela diferença, que deve ser inferior a 15%, na resposta entre os analitos adicionados ao eluato, obtidos após a extração de *wipe* brancos, e analitos adicionados diretamente na fase móvel. O efeito matriz absoluto (EM) pode ser expresso pela equação abaixo:

$$EM = ((\text{área do analito na amostra pós-extração}) \times 100) / \text{área da solução preparada em solvente}$$

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Em seguida são discutidos os resultados obtidos.

5.1 OTIMIZAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO PARA DETERMINAÇÃO DE ANTINEOPLÁSICOS EM SUPERFÍCIES

O método desenvolvido para determinação simultânea dos antineoplásicos, em superfícies empregou a cromatografia líquida de ultra performance (UHPLC) como técnica de separação, utilizando coluna C18 (100 x 3 mm, 2,2 μm) e pré-coluna similar; e a espectrometria de massas em *tandem* com analisador do tipo triplo quadrupolo, como técnica de detecção. Para a amostragem, empregou o *wipe sampling* e para a extração dos analitos, a técnica escolhida foi a ELL. A seguir, serão apresentados e discutidos os resultados obtidos no presente estudo, que levaram ao desenvolvimento de um método que possibilitou a análise de quatro, dos cinco FAN estudados, em superfícies contaminadas com tais substâncias.

5.1.1 Otimização das condições de espectrometria de massas

A primeira etapa no desenvolvimento do método foi a otimização dos parâmetros de massas para cada fármaco, uma vez que é necessária, inicialmente, a identificação das transições utilizadas para a qualificação e a quantificação dos analitos. Sendo o *electrospray*, a fonte utilizada para ionização dos fármacos antineoplásicos, que possui como vantagens a utilização para qualquer íon formado em solução (\pm); determinação de altas massas moleculares; empregado para compostos voláteis ou não voláteis; e detectabilidade a nível na ordem de traços. O ESI é uma técnica de ionização que gera íons em gotas altamente carregadas a partir de soluções; essas gotas são pulverizadas e um gás quente e/ou seco é aplicado nas gotas para auxiliar na evaporação do solvente; os íons pré-formados são

expelidos das gotas e direcionados para um orifício de entrada para a região de vácuo do analisador triplo quadrupolo (CHIARADIA; COLLINS; JARDIM, 2008).

Como pode ser verificado no Quadro 1, mostrado anteriormente, as substâncias em estudo apresentam diferentes propriedades físico-químicas, além de divergirem quanto ao comportamento, em relação à basicidade ou acidez. O DOC apresenta numerosos grupos funcionais básicos, assim como a CP e o MTX. A DOXO é uma substância anfótera, visto que os grupos fenólicos do anel proporcionam caráter ácido à molécula, enquanto o grupo amino do açúcar, caráter básico. Então, o modo de ionização positivo foi escolhido para esses compostos, sendo as fases móveis preferenciais as de caráter mais ácido, para que ocorra a protonação. Já a molécula de 5-FU apresenta caráter ácido, portanto, o modo negativo foi utilizado para esse analito, para ocorrer a desprotonação. Os modos de operação do ESI selecionados estão de acordo com os trabalhos apresentados nas Tabelas 2 e 3, que determinam esses compostos por LC-MS/MS.

Diferentes modificadores de fase, como o ácido fórmico e o formiato de amônio, assim como fases sem modificação foram testados a fim de avaliar qual seria o melhor solvente para auxiliar na ionização de todos os compostos em estudo. Para isso, foram preparadas soluções a 1000 ng mL^{-1} (1 ppm) de cada fármaco, as quais foram injetadas, num volume de $10 \text{ }\mu\text{L}$, por infusão direta no espectrômetro de massas, seguindo-se as seguintes etapas para a otimização das relações m/z e demais parâmetros de massa:

- a) SCAN: varredura da amostra injetada em um intervalo de massa determinado, para identificar a massa exata de cada analito;
- b) SIM (monitoramento seletivo de íon): análise onde se monitora especificamente um íon ($[\text{M}+\text{H}]^+$, $[\text{M}-\text{H}]^-$ ou um aduto);
- c) MRM ou SRM (monitoramento seletivo de reação): desenvolvimento de uma reação de fragmentação em que, no primeiro quadrupolo seleciona-se o íon precursor, que sofre uma fragmentação na célula de colisão, gerando íons produtos que serão selecionados no terceiro quadrupolo.

Então, para definir o método de ionização e realizar a otimização das condições de MS/MS foram testadas diferentes fases, conforme Tabela 4, mostrada anteriormente. E, como pode ser observado, o agente de ionização ácido fórmico e o sal volátil formiato de amônio foram testados para comparar a influência do pH na ionização. Além disso, o metanol e a acetonitrila, como solvente orgânico, também foram avaliados; porém, quando o metanol foi utilizado, um aumento do ruído da linha de base foi observado.

A mistura de água e metanol nas diferentes proporções testadas não levou à ionização

dos analitos. Além disso, os íons mais intensos para a 5-FU e a CP, no *full scan*, foram os íons 147 m/z e 283 m/z, respectivamente, ou seja, à 5-FU foi adicionada uma molécula de água, enquanto que para a CP, houve formação de um aduto de sódio.

Assim, dentre as fases móveis testadas, aquelas constituídas por ácido fórmico 0,1% em água: acetonitrila (50:50, v/v), ácido fórmico 0,1% em água: metanol (50:50, v/v) e formiato de amônio 10 mmol L⁻¹: acetonitrila (30:70, v/v) foram as que levaram aos resultados mais satisfatórios, em relação às áreas dos picos dos cromatogramas, obtidos no modo SIM, dos precursores de cada analito – 261 m/z, 544 m/z, 455 m/z, 830 m/z e 129 m/z para CP, DOXO, MTX, DOC e 5-FU, respectivamente –, conforme demonstrado na Tabela 9.

Tabela 9 – Áreas dos picos dos íons precursores, obtidas no modo SIM, com alteração da fase móvel para otimização das condições de MS/MS

Analitos	Ácido fórmico 0,1% em água: acetonitrila (50:50, v/v)	Ácido fórmico 0,1% em água: metanol (50:50, v/v)	Formiato de amônio 10 mmol L ⁻¹ : acetonitrila (30:70, v/v)
CP	71052130	65491465	125652128
DOC	6854374	20779134	17514792
DOXO	132905047	108047402	245792557
MTX	99752150	117162407	24960107
5-FU	691197	-	2147278

Fonte: Do autor

A fase constituída por formiato de amônio 10 mmol L⁻¹: acetonitrila (30:70, v/v) foi a que levou a uma melhor eficiência na ionização para todos os analitos em estudo, apresentando três íons produtos para todos os fármacos (Tabela 10), proporcionando assim uma maior confiabilidade na identificação das substâncias.

Tabela 10 – Parâmetros otimizados para MS/MS, com a fase móvel formiato de amônio 10 mmol L⁻¹: acetonitrila (30:70, v/v), para os antineoplásicos estudados

Analito	Modo ESI	Íon precursor (m/z)	Íons produtos (m/z)	CE (V)
CP	+	261,0	140,0	25
			120,0	25
			106,0	25
DOC	+	830,3	549,0	25
			304,0	25
			248,0	25
			396,9	15
DOXO	+	544,1	378,8	20
			130,2	20

(continua)

Tabela 10 – Parâmetros otimizados para MS/MS, com a fase móvel formiato de amônio 10 mmol L⁻¹: acetonitrila (30:70, v/v), para os antineoplásicos estudados

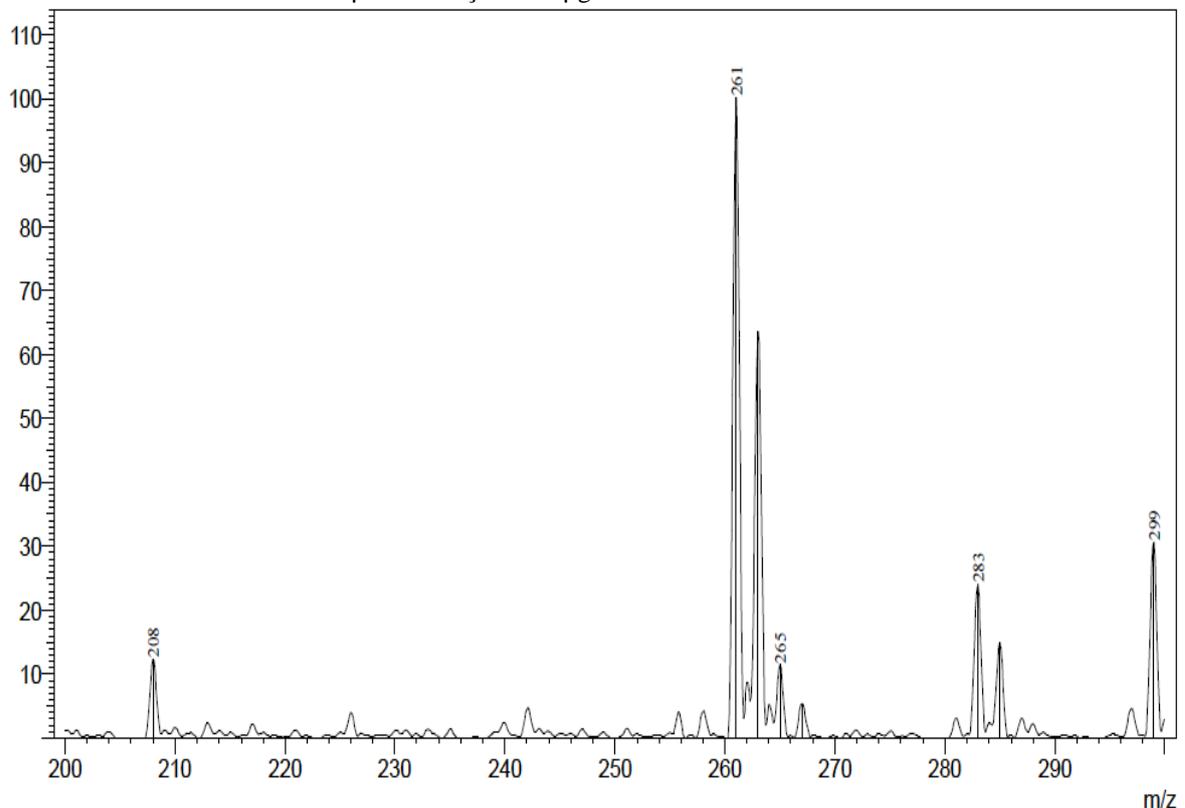
Analito	Modo ESI	Íon precursor (m/z)	Íons produtos (m/z)	(conclusão)
				CE (V)
MTX	+	455,1	308,0	20
			175,0	45
			133,9	35
5-FU	-	129,1	86,0	20
			42,1	20
			59,1	20

Fonte: Do autor

Notas: + = modo positivo de ionização; - = modo negativo de ionização; CE= energia de colisão

A partir da análise preliminar dos espectros de massas dos íons precursores e produtos de CP (Figuras 5 e 6), DOC (Figuras 7 e 8), DOXO (Figuras 9 e 10), MTX (Figuras 11 e 12) e 5-FU (Figuras 13 e 14), uma transição m/z foi escolhida para a quantificação destes: 261,0 > 140,0 m/z para a CP, 830,3 > 304,0 m/z para o DOC, 544,1 > 396,9 m/z para a DOXO, 455,1 > 308,0 para o MTX e 129,1 > 42,1 m/z para a 5-FU.

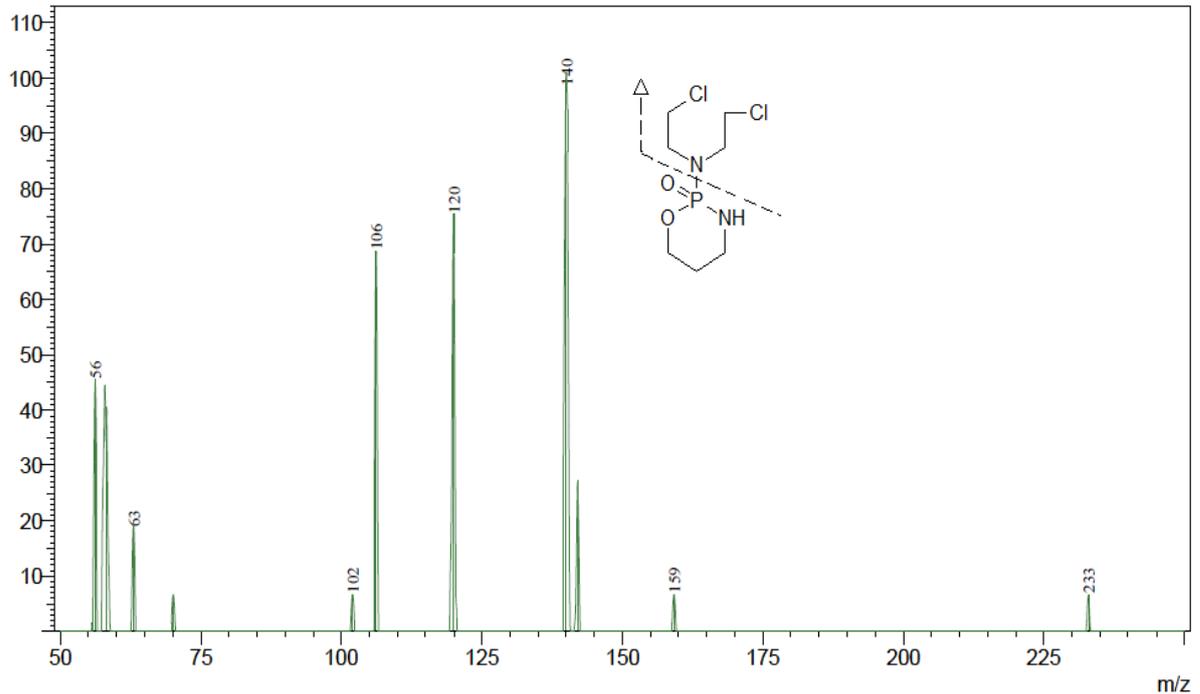
Figura 5 – Espectro de massas do íon precursor da ciclofosfamida no modo de ionização positivo, obtido por infusão direta de 10 µL da solução de 1 µg mL⁻¹



Fonte: Do autor

Notas: Fase móvel: formiato de amônio 10 mmol L⁻¹: acetonitrila (30:70, v/v); vazão: 0,3 mL min⁻¹

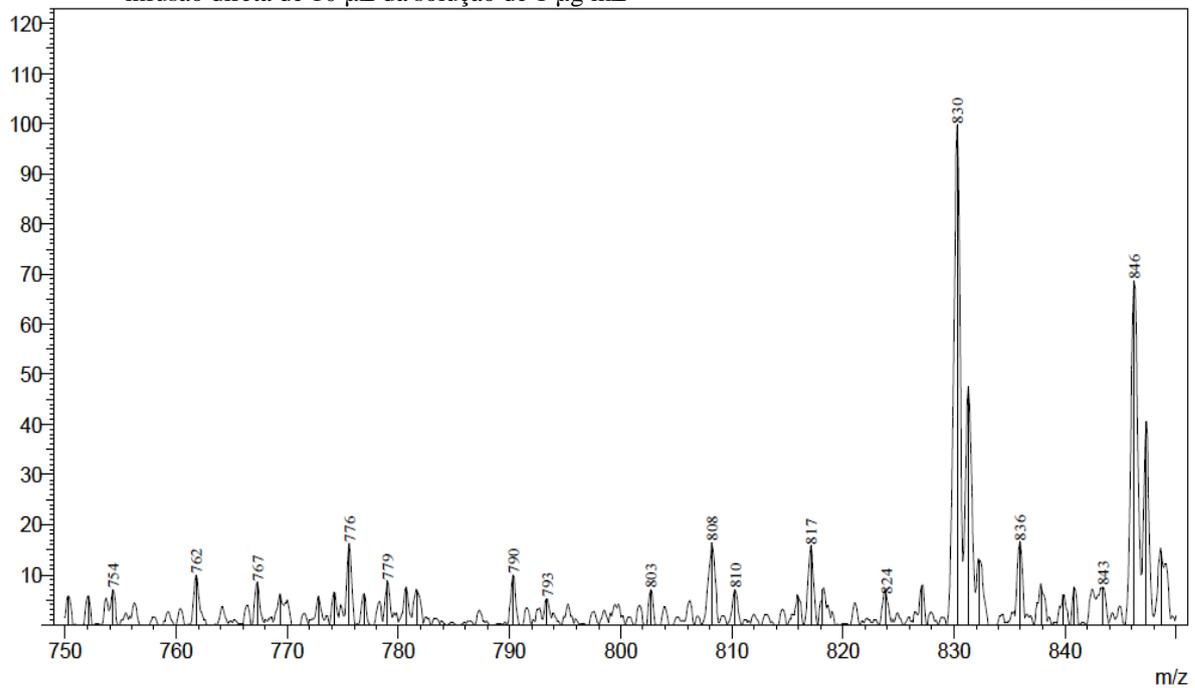
Figura 6 – Espectro de massas dos íons produzidos da ciclofosfamida, e a representação da transição 261 > 140 m/z, obtido por infusão direta de 10 µL da solução de 1 µg mL⁻¹



Fonte: Do autor

Notas: Fase móvel = formiato de amônio 10 mmol L⁻¹; acetonitrila (30:70, v/v); vazão = 0,3 mL min⁻¹

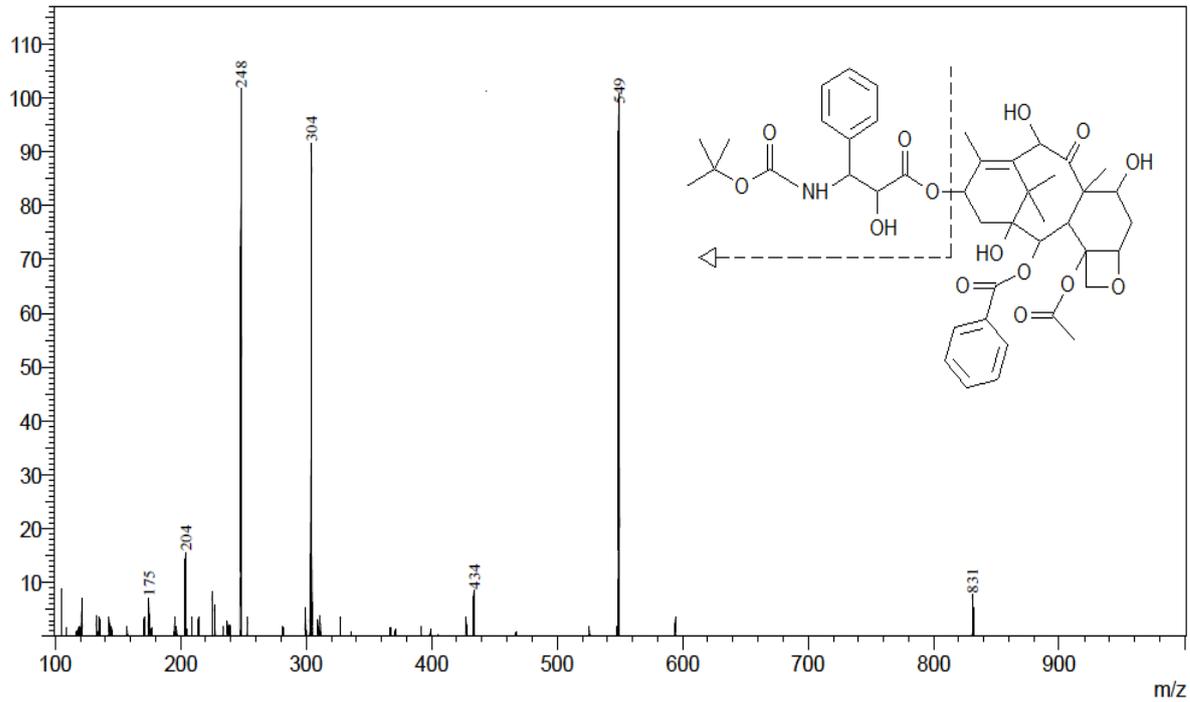
Figura 7 – Espectro de massas do íon precursor do docetaxel no modo de ionização positivo, obtido por infusão direta de 10 µL da solução de 1 µg mL⁻¹



Fonte: Do autor

Notas: Fase móvel = formiato de amônio 10 mmol L⁻¹; acetonitrila (30:70, v/v); vazão = 0,3 mL min⁻¹

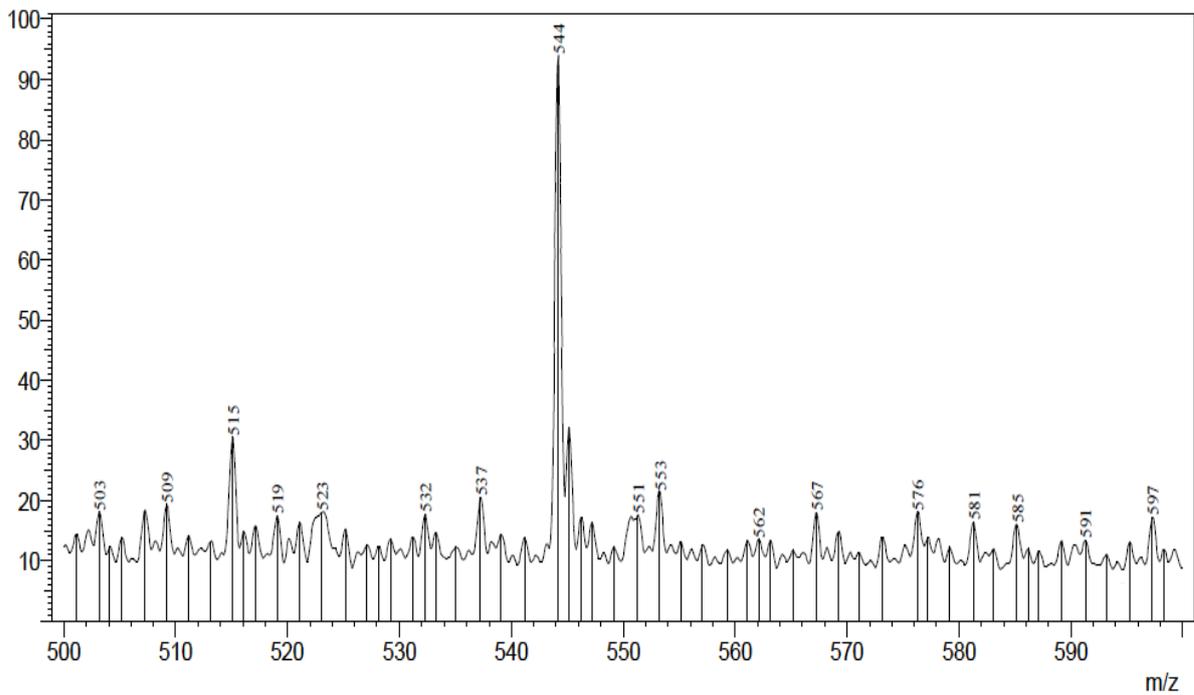
Figura 8 – Espectro de massas dos íons produtos do docetaxel, e a representação da transição 830 > 304 m/z, obtido por infusão direta de 10 µL da solução de 1 µg mL⁻¹



Fonte: Do autor

Notas: Fase móvel = formiato de amônio 10 mmol L⁻¹: acetonitrila (30:70, v/v); vazão = 0,3 mL min⁻¹

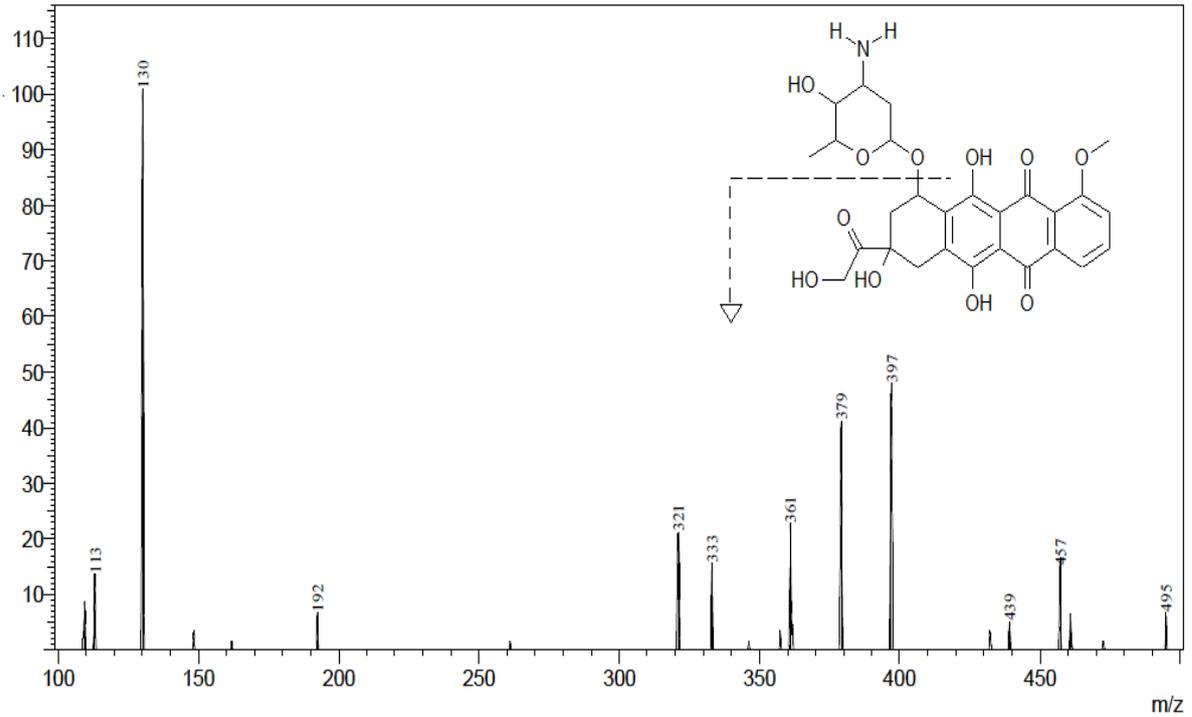
Figura 9 – Espectro de massas do íon precursor da doxorubicina no modo de ionização positiva, obtido por infusão direta de 10 µL da solução de 1 µg mL⁻¹



Fonte: Do autor

Notas: Fase móvel = formiato de amônio 10 mmol L⁻¹: acetonitrila (30:70, v/v); vazão = 0,3 mL min⁻¹

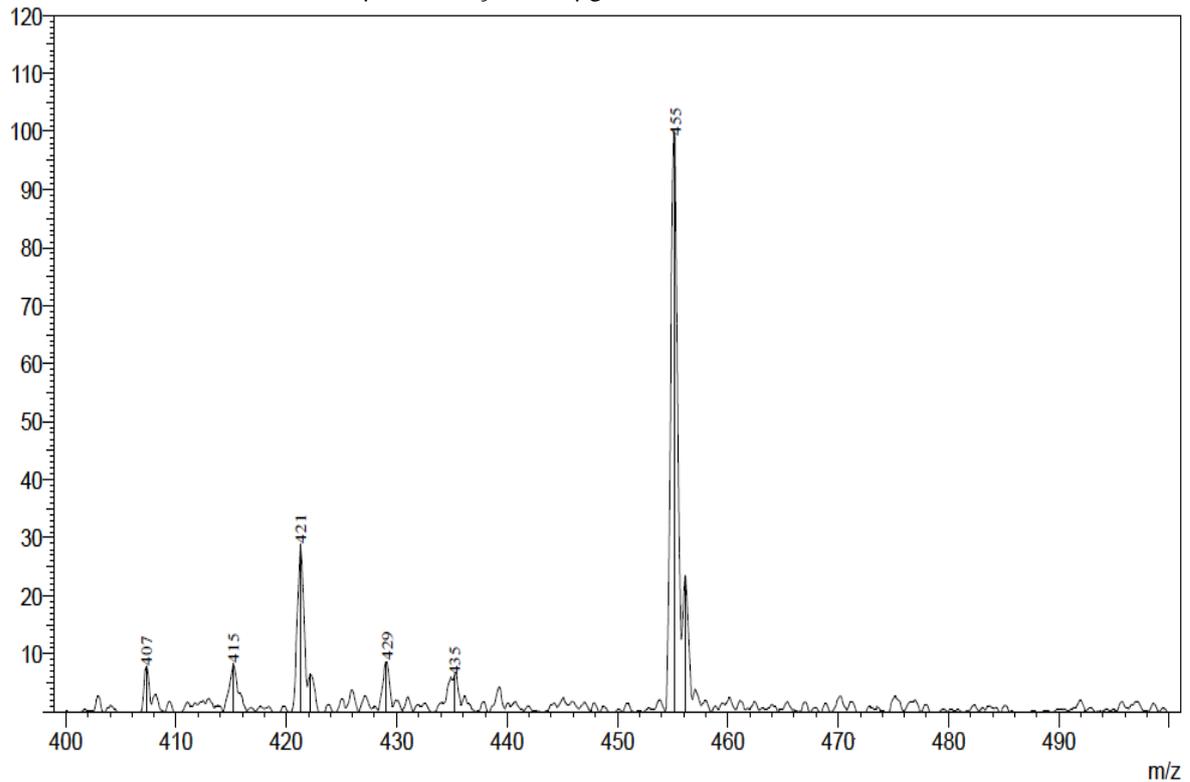
Figura 10 – Espectro de massas dos íons produtos da doxorubicina, e a representação da transição 544 > 397 m/z, obtido por infusão direta de 10 µL da solução de 1 µg mL⁻¹



Fonte: Do autor

Notas: Fase móvel = formiato de amônio 10 mmol L⁻¹: acetonitrila (30:70, v/v); vazão = 0,3 mL min⁻¹

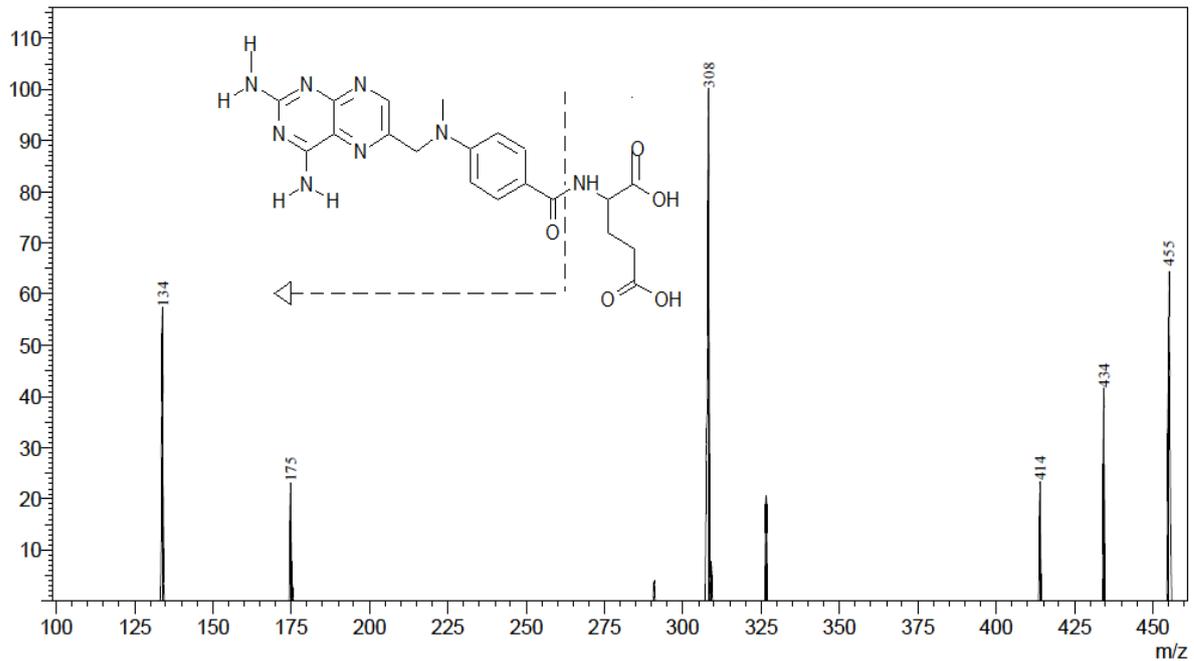
Figura 11 – Espectro de massas do íon precursor do metotrexato no modo de ionização positivo, obtido por infusão direta de 10 µL da solução de 1 µg mL⁻¹



Fonte: Do autor

Notas: Fase móvel = formiato de amônio 10 mmol L⁻¹: acetonitrila (30:70, v/v); vazão = 0,3 mL min⁻¹

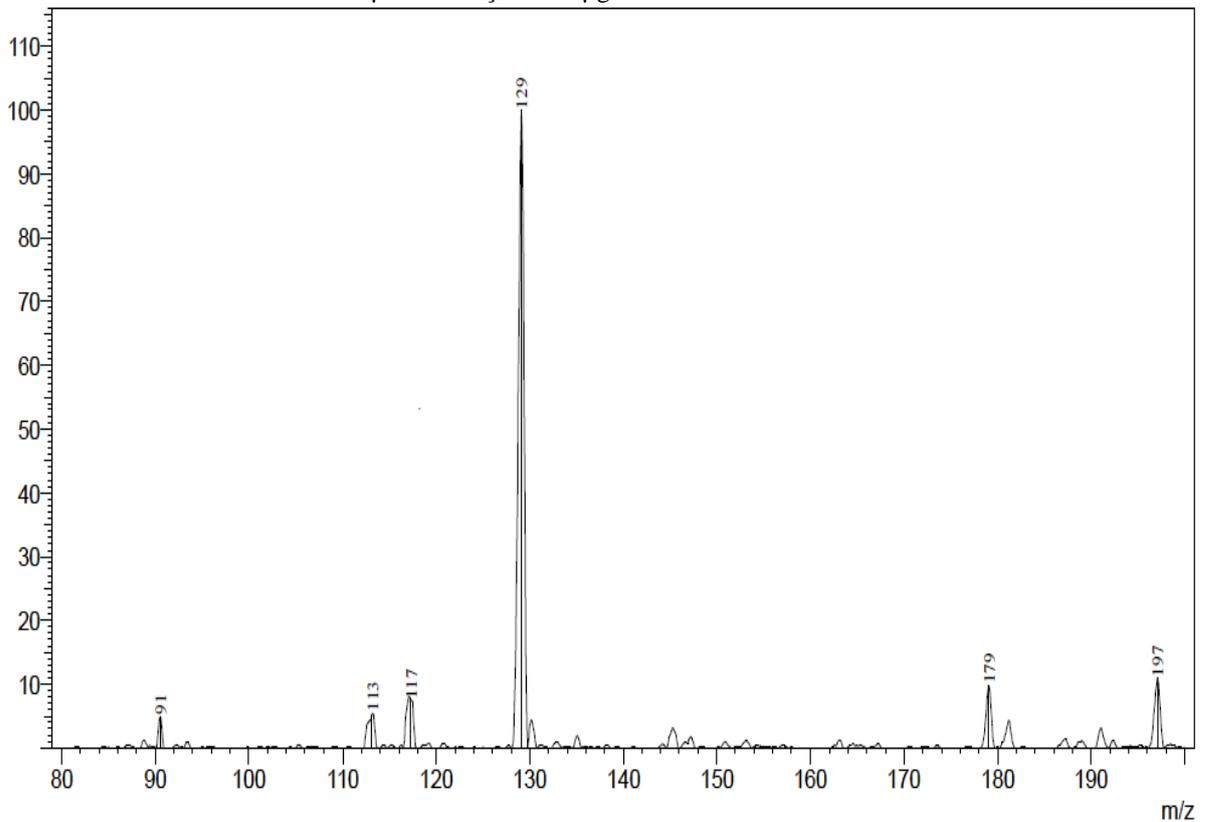
Figura 12 – Espectro de massas dos íons produtos do metotrexato, e a representação da transição 455 > 308 m/z, obtido por infusão direta de 10 µL da solução de 1 µg mL⁻¹



Fonte: Do autor

Notas: Fase móvel = formiato de amônio 10 mmol L⁻¹: acetonitrila (30:70, v/v); vazão = 0,3 mL min⁻¹

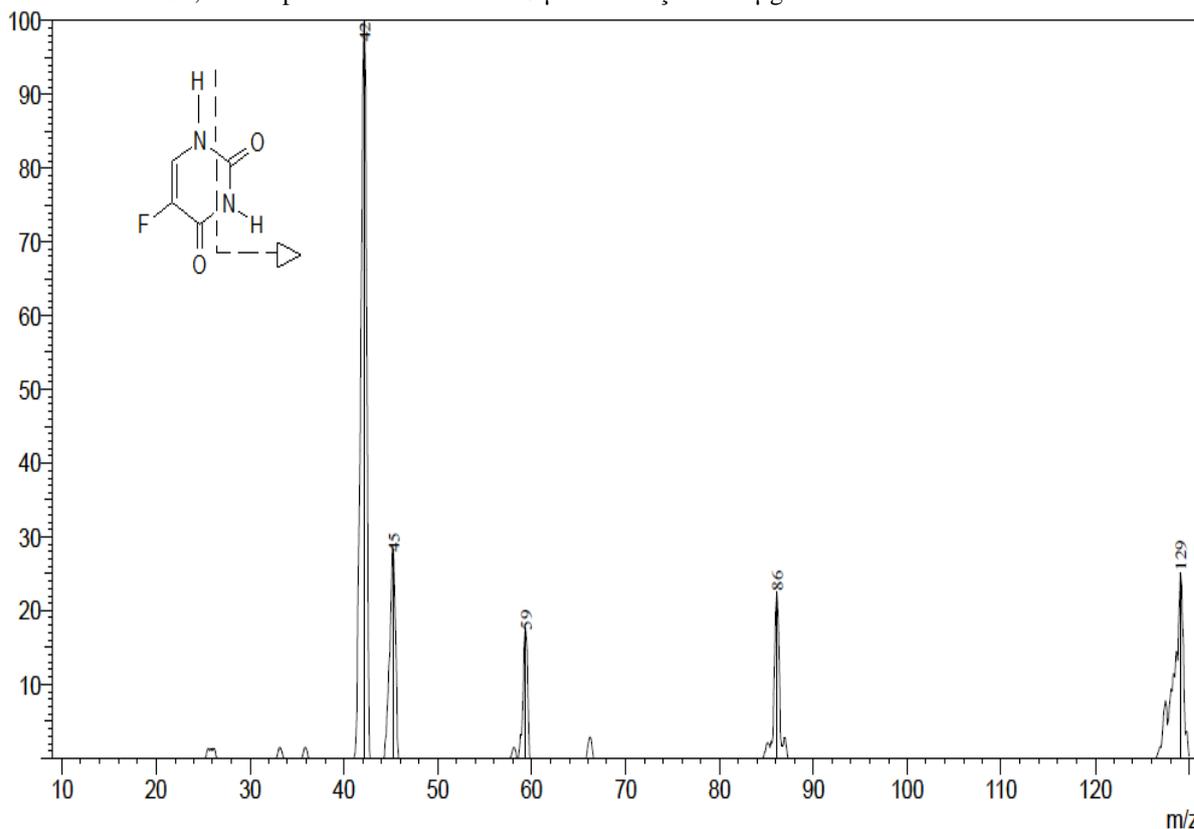
Figura 13 – Espectro de massas do íon precursor da 5-fluoruracila no modo de ionização negativo, obtido por infusão direta de 10 µL da solução de 1 µg mL⁻¹



Fonte: Do autor

Notas: Fase móvel = formiato de amônio 10 mmol L⁻¹: acetonitrila (30:70, v/v); vazão = 0,3 mL min⁻¹

Figura 14 – Espectro de massas dos íons produtos da 5-fluoruracila, e a representação da transição 129 > 42 m/z, obtido por infusão direta de 10 µL da solução de 1 µg mL⁻¹



Fonte: Do autor

Notas: Fase móvel = formiato de amônio 10 mmol L⁻¹; acetonitrila (30:70, v/v); vazão = 0,3 mL min⁻¹

Os íons precursores selecionados foram obtidos por adição (modo positivo) ou perda (modo negativo) de um hidrogênio e estão de acordo com as massas moleculares, as quais podem ser observadas no Quadro 1, com exceção do docetaxel, cujo íon de maior intensidade foi um aduto de sódio $[M+Na]^+$, o que não seria esperado, uma vez que a fase móvel utilizada não promove esse tipo de reação. Assim, esses resultados somente podem ser explicados, por uma contaminação do sal, utilizado como padrão.

Segundo Corona et al. (2011), diferentes autores têm reportado adutos alcalinos, principalmente os adutos cationizados de sódio, como mais intensos que a forma pseudomolecular, e sugerem que as transições com esses adutos devem ser exploradas com intuito de obter uma melhor sensibilidade, para o analito DOC. Contudo, os autores obtiveram o íon $[M+H]^+$ como o mais proeminente, que segundo eles foi devido a composição do eluente e vazão da FM. Em controvérsia, métodos desenvolvidos por Fernández-Peralbo et al. (2014), Grozav et al. (2004), Zhang et al. (2011), utilizando a mesma constituição de FM, ácido fórmico, como agente ionizante, e acetonitrila, como solvente orgânico, monitoraram o íon 830 m/z como íon precursor do DOC, assim como

feito no presente trabalho. Mortier et al. (2005) relataram a presença de adutos de sódio que foram controlados pela otimização da fase móvel, empregando aditivos, tais como ácido acético e acetato de amônio, que ajudaram a promover a formação de $[M+H]^+$.

A transição $261 > 140$ m/z é monitorada em todos os trabalhos publicados que determinam CP (BARBIERI et al., 2006; FERRANDO-CLIMENT; RODRIGUEZ-MOZAZ; BARCELÓ, 2013; NUSSBAUMER et al., 2010; SABATINI et al., 2005; SOTTANI et al., 2005; SOTTANI et al., 2007; SOTTANI et al., 2008), como pode ser analisado na Tabela 11, sendo essa a transição que permitiu detectabilidade adequada, para a finalidade do estudo, o que é requerido por estes métodos. As energias de colisão variam num intervalo de 5 a 31V, sendo que Ferrando-Climent; Rodriguez-Mozaz; Barceló (2013), cuja FM é composta por ácido fórmico 0,1% em água e acetonitrila, monitoram as transições $261 > 140$ m/z e $261 > 106$ m/z, que são duas daquelas monitoradas no presente trabalho. Martins; Della Rosa; Apostoli (2004), cujo método está apresentado na Tabela 2, determinam a CP por GC-MS, em superfícies de bolsas de infusão, sendo necessária a derivatização com anidrido trifluoroacético, apresentando a desvantagem de ser uma etapa morosa, com baixas repetibilidade e reprodutibilidade, além da maioria dos agentes de derivatização serem substâncias irritantes, podendo levar a efeitos tóxicos aguda e cronicamente.

Tabela 11 – Transições m/z e energias de colisão encontradas na literatura para a CP

Transição m/z	CE (V)	Referência
261,0 > 140,0	31	SABATINI et al. (2005) SOTTANI et al. (2005) BARBIERI et al. (2006)
261,0 > 140,0	5	SOTTANI et al. (2007)
261,0 > 140,0	5	SOTTANI et al. (2008)
261,0 > 233,0		
261,0 > 92,3	20	NUSSBAUMER et al. (2010)
261,0 > 140,2	20	
261,0 > 154,1	20	
261,0 > 232,9	20	
261,0 > 140,0	31	FERRANDO-CLIMENT; RODRIGUEZ-MOZAZ;
261,0 > 106,0	25	BARCELÓ (2013)

Nota: CE = energia de colisão

A Tabela 12 apresenta as transições monitoradas para o analito DOC e suas respectivas energias de colisão, que variam de 10 a 34V. No presente estudo, a CE otimizada é semelhante àquela utilizada no estudo de Fernández-Peralbo et al. (2014), os quais utilizaram como FM um gradiente de ácido fórmico 0,1% em água e acetonitrila. Nos

métodos, apresentados na Tabela 3, desenvolvidos por Corona et al. (2011), Ferrando-Climent; Rodriguez-Mozaz; Barceló (2013), Hendrikx et al. (2011), Mortier et al. (2005) e Yamaguchi et al. (2012), as transições monitoradas são semelhantes às obtidas nesse estudo, se não considerarmos o aduto de sódio. Enquanto Fernández-Peralbo et al. (2014) e Zhang et al. (2011) também quantificam o DOC pela transição 830 > 304 m/z.

Tabela 12 – Transições m/z e energias de colisão encontradas na literatura para o DOC

Transição m/z	CE (V)	Referência
808,4 > 226,1	17	MORTIER et al. (2005)
808,4 > 526,9	15	
808,3 > 527,2	15	ZHANG et al. (2010)
808,2 > 527,0	12	CORONA et al. (2011)
808,0 > 527,0	15	HENDRIKX et al. (2011)
830,4 > 304,1	34	ZHANG et al. (2011)
808,0 > 527,0	15	YAMAGUCHI et al. (2012)
808,0 > 509,0	17	FERRANDO-CLIMENT; RODRIGUEZ-MOZAZ; BARCELÓ (2013)
808,4 > 527,3	10	LIAN; SUN; ZHANG (2013)
830,0 > 304,0	20	FERNÁNDEZ-PERALBO et al. (2014)

Nota: CE = energia de colisão

Sottani et al. (2008), Nussbaumer et al. (2010) e Sottani et al. (2013) desenvolveram métodos para análise da DOXO, como observado na Tabela 2, e dentre as transições encontradas para essa substância (Tabela 13), aquelas monitoradas por Nussbaumer et al. (2010), os quais otimizaram as condições de espectrometria de massas por infusão direta da solução-padrão do fármaco, numa concentração de 1 ppm diluído em água: ácido fórmico 0,1% em metanol (50:50, v/v), são as mesmas otimizadas neste estudo, assim como a CE utilizada para fragmentação para obter o íon produto 397 m/z, cujo monitoramento é feito para quantificação deste analito.

Tabela 13 – Transições m/z e energias de colisão encontradas na literatura para a DOXO

Transição m/z	CE (V)	Referência
544,0 > 361,0	5	SOTTANI et al. (2008)
544,0 > 397,0	5	
544,6 > 379,2	15	NUSSBAUMER et al. (2010)
544,6 > 397,1	15	
544,0 > 361,0	20	SOTTANI et al. (2013)
544,0 > 397,0	4	

Nota: CE = energia de colisão

A transição $455 > 308$ m/z é monitorada por todos os estudos que analisam o MTX, de acordo com a Tabela 14, cujos métodos estão resumidos na Tabela 2. Ferrando-Climent; Rodriguez-Mozaz; Barceló (2013) e Rodin et al. (2013), assim como otimizado neste trabalho, utilizam também a transição $455 > 175$ m/z para identificação deste analito, sendo necessária uma maior CE para obtenção dessa fragmentação.

Tabela 14 – Transições m/z e energias de colisão encontradas na literatura para o MTX

Transição m/z	CE (V)	Referência
455,0 > 308,0	28	SABATINI et al. (2005)
455,0 > 308,0	28	BARBIERI et al. (2006)
455,0 > 308,0	20	NUSSBAUMER et al. (2010)
455,0 > 308,0	27	FERRANDO-CLIMENT;
455,0 > 175,0	57	RODRIGUEZ-MOZAZ;
		BARCELÓ (2013)
455,6 > 308,4	23	RODIN et al. (2013)
455,6 > 175,3	40	

Nota: CE = energia de colisão

A transição $129 > 42$ m/z é monitorada para a 5-FU por todos os trabalhos apresentados na Tabela 2, conforme Tabela 15, e as energias de colisão otimizadas estão num intervalo de 13 a 32V, sendo a CE obtida por Sabatini et al. (2005) e Carli et al. (2009) a que mais se aproxima da otimizada para essa fragmentação.

Tabela 15 – Transições m/z e energias de colisão encontradas na literatura para a 5-FU

Transição m/z	CE (V)	Referência
129,0 > 42,0	32	PISANO et al. (2005)
128,8 > 41,9	30	REMAUD et al. (2005)
129,0 > 42,0	25	SABATINI et al. (2005)
129,0 > 42,0	25	CARLI et al. (2009)
128,7 > 41,4	13	PEER et al. (2012)

Nota: CE = energia de colisão

5.1.2 Otimização das condições cromatográficas

Na etapa seguinte, as condições cromatográficas foram otimizadas. A escolha da fase móvel, na cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas, é muitas vezes uma opção entre a fase que permite a ionização dos analitos, obtendo a seletividade e detectabilidade necessárias, e o que dá a melhor separação entre os componentes de uma amostra, seja entre diferentes analitos ou entre o analito e os interferentes. Porém, ao utilizar

a espectrometria de massas em *tandem*, o fator separação não é crítico, pois essa técnica permite a detecção individual dos analitos, uma vez que os compostos são analisados em canais diferentes, além de apresentarem massas molares e perfis de fragmentação distintos. Contudo, optou-se por testar diferentes gradientes de eluição com a finalidade de obter métodos mais rápidos, o que é requerido no monitoramento da exposição ocupacional, se o número de amostras a ser analisado for alto.

Para a otimização das condições cromatográficas foram realizados diversos testes com diferentes composições e gradientes, os quais se encontram resumidos na Tabela 5, na qual pode ser observado que os modos isocrático e gradiente, os solventes orgânicos, acetonitrila e metanol, a influência do pH da fase móvel e a presença, ou não, de modificadores foram testados, a fim de obter um melhor desempenho analítico, em termos de detectabilidade.

Testando-se a mistura constituída de formiato de amônio 10 mmol L^{-1} e metanol, em condições de eluição isocrática, observou-se baixa resolução entre os picos das transições $261,0 > 140,0 \text{ m/z}$, $544,1 > 396,9 \text{ m/z}$, $455,1 > 308,0 \text{ m/z}$, $830,3 > 304,0 \text{ m/z}$, $129,1 > 42,1 \text{ m/z}$ dos analitos CP, DOXO, MTX, DOC e 5-FU, respectivamente, o que seria um parâmetro determinante se o detector utilizado não fosse um espectrômetro de massas. Quando a proporção de metanol foi aumentada de 80 para 90%, houve diminuição do tempo de retenção do DOC e um aumento das áreas obtidas, conforme amostrado na Tabela 16, porém ocorreu a quebra do pico da DOXO. Ao aumentar a porcentagem de fase aquosa para 80%, não houve ionização das moléculas. Trocando-se o solvente orgânico metanol por acetonitrila, o formato dos picos não foi adequado, uma vez que houve quebra dos picos da 5-FU e do DOC e alargamento do pico da DOXO. Além disso, essas fases não permitiram uma análise eficiente do MTX, pois a base do pico se estendeu por 3 minutos.

Tabela 16 – Resultados referentes ao cromatograma de íon total dos picos dos íons precursores da CP, do DOC, da DOXO e da 5-FU, obtidos por diferentes proporções de formiato de amônio 10 mmol L^{-1} e metanol

Analito	Formiato de amônio 10 mmol L⁻¹: metanol (20:80, v/v)	Formiato de amônio 10 mmol L⁻¹: metanol (10:90, v/v)
CP	402079649	413382968
DOXO	2918158	18776315
5-FU	39722305	50437868
DOC	4467726	8178267

Fonte: Do autor

Pelos testes realizados, pôde-se observar que ao utilizar uma alta proporção de solvente orgânico, como nos ensaios de 100% acetonitrila ou metanol, os compostos não foram separados, apresentando assim o mesmo tempo de retenção (eluição em torno de 2,3 minutos). Além disso, a acetonitrila pura resultou em picos quebrados; enquanto o metanol puro apresentou resultados satisfatórios apenas para a CP e a 5-FU, tanto em relação à área quanto ao formato dos picos.

O gradiente de eluição e a fase móvel – água e acetonitrila: metanol (70:30, v/v) –, otimizados por Tsume; Provoda; Amidon (2011), os quais desenvolveram método de LC-MS para determinação de 5-FU e outros compostos, foram testados, porém não houve eluição dos analitos.

Com base no método desenvolvido por Sabatini et al. (2005), os quais analisaram a CP, o MTX e a 5-FU em superfícies, foi testada a fase móvel constituída de acetato de amônio 20 mM (pH 4,0) (A) e metanol (B), utilizando o seguinte gradiente de eluição: após 1 minuto em modo isocrático, a proporção de B foi aumentada de 15 a 50%, em 0,5 minuto; e de 50 a 65%, em 15 minutos; seguido de um declínio de 65 a 15%, em 0,5 minuto, permanecendo em condições isocráticas, por 8 minutos, para restabelecer o equilíbrio da coluna. Foram testadas também pequenas modificações deste método, tais como apresentados na Tabela 5. Esses ensaios permitiram a análise apenas do MTX e da CP, sendo que os demais analitos não foram eluídos.

Ferrando-Climent; Rodriguez-Mozaz; Barceló (2013), que também determinaram os antineoplásicos CP, MTX e DOC, testaram diferentes modificadores de fase móvel, como o acetato de amônio 5 mmol L⁻¹ (pH 7,0), o formiato de amônio 5 mmol L⁻¹ (pH 3,0), e o ácido fórmico 0,1% (pH 2,8), utilizando a acetonitrila como solvente orgânico. Dentre esses, o ácido fórmico 0,1% (pH 2,8) foi o escolhido pelos autores, uma vez que os resultados obtidos foram satisfatórios em termos de formato de pico, resolução e detectabilidade.

Hendrikx et al. (2011), os quais desenvolveram método para o DOC em plasma, empregando LC-MS/MS, relatam a utilização de ácido fórmico 0,1% (pH 2,7) e hidróxido de amônio 10 mmol L⁻¹, em diferentes pH (8-10) e metanol como fase orgânica. Os autores otimizaram a fase móvel constituída por hidróxido de amônio 10 mmol L⁻¹ (pH 10): metanol (30:70, v/v) para tal análise.

Em estudo conduzido por Nussbaumer et al. (2010), uma separação cromatográfica de 10 analitos, num tempo total de corrida de 21 minutos, foi obtida aplicando-se um gradiente de eluição de água e acetonitrila na presença de 0,1% de ácido fórmico, com uma vazão de 0,2 mL min⁻¹. A bomba utilizada era quaternária, enquanto o equipamento LCMS-

8030 apresenta uma bomba binária, sendo necessária uma modificação em seu programa de eluição, como o apresentado na Tabela 17.

Tabela 17 – Programa do gradiente de eluição testado, com base no estudo desenvolvido por Nussbaumer et al. (2010)

Tempo (min)	Ácido fórmico 0,1% em água (%)	Acetonitrila (%)
0	98	2
2,0	98	2
2,5	79	21
10	79	21
13	70	30
13,5	50	50
15,5	50	50
16	98	2
21	98	2

Fonte: Do autor

Assim, após extensa revisão da literatura, vários testes realizados e com base nos dados de Nussbaumer et al. (2010), a fase móvel escolhida foi a constituída por ácido fórmico 0,1% em água e acetonitrila, que foi a que apresentou o melhor desempenho cromatográfico, quanto à forma, área e intensidade dos picos das transições de quantificação. Para uma melhor eficiência cromatográfica, a proporção de fase móvel foi testada nos modos isocrático e gradiente, sendo que a eluição em gradiente, que pode ser observada na Tabela 18, permitiu a separação dos analitos, com um menor tempo de retenção, diminuindo assim o tempo de corrida total, para 15 minutos. E, assim como feito pelos autores, foi realizada uma lavagem da agulha com acetonitrila 5% em água após cada injeção.

Tabela 18 – Programa de eluição em gradiente empregado no presente estudo

Tempo (min)	Ácido fórmico 0,1% em água (%)	Acetonitrila (%)
0	70	30
2,0	70	30
7,0	50	50
9,0	20	80
15,0	70	30

Fonte: Do autor

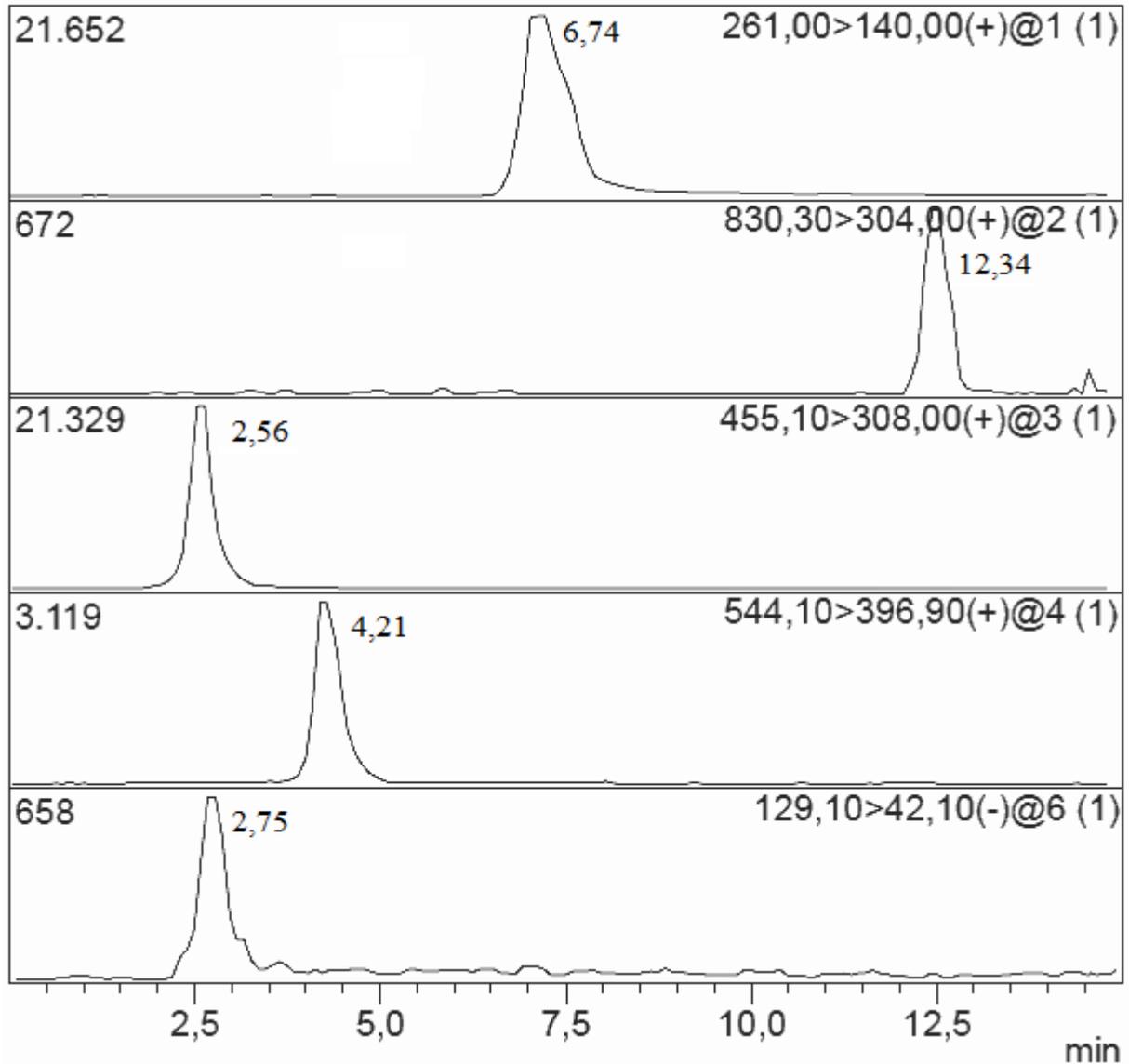
Diferentes volumes de injeção – 10, 25, 50, 75 e 100 μL – e vazão de fase móvel – 0,1 mL min^{-1} , 0,2 mL min^{-1} e 0,3 mL min^{-1} – foram testados. Os maiores volumes de 75 e 100 μL , assim como as vazões de 0,1 e 0,2 mL min^{-1} levaram ao efeito de alargamento de picos, com baixa eficiência. Já, o volume de 10 a 25 μL resultou em picos mais estreitos, no entanto não foi possível detectar baixas concentrações. Portanto, o volume de injeção e a vazão da fase móvel escolhidos foram de 50 μL e 0,3 mL min^{-1} , respectivamente, os quais permitiram detectabilidade suficiente para a determinação dos analitos em amostras de superfícies.

Assim, as condições cromatográficas otimizadas foram:

- a) Pré coluna Shim-pack[®] G-ODS C18 (10 x 4 mm, 5 μm);
- b) Coluna Shim-pack[®] XR-ODS C18 (100 x 3 mm, 2,2 μm);
- c) Fase móvel: ácido fórmico 0,1% em água (A): acetonitrila (ACN) (B), utilizando o seguinte gradiente: após 2 min de eluição isocrática, o solvente B foi aumentado de 30 a 50%, em 5 min, e, após esse tempo, foi aumentado para 80%, em 2 min. Finalmente, a proporção de B foi reduzida de 80 a 30%, em 6 min, restabelecendo as condições iniciais do sistema. O tempo total de corrida foi de 15 min;
- d) Volume de injeção: 50 μL ;
- e) Vazão da fase móvel: 0,3 mL min^{-1} ;
- f) Temperatura da coluna: 30 $^{\circ}\text{C}$;
- g) Tempos de retenção médio: 2,5 min para o MTX; 2,7 min para a 5-FU; 4,2 para a DOXO; 6,7 min para a CP e 12,3 min para o DOC.

Na Figura 15, pode ser observado o cromatograma obtido nessas condições otimizadas.

Figura 15 – Cromatograma, obtido no modo MRM, de uma solução-padrão, contendo CP (261,0>140,0 m/z), DOC (830,3>304,0 m/z), DOXO (544,1>396,9 m/z), MTX (455,1>308,0 m/z) e 5-FU (129,1>42,1 m/z), na concentração de 75 ng mL⁻¹



Fonte: Do autor

Notas: Coluna = Shim-pack® XR-ODS C18 (100 x 3 mm, 2,2 µm) protegida por uma pré-coluna Shim-pack® G-ODS C18 (10 x 4 mm, 5 µm); fase móvel = ácido fórmico 0,1% e acetonitrila em gradiente reportado na Tabela 18; vazão = 0,3 mL min⁻¹; volume de injeção = 50 µL; temperatura do forno = 30°C

5.1.3 Otimização da técnica de preparo de amostras

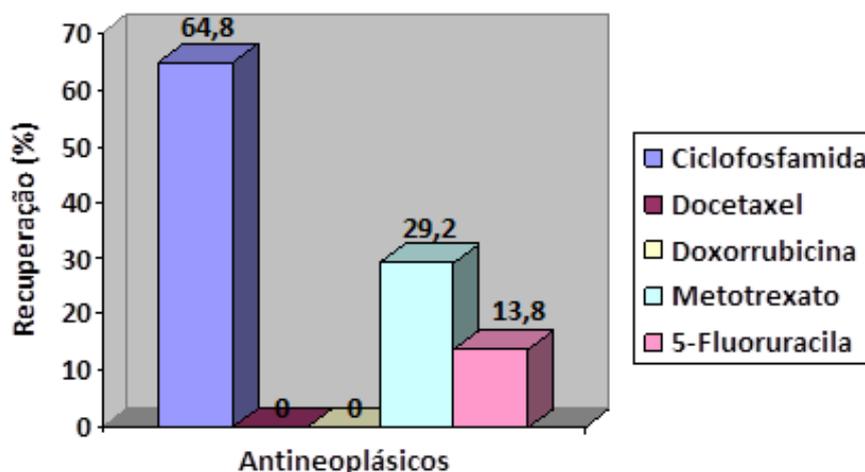
O método para análise de antineoplásicos em superfícies foi realizado com prévio preparo de amostras, sendo que diferentes soluções e solventes extratores – ácido fórmico 0,1% em água, acetonitrila pura, ácido fórmico 0,1%: acetonitrila (7:3, v/v) e acetato de etila: metanol (2:1, v/v) – foram testados, utilizando o protocolo de amostragem de superfícies, tipo

wipe sampling, descrito na seção experimental desse estudo e apresentado na Figura 4.

Esse protocolo foi estabelecido a partir de modificações feitas na técnica descrita por Nussbaumer et al. (2010), no qual os autores contaminaram superfícies de aço inoxidável para obter a concentração de 250 ng wipe⁻¹ dos fármacos avaliados, sendo que as superfícies foram limpas com filtros (Whatman 903[®]), os quais foram transferidos para frascos de vidros com 5 mL de ácido fórmico 0,1%, e mantidos por 15 minutos em banho ultrassônico. As porcentagens de recuperação obtidas, por esses autores, para MTX, CP e DOXO foram de 67, 85 e 25%, respectivamente.

Assim, foi testado o ácido fórmico 0,1%, como solução extratora. Os resultados de recuperação, para os fármacos em estudo, realizando-se a limpeza das superfícies, após contaminação de seis superfícies de espelho de fechaduras, para obter a concentração de 250 ng wipe⁻¹, que equivale a concentração de 50 ng mL⁻¹ após a extração, no presente método, podem ser observados na Figura 16.

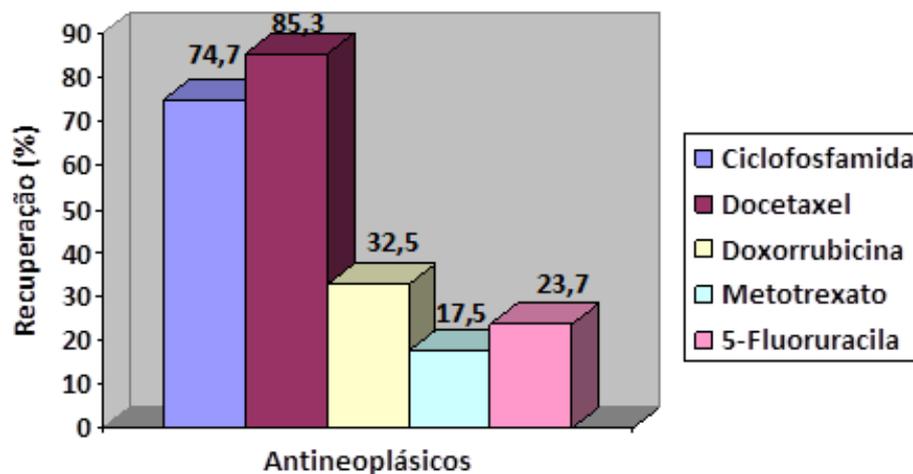
Figura 16 – Recuperação obtida para CP, DOC, DOXO, MTX e 5-FU, utilizando ácido fórmico 0,1% em água como solvente extrator



Fonte: Do autor

As recuperações obtidas para os analitos MTX e CP foram inferiores às obtidas por Nussbaumer et al. (2010) e não houve recuperação para a DOXO e o DOC. Portanto, outros solventes e outras soluções extratoras foram testados, como a acetonitrila pura, que é o solvente orgânico utilizado na fase móvel, porém os resultados não foram satisfatórios, uma vez que somente foram recuperados 4,1% de CP. Ao testar a solução constituída de ácido fórmico 0,1%: acetonitrila (7:3, v/v), a qual é utilizada para ressuspender os padrões, foi possível recuperar todos os analitos, conforme pode ser observado na Figura 17.

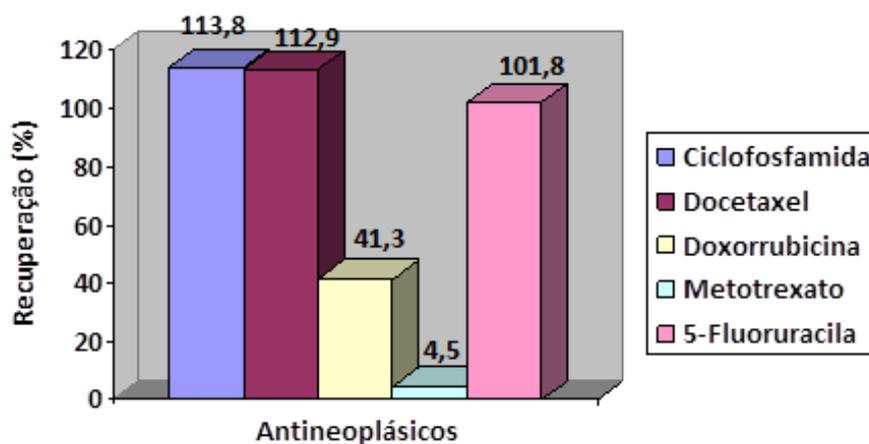
Figura 17 – Recuperação obtida para CP, DOC, DOXO, MTX e 5-FU, utilizando ácido fórmico 0,1% em água: acetonitrila (7:3, v/v) como solvente extrator



Fonte: Do autor

A recuperação com ácido fórmico 0,1%: acetonitrila (7:3, v/v) foi maior, em relação aos resultados obtidos com o ácido fórmico 0,1%, levando a menores perdas e extração de todos os analitos. Porém, optou-se por testar outra solução, acetato de etila: metanol (2:1, v/v), a fim de se aumentar a eficiência de extração para todos os compostos em estudo (Figura 18). Esta solução já havia sido utilizada, como solvente de eluição, em estudo conduzido por Sottani et al. (2007), os quais desenvolveram método para análise de CP, IF, PAC e GCA em superfícies, utilizando a extração em fase sólida (SPE), uma técnica mais laboriosa e que demanda um maior número de etapas e treinamento dos profissionais, obtendo uma recuperação média de 87,3% para a CP.

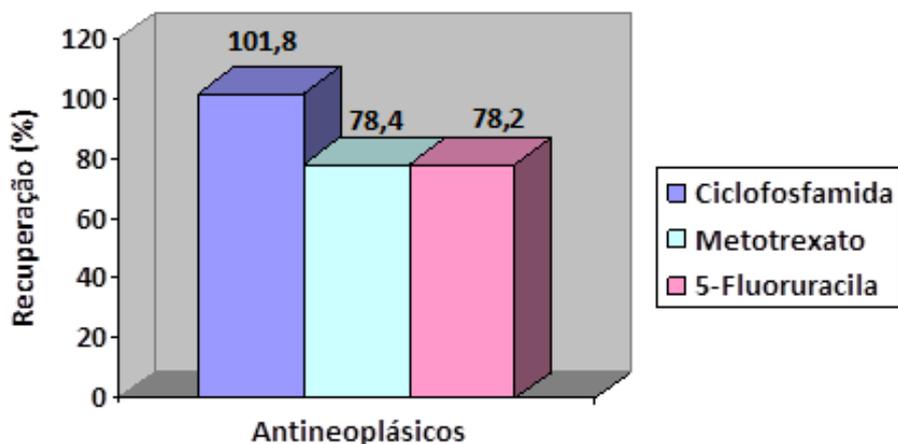
Figura 18 – Recuperação obtida para CP, DOC, DOXO, MTX e 5-FU, utilizando acetato de etila: metanol (2:1, v/v) como solvente extrator



Fonte: Do autor

A porcentagem de recuperação para os analitos CP, DOC, DOXO e 5-FU foi superior aos demais testes realizados e aos resultados demonstrados nos estudos de Sabatini et al. (2005) (Figura 19), Sottani et al. (2007) e Nussbaumer et al. (2010).

Figura 19 – Recuperação obtida para MTX, CP e 5-FU por Sabatini et al. (2005)



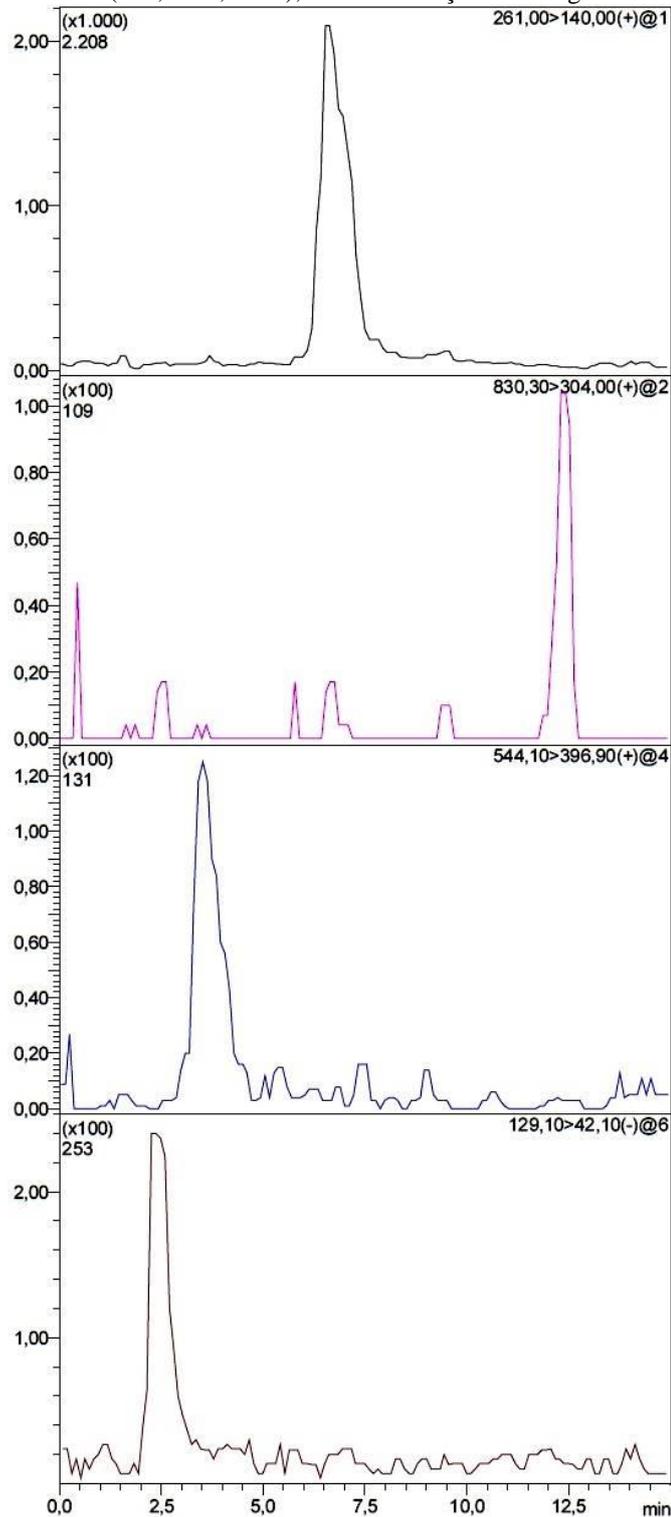
Fonte: Do autor

Porém, a eficiência da extração para o MTX foi inferior à obtida por Nussbaumer et al. (2010), os quais obtiveram recuperação de 67%. Ainda, foi mais baixa do que a obtida por Sabatini et al. (2005), os quais realizaram a limpeza de superfícies e objetos com dois tecidos Kleenex (20 x 21 cm), embebidos com acetato de amônio $0,1 \text{ mmol L}^{-1}$ (pH 6,9). Assim, após análise de todos os resultados, optou-se por excluir esse analito, do presente estudo, uma vez que seria necessária a realização de novos testes com diferentes solventes extratores para obtenção de uma boa recuperação para este analito, ou ainda, testar diferentes técnicas de extração, como, por exemplo, a SPE.

Assim, as condições de preparo de amostras e extração foram otimizadas e podem ser observadas na Figura 4, na seção experimental desse trabalho.

Após otimização das condições de espectrometria de massas, das condições cromatográficas e de preparo de amostras, obteve-se o cromatograma, apresentado na Figura 20, dos antineoplásicos CP, DOXO, DOC e 5-FU extraídos de uma amostra de superfície, na concentração de 30 ng mL^{-1} (150 ng wipe^{-1}).

Figura 20 – Cromatograma, obtido no modo MRM, de uma amostra *wipe* extraída, contendo CP (261,0>140,0 m/z), DOC (830,3>304,0 m/z), DOXO (544,1>396,9 m/z) e 5-FU (129,1>42,1 m/z), na concentração de 30 ng mL⁻¹



Fonte: Do autor

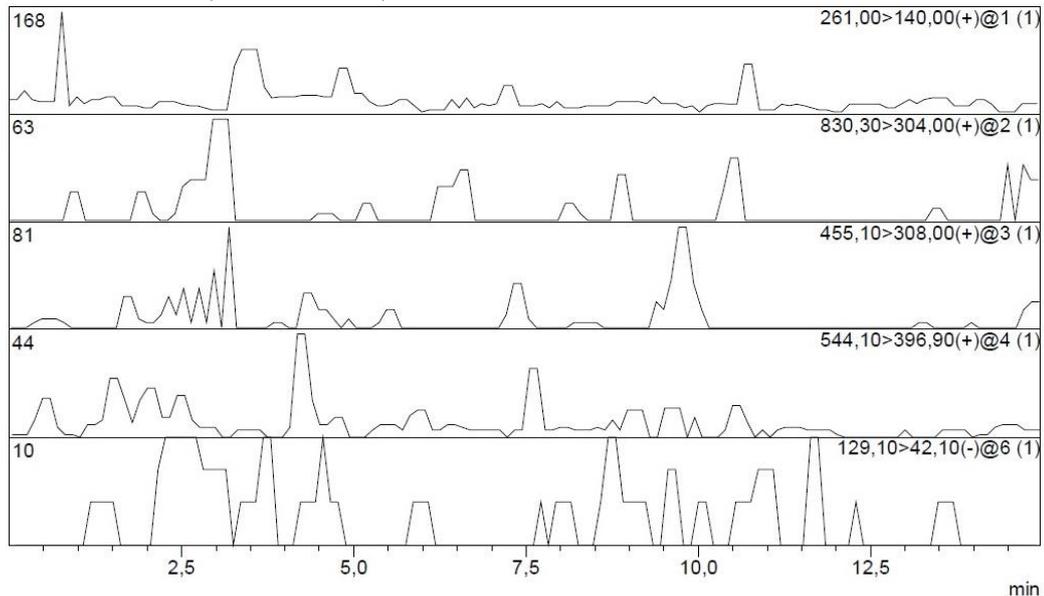
Notas: Solvente extrator = acetato de etila: metanol (2:1, v/v); coluna = Shim-pack® XR-ODS C18 (100 x 3 mm, 2,2 µm) protegida por uma pré-coluna Shim-pack® G-ODS C18 (10 x 4 mm, 5 µm); fase móvel = ácido fórmico 0,1% e acetonitrila num gradiente reportado na Tabela 18; vazão = 0,3 mL min⁻¹; volume de injeção = 50 µL; temperatura do forno = 30°C

5.2 VALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO PARA DETERMINAÇÃO DE ANTINEOPLÁSICOS EM SUPERFÍCIES

Após a otimização das condições cromatográficas e de espectrometria de massas, além das condições de extração das superfícies, procedeu-se a validação do método. O procedimento de validação foi realizado de acordo com a Resolução RE nº 899, de 29 de maio de 2003, da ANVISA (ANVISA, 2003), as normas DOQ-CGCRE-008 do INMETRO (INMETRO, 2011) e estudos realizados por Ribani et al. (2004), Paschoal et al. (2008) e Cassiano et al. (2009). Para tanto, os seguintes parâmetros foram avaliados: seletividade, robustez, efeito matriz, linearidade, limites de quantificação e detecção, precisão, exatidão e eficiência da extração.

Para o teste de seletividade, foram analisadas seis amostras de *wipe* sem adição de antineoplásicos, ou seja, amostras “branco”, sob as condições demonstradas na técnica de limpeza de superfícies, excluindo-se a etapa de contaminação das superfícies. O cromatograma pode ser observado na Figura 21 e demonstra que o método pode ser considerado seletivo, uma vez que não há picos interferentes no tempo de retenção dos analitos. Outra maneira utilizada para se avaliar a seletividade foi através da comparação dos espectros dos picos obtidos nas corridas analíticas com os espectros dos padrões puros, utilizando-se isto como uma indicação da presença do composto puro.

Figura 21 – Cromatograma, obtido no modo MRM, de uma amostra de *wipe* branco, contendo CP (261,0>140,0 m/z), DOC (830,3>304,0 m/z), DOXO (544,1>396,9 m/z) e 5-FU (129,1>42,1 m/z).



Fonte: Do autor

Notas: Solvente extrator = acetato de etila: metanol (2:1, v/v); coluna = Shim-pack® XR-ODS C18 (100 x 3 mm, 2,2 µm) protegida por uma pré-coluna Shim-pack® G-ODS C18 (10 x 4 mm, 5 µm); fase móvel = ácido fórmico 0,1% e acetonitrila num gradiente reportado na Tabela 18; vazão = 0,3 mL min⁻¹; volume de injeção = 50 µL; temperatura do forno = 30°C

Para a avaliação da linearidade do método, foram testadas as concentrações de 5, 10, 25, 30, 40, 50, 80, 100, 150, 300, 500 e 1000 ng mL⁻¹. Sendo lineares os intervalos de 5-500 ng mL⁻¹ para a CP, e de 10-500 ng mL⁻¹ para a DOXO, o DOC e a 5-FU. A concentração de 300 ng mL⁻¹ foi escolhida como limite superior de quantificação, apesar de limites maiores poderem ser usados, uma vez que ainda havia linearidade, com o objetivo de evitar uma exposição desnecessária dos pesquisadores. Então, as concentrações escolhidas para faixa de trabalho foram as de 5, 10, 25, 50, 80, 150 e 300 ng mL⁻¹ para a CP, e as de 10, 25, 50, 80, 150 e 300 ng mL⁻¹ para a DOXO, o DOC e a 5-FU. Os resultados de linearidade e dos limites de detecção e de quantificação estão apresentados na Tabela 19. O LD foi calculado com base na fórmula 3DPb/a e o LQ pela fórmula 10DPb/a, sendo também a concentração quantificada com precisão e exatidão aceitáveis (ANVISA, 2003; RIBANI et al., 2004). O método apresentou-se linear uma vez que os coeficientes de determinação (r²) obtidos para todos os analitos foram ≥ 0,99.

Tabela 19 – Linearidade, limites de detecção e de quantificação do método UHPLC-MS/MS de determinação de CP, DOXO, DOC e 5-FU

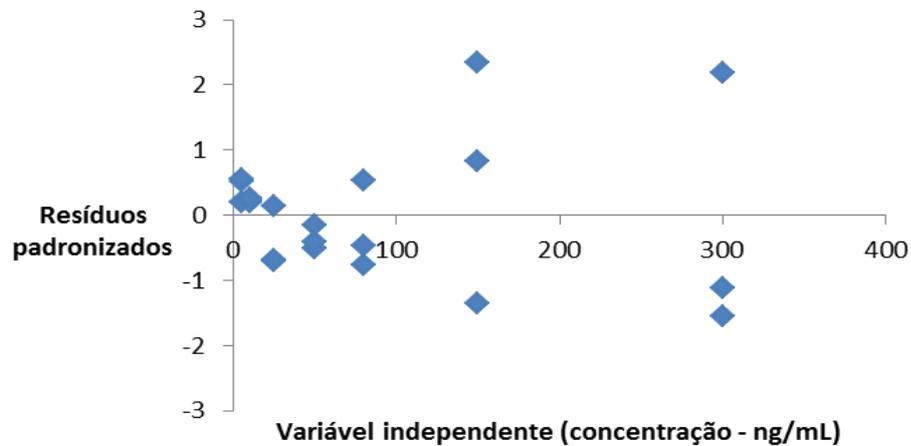
Analito	Média de a (± DP)	Média de b (± DP)	Coefficiente de determinação ($r^2 \pm DP$)	Limite de detecção (ng mL ⁻¹)	Limite de quantificação (ng mL ⁻¹)
CP	3936 (± 84)	6205 (± 1362)	0,9977 (± 0,0008)	1,04	3,46
DOC	124 (± 3)	722 (± 54)	0,9962 (± 0,0020)	1,30	4,33
DOXO	614 (± 10)	4927 (± 244)	0,9941 (± 0,0024)	1,20	3,98
5-FU	161 (± 34)	142 (± 27)	0,9939 (± 0,0030)	0,50	1,70

Fonte: Do autor

Notas: a = coeficiente angular da reta obtido pelo método de regressão linear dos mínimos quadrados; b = coeficiente linear da reta obtido pelo método de regressão linear dos mínimos quadrados; r^2 = coeficiente de determinação; DP = desvio padrão

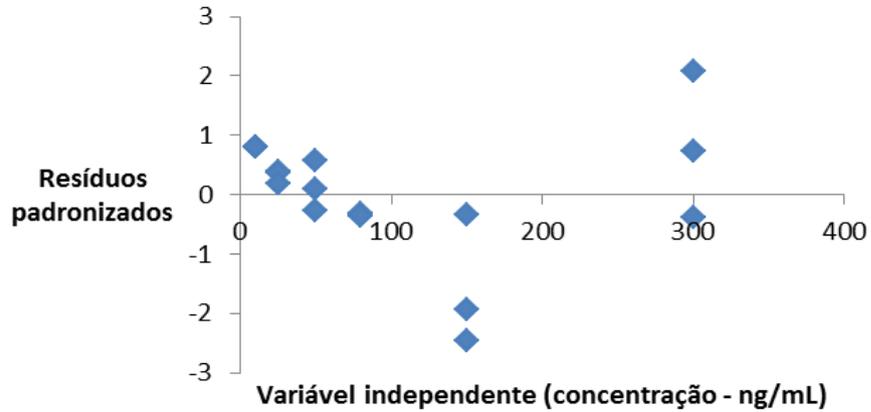
Nas Figuras 22, 23, 24 e 25 são apresentados os gráficos dos resíduos da regressão linear versus a variável independente da CP, do DOC, da DOXO e da 5-FU, respectivamente.

Figura 22 – Dispersão dos resíduos padronizados com relação aos níveis de concentração da ciclofosfamida



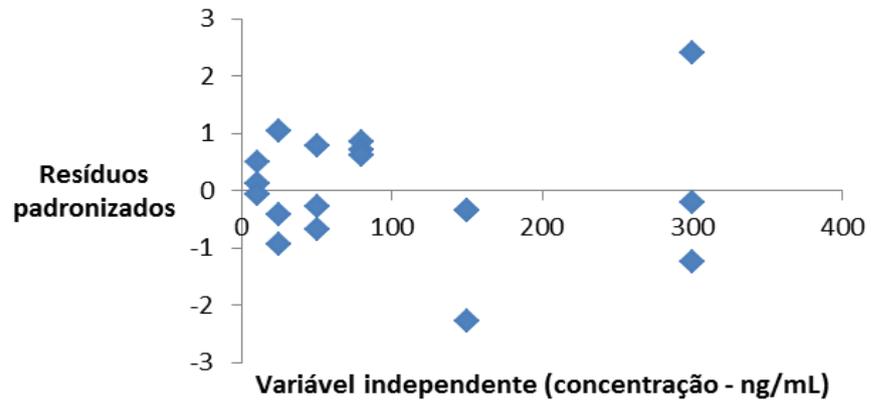
Fonte: Do autor

Figura 23 – Dispersão dos resíduos padronizados com relação aos níveis de concentração do docetaxel



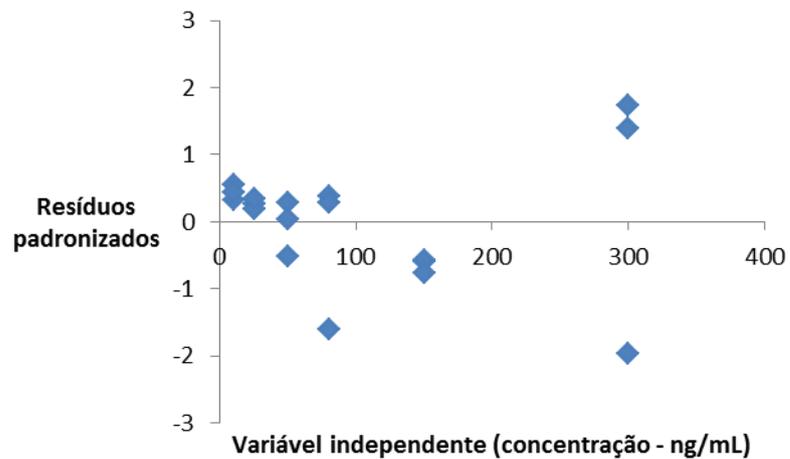
Fonte: Do autor

Figura 24 – Dispersão dos resíduos padronizados com relação aos níveis de concentração da doxorubicina



Fonte: Do autor

Figura 25 – Dispersão dos resíduos padronizados com relação aos níveis de concentração da 5-fluoruracila



Fonte: Do autor

Por meio da análise dos resíduos, observou-se que, para todos os analitos, o número de resíduos positivos é semelhante ao número de resíduos negativos; as distâncias dos resíduos positivos e negativos do zero, também são semelhantes; os resíduos estão distribuídos aleatoriamente. Portanto, o modelo linear foi apropriado, pois os resíduos se comportam de forma aleatória, de acordo com Paschoal et al. (2008).

Na análise dos FAN, em que o ideal seria não encontrar os analitos nas superfícies, a detectabilidade é característica de suma importância, pois a metodologia deve ser capaz de determinar os analitos na ordem de traços (ng ou pg/mL). Assim, os LD encontrados neste estudo, no intervalo de 0,5 a 1,3 ng mL⁻¹, foram menores que aqueles obtidos por Sabatini et al. (2005) e Sottani et al. (2007), os quais também determinaram antineoplásicos pela técnica de LC-MS/MS, conforme pode ser verificado na Tabela 2. Se compararmos aos métodos que empregaram a LC-UV (VENUTO, 2009) e LC-DAD (ALCÂNTARA et al., 2010; RESENDE et al., 2011), os resultados apresentaram níveis de detectabilidade muito superiores, ou seja, os LD obtidos foram 59 a 3800 vezes menores.

Nos estudos de precisão do método, em termos de repetibilidade (precisão intradia) e precisão intermediária (precisão interdias), e da exatidão intra e interdias, foram utilizados calibradores de 10, 50 e 300 ng mL⁻¹. As soluções foram preparadas em sextuplicata, por concentração, e para cada analito, por dois diferentes analistas, em três dias diferentes. A precisão foi expressa como DPR, enquanto a exatidão como EPR, não sendo admitidos valores superiores a 15%, para os calibradores médio e alto, e a 20% para o LQ (INMETRO, 2011). Os resultados para cada analito encontram-se na Tabela 20.

Tabela 20 – Precisão e exatidão intradia e interdias para os analitos (n=18, 6 replicatas por dia, por 3 dias)

Analito	Concentração nominal (ng mL ⁻¹)	Intradia		Interdias	
		EPR(%)	DPR(%)	EPR(%)	DPR(%)
CP	10	-15,5	1,7	-17,7	1,3
	50	+4,0	2,6	+5,5	2,5
	300	-0,1	2,5	-0,1	2,7
DOC	10	-6,1	1,6	-9,4	2,1
	50	+7,4	1,2	+0,8	1,6
	300	-0,1	6,3	+0,1	10,4
DOXO	10	+10,1	9,3	+4,3	8,9
	50	+8,4	3,8	-5,3	3,1
	300	-0,2	4,4	+0,1	3,4
5-FU	10	+13,9	14,2	-5,8	13,2
	50	+0,5	4,3	+2,4	4,1
	300	+0,1	7,5	-0,1	7,7

Fonte: Do autor

Notas: EPR = erro padrão relativo; DPR = desvio padrão relativo

Os maiores valores de DPR intradia e interdias, 14,2% e 13,2%, respectivamente, foram obtidos pela análise da concentração de 10 ng mL⁻¹ da 5-FU; enquanto os menores valores de DPR intradia, 1,2%, e interdias, 1,3%, foram encontrados para o DOC na concentração de 50 ng mL⁻¹ e para a CP na concentração de 10 ng mL⁻¹, respectivamente. Os resultados de precisão obtidos para o DOC por Mortier et al. (2005) não excederam 9,3%, o qual é inferior ao valor máximo de 10,4% obtido neste estudo. Nussbaumer et al. (2010) obtiveram DPR de 1-5% e 2-10% para CP e DOXO, respectivamente. Enquanto em estudos conduzidos por Sabatini et al. (2005), intervalos de 4,8-14,9% para a 5-FU e de 0,7-4,8% para a CP foram encontrados. Já os valores de precisão obtidos por Sottani et al. (2007) para a CP foram de 4,6-12,1%. Todavia, os valores encontrados para os antineoplásicos avaliados foram todos satisfatórios, de acordo com os guias adotados, para a validação do método desenvolvido, destacando-se, assim, uma proximidade entre os resultados obtidos em repetidas análises.

O teste de recuperação foi realizado por meio da contaminação de 54 superfícies – espelhos de fechaduras, bancadas e luvas –, em 3 níveis de concentração (150, 250 e 500 ng wipe⁻¹), em sextuplicata. Foi realizado o preparo de amostras de acordo com a técnica de limpeza de superfícies, descrita na parte experimental, utilizando como solução extratora a mistura de acetato de etila: metanol (2:1, v/v), a qual permitiu um aumento na eficiência do processo, representada pela maior porcentagem de recuperação para os analitos CP, DOXO, DOC e 5-FU, comparando-se as áreas obtidas após a extração frente às áreas obtidas pela injeção de soluções-padrão, nas mesmas concentrações. Pela técnica de extração empregada no presente estudo, as concentrações de 150, 250 e 500 ng wipe⁻¹ equivalem às concentrações de 30, 50 e 100 ng mL⁻¹. Os valores médios de recuperação obtidos, como demonstrado na Tabela 21, foram precisos e exatos, indicando que o procedimento de extração apresentou eficiência adequada (INMETRO, 2011).

Tabela 21 – Porcentagens de recuperação média dos analitos após deposição em superfícies (n=54)

(continua)

Analito	Concentração (ng mL⁻¹)	Recuperação	DPR(%)	EPR (%)
CP	30	117,8%	5,1	+1,3
	50	96,1%	4,7	+4,2
	100	94,9%	3,1	-4,9
	Média	102,9%		
DOC	30	102,4%	8,2	+1,1
	50	96,5%	5,1	-2,0
	100	106,3%	2,6	+5,2
	Média	101,7%		

Tabela 21 – Percentagens de recuperação média dos analitos após deposição em superfícies (n=54) (conclusão)

Analito	Concentração (ng mL⁻¹)	Recuperação	DPR(%)	EPR (%)
DOXO	30	49,8%	5,5	-5,1
	50	71,1%	6,9	+2,5
	100	58,7%	6,4	-0,2
	Média	59,9%		
5-FU	30	101,2%	8,3	+5,9
	50	104,5%	7,1	+2,6
	100	108,7%	8,6	+4,4
	Média	104,8%		

Fonte: Do autor

Notas: EPR = erro padrão relativo; DPR = desvio padrão relativo

Nussbaumer et al. (2010), os quais realizaram uma técnica de limpeza semelhante a otimizada neste trabalho, contaminaram 20 superfícies – 10 bolsas de infusão e 10 superfícies de aço inoxidável – com 250 ng wipe⁻¹ de todos os fármacos, e as recuperações médias obtidas, utilizando o ácido fórmico 0,1% como solução extratora, foram de 84,5% para CP e 29% para DOXO. Sottani et al. (2007) avaliaram a eficiência da extração em diferentes superfícies e obtiveram recuperação média de 73,2% para a CP. Esses autores relataram que quando os analitos foram amostrados de superfícies laminadas, as recuperações foram inferiores às demais, sendo que esses resultados são consistentes com o princípio de que uma superfície ideal é não porosa, como, por exemplo, as superfícies de aço inoxidável. Assim, podemos concluir que o método desenvolvido possui maior eficiência de extração que trabalhos já publicados.

A intensidade do efeito matriz foi avaliada por fortificação pós-extração. As respostas obtidas para as amostras cujos analitos de interesse foram adicionados pós-extração foram comparadas com as respostas das soluções preparadas em ácido fórmico 0,1%: acetonitrila (7:3, v/v). O grau do efeito matriz foi, então, determinado pela diferença da resposta entre a amostra pós-extração e a solução em solvente e os resultados obtidos encontram-se na Tabela 22, sendo que valores de 100%, para EM, indicam que as respostas para os analitos na fase móvel e nos eluatos das superfícies foram as mesmas e que o EM não foi observado. Já, valores > 100% indicam indução iônica e valores < 100% indicam supressão da ionização (Cassiano et al., 2009). A partir dos resultados obtidos foi possível verificar que não houve efeito de supressão nem de indução iônica, significativos, uma vez que o EM absoluto variou entre -5,78 e +8,83.

Tabela 22 – Efeito matriz para CP, DOC, DOXO e 5-FU nas concentrações de 30, 60 e 100 ng mL⁻¹

Analito	Concentração (ng mL⁻¹)	Efeito matriz absoluto (média ± DPR, %)
CP	30	106,44 ± 14,05
	60	100,99 ± 5,65
	100	99,86 ± 2,83
DOC	30	94,22 ± 11,17
	60	98,85 ± 6,31
	100	99,50 ± 2,75
DOXO	30	98,70 ± 2,66
	60	98,52 ± 3,62
	100	94,78 ± 5,41
5-FU	30	100,20 ± 11,79
	60	108,83 ± 12,95
	100	106,30 ± 2,22

Fonte: Do autor

Nota: DPR = desvio padrão relativo

Um método é considerado robusto quando ele não é afetado por pequenas modificações, em seus parâmetros, que possam ocorrer quando esse está sendo executado, fornecendo assim os mesmos resultados. Para determinar a robustez do método analítico, utilizou-se o teste de Youden (INMETRO, 2003). Para esse teste, superfícies foram contaminadas com 150 ng wipe⁻¹, que equivale à concentração de 30 ng mL⁻¹, e procedeu-se os testes demonstrados na Tabela 8.

A partir dos resultados obtidos, o efeito de cada parâmetro analítico, demonstrado na Tabela 7, foi estimado pela diferença entre a média dos resultados das quatro análises com as condições nominais (+) e a média dos resultados das quatro análises com as condições variadas (-). Considerando o desvio padrão entre os oito resultados, os parâmetros que apresentam efeito maior do que o desvio padrão multiplicado pela raiz quadrada de dois ($s\sqrt{2}$) são considerados significantes e, portanto, alteram a resposta analítica (INMETRO, 2011). Assim, o método desenvolvido para determinação simultânea dos antineoplásicos CP, DOXO, DOC e 5-FU, em superfícies, foi considerado robusto, para os parâmetros avaliados, uma vez que não houve diferença significativa entre os valores obtidos com os parâmetros nominais e àqueles obtidos com as condições variadas.

Os resultados da validação foram considerados satisfatórios e o método pôde ser aplicado em amostras coletadas no próprio laboratório onde a pesquisa foi desenvolvida. Os dados obtidos das análises de amostras de maçanetas das portas das salas D202 e D301, da UNIFAL-MG, além da alça do freezer, do LATF-UNIFAL, e de luvas utilizadas para contaminação de superfícies, encontram-se na Tabela 23 abaixo.

Tabela 23 – Análise dos antineoplásicos CP, DOC, DOXO e 5-FU pelo método LC-MS/MS em amostras reais coletadas no laboratório de pesquisa do LATF-UNIFAL

Amostra	Ciclofosfamida	Docetaxel	Doxorrubicina	5-Fluoruracila
Wipe teste 1: maçaneta da porta da sala do D202	< LD	< LD	< LD	< LD
Wipe teste 2: maçaneta da porta da sala do D202	< LD	< LD	< LD	< LD
Wipe teste 3: alça do freezer do LATF-UNIFAL	< LD	< LD	< LD	< LD
Wipe teste 4: luvas	< LD	< LD	< LD	< LD

Fonte: Do autor

Nota: LD = limite de detecção

Os achados do presente estudo sugerem que a manipulação dos antineoplásicos foi realizada de forma correta, uma vez que os resultados das análises indicam que a contaminação das superfícies analisadas está abaixo do limite de detecção do método, ou seja, inferiores a 0,5-1,0 ng mL⁻¹.

Os resultados obtidos após a análise de superfícies de placas de fórmica, de espelhos de fechaduras de portas e de luvas, contaminadas com os analitos, em uma quantidade de 150, 250 e 500 ng, em sextuplicata, totalizando em 54 *wipe sampling*, com recuperações médias entre 59,9-104,8% com erros-padrão relativos de até ±6%, e análise das amostras apresentadas na Tabela 23, sugerem que o método desenvolvido é adequado para identificar, simultaneamente, quatro, dos cinco, antineoplásicos estudados, constituindo uma promissora e importante ferramenta analítica para o monitoramento da exposição ocupacional a tais fármacos.

6 CONCLUSÕES

De acordo com os resultados experimentais obtidos no presente estudo, foi possível concluir que:

- a) com as condições de espectrometria de massas otimizadas, ou seja, uso de fonte de ionização ESI, modo de ionização positivo, para a CP, a DOXO e o DOC e negativo, para a 5-FU, foi possível monitorar as transições de 261,0 > 140,0 m/z, para CP; de 830,3 > 304,0 m/z, para DOC; de 544,1 > 396,9 m/z, para DOXO; de 129,1 > 42,1 m/z, para 5-FU, o que possibilitou uma identificação confiável dos analitos avaliados;
- b) com as condições cromatográficas otimizadas, ou seja, uso de pré coluna Shim-pack® G-ODS C18 (10 x 4 mm, 5 µm), coluna Shim-pack® XR-ODS C18 (100 x 3 mm, 2,2 µm), fase móvel constituída de ácido fórmico 0,1%: acetonitrila, com eluição em gradiente, vazão da fase móvel de 0,3 mL min⁻¹ e volume de injeção de 50 µL, foi possível obter uma separação cromatográfica satisfatória, dos quatro analitos, com um tempo total de corrida de 15 minutos;
- c) com as condições otimizadas no *wipe* teste, ou seja, amostragem do tipo *wipe sampling* e extração líquido-líquido, com acetato de etila: metanol (2:1, v/v), foi possível obter satisfatória eficiência de extração, uma vez que foram obtidas elevadas porcentagens de recuperação, para CP, DOC e 5-FU. Para DOXO, apesar da porcentagem de recuperação ser menor, os resultados foram aceitáveis, uma vez que houve precisão e exatidão, em todas as amostras contaminadas, para todos os analitos e em todas as três concentrações avaliadas;
- d) o método analítico, constituído de UHPLC-MS/MS, com prévia extração líquido-líquido dos analitos de amostras de superfícies, é relativamente rápido, para um método abrangente, no qual são identificadas substâncias químicas com características diferentes, simples, linear, exato, preciso, robusto e apresenta limites de detectabilidade suficientes para ser aplicado na avaliação da exposição ocupacional a esses fármacos;
- e) a técnica de detecção/ quantificação foi otimizada para o metotrexato, todavia com o *wipe* teste empregado, não foi possível obter resultados satisfatórios para

esse fármaco, sendo necessário um estudo mais aprofundado sobre as condições de extração, que possibilitariam a inclusão dele no método;

- f) não foram detectados níveis de antineoplásicos nas amostras analisadas de maçanetas de portas, além da alça do freezer do LATF-UNIFAL, nem tampouco nas luvas utilizadas pelos pesquisadores, indicando que se essas superfícies estivessem contaminadas, os níveis seriam abaixo de 0,5 a 1,0 ng mL⁻¹;
- g) o método desenvolvido é uma importante ferramenta analítica para ser aplicada no monitoramento das superfícies dos locais que manipulam antineoplásicos, como, por exemplo, laboratórios de pesquisa, uma vez que permite uma confiável avaliação da exposição, que é uma das etapas da avaliação do risco inerente ao contato dos trabalhadores com essas substâncias.

REFERÊNCIAS

AHMAD, M. et al. A fast and simple HPLC-UV method for simultaneous determination of three anti-cancer agents in plasma of breast cancer patients and its application to clinical pharmacokinetics. **African Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 5, n. 7, p. 915-922, 2011.

AHMADLOO, N. et al. The efficacy and safety of induction chemotherapy with docetaxel, cisplatin and 5-fluorouracil (TPF) in treating patients with locally advanced nasopharyngeal carcinoma. **Egyptian Journal of Ear, Nose, Throat and Allied Sciences**, v. 13, p. 107-112, 2012.

AHMED, S. et al. Selective determination of doxorubicin and doxorubicinol in rat plasma by HPLC with photosensitization reaction followed by chemiluminescence detection. **Talanta**, v. 78, p. 94-100, 2009.

ALCÂNTARA, A. M. P. P. **Desenvolvimento de métodos para a determinação simultânea de antineoplásicos em superfícies e luvas visando a aplicação na monitorização da exposição ocupacional**. 2009. 103 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, 2009.

ALCÂNTARA, A. M. P. P. et al. Liquid chromatographic method for simultaneous determination of five antineoplastic drugs. **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 28, n. 4, p. 525-530, 2009.

ALCÂNTARA, A. M. P. P. et al. Simultaneous detection of three antineoplastic drugs on gloves by liquid chromatography with diode array detector. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 46, n. 4, p. 731-740, 2010.

ALCÂNTARA, A. M. P. P.; MARTINS, I. Monitorização da exposição ocupacional aos fármacos antineoplásicos empregando matrizes não biológicas. **Revista Brasileira de Toxicologia**, v. 25, n. 1-2, p. 15-23, 2012.

ALESSIO, L. et al. **Prevenzione dei rischi da esposizione professionale a chemioterapici antiblastici**. Documento de consenso. Medicina del Lavoro, Milano, v. 87, n. 3, p. 194-200, 1996.

ALMEIDA, J. R. C. **Farmacêuticos em oncologia: uma nova realidade**. São Paulo: Atheneu, 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, n. 1, p. 118-129, 2005.

AMORIM, A. R. **Genética do câncer**. 2002. 41 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Ciências Biológicas) – Faculdade de Ciências de Saúde, Centro Universitário de Brasília, Brasília, 2002.

ANDRADE, C. C. **Farmacêutico em oncologia: interfaces administrativas e clínicas**. Fortaleza: Instituto do Câncer do Ceará, 2009.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). Resolução RE n° 899, de 29 de maio de 2003. Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. **Diário Oficial da União**, Brasília, 02 de junho de 2003.

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

BARBIERI, A. et al. Simultaneous determination of low levels of methotrexate and cyclophosphamide in human urine by micro liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 20, p. 1889-1893, 2006.

BOBIN-DUBIGEON, C. et al. A new validated wipe-sampling procedure coupled to LC-MS analysis for the simultaneous determination of 5-fluorouracil, doxorubicin and cyclophosphamide in surface contamination. **Journal of Analytical Toxicology**, v. 37, n. 7, p. 433-439, 2013.

BORGES-OSÓRIO, M. R.; ROBINSON, W. M. **Genética humana**. 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 2013.

BYRNS, M. C.; PENNING, T. M. Environmental toxicology: carcinogens and heavy metals. In: BRUNTON, L. L.; CHABNER, B. A.; KNOLLMANN, B. C. In: **Goodman and Gilman's the pharmacological basis of therapeutics**. 12. ed. São Paulo: McGraw-Hill, p. 1853-1878, 2011.

CASALE, F. et al. Simultaneous HPLC determination of 5-fluorouracil and its metabolites in plasma of cancer patients. **Biomedical Chromatography**, v. 16, p. 446-452, 2002.

CASSIANO, N. M. et al. Validação de métodos cromatográficos para análises de pequenas moléculas em matrizes biológicas. **Química Nova**, v. 32, n. 4, p. 1021-1030, 2009.

CHABNER, B. A. General principles of cancer chemotherapy. In: BRUNTON, L. L.; CHABNER, B. A.; KNOLLMANN, B. C. In: **Goodman and Gilman's the pharmacological basis of therapeutics**. 12. ed. São Paulo: McGraw-Hill, p. 1667-1675, 2011.

CHIARADIA, M. C.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F. O estado da arte da cromatografia associada à espectrometria de massas acoplada à espectrometria de massas na análise de compostos tóxicos em alimentos. **Química Nova**, v. 31, n. 3, p. 623-636, 2008.

CHU, E.; SARTORELLI, A. C. Quimioterapia do câncer. In: KATZUNG, B. G. In: **Farmacologia básica e clínica**. 10. ed. São Paulo: McGraw-Hill, p. 797-823, 2007.

CORONA, G. et al. High-throughput plasma docetaxel quantification by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **Clinica Chimica Acta**, v. 412, p. 358-364, 2011.

CZERNYCH, R. et al. Development and validation of SPE-HPLC-MS/MS method for determining cyclophosphamide in surface waters. **Polish Journal of Environmental Studies**, v. 23, n. 5, p. 1537-1545, 2014.

DE JONGE, M. E. et al. Simultaneous quantification of cyclophosphamide, 4-hydroxycyclophosphamide, N,N,N,N.-triethylenethiophosphoramidate (thiotepa) and N,N,N,N.-triethylenephosphoramidate (tepa) in human plasma by high-performance liquid chromatography coupled with electrospray ionization tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). **Journal of Mass Spectrometry**, v. 39, p. 262-271, 2004.

EDUARDO, A. M. L. N.; DIAS, J. P.; SANTOS, P. K. Atenção farmacêutica no tratamento oncológico em um instituição pública de Montes Claros-MG. **Revista Brasileira de Farmácia Hospitalar e Serviços de Saúde**, v. 3, n. 1, p. 11-14, 2012.

FERNÁNDEZ-PERALBO, M. A. et al. LC–MS/MS quantitative analysis of paclitaxel and its major metabolites in serum, plasma and tissue from women with ovariancancer after intraperitoneal chemotherapy. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 91, p. 131-137, 2014.

FERRANDO-CLIMENT, L., RODRIGUEZ-MOZAZ, S., BARCELÓ, D. Development of a UPLC-MS/MS method for the determination of ten anticancer drugs in hospital and urban wastewaters, and its application for the screening of human metabolites assisted by information-dependent acquisition tool (IDA) in sewage samples. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 405, p. 5937-5952, 2013.

GRIVICICH, I. **A importância da sequência de administração do irinotecan e de 5-fluorouracil na inibição da proliferação do carcinoma de cólon humano in vitro**. 1999. 116 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 1999.

GROZAV, A. G. et al. Rapid analysis of docetaxel in human plasma by tandem mass spectrometry with on-line sample extraction. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 36, n. 1, p. 125-131, 2004.

HARVEY, R. A.; CHAMPE, P. C.; MYCEK, M. J. **Farmacologia ilustrada**. 2. ed. Porto Alegre: Artmed, p. 373-400, 1998.

HENDRIKX, J. J. M. A. et al. A sensitive combined assay for the quantification of paclitaxel, docetaxel and ritonavir in human plasma using liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography B**, v. 879, p. 2984-2990, 2011.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA (INCA). Estimativa 2014: incidência de câncer no Brasil. **Revista Brasileira de Cancerologia**, Rio de Janeiro: INCA, 2014.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER (INCA). **O que é o câncer?** Disponível em: <http://www1.inca.gov.br/conteudo_view.asp?id=322>. Acesso em: 11 jun. 2015.

INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, NORMALIZAÇÃO E QUALIDADE INDUSTRIAL (INMETRO). DOQ-CGCRE-008, Revisão 01, mar/2003. **Orientações sobre validação de métodos de ensaios químicos**. Rio de Janeiro: INMETRO, 2003.

INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, NORMALIZAÇÃO E QUALIDADE INDUSTRIAL (INMETRO). DOQ-CGCRE-008, Revisão 04, jul/2011. **Orientações sobre validação de métodos de ensaios químicos**. Rio de Janeiro: INMETRO, 2011.

JIN, J. et al. Comparative pharmacokinetics of paclitaxel after oral administration of Taxus yunnanensis extract and pure paclitaxel to rats. **Fitoterapia**, v. 90, p. 1-9, 2013.

KATZENMEYER, J. B.; EDDY, C. V.; ARRIAGA, E. A. Tandem laser-induced fluorescence and mass spectrometry detection for high-performance liquid chromatography analysis of the in vitro metabolism of doxorubicin. **Analytical Chemistry**, v. 82, n. 19, p. 8113-8120, 2010.

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

LIAN, H.; SUN, J.; ZHANG, T. A rapid and sensitive determination of paclitaxel in rat plasma by UPLC-MS/MS method: Application to a pharmacokinetic study. **Asian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 8, p. 199-205, 2013.

LICATA, S. et al. Doxorubicin metabolism and toxicity in human myocardium: role of cytoplasmic deglycosidation and carbonyl reduction. **Chemical Research in Toxicology**, v. 13, n. 5, p. 414-420, 2000.

LIMA, I. S. et al. Equipe de enfermagem: conhecimentos acerca do manuseio de drogas antineoplásicas. **Revista de Enfermagem da UERJ**, v. 19, n. 1, p. 40-45, 2011.

LIN, G. et al. Beneficial effects of 20(S)-protopanaxadiol on antitumor activity and toxicity of cyclophosphamide in tumor-bearing mice. **Experimental and Therapeutic Medicine**, v. 5, p. 443-447, 2013.

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

MARTINS, I. et al. Simultaneous determination of cyclophosphamide and ifosfamide in plasma using SPE-HPLC-UV method. **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 28, n. 1, p. 41-46, 2009.

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

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

MOFFAT, A. C.; OSSELTON, M. D.; WIDDOP, B. **Clarke's analysis of drugs and poisons**. 4. ed. London: Pharmaceutical Press, 2011.

MONTEIRO, L. A.; CHAVES, D. C. E.; FIGUEIREDO, L. F. Conhecimento dos profissionais de enfermagem sobre a ciclofosfamida em um hospital universitário. **Revista Eletrônica de Enfermagem** [Internet], v. 15, n. 2, p. 430-436, 2013.

MORTIER, K. A. et al. Development and validation of a liquid chromatography-tandem mass spectrometry assay for the quantification of docetaxel and paclitaxel in human plasma and oral fluid. **Analytical Chemistry**, v. 77, n. 14, p. 4677-4683, 2005.

RICARDO NETTO, L. ; SANTOS, W. M. **Percepção dos profissionais de enfermagem sobre o risco no preparo e administração de antineoplásicos**. 2010. 62 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Enfermagem) - Universidade Federal do Pampa, Uruguaiana, 2010.

NUSSBAUMER, S. et al. Simultaneous quantification of ten cytotoxic drugs by a validated LC-ESI-MS/MS method. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 398, n. 7, p. 3033-3042, 2010.

OLIVEIRA, A. D. S. et al. Occupational risks of the nursing team's exposure to chemotherapeutic agents: integrative literature review. **Journal of Nursing UFPE online**, v. 7, n. 3, p. 794-802, 2013.

PASCHOAL, J. A. R. et al. Validação de métodos cromatográficos para a determinação de resíduos de medicamentos veterinários em alimentos. **Química Nova**, v. 31, n. 5, p. 1190-1198, 2008.

PEER, C. J. et al. Development and utilization of a combined LC-UV and LC-MS/MS method for the simultaneous analysis of tegafur and 5-fluorouracil in human plasma to support a phase I clinical study of oral UFT[®]/leucovorin. **Journal of Chromatography B**, v. 898, p. 32-37, 2012.

PIERI, M. et al. Biological monitoring of nurses exposed to doxorubicin and epirubicin by a validated liquid chromatography/fluorescence detection method. **Annals of Occupational Hygiene**, v. 54, n. 4, p. 368-376, 2010.

PISANO, R. et al. Hydrophilic interaction liquid chromatography-APCI-mass spectrometry determination of 5-fluorouracil in plasma and tissues. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 38, p. 738-745, 2005.

RABII, F. W. et al. Determination of six chemotherapeutic agents in municipal wastewater using online solid-phase extraction coupled to liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Science of the Total Environment**, v. 487, p. 792-800, 2014.

RANDON, F. R. **Avaliação dos níveis de genotoxicidade e estresse oxidativo em manipuladores de quimioterápicos em serviços de oncologia**. 2006. 88 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade de Caxias do Sul, Caxias do Sul, 2006.

REMAUD, G. et al. Sensitive MS/MS–liquid chromatography assay for simultaneous determination of tegafur, 5-fluorouracil and 5-fluorodihydrouracil in plasma. **Journal of Chromatography B**, v. 824, p. 153-160, 2005.

RESENDE, R. C. et al. Determination of 5-fluorouracil in surface samples using SPE combined with HPLC- DAD. **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 30, n. 4, p. 737-745, 2011.

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

RODIN, I. et al. A validated LC–MS/MS method for rapid determination of methotrexate in human saliva and its application to an excretion evaluation study. **Journal of Chromatography B**, v. 937, p. 1-6, 2013.

RODRIGUES, V. C. **Desenvolvimento e validação de metodologia analítica para a determinação de fármacos em amostras de água, superficial e tratada, utilizando a cromatografia líquida de ultra-performance acoplada a espectrometria de massas Tandem (UPLC-MS/MS)**. 2011. 91 f. Dissertação (Mestrado em Ciências na Área de Tecnologia Nuclear-Materiais) – Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, Autarquia associada à Universidade de São Paulo, 2011.

SABATINI, L. et al. A new high-performance liquid chromatographic/ electrospray ionization tandem mass spectrometric method for the simultaneous determination of cyclophosphamide, methotrexate and 5-fluorouracil as markers of surface contamination for occupational exposure monitoring. **Journal of Mass Spectrometry**, v. 40, p. 669-674, 2005.

SANSON, A. L. et al. Liquid-liquid extraction combined with high performance liquid chromatography-diode array-ultra-violet for simultaneous determination of antineoplastic drugs in plasma. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 47, n. 2, p. 363-371, 2011.

SILVA, T. M. **Biossegurança e responsabilidade profissional dos trabalhadores de enfermagem no manuseio de quimioterápicos antineoplásicos sob a ótica da bioética.** 2003. 243 f. Tese (Doutorado em Enfermagem) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2003.

SILVA, L. F.; REIS, P. E. D. Avaliação do conhecimento da equipe de enfermagem sobre riscos ocupacionais na administração de quimioterápicos. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 56, n. 3, p. 311-320, 2010.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE FARMACÊUTICOS EM ONCOLOGIA (SOBRAFO). **Guia para o preparo seguro de agentes citotóxicos.** São Paulo: SOBRAFO, 2003.

SOTTANI, C. et al. Highly sensitive high-performance liquid chromatography/selective reaction monitoring mass spectrometry method for the determination of cyclophosphamide and ifosfamide in urine of health care workers exposed to antineoplastic agents. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 19, p. 2794-2800, 2005.

SOTTANI, C. et al. Simultaneous determination of gemcitabine, taxol, cyclophosphamide and ifosfamide in wipe samples by high-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry: protocol of validation and uncertainty of measurement. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 21, p. 1289-1296, 2007.

SOTTANI, C. et al. Simultaneous determination of cyclophosphamide, ifosfamide, doxorubicin, epirubicin and daunorubicin in human urine using high-performance liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry: bioanalytical method validation. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 22, p. 2645-2659, 2008.

SOTTANI, C. et al. An analysis to study trends in occupational exposure to antineoplastic drugs among health care workers. **Journal of Chromatography B**, v. 878, p. 2593-2605, 2010.

SOTTANI, C. et al. Occupational exposure to antineoplastic drugs in four Italian health care settings. **Toxicology Letters**, v. 213, n. 1, p. 107-115, 2011.

SOTTANI, C. et al. Simultaneous measurement of doxorubicin and reduced metabolite doxorubicinol by UHPLC–MS/MS in human plasma of HCC patients treated with TACE. **Journal of Chromatography B**, v. 915-916, p. 71-78, 2013.

SUSPIRO, A.; PRISTA, J. Exposição ocupacional a citostáticos e efeitos sobre a saúde. **Revista Portuguesa de Saúde Pública**, v. 30, n. 1, p. 76-88, 2012.

TSUME, Y.; PROVODA, C. J.; AMIDON, G. L. The achievement of mass balance by simultaneous quantification of floxuridine prodrug, floxuridine, 5-fluorouracil, 5-dihydrouracil, α -fluoro- β -ureidopropionate, α -fluoro- β -alanine using LC–MS. **Journal of Chromatography B**, v. 879, p. 915-920, 2011.

TURCI, R. et al. Biological monitoring of hospital personnel occupationally exposed to antineoplastic agentes. **Toxicology Letters**, v. 134, p. 57-64, 2002.

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

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

VENUTO, L. M. A. Desenvolvimento de método para a determinação simultânea de fármacos antineoplásicos por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE-UV) em matrizes não biológicas. **Infarma**, v. 21, n. 1/2, p. 11-22, 2009.

YAMADA, S. et al. Salvage chemotherapy with docetaxel, ifosfamide and nedaplatin (DIN) for patients with advanced germ cell tumors: a preliminary report. **Japanese Journal of Clinical Oncology**, v. 43, n. 7, p. 734-739, 2013.

YAMAGUCHI, H. et al. A rapid and sensitive LC/ESI–MS/MS method for quantitative analysis of docetaxel in human plasma and its application to a pharmacokinetic study. **Journal of Chromatography B**, v. 893-894, p. 157-161, 2012.

ZHANG, S.-Q. et al. Liquid chromatography–tandem mass spectrometry for the determination of paclitaxel in rat plasma after intravenous administration of poly(l-glutamic acid)-alanine-paclitaxel conjugate. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 51, p. 1169-1174, 2010.

ZHANG, W. et al. Quantitation of paclitaxel and its two major metabolites using a liquid chromatography–electrospray ionization tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography B**, v. 879, p. 2018-2022, 2011.

ZHOU, Q.; CHOWBAY, B. Determination of doxorubicin and its metabolites in rat serum and bile by LC: application to preclinical pharmacokinetic studies. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 30, n. 4, p. 1063-1074, 2002.