

**Faculdade de Farmácia  
Universidade Federal de Goiás**

**MONITORIZAÇÃO TERAPÊUTICA DO  
METOTREXATO SOB ALTAS DOSES, EM  
PACIENTES PORTADORES DE LEUCEMIA  
LINFOBLÁSTICA AGUDA**

Dissertação apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Goiás, para a obtenção do título de mestre em Ciências Farmacêuticas.

**Raphael Nunes Leles**

**Orientador: Prof. Dr. Luiz Carlos da Cunha**

**2008**

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)  
(GPT/BC/UFG)

**Leles, Raphael Nunes.**

**L539m Motorização terapêutica do metotrexato sob altas doses, em  
pacientes portadores de leucemia linfoblástica aguda  
[manuscrito] / Raphael Nunes Leles. – 2008.  
x,72 f. : il., color., figs., tabs.**

**Orientador: Prof. Dr. Luiz Carlos da Cunha.**

**Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Goiás,  
Faculdade de Farmácia, 2008.**

Bibliografia: f. 60-64.

**Inclui lista de figuras, tabelas, abreviaturas ou siglas.**

1. Leucemia linfoblástica aguda - Tratamento 2. Monitorização  
terapêutica 3. Metotrexato I.Título.

CDU: 616.15.5.392

Dedico este trabalho primeiramente a Deus, minha família, a minha namorada e aos meus eternos amigos, sem os quais não me seria possível realizar mais esse feito em minha vida. Este trabalho carrega um pouco de todos vocês também!



## **AGRADECIMENTOS**

“Pedras no caminho? Guardo todas... um dia, construirei um castelo!”

(Fernando Pessoa)

Agradeço primeiramente a Deus, inteligência máxima e causa primária de todas as coisas, por seu amor e dedicação a esse filho, as vezes rebelde, mas que sempre necessita de seu amor incondicional.

Agradeço a meu pai, Ginaldo Rossi Leles, pessoa da qual eu guardo todo o respeito e admiração, que eu tenho e sempre terei em meu intimo como uma exemplificação de esforço, dedicação, coragem e perseverança. Obrigado pela oportunidade de ser seu filho!

Agradeço a minha mãe, Lúcia Maria Nunes Leles, que sempre me apoiou nos momentos de dificuldade, e que esteve sempre ao meu lado em todos os momentos da minha vida, sempre com a solicitude e o amor característicos de sua alma elevada. Obrigado por tudo!

Agradeço a meus irmãos Rodrigo e Renan, pelo companheirismo, amizade, incentivo e apoio durante vários momentos de minha vida.

Agradeço a meus avós, tios, primos que colaboraram direta e indiretamente para todas as conquistas que eu obtive até hoje, estando presentes, quer pessoalmente, quer em pensamento e também em espírito (vovô Sebastião, sei que esta ao meu lado sempre!!). Obrigado!

À minha namorada e companheira, Ariane Moraes Torres, por todo seu amor, apoio e fundamentalmente por sua paciência e compreensão, e a toda sua família, Paulo, Rose, Talita, Marciel e Sofia, por todos os momentos de diversão e conversas que me proporcionam agradáveis e sonoras gargalhadas!

Aos meus verdadeiros amigos, que nunca deixaram de estar presentes em minha vida, independentemente do tempo ou da distancia, Paulo, Charles, Caio, João Paulo, Rodrigo, Rafael, Fábio, Larissa, Aline, Michele, Humberto, e vários outros que foram importantes não apenas neste momento da minha vida, mas em toda ela, e gostaria muito que vocês soubessem disso. Obrigado!

Ao professor doutor Luiz Carlos da Cunha, por ter acreditado em mim, desde o primeiro momento que conversamos a respeito de pós-graduação, que colaborou

de fora decisiva não apenas para minha formação acadêmica, mas também na minha formação

como ser humano, através de conversas e conselhos, de sugestões e observações sempre visando meu crescimento. Obrigado!

A todos os amigos do NEPET/UFG, Liuba, Marcelo, Polyana, Ricardo, Camila, pela valorosa contribuição nessa pesquisa e pela oportunidade de poder ter contado com sua amizade e apoio.

Agradeço ao sempre amigo Ricardo Rodrigues Bonfim, pelos conhecimentos passados acerca dos métodos analíticos empregados nesse trabalho, além das conversas a respeito de Deus, namoro, bateria... enfim, muito obrigado não apenas pelo conhecimento técnico, mas fundamentalmente pela sua amizade.

Agradeço a toda equipe médica e de enfermagem do Hospital Araújo Jorge/ACCG, na pessoa do Dr. César Bariani, por toda a solicitude e cooperação que possibilitaram a concretização desse trabalho.

Agradeço a todos os meus colegas do Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Goiás, pela convivência, pelo apoio e pela amizade que surgiu dentro de todos nós.

Agradeço às professoras Marize Campos Valadares Bozinis e Kênnia Rocha Rezende pela convivência em laboratório e pelos conselhos sempre muito importantes e que contribuíram muito para a realização desse trabalho.

Agradeço a todos os amigos do Grupo Espírita Regeneração, pelo apoio, convívio e preces.

Agradeço à secretária do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Sr<sup>a</sup> Fernanda Bellato, por toda dedicação e presteza no atendimento.

Agradeço a PRPPG/UFG pela bolsa de estudo concedida, a CAPES, CNPq e FUNAPE pela concessão e gestão dos recursos financeiros necessário para a execução dos trabalhos de pesquisa.





## SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	iv
LISTA DE TABELAS	vi
LISTA DE ABREVIATURAS OU SIGLAS	vii
RESUMO	ix
ABSTRACT	x
1. INTRODUÇÃO	01
2. REVISÃO DE LITERATURA	04
2.1. Metotrexato	
2.1.1. Aspectos físico-químicos.	04
2.1.2. Farmacodinâmica	04
2.1.3. Farmacocinética	
Absorção	06
Distribuição	07
Metabolismo	08
Excreção Renal	09
2.1.4. Aspectos Toxicológicos	12
2.2. Monitorização Terapêutica de Fármacos	14
2.2.1. Aplicações da farmacocinética clínica em monitorização terapêutica de drogas.	16
2.2.2. Conceito de Faixa Terapêutica.	17
2.3. A monitoração terapêutica no tratamento quimioterápico com metotrexato.	18
2.3.1. Fatores importantes na monitorização terapêutica do metotrexato	19
3. Objetivos	21
4. MATERIAIS E MÉTODOS	22
4.1- Materiais	
4.1.1 - Padrões	22
4.1.2 - Padrões de medicamentos	22
4.1.3 - Solventes	22
4.1.4 - Outros Materiais	22
4.1.5 – Sistema de HPLC	22
4.1.6 – Outros equipamentos	23
4.2 – Determinação por HPLC das concentrações de metotrexato em amostras de plasma de pacientes com LLA	
4.2.1 – Preparo das soluções contendo padrão	23
4.2.2 – Preparo das soluções contendo padrão de Medicamentos	24
4.2.3 – Condições cromatográficas	24
4.2.4 – Preparo da curva de calibração e das amostras	25
4.2.5 – validação de método cromatográfico por HPLC-PDA para a análise de metotrexato em plasma	26
4.2.5.1- Especificidade	27
4.2.5.2 - Recuperação	27
4.2.5.3 - Limites superior e inferior de quantificação	28
4.2.5.4 - Precisão e Exatidão	28
4.2.5.5 - Estabilidade de longa duração	29
4.2.5.6 – Curva de calibração	29
4.2.5.7 - Co-validação	30
4.2.5.8 - Estimativa de parâmetros de validação da coluna cromatográfica	30
4.3 - Estimativa dos parâmetros farmacocinéticos do metotrexato em pacientes com LLA	

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. molécula do metotrexato	04
Figura 2. Sistema de HPLC modelo LC-20A Prominence	23
Figura 3. Fluxograma demonstrativo das etapas para o desenvolvimento e a validação da técnica em HPLC-PDA para dosagem plasmática de MTX	34
Figura 4. Fluxograma demonstrativo das etapas para a extração das amostras da técnica em HPLC-PDA para dosagem de MTX plasmático	35
Figura 5: Cromatograma referente à análise das soluções de clorotefilina (conc.= 10 µg/mL;Tr= 8,8 min) e metotrexato (conc.= 10 µg/mL;Tr= 10,9 min); comprimento de onda de 275 nm; tampão acetato de sódio (pH 3,9):ACN (88:12)	36
Figura 6: Cromatograma referente à análise das soluções de teofilina (conc.= 10 µg/mL; Tr= 5,0 min) e metotrexato (conc.= 10 µg/mL; Tr= 9,55 min); comprimento de onda de 275 nm; tampão acetato de sódio (pH 3,9):ACN (88:12)	37

Figura 7: Cromatograma referente à análise das soluções de teofilina (conc.= 10 µg/mL; Tr= 6,4 min) e metotrexato (conc.= 10 µg/mL; Tr= 8,15 min); comprimento de onda de 259 nm; Coluna C8, tampão acetato de sódio (pH 3,9):ACN (88:12)	38
Figura 8: Cromatograma referente à análise das soluções de teofilina (conc.= 10 µg/mL; Tr= 4,2 min) e metotrexato (conc.= 10 µg/mL; Tr= 5,75 min); comprimento de onda de 259 nm; Coluna C18, tampão acetato de sódio (pH 3,9):ACN (88:12)	39
Figura 9: Cromatograma referente à análise das soluções de teofilina (conc.= 10 µg/mL; Tr= 4,1 min) e metotrexato (conc.= 10 µg/mL; Tr= 8,3 min); comprimento de onda de 271 nm (vermelho) e 304 nm (preto); ácido acético 0,1%:metanol:acetonitrila	40
Figura 10: Cromatograma referente à análise da solução de cafeína (conc.= 10 µg/mL; Tr= 8,0 min); comprimento de onda de 271 nm (vermelho) e 304 nm (preto); ácido acético 0,1%:metanol:acetonitrila	41
figura 11: Cromatograma referente à análise da solução de furosemida (conc.= 10 µg/mL); comprimento de onda de 271 nm (vermelho) e 304 nm (preto); ácido acético 0,1%:metanol:acetonitrila	42
figura 12: Cromatograma referente à análise da solução de ondansetrona (conc.= 10 µg/mL); comprimento de onda de 271 nm (vermelho) e 304 nm (preto); ácido acético 0,1%:metanol:acetonitrila	42
figura 13: Cromatograma referente à análise da solução de dipirona (conc.= 10 µg/mL); comprimento de onda de 271 nm (vermelho) e 304 nm (preto); ácido acético 0,1%:metanol:acetonitrila	43
figura 14: Cromatograma referente à análise da solução de ácido fólico (conc.= 10 µg/mL; Tr= 8,8 min); comprimento de onda de 271 nm (vermelho) e 304 nm (preto); ácido acético 0,1%:metanol:acetonitrila	43
figura 15: Cromatograma referente à análise da solução de dimenidrato (conc.= 10 µg/mL); comprimento de onda de 271 nm (vermelho) e 304 nm (preto); ácido acético 0,1%:metanol:acetonitrila	44
figura 16: Cromatograma referente à análise da solução de mercaptopurina (conc.= 10 µg/mL); comprimento de onda de 271 nm (vermelho) e 304 nm (preto); ácido acético 0,1%:metanol:acetonitrila	44
figura 17: Cromatograma referente à análise de plasma branco; comprimento de onda de 271 nm (vermelho) e 304 nm (preto); ácido acético 0,1%:metanol:acetonitrila	45
figura 18: Cromatograma referente à análise da solução de LIQ (conc.= 0,1 µg/mL; Tr= 8,60 min); comprimento de onda de 271 nm (vermelho) e 304 nm (preto); ácido acético 0,1%:metanol:acetonitrila.	48
figura 19: Cromatograma referente à análise de plasma branco; comprimento de onda de 271 nm (vermelho) e 304 nm (preto); ácido acético 0,1%:metanol:acetonitrila.	48
Figura 20. Curva de calibração obtida para a técnica analítica de metotrexato por HPLC	52

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Regime de resgate com ácido folínico, padronizado pelo St. Jude's Research Hospital, para pacientes de alto risco	11
Tabela 2. Reações adversas provocadas pelo metotrexato, distribuídas por sintomatologia e órgãos-alvo	13
Tabela 3. Fármacos que afetam a farmacocinética do metotrexato	14
Tabela 4. Recuperação do metotrexato, para a técnica desenvolvida em HPLC-PDA.	46
Tabela 5. Valores de precisão e exatidão da técnica analítica desenvolvida para o metotrexato.	49
Tabela 6. Valores de estabilidade de longa duração para o metotrexato.	51

Tabela 7. Valores obtidos durante a co-validação da técnica analítica.	53
Tabela 8. Dose e concentração plasmática do metotrexato	56
Tabela 9. Parâmetros farmacocinéticos estimados para o metotrexato	56

## LISTA DE ABREVIATURAS OU SIGLAS

7OHMTX	7-hidroximetotrexato
ACCG	Associação de Combate ao Câncer em Goiás
ANVISA	Agencia Nacional de Vigilância Sanitária
APA	Ácido 4-amino-4-desoxi-N <sup>10</sup> -metilpteróico
ASC <sub>t</sub> /AUC <sub>t</sub>	Área sob a curva total
C <sub>esp</sub>	Concentração esperada
Cl <sub>t</sub>	Clearance total
C <sub>max</sub>	Concentração maxima
C <sub>min</sub>	Concentração minima
C <sub>obtida</sub>	Concentração obtida
CQA	Controle de qualidade alto
CQB	Controle de qualidade baixo
CQM	Controle de qualidade médio
D	Dalton
DAMPA	Ác. 2-4 diamino-N <sup>10</sup> -metilpteróico

DHFR	Diidrofolato-redutase
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DP	Desvio padrão
EDTA	Ácido Etileno Diamino Tetra Acético
FPGS	Folil poliglutamato sintetase
GO	Goiás
HPLC	High-performance liquid chromatography
$K_{el}$	Constante de eliminação
LID	Limite inferior de detecção
LIQ	Limite inferior de quantificação
LLA	Leucemia linfoblástica aguda
LSQ	Limite superior de quantificação
MTF	Monitoramento terapêutico de fármacos
MTX	Metotrexato
NEPET	Núcleo de Estudos e Pesquisas Tóxico- Farmacológicas
PDA	Photodiode array
PM	Peso molecular
Rpm	Rotações por minuto
SNC	Sistema nervoso central
$t_{(1/2)\beta}$	Tempo de meia vida de eliminação
TGI	Trato gastro-intestinal
$T_{max}$	Tempo para atingir a concentração máxima
TR	Tempo de retenção
UFG	Universidade Federal de Goiás
UV	Ultra-violeta
Vd	Volume de distribuição

## RESUMO

O metotrexato (MTX) é um fármaco de elevada toxicidade utilizado em doses geralmente elevadas, no tratamento de neoplasias. Concentrações terapêuticas preservam a eficácia, porém valores acima elevam o risco de intoxicação. Assim o presente trabalho objetivou desenvolver e validar uma técnica analítica em HPLC-PDA para dosagem do metotrexato em plasma, e monitorar seus níveis plasmáticos em crianças com LLA. A técnica analítica foi desenvolvida apresentando fase móvel contendo ácido acético 0,1%:acetonitrila:metanol em diferentes proporções durante a corrida. Utilizamos como parâmetros de validação a especificidade, recuperação, limites inferior (LIQ) e superior (LSQ) de quantificação, precisão, exatidão, estabilidade de longa duração, curva de calibração e co-validação. O material utilizado na realização desse trabalho foi coletado de pacientes Internados no Hospital Araújo Jorge (ACCG), totalizando 42 amostras de plasma, provenientes de 7 pacientes, para estabelecimento de parâmetros farmacocinéticos. Como resultados obtivemos como condições de análise um fluxo de 1,5 mL/min, com detecção do metotrexato e da teofilina em 304 e 271 nm respectivamente, em 13 minutos de corrida. A técnica analítica apresentou recuperação média de 71%, um LIQ de 0,1 µg/mL, como precisão um coeficiente de variação médio de 11% para o LIQ, e máximo de 14,88% para os demais pontos, valor de exatidão médio de 97,63%, demonstramos a estabilidade do fármaco em plasma humano quando congelado a -20°C, não obtendo variação maior do que 15% na co-validação. Como parâmetros farmacocinéticos obtivemos *clearance* total médio de 3,03 L/h, constante

de eliminação média de  $0,2586 \text{ h}^{-1}$ , volume de distribuição médio de 12,57 L, tempo médio de meia vida de 2,73 horas, área sob a curva média equivalendo a 626,493  $\mu\text{gh/mL}$ . Como conclusão, a técnica analítica mostrou-se bastante eficaz para a detecção e quantificação do fármaco, e observamos uma grande variabilidade dos parâmetros farmacocinéticos, o que comprova a necessidade de se realizar a monitoração terapêutica.

## ABSTRACT

Methotrexate (MTX) is a drug with high toxicity, used in high doses for the treatment of neoplastic diseases. Therapeutic concentrations preserve the effectiveness, but higher values increases the toxicity risks. The aim of this article was to develop and validate an analytical method on HPLC-PDA to measure methotrexate plasma levels on children affected by LLA. The analytical method was performed with a mobile phase composed by acetic acid 0,1%:methanol:acetonitrile in concentration gradients during the analysis. The validation parameters were: specificity, relative recovery, lowest (LLQ) and higher limits of quantification, precision (Intra-assay standard deviation), accuracy, log time stability, calibration curve and co-validation. Biological samples were collected from 7 patients hospitalized on Araújo Jorge Hospital totaling 42 blood samples used to estimate the pharmacokinetic parameters. As results we obtained a method with a flow-rate of 1.5 mL/min, the methotrexate and teophyllin detection were observed in 304 and 271 nm respectively, in 13 minutes of carryover. The relative recovery was about 71%, LLQ about 0,1  $\mu\text{g/ML}$ . Intra-assay standard deviation was 11% for LLQ and no more than 14,88% for other concentrations; the accuracy was 97,63% and the long time stability was confirmed in human blood with a  $-20^\circ \text{ C}$  freezing. As pharmacokinetic parameters, we estimate the total *clearance* (3,03 L/h), constant of elimination ( $0,2586 \text{ h}^{-1}$ ), a distribution volume of 12,57 L, half-life time as 2,73 h and median  $\text{AUC}_T$  (for area under the time

vs concentration curve) of 626,493  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . As conclusion, the analytical method proved to be high efficient to detect and to quantify the drug on human blood, and we observed the high variability of the pharmacokinetic parameters, showing the importance of realize the therapeutic drug monitoring.

## 1. INTRODUÇÃO

A leucemia linfóide aguda (LLA) é o tipo mais comum de câncer infantil, e representa um terço do número total de neoplasias infantis, sendo que nos Estados Unidos da América do Norte, a taxa de incidência é de cerca de 3,4 casos por 100.000 crianças menores de 15 anos, com pico de incidência entre três e quatro anos de idade, sendo mais comum em crianças brancas e do sexo masculino (Pedrosa & Lins, 2002).

É caracterizada por um distúrbio maligno de células progenitoras de linhagem linfóide, cuja patogenia encontra-se ainda indefinida, mas sabe-se que envolve mecanismos de translocações cromossômicas, além de outros tipos de lesões genéticas.

Sua classificação tem como base os vários níveis de diferenciação observados em células-B e células-T sanguíneas, sendo que os achados de maior relevância terapêutica são células-T, células-B maduras e os fenótipos de precursores de células-B (Ching-Hon Pui et al, 2008).

Os primeiros medicamentos citotóxicos a serem introduzidos na terapia para leucemias foram os agentes alquilantes, no ano de 1943, sendo a aminopterina o primeiro agente efetivo a ser empregado no tratamento da LLA. A década de 50 marcou a introdução de duas novas classes de fármacos no tratamento da LLA: os corticosteróides e as antipurinas. Posteriormente, na década de 60, foi demonstrado que a vincristina, um alcalóide da vinca, era capaz de produzir remissão da LLA (Pedrosa & Lins, 2002).

Um regime de tratamento com quatro medicamentos foi desenvolvido no início dos anos 60, cuja finalidade seria unir os efeitos terapêuticos de cada um, sem que houvesse o somatório de seus efeitos tóxicos, além da introdução do tratamento específico para o sistema nervoso central, na tentativa de evitar a recaída meníngea. Também nessa época foi observada a importância de se prolongar o tratamento da LLA por um período de dois a três anos, originando a fase do tratamento conhecida como fase de manutenção (Pedrosa & Lins, 2002).

Atualmente, o tratamento da LLA sofre algumas alterações de protocolo, entre os hospitais especializados; porém, de forma geral, é um tratamento que se prolonga de dois a três anos, apresentando cinco grandes fases bem definidas, que são: indução da remissão, intensificação-consolidação, reindução, prevenção da

leucemia no sistema nervoso central (SNC) e continuação ou manutenção da remissão. Na fase de indução, cujo efeito esperado é a erradicação das células malignas, geralmente utiliza-se três a quatro medicamentos, dentre eles a vincristina, os corticosteróides, a L-asparaginase e a daunoblastina. A fase de intensificação-consolidação tem como objetivo a erradicação de células leucêmicas residuais, enquanto que a fase de prevenção de recaída leucêmica no sistema nervoso central é importante, já que as células malignas apresentam um tropismo pelo SNC, e normalmente empregam-se protocolos de quimioterapia intratecal associada com radioterapia do crânio. Na fase de manutenção utiliza-se terapia com doses-padrão de 6-mercaptopurina e metotrexato (MTX) (Pedrosa & Lins, 2002).

Em um intervalo de meio século, grandes avanços foram feitos no tratamento das leucemias, que evoluíram de doenças universalmente fatais para uma taxa de remissão completa que pode chegar a cerca de 98%, apesar de o tratamento ainda apresentar problemas com relação à toxicidade potencial relacionada tanto a procedimentos empregados, como no caso da radioterapia do crânio, quanto de medicamentos utilizados na terapia, como no caso do metotrexato (Pedrosa & Lins, 2002).

O metotrexato, devido ao seu baixo índice terapêutico e, portanto, alto potencial de toxicidade, deve ter administração e acompanhamento criteriosos, necessitando de avaliação tanto da eficácia, quanto da tolerância e toxicidade em decorrência de sua utilização terapêutica.

Apesar de existir relação dose-efeito ou concentração-efeito bem definida para este fármaco, algumas situações clínicas como nefropatias, cardiopatias e hepatopatias, bem como grupos específicos de pacientes como pacientes pediátricos, neonatos, gestantes, idosos, pacientes psiquiátricos, pacientes submetidos a tratamentos com múltiplos medicamentos, pacientes sob uso de medicamentos indutores e inibidores enzimáticos, fumantes, alcoolistas e, atualmente, os pacientes imunodeprimidos necessitam, e justificam, um controle ainda mais rigoroso de suas concentrações plasmáticas (Evans et al, 1986; Gibaldi, 1984; Young et al, 1989; Winter, 1992; Hallworth & Capps, 1993; Gram, 2001).

Os pacientes que utilizam MTX, em nosso meio, raramente fazem doseamento plasmático do mesmo, visando melhorar a farmacoterapia. Desta forma, o perfil de concentrações plasmáticas do MTX é desconhecido, sendo que quaisquer ajustes de doses são realizados empiricamente, confiando na experiência

clínica e em protocolos pré-estabelecidos, desconsiderando as variações interindividuais.

Neste trabalho, destacamos a monitoração terapêutica do metotrexato (MTX), resgatando alguns aspectos farmacológicos e finalizando com o objetivo de padronizar técnica analítica em HPLC-PDA, e o estabelecimento de parâmetros farmacocinéticos para possibilitar o acompanhamento de pacientes sob tratamento.

A cromatografia líquida de alta eficiência é um método analítico que se baseia na separação de compostos através da interação desses com um sistema de fases móvel, que esta no estado líquido, e estacionária, que pode ser líquida ou sólida, podendo ser combinadas de várias formas possíveis, para se obter como produto final uma análise em um menor intervalo de tempo, de fácil execução e que apresente um alto índice de especificidade e sensibilidade, de acordo com o detector utilizado (Skoog et al, 2002).

De acordo com suas propriedades químicas, o MTX presente em várias amostras biológicas (plasma, soro, saliva, urina, fluido cérebro-espinhal, espécimes de tecidos) pode ser extraído, separado e detectado sob uma variedade de condições cromatográficas, isto é, em diferentes fases estacionárias, sob uma larga escolha de fases móveis (ácida ou neutra, empregando íon-par ou cromatografia micelar) seguido de várias técnicas de detecção como: UV-Vis, espectrofotometria, pré- ou pós-coluna de oxidação e fluorimetria, eletroquímica, espectrofotometria de massas e outras (Rubino, 2001).

A grande maioria dos trabalhos publicados cita a utilização do detector de UV-espectrofotometria na região do visível, devido às características da molécula do metotrexato, que apresenta um grupamento pterina heteroaromático cromóforo, e possui absorvância máxima dependente do pH da fase móvel empregada na análise, que de forma geral pode variar de 303 a 313 nm (Rubino, 2001).

O detector de UV do tipo PDA (*photodiode array* ou detector de arranjo de diodos), devido à sua capacidade de promover uma varredura completa em uma determinada faixa de comprimento de onda (200 a 800 nm), permite assim monitorar vários comprimentos de onda diferentes, em uma só corrida cromatográfica, além de possibilitar uma identificação precisa de uma substância qualquer através da análise de seu espectro de UV, representando um aumento de especificidade (Palmisano, et al, 1989; Kiffmeyer, et al, 1998).



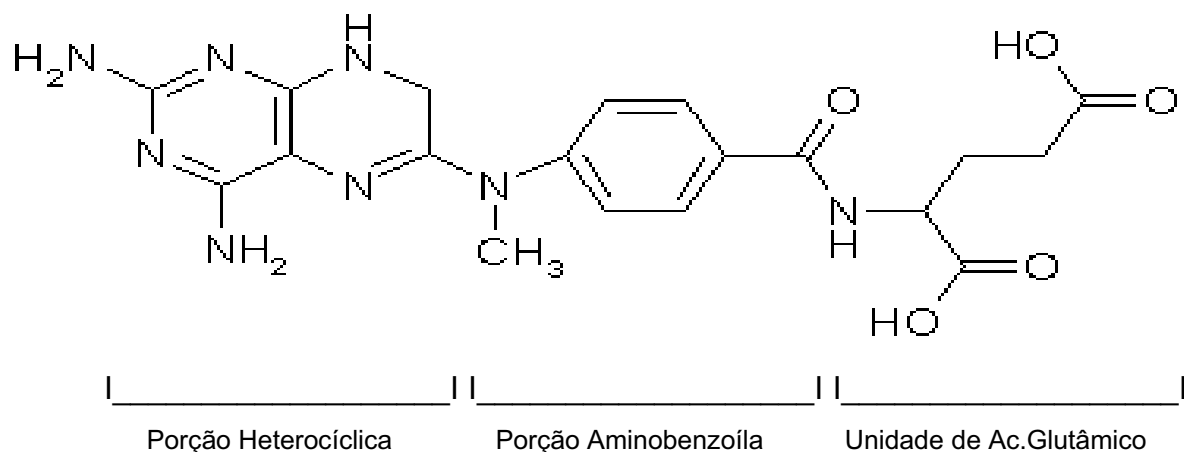
## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1. METOTREXATO

#### 2.1.1. Aspectos físico-químicos.

O metotrexato é um análogo do ácido fólico, quimicamente é um ácido dicarboxílico fraco com valor de pKa de 4,8 a 5,5 e PM de 454 D. A solubilidade em água é pH dependente, variando de 0,9 mM em pH 5 à 20 mM em pH 7. A molécula (Figura 1) é constituída por uma porção heterocíclica (um anel pteridínico 2-4 diamino substituído) ligada a uma porção aminobenzoíla que, através de uma ligação amida, liga-se à uma unidade de ácido glutâmico (porção dicarboxílica).

Figura 1.



#### 2.1.2. Farmacodinâmica

O metotrexato, em pH fisiológico, está predominantemente na forma ionizada, portanto, somente após atingir altas concentrações plasmáticas é que se torna capaz de atravessar barreiras lipídicas, tais como hematoencefálica, hemato-testicular e hemato-ocular.

O metotrexato é classificado como antagonista do folato. Os folatos carregam grupos de 1 átomo de carbono necessários para a síntese de purina e ácido timidílico, imprescindíveis para a síntese de DNA e para a divisão celular. Quando adentram nas células, os folatos são reduzidos a tetraidrofolatos pela diidrofolato-

redutase (DHFR) e metabolizado a derivados poliglutamatos. Tais metabólitos são retidos pelas células e são capazes de transferir eficientemente o átomo de carbono para a síntese de purina.

Em concentrações menores que  $5 \times 10^{-6}$  M, o MTX entra na célula ativamente, sendo que em concentrações maiores, acumula passivamente no meio intracelular. O MTX compete com o diidrofolato pela ligação reversível à diidrofolato-redutase, bloqueando sua atividade impedindo e/ou diminuindo a síntese de RNA e DNA. Adicionalmente, a conversão de aminoácidos é bloqueada, inibindo a síntese protéica. O bloqueio completo da DHFR ocorre em altas concentrações de MTX livre intracelular, induzindo o bloqueio metabólico e acumulando diidrofolatos (Hallworth & Capps, 1993; Schumacher, 1995; Hardman & Limbird, 2003).

A redução da concentração extracelular de MTX promove a dissociação MTX-DHFR para manter o equilíbrio. O MTX é metabolizado intracelularmente pela folil poliglutamato sintetase (FPGS) a derivados poliglutamatos que aumentam de acordo com o tempo e a exposição à droga, resultando assim em retenção seletiva destes metabólitos ativos, que também se ligam à DHFR com afinidade igual ao MTX, porém têm uma dissociação mais lenta e persistem na célula apesar das concentrações extracelulares de MTX. Há prolongamento da citotoxicidade por inibição da timidilato sintase e outras enzimas envolvidas na síntese de purina (Hallworth & Capps, 1993; Schumacher, 1995; Hardman & Limbird, 2003).

O MTX tem atividade pronunciada em tecidos que apresentam rápida divisão celular por mitose (fase S e fase G, quando presente em altas concentrações). A citotoxicidade está relacionada à concentração e duração da exposição à droga, sendo que tecidos normais são mais sensíveis aos efeitos citotóxicos (Hallworth & Capps, 1993; Hardman & Limbird, 2003).

Quando há risco de toxicidade pelo MTX, administra-se ácido folínico (Leucovorin®), um ácido fraco de alta solubilidade aquosa que promove a recuperação, ou “resgate” da atividade celular, resultando na restauração de folatos reduzidos para a síntese de DNA. O ácido folínico interfere em vários níveis competitivamente para neutralizar a citotoxicidade do MTX (Hallworth & Capps, 1993; Schumacher, 1995; Hardman & Limbird, 2003), incluindo:

- Competição com o sistema carreador de membrana;
- Entrada na via do poliglutamato, prolongando o resgate intracelular;

- Aumento dose-dependente das concentrações de diidrofolatos intracelulares .

A administração deve ocorrer dentro de um período de até 36 h. Após 42-44 h, o ácido folínico parece não mais reverter a citotoxicidade do MTX e de outros antagonistas do ácido fólico, sendo que o “resgate” deve continuar até que a concentração de MTX esteja abaixo dos níveis citotóxicos (menor que  $5 \times 10^{-8}M$ ) (Hallworth & Capps, 1993; Schumacher, 1995; Hardman & Limbird, 2003).

A concentração de MTX deve ser quantificada diariamente em pacientes de alto risco e, para pacientes que recebem  $12 \text{ g/m}^2$ , recomenda-se que o resgate com ácido folínico deve começar após 20 h, enquanto aqueles que recebem  $1,5 \text{ g/m}^2$  devem iniciá-lo em 24 h, tendo como base a infusão completa do MTX.

### **2.1.3. Farmacocinética.**

#### **Absorção**

A absorção do MTX pelo trato gastrointestinal é dependente da dose administrada. Estudos em animais demonstraram que existe o sistema de transporte passivo e ativo pelo trato gastrointestinal (TGI), permitindo a variação de absorção dependendo das concentrações de MTX, que geralmente se encontram na faixa de  $10^{-7}M$ . A absorção oral do MTX é rápida, não apresentando variação diurna, com concentração detectável no soro após 30 minutos, e apresentando pico de concentração em torno de 1,5 h (Evans et al, 1986; Gibaldi, 1984; Young et al, 1989; Winter, 1992; Hallworth & Capps, 1993; Schumacher, 1995; Gram, 2001).

Triagens clínicas têm demonstrado que a biodisponibilidade oral de MTX, é variável e incompleta. Doses menores que  $30 \text{ mg/m}^2$  são completamente absorvidas, enquanto que doses maiores têm biodisponibilidade reduzida de 12 a 77% (dose menor que  $30 \text{ mg/m}^2$  pode chegar a até mais de 80%, enquanto que para uma dose maior que  $30 \text{ mg/m}^2$ , esse valor pode cair para menos de 25%), indicando que a diminuição na absorção tem, como possível causa, a saturação dos carreadores responsáveis pelo transporte ativo no TGI, além de outros fatores como alimentação, particularmente alimentos ricos em gorduras, e administração oral de antibióticos não absorvidos. Por via subcutânea apresenta uma biodisponibilidade de 100%, e por via intramuscular apresenta uma variação de 75

a 100% (Evans et al, 1986; Gibaldi, 1984; Young et al, 1989; Winter, 1992; Hallworth & Capps, 1993; Gram, 2001).

Após administração subcutânea a absorção do MTX é completa e comparável com a absorção por via oral em baixas doses (7,5 mg/m<sup>2</sup>), apresentando C<sub>max</sub> após 15 a 30 minutos da administração. Quando utilizado na dose de 40 mg/m<sup>2</sup>, o valor de concentração sérica de MTX é equivalente ao encontrado por via intravenosa, sofrendo redução de aproximadamente 40% desse valor quando administrado por via oral (Winter, 1992; Schumacher, 1995; Hardman & Limbird, 2003). Após a aplicação intramuscular, a concentração de MTX pode ser mensurada 15 min, atingindo C<sub>max</sub> em aproximadamente 1 h, apresentando biodisponibilidade de 75 a 100%, tanto em crianças quanto em adultos, indicando completa absorção e proporcionando altas e mais sustentáveis concentrações séricas quando comparadas com equivalentes doses orais de MTX.

O tempo para atingir a concentração máxima (T<sub>máx</sub>) também se mostra dependente da via de administração do fármaco, sendo que pela via peroral pode demorar de 1 a 3 h, enquanto que pela via subcutânea esse intervalo de tempo diminui para 0,25 a 0,5 h, e pela via intramuscular apresenta variação de 0,25 a 1,25 h (Winter, 1992; Schumacher, 1995; Hardman & Limbird, 2003).

## **Distribuição**

Após administração intravenosa, o MTX apresenta cinética linear e rapidamente se distribui para o compartimento extracelular. No estado de equilíbrio, o volume de distribuição (V<sub>d</sub>) aproxima-se do total de água do corpo. A meia-vida de distribuição ( $t_{1/2 \alpha}$ ) é de 0,45 a 2,0 h (Winter, 1992; Schumacher, 1995; Hardman & Limbird, 2003).

Distribuição e retenção dentro de “terceiro espaço”, tais como efusão pleural e fluido ascítico foi demonstrada. O MTX acumula-se lentamente nestes líquidos. O *clearance* da droga destes locais é mais devagar que o do plasma, resultando em depósitos de concentrações de MTX que podem exceder aquelas mensuradas no plasma durante a eliminação terminal. A baixa eliminação por estes fluidos locais coletados resultam em prolongamento da fase terminal da droga e contínua exposição ao MTX, o que resulta em significativa toxicidade (Winter, 1992; Schumacher, 1995; Hardman & Limbird, 2003).

O MTX que está ionizado no pH fisiológico não atravessa prontamente a barreira hemato-encefálica. A transferência para o SNC foi demonstrada após o aumento da dose e administração tanto por bolus ou infusão contínua. No estado de equilíbrio plasmático a relação entre concentração plasmática e líquido é de aproximadamente 30:1 durante infusão IV prolongada (Winter, 1992; Schumacher, 1995; Hardman & Limbird, 2003).

O Vd do MTX varia de acordo com a idade, sendo que apresenta valores médios de 1,1 L/kg (16,4 L/m<sup>2</sup>) em pacientes pediátricos, podendo variar de 0,5 a 1,0 L/kg em pacientes adultos, podendo chegar a 0,4 L/kg em pacientes obesos (Winter, 1992; Schumacher, 1995; Hardman & Limbird, 2003).

Possui ligação a proteínas plasmáticas (%B) da ordem de 50 a 70%. A concentração plasmática terapêutica mínima é da ordem de 1,0 µM, enquanto que a concentração plasmática considerada tóxica é aproximadamente 10 vezes maior do que a faixa terapêutica mínima (10 µM). O órgão mais sensível à toxicidade induzida pelo metotrexato é a medula óssea, cujas concentrações tóxicas plasmáticas seriam de 10 µM em 24 h, 1,0 µM em 48 h e 0,1 µM em 72 h (Winter, 1992; Schumacher, 1995; Hardman & Limbird, 2003), valores que funcionam como parâmetros a ser atingidos quando da monitoração terapêutica do fármaco.

## **Metabolismo**

O MTX tem três principais metabólitos: ácido 4-amino-4-desoxi-N<sup>10</sup>-metilopteróico (DAMPA), 7-hidroximetotrexato (7-OH-MTX) e MTX-poliglutamato. O DAMPA é formado por bactérias intestinais durante a circulação êntero-hepática, tendo atividade citotóxica aproximadamente 1/200 vezes menor que o MTX, promovendo contribuição mínima para a ação antineoplásica do MTX.

O MTX é oxidado a 7-OH-MTX pelo sistema microsomal hepático. A solubilidade aquosa deste metabólito é muito menor que os demais compostos parenterais e possivelmente contribui para a toxicidade renal do MTX. O 7-OH-MTX entra na célula por um sistema carreador de folato, reduzindo a quantidade intracelular relativa de MTX-poliglutamato e reduzindo a inibição de DHFR, já que O 7-OH-MTX não tem a mesma afinidade de ligação ao DHFR que o MTX. (Winter, 1992; Schumacher, 1995; Hardman & Limbird, 2003).

A farmacocinética do metabólito 7-OH-MTX foi descrita tanto em adulto quanto em criança em uma larga escala de doses de MTX. Com doses acima de 5 g/m<sup>2</sup>, apresentou pico de concentração de 7-OH-MTX de 7 a 21 μM, quando medido após 24 h da administração da droga. A concentração de 7-OH-MTX tipicamente excede a concentração nos fluidos parenterais no fim da infusão, com relação 7-OH-MTX/MTX de aproximadamente 8:1 nas primeiras 48 h após a infusão. O 7-OH-MTX tem declínio de sua biodisponibilidade demonstrado, com  $t_{1/2\alpha}$  e  $t_{1/2\beta}$  de aproximadamente 8 e 20 h, respectivamente.

Os mais importantes metabólitos do MTX são os derivados poliglutamínicos. Estes metabólitos são formados no meio intracelular pela enzima folil poliglutamato sintetase (FPGS) a qual catalisa a adição de 5 resíduos de glutamato para o glutamato terminal. Esta adição aumenta o tamanho da molécula e, desse modo, inibe o efluxo da droga para a célula. Estudos *in vitro* demonstraram que a formação do MTX-poliglutamato ocorre em função da concentração de MTX intracelular livre e da duração da exposição. Cadeias longas de poliglutamatos são desejáveis porque elas se ligam ao DHFR com igual ou maior afinidade que o MTX, sendo formadas somente depois de várias h de exposição ao MTX intracelular e pode representar aproximadamente 90% do MTX intracelular, em até 48 h. Estes metabólicos são retidos no meio intracelular apesar da concentração de MTX, desse modo contribuindo para manter a citotoxicidade susceptível à célula. Os parâmetros da farmacocinética dos derivados do MTX-poliglutamato ainda não foram descritos (Winter, 1992; Schumacher, 1995; Hardman & Limbird, 2003).

## **Excreção Renal**

A primeira via de eliminação do MTX é a excreção renal via filtração glomerular e secreção tubular ativa. Investigações clínicas demonstraram que mais de 90% da dose de MTX tem eliminação predominantemente renal dentro das primeiras 24 h. Pacientes com função renal reduzida têm, em função disto, mais riscos dos efeitos tóxicos. Foi demonstrada que a eliminação do MTX e do 7-OH-MTX é aumentada quando o pH da urina é mantido em torno de 6,5. Precipitação de MTX na urina foi observada quando o pH cai abaixo de 6,5, e pode representar um mecanismo para indução da toxicidade renal do MTX. Mantendo adequada hidratação e alcalinização urinária com bicarbonato de sódio oral ou intravenoso, ou

com acetazolamida triidratada, para manter o pH urinário maior que 6,5 provou ter efeitos preventivos contra toxicidade renal do MTX (Winter, 1992; Schumacher, 1995; Hardman & Limbird, 2003).

De acordo com a terapia de altas doses, a eliminação do MTX é bifásica sendo que a fase  $\beta$  representa a eliminação renal e a posterior fase monolínear gama representa a liberação da droga dos tecidos profundos. Estudos demonstraram aumento na variação de dez vezes o *clearance* de MTX na população. A meia-vida de eliminação rápida,  $t_{1/2\beta}$ , via IV, é de 3 a 5 h, já que o MTX apresenta modelo tricompartmental aberto, sendo a  $t_{1/2\gamma}$ , de 8 a 26 h e representa a redistribuição de tecidos profundos e dos sítios de ação. A fase terminal da eliminação tem sido correlacionada com a toxicidade do MTX (Winter, 1992; Schumacher, 1995; Hardman & Limbird, 2003).

A eliminação do MTX via intratecal foi descrita como bifásica, com meia vida de 4,5 e 12 a 18 h. O MTX é eliminado do fluido cérebro-espinhal por transporte ativo. Queda do *clearance* foi demonstrada em pacientes com leucemia meníngea e em pacientes mais velhos, favorecendo ao aparecimento de manifestações tóxicas.

A eliminação do fármaco presente no “terceiro espaço”, tanto pleural quanto pelos fluidos ascíticos, foi relatada como sendo relativamente mais prolongada que a eliminação do MTX do soro. Um investigador observou uma meia vida de eliminação de 27,3 h para fluido pleural comparada com 9,2 h para plasma (Winter, 1992; Schumacher, 1995; Hardman & Limbird, 2003).

Um caminho menor de eliminação do MTX inclui a secreção biliar com excreção fecal. Esta rota representa menos de 10% da dose administrada. Embora a eliminação renal não possa ser considerada clinicamente insignificante para baixas doses de tratamento, em pacientes que recebem altas doses de terapia com redução do tempo do trânsito do TGI ou íleo, podem apresentar concentrações no TGI com potencial para induzir toxicidade, provocando prolongamento do *clearance* e aumento do risco do surgimento de efeitos tóxicos.

O uso de hemodiálise para remover o MTX encontrou sucesso limitado. Diálise peritoneal foi comprovadamente ineficiente devido a ionização em pH fisiológico. A combinação de hemoperfusão com filtros de carvão ativado e hemodiálise teve sucesso no emprego da remoção de MTX em pacientes com concentrações plasmáticas maiores que 574  $\mu\text{M}$ , sendo que pacientes que

receberam a combinação de hemodiálise e hemoperfusão tiveram diminuição da morbidade, quando este procedimento foi utilizado juntamente com o ácido fólico e terapia oral com carvão ativado para remoção de MTX (Winter, 1992; Schumacher, 1995; Hardman & Limbird, 2003).

A meia-vida pode ser caracterizada em 3 momentos distintos, como: meia-vida de distribuição ( $t_{(1/2)\alpha}$ ), variando de 0,03 a 0,13 h, ou pode variar de 0,45 a 2,0 h; meia-vida de eliminação rápida ( $t_{(1/2)\beta}$ ), que pode variar de 0,9 a 4 h, ou ter valor estimado em 5,5 h, exceção feita para pacientes obesos que pode chegar a 9,3 h; meia-vida de eliminação lenta ( $t_{(1/2)\gamma}$ ) na ordem de 5,3 a 15 h, e 11 a 20 h para pacientes pediátricos e adultos respectivamente (Winter, 1992; Schumacher, 1995; Hardman & Limbird, 2003).

A constante de eliminação foi estimada para pacientes pediátricos, chegando-se ao valor de  $0,578 \text{ h}^{-1}$ , pouco maior do que o valor para pacientes adultos que foi de  $0,306 \text{ h}^{-1}$ . A via de eliminação preferencial do metotrexato é a renal, com um percentual que vai de 44 a 100% do fármaco, na forma inalterada, seguido pela via hepática, de 10 a 40%, resultando em um *clearance* total de aproximadamente  $100 \text{ mL/min/m}^2$  para pacientes pediátricos e  $71 \text{ mL/min/m}^2$  ( $2,3 \text{ mL/min/kg}$ ) para pacientes adultos; no entanto pacientes obesos podem apresentar um *clearance* total diminuído, estando em cerca de  $1,6 \text{ mL/min/kg}$ . (Winter, 1992; Schumacher, 1995; Hardman & Limbird, 2003).

Os dados de concentração plasmática de MTX e as respectivas doses de ácido fólico utilizadas para o resgate dos pacientes de alto risco, de forma padronizada, pelo St. Jude's Research Hospital e encontram expostos na Tabela 1.

**Tabela 1.** Regime de resgate com ácido fólico, padronizado pelo St. Jude's Research Hospital, para pacientes de alto risco (\*)

Concentração de metotrexato (mM)	Dose de ácido fólico (mg/m <sup>2</sup> )
90 – 100	1000 3/3 h iv
80 – 90	900 3/3 h iv
70 – 80	800 3/3 h iv
60 – 70	700 3/3 h iv
50 – 60	600 3/3 h iv
40 – 50	500 3/3 h iv
30 – 40	400 3/3 h iv
20 – 30	300 3/3 h iv
15 – 20	200 3/3 h iv
10 – 15	150 3/3 h iv
5 – 10	100 3/3 h iv

2 – 5	50 6/6 h iv
1 – 2	25 6/6 h iv ou p.o.
0,5 – 1,0	15 6/6 h iv ou p.o.
0,1 – 0,5	15 12/12 h iv ou p.o.
0,05 – 0,1	5 12/12 h p.o. ou iv
< 0,05	suspender

**Ref.: 1.** Schumacher, G.E. Therapeutic Drug Monitoring (TDM), Appleton & Lange, p. 684, 1995.

**(\*) Pacientes de alto risco**

**12 g/m<sup>2</sup> MTX por 6 h**

Nível MTX 20<sup>a</sup> h > 10 µM

Nível MTX 24<sup>a</sup> h > 5 µM

Nível MTX 44<sup>a</sup> h > 1 µM

Meia-vida eliminação > 3,5 h

**1,5 g/m<sup>2</sup> MTX por 24 h**

Nível MTX 21<sup>a</sup> h > 2 µM

Nível MTX 0,8 h > 0,8 µM

#### **2.1.4. Aspectos Toxicológicos**

As reações adversas ao MTX são os mais importantes motivos para a monitoração das concentrações plasmáticas. Na Tabela 2, distribuem-se as reações adversas ao MTX por sintomatologia, início e duração dos sintomas, eficiência do resgate com o ácido folínico e comentários sobre características particulares de cada reação adversa (Winter, 1992; Schumacher, 1995; Hardman & Limbird, 2003).

Os fatores de risco incluem pouca hidratação, pH ácido da urina, desidratação com vômito e diarreia, pouca função renal, obstrução intestinal e presença de um “terceiro espaço” (pleural, efusão ou ascite), e nem sempre esses efeitos tóxicos estão relacionados ao antagonismo de folatos, ou são reversíveis com a administração do ácido folínico (Winter, 1992; Schumacher, 1995; Hardman & Limbird, 2003).

**Tabela 2.** Reações adversas provocadas pelo metotrexato, distribuídas por sintomatologia e órgãos-alvo (Hardman & Limbird, 2003; Schumacher, 1995).

Tipo de sintomas	Início/ Duração	Leucovorin é eficiente?	Comentários
Gastrointestinal (Náusea, vômito)	1-3 d	Não	A incidência pode chegar a 40%. Evita-se com terapêutica anti-emética. A desidratação devido ao vômito pode potencializar a toxicidade do MTX.
Diarréia	1-3 d	Sim	Hidratação adequada evita toxicidade por MTX.
Toxicidade dermatológica	1-5 d	Não	<i>Rashes</i> pós-administração de altas doses de MTX: erupções maculopapulares eritematosas transitórias moderadas, exacerbações de acne, vasculites, dermatite exfoliativa, reativação de queimadura pelo sol e por radiação.
Nefrotoxicidade	1-7 d	Não	Manifestação: aumento de uréia/creatinina e diminuição do clearance do MTX; pode ser resultado de precipitação do MTX ou metabólitos na urina; é evitada com alcalinização da urina para manter pH > 6,5 e vigorosa hidratação (3000 mL/m <sup>2</sup> /dia).
Toxicidade hepática aguda	1-10 d	Não	Elevações transitórias nas transaminases; pode estar associado com hiperbilirrubinemia; o retorno a níveis basais pode se dar em 2 semanas.
Mucosite	3-7 d	Sim	Manter boa higiene oral e tratamento de suporte.
Conjuntivite	2-7 d	Não	Queimação, prurido, "olhos secos"; pode ser tratado com lubrificantes tópicos; etiologia: MTX insolúvel no fluido lacrimal.
Mielossupressão	7-14 d	Sim	Tratamento de suporte por fatores estimulantes de colônias de leucócitos em mielossupressão prolongada.
Síndrome neurológica transitória	6-20 d	Não esclarecido	Rara; pode se manifestar por hemiplegia, disfunções da fala, convulsões, status epilepticus, paralisia ascendente. Resolução em 1-7 dias. Administração intratecal pode resultar em meningismos, tremores, cefalalgia, febre.
Leucoencefalopatia crônica	Meses a anos	Não esclarecido	Rara, envolve toxicidade. Clinicamente, manifesta-se como letargia, demência progressiva, convulsões, espasticidade; irradiação craniana, administração sistêmica e intratecal de MTX e doses cumulativas de MTX pode aumentar o risco. Pode ser fatal.

Alguns medicamentos, quando em associação com o MTX, aumentam as chances de alteração das concentrações plasmáticas, devido à interferência na cinética do mesmo, especialmente com relação à excreção renal e metabolismo, estando as mais importantes destacadas na Tabela 3 (Hardman & Limbird, 2003; Schumacher, 1995).

**Tabela 3.** Fármacos que afetam a farmacocinética do metotrexato

<b>Agente</b>	<b>Mecanismo Interativo</b>	<b>Comentários</b>
Aspirina	➤ Diminuição do clearance renal por competição com o transporte tubular renal (secreção tubular ativa).	Pode aumentar a exposição ao 7-OH-MTX
Probenecida	➤ Diminui a ligação protéica do MTX ➤ Diminui a excreção renal do MTX	Ácidos orgânicos fracos competem pelo transporte tubular renal, resultando em reabsorção do metotrexato.
Antibióticos não-absorvíveis	➤ Diminui a secreção biliar ➤ Diminui a absorção oral do MTX em aproximadamente 35% ➤ Diminui o metabolismo gastrointestinal	
Sulfonamidas	➤ Diminui a ligação protéica, resultando em aumento da fração livre o MTX ➤ Diminui o clearance do MTX livre ➤ Possível toxicidade hematológica aditiva	De modo geral, resulta em um aumento aproximado de 66% na exposição sistêmica ao MTX
AINES (anitiinflamatórios não-esteroidais)	➤ Diminui o clearance renal por: a) inibição da perfusão renal mediada por prostaglandina; b) competição pela secreção tubular renal; c) desligamento do MTX das proteínas plasmáticas.	
Penicilinas	➤ Diminuição do clearance renal por competição com o transporte tubular renal (secreção tubular ativa).	
5-Fluorouracil	➤ Citotoxicidade sinérgica quando administrada após o MTX	
Cisplatina	➤ Diminui a eliminação renal via toxicidade renal induzida por cisplatina e danos residuais	Tratamento prévio com cisplatina é um fator de risco no prolongamento da eliminação do MTX
Colestiramina	➤ Aumenta a eliminação biliar do MTX	Pode ter reduzido significado clínico, já que a excreção biliar é uma via de eliminação de menor importância
Carvão ativado	➤ Aceleração da velocidade de eliminação do MTX pela interrupção da circulação êntero-hepática	Pode ser utilizado em combinação com hemodiálise/hemoperfusão.

## 2.2. MONITORAÇÃO TERAPÊUTICA DE FÁRMACOS.

A monitoração terapêutica de fármacos, aqui conceituada como sendo todos os recursos utilizados para melhorar a aderência do paciente ao tratamento medicamentoso, evitar ineficácia e evitar ou diminuir a incidência de reações adversas graves, apresentando como ferramentas importantes para sua realização a determinação da concentração plasmática de fármacos e a medida de variáveis fisiológicas e bioquímicas decorrentes de sua ação (Gram, 2001).

A monitoração terapêutica de fármacos (MTF) auxilia ainda na averiguação da aderência ao tratamento farmacológico, o que facilita o acompanhamento de

todos os pacientes que necessitam se submeter a tratamentos medicamentosos crônicos (Young et al, 1989).

Para realizar MTF, é necessário assumir alguns aspectos teóricos como racionalização farmacológica e clínica, documentação científica e implementação prática, respeitando as bases teóricas e científicas, o que acaba restringindo esse procedimento a uma pequena fração de fármacos disponíveis.

Dentre os critérios indicativos para a necessidade de desenvolver protocolos de MTF, destacam-se: estreito intervalo terapêutico do fármaco, existência de muitas e significativas variáveis farmacocinéticas na população, quando as consequências de falha terapêutica forem graves, quando concentrações terapêuticas são bem conhecidas e quando existirem técnicas analíticas disponíveis e de fácil aplicação (Hallworth & Capps, 1993).

Sendo assim há, relativamente, poucos fármacos que, efetivamente, merecem ser submetidos à monitoração das concentrações plasmáticas, dentre os quais destacamos alguns fármacos antibióticos como a amicacina, gentamicina, tobramicina, vancomicina, cloranfenicol; cardiovasculares como a amiodarona + DEA, propranolol, sotalol, lidocaína, digoxina, digitoxina, verapamil, quinidina, procainamida + NAPA, nifedipina; imunossupressores como a ciclosporina A e antineoplásicos como o metotrexato (Hallworth & Capps, 1993; Gram, 2001).

A teoria de que a concentração sanguínea reflete ou prediz a concentração tecidual/receptor e os alvos clínicos, requer que consideremos algumas variáveis, tais como flutuação das concentrações, ligação protéica, metabólitos ativos, estereosseletividade, etc (Gram, 2001; Deveaux et al, 1997). Geralmente, assume-se uma razão relativamente constante entre as concentrações sanguíneas e tecido/receptor, mas a importante função das proteínas transportadoras, com variabilidade inter e intra-indivíduo devido ao polimorfismo, indutores e inibidores, modifica seriamente estas premissas básicas.

A relação concentração-efeito é relacionada a grupos de pacientes e indica a probabilidade de uma dada resposta, seja ela terapêutica ou tóxica, a uma dada concentração.

Estudos de dose-efeito e concentração-efeito de fármacos como metotrexato, lítio e antidepressivos, têm demonstrado que curvas de dose-efeito ou concentração-efeito terapêutico e tolerabilidade têm resultado em sobreposição, sendo que estudos de dose-efeito, padrão no desenvolvimento de novos fármacos,

representam a única possibilidade de examinar a relação entre dose, concentração e efeito de novos fármacos (Gram, 2001).

A utilização da monitoração terapêutica das concentrações de determinado fármaco com vistas a reduzir a variabilidade da relação dose-efeito inter e intra-indivíduo está baseada em 3 hipóteses:

- A mensuração dos níveis da droga no paciente proporciona uma oportunidade para o ajuste nas variações farmacocinéticas através da individualização das dosagens;
- A concentração sérica da droga é melhor indicador da resposta terapêutica no paciente do que a dose;
- Existe uma boa correlação entre a concentração sérica da droga e a resposta farmacológica.

Considerando-se que na relação dose-resposta, a fase farmacocinética sofre maiores variações de paciente para paciente, enquanto que a fase farmacodinâmica, apesar de também estar sujeita a um número de fatores e variações individuais, é considerada bem menos variável, resultando que a fase farmacocinética, com certeza, proporciona uma concentração bem mais próxima ao resultado final em relação à dose administrada (Schumacher, 1995).

### **1.2.1. Aplicações da farmacocinética clínica em monitoração terapêutica de drogas.**

Na relação entre dose administrada, variáveis farmacocinéticas, concentração sérica e resposta farmacológica, as únicas variáveis passíveis do controle direto pelo esquema dose-resposta são: a quantidade da droga administrada e a freqüência das administrações. Estas variáveis podem ser manipuladas para compensarem as variáveis farmacocinéticas individuais, que escapam ao nosso controle, para a obtenção da concentração desejada. Se uma relação clara entre o nível sérico da droga e a resposta terapêutica for estabelecida, então será razoável definir uma terapia baseada nas concentrações séricas, o que reduziria a influência das variações intra e interindividuais nas respostas farmacocinéticas e farmacodinâmicas.

Selecionar uma concentração de equilíbrio ideal é frequentemente referido como a utilização de uma “estratégia de concentração alvo. A concentração alvo

encontra-se dentro de uma faixa de concentrações efetivas e seguras, determinadas para uma população em geral (Evans et al, 1986; Gibaldi, 1984; Young et al, 1989; Winter, 1992; Hallworth & Capps, 1993; Schumacher, 1995; Gram, 2001).

Desta forma, assume-se que o paciente se comporta como a média dos membros de uma população com respeito à farmacocinética, nível sérico e resposta esperada, e utiliza-se a média dos parâmetros farmacocinéticos para calcular a dose necessária para encontrar a concentração alvo pretendida. Se após a administração do regime de dose até que a concentração de equilíbrio seja alcançada, o paciente estiver respondendo apropriadamente e a medida da concentração estiver dentro da faixa terapêutica (concentração alvo), nenhum ajuste é necessário. Se, entretanto, o paciente estiver com sinais de concentração subterapêutica ou efeitos tóxicos, devida à farmacocinética e farmacodinâmica atípica em relação à população, então a única alternativa será manipular as variáveis dose e frequência de administrações para trazer a resposta farmacológica e terapêutica dentro da faixa aceitável (Evans et al, 1986; Gibaldi, 1984; Young et al, 1989; Winter, 1992; Hallworth & Capps, 1993; Schumacher, 1995; Gram, 2001).

Geralmente, mas nem sempre, uma resposta segura e efetiva é conseguida após o ajuste do regime de dosagem para trazer a concentração sérica para a faixa de concentração alvo. Alguns pacientes entretanto, irão, seguramente, atingir a resposta abaixo ou acima da faixa de concentração alvo (Evans et al, 1986; Gibaldi, 1984; Young et al, 1989; Winter, 1992; Hallworth & Capps, 1993; Schumacher, 1995; Gram, 2001).

### **1.2.2. Conceito de Faixa Terapêutica.**

A noção de faixa terapêutica é mais um conceito probabilístico do que uma entidade absoluta. Para qualquer droga, existe uma faixa de concentrações séricas para as quais a maioria dos pacientes demonstrará uma resposta efetiva com um mínimo de efeitos colaterais e reações adversas. Embora a maioria dos pacientes não apresente boa resposta abaixo desta faixa, alguns pacientes responderão bem, da mesma forma que, apesar de a maioria dos pacientes demonstrarem sinais de vários graus de reações tóxicas acima desta faixa, alguns não irão sofrer efeitos deletérios (Evans et al, 1986; Gibaldi, 1984; Young et al, 1989; Winter, 1992; Hallworth & Capps, 1993; Schumacher, 1995; Gram, 2001).

Sendo assim, a faixa terapêutica é comumente referida como uma faixa de concentrações da droga dentre a qual a probabilidade de uma resposta clínica desejada é relativamente alta e a probabilidade de uma toxicidade inaceitável é relativamente baixa (Evans et al, 1986; Gibaldi, 1984; Young et al, 1989; Winter, 1992; Hallworth & Capps, 1993; Schumacher, 1995; Gram, 2001).

Do ponto de vista de monitoração de fármacos (MTF), a utilização da faixa terapêutica e concentração alvo de determinado fármaco terão significância, se estas forem bastante limitadas para o alcance de resultados efetivos e seguros na população, por apresentarem uma razoável variabilidade farmacocinética, justificando-se assim uma terapia utilizando-se regimes padrões de dosagens (Evans et al, 1986; Gibaldi, 1984; Young et al, 1989; Winter, 1992; Hallworth & Capps, 1993; Schumacher, 1995; Gram, 2001).

Portanto, conclui-se que para que um fármaco possa ser submetido ao processo de MTF, deve apresentar algumas características, a saber:

- O fármaco deve possuir um estreito índice terapêutico;
- Haver significativa variabilidade farmacocinética dentro da população;
- As conseqüências de uma falha terapêutica sejam graves;
- A faixa de concentração terapêutica deve ser conhecida;
- Pronta disponibilidade de tecnologia de ensaios analíticos para o referido fármaco.

Outras variáveis importantes seriam os efeitos dos metabólitos da droga, rotina de administração, esquema de dosagem, estado fisiológico do paciente (Evans et al, 1986; Gibaldi, 1984; Young et al, 1989; Winter, 1992; Hallworth & Capps, 1993; Schumacher, 1995; Gram, 2001).

### **2.3. A MONITORAÇÃO TERAPÊUTICA NO TRATAMENTO QUIMIOTERÁPICO COM METOTREXATO.**

O tratamento do câncer através da quimioterapia foi introduzido em 1940, e desde então novos e promissores agentes têm sido continuamente desenvolvidos para utilização isolada ou em numerosas combinações (Evans et al, 1986; Gibaldi,

1984; Young et al, 1989; Winter, 1992; Hallworth & Capps, 1993; Schumacher, 1995; Gram, 2001).

O MTX, dentre as fármacos antineoplásicos disponíveis na quimioterapia, é utilizado tanto em administrações orais quanto parenterais, sendo que nas altas dosagens (acima de 300 mg/m<sup>2</sup>), por não dispor de boa biodisponibilidade oral, é administrado preferencialmente por infusão intravenosa, tendo pronta distribuição pelos tecidos, seguido de eliminação trifásica. O MTX sofre metabolização intracelular a 7-hidroxiemetotrexato (7OH-MTX), ácido 2-4 diamino-N<sup>10</sup>-metilpteróico (DAMPA) e seus derivados poliglutamatos que aumentam de acordo com a concentração e o tempo de exposição à droga; estes metabólitos são os responsáveis pelo aumento da toxicidade, principalmente nos tecidos em rápida divisão celular como a medula óssea, TGI e pele.

A suplementação de folatos reduzidos, como o ácido folínico, reduz a toxicidade, sendo que a quantidade necessária a ser administrada está relacionada à concentração plasmática de MTX e a sensibilidade do tumor (Eksborg, et al, 1996)

A monitoração das concentrações plasmáticas do fármaco é de importância para orientação na terapia de resgate com ácido folínico, a fim de se proteger o paciente através da otimização das dosagens com minimização dos efeitos tóxicos, como também para um aumento da resposta terapêutica. Este propósito, no entanto, sofre influências como a variabilidade farmacocinética populacional, as interações com outros fármacos e a administração em situações especiais como: estado de hidratação, deficiências orgânicas (notadamente insuficiência renal e hepática), além de pacientes obesos e crianças (McCrudden et al, 1999; Cociglio et al, 1995).

Outras situações nas quais a monitoração terapêutica desempenha importância destacam-se: a identificação prévia de pacientes que apresentam risco de desenvolverem toxicidade, em especial nas terapias de altas dosagens; avaliação da baixa biodisponibilidade; identificação de falha terapêutica e aderência do paciente ao tratamento farmacológico prescrito.

Dentre os parâmetros farmacocinéticos importantes na monitoração terapêutica estão a concentração plasmática no estado de equilíbrio (C<sub>ss</sub>), a área sob a curva da concentração vs tempo (ASC) e a meia-vida de eliminação (t<sub>1/2β</sub>) do fármaco.

### **2.3.1. Fatores importantes na monitoração terapêutica do metotrexato (MTF)**

O metotrexato, dentre as drogas antineoplásicas, apresenta características importantes para sua utilização mediante monitoração terapêutica:

- Variabilidade quanto à disposição da droga (relação: Concentração local x Toxicidade x Efeito Terapêutico);
- Falta de aplicabilidade quanto ao uso da droga em uma faixa terapêutica ou “concentração alvo” para uma população;
- Disponibilidade de metodologia analítica simples, precisa para rápidas quantificações do fármaco;
- Dados sobre concentração-tempo devem ser retrospectivamente avaliados para se determinar a relação entre exposição e efeito.
- Terapia comumente utilizada, com dosagem de  $1 \text{ g/m}^2$  ou  $20 \text{ mg/kg}$  ou mais de metotrexato, seguido de resgate por ácido folínico para sobrepor a resistência do fármaco e aumentar a penetração do MTX nos sítios farmacológicos;
- Identificação prospectiva de fatores de risco ao prolongamento da eliminação de MTX .

### **3. OBJETIVOS**

- Validar metodologia analítica em HPLC-PDA para dosagem plasmática do metotrexato.
- Monitorar os níveis plasmáticos do metotrexato após infusão, para avaliar a variabilidade na concentração plasmática efetiva da droga segundo o regime terapêutico estabelecido, em crianças com leucemia linfoblástica aguda.
- Estimar perfil cinético do decaimento plasmático do metotrexato.

## **4. MATERIAIS E MÉTODOS**

### **4.1- MATERIAIS**

#### **4.1.1 – Padrões de calibração**

Para a preparação de soluções-estoque e soluções de uso utilizaram-se metotrexato e teofilina (padrão interno) fornecidos pela Sigma-Aldrich, com elevado grau de pureza ( $\geq 99.0\%$ ).

#### **4.1.2 - Padrões de medicamentos**

Após levantamento nos prontuários dos pacientes, observou-se que alguns fármacos eram administrados simultaneamente ao metotrexato. Assim, utilizou-se os seguintes medicamentos injetáveis para ser adicionados a plasma branco para a avaliação de seletividade/especificidade da técnica analítica: ácido fólico (Eurofarma), 6-mercaptopurina (GlaxoSmithKline), dipirona (Eurofarma), cafeína (NEPET/UFG), ondansetrona (Laboratório Biosintética), dimenidrato (Altana Pharma) e furosemida (Medley)

#### **4.1.3 - Solventes**

Foram utilizados água ultrapura produzida pelo equipamento Waters Millipore – Simplicity 185, acetonitrila – Tedia (Grau HPLC) e metanol – Tedia (Grau HPLC).

#### **4.1.4 - Outros Materiais**

Adicionalmente, utilizou-se ácido acético glacial (PA) – Vetec, hidróxido de sódio (PA) – Biotec, cartucho de extração em fase sólida C-18 – Oasis<sup>®</sup> Waters e coluna cromatográfica RP 18e (100 - 4,6 mm) - Chromolith<sup>®</sup> Performance, contendo partículas de 5 $\mu$ m.

#### **4.1.5 - Sistema de HPLC**

O sistema de HPLC (figura 2) foi constituído por: Bomba HPLC Shimadzu – LC - 20AT Prominence, Auto-injetor Shimadzu – SIL - 20A Prominence, Detector PDA Shimadzu – SPD - M20A Prominence, Desgaseificador Shimadzu – DGU - 20A<sub>5</sub> Prominence, Forno de Coluna Shimadzu – CTO - 20A Prominence. Módulo Controlador Shimadzu – CBM - 20A Prominence.



**Figura 2: Sistema de HPLC modelo LC-20A Prominence**

#### **4.1.6 – Outros equipamentos**

Equipamentos acessórios: sonicador – Unique USC 1400, centrifugador refrigerado – Hettisch Rotina 38R, balança analítica – Celtac FA2104N, peagômetro – Tecnal Tec-2, vórtex – Phoenix AP-56, freezer -20°C – Consul e refrigerador – Eletrolux.

## **4.2 – DETERMINAÇÃO POR HPLC DAS CONCENTRAÇÕES DE METOTREXATO EM AMOSTRAS DE PLASMA DE PACIENTES COM LLA.**

### **4.2.1 – Preparo das soluções padrão**

Para se proceder ao desenvolvimento e a validação de um método cromatográfico para a detecção e quantificação do metotrexato em plasma de pacientes humanos, o primeiro passo foi estabelecer as condições cromatográficas que se mostrassem mais eficazes, levando em consideração as características do fármaco.

Preparou-se uma solução padrão inicial de metotrexato na concentração de 1 mg/mL, pesando-se 15 mg de padrão de metotrexato (Sigma-Aldrich), sendo solubilizado em 15 mL de água ultrapura, utilizando hidróxido de sódio, em

quantidade mínima necessária para promover a completa dissolução do metotrexato na água, uma vez que o fármaco só se torna solúvel em meio alcalino (USP, 2007).

Como trabalhos anteriores citam a 8-cloroteofilina como padrão interno para a análise do metotrexato por HPLC (Aboleneen et al, 1995), adotou-se como padrão interno a teofilina, o que acabou se tornando critério de exclusão para pacientes. Pesou-se 15 mg de padrão de teofilina (Sigma-Aldrich), e solubilizou-se em 15 mL de uma solução de metanol (grau HPLC) a 50% em água ultrapura.

#### **4.2.2 – Preparo das soluções contendo padrões de medicamentos**

As soluções contendo padrões de medicamentos foram utilizadas para a verificação da especificidade do método cromatográfico para a detecção e quantificação do metotrexato, visto que os pacientes normalmente apresentam terapia contendo vários medicamentos administrados em conjunto.

Esses padrões foram obtidos a partir dos medicamentos mais comumente utilizados pelos pacientes, na forma de comprimidos ou solução injetável, com exceção da cafeína, doados pelo próprio serviço de pediatria do Hospital Araújo Jorge, de onde foram obtidas soluções em metanol (grau HPLC) a 50% em água ultrapura, com posterior filtração utilizando-se filtros Millipore contendo poros de 0,22 µm, estando as soluções de análise na concentração de 10 µg/mL.

#### **4.2.3 – Condições cromatográficas**

Para se estabelecer as condições cromatográficas ideais de detecção e quantificação do metotrexato, foram realizados consecutivos testes para determinar a fase móvel ideal, o método de extração da amostra, o tempo de corrida, o comprimento de onda para a detecção tanto do metotrexato, quanto do padrão interno (teofilina).

A coluna cromatográfica utilizada foi RP 18 com 10 cm de comprimento (100 - 4,6 mm) - Chromolith® Performance, com um tempo de corrida de 13 minutos, sendo a fase móvel uma solução de ácido acético a 0,1% em água ultrapura (pH~3,0)/ metanol (grau HPLC)/acetonitrila (grau HPLC) em diferentes gradientes de concentração durante a corrida, de forma que de 0 a 4 minutos, a fase móvel era formada por ácido acético 0,1%, metanol e acetonitrila na proporção de 90:8:2,

respectivamente. A partir dos 4 minutos, foi alterada para ácido acético 0,1%, metanol e acetonitrila na proporção de 90:0:10, permanecendo assim até atingir 10 minutos de corrida, quando a proporção inicial de 90:8:2 era restabelecida, permanecendo assim até os 13 minutos, tempo que marca o fim da corrida cromatográfica.

O fluxo de fase móvel utilizado foi de 1,5 mL por minuto, com a coluna em temperatura ambiente (23 °C). O volume injetado foi de 20 µL, tanto para os padrões quanto para as amostras extraídas de pacientes.

O detector utilizado foi o PDA, sendo que o comprimento de onda escolhido para a detecção do metotrexato foi de 304 nm e, para a teofilina, de 271 nm.

Para se obter possíveis candidatos a padrão interno foi realizada uma revisão bibliográfica, no intuito de encontrar moléculas já utilizadas para esse fim em outros trabalhos envolvendo a análise cromatográfica do metotrexato, sendo que Aboleneen *et al* (1995) citaram a utilização da 8-cloroteofilina como padrão interno para análise cromatográfica do metotrexato por HPLC. A partir deste dado, testamos a 8-cloroteofilina, bem como a Teofilina, devido a sua semelhança molecular e a relativa facilidade de se obter padrões primários das duas moléculas.

#### **4.2.4 – Preparo da curva de calibração e das amostras**

Para se construir as curvas de calibração foram feitas diluições das soluções iniciais (solução de padrão primário de metotrexato) obtendo soluções de 1, 3, 5, 25, 50, 80, 100, 150 e 200 µg/mL de metotrexato em água ultrapura, tendo sido adotadas como soluções de trabalho, sendo que as soluções de 1, 5, 25, 50, 100 e 200 µg/mL de metotrexato compuseram a curva de calibração para a técnica, enquanto que as soluções com concentração de 3, 80 e 150 µg/mL corresponderam aos controles baixo, médio e alto respectivamente.

A solução inicial contendo padrão primário de teofilina foi diluída para 47 µg/mL de teofilina em solução de metanol a 50% em água ultrapura, tendo sido adotada como solução de trabalho.

Para a preparação da curva de calibração e controles de qualidade utilizou-se, para cada ponto, 250 µL de plasma humano branco previamente centrifugado, sendo adicionados 25 µL de padrão interno (solução de trabalho contendo teofilina) e 25 µL de solução de trabalho contendo metotrexato, em tubos de ensaio. Além dos pontos da curva de calibração e controles, foi feita uma solução com o branco, que

continha 250 µL de plasma humano branco, sendo adicionados 50 µL de água ultrapura, e um contendo apenas padrão interno, constituindo-se de 250 µL de plasma humano branco, adicionando 25 µL de padrão interno e 25 µL de água ultrapura, totalizando 11 concentrações de análise, seguido de homogeneização em vórtex, por 5 s (figura 4).

Posteriormente, procedeu-se ao condicionamento dos cartuchos de extração em fase sólida (C-18), com capacidade para 1 mL, utilizando-se protocolo de condicionamento que consistiu em adicionar metanol a 50%, centrifugação a 3000 rpm por 3 min e, posteriormente, água ultrapura, e centrifugação a 3000 rpm por 3 min.

Transferiu-se os 300 µL das amostras recém preparadas (curva de calibração) para os cartuchos de extração em fase sólida, adaptados em um tubo de ensaio, procedendo nova centrifugação a 3000 rpm por 3 min. Desprezou-se o plasma contido nos tubos em hipoclorito a 0,1%. A seguir procedeu-se eluição dos analitos adicionando-se 400 µL de metanol a 50% em água ultrapura no cartucho, adaptando-o em outro tubo de ensaio limpo. Procedeu-se nova centrifugação a 3000 rpm/3 min, coletando-se a solução presente no tubo de ensaio e transferindo-a para um *vial* de amostra limpo, consistindo na amostra a ser injetada no cromatógrafo.

#### **4.2.5 – Validação de Método Cromatográfico por HPLC-PDA para a Análise de Metotrexato em Plasma**

Um processo de validação de uma técnica cromatográfica consiste em uma série de experimentos comprovando que um determinado método atenda a todas as exigências de aplicações analíticas, produzindo resultados confiáveis e com reprodutibilidade comprovada. Neste trabalho, utilizou-se como referência os critérios de validação estabelecidos pela RE 899/2003 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária-ANVISA (BRASIL, 2003)

Para um método ser considerado validado deve apresentar uma série de parâmetros como precisão, exatidão, linearidade, limite de detecção e limite de quantificação, especificidade, reprodutibilidade, estabilidade e recuperação, sendo que esses parâmetros devem obedecer a um limite de variação dentro de critérios previamente estabelecidos, os quais são descritos a seguir.

#### **4.2.5.1- Especificidade**

Define-se especificidade como a habilidade de um método bioanalítico em diferenciar o analito de outros componentes que possam estar presentes nas amostras a serem analisadas tais como metabólitos, impurezas (inclusive outros fármacos), compostos de degradação ou componentes da matriz.

Para a definição da especificidade do método para análise de metotrexato por HPLC-PDA, foi realizado um estudo de possíveis compostos que pudessem interferir na análise.

Uma vez que pacientes de quimioterapia fazem uso de vários fármacos concomitantes, no sentido de minimizar possíveis efeitos colaterais provocados pelos quimioterápicos foi feito levantamento, através de consulta aos prontuários médicos, dos fármacos mais comumente administrados aos pacientes que fariam parte do estudo, além de substâncias que pudessem naturalmente apresentar-se em concentrações detectáveis nas amostras dos pacientes como a cafeína, por exemplo, sendo que esse levantamento serviu como base para montarmos protocolo de estudo para a especificidade do método.

Entre os fármacos administrados aos pacientes durante o tempo em que as amostras de plasma foram coletadas encontra-se o ácido fólico, a dipirona, a furosemida, o dimenidrato (Dramin®), a 6-mercaptopurina e a ondansetrona, além da cafeína, por ser uma molécula facilmente detectável em plasma humano, juntamente com uma amostra de plasma branco.

#### **4.2.5.2 – Recuperação absoluta**

A recuperação é definida como a eficiência de um processo de extração do método analítico, expressa através de uma relação percentual entre os valores observados quando se compara uma amostra branco, acrescida de padrão, e submetida ao processo de extração, com uma solução contendo padrão, porém não extraída.

Para definir a recuperação do método, foi realizada análise de 5 amostras em fase móvel (metanol a 50%) para cada solução de metotrexato, em concentração conhecida (controle alto, médio e baixo), comparando com 5 amostras de plasma contaminadas com as mesmas soluções de concentração conhecida, submetidas ao método de extração desenvolvido para a técnica, além de 15 amostras em fase móvel (metanol a 50%) contendo solução de teofilina, em concentração conhecida (47 µg/mL), e 15 amostras de plasma contaminadas com a mesma solução de teofilina em concentração conhecida, e submetida ao método de extração.

#### **4.2.5.3 – Limites inferior e superior de quantificação**

Limites inferior e superior de quantificação são definidos como sendo a menor e maior concentração de um determinado analito, presente em uma amostra qualquer, que pode ser quantificada, apresentando precisão e exatidão consideradas aceitáveis.

O limite inferior de quantificação (LIQ) deve apresentar uma relação de no mínimo 5:1 em relação ao ruído da linha de base, o que significa dizer que o sinal do LIQ deve ser pelo menos 5 vezes maior do que qualquer ruído presente no tempo de retenção do fármaco, levando em consideração uma amostra branco, além de ser identificável e quantificável, com precisão de 20% e exatidão de 80 a 120%.

#### **4.2.5.4 - Precisão e Exatidão**

Precisão é definida como o grau de repetibilidade entre os resultados de análises individuais, quando o procedimento é aplicado diversas vezes em uma mesma amostra homogênea e em idênticas condições de ensaio.

A precisão do método foi avaliada a partir das soluções de trabalho preparadas e já descritas anteriormente, utilizando 3 lotes de amostras recém extraídas de plasma branco, amostras contendo apenas padrão interno e uma curva de calibração contendo 6 pontos, todos em duplicata, além de 5 amostras contendo controle alto, médio e baixo, sendo obtido através da fórmula:

$$DPR = \frac{DP}{CMD} \times 100$$

onde, DP = desvio padrão; DPR = desvio-padrão relativo ao CQ ou coeficiente de variação (CV%) relativo ao CQ e CMD = concentração média determinada.

A exatidão é definida como grau de concordância entre os resultados encontrados durante a análise e um valor aceito como referência.

A exatidão do método, da mesma forma que a precisão, foi avaliada a partir das soluções de trabalho preparadas e já descritas anteriormente, utilizando 3 lotes de amostras extraídas de plasma branco, amostra contendo apenas padrão interno e uma curva de calibração contendo 6 pontos, todos em duplicata, além de 5 amostras contendo controle alto, médio e baixo, sendo obtida através da fórmula:

$$\text{Exatidão} = \frac{\text{concentração média experimental}}{\text{concentração teórica}} \times 100$$

#### 4.2.5.5 – Estabilidade de Longa Duração

O estudo de estabilidade visa determinar se o analito se mantém quimicamente inalterado em uma determinada matriz, sob condições específicas e intervalos de tempo determinados.

A estabilidade de longa duração tem a finalidade de comprovar que o metotrexato se manteve estável em plasma humano congelado, em freezer (-20°C), durante todo o intervalo de tempo que compreendeu a coleta das amostras, preparação e análise das mesmas.

Quando foram coletadas as amostras do primeiro paciente, foi congelado também um lote de plasma branco, contendo os 6 pontos da curva de calibração, juntamente com 5 amostras contendo controle alto e baixo.

Ao término de todas as análises de amostras de pacientes, descongelamos e analisamos as amostras para estabilidade de longa duração, comparando com amostras recém-preparadas de curva de calibração e controles alto e baixo.

#### **4.2.5.6 – Curva de calibração**

A curva de calibração representa a relação existente entre as amostras de um analito, com concentração conhecida, e a resposta do aparelho. É utilizada para quantificar um determinado fármaco em amostras, considerando-se a mesma matriz biológica proposta para o estudo.

Segundo as normas da ANVISA, a curva de calibração deve apresentar uma amostra branco (sem a presença de padrão interno e analito), uma amostra contaminada apenas com padrão interno e, no mínimo, 6 amostras contendo padrão interno e analito, este estando em diferentes concentrações conhecidas, podendo apresentar um desvio de até 20%, em relação a concentração nominal, para o LIQ e de até 15%, em relação a concentração nominal, para os demais pontos. No mínimo 4 amostras da curva de calibração devem obedecer aos critérios anteriores, sendo que entre elas é obrigatória a presença do LIQ e da maior concentração a ser analisada, além de apresentar um coeficiente de correlação linear igual ou superior a 0,98.

#### **4.2.5.7 – Co-validação**

Para se comprovar a linearidade do método, foram preparadas amostras de CQA com concentração igual a 45 µg/mL (3 vezes maior do que a concentração nominal, que é de 15 µg/mL). As amostras foram diluídas em metanol 50%, na proporção de 1:3, e foram analisadas em 3 lotes, cada um contendo 5 CQA.

#### **4.2.5.8. – Estimativa de parâmetros de validação da coluna cromatográfica (Ciola, 2006)**

Para avaliar a qualidade das colunas, bem como a resolução entre o pico de metotrexato e dos candidatos a padrão interno (teofilina e cloroteofilina), foram estimados os valores dos parâmetros Número de Pratos Teóricos (N) e Resolução (R), conforme as equações que seguem.

$$N = \frac{5,55 \cdot (tR)^2}{(W_{1/2})^2}$$

Sendo  $w_{1/2}$  = largura do pico a meia-altura (min) e TR = tempo de retenção (min).

$$R = \frac{2 \cdot [(TR_B) - (TR_A)]}{(W_A + W_B)}$$

Onde, R = resolução (grau de separação entre os dois picos); TR = tempo de retenção (sendo B o fármaco com maior valor de TR); W = largura do pico (A ou B).

### **4.3 – ESTIMATIVA DOS PARÂMETROS FARMACOCINÉTICOS DO METOTREXATO EM PACIENTES COM LLA.**

#### **4.3.1 – Pacientes**

Participaram do estudo 7 pacientes com idade entre 2 e 12 anos, internados na ala pediátrica do Hospital Araújo Jorge, Associação de Combate ao Câncer em Goiás (ACCG), no município de Goiânia/GO, apresentando diagnóstico estabelecido de leucemia linfoblástica aguda (LLA), recebendo tratamento com protocolo quimioterápico contendo metotrexato, em esquema de dose única de 2 g/m<sup>2</sup> de superfície corporal, sendo que 10% da dose foi administrada por via intratecal e os 90% restantes foram administrados por via endovenosa, resultando em tempo total de infusão de 6 h, seguindo protocolo adotado pelo Serviço de Pediatria do hospital.

Todos os pacientes apresentavam, no momento do estudo, função hepática e renal normais, comprovada por exames bioquímicos (transaminases e creatinina) e anamnese e exame físico do corpo médico do hospital, tendo sido acompanhados durante todo o tempo em que estiveram internados para o tratamento com quimioterapia.

O corpo médico do hospital fez uma triagem inicial dos prováveis pacientes a ser incluídos no estudo, tendo seus respectivos responsáveis sido instruídos a respeito da pesquisa, assinando um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, elaborado para ser utilizado nessa pesquisa e aprovado pelo Comitê de Ética da ACCG (nº 051/2006) (vide Anexo), sendo que a não assinatura deste termo implicaria na não inclusão do paciente. Outros fatores de inclusão foram a presença da patologia clinicamente diagnosticada, ter idade entre 0 e 12 anos, protocolo de tratamento contendo dose de 2 g/m<sup>2</sup>. a não constatação de qualquer um desses pré-requisitos, ou a utilização de tratamento contendo teofilina, implicaria na exclusão do paciente para esse estudo

#### **4.3.2 – Obtenção, processamento e conservação das amostras coletadas dos pacientes**

O material biológico de escolha para este estudo foi plasma obtido pela coleta de sangue venoso, utilizando sistema de coleta de sangue a vácuo (BD-

Vacutainer®), em tubos contendo EDTA (7,2 mg), cedidos pelo NEPET/UFG, com capacidade de 4 mL. Todas as coletas foram realizadas por profissionais do corpo de enfermagem do hospital Araújo Jorge, obedecendo a protocolo estabelecido para a pesquisa. Este consistiu-se de 6 coletas programadas de sangue, sendo a primeira coleta realizada momentos antes do início da infusão do metotrexato, a segunda assim que a infusão do medicamento chegou ao fim, na intenção de encontrar o pico máximo de concentração plasmática do fármaco.

Com o intuito de estabelecer o perfil de decaimento da concentração plasmática vs tempo do metotrexato, foram coletadas amostras de plasma com 24, 48, 72 e 96 h após o início da infusão do medicamento. Todas as coletas foram realizadas em locais do corpo diferentes daquele onde havia sido feita a infusão com metotrexato.

Após a coleta, o material biológico foi acondicionado em embalagem de isopor contendo resfriamento (gelo) para evitar hemólise, e enviado para o NEPET/UFG, onde foi imediatamente centrifugado em uma velocidade de 2000 rpm, durante 7 minutos, evitando hemólise, obtendo a separação entre o plasma e os elementos figurados do sangue. O plasma foi transferido para um tubo de congelamento e foi estocado em freezer a -20°C, para posterior análise utilizando HPLC-PDA, enquanto que os elementos figurados do sangue foram desprezados em solução de hipoclorito 0,1%, para posterior descarte.

#### 4.3.3 – Estimativa dos parâmetros farmacocinéticos do metotrexato

Para a estimativa dos parâmetros farmacocinéticos do metotrexato, foi usado como base o modelo monocompartimental aberto, tendo sido determinados os parâmetros farmacocinéticos, como a área sob a curva de concentração vs tempo, o *clearance* total ( $CL_T$ ) e o volume de distribuição ( $V_d$ ), meia-vida de eliminação ( $t_{(1/2)\beta}$ ), e constante de eliminação ( $K_{el}$ ).

Esses dados foram obtidos após plotar os valores de concentração vs tempo em papel semilogarítmico e submetidos a cálculos matemáticos, utilizando-se para isso a seguinte equação:

$$C = \frac{R_o}{V_d \cdot K} \cdot (1 - e^{-kti}) \cdot (e^{-kt})^2$$

onde  $C$  = concentração plasmática de MTX;  $R_0$  = taxa de infusão em mg/h;  $V_d$  = volume de distribuição em L;  $K$  = constante de eliminação em  $h^{-1}$ ;

$t_i$  = tempo de infusão;  $t$  = tempo;  $e$  = base do logaritmo neperiano.

Além desses parâmetros obtivemos também a concentração máxima do fármaco ( $C_{max}$ ), o tempo para que essa concentração fosse atingida ( $T_{max}$ ), e a concentração mínima do fármaco ( $C_{min}$ ), sendo obtidos de forma direta, a partir do gráfico de decaimento construído para o metotrexato.

As figuras 2 e 3 contêm fluxogramas esquematizando a parte experimental desenvolvida para a técnica.

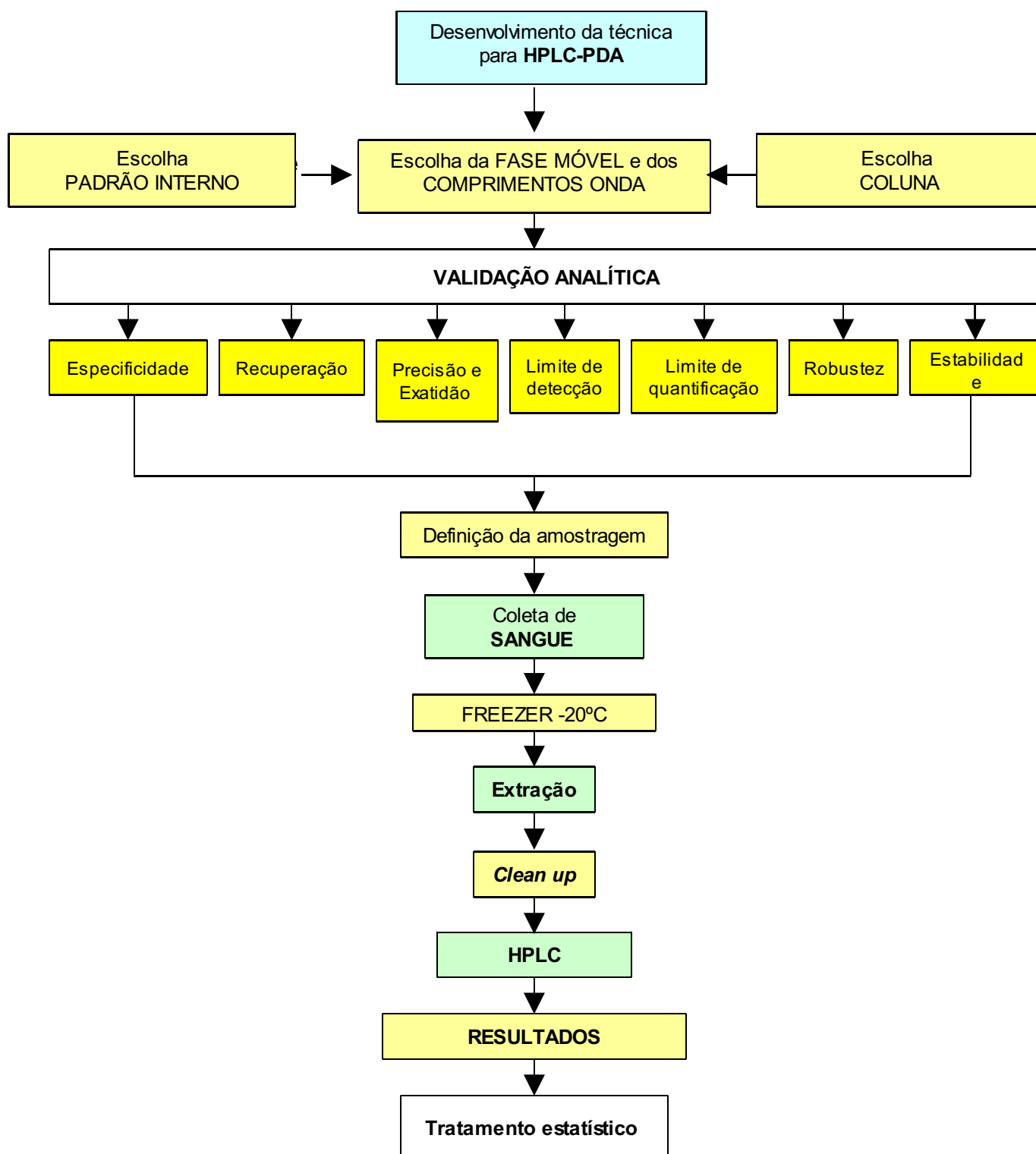


Figura 3. Fluxograma demonstrativo das etapas para o desenvolvimento e a validação da técnica em HPLC-PDA para dosagem plasmática de MTX.

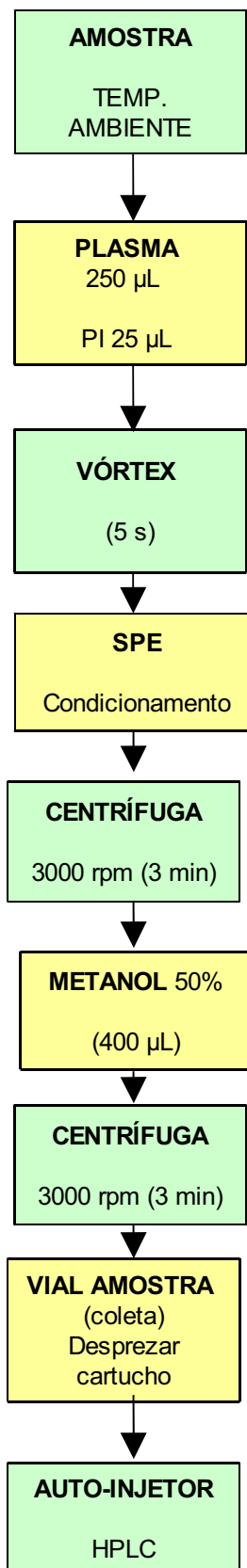


Figura 4. Fluxograma demonstrativo das etapas para a extração das amostras da técnica em HPLC-PDA para dosagem de MTX plasmático.

#### **4.4 – ANÁLISE ESTATÍSTICA**

Foi usada estatística descritiva para a análise dos dados, sendo expressa na forma de média, desvio padrão e coeficiente de variação, utilizando *software* Microsoft Office Excel 2003.

### **5. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

#### **5.1 – Desenvolvimento da técnica cromatográfica por HPLC-PDA para a análise de metotrexato em plasma.**

Para proceder a identificação e quantificação do metotrexato em plasma humano, foi preciso efetuar vários testes consecutivos, alternando as condições cromatográficas, até que obtivéssemos uma condição considerada ideal para a análise, levando-se em consideração não apenas a capacidade de detectar o metotrexato, mas sim de obter uma separação considerada ótima (Resolução maior que 2,0) entre o analito e o padrão interno escolhido para o método (USP).

Figura 5: Cromatograma referente à análise das soluções de clorotefilina (10 µg/mL; tR = 8,8 min) e metotrexato (10 µg/mL; tR = 10,9 min);  $\lambda = 275$  nm; Fase móvel: tampão acetato de sódio (pH 3,9):ACN (88:12); fluxo de 1,5 mL/min. Legenda: TR = tempo de retenção;  $\lambda$  = comprimento de onda.

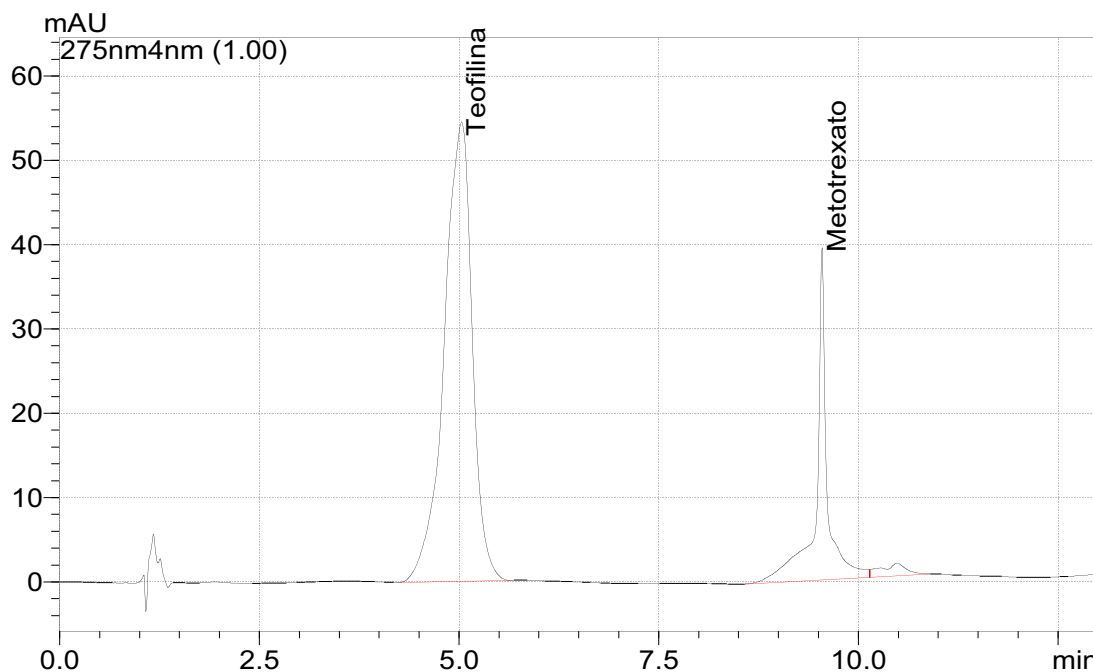


Figura 6: Cromatograma referente à análise das soluções de teofilina (10 µg/mL; tR= 5,0 min) e metotrexato (10 µg/mL; tR= 9,55 min);  $\lambda = 275 \text{ nm}$ ; Fase móvel: tampão acetato de sódio (pH 3,9):ACN (88:12); fluxo de 1,5 mL/min. Legenda: tR = tempo de retenção;  $\lambda$  = comprimento de onda.

Após os testes realizados com a teofilina e com a 8-cloroteofilina, observou-se que ambas as substâncias apresentam um perfil cromatográfico favorável à utilização como padrão interno para a análise do metotrexato, com picos apresentando uma boa simetria, observada segundo a equação:  $A_s = b/a$ , sendo  $A_s$  a distancia equivalente a 10% da altura do pico; b corresponde à distorção caudal; e a corresponde à distorção frontal do pico (USP).

Entretanto, a teofilina apresentou uma absorção melhor, facilmente perceptível ao analisarmos a diferença de intensidade entre teofilina e 8-cloroteofilina, o que nos permitiria trabalhar com soluções-padrão mais diluídas, sem que houvesse prejuízo na sensibilidade da técnica. Adicionalmente, observou-se diferença de tempos de retenção maior entre padrão interno e analito, quando a teofilina foi utilizada, comparando-se à a 8-cloroteofilina, fato que possibilitaria uma melhor integração dos picos, além de melhorar a técnica cromatográfica, sem a o risco de co-eluição dos picos do padrão interno e analito. Desta forma, a teofilina foi definida como padrão interno.

A interferência apresentada no pico cromatográfico do metotrexato na figura 6, foi provavelmente devido ao comprimento de onda não específica para o metotrexato, e à fase móvel inadequada para a análise.

Após a definição do padrão interno, coube definir o tipo de coluna cromatográfica a ser utilizada na análise. Dentre os tipos de colunas cromatográficas mais empregadas na análise de metotrexato por HPLC, destacam-se as colunas de fase reversa, havendo também métodos desenvolvidos utilizando colunas cromatográficas de pareamento iônico (ion-pairing), ou colunas cromatográficas de troca iônica (ion-exchange), sendo que esta última se encontra ainda muito pouco explorada em relação às técnicas que envolvem colunas de fase reversa (Rubino, 2001).

Foram testadas 2 colunas cromatográficas diferentes, uma contendo fase estacionária do tipo C<sub>8</sub> (240 - 4,6 mm), da marca Shimadzu®, e outra com fase estacionária C<sub>18</sub> (100 - 4,6 mm), da marca Chromolith®. Os resultados comparativos entre as 2 colunas encontram-se representados nas figuras 6 e 7.

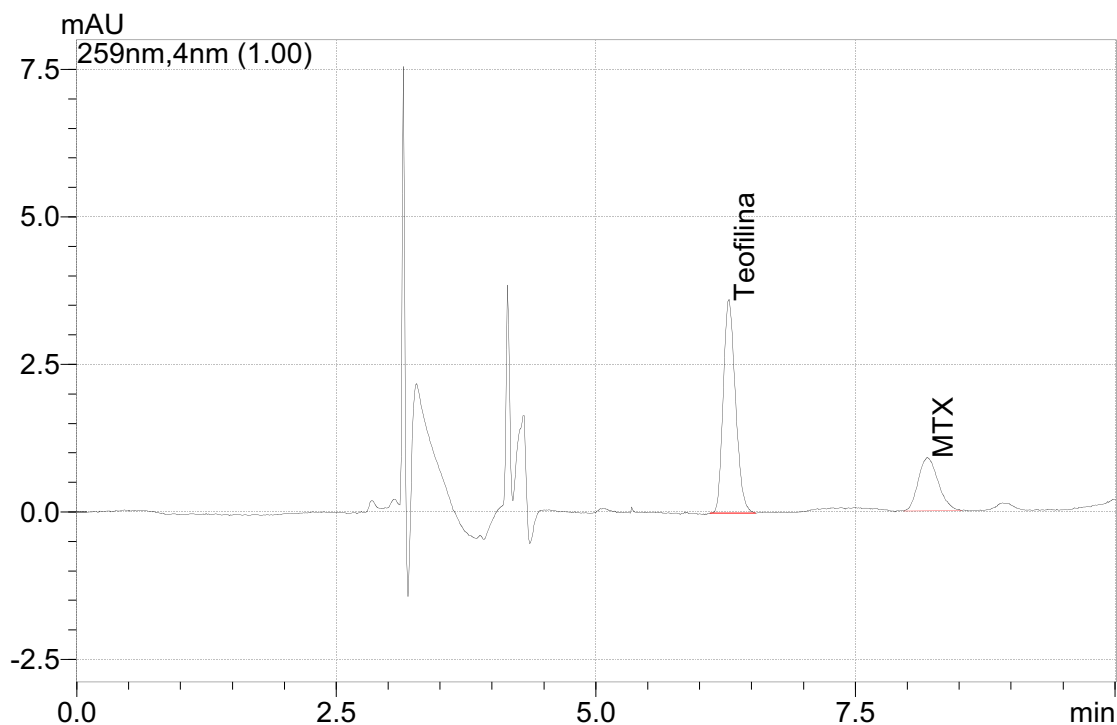


Figura 7: Cromatograma referente à análise das soluções de teofilina (10 µg/mL; tR= 6,4 min) e metotrexato (10 µg/mL; tR= 8,15 min);  $\lambda$  = 259 nm; Coluna C8; Fase móvel: tampão acetato de sódio (pH 3,9):ACN (88:12); fluxo de 1,5 mL/min. Legenda: tR = tempo de retenção;  $\lambda$  = comprimento de onda.

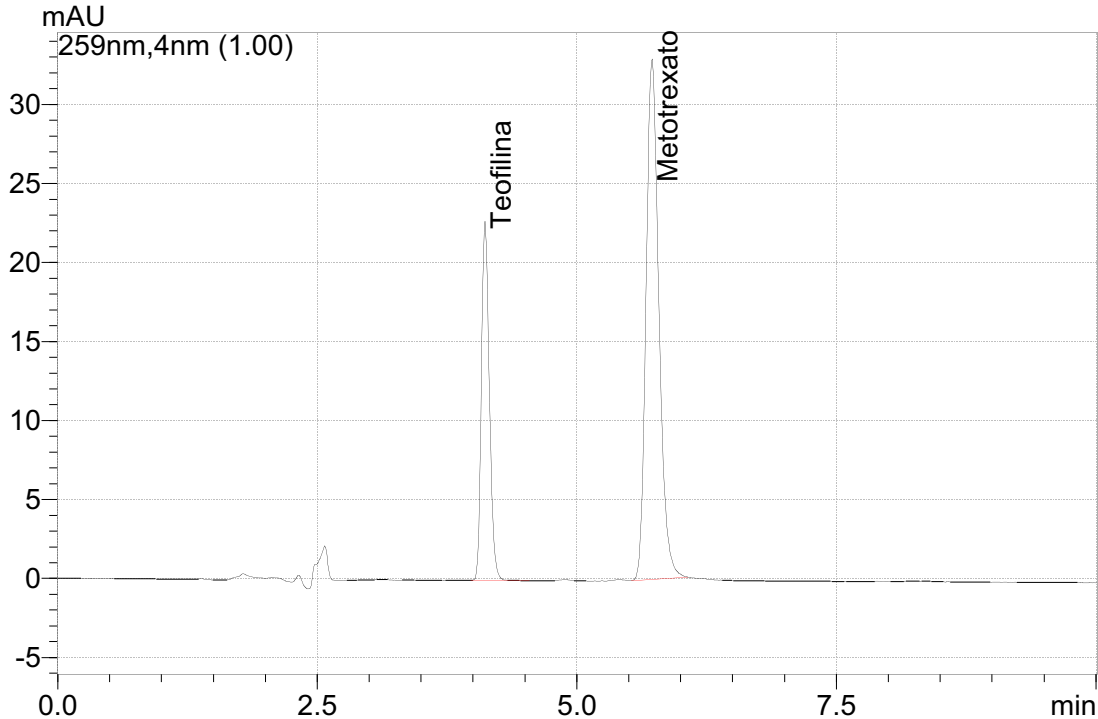


Figura 8: Cromatograma referente à análise das soluções de teofilina (10 µg/mL; tR= 4,2 min) e metotrexato (10 µg/mL; tR= 5,75 min);  $\lambda = 259$  nm; Coluna C18; Fase móvel: tampão acetato de sódio (pH 3,9):ACN (88:12); fluxo de 1,5 mL/min. Legenda: tR = tempo de retenção;  $\lambda$  = comprimento de onda.

Observando-se os cromatogramas 7 e 8, conclui-se que a coluna C18 apresentou um perfil cromatográfico com menor quantidade de interferentes e proporcionou um tempo de corrida menor, pelo fato de ser uma coluna de menor comprimento e partículas mais uniformes, possibilitando um menor tempo de eluição das amostras, fato que se refletiu na diminuição dos tempos de retenção dos compostos na coluna, além de resultar em picos mais homogêneos e simétricos, fato confirmado através do cálculo do número de pratos teóricos amplamente maior para a coluna C18 (95,584), em relação à coluna C8 (24,865), proporcionando também uma diferença de tempo de retenção entre a teofilina e o metotrexato, com resolução de 9,33, considerada boa para a execução de uma análise cromatográfica.

Quanto à escolha do tipo de detector para análise de MTX, observou-se em recente revisão (Rubino, 2001) que existem artigos contendo métodos de detecção do metotrexato com detectores ultravioleta (UV/Vis), fluorimetria, eletroquímica e espectrometria de massa.

A maioria dos trabalhos cita a utilização do detector de UV/Vis, devido às características do metotrexato, que apresenta um grupamento pterina

heteroaromático cromóforo, e possui absorvância máxima dependente do pH da fase móvel empregada na análise, que de forma geral pode variar de 303 a 313 nm (Rubino, 2001).

O detector escolhido para esse método foi um detector de UV do tipo PDA (photodiode array; detector de arraste de diodos), devido à sua capacidade de promover uma varredura completa em uma determinada faixa de comprimento de onda (200 a 800 nm), permitindo assim monitorar vários comprimentos de onda diferentes, em uma só corrida cromatográfica.

Através de testes realizados no laboratório, teofilina tem absorção máxima com comprimento de onda 271 nm, enquanto o metotrexato apresentou absorção máxima no comprimento de onda de 304 nm, dado que corrobora com outros trabalhos já publicados (Palmisano, et al, 1989; Kiffmeyer, et al, 1998). Desta forma, escolheu-se realizar as análises dos cromatogramas nesses dois comprimentos de onda simultaneamente, recurso disponível no detector PDA.

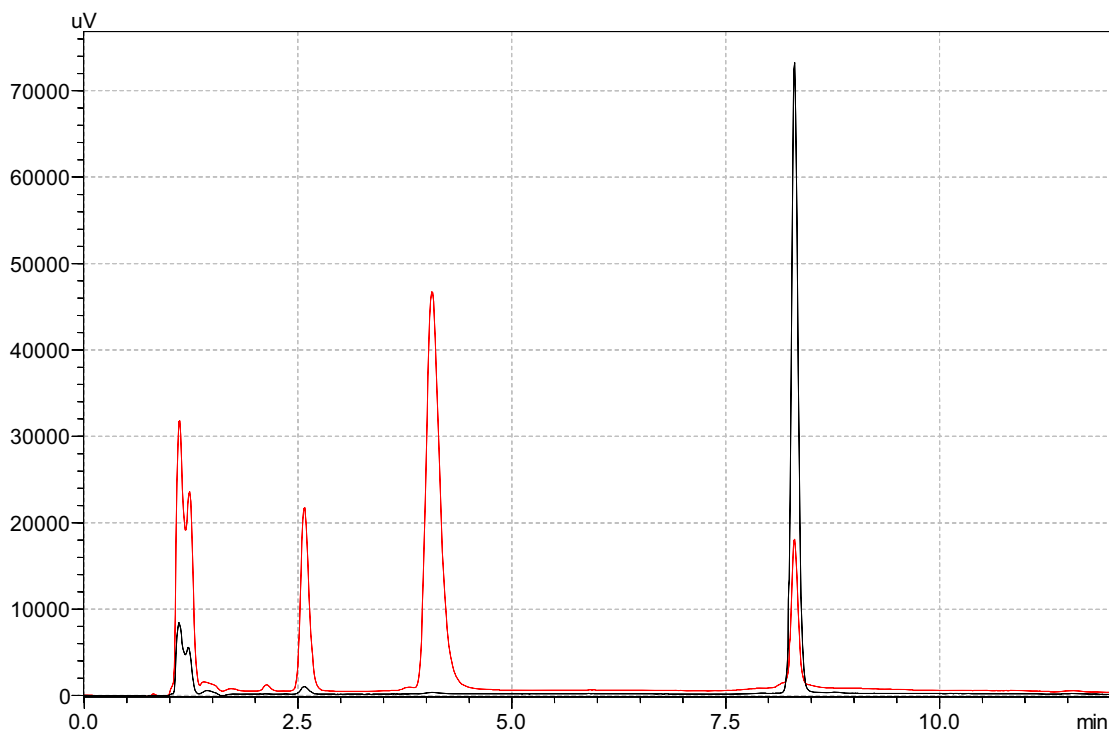


Figura 9: Cromatograma referente à análise das soluções de teofilina (10 µg/mL; tR= 4,1 min) e metotrexato (10 µg/mL; tR= 8,3 min);  $\lambda = 271$  nm (vermelho) e 304 nm (preto); Fase móvel: ácido acético 0,1%:metanol:acetonitrila; fluxo de 1,5 mL/min. Legenda: TR = tempo de retenção;  $\lambda$  = comprimento de onda.

A fase móvel utilizada foi definida após sucessivas variações de um método inicial, descrito por Cociglio *et al* (1995), que utilizava um sistema isocrático formado por tampão acetato de sódio 0,025M (pH 3,9) / acetonitrila, na proporção de 88:12 v/v, com um fluxo de 1,5 mL/min. Ao final dos testes, chegou-se a uma fase móvel formada por ácido acético 0,1% (pH~3,0)/metanol/acetonitrila, formando um gradiente de concentração entre esses 3 constituintes, com um fluxo de 1,5 mL/minuto.

## 5.2 – Validação de Método Cromatográfico por HPLC-PDA para a Análise de Metotrexato em Plasma.

### 5.2.1- Especificidade

Os perfis cromatográficos obtidos durante a verificação da especificidade se encontram representados pelas figuras 10 a 17.

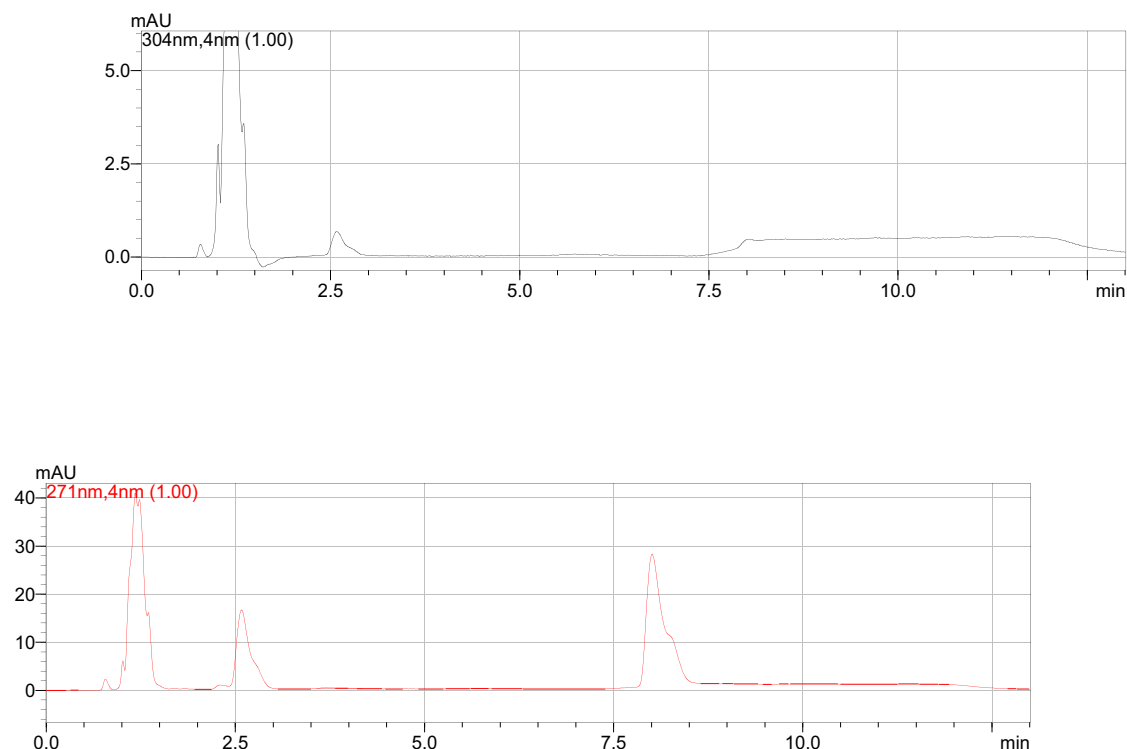


Figura 10: Cromatograma referente à análise da solução de cafeína (10 µg/mL; tR= 8,0 min);  $\lambda$  = 271 nm e 304 nm; Fase móvel: ácido acético 0,1%:metanol:acetonitrila; fluxo de 1,5 mL/min. Legenda: tR = tempo de retenção;  $\lambda$  = comprimento de onda.

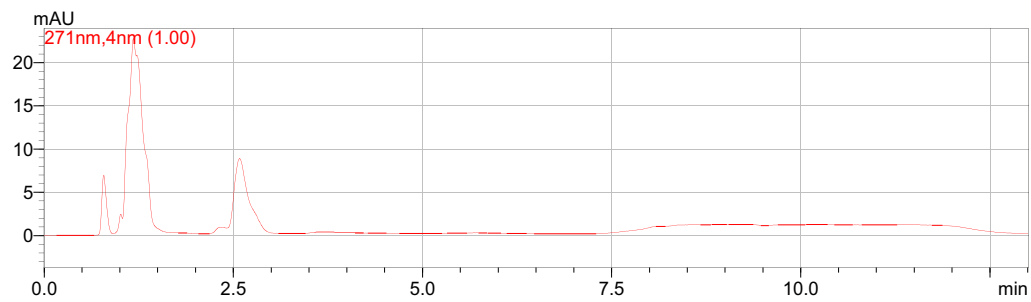
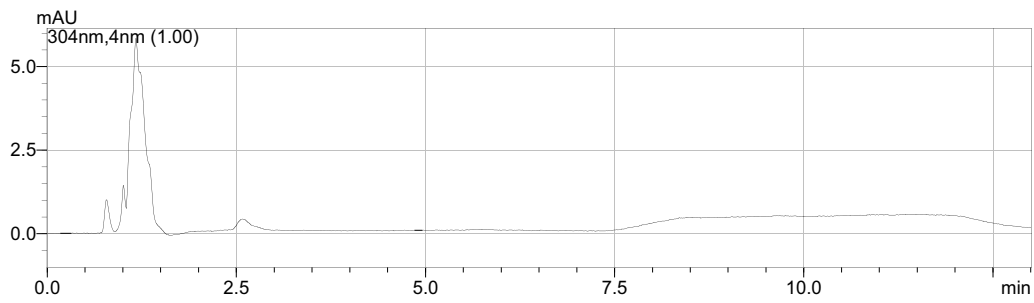


Figura 11: Cromatograma referente à análise da solução de furosemda (10  $\mu\text{g/mL}$ );  $\lambda = 271 \text{ nm}$  e  $304 \text{ nm}$ ; Fase móvel: ácido acético 0,1%:metanol:acetonitrila; fluxo de 1,5 mL/min. Legenda:  $\lambda =$  comprimento de onda.

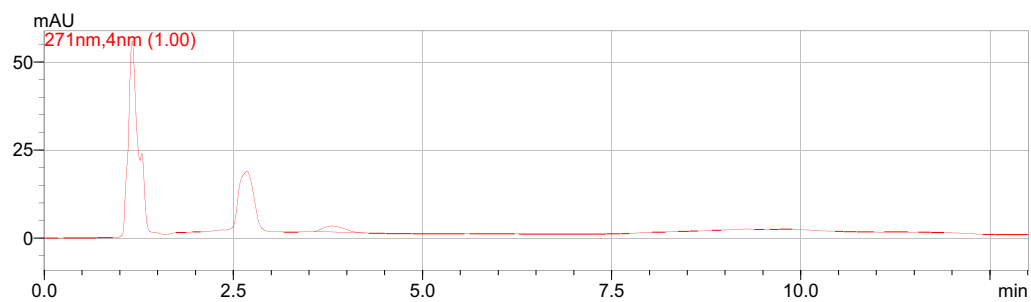
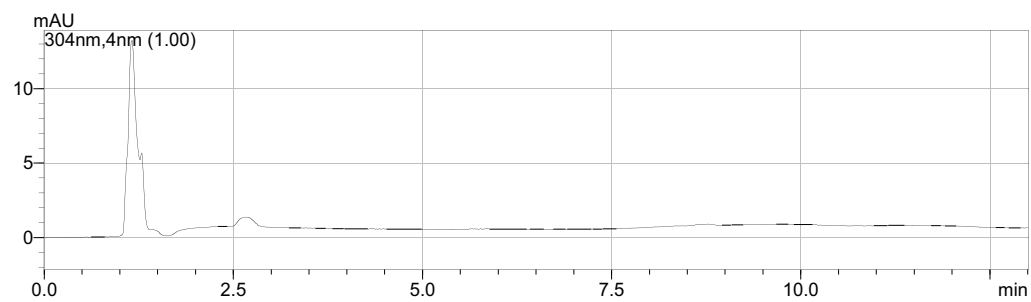


Figura 12: Cromatograma referente à análise da solução de ondansetrona (10  $\mu\text{g/mL}$ );  $\lambda = 271 \text{ nm}$  e  $304 \text{ nm}$ ; Fase móvel: ácido acético 0,1%:metanol:acetonitrila; fluxo de 1,5 mL/min. Legenda:  $\lambda =$  comprimento de onda.

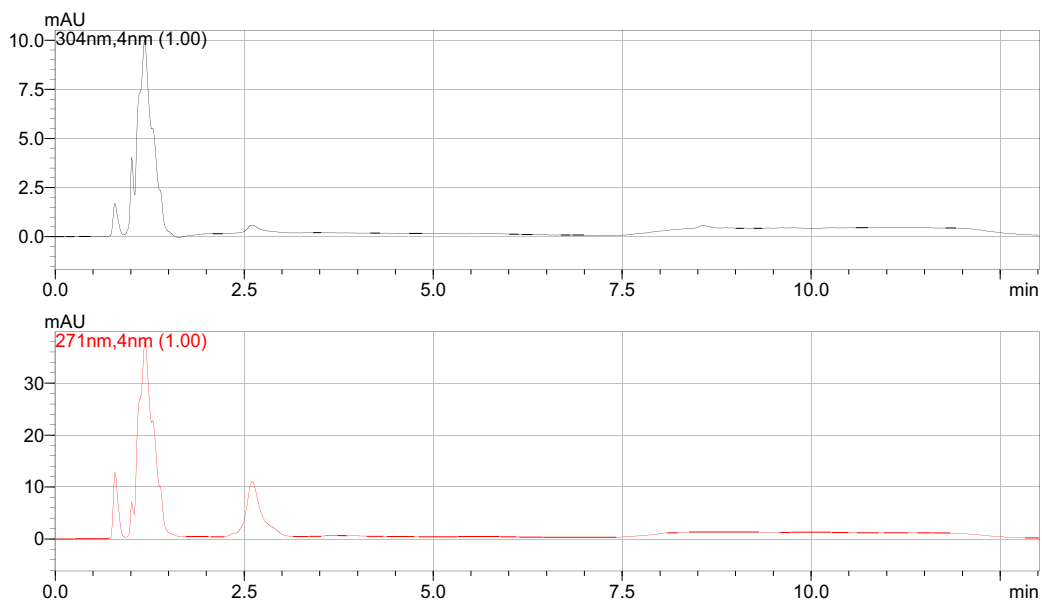


Figura 13: Cromatograma referente à análise da solução de dipirona (10 µg/mL);  $\lambda = 271$  nm e 304 nm; Fase móvel: ácido acético 0,1%:metanol:acetonitrila; fluxo de 1,5 mL/min. Legenda:  $\lambda =$  comprimento de onda.

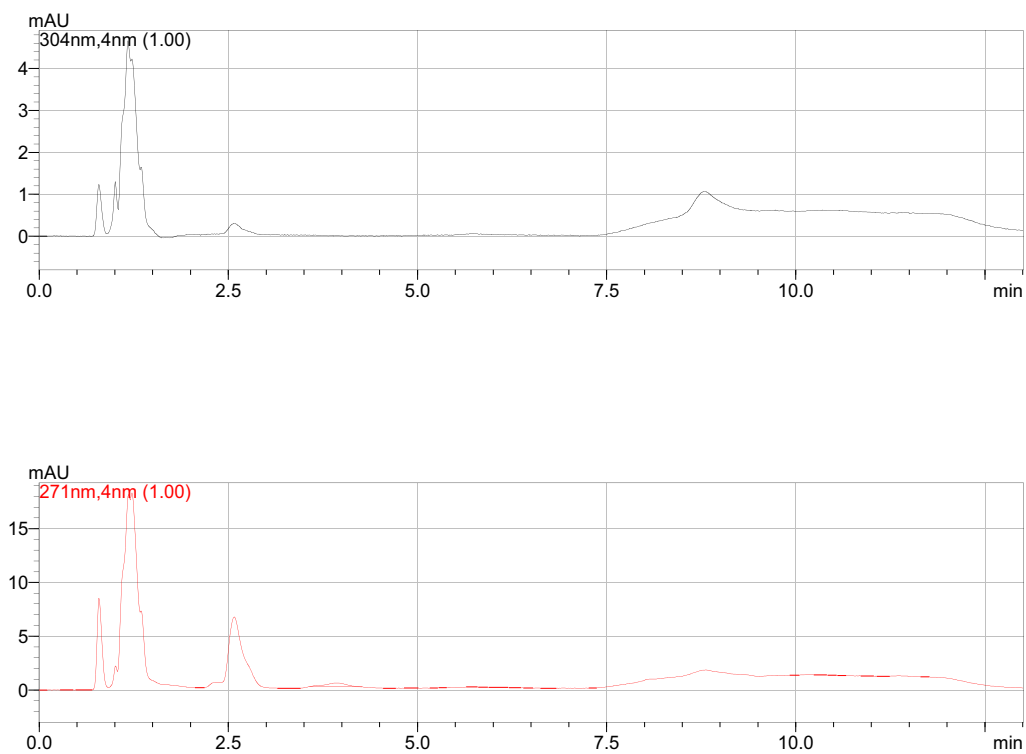


Figura 14: Cromatograma referente à análise da solução de ácido folínico (10 µg/mL;  $t_R = 8,8$  min);  $\lambda = 271$  nm e 304 nm; Fase móvel: ácido acético 0,1%:metanol:acetonitrila; fluxo de 1,5 mL/min. Legenda:  $t_R =$  tempo de retenção;  $\lambda =$  comprimento de onda.

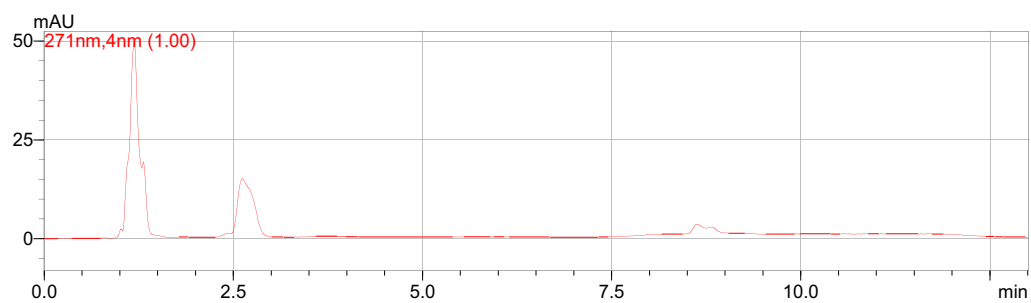
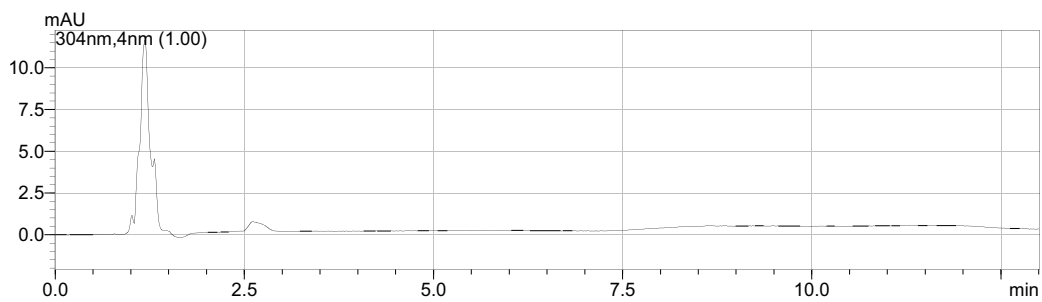


Figura 15: Cromatograma referente à análise da solução de dimenidrate (10 µg/mL);  $\lambda = 271$  nm e 304 nm; Fase móvel: ácido acético 0,1%:metanol:acetonitrila; fluxo de 1,5 mL/min. Legenda:  $\lambda =$  comprimento de onda.

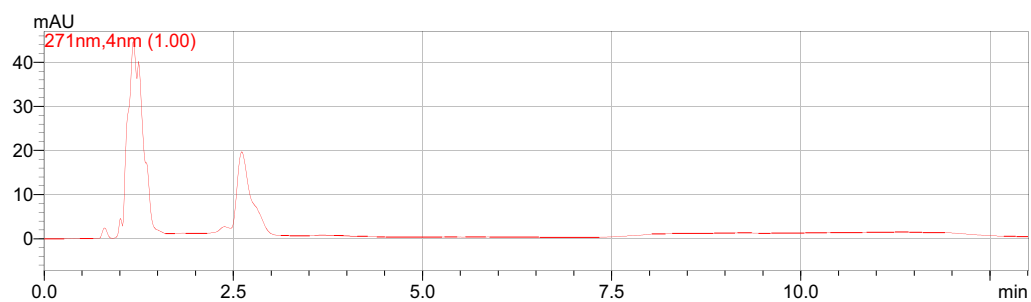
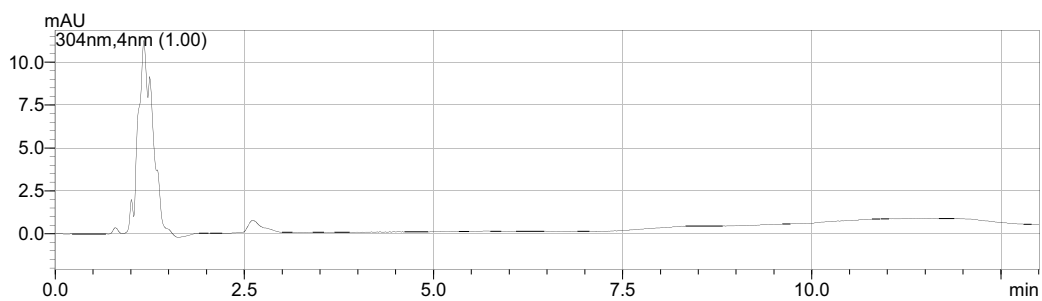


Figura 16: Cromatograma referente à análise da solução de mercaptopurina (10 µg/mL);  $\lambda = 271$  nm e 304 nm; Fase móvel: ácido acético 0,1%:metanol:acetonitrila; fluxo de 1,5 mL/min. Legenda:  $\lambda =$  comprimento de onda.

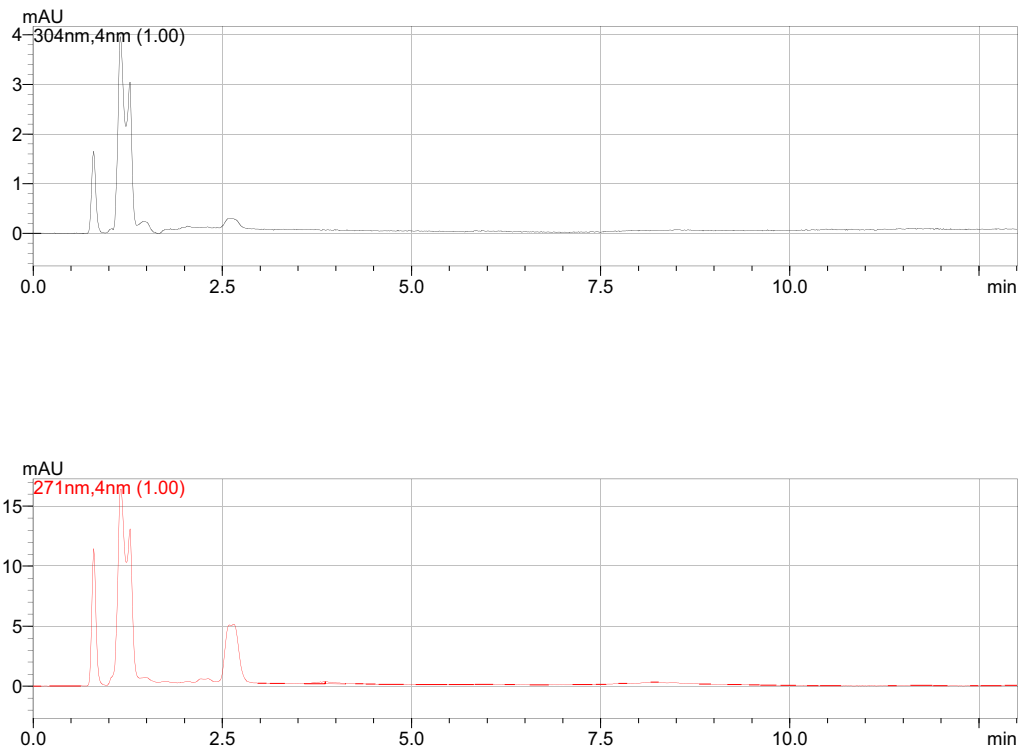


Figura 17: Cromatograma referente à análise da solução de plasma branco;  $\lambda = 271 \text{ nm}$  e  $304 \text{ nm}$ ; Fase móvel: ácido acético 0,1%:metanol:acetonitrila; fluxo de  $1,5 \text{ mL/min}$ . Legenda:  $\lambda =$  comprimento de onda.

A especificidade foi comprovada através da análise dos perfis cromatográficos dos possíveis interferentes, obtidos nos mesmos comprimentos de onda onde se realiza as detecções tanto da teofilina quanto do metotrexato.

A constatação da inexistência de sinais nas regiões do cromatograma que correspondem aos tempos de retenção da teofilina ( $t_R = 4,205 \text{ min}$ ;  $271 \text{ nm}$ ) e metotrexato ( $t_R = 8,326 \text{ min}$ ;  $304 \text{ nm}$ ) na amostra de plasma branco nos proporciona a segurança de afirmar que não há nenhum interferente biológico próprio do plasma que possa interferir na análise do metotrexato.

A cafeína apresentou um leve sinal de detecção no tempo de retenção do metotrexato, o que poderia abrir precedente para uma hipótese de co-eluição, porém ao analisarmos a intensidade do sinal e ao compará-la à intensidade de sinal obtida na análise do LIQ (figura 18), nós concluímos que este sinal não interferiria quantitativamente de forma significante ( $< 5\%$  de intensidade em relação ao LIQ) nas análises das amostras provenientes de pacientes.

O fato de não detectarmos a presença de sinais nas regiões do cromatograma que correspondem à análise de metotrexato e teofilina em plasma

contaminado com os medicamentos considerados possíveis interferentes nos permite determinar o método como específico.

Foi descrito uma reação cruzada importante entre metotrexato e seu metabólito, o ácido 4-amino-4-desoxi-N<sup>10</sup>-metilpteróico (APA), observada em análises utilizando metodologia imunoenzimática (Ensaio Emit® Metotrexato, 1996), fato não observado durante a análise por HPLC-PDA, visto que as amostras de plasma de pacientes que receberam infusão de metotrexato não apresentaram picos interferentes, nem mesmo quando a concentração de fármaco se encontrava abaixo do limite de detecção.

### 5.2.2 - Recuperação

Os resultados comparativos das análises de amostras extraídas e não extraídas de metotrexato se encontram representados na tabela 4.

**Tabela 4.** Recuperação do metotrexato, para a técnica desenvolvida em HPLC-PDA.

AMOSTRA	CQA (área do pico)	CQA <sub>E</sub> (área do pico)	CQM (área do pico)	CQM <sub>E</sub> (área do pico)	CQB (área do pico)	CQB <sub>E</sub> (área do pico)
1	645870	461663	336299,0	221536,0	10349,0	9193,0
2	538170	256257	291131,0	58368,0	11370,0	9709,0
3	588643	344836	290486,0	217334,0	11223,0	9718,0
4	552573	392951	294950,0	230170,0	11772,0	7753,0
5	531011	420666	305969,0	232515,0	11247,0	9798,0
<b>Média (±DP)</b>	571253 (±47257,15)	375275 (±78942,21)	303767 (±19215,7)	191985 (±74950,17)	11192 (±520,268)	9234 (±862,122)
<b>CV (%)</b>	8,27	21,03	6,32	39,04	4,64	9,33
<b>Recup.(%)</b>	66%		63%		83%	

**Legenda:** CQA: Controle de qualidade alto; CQA<sub>E</sub>: Controle de qualidade alto extraído; CQM: Controle de qualidade médio; CQM<sub>E</sub>: Controle de qualidade médio extraído; CQB: Controle de qualidade baixo; CQB<sub>E</sub>: controle de qualidade baixo extraído; DP: Desvio padrão; CV: Coeficiente de variação; Recup.: Recuperação.

A recuperação absoluta para o metotrexato teve uma média total de 71% (± 10,78) em relação às amostras em fase móvel, valor estabelecido como alto (Chen, et al, 1982; Rubino, 2001), sendo que a teofilina apresentou recuperação de 80%.

Os primeiro teste realizado para se definir o método de preparação de amostra foi a extração líquida-líquida utilizando metanol, por ser uma metodologia de

fácil execução e baixo custo, porém não apresentou uma recuperação satisfatória (< 50%), tendo sido logo descartada.

Trabalhos relatam uma taxa de recuperação de 40 a 96% com a utilização de método de extração por precipitação de proteínas (Rubino, 2001), o que nos motivou a testá-lo, utilizando como precipitante a acetonitrila, obtendo uma recuperação melhor do que a extração líquida-líquida, mas apresentando problemas de reprodutibilidade, já que houve muita variação nos valores de recuperação obtidos.

Vários trabalhos já publicados sobre análise de metotrexato por HPLC adotam a extração em fase sólida como metodologia de preparação para amostras biológicas (Albertione, *et al*, 1994; Aboleneen, *et al*, 1995; McCrudden, *et al*, 1998; Chládek, *et al*, 2000; Rubino, 2001), devido ao fato de apresentar valores de recuperação que variam entre 70 e 100%, valores que foram obtidos durante a validação da técnica, tanto para o metotrexato quanto para a teofilina, corroborando, portanto com os dados já descritos na literatura (Albertione, *et al*, 1994; Aboleneen, *et al*, 1995; McCrudden, *et al*, 1998; Chládek, *et al*, 2000; Rubino, 2001) sendo, portanto padronizado para o método, apresentando no entanto a desvantagem de ser um processo que exige maiores investimentos, para a compra dos cartuchos de extração.

### **5.2.3 – Limites inferior e superior de quantificação**

Por meio de experimentos realizados, observando os critérios descritos pela resolução 899/2003 da ANVISA, estabelecemos como LIQ a concentração correspondente a 0,1 µg/mL de analito em amostra de plasma humano, representado na figura 17.

Para efeito de construção da curva de calibração, estabelecemos uma concentração de 20 µg/mL, procedendo, se necessário, um processo de co-validação para as amostras de concentração acima desse valor, para garantir a linearidade do método.

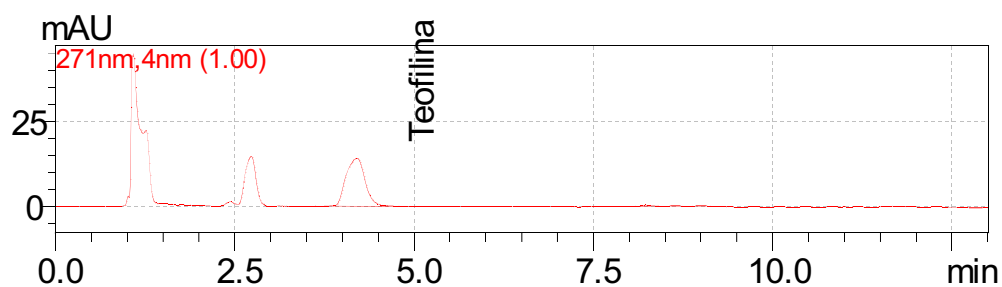
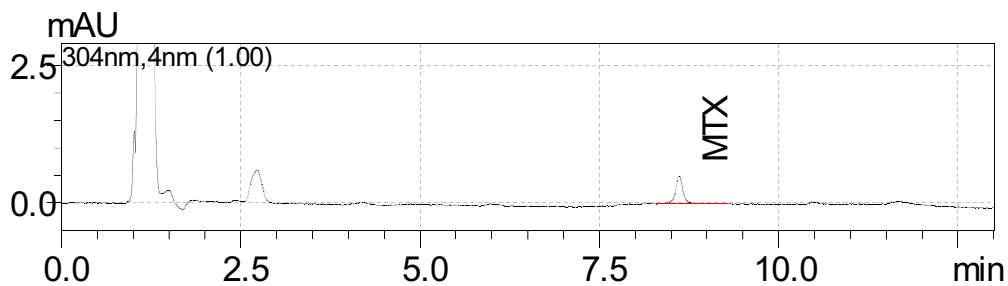


Figura 18: Cromatograma referente à análise da solução de LIQ (0,1 µg/mL; tR= 8,60);  $\lambda$  = 271 nm e 304 nm; Fase móvel: ácido acético 0,1%:metanol:acetonitrila; fluxo de 1,5 mL/min. Legenda: TR= tempo de retenção;  $\lambda$  = comprimento de onda.

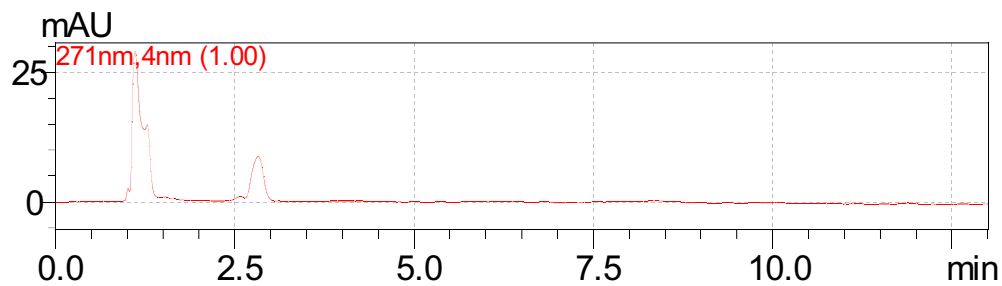
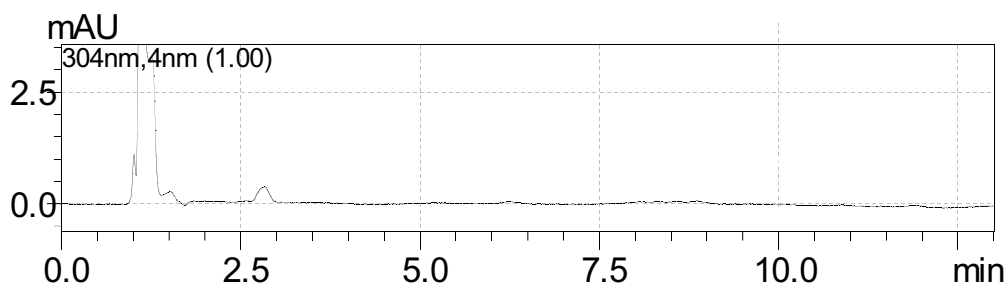


Figura 19: Cromatograma referente à análise da solução de plasma branco;  $\lambda$  = 271 nm e 304 nm; Fase móvel: ácido acético 0,1%:metanol:acetonitrila; fluxo de 1,5 mL/min. Legenda:  $\lambda$  = comprimento de onda.

### 5.2.4 - Precisão e Exatidão

Os resultados obtidos para precisão e exatidão estão representados na tabela 5.

**Tabela 5.** Valores de precisão e exatidão da técnica analítica desenvolvida para o metotrexato.

$C_{\text{esp}}$ ( $\mu\text{g/mL}$ )	$C_{\text{obtida}}$ Lote 1 ( $\mu\text{g/mL}$ )	$C_{\text{obtida}}$ Lote 2 ( $\mu\text{g/mL}$ )	$C_{\text{obtida}}$ Lote 3 ( $\mu\text{g/mL}$ )	Média ( $\pm\text{DP}$ )	$\text{CV}_2$ (%)	Exatidão (%)
0,1	0,100	0,100	0,087	0,095( $\pm 0,007$ )	7,9	95
0,1	0,117	0,118	0,088	0,107 ( $\pm 0,015$ )	14,11	107
$\text{CV}_1$ (%)	11,11	11,00	0,80	-	-	-
0,5	0,500	0,500	0,402	0,467 ( $\pm 0,0565$ )	12,11	93,4
0,5	0,472	0,468	0,550	0,496 ( $\pm 0,046231$ )	9,32	99,2
$\text{CV}_1$ (%)	3,90	4,58	21,84	-	-	-
2,5	2,484	2,483	2,496	2,487 ( $\pm 0,007234$ )	0,29	99,4
2,5	2,664	2,642	2,412	2,572 ( $\pm 0,139576$ )	5,42	102,9
$\text{CV}_1$ (%)	4,93	4,37	2,40	-	-	-
5,0	5,071	5,083	4,762	4,972 ( $\pm 0,181964$ )	3,65	99,4
5,0	5,429	5,371	5,491	5,430 ( $\pm 0,060011$ )	1,10	108,6
$\text{CV}_1$ (%)	4,81	3,88	10,04	-	-	-
10,0	10,217	10,196	10,284	10,232 ( $\pm 0,04596$ )	0,45	102,3
10,0	9,729	9,658	10,380	9,922 ( $\pm 0,397938$ )	4,01	99,2
$\text{CV}_1$ (%)	3,45	3,82	0,64	-	-	-
20,0	19,768	19,856	20,308	19,977( $\pm 0,289726$ )	1,45	99,9
20,0	19,512	19,333	19,270	19,371( $\pm 0,125548$ )	0,64	96,8
$\text{CV}_1$ (%)	0,91	1,88	3,70	-	-	-
CQA	14,974	14,840	16,920	15,578( $\pm 1,164136$ )	7,47	103,8
CQA	14,403	14,276	15,743	14,807( $\pm 0,812795$ )	5,49	98,7
CQA	14,888	15,042	15,471	15,133( $\pm 0,302116$ )	1,99	100,9
CQA	10,916	10,995	14,708	12,206( $\pm 2,166867$ )	17,75	81,4
CQA	13,525	13,665	14,923	14,037 ( $\pm 0,76991$ )	5,48	93,6
$\text{CV}_1$ (%)	12,22	11,89	5,28	-	-	-
CQM	7,957	8,030	9,018	8,335 ( $\pm 0,59262$ )	7,11	104,2
CQM	8,143	8,438	7,804	8,128 ( $\pm 0,317254$ )	3,90	101,6
CQM	7,138	7,423	7,365	7,308 ( $\pm 0,15062$ )	2,06	91,3
CQM	6,996	7,110	9,696	7,934 ( $\pm 1,527001$ )	19,24	99,2
CQM	7,055	7,137	9,096	7,762 ( $\pm 1,155428$ )	14,88	97,0
$\text{CV}_1$ (%)	7,32	7,67	11,30	-	-	-
CQB	0,278	0,285	0,251	0,271 ( $\pm 0,017954$ )	6,62	90,3
CQB	0,247	0,252	0,263	0,254 ( $\pm 0,008185$ )	3,22	84,6
CQB	0,267	0,290	0,245	0,267 ( $\pm 0,022502$ )	8,42	89,0

<b>CQB</b>	0,207	0,232	0,251	0,230 ( $\pm 0,022068$ )	9,59	76,6
<b>CQB</b>	0,251	0,245	0,255	0,250 ( $\pm 0,005033$ )	2,01	83,3
<b>CV<sub>1</sub>(%)</b>	10,8	9,61	2,37	-	-	-

**Legenda:** CQA: Controle de qualidade alto (15,0 µg/mL); CQM: Controle de qualidade médio (8,0 µg/mL); CQB: Controle de qualidade baixo (3,0 µg/mL); Cesp: Concentração esperada; Cobtida: Concentração obtida; Exat.: Exatidão; DP: Desvio padrão; CV<sub>1</sub>: Coeficiente de variação intra-dia; CV<sub>2</sub>: Coeficiente de variação inter-dia; µg/mL: micrograma por mililitro.

Rubino (2001) cita em seu artigo de revisão que trabalhos já publicados em literatura citam coeficientes de variação de  $\pm 15\%$ , sendo que os menores valores foram da ordem de 2%, quando se estabelece a precisão de técnicas analíticas desenvolvidas para análise de metotrexato, semelhante aos que foram obtidos durante o processo de validação dessa técnica (Shah, et al, 1992; Steinborner, et al, 1999).

Aboleneen, *et al* (1995), durante processo de validação de sua técnica analítica, encontraram um coeficiente de variação máximo de 14,4% para controles contendo baixa concentração de metotrexato, ao passo que Chládek, *et al* (2000) estabeleceram um coeficiente de variação máximo de 8,1%, enquanto Albertioni, *et al* (1995) encontraram um coeficiente de variação máximo de 7,8% para o metotrexato.

De acordo com as diretrizes da ANVISA (2003), um coeficiente de variação de até 20%, para os pontos de menor concentração (LIQ), e de 15% para os demais pontos da curva e controles, podendo tolerar até um ponto fora de cada controle, é considerado aceitável para se classificar um método analítico como preciso.

Em nosso trabalho descartamos uma análise de CQA cujo coeficiente de variação foi de 17,75%, e uma análise de CQM cujo coeficiente de variação de 19,24%.

Grande parte dos trabalhos pesquisados em literatura cita estudos de exatidão, com variação de até  $\pm 10\%$  do valor nominal da amostra para os controles mais altos, e de  $\pm 14\%$ , para os controles de menor concentração (Cociglio, *et al*, 1995, Aboleneen, *et al*, 1996, McCrudden, *et al*, 1999), enquanto Rubino (2001) cita em seu artigo de revisão que a média de variação da exatidão foi de  $\pm 15\%$  para a maior parte dos trabalhos (Shah, et al, 1992; Steinborner, et al, 1999).

Como critério de aprovação de um ensaio biológico para um determinado fármaco, a ANVISA admite valores de exatidão que vão de 85 a 115%, havendo a possibilidade de se descartar até 1 ponto de análise de cada controle. A amostra de CQA, que apresentou exatidão de 81,4%, e a amostra de CQB que apresentou exatidão de 76,6%, foram desconsideradas do estudo, de acordo com normatização publicada pela própria ANVISA (Brasil, 2003).

### 5.2.5 – Estabilidade de Longa Duração

Os resultados das amostras controle se encontram representados na tabela 6.

**Tabela 6.** Valores de estabilidade de longa duração para o metotrexato.

<b>C<sub>esp</sub> (µg/mL)</b>	<b>C<sub>obtida</sub> 1</b>	<b>C<sub>obtida</sub> 2</b>	<b>C<sub>obtida</sub> 3</b>	<b>C<sub>obtida</sub> 4</b>	<b>C<sub>obtida</sub> 5</b>	<b>Média (± DP)</b>	<b>CV<sub>2</sub> (%)</b>
<b>15,0</b>	16,196	15,503	15,859	15,123	15,815	15,699 (±0,405)	2,58
<b>15,0 (congelado)</b>	16,045	16,402	16,620	15,267	15,471	15,961 (±0,582)	3,64
<b>Média (± DP)</b>	16,120 (±0,106)	15,952 (±0,635)	16,239 (±0,538)	15,195 (±0,101)	15,643 (±0,243)	-	-
<b>CV<sub>1</sub> (%)</b>	0,65	3,98	3,31	0,66	1,55	-	-
<b>3,0</b>	0,250	0,252	0,262	0,255	0,263	0,256 (±0,005)	1,95
<b>3,0 (congelado)</b>	0,257	0,259	0,256	0,267	0,260	0,259 (±0,004)	1,54
<b>Média (± DP)</b>	0,253 (±0,004)	0,255 (±0,004)	0,259 (±0,004)	0,261 (±0,008)	0,261 (±0,002)	-	-
<b>CV<sub>1</sub> (%)</b>	1,58	1,57	1,54	3,06	0,76	-	-

**Legenda:** Cesp: Concentração esperada; Cobtida: Concentração obtida; Exat.: Exatidão; DP: Desvio padrão; CV<sub>1</sub>: Coeficiente de variação intra-ensaio; CV<sub>2</sub>: Coeficiente de variação inter-ensaio µg/mL: micrograma por mililitro.

O metotrexato mostrou-se estável em plasma humano quando congelado em temperatura de -20°C durante todo o tempo que compreendeu as análises de amostras dos pacientes, o que nos leva a deduzir que a droga presente no plasma dos pacientes também se manteve estável durante todo o intervalo de tempo entre a coleta, a preparação e a análise das mesmas.

Chládek, *et al* (2000) já haviam demonstrado em seu trabalho que o metotrexato era estável sob condições de congelamento tanto a -80°C quanto a -20°C, dados que foram confirmados também por nosso estudo.

### 5.2.6 – Curva de calibração

A curva de calibração obtida para o método continha 6 concentrações analisadas em duplicata, tendo descartado 2 análises, perfazendo um total de 10 pontos. A curva de calibração do método se encontra representada na figura 20.

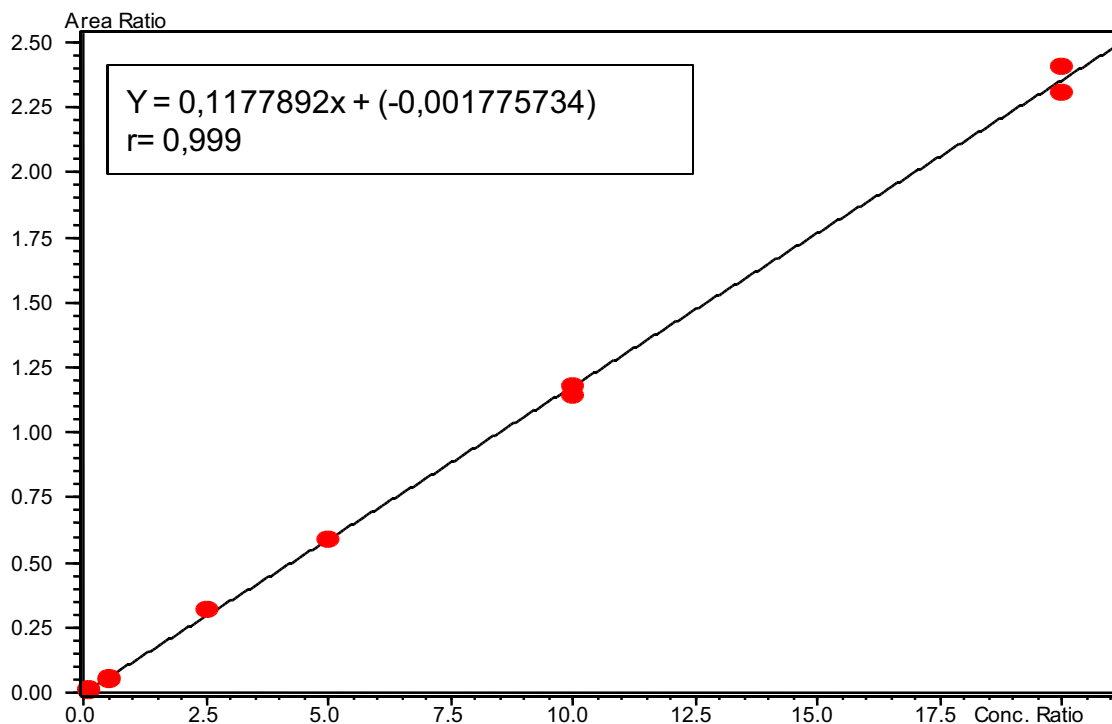


Figura 20. Curva de calibração obtida para a técnica analítica de metotrexato por HPLC

A curva de calibração obtida para a técnica satisfaz todos os critérios estabelecidos pela ANVISA através da resolução 899/2003, obedecendo aos desvios de 20% para o LIQ e 15% para as demais concentrações, além de apresentar um valor de coeficiente de correlação linear (r) de 0,999, bem superior ao valor mínimo de 0,98, exigido pela legislação vigente.

### 5.2.7 – Co-validação

Segundo norma técnica da ANVISA, toda vez que um método analítico sofrer modificações, é necessário que se faça uma adequação, ou co-validação do método. Um dos parâmetros apontados pela ANVISA, e que se torna motivo para se realizar a co-validação, é mudança relevante da faixa de concentração a ser trabalhada.

O método foi validado utilizando-se uma concentração máxima teórica de 20 µg/mL para a curva de calibração, no entanto, ao se analisar as amostras dos pacientes, observamos que a concentração do fármaco nas amostras extrapolava a concentração definida para a curva de calibração, motivando-nos a realizar um estudo para comprovar a linearidade do método, para amostras com concentrações de fármaco acima da concentração máxima definida para a curva de calibração. Os resultados estão representados na tabela 7.

**Tabela 7.** Valores obtidos durante a co-validação da técnica analítica.

<b>C<sub>esp</sub> (µg/mL)</b>	<b>C<sub>obtida</sub> Lote 1 (ug/mL)</b>	<b>C<sub>obtida</sub> Lote 2 (ug/mL)</b>	<b>C<sub>obtida</sub> Lote 3 (ug/mL)</b>	<b>Media (± DP)</b>	<b>CV<sub>2</sub> (%)</b>
<b>CQA (15,0)</b>	14,157	16,045	13,392	14,531 (± 1,365)	9,40
<b>CQA (15,0)</b>	15,183	15,754	14,213	15,05 (± 0,779)	5,17
<b>CQA (15,0)</b>	16,786	16,196	15,922	16,301 (± 0,441)	2,70
<b>CQA (15,0)</b>	14,994	14,660	14,132	14,595 (± 0,434)	2,97
<b>CQA (15,0)</b>	16,662	15,624	16,040	16,108 (± 0,522)	3,24
<b>Media (± DP)</b>	15,556 (±1,134)	15,655 (±0,601)	14,734 (±1,178)	-	-
<b>CV<sub>1</sub> (%)</b>	7,29	3,84	7,99	-	-

**Legenda:** CQA: Controle de qualidade alto (15,0 µg/mL); Cesp: Concentração esperada; Cobtida: Concentração obtida; Exat.: Exatidão; DP: Desvio padrão; CV<sub>1</sub>: Coeficiente de variação intra-ensaio; CV<sub>2</sub>: Coeficiente de variação inter-ensaio µg/mL: micrograma por mililitro.

As análises das amostras durante a co-validação demonstraram não haver variação maior do que 15% entre a concentração nominal do CQA (15 µg/mL) e os valores de concentração das amostras diluídas, comprovando que o método conserva sua linearidade mesmo para amostras altamente concentradas, e que o processo de diluição das amostras poderia ser utilizado sem que houvesse alteração nos valores de concentração final.

### **5.3 – ESTIMATIVA DOS PARÂMETROS FARMACOCINÉTICOS DO METOTREXATO EM PACIENTES COM LLA.**

As amostras dos pacientes foram colhidas de acordo com protocolo estabelecido em conjunto com a equipe médica do Hospital Araújo Jorge/ACCG, no município de Goiânia-GO, conforme especificado anteriormente.

As amostras de pacientes foram todas analisadas em duplicata e aquelas que apresentaram concentração maior do que 20  $\mu\text{g/mL}$  foram diluídas e reanalisadas para confirmação dos valores de concentração.

Para a realização da estimativa dos parâmetros farmacocinéticos dos pacientes foram analisados parâmetros como tempo de meia-vida de eliminação ( $t_{(1/2)\beta}$ ); área sob a curva total ( $ASC_t$ ); constante de eliminação ( $K_{el}$ ); clearance total ( $Cl_t$ ) e volume de distribuição ( $V_d$ ), que estão representados na tabela 8.

A área sob a curva total foi estimada segundo o método dos trapezóides, feito a partir das curvas de decaimento, desenhadas para cada paciente, levando-se em consideração as concentrações plasmáticas encontradas e o intervalo de tempo necessário para que fossem atingidas tais concentrações. O valor médio obtido para a área sob a curva neste trabalho equivale a 626,493. Trabalho já publicado em literatura cita como valor médio de área sob a curva 3236, valor bastante diferente do encontrado, porém pode ser explicado devido a dose administrada para os pacientes, que foi de 5  $\text{g/m}^2$  (Wall, *et al*, 2000), enquanto nesse trabalho utilizou-se a concentração de 2  $\text{g/m}^2$ .

As curvas de decaimento para cada pacientes estão representadas pela figura 21.

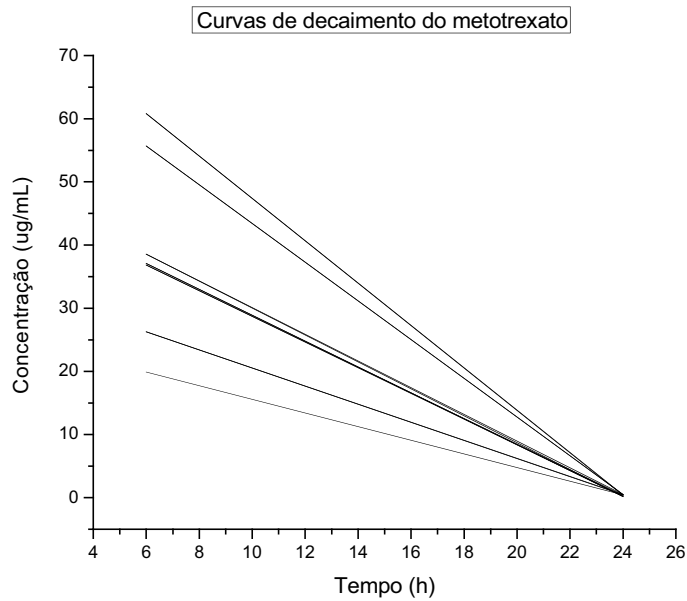


Figura 21. Curvas de decaimento do metotrexato, nos entre os tempos 6 e 24 h (N = 7).

Dados presentes em literatura apontam para um tempo de meia vida de eliminação médio variando de 0,9 a 4 h (Hardman & Limbird, 2003, Schumacher, 1995) para pacientes pediátricos, dado confirmado pelo nosso trabalho que apresentou um tempo de meia vida de eliminação médio de 2,73 h, onde o maior valor correspondeu a 3,4 e o menor valor encontrado foi de 2,25 h.

A concentração plasmática do fármaco imediatamente após o término da infusão, momento em que foi realizada a primeira coleta, apresentou uma variação de valores bastante considerável, atingindo uma concentração máxima de 133,849  $\mu\text{mol/L}$  para um paciente analisado, enquanto que o menor valor foi de 43,822  $\mu\text{mol/L}$  foi obtido para outro paciente, tendo uma concentração média de 86,498  $\mu\text{mol/L}$ .

Esses dados demonstram que os altos níveis de concentração plasmática obtidos nesse trabalho foram semelhantes a valores obtidos em outras publicações, estando dentro da faixa de concentração esperada para esse fármaco. (Thompson, *et al*, 2006; Piard, *et al*, 2006; Aumente, *et al*, 2006).

**Tabela 8.** Dose e concentração plasmática do metotrexato

<b>Paciente</b>	<b>DA (mg)</b>	<b>SC (cm<sup>2</sup>)</b>	<b>DAj (mg/cm<sup>2</sup>)</b>	<b>C 6 h +/- DP (umol/L)</b>	<b>C 24 h +/- DP (umol/L)</b>
<b>DRCV</b>	1972	1,014	2000	43,822 (±1,815)	1,095 (± 0,07)
<b>ADS</b>	2127	0,846	1800	57,817 (±2,645)	1,106 (±0,063)
<b>ERS</b>	1972	0,507	1000	122,508 (±1,833)	1,087
<b>NMP</b>	2035	0,786	1600	84,854 (±5,933)	0,341 (±0,002)
<b>KCRS</b>	1989	0,553	1100	81,544 (±0,105)	0,426
<b>TSC</b>	1935	1,137	2200	81,095 (±4,427)	0,836 (±0,068)
<b>MLS</b>	1961	1,224	2400	133,849 (±1,296)	1,036 (± 0,02)
<b>Média (± DP)</b>	1998,71 (± 64,26)	0,8667 (± 0,27)	1728,57 (±531,39)	86,498 (±32,246)	0,846 (±0,330)
<b>Mediana</b>	1972	0,846	1800	81,544	1,036

**Legenda:** DA: dose administrada; SC: superfície corporal; DA.: dose ajustada; C 6 h: concentração após 6 h da infusão; C 24 h: concentração após 24 h da infusão; DP: desvio padrão.

**Tabela 9.** Parâmetros farmacocinéticos estimados para o metotrexato

<b>Paciente</b>	<b>Kel (h<sup>-1</sup>)</b>	<b>t<sub>(1/2)</sub>β (h)</b>	<b>Vd (L)</b>	<b>CL<sub>T</sub> (L/h)</b>	<b>ASC (μg*h/mL)</b>
<b>DRCV</b>	0,2038	3,40	28,188	5,745	348,133
<b>ADS</b>	0,2200	3,15	17,047	3,750	479,932
<b>ERS</b>	0,2616	2,65	4,757	1,244	803,855
<b>NMP</b>	0,3080	2,25	8,133	2,505	638,683
<b>KCRS</b>	0,2887	2,40	5,954	1,719	639,829
<b>TSC</b>	0,2566	2,70	13,332	3,421	643,046
<b>MLS</b>	0,2717	2,55	10,617	2,884	831,975
<b>Média (± DP)</b>	0,2586 (±0,036)	2,73 (±0,409)	12,575 (± 8,091)	3,038 (± 1,485)	626,493 (±169,924)
<b>Mediana</b>	0,2616	2,65	10,617	2,884	639,829

**Legenda:**  $K_{el}$ : constante de eliminação;  $V_d$ : Volume de distribuição;  $Cl_T$ : *clearance total*; ASC: área sob a curva de concentração vs tempo; DP: desvio padrão.

Em trabalhos publicados recentemente, observou-se concentrações semelhantes, quando comparados os dados de pacientes pediátricos, com idade de 0 a 12 meses, submetidos a um protocolo de tratamento contendo infusão de 4 g/m<sup>2</sup>, durante 24 h, sendo que as maiores concentrações variaram de 27 a 150 µM para pacientes de 0 a 6 meses de idade, enquanto que para pacientes de 7 a 12 meses de idade as concentrações variaram de 26 a 140 µM, obtendo concentrações médias de 74 e 60 µM para as respectivas faixas etárias, valores muito próximos aos encontrados nesse trabalho (Thompson, *et al*, 2006; Piard, *et al*, 2006; Aumente, *et al*, 2006).

Uma vez que a dose do fármaco utilizada em todos os pacientes foi a mesma (média de 1998,71 mg), acredita-se que exista um comportamento farmacocinético bastante variável para o metotrexato, no entanto defende-se que, por apresentar taxa de eliminação mais rápida em pacientes pediátricos, fato que pode ser observado ao analisarmos o *clearance*, sugere a utilização segura em altas doses, no sentido de aumentar os efeitos benéficos em pacientes leucêmicos, sem que haja elevação dos riscos de desenvolvimento de toxicidade associada ao uso do fármaco (Aumente, *et al*, 2006).

A concentração baixa de fármaco após 24 h do início da infusão confirma que o fármaco foi rapidamente eliminado, obtendo um valor de concentração médio de 0,846 µmol/L, não sendo detectado fármaco em nenhuma das análises correspondentes às demais coletas (48, 72 e 96 h), o que indica um risco inexistente de toxicidade tardia relacionado ao uso do metotrexato nesses pacientes, além de indicar que o processo de resgate utilizando-se o ácido folínico, iniciado após 24 h do início da infusão, foi bastante eficiente, demonstrando que o protocolo adotado pela equipe médica do hospital possibilita a utilização do fármaco em altas doses para o tratamento de pacientes com LLA, sem a exacerbação dos efeitos tóxicos associados à utilização da medicação, como já citado em outros trabalhos da literatura (Aumente, *et al*, 2006).

O valor do *clearance* total neste trabalho foi estimado a partir dos valores de área sob a curva total (ASC<sub>T</sub>), obtendo-se um valor médio de 3,038 L/h, sendo que o valor máximo obtido por essa estimativa foi de 5,745 L/h para um paciente, o que esta de acordo com trabalhos descritos em literatura, que apontam um *clearance* total médio de 5,29 L/h segundo um modelo base populacional para parâmetros farmacocinéticos. No mesmo trabalho, os autores citam a existência de uma faixa de valores que vai de 3,5 a 7,1L/h, sendo que valores menores de *clearance* poderiam

estar associados à utilização do metotrexato em doses mais altas (Aumente, *et al*, 2006).

Dados indicam ainda que pacientes mais novos possuem uma maior capacidade de eliminação do que pacientes mais velhos, e que o *clearance* sistêmico do metotrexato diminui em função da idade, podendo alcançar portanto concentrações plasmáticas maiores em pacientes com mais idade (Aumente, *et al*, 2006).

A constante de eliminação estimada para os pacientes analisados apresentou um valor médio de  $0,2586 \text{ h}^{-1}$ , sendo que a faixa de variação encontrada foi de  $0,2038$  a  $0,3080 \text{ h}^{-1}$ . Autores afirmam que a constante de eliminação pode variar de acordo com a idade dos pacientes, de forma que em pacientes pediátricos pode-se encontrar um valor médio de  $0,578 \text{ h}^{-1}$ , enquanto que para pacientes adultos, esse valor pode cair para  $0,306 \text{ h}^{-1}$ , valor semelhante ao obtido durante a estimativa dos parâmetros farmacocinéticos nesse trabalho (Hardman & Limbird, 2003, Schumacher, 1995).

Piard, *et al* (2006) citam como valor médio, para a constante de eliminação,  $0,360 \text{ h}^{-1}$ . Nesse mesmo trabalho há a citação de outros autores que encontraram valores de constante de eliminação da ordem de  $0,410 \text{ h}^{-1}$ . Esses dados demonstram a grande variabilidade existente na farmacocinética do metotrexato, fato já citado por outros autores (Piard, *et al*, 2006; Aumente, *et al*, 2006).

Outro parâmetro farmacocinético estimado neste trabalho corresponde ao volume de distribuição, cujo valor médio encontrado foi de  $12,575 \text{ L}$ , com uma faixa de variação que foi de  $5,954$  a  $28,188 \text{ L}$ . Outros trabalhos citam, como valores médios para o volume de distribuição, valores que variaram de  $8,67$  a até  $25,7 \text{ L}$ , comprovando mais uma vez a grande variabilidade dos parâmetros farmacocinéticos que o metotrexato apresenta, principalmente em uma área bastante delicada, como a pediatria (Wall, *et al*, 2000; Aumente, *et al*, 2006).

## 6. CONCLUSÕES

A método analítico desenvolvido e validado para a análise do metotrexato em plasma humano mostrou-se bastante eficaz não apenas para a detecção quanto para a quantificação do fármaco.

O método caracterizou-se por ser de fácil execução, demandar pouco tempo para obtenção de resultados, o que possibilita sua implantação em serviços de emergência de hospitais, além de laboratórios de análises clínicas e toxicológicas, dada a importância do acompanhamento terapêutico dos pacientes.

A utilização do PDA acoplado ao HPLC permitiu a detecção de dois compostos, em comprimentos de onda bastante distintos, utilizando-se uma mesma corrida cromatográfica, possibilitando uma redução considerável no número de injeções a ser realizadas, preservando componentes importantes do cromatógrafo como coluna, detector, além de possibilitar uma diminuição do número de cartuchos para extração, resultando em considerável diminuição de custos, o que viabiliza ainda mais sua utilização como método de rotina para a análise, sem os riscos de reações cruzadas com outros compostos, observadas nas análises por métodos imunológicos.

Os parâmetros farmacocinéticos do metotrexato observados nos pacientes do Hospital Araújo Jorge demonstraram que o protocolo utilizado pelo serviço médico do hospital possibilita um tratamento eficaz, uma vez que as concentrações plasmáticas atinjam níveis considerados tóxicos, além de evidenciar que o resgate realizado com o ácido folínico impediu o surgimento de toxicidade tardia nesses pacientes.

Os parâmetros farmacocinéticos do metotrexato apresentaram uma grande variabilidade, fato que também pode ser observado em outros trabalhos já publicados em literatura, o que confirma a necessidade de se realizar o monitoramento terapêutico para esse fármaco.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABOLENEEN, H.; SIMPSON, J.; BACKES, D. Determination of methotrexate in serum by high performance liquid chromatography. ***Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications***, v. 681, n. 1-2, p.217-254, 2001.

ALBERTIONI, F., PETTERSSON, B., OLOF, B., et al. Simultaneous quantitation of methotrexate and its two main metabolites in biological fluids by a novel solid-phase extraction procedure using high-performance liquid chromatography. ***Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications***, v. 665, n. 1, p.163-170, 1995.

AUMENTE, D., BUELGA, D. S., LUKAS, J. C., GOMEZ, P., TORRES, A., GARCÍA, M. J. Population Pharmacokinetics of High-Dose Methotrexate in Children with Acute Lymphoblastic Leukaemia. ***Clinical Pharmacokinetic***, V. 45, n.12, p. 1227-1238, 2006.

BECQUEMONT, L., VERSTUYFT, C., KERB, R. et al. Effect of grapefruit juice on digoxin pharmacokinetics in humans. ***Clinical Pharmacology and Therapeutics***, v. 70, n. 4, p. 311-316, 2001.

Brasil, Agência Nacional de Vigilância Sanitária, resolução nº 899/2003, disponível em [www.anvisa.gov.br](http://www.anvisa.gov.br)

CHEN, M.L., CHIOU, W.L. ***Journal of Pharmaceutical Science***, v.71, p. 129, 1982.

CHLÁDEK , J., SISPERA, L., MARTÍNKOVÁ, J. High-performance liquid chromatographic assay for the determination of 5- methyltetrahydrofolate in human plasma. ***Journal of Chromatography B***, v. 744, p. 307–313, 2000.

CIOLA, R. **Fundamentos da Cromatografia a Líquido de Alto Desempenho – HPLC**. Ed. Edgard Blucher, ISBN: 8521201389, São Paulo-SP, 2006. p. 179.

COCIGLIO, M.; HILLAIRE-BUYS, D.; ALRIC.C. Determination of methotrexate and 7-hydroxymethotrexate by liquid chromatography for routine monitoring of plasma levels. ***Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications***, v. 674, n. 1, p.101-110, 1995.

CUNHA, L.C.; RAMALHO, P.I.S.; REZENDE, K.R.; MARINHO, C.H.C., OLIVEIRA, E.C.DE.; SILVA, N.Z. Validação analítica em CLAE-UV para monitoração plasmática de

metilprednisolona e do succinato de metilprednisolona. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v.1, n. 1, p.23-34, 2004.

DEVEAUX, M., RÉVUELTA, E., MORNAY, E., HÉDOUIN, V. & GOSSET, D. Immunoassay of digoxin in hair. **Forensic Science International**, v. 84, p. 219-223, 1997.

EKSBORG, S.; ALBERTIONI, F.; RASK, C.; et al. Methotrexate plasma pharmacokinetics: importance of assay method. **Cancer Letters**, v. 108, n. 2, p.163-169, 1996.

ESTÈVE, M. A., DEVICTOR-PIERRE, B., GALY, G., ANDRÉ, N., COZE, C., LACARELLE, B., BERNARD, J.L., MONJANEL-MOUTERDE, S. Severe acute toxicity associated with high-dose methotrexate (MTX) therapy: use of therapeutic drug monitoring and test-dose to guide carboxypeptidase G2 rescue and MTX continuation. **European Journal of Clinical Pharmacology**, v. 63, p. 39–42, 2007.

EVANS, W. E., RELLING, M. V., BOYETT, J. M., HON PUI, C. Does pharmacokinetic variability influence the efficacy of high-dose methotrexate for the treatment of children with acute lymphoblastic leukemia: wath can we learn from small studies? **Leukemia Research**, v. 21, n. 5, p. 435-437, 1997.

EVANS, W. E., SCHENTAG, J. J. and JUSKO, W. J. - **Applied Pharmacokinetics: Principles of Therapeutic Drug Monitoring**, 2<sup>nd</sup> edition Applied Therapeutics, Inc., Vancouver, Washington, 1986.

GIBALDI, M. **Biopharmaceutics and Clinial Pharmacokinetics**, 3<sup>rd</sup> ed., Lea & Febiger, Philadelphia, 1984.

GRAM, L. F. The dose–concentration–effect relationships—the basis for TDM. A critical appraisal. **International Congress Series**, v. 1220, p. 117– 123, 2001.

GRONINGER, E., PROOST, J.H., DE GRAAF, S.S.N. Pharmacokinetic studies in children with cancer. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, v. 52, p. 173–197, 2004.

HALLWORTH, M. & CAPPS, N. - **Therapeutic drug monitoring, Clinical Biochemistry in Medicine**, ACB Venture Publications, London, 1993.

HARDMAN, J.G. & LIMBIRD, L.E. **Goodman & Gilman's The Phamacological Basis of Therapeutics**, 10<sup>th</sup> ed., McGraw Hill, New York-USA, 2003.

HON PUI, C., ROBISON, L. L., LOOK, A. T. Acute lymphoblastic leukaemia. **Lancet**, v. 371, p. 1030–1043, 2008.

JOHNE, A., BROCKMÖLLER, J., BAUER, S. et al. Pharmacokinetic interaction of digoxin with an herbal extract from St John's wort (*Hypericum perforatum*). **Clinical Pharmacology and Therapeutics**, v. 66, n. 4, p. 338-345, 1999).

KIFFMEYER, T., GOTTZE, H.J., JURSCH, M., LUDERS, U. **Analytical Chemistry**, v. 361, p. 185, 1998.

KINOSHITA, A., KUROSAWA, Y., KONDOH, K., SUZUKI, T., MANABE, A., INUKAI, T., SUGITA, K., NAKAZAWA, S. Effects of sodium in hydration solution on plasma methotrexate concentrations following high-dose methotrexate in children with acute lymphoblastic leukemia. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**, v. 51, p. 256–260, 2003.

LI, H., LUO, W., ZENG, Q., LIN, Z., LUO, H., ZHANG, Y. Method for the determination of blood methotrexate by high performance liquid chromatography with online post-column electrochemical oxidation and fluorescence detection. **Journal of Chromatography B**, v. 845, p. 164–168, 2007.

LOBO, E.D., BALTHASAR, J. P. Highly sensitive high-performance liquid chromatographic assay for methotrexate in the presence and absence of anti-methotrexate antibody fragments in rat and mouse plasma. **Journal of Chromatography B**, v. 736, p. 191–199, 1999.

McCRUDEN, E.A; TETT, S.E. Improved high-performance liquid chromatography determination of methotrexate and its major metabolite in plasma using a polystyrene-divinylbenzene column. **Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications**, v. 721, p.87-92, 1999.

PALMISANO, F., GUERRIERI, A., ZAMBONIN, P.G., CATALDI, T.R. **Analytical Chemistry**, v. 61, n° 9, p, 946, 1989.

PIARD, C., BRESSOLLE, F., FAKHOURY, M., ZHANG, D., YACOBEN, K., RIEUTORD, A., JACQZ-AIGRAIN, E. A limited sampling strategy to estimate individual pharmacokinetic parameters of methotrexate in children with acute lymphoblastic leukemia. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**, © Springer-Verlag 2006

RUBINO, F.M. Separation methods for methotrexate, its structural analogues and metabolites. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, v. 764, n. 1-2, p.217-254, 2001.

SABINO, M. A., ODOE FILHO, V., MALUF, P. T., SCHILLER, P. G., SANNA, M. C., EUSTAQUIO, M. S. Leucemia linfocítica aguda na infância- Conceitos atuais no tratamento e experiência do Instituto da Criança. *Pediatria (São Paulo)*, v. 3, p. 296-303, 1981.

SCHUMACHER, E.G. *Therapeutic drug monitoring*. Appleton&Lange, Norwalk, Conecticut, USA, 1995, 527-531p.

SEIDEL, H., NYGAARD, R., MOE, P. J., JACOBSEN, G., LINDQVIST, F. B., SLARDAL, L. On the prognostic value of systemic methotrexate clearance in childhood acute lymphocytic leukemia. *Leukemia Research*, v. 21, n. 5, p. 429-434, 1997.

SHAH, V.P., MIDHA, K.K., DIGHE, S., MCGILVERAY, I.J., YACOBI, A., LAYLOFF, T., VISWANATHAN, C.T., COK, C.E., MCDOWALL, R.D., PITTMAN, K.A., SPECTOR, S. *Journal of Pharmaceutical Science*, v. 81, p. 309, 1992.

STEINBORNER, S., HENION, J. *Analytical Chemistry*, v. 71, nº13, p. 2340, 1999.

SYVA® EMIT® METHOTREXATE ASSAY, Dade Behring, 1996

TETEF, M. L., MARGOLIN, K.A., DOROSHOW, J.H., AKMAN,S., LEONG, L.A., MORGAN JR, R.J., RASCHKO, J.W., SLATKIN, N., SOMLO, G., LONGMATE, J.A., CARROL, M.I., NEWMAN, E.M. Pharmacokinetics and toxicity of high-dose intravenous methotrexate in the treatment of leptomeningeal carcinomatosis. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, v. 46, p. 19-26, 2000.

THOMPSON, P. A., MURRY, D. J., ROSNER, G. L., LUNAGOMEZ, S., BLANEY, S. M., BERG, S. L., CAMITTA, B. M., DREYER, Z. E., BOMGAARS, L. R. Methotrexate pharmacokinetics in infants with acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, Springer-Verlag 2006.

**United States Pharmacopeia (USP) Convention**; US Pharmacopeia 27, Rockville, 2004.

WALL, A.M., GAJJAR, A., LINK, A., MAHMOUD, H., PUI, C-H., RELLING, M.V. Individualized methotrexate dosing in children with relapsed acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia*, v. 14, p. 221-225, 2000.

WANG, J. J., FREEMAN, A. I., SINKS, L. F. Treatment of Acute Lymphocytic Leukemia by High-Dose Intravenous Methotrexate. **Cancer Research**, v. 36, p. 1441-1444, 1976.

WINTER, M. E. **Basic Clinical Pharmacokinetics**, 2nd edition, 6th printing, Applied Therapeutics, Inc., Vancouver, Washington, 1992.

WOLFROM, C., HARTMANN, R., FENGLER, R., BROHMOLLER, S., INGWERSEN, A., HENZE, G. Randomized Comparison of 36-Hour Intermediate-Dose Versus 4-Hour High-Dose Methotrexate Infusions for Remission Induction in Relapsed Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia. **Journal of Clinical Oncology**, v. 11, n. 5, p. 827-833, 1993.

YOUNG, L. Y., KODA-KIMBLE, M. A., GUGLIELMO JR., B. J. and KRADJAN, W. A. - **Handbook of Applied Therapeutics**, Applied Therapeutics, Inc., Vancouver, Washington, 1989.

ZGÓRKA, G., KAWKA, S. Application of conventional UV, photodiode array (PDA) and fluorescence (FL) detection to analysis of phenolic acids in plant material and pharmaceutical preparations. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.24, p. 1065-1072, 2001.

## 8. ANEXOS

ANEXO 1: Valores de exames bioquímicos de função hepática e renal (transaminases e creatinina) dos pacientes, no momento de realização do estudo.

<b>Paciente</b>	<b>Transaminase glutâmico-pirúvica (TGP)</b>	<b>Transaminase glutâmico-oxalacética (TGO)</b>	<b>Creatinina</b>
<b>DRCV</b>	18 U/L	22 U/L	0,89 mg/dL
<b>ADS</b>	16 U/L	21 U/L	0,87 mg/dL
<b>ERS</b>	22 U/L	31 U/L	0,90 mg/dL
<b>NMP</b>	14 U/L	18 U/L	0,76 mg/dL
<b>KCRS</b>	24 U/L	29 U/L	0,78 mg/dL
<b>TSC</b>	19 U/L	23 U/L	0,81 mg/dL
<b>MLS</b>	21 U/L	27 U/L	0,87 mg/dL
<b>Referência</b> *	< 29 U/L	< 36 U/L	< 1,0 mg/dL

\*Valores de referência adequados a pacientes pediátricos; metodologia empregada:enzimático colorimétrico.



Razão para requerimento do MTF (marcar e descrever)	
<input type="checkbox"/> Possível interação entre fármacos	<input type="checkbox"/> Mudança na terapia (e.g.: dose)
<input type="checkbox"/> Regime diário duplicado	<input type="checkbox"/> Estado clínico alterado
<input type="checkbox"/> Suspeita de ineficácia	<input type="checkbox"/> Paciente pediátrico
<input type="checkbox"/> Suspeita de reação adversa/intoxicação	<input type="checkbox"/> Paciente geriátrico
<input type="checkbox"/> Suspeita de falta de aderência	<input type="checkbox"/> Uso crônico de álcool (Quantidade/semana?)
<input type="checkbox"/> Fumante (Quantos cigarros/dia?)	<input type="checkbox"/> Obeso
<input type="checkbox"/> Subnutrido	<input type="checkbox"/> Outros (favor descrever)





## ANEXO 3

### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Estamos solicitando sua autorização, após ser esclarecido (a) sobre as informações a seguir, quanto à participação de seu(sua) filho(a) em uma pesquisa. Meu nome é Raphael Nunes Leles, sou pesquisador responsável e minha área de atuação é em Ciências da Saúde (Farmacêutico-Bioquímico).

Após estar esclarecido (a) e no caso de aceitar a participação de seu(sua) filho(a) a fazer parte do estudo, assine ao final deste documento, que está em duas vias. Uma delas é sua e a outra é do pesquisador responsável. Em caso de dúvida sobre a pesquisa, você poderá entrar em contato com os pesquisadores abaixo. Em caso de dúvidas quanto aos direitos do seu dependente participante da pesquisa, você poderá entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa da Associação de Combate ao Câncer em Goiás (Hospital Araújo Jorge) pelo telefone:

---

Em caso de recusa seu dependente não será penalizado de forma alguma.

### INFORMAÇÕES SOBRE A PESQUISA

**1. Título do Projeto: MONITORIZAÇÃO TERAPÊUTICA DO METOTREXATO SOB ALTAS DOSES, EM PACIENTES PORTADORES DE LEUCEMIA LINFOBLÁTICA AGUDA**

**2. Pesquisador Responsável pela pesquisa e aplicação deste termo de consentimento:**

Farmacêutico-Bioquímico: Raphael Nunes Leles.(Fone: 9160-5179)

**3. Pesquisadores participantes:**

Prof. Dr. Marize Campos Valadares Bozini / Telefone: (62) 3209 6044 R. 227 / 81173040

Prof. Dr. Luiz Carlos da Cunha / Telefone: (62) 3209 6044 R. 227/99942586

**4. Informações gerais**

**Objetivos da Pesquisa:**

- Este estudo envolve a dosagem do medicamento que seu(sua) filho(a) estará utilizando no tratamento da leucemia linfoblástica aguda, cujo nome é **metotrexato**, para saber se o mesmo está alcançando uma quantidade adequada na corrente sanguínea.
  
- A pesquisa tem por objetivo estudar os valores da quantidade do medicamento no sangue e comparar: com valores de referência; com a possível influência de outros medicamentos; com o estado clínico de seu(sua) filho(a) e com os resultados dos exames laboratoriais do(a) mesmo(a). Em nenhum momento o(a) paciente poderá receber o medicamento sem que o mesmo seja indicado para o tratamento do caso.
  
- Seu filho(a) será submetido(a) a coletas de sangue pela veia, utilizaremos para isto, um catéter previamente inserido na veia do braço (3 coletas de 5 mL de sangue nas primeiras 24 h; e 1 coleta de sangue às 36, 48, 72 e 96 horas posteriores. A primeira coleta será logo antes da tomada da primeira dose do medicamento feita pelo Médico na via intratecal. As seringas e catéteres são estéreis e a coleta será feita por pessoal de enfermagem treinado para tal atividade. As coletas nos tempos 48, 72 e 96 h serão feitas diretamente na veia do braço. Para todas estas coletas, o(a) paciente permanecerá no leito; o braço será pressionado levemente por um torniquete de borracha, sendo que no local da punção será feita antissepsia com álcool a 70° GL ou com álcool iodado (caso não haja história de alergia). A coleta de sangue poderá ocasionar algum desconforto ou lesão no local da punção (como um hematoma), passageiros e recuperáveis.
  
- As amostras de sangue serão encaminhadas para o Laboratório de Análises Toxicológicas da UFG para se analisar a quantidade do metotrexato presente no sangue.
  
- O período de participação de seu(sua) dependente é o correspondente às 4 sessões de infusão previstas para o tratamento.
  
- Na eventual hipótese de ocorrência de danos tecnicamente comprovados, decorrentes da participação de seu(sua) filho(a) na pesquisa, lhe dará direito à indenização
  
- Na oportunidade, notificamos ao Sr(a) que há benefícios diretos para o(a) paciente, na execução deste protocolo de estudo (orientação farmacêutica, ajuste de posologia/dose) e que não haverá pagamento de qualquer remuneração para participar do mesmo.

- Este estudo proporcionará maiores conhecimentos a respeito dos valores médios atingidos pelo Metotrexato no sangue, em pacientes com o mesmo tipo de doença que acomete seu(sua) filho(a), o que poderá melhorar a qualidade do atendimento, da eficácia do tratamento e do melhor momento para a administração do medicamento (Leucovorin) que é utilizado como antídoto para possíveis efeitos colaterais existentes durante o tratamento.
- A participação de seu(sua) filho(a) no estudo não implica em alterar a rotina de retorno do(a) mesmo(a) ao Hospital Araújo Jorge (Associação de Combate ao Câncer de Goiás).
- O nome de seu(sua) filho(a), enquanto participante deste estudo, estará sob sigilo absoluto durante todo o período da pesquisa e após a conclusão desta.
- O seu (sua) filho(a) não é obrigado/a a continuar participando da pesquisa e pode, a qualquer momento, sair da mesma, sem que isso leve o/a mesmo(a) a deixar de ser tratado/a como os/as demais pacientes desta instituição.

### CONSENTIMENTO DA PARTICIPAÇÃO DA PESSOA COMO SUJEITO

Eu, \_\_\_\_\_, portador do RG nº \_\_\_\_\_, CPF nº \_\_\_\_\_, responsável pelo (a) paciente do Hospital das Clínicas com prontuário nº \_\_\_\_\_, subscrevo-me abaixo, autorizando, livre e espontaneamente, a participação de meu/minha dependente no estudo com o título **“MONITORIZAÇÃO TERAPÉUTICA DO METOTREXATO SOB ALTAS DOSES, EM PACIENTES PORTADORES DE LEUCEMIA LINFOBLÁSTICA AGUDA”**, como sujeito.

Fui devidamente informado e esclarecido pelos pesquisadores **Farm. Paulo C.M.Freitas /Dr. Luiz Carlos Cunha / Dr. Marize Campos Valadares Bozinis**, sobre a pesquisa, os procedimentos de coletas de sangue nela envolvidos, assim como os possíveis riscos e benefícios decorrentes da participação de meu/minha dependente.

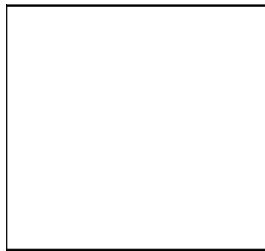
Foi-me garantido que posso retirar meu consentimento a qualquer momento, sem que isto leve à qualquer penalidade ou interrupção do acompanhamento, assistência ou tratamento de meu/minha dependente.

**Local e data:**                    **Goiânia, \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_**

**Responsável:**

Nome: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

**Assinatura Dactiloscópica:**



**Pesquisador:**

Nome: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

Presenciamos a solicitação de consentimento, esclarecimentos sobre a pesquisa e aceite do sujeito em participar.

**Testemunhas (não ligadas à equipe de pesquisadores):**

Nome: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

Nome: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

**Observações**

**complementares:** \_\_\_\_\_

---

---

---