

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Fármaco e Medicamentos
Área de Produção e Controle Farmacêuticos

**AVALIAÇÃO DA INATIVAÇÃO DE CISPLATINA, DOXORRUBICINA E
PACLITAXEL UTILIZANDO SOLUÇÕES DE ASEPTO 75[®] 0,5%, HIPOCLORITO
DE SÓDIO 10% E TIOSSULFATO DE SÓDIO 10%**

Fernanda dos Santos Scaramel

Dissertação para obtenção do grau de:
MESTRE

Orientadora:
Profa. Tit. Terezinha de J. Andreoli Pinto

São Paulo

2009

DEDALUS - Acervo - CQ



30100015779

Ficha Catalográfica

Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP

Scaramel, Fernanda dos Santos
S285a Avaliação da inativação de cisplatina, doxorrubicina e paclitaxel
utilizando soluções de asepto 75^º 0,5%, hipoclorito de sódio 10%
e tiosulfato de sódio 10% / Fernanda dos Santos Scaramel. --
São Paulo, 2009.
109p.
BDF, p. 109

Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas
da Universidade de São Paulo. Departamento de Farmácia.
Orientador: Pinto, Terezinha de Jesus Andreoli

I. Medicamentos : Controle de qualidade I. T. II. Pinto,
Terezinha de Jesus Andreoli, orientador.

615.19015 CDD

Fernanda dos Santos Scaramel

**Avaliação da inativação de cisplatina, doxorrubicina e paclitaxel utilizando
soluções de asepto 75 0,5%, hipoclorito de sódio 10% e tiosulfato de sódio 10%**

Comissão Julgadora
da
Dissertação para obtenção do grau de Mestre

Profa. Tit. Terezinha de Jesus Andreoli Pinto
Orientador/Presidente

1º. Examinador

2º. Examinador

de/pia: 15/10/2009

*Aos meus pais Nelson e Rita, pelos valores
passados e por tudo que sou.*

*Ao meu marido Toshiro, por me ajudar a ser uma
pessoa melhor todos os dias.*

*À Profa. Tit. Terezinha de Jesus Andreoli Pinto,
pela orientação, confiança e exemplo.*

AGRADECIMENTOS

À Coordenadoria do Curso de Pós-Graduação em Fármaco e Medicamentos do Departamento de Farmácia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP, pela oportunidade na efetivação do curso e obtenção do título.

À Profa. Tit. Terezinha de Jesus Andreoli Pinto, do Departamento de Farmácia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP, pela confiança, exemplo e compreensão na orientação deste trabalho.

À Profa. Dra. Telma Mary Kaneko, do Departamento de Farmácia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP, pelas contribuições no desenvolvimento deste trabalho.

À Profa. Dra. Célia Yamamoto, da Universidade de Juiz de Fora, pelas contribuições no desenvolvimento deste trabalho.

À Dra. Aurea Silveira Cruz, do Laboratório de Cultura Celular do Instituto Adolfo Lutz pelo auxílio técnico na execução deste trabalho e colaboração na realização dos ensaios *in vitro*.

Aos farmacêuticos Rosa Noriko Yamamoto, Janice Campos de Azevedo e Felipe Rebello Lourenço, pelo auxílio técnico e companheirismo na execução deste trabalho.

Aos Srs. Roberto Guttmann e Robert Friedlander pelo apoio e compreensão.

Aos farmacêuticos Ademir Tesser, Gilson Hirata Kobori e Rosely Baroni Jermoloviscious pela amizade e apoio.

À acadêmica Gabriela Marino Schiavon, pela ajuda na execução deste trabalho.

A todo o pessoal da Seção de Culturas Celulares do Instituto Adolfo Lutz, especialmente à Sra. Tamiko I. Ikeda pela colaboração na realização dos ensaios *in vitro*.

A todo o pessoal do laboratório Confar, especialmente à Sra. Marly N. Assunção.

A todos que colaboraram na execução deste trabalho.

Avaliação da inativação de cisplatina, doxorrubicina e paclitaxel utilizando soluções de asepto 75 0,5%, hipoclorito de sódio 10% e tiosulfato de sódio 10%

Os agentes antineoplásicos são considerados drogas de risco, ou seja, aquelas que podem ocasionar efeitos como genotoxicidade, carcinogenicidade, teratogenicidade ou alteração na fertilidade e a exposição dos profissionais de saúde constitui-se em grande preocupação do ponto de vista de saúde ocupacional. Precedendo o seu emprego na terapia oncológica, estes medicamentos devem ser submetidos a análises físicas, químicas e biológicas para avaliação da qualidade, sendo que estes testes geram considerável volume de resíduos que também requerem tratamento. O objetivo deste trabalho foi avaliar a eficácia de diferentes métodos de inativação para as moléculas de cisplatina, doxorrubicina e paclitaxel em solução injetável, utilizando cromatografia líquida de alta eficiência (avaliação química) e teste de citotoxicidade in vitro (avaliação biológica). Foram avaliados os inativantes Asepto 75[®] (solução a 0,5%), hipoclorito de sódio (solução a 10%) e tiosulfato de sódio (solução a 10%). Os ativos ficaram expostos aos inativantes por períodos que variaram de 0 a 6 horas. Os resultados demonstraram que o asepto 75 é eficiente para a inativação química e biológica dos três ativos, sendo o tempo de exposição fator determinante para a degradação química da cisplatina. Os graus de citotoxicidade variaram de nenhum a leve (IZ= 0 a 1). O hipoclorito de sódio possui um grau de citotoxicidade por si só, porém foi eficaz na inativação química dos três ativos. Já o inativante tiosulfato de sódio se mostrou eficaz na inativação química da cisplatina, não tendo efeito sobre a doxorrubicina ou sobre o paclitaxel. Os resultados da avaliação in vitro mostraram-se compatíveis com os da avaliação química. Conclui-se que a inativação dos princípios ativos previamente ao descarte é eficaz para reduzir os riscos ocupacionais e ambientais das drogas citotóxicas.

Palavras-chave: Inativação, Citotoxicidade, Cromatografia, Cisplatina, Doxorrubicina, Paclitaxel

Evaluation of inactivation of cisplatin, doxorubicin and paclitaxel using solutions of 0,5% asepto 75, 10% sodium hypochlorite and 10% sodium thiosulfate

The anti-neoplastic agents are considered risk drugs, that is, the ones that can cause effects, such as genotoxicity, carcinogenicity, teratogenicity or change in fertility. Because of these factors, the exposure of the health care professionals are a great concern of occupational health. Before the use of the oncological therapy, these drugs should be undergone to the physical, chemical and biological tests for the quality evaluation, considering that these test also produce a considerable amount of waste which also demand treatment. The aim of this work is to evaluate the efficacy oh the different methods of inactivation for the cisplatine molecules, doxorubicine and paclitaxel in injection solutions. Using high performance liquid chromatography (chemical evalution) and in vitro citotoxicity test (biological evaluation). It has been evaluated Asepto 75 degradant (aqueous solution at 0,5%), sodium hypochlorite (aqueous solution at 10%) and sodium thyosulfate (aqueous solution at 10%). The drugs were exposed to the degradants in periods that ranged from 0 to 6 hours. The results have been demonstrated that asepto 75 is efficient for the chemical and biological inativation of the drugs, and the time of exposition is determinant for the chemical degradation of cisplatin. The citotoxicity grades have ranged from "none" to "slight". The sodium hypochlorite has a toxicity grade for itself, although it was effective in the chemical degradation of the three drugs. Yet the sodium thiosulfate degradant has demonstrated to be effective in the chemical inativation of cisplatin, not having effects over doxorubicin or paclitaxel. The results of in vitro evaluation have been compatible with the chemical evaluation. It concludes that the inativation of the drugs before the waste is effective to reduce the occupational and environmental risks of citotoxic drugs.

Key words: Inativation, Citotoxicity, Chromatography, Cisplatin, Doxorubicin, Paclitaxel

Lista de figuras

Figura 1: linha do tempo de desenvolvimento de drogas de platina para terapia do câncer

Figura 2: Estrutura química da cisplatina

Figura 3: Estrutura química da doxorubicina

Figura 4: Estrutura química do paclitaxel

Figura 5: Estrutura química do dicloroisocianurato de sódio

Figura 6: Cromatograma – Cisplatina, Padrão 100%.

Figura 7: Varredura – Cisplatina, Padrão 100%.

Figura 8: Cromatograma – Amostra de cisplatina

Figura 9: Varredura – Amostra de cisplatina

Figura 10: Cromatograma – Cisplatina, Branco Aseptado.

Figura 11: Varredura – Cisplatina, Branco Aseptado.

Figura 12: Cromatograma – Cisplatina em asepto, tempo 0 hora.

Figura 13: Varredura – Cisplatina em asepto, tempo 0 hora.

Figura 14: Cromatograma – Cisplatina em asepto, tempo 1 hora.

Figura 15: Varredura – Cisplatina em asepto, tempo 1 hora.

Figura 16: Cromatograma – Cisplatina em asepto, tempo 6 horas.

Figura 17: Varredura – Cisplatina em asepto, tempo 6 horas.

Figura 18: Cromatograma – Cisplatina, Branco Hipoclorito de Sódio

Figura 19: Varredura – Cisplatina, Branco Hipoclorito de sódio.

Figura 20: Cromatograma – Cisplatina em hipoclorito de sódio, tempo 0 hora.

Figura 21: Varredura – Cisplatina em hipoclorito de sódio, tempo 0 hora.

Figura 22: Cromatograma – Cisplatina em hipoclorito de sódio, tempo 1 hora.

Figura 23: Varredura – Cisplatina em hipoclorito de sódio, tempo 1 hora.

Figura 24: Cromatograma – Cisplatina em hipoclorito de sódio, tempo 6 horas.

Figura 25: Varredura – Cisplatina em hipoclorito de sódio, tempo 6 horas.

Figura 26: Cromatograma – Cisplatina, Branco Tiosulfato de Sódio.

Figura 27: Varredura – Cisplatina, Branco Tiosulfato de Sódio.

Figura 28: Cromatograma – Cisplatina em tiosulfato de sódio, tempo 0 hora.

Figura 29: Varredura – Cisplatina em tiosulfato de sódio, tempo 0 hora.

Figura 30: Cromatograma – Cisplatina em tiosulfato de sódio, tempo 1 hora.

Figura 31: Varredura – Cisplatina em tiosulfato de sódio, tempo 1 hora.

Figura 32: Cromatograma – Cisplatina em tiosulfato de sódio, tempo 6 horas.

Figura 33: Varredura – Cisplatina em tiosulfato de sódio, tempo 6 horas.

Figura 34: Cromatograma – Doxorrubicina, Padrão 100%.

Figura 35: Varredura – Doxorrubicina, Padrão 100%.

Figura 36: Cromatograma – Amostra de doxorrubicina

Figura 37: Varredura – Amostra de doxorrubicina

Figura 38: Cromatograma – Doxorrubicina, Branco Aseptado.

Figura 39: Varredura – Doxorrubicina, Branco Aseptado.

Figura 40: Cromatograma – Doxorrubicina em asepto, tempo 0 hora.

Figura 41: Varredura – Doxorrubicina em asepto, tempo 0 hora.

Figura 42: Cromatograma – Doxorrubicina em asepto, tempo 1 hora.

Figura 43: Varredura – Doxorrubicina em asepto, tempo 1 hora.

Figura 44: Cromatograma – Doxorrubicina em asepto, tempo 6 horas.

Figura 45: Varredura – Doxorrubicina em asepto, tempo 6 horas.

Figura 46: Cromatograma – Doxorrubicina, Branco Hipoclorito de Sódio

Figura 47: Varredura – Doxorrubicina, Branco Hipoclorito de sódio.

Figura 48: Cromatograma – Doxorrubicina em hipoclorito de sódio, tempo 0 hora.

Figura 49: Varredura – Doxorrubicina em hipoclorito de sódio, tempo 0 hora.

Figura 50: Cromatograma – Doxorrubicina em hipoclorito de sódio, tempo 1 hora.

Figura 51: Varredura – Doxorrubicina em hipoclorito de sódio, tempo 1 hora.

Figura 52: Cromatograma – Doxorrubicina em hipoclorito de sódio, tempo 6 horas.

Figura 53: Varredura – Doxorrubicina em hipoclorito de sódio, tempo 6 horas.

Figura 54: Cromatograma – Doxorrubicina, Branco Tiosulfato de Sódio.

Figura 55: Varredura – Doxorrubicina, Branco Tiosulfato de Sódio.

Figura 56: Cromatograma – Doxorrubicina em tiosulfato de sódio, tempo 0 hora.

Figura 57: Varredura – Doxorrubicina em tiosulfato de sódio, tempo 0 hora.

Figura 58: Cromatograma – Doxorrubicina em tiosulfato de sódio, tempo 1 hora.

Figura 59: Varredura – Doxorrubicina em tiosulfato de sódio, tempo 1 hora.

Figura 60: Cromatograma – Doxorrubicina em tiosulfato de sódio, tempo 6 horas.

Figura 61: Varredura – Doxorrubicina em tiosulfato de sódio, tempo 6 horas.

Figura 62: Cromatograma – Paclitaxel, Padrão 100%.

Figura 63: Varredura – Paclitaxel, Padrão 100%.

Figura 64: Cromatograma – Amostra de paclitaxel

Figura 65: Varredura – Amostra de paclitaxel

Figura 66: Cromatograma – Paclitaxel, Branco Aseptó.

Figura 67: Varredura – Paclitaxel, Branco Aseptó.

Figura 68: Cromatograma – Paclitaxel em asepto, tempo 0 hora.

Figura 69: Varredura – Paclitaxel em asepto, tempo 0 hora.

Figura 70: Cromatograma – Paclitaxel em asepto, tempo 1 hora.

Figura 71: Varredura – Paclitaxel em asepto, tempo 1 hora.

Figura 72: Cromatograma – Paclitaxel em asepto, tempo 6 horas.

Figura 73: Varredura – Paclitaxel em asepto, tempo 6 horas.

Figura 74: Cromatograma – Paclitaxel, Branco Hipoclorito de Sódio

Figura 75: Varredura – Paclitaxel, Branco Hipoclorito de sódio.

Figura 76: Cromatograma – Paclitaxel em hipoclorito de sódio, tempo 0 hora.

Figura 77: Varredura – Paclitaxel em hipoclorito de sódio, tempo 0 hora.

Figura 78: Cromatograma – Paclitaxel em hipoclorito de sódio, tempo 1 hora.

Figura 79: Varredura – Paclitaxel em hipoclorito de sódio, tempo 1 hora.

Figura 80: Cromatograma – Paclitaxel em hipoclorito de sódio, tempo 6 horas.

Figura 81: Varredura – Paclitaxel em hipoclorito de sódio, tempo 6 horas.

Figura 82: Cromatograma – Paclitaxel, Branco Tiosulfato de Sódio.

Figura 83: Varredura – Paclitaxel, Branco Tiosulfato de Sódio.

Figura 84: Cromatograma – Paclitaxel em tiosulfato de sódio, tempo 0 hora.

Figura 85: Varredura – Paclitaxel em tiosulfato de sódio, tempo 0 hora.

Figura 86: Cromatograma – Paclitaxel em tiosulfato de sódio, tempo 1 hora.

Figura 87: Varredura – Paclitaxel em tiosulfato de sódio, tempo 1 hora.

Figura 88: Cromatograma – Paclitaxel em tiosulfato de sódio, tempo 6 horas.

Figura 89: Varredura – Paclitaxel em tiosulfato de sódio, tempo 6 horas.

Lista de tabelas

Tabela 1: Graus de reatividade para teste de difusão em ágar e teste de contato direto

Tabela 2: Curva de calibração em três pontos e porcentagem de área da amostra para cisplatina

Tabela 3: Resultados da cromatografia após exposição ao aseptó 75

Tabela 4: Resultados da cromatografia após exposição ao hipoclorito de sódio

Tabela 5: Resultados da cromatografia após exposição ao tiosulfato de sódio

Tabela 6: Curva de calibração em três pontos e porcentagem de área da amostra para doxorubicina

Tabela 7: Resultados da cromatografia após exposição ao aseptó 75

Tabela 8: Resultados da cromatografia após exposição ao hipoclorito de sódio

Tabela 9: Resultados da cromatografia após exposição ao tiosulfato de sódio

Tabela 10: Curva de calibração em três pontos e porcentagem de área da amostra para paclitaxel

Tabela 11: Resultados da cromatografia após exposição ao aseptó 75

Tabela 12: Resultados da cromatografia após exposição ao hipoclorito de sódio

Tabela 13: Resultados da cromatografia após exposição ao tiosulfato de sódio

Lista de gráficos

Gráfico 1: Curva de calibração Cisplatina

Gráfico 2: Curva de calibração Doxorrubicina

Gráfico 3: Curva de calibração Paclitaxel

SUMÁRIO

1. Introdução	1
2. Revisão de literatura	3
2.1. Cisplatina	3
2.2. Doxorrubicina	7
2.3. Paclitaxel	10
2.4. Asepto 75	13
2.5. Hipoclorito de sódio	14
2.6. Tiosulfato de sódio	15
2.7. Cromatografia líquida de alta eficiência	16
2.8. Citotoxicidade in vitro	19
3. Objetivo	25
4. Material e método	26
4.1. Análise cromatográfica	26
4.1.1. Material	26
4.1.2. Método	27
4.1.2.1. Determinação de cisplatina por HPLC	27
4.1.2.1.1. Fase móvel	27
4.1.2.1.2. Preparação do padrão	27
4.1.2.1.3. Preparação da amostra	27
4.1.2.1.4. Sistema cromatográfico	28
4.1.2.2. Determinação de doxorrubicina por HPLC	30
4.1.2.2.1. Hidróxido de sódio 2N	30
4.1.2.2.2. Fase móvel	30
4.1.2.2.3. Preparação do padrão	30
4.1.2.2.4. Preparação da amostra	30
4.1.2.2.5. Sistema cromatográfico	31
4.1.2.3. Determinação de paclitaxel por HPLC	33
4.1.2.3.1. Fase móvel	33
4.1.2.3.2. Preparação do diluente	33
4.1.2.3.3. Preparação do padrão	33
4.1.2.3.4. Preparação da amostra	33
4.1.2.3.5. Sistema cromatográfico	34

4.1.3. Teste de citotoxicidade in vitro	36
4.1.3.1. Material	36
4.1.3.2. Método	36
5. Resultados	39
5.1. Cisplatina	39
5.1.1. Curva de calibração	39
5.1.2. Cromatografia asepto 75	40
5.1.3. Citotoxicidade asepto 75	40
5.1.4. Cromatografia hipoclorito de sódio	40
5.1.5. Citotoxicidade hipoclorito de sódio	40
5.1.6. Cromatografia tiosulfato de sódio	41
5.1.7. Citotoxicidade tiosulfato de sódio	41
5.2. Doxorrubicina	42
5.2.1. Curva de calibração	42
5.2.2. Cromatografia asepto 75	43
5.2.3. Citotoxicidade asepto 75	43
5.2.4. Cromatografia hipoclorito de sódio	43
5.2.5. Citotoxicidade hipoclorito de sódio	43
5.2.6. Cromatografia tiosulfato de sódio	44
5.2.7. Citotoxicidade tiosulfato de sódio	44
5.3. Paclitaxel	45
5.3.1. Curva de calibração	45
5.3.2. Cromatografia asepto 75	46
5.3.3. Citotoxicidade asepto 75	46
5.3.4. Cromatografia hipoclorito de sódio	46
5.3.5. Citotoxicidade hipoclorito de sódio	46
5.3.6. Cromatografia tiosulfato de sódio	47
5.3.7. Citotoxicidade tiosulfato de sódio	47
6. Discussão	48
7. Conclusão	81
8. Referências bibliográficas	82

1. Introdução

Em função do crescente aumento da exposição da população mundial a fatores de risco para câncer tais como poluição, agrotóxicos, cigarro, alimentos industrializados e com o aprimoramento do campo da medicina diagnóstica e do tratamento, levando ao aumento da sobrevida média dos pacientes, o uso de medicamentos anti-neoplásicos vem crescendo mundialmente.

O câncer ocupacional é decorrente da exposição a agentes químicos, físicos ou biológicos classificados como carcinogênicos, presentes no ambiente de trabalho. Para a Occupational Safety and Health Administration:

(...)[um potencial carcinogênico ocupacional significa qualquer substância, combinação ou mistura de substâncias, que causam um aumento da incidência de neoplasias benignas ou malignas, ou uma substancial diminuição do período de latência entre a exposição e o aparecimento da doença em humanos ou em um ou mais mamíferos de experimentação como resultado de exposição por via oral, respiratória ou dérmica, ou qualquer outra exposição que resulte na indução de tumor em um local diferente do local de administração. Esta definição também inclui qualquer substância que seja metabolizada em carcinogênicos ocupacionais pelos mamíferos (Hunter, 1989).

A proporção de casos de câncer atribuída a exposições ocupacionais é variável, entre 4 e 40%, dependendo do tipo de tumor e metodologia empregada. Nos países industrializados, a exposição a cancerígenos parece ser maior nos trabalhadores dos países em desenvolvimento, como decorrência de procedimentos precários de segurança e do uso de tecnologia obsoleta (Ribeiro; Wünsch Filho, 2004).

No Brasil, a legislação específica do Ministério do Trabalho e Emprego reconhece como agentes cancerígenos, apenas cinco substâncias: benzeno, 4-aminodifenil, benidina, beta-naftilamina e 4-nitrodifenil. Porém, agentes reconhecidamente cancerígenos, como radiação ionizante, amianto e a sílica, estão entre as que possuem exposições toleradas. Desta forma, adota-se no País a concepção de "níveis seguros" para a exposição ocupacional a maior parte dos cancerígenos, o que conflita com o atual conhecimento científico sobre carcinogênese, que não reconhece limites seguros para a exposição do trabalhador aos agentes cancerígenos (Ribeiro; Wünsch Filho, 2004).

Por outro lado, muitos dos medicamentos usados no tratamento de tumores malignos podem provocar o aparecimento de câncer e alterações na fertilidade e no sistema imunológico quando pessoas saudáveis são expostas a eles.

Assim, é uma preocupação do ponto de vista da saúde ocupacional e da preservação do meio ambiente prevenir a exposição acidental a resíduos destes medicamentos.

Para garantir a segurança no manuseio do medicamento e no descarte dos resíduos, é essencial que a manipulação seja realizada em ambiente adequado (por exemplo, fluxo laminar classe II B2), por pessoal treinado e que as superfícies e materiais que estiveram em contato com o medicamento, bem como as sobras da manipulação sejam inativados antes do descarte final.

Assim, se torna relevante fazer uma avaliação da capacidade de inativação de diversos compostos levando em consideração o custo do procedimento, tempo necessário para inativação e citotoxicidade do resíduo final, de modo a otimizar o processo e minimizar os riscos, tanto ocupacionais quanto ambientais.

2. Revisão de literatura

2.1. Cisplatina

A cis-diclorodiaminoplatina ou cisplatina é um agente genotóxico largamente empregado no tratamento do câncer. É utilizada em tratamentos contra câncer de testículo, ovário, esôfago, carcinoma de bexiga, mama, cabeça, pescoço e pulmão (Kartalou e Essigmann, 2001; Chaney *et al.*, 2004; Brabec e Kasparkova, 2005; Kim *et al.*, 2005; Wang e Lippard, 2005). Essa droga liga-se ao DNA, formando aductos intra e intercadeias, o que causa alterações na estrutura do DNA. O DNA é o alvo principal da cisplatina, muito embora somente 1% da cisplatina intracelular reaja com o DNA nuclear (Mandic *et al.*, 2003; Wang e Lippard, 2005).

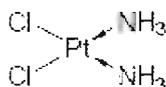


Figura 1: estrutura química da cisplatina (Merck Index)

O potencial de compostos de platina como agentes antitumorais foi primeiramente reconhecido após a demonstração da sua capacidade de inibição da divisão bacteriana. Investigações subseqüentes identificaram a cisplatina como composto ativo e uma década de estudos clínicos levaram à sua aprovação pelo FDA (*Food and Drug Administration*) em 1978 (Kelland, 2007).

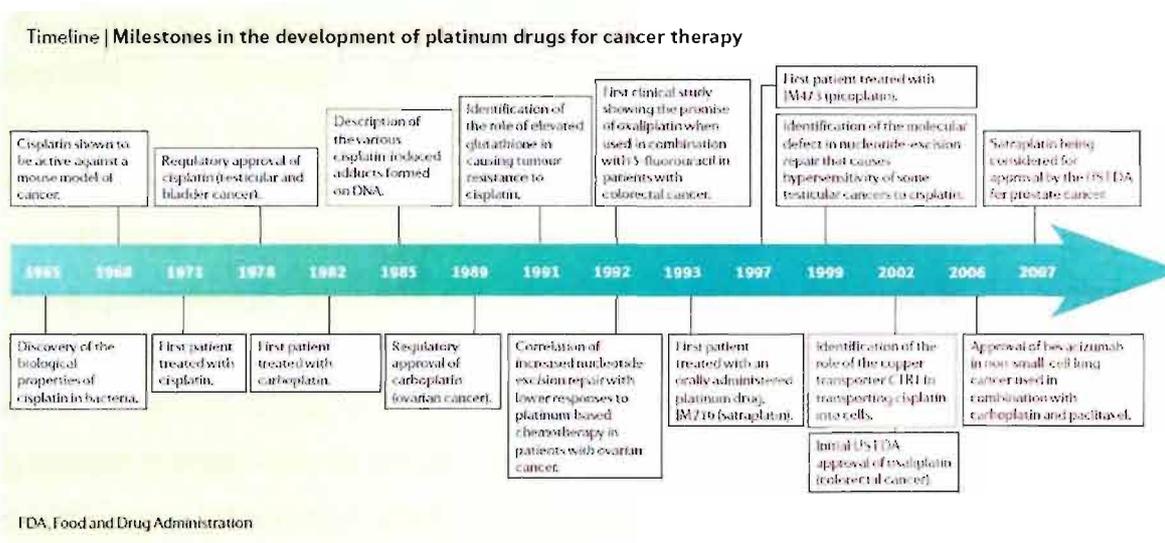


Figura 2: linha do tempo de desenvolvimento de drogas de platina para terapia do câncer (Kelland, 2007).

O mecanismo pelo qual a cisplatina alcança o interior das células não é bem conhecido. O composto é uma molécula polar e não atravessa a membrana facilmente. Foi proposto que aproximadamente 50% da taxa inicial de entrada da droga na célula seja devido à difusão passiva através da membrana celular e que 50% de droga remanescente resulta da difusão facilitada por meio de um canal na membrana celular (Sedletska *et al.*, 2005).

O alvo para os compostos antitumorais de platina é o DNA, ao qual eles se ligam eficientemente formando uma variedade de aductos, os quais bloqueiam a duplicação e a transcrição e induzem morte celular. A natureza dos aductos afeta um número de vias de transdução e induzem a apoptose ou necrose nas células tumorais (Fuentes *et al.*, 2003). Juntamente aos fatores que não operam diretamente ao nível dos aductos no DNA, estes têm um importante papel na atividade biológica dos complexos de platina, incluindo-se a sua citotoxicidade e processos relacionados à resistência das células tumorais (Brabec e Kasparkova, 2005). O tratamento com a cisplatina induz não somente estresses que causam danos no DNA, mas também estresse oxidativo e no retículo endoplasmático (Torigoe *et al.*, 2005).

O uso clínico da cisplatina está limitado pelo seu efeito tóxico e pelo desenvolvimento de resistência (Sedletska *et al.*, 2005; Wang e Lippard, 2005). Existem muitos mecanismos envolvidos na resistência à cisplatina, como a absorção reduzida da droga, aumento dos níveis celulares de tiol/folato e aumento da taxa de

reparo do DNA, assim como elevação do conteúdo da glutatona ou da atividade da glutatona-S transferase, elevação da metalotioneína e variação nas atividades de reparo de DNA. Esses mecanismos celulares contribuem para modular a interação droga-alvo e a sensibilidade à droga (Sedletska *et al.*, 2005).

O reparo do DNA é considerado um importante mecanismo de resistência para a quimioterapia baseada em cisplatina. O reparo por excisão de nucleotídeos (NER: *nucleotide excision repair*) é uma via vital na remoção dos aductos cisplatina-DNA e no reparo do dano no DNA e, dessa forma, esse sistema de reparo constitui o principal mecanismo de defesa celular contra os efeitos tóxicos da cisplatina e um dos principais fatores que contribuem para a resistência tumoral à droga (Brabec e Kasparkova, 2005; Torigoe *et al.*, 2005). Defeitos celulares no NER resultaram em hipersensibilidade à cisplatina (Cohen e Lippard, 2001; Siddik, 2003).

O NER consiste em dois sub-mecanismos sobrepostos: reparo genômico global (GGR), que é capaz de reparar lesões na fita não transcrita de genes ativos e no genoma não transcrito, e reparo acoplado à transcrição (TCR). Este remove lesões que bloqueiam a transcrição (Hanawalt, 2001; Tremeau-Bravard *et al.*, 2004). Furuta *et al.* (2002) demonstraram a importância do TCR para a resposta celular aos danos causados pela cisplatina, os quais representam um forte impedimento para a progressão da RNA polimerase II.

Há evidências de que mecanismos celulares adicionais de reparo podem afetar a eficácia antitumoral da cisplatina (Bejanski *et al.*, 2004). O reparo homólogo (HR) e síntese translesão (TLS) proporcionam rotas pelas quais as células podem continuar a duplicação, a despeito da presença de aductos bloqueando a forquilha de duplicação (Doetsch *et al.*, 2001). HR e TLS são freqüentemente considerados como vias de tolerância, pois permitem às células completarem a duplicação e a mitose ao custo de mutações e freqüências de recombinação aumentadas.

Sabe-se que a ação genotóxica da cisplatina requer também a atividade de reparo do DNA tipo *mismatch*, um sistema de reparo pós-duplicação que corrige nucleotídeos não pareados ou pareados de forma errada (Yamada *et al.*, 1997). O papel primário do MMR (*mismatch repair*) é a correção de erros gerados na duplicação do DNA, supressão da recombinação, interação com outros sistemas de reparo, regulação dos *checkpoints* e apoptose. O *status* do MMR de uma célula pode influenciar a sua resposta a uma grande variedade de agentes

quimioterápicos. Recentes observações demonstram que o MMR media a citotoxicidade da cisplatina em células tumorais e que a disfunção deste tipo de reparo pode resultar na resistência ou tolerância à cisplatina (Papouli *et al.*, 2004). A ligação do complexo MMR aos aductos de cisplatina parece aumentar a citotoxicidade desses aductos, tanto por ativar vias de sinalização que levam à apoptose ou por causar um ciclo de tentativas frustradas de reparo durante a síntese translesão dos aductos cisplatina-DNA (Brabec e Kasparkova, 2005).

Foi descoberto que proteínas do domínio HMG (*high mobility group*) poderiam se ligar com alta afinidade ao *crosslink 1,2* intracadeia e que este reconhecimento do dano por parte das proteínas HMG poderia provocar um efeito observável nas células tratadas com a cisplatina e, portanto, essas proteínas poderiam mediar a genotoxicidade dessa droga (revisado em Cohen e Lippard, 2001). Uma outra possível via pela qual a cisplatina poderia causar genotoxicidade é por meio do *repair shielding*. Os aductos de cisplatina são removidos primariamente por enzimas do sistema de reparo por excisão de nucleotídeos (NER). Quando as proteínas do domínio HMG, como HMG1, se ligam às lesões causadas pela cisplatina, o NER pode ser bloqueado, permitindo a persistência do dano. Os aductos cisplatina-DNA resultantes bloqueiam a duplicação e transcrição (Cohen e Lippard, 2001).

Outro mecanismo pelo qual a cisplatina pode danificar as células é por meio do seqüestro de fatores nucleares essenciais para as funções celulares. A ligação de tais fatores ao DNA modificado pela cisplatina desvia os mesmos de seus sítios naturais, impedindo essas proteínas de realizarem as suas funções críticas (Cohen e Lippard, 2001; Chaney *et al.*, 2004).

2.2. Doxorubicina

A doxorubicina é um antibiótico antraciclínico isolado de cultura de *Streptomyces peucetius* var. *caesius*. A doxorubicina liga-se ao ácido nucléico, provavelmente por intercalação específica do núcleo antraciclínico planar com a dupla hélice de DNA, sendo que muitas funções do DNA são afetadas incluindo a síntese de DNA e RNA (KEIZER *et al.*, 1990).

A doxorubicina (8-hidroxiacetil (8S,10S)-10-[(3-amino-2,3,6-trideoxi- α L-lisohexopiranosil) oxi] – 6,8,11 – trihidroxi-1-metoxi-7,8,9,10-tetrahidronaftaceno-5,12-diona tem fórmula molecular $C_{27}H_{29}NO_{11}$ e peso molecular 543,52. É solúvel em água, metanol e solução aquosa de álcool. É insolúvel em clorofórmio, éter e outros solventes orgânicos. Uma solução a 0,5% de doxorubicina em água tem um pH de 4,0 a 5,5. A solução de injeção, segundo a USP 24, tem um pH entre 2,5 e 4,5. A doxorubicina deve ser estocada em frascos hermeticamente fechados (Reynolds, 1996). Ela é uma base fraca com pKa de 8,3 (Perrin *et al.*, 1981).

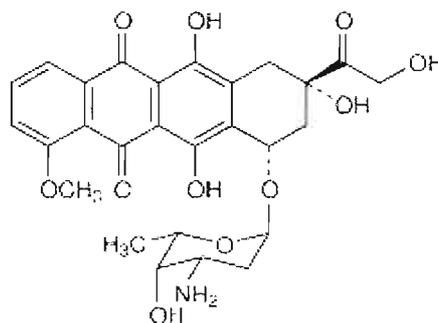


Figura 3: Estrutura química da doxorubicina

A doxorubicina é um agente tanto mutagênico quanto carcinogênico e tem sido empregada com eficácia em leucemias agudas e linfomas malignos. Também é ativa contra tumores sólidos como, por exemplo, câncer de mama. É particularmente eficaz em vários tipos de sarcomas, incluindo osteogênicos, Sarcoma de Ewing e sarcomas de tecidos moles. No tratamento do carcinoma metastásico de tireóide é a droga de melhor escolha. As manifestações tóxicas da doxorubicina incluem a mielossupressão, leucopenia, pode causar lesão cardíaca cumulativa e relacionada

com a dose, resultando em arritmias e insuficiência cardíaca. A ocorrência de extravasamento no local da injeção pode causar necrose local (Keizer *et al.*, 1990).

As antraciclinas são muito utilizadas na oncologia sozinhas ou em conjunto com outros fármacos em regimes quimioterápicos (DeVita, 2005). Dentre elas pode-se destacar a daunorrubicina, a doxorrubicina e mais recentemente a epirrubicina e idarrubicina. A daunorrubicina foi descoberta como substância capaz de diminuir tumores em testes *in vivo* com ratos, e mostrou ser eficaz no tratamento de leucemia pediátrica (Doroshov *et al.*, 2001). A doxorrubicina, descoberta em 1970, é um derivado hidroxilado da daunorrubicina, e apresenta uma ação terapêutica maior.

Acredita-se que o efeito antitumoral das antraciclinas se deve principalmente a sua ação inibidora da topoisomerase II α , impedindo assim a ligação das cadeias do DNA das células e, conseqüentemente, provocando a quebra do DNA e a morte celular.

As antraciclinas possuem um grupo quinona, que contém um anel aromático rígido e planar ligado ao anel de um amino açúcar. Esta estrutura absorve luz em comprimentos de onda ultravioleta e visível, conferindo cor vermelho-alaranjada à substância. O grupo quinona é responsável pela cardiotoxicidade das antraquinonas. Além disso, ele faz com que estas substâncias sofram reações de oxi-redução, as quais geram radicais livres de oxigênio e contribuem para o seu efeito anti-tumoral (DeVita, 2005).

A doxorrubicina é comumente usada no tratamento de vários tipos de tumores, incluindo linfomas de Hodgkins e não-Hodgkins, mielomas múltiplos, sarcoma de ovário, pulmão, estômago e mama (DeVita, 2005) além de câncer no ovário e cervical (Israel *et al.*, 2000).

Segundo Stiles e Allen (1991), a doxorrubicina é estável em soluções ácidas em pH entre 3 a 6,5 mas se decompõe com o aumento do pH. No estado sólido, a doxorrubicina demonstrou ser muito estável, podendo ser estocada por anos à temperatura ambiente e na presença de luz sem perder seu potencial.

A doxorrubicina não é administrada oralmente devido à sua baixa absorção pelo aparelho digestivo (Strohl, 1997). A administração intravenosa é também utilizada para o tratamento de tumores cutâneos (Liu *et al.*, 2002). Sua administração endovenosa permite rápida distribuição no organismo humano.

Acumula-se nos tecidos muito irrigados como: fígado, pulmão, rim e especialmente no coração, sendo esta uma das explicações para a toxicidade cardíaca.

O tratamento prolongado com a doxorubicina costuma ser evitado devido ao mecanismo de resistência que as células desenvolvem ao fármaco ou estruturas químicas semelhantes. As células passam a expressar uma glicoproteína P-gp dependente da bomba ATP, que expelle o fármaco para fora do meio intracelular, não restando quantidades suficientes para inibir o crescimento celular (Heywang *et al.*, 1998).

Várias alternativas estão sendo estudadas para que os efeitos tóxicos da doxorubicina sejam eliminados para melhorar a eficácia do tratamento. Uma das estratégias é a mudança da via de administração de endovenosa para tópica, no caso do tratamento de câncer de pele. A via tópica, além de ser mais prática, não possui riscos de contaminação e não necessita de profissional especializado para administração do fármaco. Os efeitos tóxicos podem ser menores já que a dose administrada é menor e localizada.

Shimizu *et al.* (1986) estudaram a ação tópica da doxorubicina em pacientes com neoplasia cutânea decorrente de câncer de mama avançado. Utilizaram a doxorubicina a 0,04% incorporada em pomada de polietilenoglicol e observaram que não ocorreu crescimento da úlcera neoplásica, mas não atuou no tumor de mama propriamente dito.

2.3. Paclitaxel

Paclitaxel é o fármaco precursor de uma nova classe de agentes estabilizantes de microtúbulos, os taxanos. A sua descoberta envolveu a investigação de aproximadamente 12.000 compostos naturais pelo Instituto Nacional de Câncer dos Estados Unidos (NCI-USA) em 1963. Neste trabalho, diferentes extratos foram testados contra um painel de tumores experimentais e, no final, apenas aqueles que apresentavam alguma atividade antiproliferativa foram selecionados (Rowinsky *et al.*, 1990).

O paclitaxel foi extraído, primariamente, no começo dos anos 60 a partir do extrato da casca do teixo do Pacífico, o *Taxus brevifolia*. A forma pura foi obtida somente em 1969 e sua estrutura foi descrita pela primeira vez por Wani *et al.*, em 1971. Seu desenvolvimento foi, inicialmente, dificultado pelo suprimento limitado da árvore e pela baixa solubilidade da molécula em água, o que, de fato, retardou em muito sua disponibilização para o mercado farmacêutico. Por ser um fármaco de origem vegetal, seu suprimento era escasso. Em meados dos anos 80, a partir do desenvolvimento de um método de produção semi-sintética, passou a ser obtido de um precursor não citotóxico extraído de teixos mais abundantes, como o *Taxus baccata* (Horwitz, 1992).

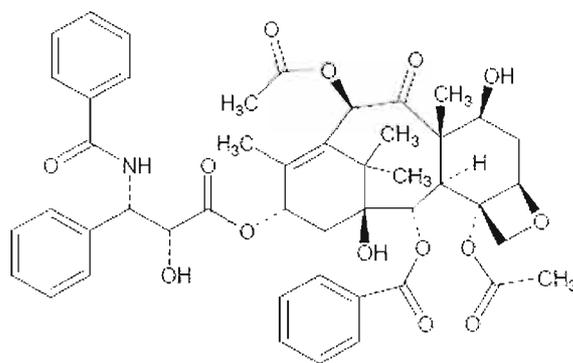


Figura 4: estrutura química do paclitaxel

O interesse por este agente cresceu substancialmente quando o NCI mostrou ter atividade anti-tumoral bastante significativa (Schiff e Horwitz, 1980).

Tem atividade antineoplásica em carcinoma epitelial de ovário, em câncer de mama, colo, cabeça, células não-pequenas de pulmão e sarcoma de Kaposi associados com AIDS (Rowinsky, 1994).

O seu mecanismo de ação foi divulgado em 1984 por Manfredi *et al.* Diferentemente de outros agentes que atuam nos microtúbulos, tais como os alcalóides da vinca, o paclitaxel promove a polimerização da tubulina. Os microtúbulos são essenciais para a manutenção da forma celular, sendo um dos componentes do fuso mitótico e do transporte de organelas dentro das células. A sua ligação aos microtúbulos estimula a polimerização da tubulina, o que, por sua vez, estabiliza os microtúbulos. Dessa forma, o ciclo celular acaba sendo bloqueado em sua última fase, isto é, a G2 e na mitose, o que impede a divisão celular e a conseqüente proliferação das células neoplásicas (Horwitz, 1992; Horwitz *et al.*, 1993).

O mecanismo preciso pelo qual o paclitaxel é transportado para dentro das células é ainda desconhecido. Supõe-se que, devido à sua natureza hidrofóbica, o paclitaxel possa entrar na célula por difusão passiva. Esta hipótese é suportada pelos achados de experimentos onde o paclitaxel foi adicionado juntamente com azida sódica sob células em cultura. Esta é responsável pela diminuição do nível de ATP celular e, quando ela é acrescentada ao meio de cultura, a concentração intracelular de paclitaxel não é afetada (Manfredi e Horwitz, 1984).

A estrutura do paclitaxel consiste em um anel taxano que confere atividade citostática à molécula (Wani *et al.*, 1971) e uma cadeia lateral éstereo-específica com dois anéis aromáticos conectados por uma amida.

Estudos de ressonância magnética nuclear mostraram que paclitaxel exibe pequeno grau de flexibilidade, dependendo da polaridade do sistema solvente. Em solventes apolares como o clorofórmio, sofre agregação na dependência da sua concentração. Este efeito de agregação está diretamente ligado à formação de pontes de hidrogênio dos quatro grupos funcionais de sua estrutura. Essas ligações podem ser coordenadas, ocorrendo ligações intra e extramoleculares, o que propaga a agregação e provoca a precipitação das moléculas. A tendência de agregação pode contribuir para o seu mecanismo de ação, ou seja, o fármaco estabilizaria os microtúbulos pela formação de pontes associadas entre o fármaco e os microtúbulos (Balasubramanian e Alderfer, 1994).

Sabe-se que o paclitaxel é solúvel em uma variedade de solventes orgânicos incluindo etanol, metanol, benzeno e clorofórmio, entre outros, porém, tais solventes não são administrados em humanos, com exceção do etanol (Trisse, 1997). É praticamente insolúvel em água. A falta de grupos ionizáveis na molécula não permite que se manipule o pH com o intuito de aumentar a sua solubilidade.

Para possibilitar a comercialização do paclitaxel pela indústria farmacêutica, efetuou-se a sua solubilização em um sistema de solvente utilizado pelo NCI-USA, chamado de diluente 12. Este é composto por partes iguais de etanol e o surfactante Cremophor EL, um derivado poli-oxetilado de óleo de castor. Essa forma comercial foi denominada originalmente de Taxol .

Um dos maiores problemas associados com a formulação é que o Cremophor EL é tóxico. Embora também seja utilizado para solubilizar outros fármacos, tais como ciclosporina e tenoposido, a quantidade requerida do diluente nestas formulações é inferior à utilizada para solubilizar o paclitaxel (Trisse, 1997). Os efeitos colaterais causados pelo Cremophor EL incluem reações de hipersensibilidade, nefrotoxicidade e neurotoxicidade (Weiss *et al.*, 1990; Rowinsky *et al.*, 1989). O Cremophor EL também tem influência na função do endotélio e músculos, causando vasodilatação, dispnéia, letargia e hipotensão (Liebmann *et al.*, 1993). Com o intuito de amenizar estes efeitos e de reduzir a incidência de reações de hipersensibilidade, medidas profiláticas são adotadas durante o tratamento, como o uso de anti-histamínicos e corticosteróides ao longo da infusão (Sharma *et al.*, 1995).

2.4. Asepto 75

O asepto 75 é um detergente industrial composto por carbonato de sódio, tripolifosfato de sódio, metassilicato de sódio pente granular e dodecilbenzeno sulfonato de sódio. Tem como componente ativo o dicloroisocianurato de sódio anidro em concentração 3,6 %.

O dicloroisocianurato de sódio é um pó ou grânulo branco, de peso molecular 256, contendo de 55 a 60% de cloro disponível. Com fórmula $C_3Cl_2N_3NaO_3$, solubilidade 25 g/100 g de água a 25°C, sua atividade bactericida não é afetada na faixa de pH 6 à 10 (Merck).

Pode ser usado para a limpeza de materiais em solução aquosa com concentração variando de 0,5% a 2,5% e em temperatura de até 50°C.

Por conter cloro, pode causar irritações na pele, olhos e mucosa, devendo ser manuseado com equipamentos de proteção individual, como óculos de segurança, botas, luvas e avental.

O dicloroisocianurato de sódio é um composto anidro clorado, excelente bactericida. É utilizado como fonte de cloro disponível para desinfecção e sanitização por possuir agente estabilizador de cloro o que mantém o efeito sanitizante por mais tempo e por possuir baixo índice de insolúveis.

Por ser inodoro, possui vantagem sobre o hipoclorito de sódio como fonte de cloro.

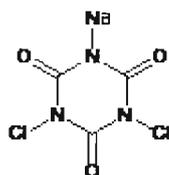
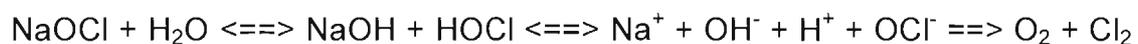


Figura 5: estrutura do dicloroisocianurato de sódio

2.5. Hipoclorito de sódio

O hipoclorito de sódio é um líquido de cor amarelo-esverdeada e odor pungente como cloro. Apresenta pH entre 9 e 12 e é completamente miscível em água.

O hipoclorito de sódio não existe no estado sólido, somente em solução aquosa. Estando em solução aquosa, encontra-se em um equilíbrio químico dinâmico, no qual pode apresentar-se como um sal não-dissociado, dando origem a outras substâncias ou apresentando-se também totalmente dissociado. Essa solução aquosa de hipoclorito de sódio, devido ao seu equilíbrio químico dinâmico, pode ser representada pela seguinte reação química:



2.6. Tiosulfato de sódio

O tiosulfato de sódio é um pó branco, inodoro, utilizado como reagente analítico em larga escala por reagir estequiometricamente com o iodo, em doseamentos por iodometria. Apresenta-se sob duas formas: pó branco (anidro) ou cristais incolores (penta-hidratado) (Merck Index, 2006).

É amplamente solúvel em água (701 g/L), apresenta pH entre 6,0 e 7,5 (solução a 10%, 20°C) (Merck Index, 2006).

Suas propriedades também estão ligadas à inativação de produtos que liberam cloro, sendo utilizado em processos de decolorificação. (Franco e Landgraf, 1999; Silva *et al.*, 1997).

2.7. Cromatografia líquida de alta eficiência

A cromatografia é um método de separação desenvolvido pelo botânico russo Mikhail Tswett no início do século 20 e encontra aplicação em diversos ramos da ciência. A técnica foi inicialmente usada para separar pigmentos de plantas, tais como clorofila e xantofila (Skoog *et al.*, 2002).

Empregou-se a técnica para separar vários pigmentos de plantas como clorofila e xantofila, passando soluções desses componentes através de uma coluna de vidro empacotada com carbonato de cálcio finamente dividido. As espécies separadas apareciam como bandas coloridas na coluna, o que colaborou para a escolha do nome do método (em grego *chroma* significa cor e *graphein* significa escrever) (Skoog *et al.*, 2002).

A cromatografia compreende um grupo diversificado e importante de métodos que permitem ao cientista separar componentes muito semelhantes de misturas complexas. Muitas dessas separações são impossíveis por outros meios.

Em todas as separações cromatográficas, a amostra é transportada por uma fase móvel, que pode ser um gás, um líquido ou um fluido supercrítico. Essa fase móvel é então forçada através de uma fase estacionária imiscível fixa, colocada na coluna ou em uma superfície sólida. As duas fases são escolhidas de modo que os componentes da amostra se distribuam entre as fases móvel e estacionária em vários graus (Harris).

Os componentes que são mais fortemente retidos na fase estacionária movem-se muito lentamente no fluxo da fase móvel enquanto que os componentes que se ligam mais fracamente à fase estacionária movem-se mais rapidamente.

Como consequência dessas diferenças na mobilidade, os componentes da amostra se separam em bandas ou zonas discretas que podem ser analisadas qualitativamente e/ou quantitativamente.

A cromatografia líquida, incluindo o trabalho original de Tswett, foi inicialmente feita em colunas de vidro com diâmetro de 1 a 5 cm e comprimentos de 50 a 500 cm. Para assegurar vazões razoáveis, o diâmetro das partículas de fase estacionária sólida estava geralmente no intervalo de 150 a 200 μm . Mesmo assim, as vazões eram muito baixas, da ordem de alguns décimos de milímetros por minuto. E os

tempos de separação eram longos – de várias horas. Tentativas de acelerar o procedimento clássico por aplicação de bomba de vácuo ou por bombeamento não foram eficientes por que o aumento na vazão prova aumento na altura dos pratos, além do mínimo no gráfico típico de altura de prato versus vazão e o resultado era perda de eficiência.

No início do desenvolvimento da cromatografia líquida, os cientistas perceberam que a eficiência da coluna podia ser aumentada através da diminuição do tamanho da partícula da fase estacionária. Entretanto, somente no final dos anos 1960 foi desenvolvida a tecnologia para a produção e uso de fases estacionárias com partículas de diâmetro de 3 a 10 μm .

Essa tecnologia exigiu equipamentos sofisticados operando altas pressões, que contrastavam acentuadamente com as colunas simples de vidro da clássica cromatografia líquida de fluxo por gravidade. O nome cromatografia líquida de alta eficiência – HPLC é empregado para distinguir estes procedimentos mais novos dos métodos básicos, ainda usados para finalidades preparativas.

A eficiência de uma coluna cromatográfica em separar dois solutos depende em parte das velocidades relativas nas quais as duas espécies eluem. Essas velocidades são determinadas pela magnitude das constantes de equilíbrio das reações de distribuição dos solutos entre as fases móvel e estacionária.

A cromatografia cresceu e tornou-se o primeiro método de separação de espécies químicas muito semelhantes. Além disso, ela pode ser empregada na identificação qualitativa e quantitativa das espécies separadas.

É importante observar que os cromatogramas podem não levar à identificação positiva das espécies presentes na amostra mas fornecem evidência segura da ausência de certos compostos. Assim, se a amostra não produz um pico no mesmo tempo de retenção que um determinado padrão usado em condições idênticas, pode-se considerar que o composto em questão está ausente (ou sua presença ocorre em nível de concentração abaixo do limite de detecção do procedimento).

A cromatografia quantitativa em coluna está baseada na comparação da altura ou da área do pico do analito com a de um ou mais padrões. Em cromatografia planar, a área coberta pela espécie separada funciona como parâmetro analítico. Se as condições forem controladas apropriadamente, estes parâmetros variam linearmente com a concentração.

Uma separação que emprega um único solvente de composição constante é chamada de eluição isocrática. Frequentemente, a eficiência da separação é bastante aumentada pela eluição com gradiente. Neste caso, são empregados dois ou três sistemas de solventes que diferem bastante entre si em polaridade. Depois que a eluição começa, a razão entre os solventes variada de modo programado, algumas vezes de forma contínua e outras vezes em uma série de passos.

O sistema de HPLC conta ainda com um injetor de amostras, que pode ser manual ou automatizado, sendo que este último apresenta melhor precisão entre as injeções (Skoog *et al.*, 2002) e com sistemas detectores, que podem ser de diversos tipos. O detector mais utilizado para aplicações quantitativas é o UV-Visível, podendo ser de comprimento de onda fixo ou variável por arranjo de diodos (DAD). Existem ainda detectores de fluorescência, índice de refração, espectro de massa, dentre outros.

2.8. Citotoxicidade in vitro

2.8.1. Culturas Celulares

Os primeiros experimentos de cultivo de células foram realizados por Ross Granveile Harrison, na Universidade Johns Hopkins, há mais de 100 anos. Harrison implantou pequenos fragmentos de tubo neural de rã em coágulos de linfa da mesma espécie e observou ao microscópio a migração de fibras nervosas. O uso desta técnica continua sendo uma importante ferramenta de estudo (Peres & Curi, 2005). Com ela pode-se investigar as interações específicas que ocorrem em nível celular, além de realizar vários experimentos sob as mesmas condições e minimizar a utilização de animais para vários testes (Pizzoferrato *et al.*, 1994).

Em 1912, Aléxis Carrel, Prêmio Nobel em Cirurgia Experimental, observou que o plasma coagulado era um excelente suporte para fragmentos de tecidos, mas não continha as substâncias necessárias para o crescimento e que a adição de extratos de embriões ou de tecidos tornava possível a proliferação das células. Como profundo conhecedor das técnicas de assepsia, Carrel conseguiu manter por 34 anos uma linhagem de fibroblasto de galinha. Infelizmente, estas técnicas assépticas, desencorajavam muitos pesquisadores que acreditavam que culturas de células eram muito difíceis e sofisticadas (Rizzo *et al.*, 1983; Freshney, 1987).

O desenvolvimento dos meios líquidos e a descoberta dos antibióticos, por volta dos anos 40, propiciaram os experimentos com as culturas de tecidos, fornecendo a base de diversas pesquisas. A primeira linhagem celular infinita isolada a partir de tecido subcutâneo de camundongo recebeu o nome de linhagem L. Desta linhagem, em 1948, por técnica de clonagem ocorreu o isolamento de uma nova linhagem denominada NCTC clone 929, até hoje utilizada nos estudos de toxicidade.

A maioria das culturas celulares, se mantidas em condições ideais, podem multiplicar-se e expressar diferentes propriedades quando mantidas in vitro. Nestas condições, as culturas podem ser observadas continuamente sob um microscópio e analisadas morfológica e bioquimicamente. Pode-se estudar a morte celular,

quanto a adição de moléculas ou substâncias específicas, para a realização de estudos diversos (Bruce *et al.*, 2002).

O experimento original de cultura celular foi feito com fragmentos de fibras nervosas, chamado cultura de explantes. Hoje, as culturas são usualmente feitas a partir de suspensões de células dissociadas dos tecidos (Bruce *et al.*, 2002).

A cultura de células origina-se de tecidos embriológicos. As células cultivadas podem crescer e sobreviver mais facilmente do que os tecidos adultos. Elas são obtidas pela desagregação enzimática ou mecânica de um pedaço de tecido ou pela migração espontânea de um explante (Pizzoferrato *et al.*, 1994).

As células cultivadas *in vitro* mantêm as suas características e funções originais. Por exemplo, as células de fibroblastos continuam secretando colágeno; as células derivadas do músculo esquelético se fundem e formam fibras musculares, que se contraem espontaneamente no meio de cultura; as células nervosas estendem o axioma que são eletricamente excitáveis e fazem sinapse com as demais células nervosas; e as células epiteliais formam grandes extensões com as mesmas propriedades do epitélio intacto. Devido a estes fenômenos ocorrerem na cultura de células, são possíveis diferentes estudos que normalmente não seriam possíveis no tecido intacto.

Condições específicas são necessárias para que cada tipo de célula se multiplique. Muitos aspectos do sistema de cultivo podem afetar o crescimento celular, como a composição do meio de cultura, o número de células, a adesão ao substrato, a natureza do substrato, a maneira pela qual as células são manipuladas durante o repique, entre outros (Rizzo *et al.*, 1983).

A manipulação de culturas de células deve ser feita em ambiente estritamente asséptico (preferencialmente em fluxo laminar). É de extrema importância evitar de todas as formas possíveis a contaminação da cultura celular por microrganismos. (Peres & Curi, 2005).

Para esterilização dos objetos o aquecimento por autoclavação é o método mais utilizado. Nele, o calor úmido causa desnaturação e coagulação de proteínas vitais para os microrganismos, tais como enzimas. É um método eficiente que exige pouco tempo de exposição dos materiais (Pelczar *et al.*, 1997).

As células devem ser mantidas sob temperaturas adequadas e numa atmosfera controlada. Para a maioria das células a temperatura utilizada é de 37°C

e a umidade relativa > 95%. O pH é mantido estável devido a injeção de CO₂ numa concentração de 5% em incubadoras apropriadas (Freshney, 1994).

Para que se desenvolvam em cultura, as células necessitam de nutrientes específicos que são fornecidos pelo meio de cultura celular (Eagle, 1995). O meio de cultura deve fornecer às células, além de todos os nutrientes essenciais, um ambiente que se assemelhe ao máximo àquele que elas dispunham "in vivo". Dentre os nutrientes essenciais, estão as matérias primas necessárias a síntese de novas células, substratos para o metabolismo energético, vitaminas, traços de minerais com função primordialmente catalítica e íons inorgânicos brutos, que possuem tanto função catalítica como fisiológica. Existem limites aceitáveis para cada um destes componentes, a fim de manter a osmolaridade e o pH adequados (Freshney, 1994).

As soluções preparadas para manter as células em cultura são baseadas em solução salina fisiológica de Ringer. Esta solução é composta por três cátions (cálcio, potássio e sódio), em proporções similares à do sangue de animais superiores (Katsuta *et al.*, 1959).

Além dos sais, o meio de cultura, principalmente aquele que mantém culturas de células de mamíferos, deve conter soro ou algum tipo de fluido corporal complexo, para o crescimento e sobrevivência das células. Somente alguns tipos de células podem crescer na ausência do soro, e mesmo estas crescem melhor quando o meio é adicionado deste. Sendo assim, a maioria das vezes eles são suplementados com soro fetal bovino (*fetal bovine serum* - FBS), soro de cavalo (*horse serum* - HS) ou soro fetal de bezerro (*fetal calf serum* - FCS). Muitos estudos indicam que são as macromoléculas presentes no soro, ou seja, as proteínas, as responsáveis pela promoção do conteúdo celular (Bates & Levene, 1970).

As frações séricas de elevado peso molecular presentes no soro, além de ter papel nutritivo, parecem promover a adesão e o achatamento das células ao substrato. Também são uma fonte rica em hormônios, fatores de crescimento e elementos capazes de acelerar o crescimento celular. A elevada quantidade de albumina presente no soro protege as células de condições adversas, como a flutuação do pH e outros fatores que poderiam danificar as células. Porém, a composição do soro é variável e ainda indefinida, podendo acarretar em uma ineficiente produtividade em decorrência do variável crescimento celular (Butler, M., 2005).

A observação da morfologia celular deve ser feita durante o cultivo celular pois alterações no substrato e na constituição do meio de cultura podem alterar a morfologia celular. Portanto, observações comparativas devem ser feitas em diferentes estágios de crescimento, concentrações celulares ou mesmo em diferentes meios de cultura (Goulet *et al.*, 1996; Freshney *et al.*, 1980).

Em 1947, Earle e colaboradores descobriram e desenvolveram a técnica de cultivo de células animais em monocamadas sobre superfície sólida, usando meio de cultura líquido. Nessa técnica as células aderem à superfície sólida, achatam-se e multiplicam-se até formarem o que se costuma chamar de tapete celular ou camada contínua, uniestratificada.

As enzimas mais empregadas são: tripsina, pancreatina, elastase e colagenase. A tripsina é usada desde 1916 em soluções salinas completas ou isentas de íons. Só em 1952 foi introduzida por Dulbecco nos métodos de virologia. Ela catalisa a hidrólise de ligações peptídicas entre o grupo carboxila da arginina ou lisina e o grupo amínico de outro aminoácido. Sendo assim ela degrada a matriz protéica (cimento celular) que une as células do tecido, liberando-as na suspensão antes que sejam seriamente danificadas. Este processo de obtenção de suspensões celulares finamente dispersas, a partir de fragmentos de órgãos ou de tecidos, pelo uso da tripsina, chama-se tripsinização. Todo tecido a ser tripsinizado deve ser lavado previamente com solução tampão ou meio de cultura sem soro, para a eliminação do sangue ou soro presente nos tecidos. De acordo com o tipo de célula e da substância intercelular, que determina uma adesão maior ou menor ao substrato, varia-se o tempo de ação da tripsina sobre as células (Freshney, 1994).

2.8.2. Testes In Vitro

Na tentativa de avaliar o risco do uso de produtos por seres humanos sem necessitar da utilização de animais de laboratório, desde a década de 60 diversos estudos têm sido realizados utilizando tecidos e células vivas de mamíferos, além de organismos inferiores e substratos inertes (Chamberlain e Parish, 1990).

Desenvolveram-se também bancos de dados informatizados e programas que avaliam a toxicidade pela determinação de relação estrutura-atividade, como por exemplo o Quantitation Structure Activity Relationship (QSAR), cujo protocolo

relaciona a estrutura físico-química de um componente com sua toxicidade (Barrat, 1991; Bagley *et al.*, 1996). Estes estudos buscam obter metodologias rápidas, baratas, de fácil execução e reprodutibilidade que possam ser padronizadas e validadas, situação imprescindível para que os métodos *in vitro* alcancem a aceitação científica internacional.

As metodologias que utilizam tecidos e células vivas são as mais empregadas, pois a intrínseca complexidade celular é mantida. As células utilizadas podem ser de vários tecidos, sendo que a sobrevivência e/ou proliferação celular podem ser avaliadas por contagem do número de células ou pelo uso de corantes vitais. A incorporação de radioisótopos, formação de colônias, aderência celular, produtos de metabolismo entre outros são parâmetros que também podem ser utilizados (Riddell *et al.*, 1986; De Angelis *et al.*, 1986; Husoy *et al.*, 1993).

A verificação da viabilidade celular pelo uso de corantes vitais é um dos parâmetros empregados e dentre os mais citados na literatura encontramos o brometo de 3 (4,5-dimetil-1-tiazol-2-il) 2,5 difeniltetrazólio (MTT) e o vermelho neutro (3-amino-7-dimethylamino-2-methylphenazine hydrochloride). O MTT é um sal amarelo solúvel, metabolizado pela succinato desidrogenase presente na mitocôndria, transformando-se em um produto azul insolúvel. O vermelho neutro em pH fisiológico passa facilmente através da membrana plasmática e se concentra no interior dos lisossomos. A perda deste gradiente de pH por mortalidade/morbidade da célula ou a perda da permeação da membrana inibe a incorporação destes corantes (Harbell *et al.*, 1997).

Uma das primeiras metodologias descritas para avaliação *in vitro* foi sugerida por Rosenbluth *et al.* (1965), que propuseram o teste da biocompatibilidade para avaliar plásticos empregados em artigos médico-hospitalares. Neste ensaio os materiais eram colocados diretamente sobre uma monocamada de células de mamífero e após 24 horas estas células eram observadas para verificar se havia ou não a presença de algum efeito tóxico. No mesmo ano, Guess *et al.* (1965) descreveram o método de difusão em ágar, onde a monocamada celular era sobreposta por uma camada de ágar e os materiais a serem testados eram colocados sobre esta camada evitando assim, os problemas apresentados quando colocados diretamente em contato com a monocamada celular.

No início da década de 80, Mosmann (1983), Borenfreud e Puerner (1984) descreveram outra técnica para quantidades elevadas de amostras. Nesta técnica, as células são semeadas em microplacas e a viabilidade celular é avaliada por métodos colorimétricos, utilizando a redução do MTT ou a incorporação do vermelho neutro, os quais são quantificados por espectrofotometria. Esta técnica é rápida e quantitativa, pois permite avaliar várias concentrações do produto e calcular a concentração que causa 50% de morte celular. Desde então, vários estudos comparando o uso do vermelho neutro com o MTT ou estudos utilizando um destes corantes têm sido realizados para a determinação do índice médio de citotoxicidade de muitas substâncias (Borenfreud e Puerner 1985; Babich e Babich, 1997).

Chiba *et al.*, (1998) desenvolveram um estudo que avalia na mesma célula a viabilidade e o crescimento celular usando simultaneamente vermelho neutro, MTT e cristal violeta. O método pode ser útil na avaliação da citotoxicidade de substâncias mediadas por diferentes mecanismos, levando a diferentes respostas e ainda, o uso de vários tipos de avaliação evitaria resultados duvidosos (Chamberlain *et al.*, 1997).

Métodos baseados nas funções celulares são também utilizados, tais como o teste da passagem de fluoresceína e o teste da medida do metabolismo celular. O teste da passagem de fluoresceína reflete os aspectos funcionais das células epiteliais como barreira, nas regiões das ligações intercelulares e na integridade da membrana plasmática. Neste teste, as linhagens celulares mais utilizadas são a MDCK (cultura de células de rim de cachorro) e a NHEK (cultura de células de queratinócitos humanos) porque mantêm estas funções *in vitro*. O teste do metabolismo celular é realizado por meio de um aparelho que detecta alterações metabólicas celulares semelhantes à resposta local, das células oculares, frente aos produtos irritantes.

3. Objetivo

O objetivo deste trabalho foi avaliar a eficácia de diferentes métodos de inativação química para as moléculas de cisplatina, doxorubicina e paclitaxel em solução injetável, utilizando cromatografia líquida de alta eficiência (avaliação química) e teste de citotoxicidade in vitro (avaliação biológica).

Foram avaliados os inativantes Aseptó 75 (solução aquosa a 0,5%), hipoclorito de sódio (solução aquosa a 10%) e tiosulfato de sódio (solução aquosa a 10%). Os ensaios foram realizados expondo amostras dos três princípios ativos aos inativantes por períodos que variaram de 0 a 6 horas antes de serem submetidas aos ensaios de cromatografia.

Buscou-se, assim, determinar o melhor tipo de inativante a ser utilizado para cada princípio ativo e o tempo mínimo de exposição ao mesmo para se obter a diminuição da citotoxicidade.

4. Material e método

4.1. Análise cromatográfica

4.1.1. Material

Amostras de cisplatina solução injetável (50 mg por frasco-ampola), formulação comercial. Cada frasco-ampola contém 100 mL.

Amostras de cloridrato de doxorubicina pó líofilo para solução injetável (50 mg por frasco-ampola), formulação comercial.

Amostras de paclitaxel solução injetável (30 mg por frasco-ampola), formulação comercial. Cada frasco ampola contém 5 mL.

Padrões primários USP de cisplatina, doxorubicina e paclitaxel.

Asepto 75 grau técnico.

Hipoclorito de sódio 10% grau técnico.

Tiosulfato de sódio P.A.

Balança analítica de quatro casas.

Cromatógrafo líquido de alta eficiência Merck composto por bomba quaternária com gradiente, injetor automático com sistema de resfriamento para as amostras, forno para coluna e detector de arranjo de diodos (UV-Variável).

pHmetro com eletrodo de vidro combinado, calibrado nos pHs 4,00, 7,00 e 10,00.

Ultrapurificador de água modelo Option-Q DV 7500 Elga, com pré-filtros, cartucho de osmose reversa, lâmpada UV e cartucho de deionização.

Acetato de Etila P.A.

Dimetilformamida P.A.

Metanol Grau CLAE.

Acetonitrila Grau CLAE.

Ácido fosfórico P.A.

Lauril sulfato de sódio P.A.

Hidróxido de sódio P.A.

Ácido acético glacial P.A.

4.1.2. Método

4.1.2.1. Determinação de cisplatina por HPLC

Foi adotada a metodologia para determinação de teor de acordo com a farmacopéia americana (USP 30, 2007). Para a realização dos cálculos foi considerada a área dos picos medida nos comprimentos de onda determinados nos métodos para cada um dos princípios ativos. Entretanto, para avaliação da formação de produtos de degradação, foi feita uma varredura com o detector de arranjo de diodos em comprimentos de onda variáveis.

4.1.2.1.1. Fase móvel

Foram misturados quantitativamente acetato de etila P.A., metanol, dimetilformamida P.A. e água purificada (25 : 16 : 5 : 5). A mistura foi filtrada e degaseificada em aparato apropriado utilizando membrana de celulose regenerada de 0,45 µm antes do uso.

4.1.2.1.2. Preparação do padrão

Foram transferidos quantitativamente cerca de 25 mg de cisplatina Padrão de Referência, pesados com exatidão, para um balão volumétrico de 50 mL. Dissolveu-se e diluiu-se ao volume com dimetilformamida P.A. Esta é a solução padrão estoque. Foram transferidos 5,0 mL da solução estoque para balão de 10 mL e completou-se ao volume com dimetilformamida. Esta é a solução padrão 100% e contém cerca de 0,25 mg/mL de cisplatina. Da mesma maneira foram transferidos 3,5 mL para balão de 10 mL e 6,5 mL para balão de 10 mL. Completou-se os balões ao volume com dimetilformamida. Estas são as soluções padrão 70% e 130%, e contêm cerca de 0,175 e 0,325 mg/mL de cisplatina, respectivamente.

4.1.2.1.3. Preparação da amostra

As amostras foram preparadas em duplicata para o teste de doseamento. Diluiu-se 5,0 mL da amostra de cisplatina para 10,0 mL com dimetilformamida. Estas são as soluções A e B, com concentração teórica de 0,25 mg/mL de cisplatina.

Inativante Asepto 75 – 0,5%

Diluiu-se 5,0 mL da amostra de cisplatina para 10 mL com o inativante assepto 75 0,5%.

Para o branco diluiu-se 5,0 mL de dimetilformamida para 10 mL com o inativante assepto 75 0,5%.

Inativante Hipoclorito de sódio – 10%

Diluiu-se 5,0 mL da amostra de cisplatina para 10 mL com o inativante hipoclorito de sódio 10%.

Para o branco diluiu-se 5,0 mL de dimetilformamida para 10 mL com o inativante hipoclorito de sódio 10%.

Inativante Tiosulfato de sódio – 10%

Diluiu-se 5,0 mL da amostra de cisplatina para 10 mL com o inativante tiosulfato de sódio 10%.

Para o branco diluiu-se 5,0 mL de dimetilformamida para 10 mL com o inativante tiosulfato de sódio 10%.

Todas as soluções (padrões, brancos, amostras e diluente) foram filtradas em membrana de celulose regenerada 0,45 μm (Minisart RC 25).

4.1.2.1.4. Sistema cromatográfico

Utilizou-se o sistema Merck EZChrom com detector PDA com varredura entre 240 e 400 nm e comprimento fixo a 310 nm, coluna L8 (fase essencialmente monomolecular de aminopropilsilano quimicamente ligado a um suporte de sílica gel com 10 μm de diâmetro) de 4,0 mm x 30 cm de comprimento. Ajustou-se o fluxo em 2,0 mL/minuto. Injetou-se o volume de 60 μL . A bandeja de amostras do injetor manteve-se em 15°C e o forno da coluna foi mantido em 25°C durante a análise.

Foi injetado o diluente das amostras como branco. Em seguida, injetou-se a curva de calibração (padrão em três concentrações) em triplicata para cada concentração. Após a verificação da adequabilidade do sistema (através do cálculo do DPR para área e tempo de retenção entre as replicatas das injeções de mesma concentração, cujo valor não foi maior que 2,0% em ambos os casos) injetou-se as amostras A e B, uma vez cada.

Em seguida foram injetados os brancos dos três inativantes.

As soluções da amostra com os inativantes foram preparadas imediatamente antes da injeção e o tempo de injeção foi controlado de modo a permitir que cada

inativante fosse reinjetado 1 hora e 6 horas após o contato inicial com a amostra. Durante o período de análise (do tempo 0 até 6 horas) as amostras foram mantidas na bandeja do injetor do sistema cromatográfico a 15°C.

As comparações foram feitas utilizando as respostas das áreas dos picos nas amostras preparadas conforme a metodologia e as mesmas soluções expostas aos inativantes.

4.1.2.2. Determinação de doxorubicina por HPLC

Foi adotada a metodologia para determinação de teor de acordo com a farmacopéia americana (USP 30, 2007).

4.1.2.2.1. Preparo hidróxido de sódio 2 N

Foram transferidos quantitativamente 8 g de hidróxido de sódio P.A. para um balão volumétrico de 100 mL. Adicionou-se aproximadamente 50 mL de água purificada, dissolveu-se, esfriou-se e diluiu-se ao volume com água purificada.

4.1.2.2.2. Fase móvel

Foram misturados quantitativamente água purificada, acetonitrila, metanol e ácido fosfórico (540 : 290 : 170 : 2). Dissolveu-se quantitativamente 1 g de lauril sulfato de sódio P.A em 1000 mL desta mistura. Ajustou-se o pH em $3,6 \pm 0,1$ com hidróxido de sódio 2 N. A mistura foi filtrada e degaseificada em aparato apropriado utilizando membrana de celulose regenerada de 0,45 μm antes do uso.

4.1.2.2.3. Preparação do padrão

Foram transferidos quantitativamente cerca de 25 mg de cloridrato de doxorubicina Padrão de Referência, pesados com exatidão, para um balão volumétrico de 100 mL, dissolveu-se e diluiu-se ao volume com fase móvel. Esta é a solução padrão estoque. Foram transferidos 10,0 mL da solução estoque para balão de 25 mL e completou-se ao volume com fase móvel. Esta é a solução padrão 100% e contém cerca de 0,1 mg/mL de doxorubicina. Da mesma maneira foram transferidos 7 mL para balão de 25 mL e 13 mL para balão de 25 mL. Completou-se os balões ao volume com fase móvel. Estas são as soluções padrão 70% e 130%, e contém 0,07 e 0,13 mg/mL, respectivamente.

4.1.2.2.4. Preparação da amostra

As amostras foram preparadas em duplicata para o teste de doseamento. Diluiu-se quantitativa e volumetricamente um frasco de cloridrato de doxorubicina pó para injetável em fase móvel de modo a obter uma solução de concentração conhecida de cerca de 0,2 mg/mL de cloridrato de doxorubicina (solução estoque). Diluiu-se

5,0 mL da solução estoque de doxorubicina para 10,0 mL com fase móvel. Estas são as soluções A e B, com concentração teórica de 0,1 mg/mL de doxorubicina.

Inativante Asepto 75 – 0,5 %

Diluiu-se 5,0 mL da solução estoque de doxorubicina para 10 mL com o inativante assepto 75 0,5%.

Para o branco diluiu-se 5,0 mL de fase móvel para 10 mL com o inativante assepto 75 0,5%.

Inativante hipoclorito de sódio 10%

Diluiu-se 5,0 mL da solução estoque de doxorubicina para 10 mL com o inativante hipoclorito de sódio 10%.

Para o branco diluiu-se 5,0 mL de fase móvel para 10 mL com o inativante hipoclorito de sódio 10%.

Inativante Tiosulfato de sódio

Diluiu-se 5,0 mL da solução estoque de doxorubicina para 10 mL com o inativante tiosulfato de sódio 10%.

Para o branco diluiu-se 5,0 mL de fase móvel para 10 mL com o inativante tiosulfato de sódio 10%.

Todas as soluções (padrões, brancos, amostras e diluente) foram filtradas em membrana de celulose regenerada 0,45 μm (Minisart RC 25).

4.1.2.2.5. Sistema cromatográfico

Utilizou-se o sistema Merck EZChrom com detector PDA com varredura entre 220 e 380 nm e comprimento fixo a 254 nm, coluna L13 (Trimetilsilano quimicamente ligado a partículas de sílica com diâmetro de 3 a 10 μm) de 4,6 mm x 25 cm de comprimento. O fluxo foi ajustado em 1,5 mL/minuto. O volume de injeção foi 10 μL . A bandeja de amostras do injetor foi mantida em 15°C e o forno da coluna foi mantido em 25°C durante a análise. Foi injetado o diluente das amostras (fase móvel) como branco. Em seguida, injetou-se a curva de calibração (padrão em três concentrações) em triplicata para cada concentração.

A verificação da adequabilidade do sistema foi feita pela avaliação dos seguintes parâmetros: cálculo do DPR para área e tempo de retenção entre as replicatas das injeções de mesma concentração, cujo valor não foi maior que 2,0% em ambos os casos. O fator de cauda para o pico de doxorubicina deve estar entre 0,7 e 1,2. A

eficiência da coluna não deve ser menor que 2250 pratos teóricos. Em seguida injetou-se as amostras A e B, uma vez cada.

O DPR entre as replicatas das injeções de mesma concentração não é ser maior que 1,0 %.

Em seguida foram injetados os brancos dos três inativantes.

As soluções da amostra com os inativantes foram preparadas imediatamente antes da injeção e o tempo de injeção foi controlado de modo a permitir que cada inativante fosse reinjetado 1 hora e 6 horas após o contato inicial com a amostra. Durante o período de análise (do tempo 0 até 6 horas) as amostras foram mantidas na bandeja do injetor do sistema cromatográfico a 15°C.

As comparações foram feitas utilizando as respostas das áreas dos picos nas amostras preparadas conforme a metodologia e as mesmas soluções expostas aos inativantes.

4.1.2.3. Determinação de paclitaxel por HPLC

Foi adotada a metodologia para determinação de teor de acordo com a farmacopéia americana (USP 30, 2007).

4.1.2.3.1. Fase móvel

Preparou-se uma mistura filtrada e degaseificada de água e acetonitrila grau CLAE (11:9). A mistura foi filtrada e degaseificada em aparato apropriado utilizando membrana de celulose regenerada de 0,45 µm antes do uso.

4.1.2.3.2. Preparação do diluente

Transferiu-se 200 µL de ácido acético glacial P.A. para um balão volumétrico de 1 litro contendo cerca de 500 mL de metanol P.A., misturou-se e diluiu-se ao volume com metanol Grau CLAE.

4.1.2.3.3. Preparação do padrão

Transferiu-se quantitativamente cerca de 30 mg de paclitaxel Padrão de Referência, pesados com exatidão, para um balão volumétrico de 50 mL, dissolveu-se e diluiu-se ao volume com a solução diluente. Esta é a solução padrão 100% e contém cerca de 0,6 mg/mL de paclitaxel. Da mesma maneira pesou-se cerca de 21 mg e 39 mg de paclitaxel Padrão de Referência e transferiu-se para dois balões de 50 mL. Dissolveu-se e diluiu-se ao volume com diluente. Estas são as soluções padrão 70% e 130%, e contém cerca de 0,42 e 0,78 mg/mL de paclitaxel, respectivamente.

4.1.2.3.4. Preparação da amostra

As amostras foram preparadas em duplicata para o teste de doseamento. Diluiu-se quantitativamente 10,0 mL da amostra de paclitaxel para 50,0 mL com diluente de modo a obter uma concentração conhecida de cerca de 1,2 mg/mL de paclitaxel (solução estoque). Em seguida, diluiu-se 5,0 mL da solução estoque para 10,0 mL com diluente. Estas são as soluções A e B, com concentração teórica de 0,6 mg/mL de paclitaxel.

Inativante Asepto 75 0,5%:

Diluiu-se 5,0 mL da solução estoque de paclitaxel para 10 mL com o inativante assepto 75 0,5%.

Para o branco diluiu-se 5,0 mL de diluente para 10 mL com o inativante assepto 75 0,5%.

Inativante Hipoclorito de sódio 10%:

Diluiu-se 5,0 mL da solução estoque de paclitaxel para 10 mL com o inativante hipoclorito de sódio 10%.

Para o branco diluiu-se 5,0 mL de diluente para 10 mL com o inativante hipoclorito de sódio 10%.

Inativante Tiosulfato de sódio 10%:

Diluiu-se 5,0 mL da solução estoque de paclitaxel para 10 mL com o inativante tiosulfato de sódio 10%.

Para o branco diluiu-se 5,0 mL de diluente para 10 mL com o inativante tiosulfato de sódio 10%.

Todas as soluções (padrões, brancos, amostras e diluente) foram filtradas em membrana de celulose regenerada 0,45 μm (Minisart RC 25).

4.1.2.3.5. Sistema cromatográfico

Utilizou-se o sistema Merck EZChrom com detector PDA com varredura entre 200 e 400 nm e comprimento fixo a 227 nm, coluna L43 (grupos pentafluorofenil quimicamente ligados a partículas de sílica por um espaçador de propila, de 5 μm de diâmetro) de 4,0 mm x 25 cm de comprimento. O fluxo foi ajustado em 1,5 mL/minuto. O volume de injeção foi 10 μL . A bandeja de amostras do injetor foi mantida em 15°C e o forno da coluna foi mantido em 25°C durante a análise. Foi injetado o diluente das amostras (fase móvel) como branco. Em seguida, injetou-se a curva de calibração (padrão em três concentrações) em triplicata para cada concentração.

A verificação da adequabilidade do sistema foi feita pela avaliação dos seguintes parâmetros: cálculo do DPR para área e tempo de retenção entre as replicatas das injeções de mesma concentração, cujo valor não foi maior que 1,5%.

Em seguida foram injetados os brancos dos três inativantes.

As soluções da amostra com os inativantes foram preparadas imediatamente antes da injeção e o tempo de injeção foi controlado de modo a permitir que cada

inativante fosse reinjetado 1 hora e 6 horas após o contato inicial com a amostra. Durante o período de análise (do tempo 0 até 6 horas) as amostras foram mantidas na bandeja do injetor do sistema cromatográfico a 15°C.

As comparações foram feitas utilizando as respostas das áreas dos picos nas amostras preparadas conforme a metodologia e as mesmas soluções expostas aos inativantes.

4.1.3. Teste de citotoxicidade *in vitro*

4.1.3.1. Material

Amostras de cisplatina solução injetável (50 mg por frasco-ampola), formulação comercial. Cada frasco-ampola contém 100 mL.

Amostras de cloridrato de doxorrubicina pó líófilo para solução injetável (50 mg por frasco-ampola), formulação comercial.

Amostras de paclitaxel solução injetável (30 mg por frasco-ampola), formulação comercial. Cada frasco ampola contém 5 mL.

Asepto 75 grau técnico.

Hipoclorito de sódio 10% grau técnico.

Tiosulfato de sódio P.A.

Solução salina 0,9% estéril.

Meio mínimo de Eagle, suplementado com 0,1 mM de aminoácidos não essenciais, 1,0 mM de piruvato de sódio e 10% de soro fetal bovino, sem antibiótico (MEM c/ 10% SFB).

4.1.3.2. Método

As avaliações *in vitro* foram feitas pela análise da citotoxicidade ou reatividade biológica em culturas celulares, tomando como parâmetro a viabilidade celular. O método utilizado foi o de difusão em ágar (USP 30, 2007).

Os ensaios foram realizados na Seção de Culturas Celulares do Instituto Adolfo Lutz (IAL), em capela de fluxo laminar vertical, por sua vez alojado em sala limpa, com sistema de filtro absoluto e pressão positiva. Todo o trabalho foi desenvolvido empregando material esterilizado e técnicas assépticas.

Foi utilizada a seguinte linhagem celular: NCTC clone 929 (ATCC-CCL 1), células de tecido conjuntivo de camundongo.

A linhagem celular NCTC clone 929 foi cultivada em meio mínimo de Eagle, suplementado com 0,1 mM de aminoácidos não essenciais, 1,0 mM de piruvato de sódio e 10% de soro fetal bovino, sem antibiótico (MEM c/ 10% SFB).

A manutenção foi feita a 36°C, em garrafas de 75 cm² ou 250 mL e repiques com intervalos médios de 72 horas. A dispersão da monocamada celular foi efetuada utilizando uma associação de tripsina 0,20% e versene 0,02% (ATV). Após a dispersão, as células foram novamente suspensas no meio de cultura e distribuídas, tanto nas garrafas destinadas a manutenção como em placas de Petri, que foram utilizadas durante a realização dos ensaios (PAUL, 1975; FRESHNEY, 1987).

Todas as amostras foram analisadas empregando a linhagem celular NCTC clone 929.

As células foram semeadas em volumes de 5 mL em placas de Petri (60x15 mm), na concentração de $3,0 \times 10^5$ céls/ mL. A incubação foi realizada por 48 horas a 37°C em atmosfera úmida contendo 5% de CO₂. Após este período, com a monocamada de células já formadas, o meio de cultura foi desprezado e adicionado o volume de 5 mL de meio *overlay*, em cada placa de Petri. Este meio é composto de partes iguais de MEM duas vezes concentrado e ágar (BBL-Becton Dickinson) a 1,8% contendo 0,01% de vermelho neutro (Merck), como corante vital. No momento do uso o ágar foi fundido e misturado com o MEM, ambos à temperatura de $44 \pm 1^\circ\text{C}$. Discos de 0,5 cm de diâmetro, de papel de filtro de natureza comprovadamente atóxica, foram embebidos nas amostras ou e posicionados sobre a camada de ágar, antes de sua solidificação completa. As placas de Petri foram incubadas novamente em estufa com 5% de CO₂ a 37°C por 24 horas (Guess *et al.*, 1965; USP 22, 1990; ISO, 1992).

Como controles positivos foram utilizados fragmentos de látex e como controles negativos discos de papel de filtro, respeitando a dimensão de 0,5 cm de diâmetro para ambos. As amostras foram avaliadas em triplicata para cada linhagem celular.

As placas foram analisadas macroscópica e microscopicamente e a citotoxicidade foi constatada pela presença de um halo claro sob ou ao redor da amostra testada. Os diâmetros destes halos, quando presentes foram cuidadosamente medidos empregando paquímetro calibrado.

Com o objetivo de obter as graduações de reatividade biológica *in vitro* de acordo com o índice de zona (IZ), segundo a USP 30 (2007), utilizou-se a média dos diâmetros e desse valor subtraiu-se 0,5 cm, referente ao tamanho do disco de papel

utilizado para embeber as amostras. O resultado foi dividido por dois para obter a medida da toxicidade ao redor da amostra. Este cálculo não foi realizado para as amostras que apresentaram halo de toxicidade somente sob o disco de papel.

A partir da medida da toxicidade, os índices de zona foram graduados de 0 a 4, onde o IZ=0 corresponde a ausência de efeito sob a amostra, IZ=1 alteração ou degeneração celular sob a amostra, IZ=2 halo claro somente sob a amostra, IZ=3 halo entre 0,5 e 1,0 cm ao redor da amostra, IZ=4 para halo claro maior que 1,0 cm (USP 23, 1995; USP 24, 1999; USP 25, 2002; USP 30, 2007).

Tabela 1: Graus de reatividade para teste de difusão em ágar e teste de contato direto

Grau	Reatividade	Descrição da zona de reatividade
0	Nenhum	Ausência de efeito sob a amostra
1	Desprezível	Alteração ou degeneração celular sob a amostra
2	Suave	Halo claro somente sob a amostra
3	Moderado	Halo entre 0,5 e 1,0 cm ao redor da amostra
4	Severo	Halo claro maior que 1,0 cm

5. Resultados

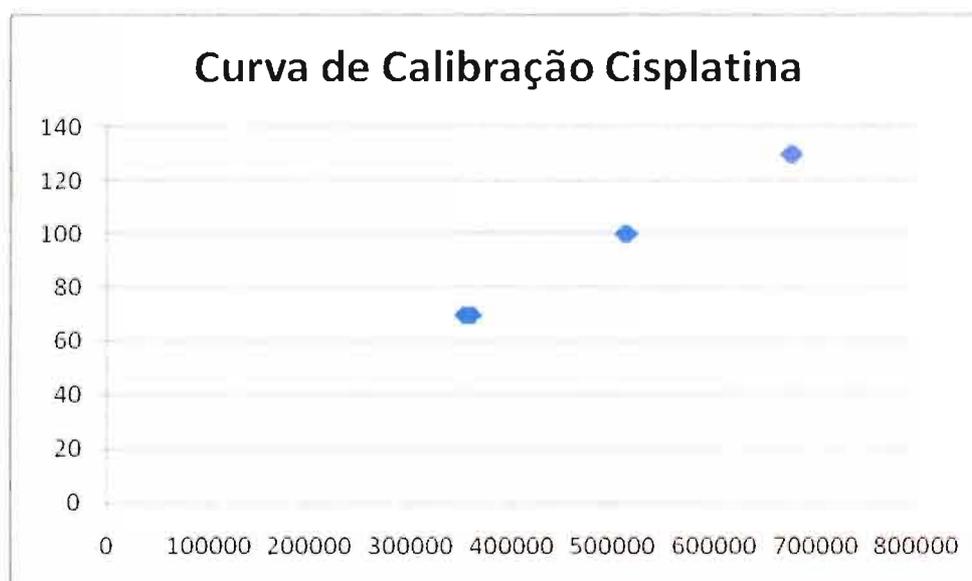
5.1. Cisplatina

5.1.1. Curva de calibração

Tabela 2: Curva de calibração em três pontos e porcentagem de área da amostra para cisplatina

Amostra	Área	% Área
Padrão 70-1	351965	70
Padrão 70-2	357054	70
Padrão 70-3	360787	70
Padrão 100-1	510006	100
Padrão 100-2	514711	100
Padrão 100-3	511757	100
Padrão 130-1	673550	130
Padrão 130-2	678342	130
Padrão 130-3	676324	130
Amostra A	514013	99,83
Amostra B	491915	95,68

Gráfico 1: Curva de calibração Cisplatina



5.1.2. Cromatografia asepto 75

Tabela 3: Resultados da cromatografia após exposição ao asepto 75

Amostra	Área	% Área
Asepto - T0	409304	80,17
Asepto - T1	383254	75,28
Asepto - T6	309950	61,52

5.1.3. Citotoxicidade asepto 75

Considerando a amostra de cisplatina em solução salina como branco, obteve-se um grau de reatividade moderado (IZ=3), com halos 0,8; 0,8 e 1,0 para a cisplatina.

Teste do inativante asepto 75 em solução salina mostrou que o mesmo não possui efeito citotóxico sobre as células testadas (IZ=0).

Após exposição ao asepto 75 de amostra de cisplatina similarmente preparada, obteve-se grau de reatividade nenhum (IZ=0). Houve completa degradação da cisplatina em componentes não tóxicos na concentração testada.

5.1.4. Cromatografia hipoclorito de sódio

Tabela 4: Resultados da cromatografia após exposição ao hipoclorito de sódio

Amostra	Área	% Área
Hipoclorito-T0	0	0
Hipoclorito-T1	0	0
Hipoclorito-T6	0	0

Não houve detecção de pico de cisplatina nas amostras expostas ao inativante hipoclorito de sódio.

5.1.5. Citotoxicidade hipoclorito de sódio

Considerando a amostra de cisplatina em solução salina como branco, obteve-se um grau de reatividade moderado (IZ=3), com halos 0,8; 0,8 e 1,0 para a cisplatina.

Teste do inativante hipoclorito de sódio em solução salina mostrou que o mesmo apresenta grau de reatividade moderado sobre as células testadas (IZ=3), com halos 0,8; 0,8 e 0,9 na concentração testada.

Repetindo-se o teste utilizando a metade da concentração obteve-se grau de reatividade suave (IZ=2) com halos 0,3; 0,3 e 0,4.

Após exposição ao hipoclorito de sódio de amostra de cisplatina preparada similarmente aos demais inativantes, obteve-se grau de reatividade moderado (IZ=3), com halos 0,8; 0,8 e 1,0.

5.1.6. Cromatografia tiosulfato de sódio

Tabela 5: Resultados da cromatografia após exposição ao tiosulfato de sódio

Amostra	Área	% Área
Tiosulfato-T0	0	0
Tiosulfato-T1	0	0
Tiosulfato-T6	0	0

Não houve detecção de pico de cisplatina nas amostras expostas ao inativante tiosulfato de sódio.

5.1.7. Citotoxicidade tiosulfato de sódio

Considerando a amostra de cisplatina em solução salina como branco, obteve-se um grau de reatividade moderado (IZ=3), com halos 0,8; 0,8 e 1,0 para a cisplatina.

Teste do inativante tiosulfato de sódio em solução salina mostrou que o mesmo não apresenta reatividade sobre as células testadas (IZ=0).

Após exposição ao tiosulfato de sódio de amostra de cisplatina preparada similarmente aos demais inativantes, obteve-se grau de reatividade nenhum (IZ=0).

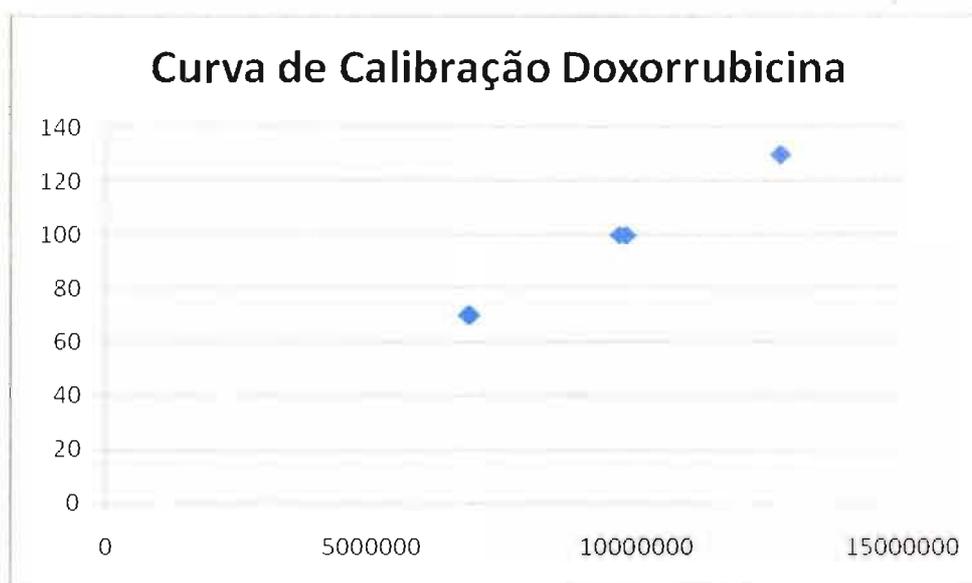
5.2. Doxorrubicina

5.2.1. Curva de calibração

Tabela 6: Curva de calibração em três pontos e porcentagem de área da amostra para doxorrubicina

Amostra	Área	% Área
Padrão 70-1	6812217	70
Padrão 70-2	6787925	70
Padrão 70-3	6386214	70
Padrão 100-1	9652047	100
Padrão 100-2	9792850	100
Padrão 100-3	9773005	100
Padrão 130-1	12663509	130
Padrão 130-2	12695911	130
Padrão 130-3	12692046	130
Amostra A	10136036	104,38
Amostra B	10397005	106,98

Gráfico 2: Curva de calibração Doxorrubicina



5.2.2. Cromatografia asepto 75

Tabela 7: Resultados da cromatografia após exposição ao asepto 75

Amostra	Área	% Área
Asepto-T0	422784	7,84
Asepto-T1	300502	6,63
Asepto-T6	1112427	14,70

5.2.3. Citotoxicidade asepto 75

Considerando a amostra de doxorrubicina em solução salina como branco, obteve-se um grau de reatividade moderado ($IZ=3$), com halos 0,8; 0,6 e 0,7 para a doxorrubicina.

Teste do inativante asepto 75 em solução salina mostrou que o mesmo não possui efeito citotóxico sobre as células testadas ($IZ=0$).

Após exposição ao asepto 75 de amostra de doxorrubicina similarmente preparada, obteve-se grau de reatividade nenhum ($IZ=0$). Houve completa degradação da doxorrubicina em componentes não tóxicos na concentração testada.

5.2.4. Cromatografia hipoclorito de sódio

Tabela 8: Resultados da cromatografia após exposição ao hipoclorito de sódio

Amostra	Área	% Área
Hipoclorito-T0	0	0
Hipoclorito-T1	0	0
Hipoclorito-T6	0	0

5.2.5. Citotoxicidade hipoclorito de sódio

Considerando a amostra de doxorrubicina em solução salina como branco, obteve-se um grau de reatividade moderado ($IZ=3$), com halos 0,8; 0,6 e 0,7 para a doxorrubicina.

Teste do inativante hipoclorito de sódio em solução salina mostrou que o mesmo apresenta grau de reatividade moderado sobre as células testadas (IZ=3), com halos 0,8; 0,8 e 0,9 na concentração testada.

Repetindo-se o teste utilizando a metade da concentração obteve-se grau de reatividade suave (IZ=2) com halos 0,3; 0,3 e 0,4.

Após exposição ao hipoclorito de sódio de amostra de doxorubicina preparada similarmente aos demais inativantes, obteve-se grau de reatividade moderado (IZ=3), com halos 0,7; 0,8 e 0,8.

5.2.6. Cromatografia tiosulfato de sódio

Tabela 9: Resultados da cromatografia após exposição ao tiosulfato de sódio

Amostra	Área	% Área
Tiosulfato-T0	10347623	106,49
Tiosulfato-T1	10371223	106,72
Tiosulfato-T6	10334044	106,35

5.2.7. Citotoxicidade tiosulfato de sódio

Considerando a amostra de doxorubicina em solução salina como branco, obteve-se um grau de reatividade moderado (IZ=3), com halos 0,8; 0,6 e 0,7 para a doxorubicina.

Teste do inativante tiosulfato de sódio em solução salina mostrou que o mesmo não apresenta reatividade sobre as células testadas (IZ=0).

Após exposição ao tiosulfato de sódio de amostra de doxorubicina preparada similarmente, obteve-se grau de reatividade leve (IZ=2).

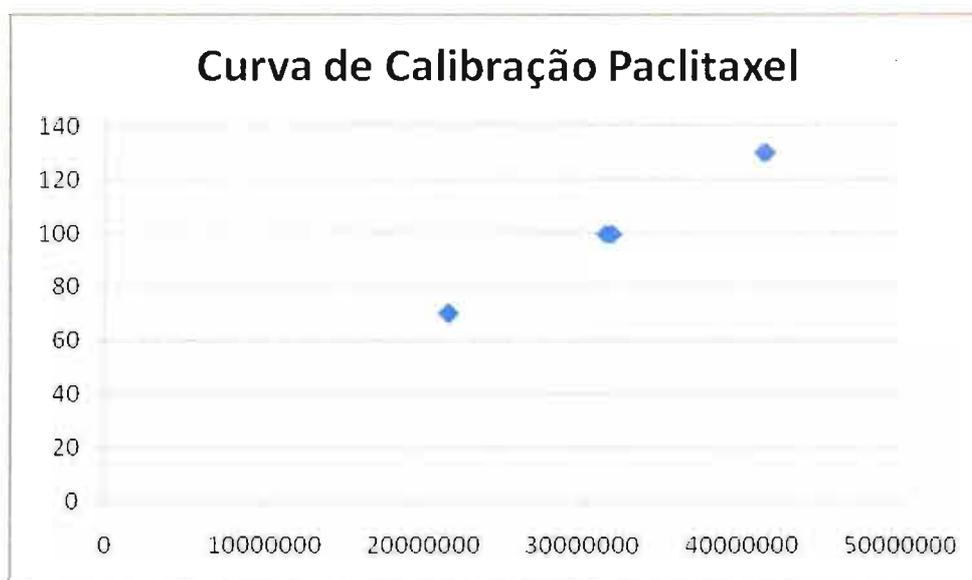
5.3. Paclitaxel

5.3.1. Curva de calibração

Tabela 10: Curva de calibração em três pontos e porcentagem de área da amostra para paclitaxel

Amostra	Área	% Área
Padrão 70-1	21456234	70
Padrão 70-2	21539069	70
Padrão 70-3	21410672	70
Padrão 100-1	31712530	100
Padrão 100-2	31405403	100
Padrão 100-3	31836848	100
Padrão 130-1	41298982	130
Padrão 130-2	41499538	130
Padrão 130-3	41494079	130
Amostra A	31946318	101,65
Amostra B	31802095	101,21

Gráfico 3: Curva de calibração Paclitaxel



5.3.2. Cromatografia asepto 75

Tabela 11: Resultados da cromatografia após exposição ao asepto 75

Amostra	Área	% Área
Asepto-T0	0	0
Asepto-T1	0	0
Asepto-T6	0	0

5.3.3. Citotoxicidade asepto 75

Considerando a amostra de paclitaxel em solução salina como branco, obteve-se um grau de reatividade moderado (IZ=3), com halos 0,8; 0,9 e 1,1 para o paclitaxel.

Teste do inativante asepto 75 em solução salina mostrou que o mesmo não possui efeito citotóxico sobre as células testadas (IZ=0).

Após exposição ao asepto 75 de amostra de paclitaxel similarmente preparada, obteve-se grau de reatividade suave (IZ=2), com halos de 0,3; 0,3 e 0,5. Houve diminuição da citotoxicidade do paclitaxel na concentração testada.

5.3.4. Cromatografia hipoclorito de sódio

Tabela 12: Resultados da cromatografia após exposição ao hipoclorito de sódio

Amostra	Área	% Área
Hipoclorito-T0	58561	4,40
Hipoclorito-T1	0	0
Hipoclorito-T6	50302	4,38

5.3.5. Citotoxicidade hipoclorito de sódio

Considerando a amostra de paclitaxel em solução salina como branco, obteve-se um grau de reatividade moderado (IZ=3), com halos 0,8; 0,9 e 1,1 para o paclitaxel.

Teste do inativante hipoclorito de sódio em solução salina mostrou que o mesmo apresenta grau de reatividade moderado sobre as células testadas (IZ=3), com halos 0,8; 0,8 e 0,9 na concentração testada.

Repetindo-se o teste utilizando a metade da concentração obteve-se grau de reatividade suave (IZ=2) com halos 0,3; 0,3 e 0,4.

Após exposição ao hipoclorito de sódio de amostra de paclitaxel preparada similarmente aos demais inativantes, obteve-se grau de reatividade moderado ($I_Z=3$), com halos 0,8; 0,8 e 1,0.

A citotoxicidade do hipoclorito de sódio associada à do paclitaxel não permitiu verificar diminuição da citotoxicidade neste caso.

5.3.6. Cromatografia tiosulfato de sódio

Tabela 13: Resultados da cromatografia após exposição ao tiosulfato de sódio

Amostra	Área	% Área
Tiosulfato-T0	34124667	108,29
Tiosulfato-T1	34233960	108,62
Tiosulfato-T6	33821702	107,37

5.3.7. Citotoxicidade tiosulfato de sódio

Considerando a amostra de paclitaxel em solução salina como branco, obteve-se um grau de reatividade moderado ($I_Z=3$), com halos 0,8; 0,9 e 1,1 para o paclitaxel.

Teste do inativante tiosulfato de sódio em solução salina mostrou que o mesmo não apresenta reatividade sobre as células testadas ($I_Z=0$).

Após exposição ao tiosulfato de sódio de amostra de paclitaxel preparada similarmente aos demais inativantes, obteve-se grau de reatividade suave ($I_Z=2$), com halos de 0,2; 0,3 e 0,4.

6. Discussão

Os resultados obtidos nos ensaios cromatográficos foram tratados como valores absolutos, uma vez que o foco do trabalho é averiguar a porcentagem de degradação dos princípios ativos frente aos inativantes e, posteriormente, avaliar através do ensaio de citotoxicidade *in vitro* se os produtos de degradação formados apresentam citotoxicidade inferior, similar ou superior à dos reagentes iniciais. Assim, foi feita uma curva de calibração com o padrão de referência em três pontos (“linearidade simplificada”) e quantificou-se a amostra frente a esta curva considerando o ponto médio da curva como 100%, o ponto menor 70% e o ponto maior 130%. Da mesma forma, não buscou-se identificar os resíduos formados, desde que os mesmos apresentassem citotoxicidade no máximo igual à dos produtos iniciais. Caso contrário, haveria uma tentativa de identificar o composto cuja citotoxicidade fosse maior que a dos produtos iniciais.

Não foram avaliados os parâmetros intrínsecos à validação do método analítico, pois uma vez que se trata de método farmacopeico o mesmo é considerado validado desde que as condições de adequabilidade do sistema sejam cumpridas e que não sejam feitas alterações além das permitidas na própria farmacopéia (USP 30, 2007). Para o teste de citotoxicidade *in vitro* as concentrações dos princípios ativos foram ajustadas de modo a se obter uma citotoxicidade moderada nas amostras dos ativos em solução salina, de modo a se poderem comparar os resultados obtidos.

Na análise de cisplatina, a quantificação do princípio ativo é feita a 310 nm, região em que o espectro exibe máximo de absorvância (conforme figuras 6 e 7).

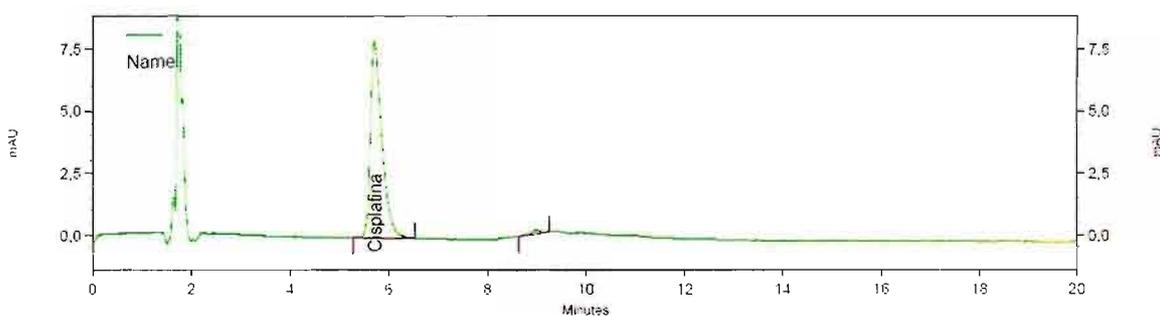


Figura 6: Cromatograma – Cisplatina, Padrão 100%.

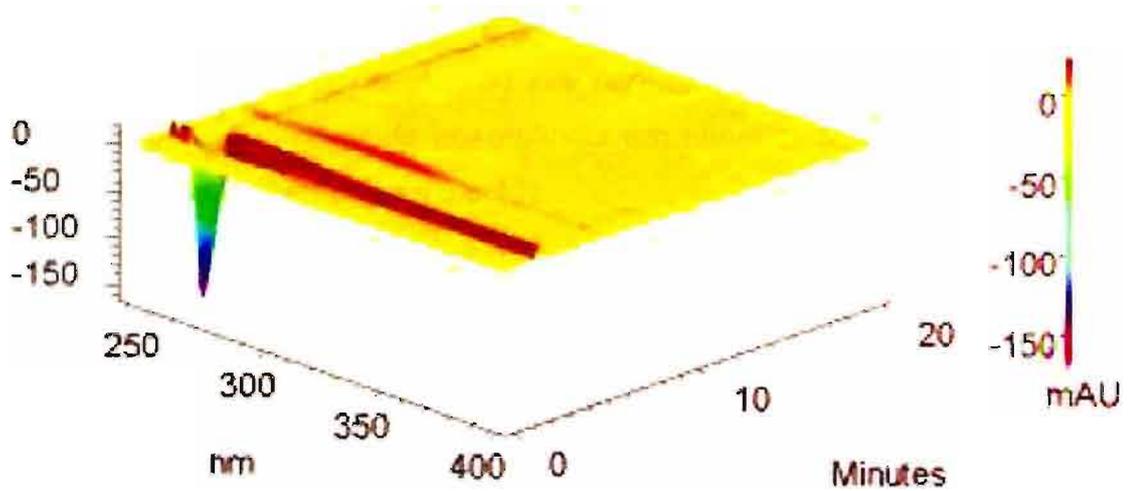


Figura 7: Varredura – Cisplatina, Padrão 100%.

Da mesma forma, o cromatograma da amostra da solução injetável é similar ao do padrão, não apresentando picos que não estejam presentes nos cromatogramas do padrão, conforme figuras 8 e 9.

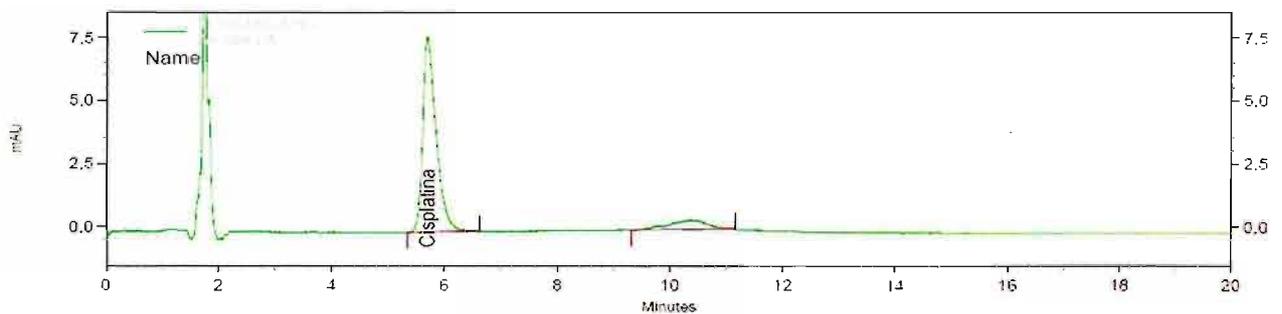


Figura 8: Cromatograma – Amostra de cisplatina

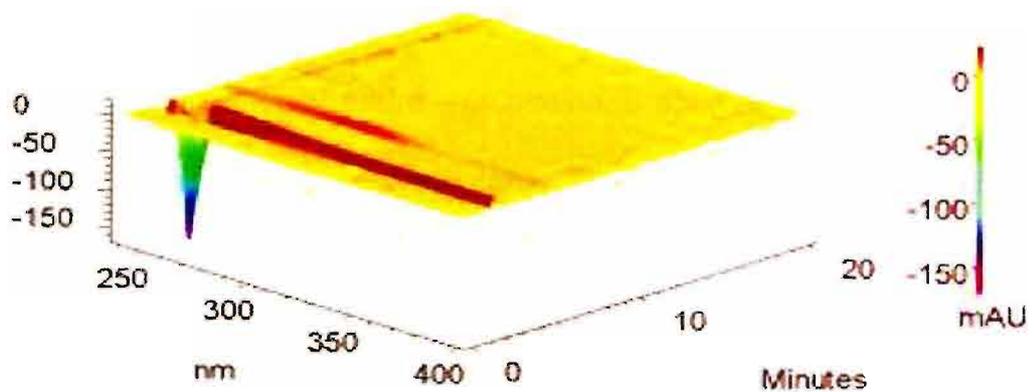


Figura 9: Varredura – Amostra de cisplatina

Injetando-se somente o inativante asepto diluído no diluente do método observamos que não há interferência do mesmo em nenhuma região do cromatograma e o mesmo não possui máxima de absorvância em nenhum comprimento de onda na região do UV (conforme figuras 10 e 11).

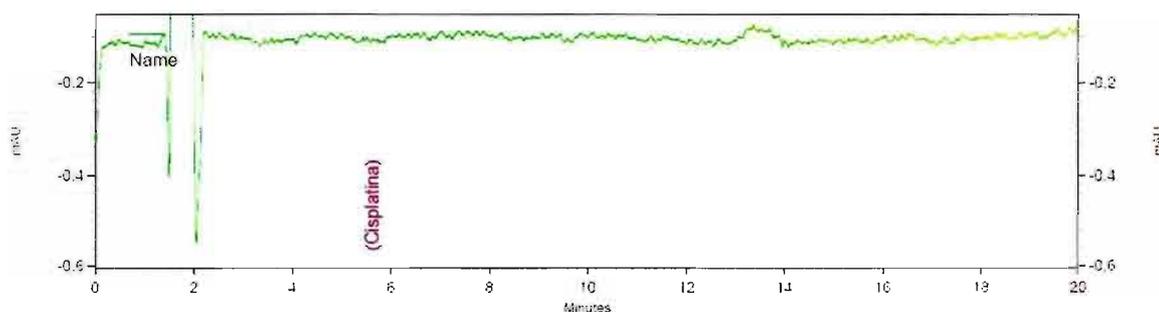


Figura 10: Cromatograma – Cisplatina, Branco Asepto.

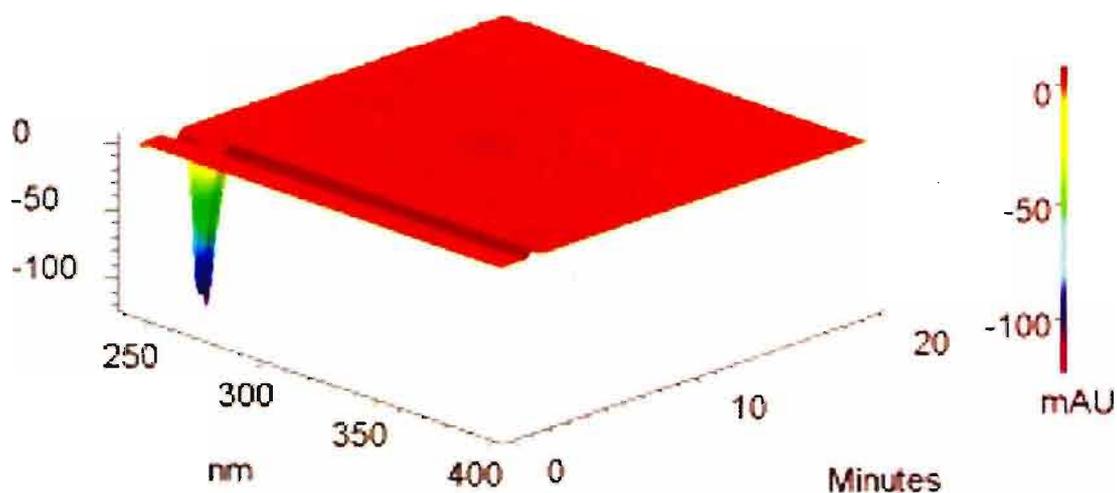


Figura 11: Varredura – Cisplatina, Branco Asepto.

O cromatograma da amostra em contato com o diluente no tempo zero (figura 12) já mostra uma redução na área do pico de cisplatina com formação de um segundo pico adjacente, resultante da reação entre o dicloroisocianurato de sódio (asepto) e a cisplatina. Observa-se também a formação de picos em outros comprimentos de onda (figura 13).

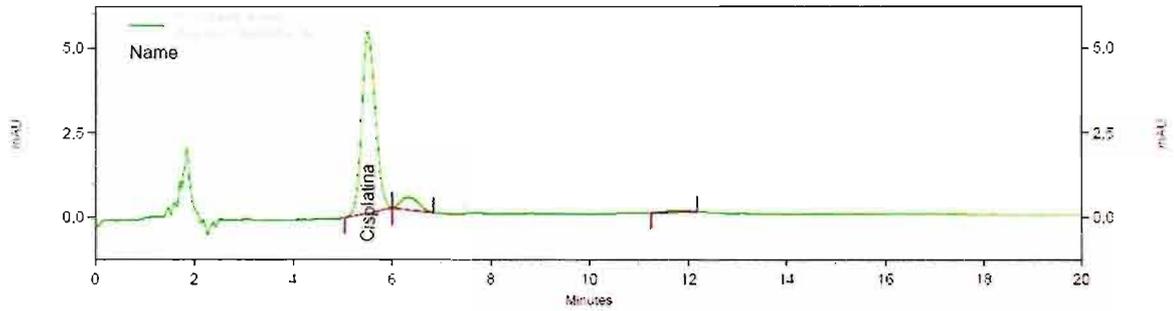


Figura 12: Cromatograma – Cisplatina em asepto, tempo 0 hora.

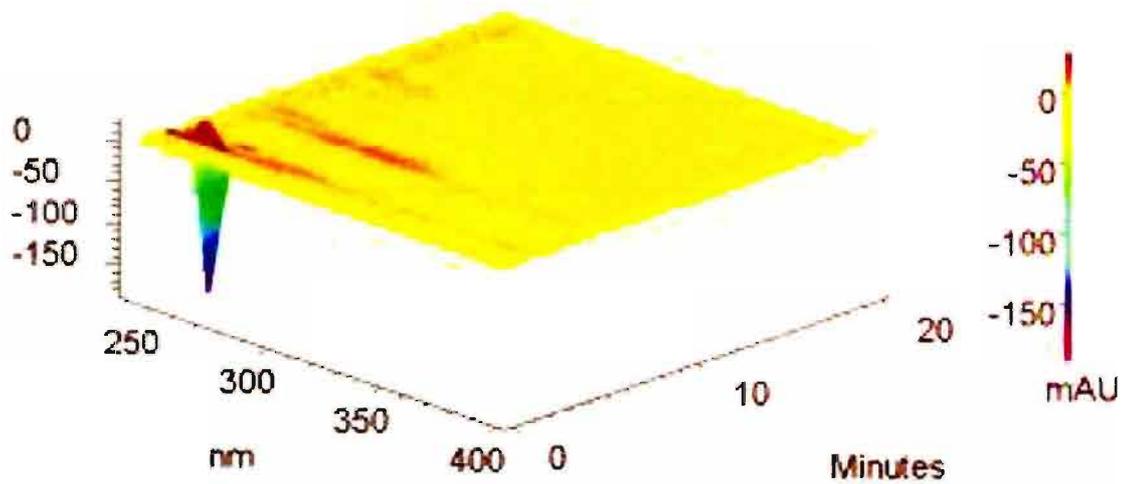


Figura 13: Varredura – Cisplatina em asepto, tempo 0 hora.

Observa-se a continuação da reação nos tempos de 1 hora e 6 horas, não tendo ocorrido total degradação da cisplatina no período avaliado (conforme figuras 14 a 17).

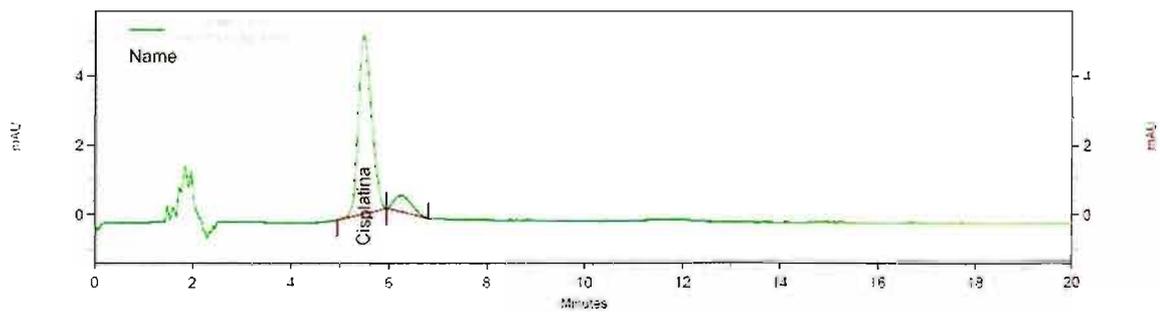


Figura 14: Cromatograma – Cisplatina em asepto, tempo 1 hora.

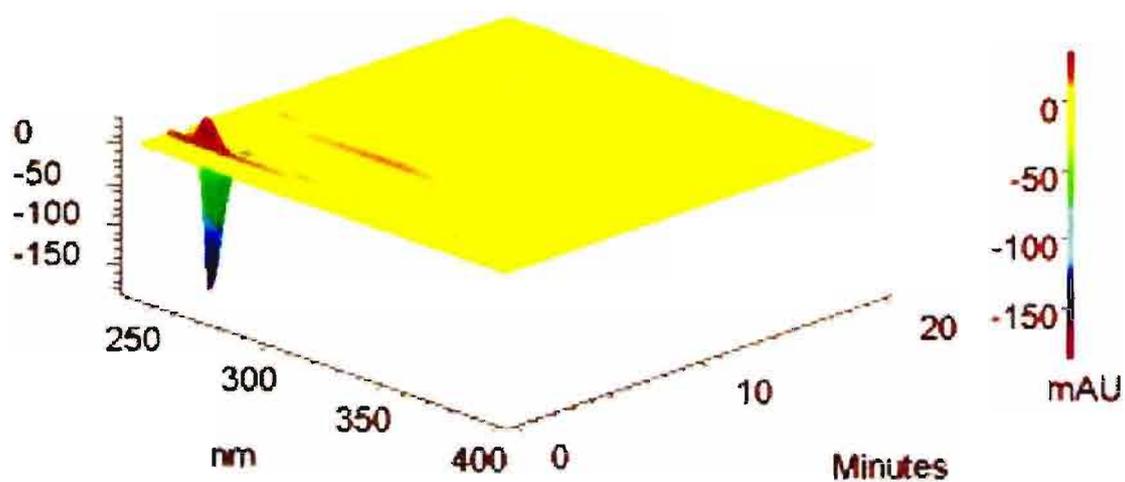


Figura 15: Varredura – Cisplatina em asepto, tempo 1 hora.

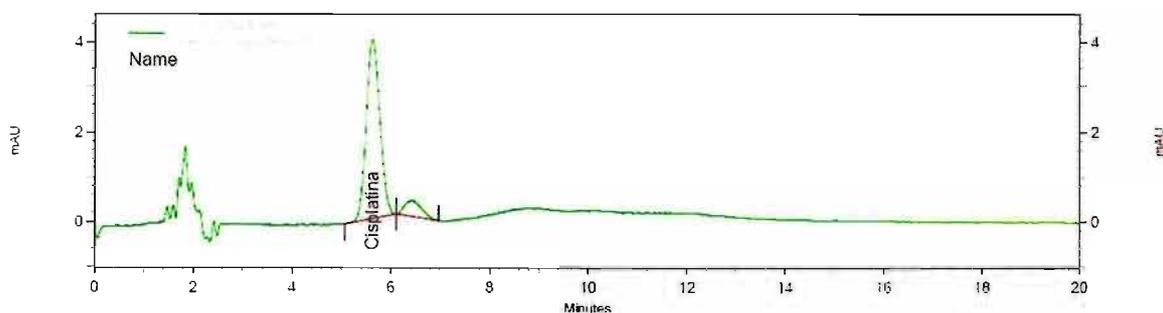


Figura 16: Cromatograma – Cisplatina em asepto, tempo 6 horas.

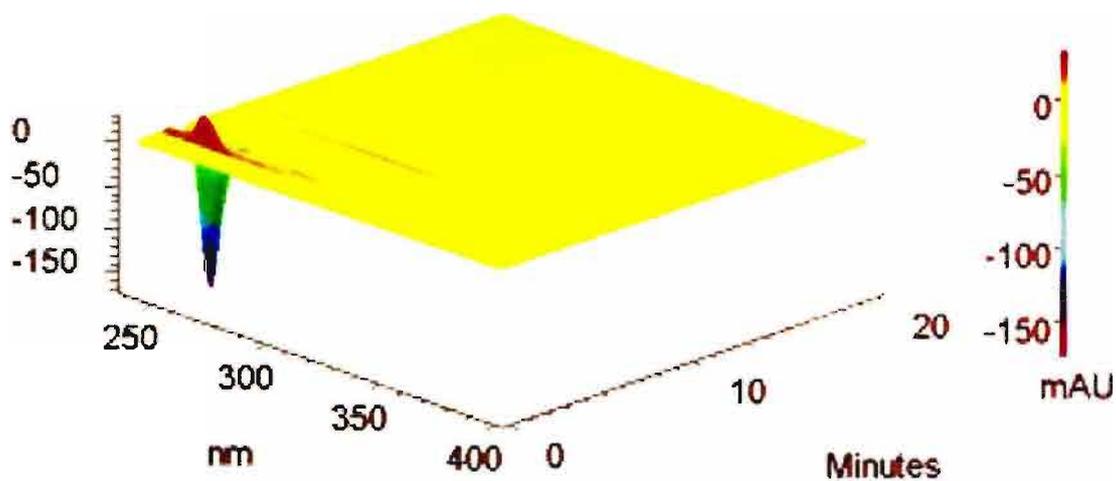


Figura 17: Varredura – Cisplatina em asepto, tempo 6 horas.

Na avaliação da citotoxicidade *in vitro* para esta amostra, ocorreu a diminuição do grau de reatividade de 3 (moderado) para 0 (nenhum). Com o início do processo de

degradação, é possível que a quantidade de cisplatina ainda presente na amostra não estivesse em concentração suficiente para produzir efeitos citotóxicos sobre as células.

Injetando-se somente o inativante hipoclorito de sódio diluído no diluente do método observamos que não há interferência do mesmo na região do cromatograma em que aparece a cisplatina e o mesmo possui máxima de absorvância em torno de 260 nm (conforme figuras 18 e 19).

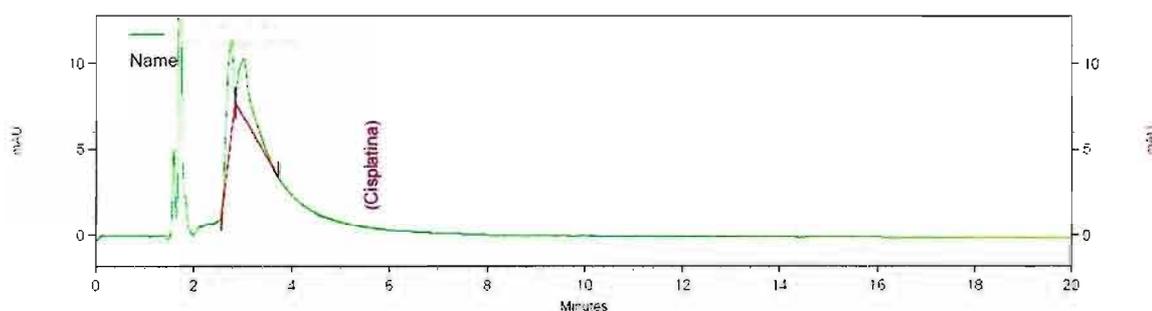


Figura 18: Cromatograma – Cisplatina, Branco Hipoclorito de Sódio

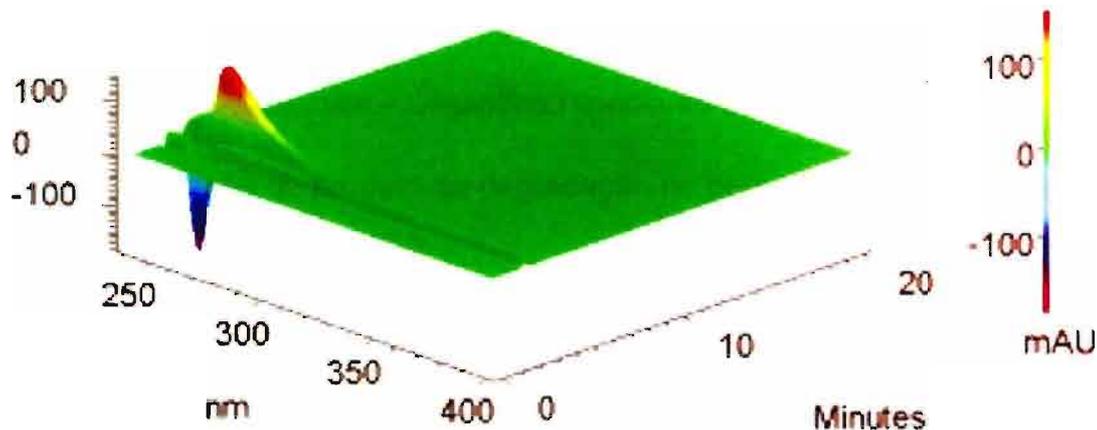


Figura 19: Varredura – Cisplatina, Branco Hipoclorito de sódio

A exposição da cisplatina ao hipoclorito de sódio produz degradação imediata, com aumento da máxima de absorvância na região de 260 nm (figuras 20 e 21).

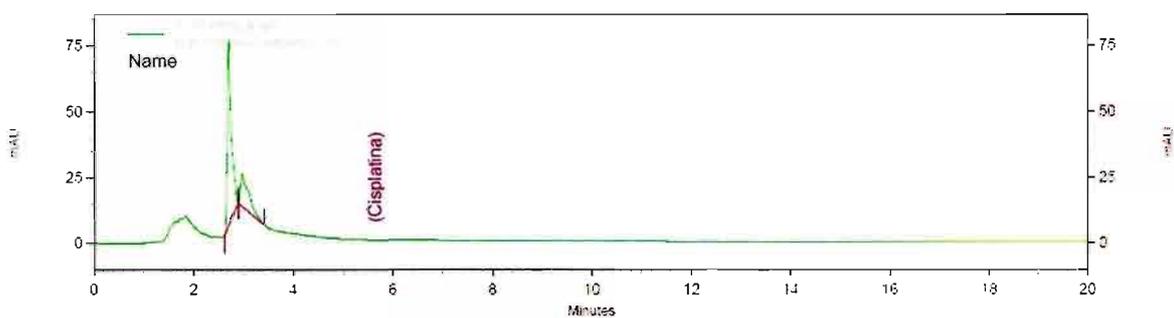


Figura 20: Cromatograma – Cisplatina, Hipoclorito de Sódio, tempo 0 hora.

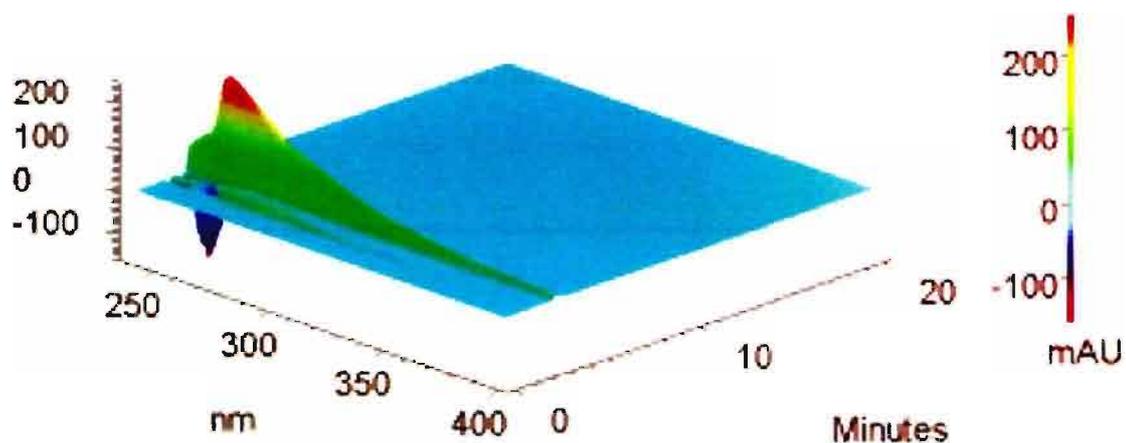


Figura 21: Varredura – Cisplatina, Hipoclorito de Sódio, tempo 0 hora.

Não houve alteração do produto de degradação no período subsequente (1 hora e 6 horas), conforme figuras 22 a 25.

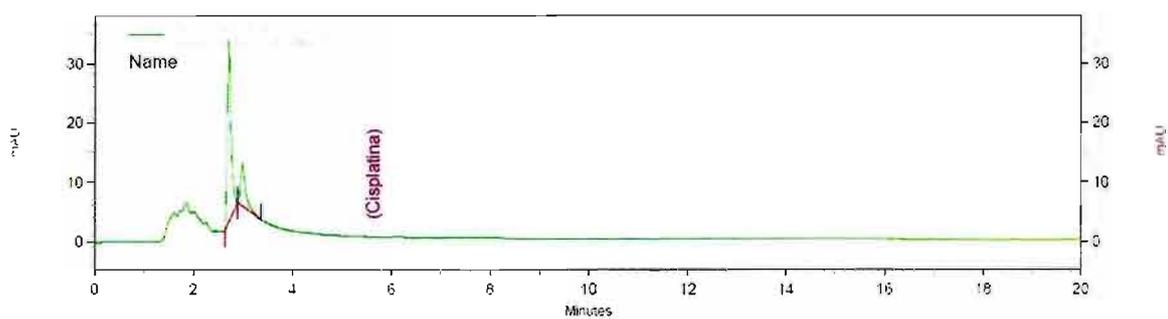


Figura 22: Cromatograma – Cisplatina, Hipoclorito de Sódio, tempo 1 hora.

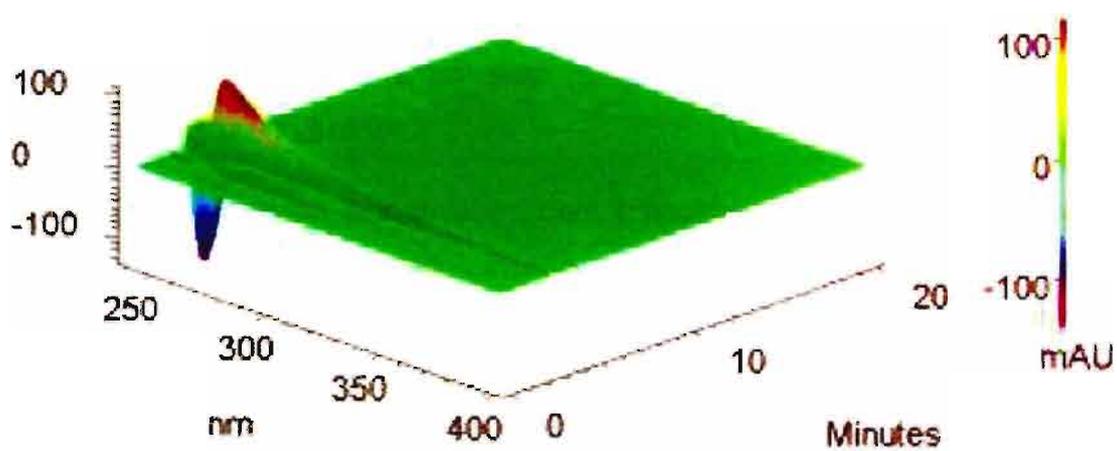


Figura 23: Varredura – Cisplatina, Hipoclorito de Sódio, tempo 1 hora.

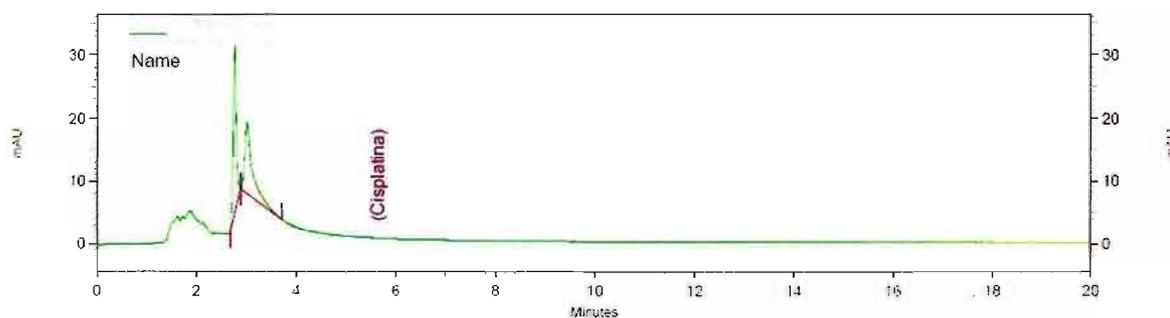


Figura 24: Cromatograma – Cisplatina em hipoclorito de sódio, tempo 6 horas.

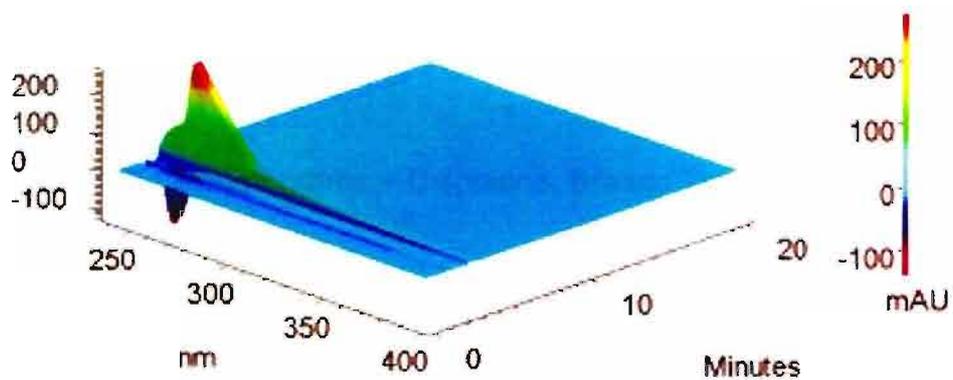


Figura 25: Varredura – Cisplatina em hipoclorito de sódio, tempo 6 horas.

O ensaio de citotoxicidade do hipoclorito de sódio revelou que o mesmo apresenta características citotóxicas, tendo sido encontrado um grau de citotoxicidade moderado no ensaio do branco.

As amostras submetidas à inativação com hipoclorito de sódio apresentaram um grau de citotoxicidade moderado. Tendo em vista que a análise cromatográfica demonstrou a total degradação do princípio ativo e o alto grau de citotoxicidade apresentado pelo reagente hipoclorito de sódio, pode-se inferir que a inativação do princípio ativo foi efetiva, observando-se um grau moderado de citotoxicidade na amostra testada em função da presença de resíduos de hipoclorito. Realizando-se o teste com uma concentração menor do inativante, obteve-se um grau de citotoxicidade menor ($IZ=2$), o que corrobora a inferência.

Injetando-se somente o inativante tiosulfato de sódio diluído no diluente do método observamos que não há interferência do mesmo na região do cromatograma em que aparece a cisplatina e o mesmo não possui máxima de absorvância em nenhuma região do cromatograma (conforme figuras 26 e 27).

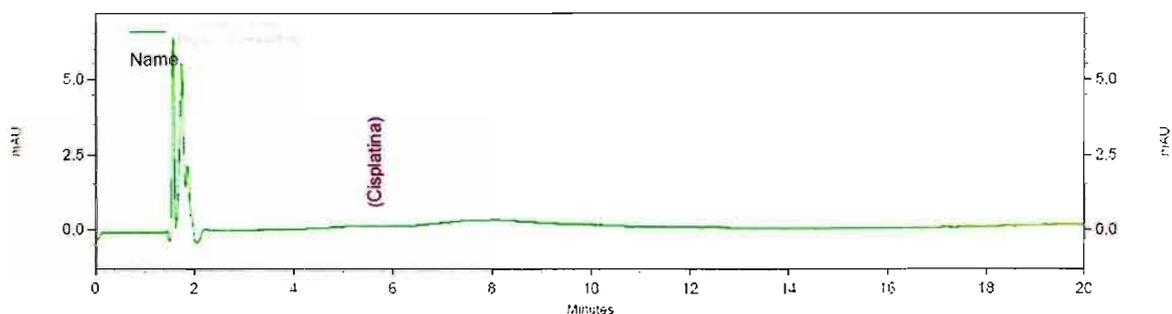


Figura 26: Cromatograma – Cisplatina, Branco Tiosulfato de Sódio.

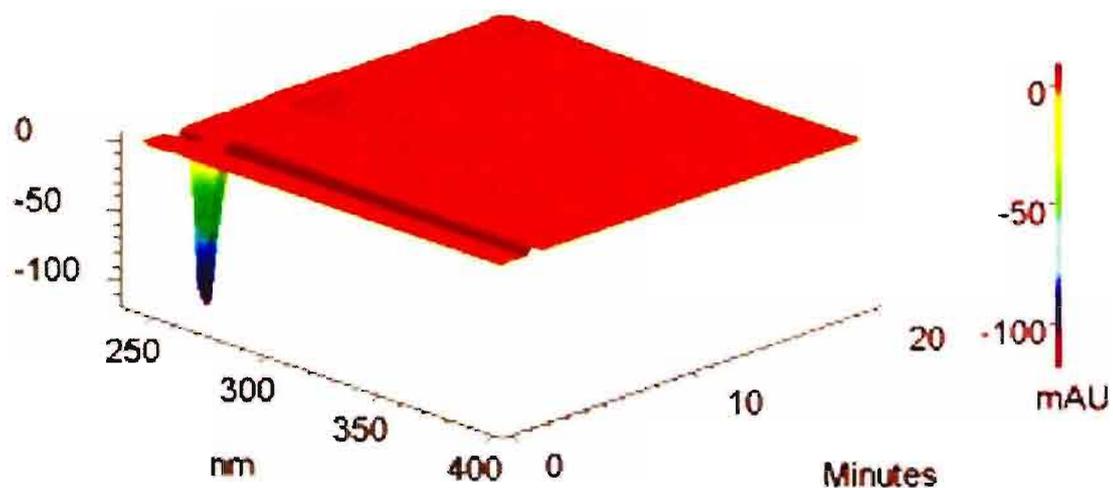


Figura 27: Varredura – Cisplatina Branco Tiosulfato de Sódio.

O cromatograma de cisplatina em contato com o inativante tiosulfato de sódio mostra degradação imediata da cisplatina, com aparecimento de um novo pico no mesmo comprimento de onda (310 nm), conforme observado nas figuras 28 e 29.

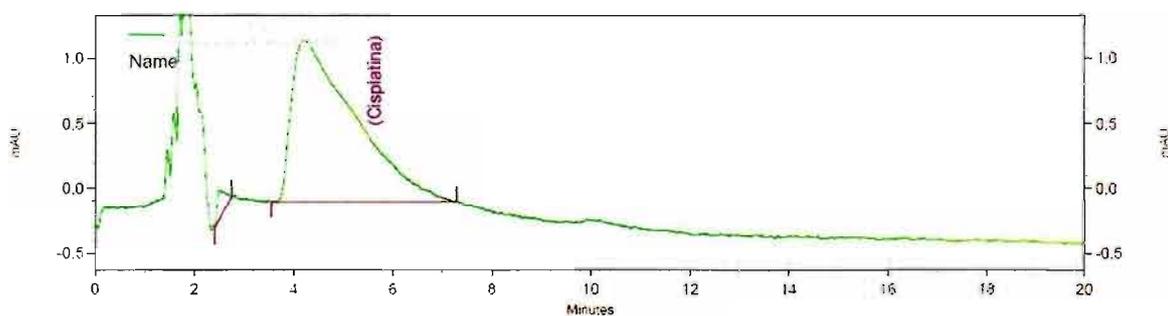


Figura 28: Cromatograma – Cisplatina, Tiosulfato de Sódio, tempo 0 hora.

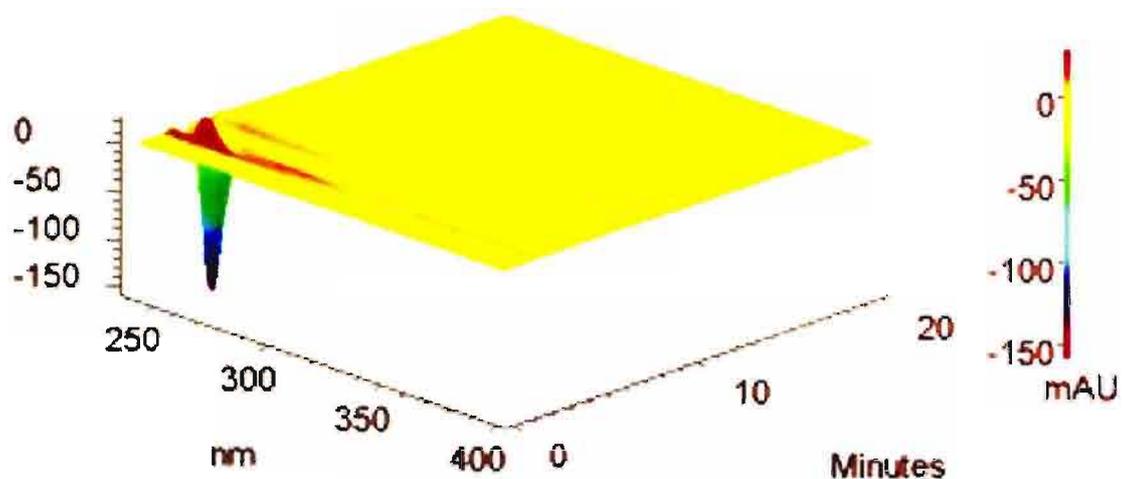


Figura 29: Varredura – Cisplatina, Tiosulfato de Sódio, tempo 0 hora.

Não houve alteração do produto de degradação no período subsequente (1 hora e 6 horas), conforme figuras 30 a 33.

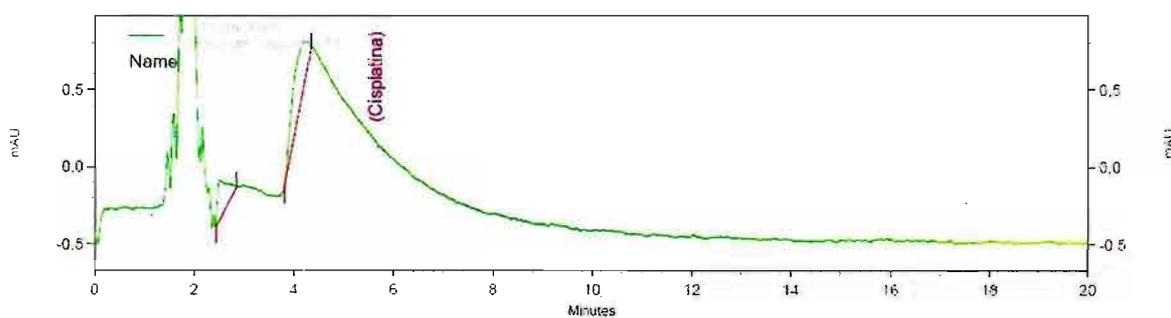


Figura 30: Cromatograma – Cisplatina, Tiosulfato de Sódio, tempo 1 hora.

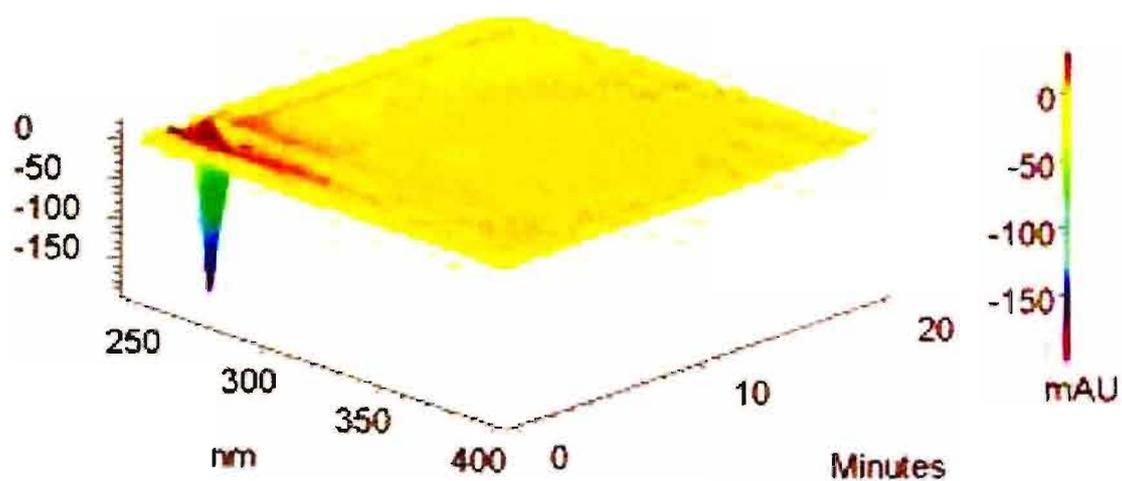


Figura 31: Varredura – Cisplatina, Tiosulfato de Sódio, tempo 1 hora.

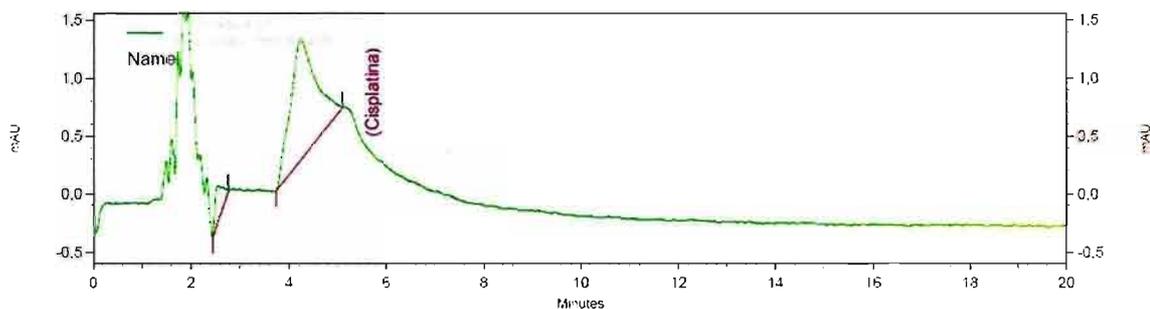


Figura 32: Cromatograma – Cisplatina, Tiosulfato de Sódio, tempo 6 horas.

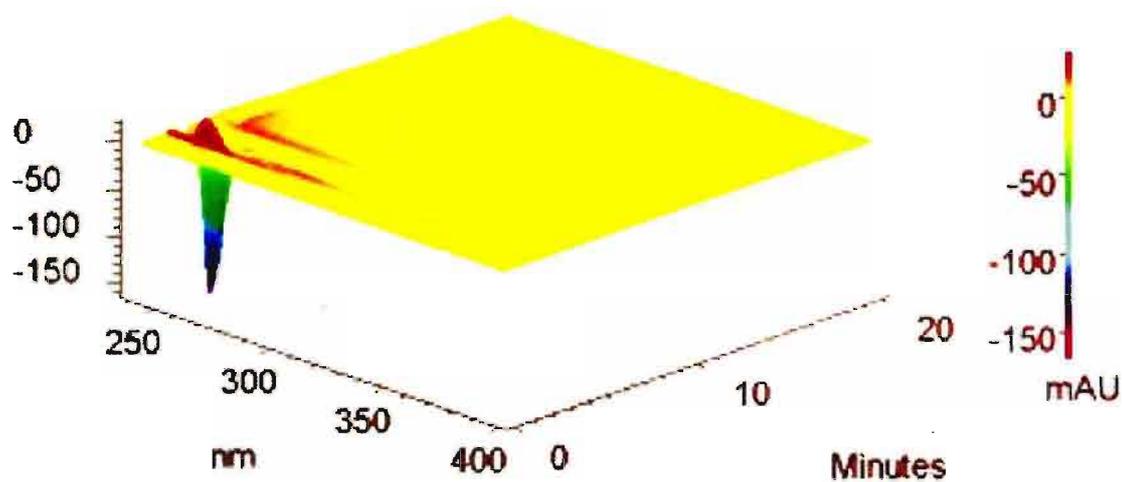


Figura 33: Varredura – Cisplatina, Tiosulfato de Sódio, tempo 6 horas.

Os estudos de citotoxicidade para estas amostras demonstraram que houve total inativação da cisplatina. O tiosulfato não apresenta citotoxicidade quando testado sozinho e houve redução do grau de reatividade nas amostras de 3 (moderado) para 0 (nenhum) após os ensaios.

Os cromatogramas de doxorubicina são quantificados em 254 nm, região em que o espectro exibe máximo de absorvância (conforme figuras 34 e 35).

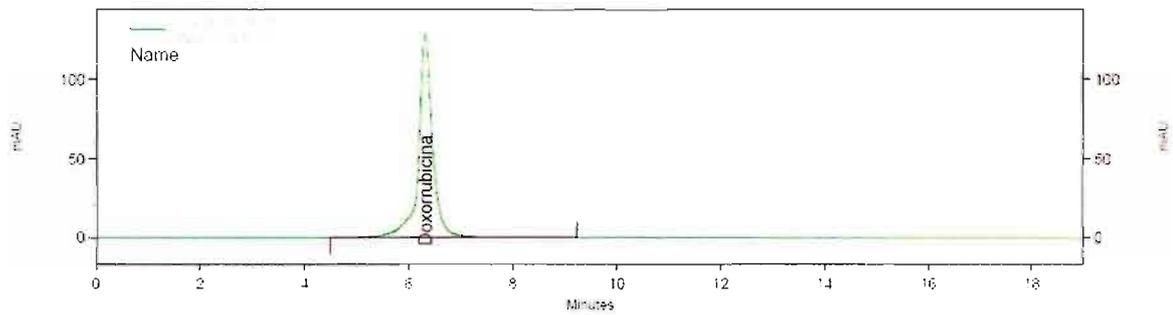


Figura 34: Cromatograma – Doxorrubicina, Padrão 100%.

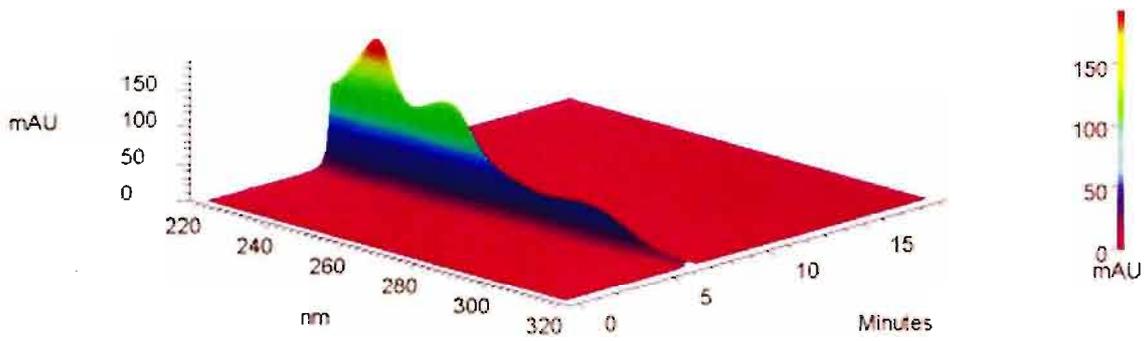


Figura 35: Varredura – Doxorrubicina, Padrão 100%.

Da mesma forma, o cromatograma da amostra da solução injetável é similar ao do padrão, apresentando somente um pico que não está presente nos cromatogramas do padrão, conforme figuras 36 e 37 e que não está presente nos demais comprimentos de onda avaliados.

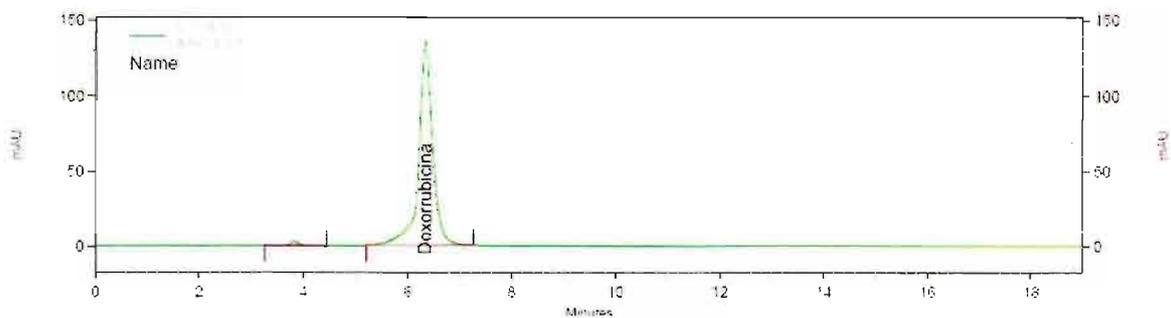


Figura 36: Cromatograma – Amostra de doxorrubicina

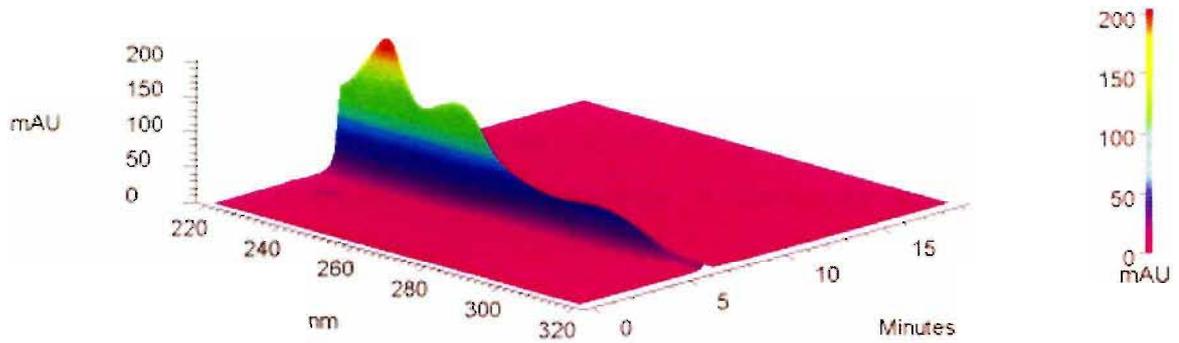


Figura 37: Varredura – Amostra de doxorubicina

Injetando-se somente o inativante asepto diluído no diluente do método observamos que o mesmo possui absorvância em 254 nm, entretanto em tempo de retenção diferente da doxorubicina, o que não causa interferência na detecção desta (conforme figuras 38 e 39).

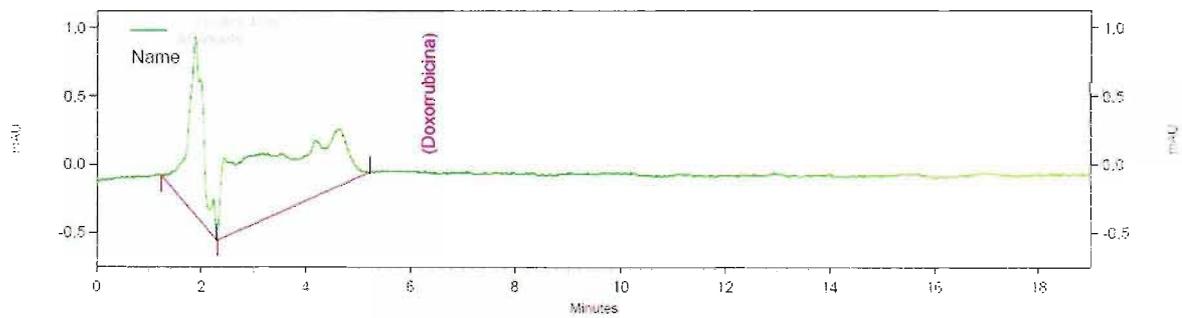


Figura 38: Cromatograma – Doxorubicina, Branco Asept.

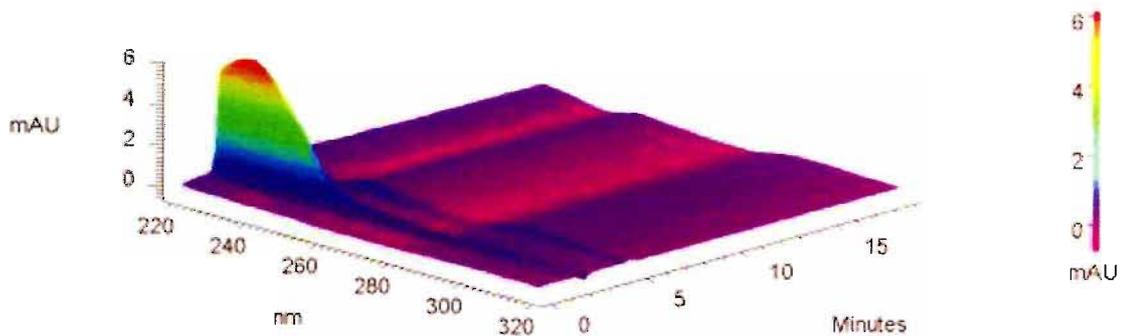


Figura 39: Varredura – Doxorubicina, Branco Asept.

O cromatograma da amostra em contato com o diluente no tempo zero (figura 40) já mostra uma redução na área do pico de doxorrubicina com formação de um segundo pico adjacente, resultante da reação entre o dicloroisocianurato de sódio (asepto) e a doxorrubicina. Não observa-se a formação de picos em outros comprimentos de onda (figura 41).

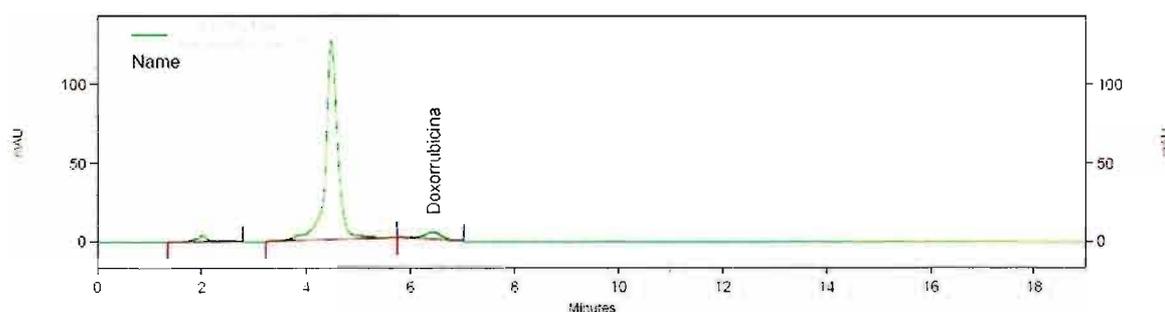


Figura 40: Cromatograma – Doxorrubicina em asepto, tempo 0 hora.

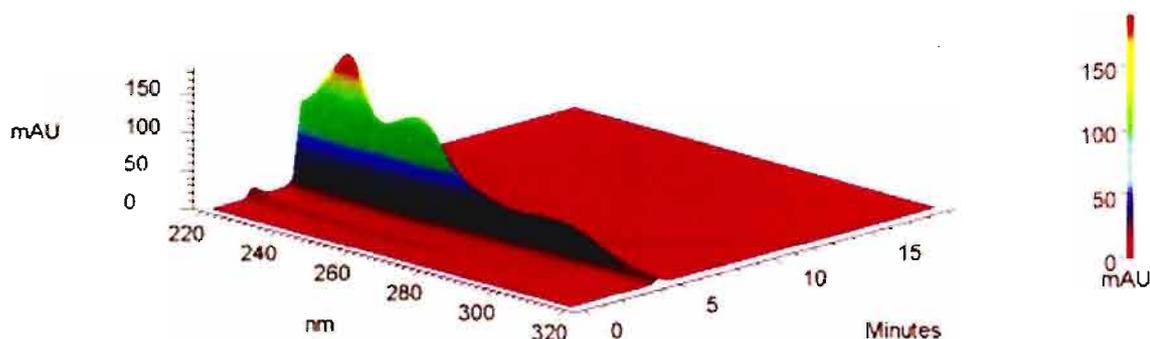


Figura 41: Varredura – Doxorrubicina em asepto, tempo 0 hora.

Observa-se a continuação da reação nos tempos de 1 hora e 6 horas, tendo ocorrido degradação quase total da doxorrubicina no período avaliado (conforme figuras 42 a 45).

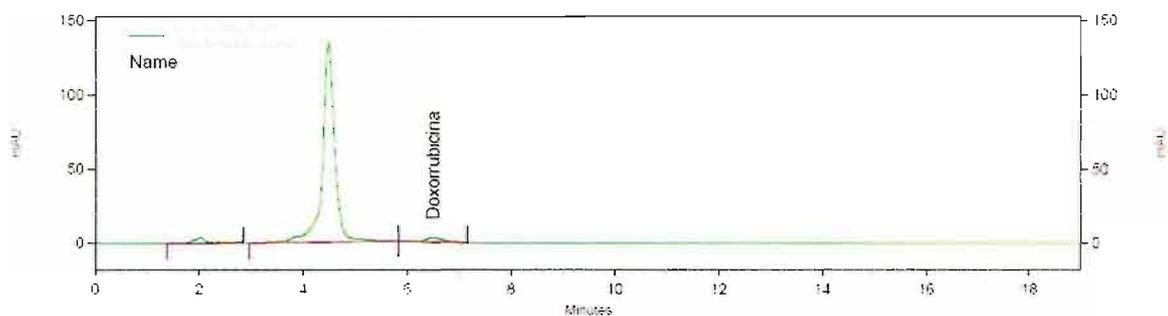


Figura 42: Cromatograma – Doxorrubicina em asepto, tempo 1 hora.

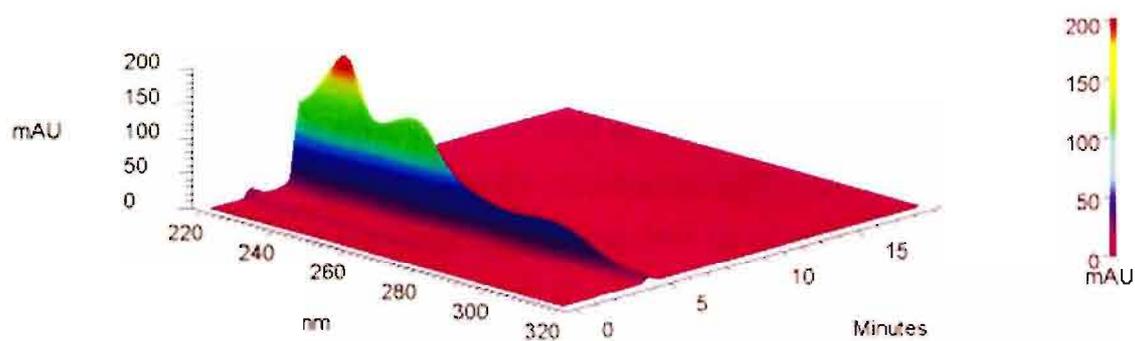


Figura 43: Varredura – Doxorrubicina em asepto, tempo 1 hora.

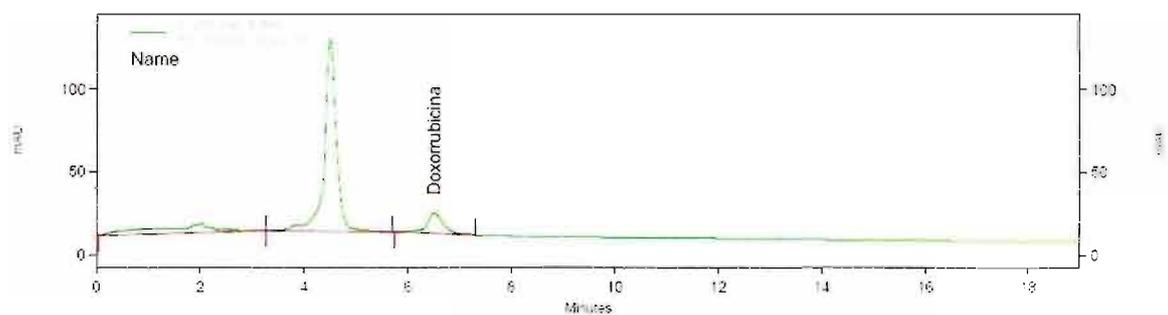


Figura 44: Cromatograma – Doxorrubicina em asepto, tempo 6 horas.

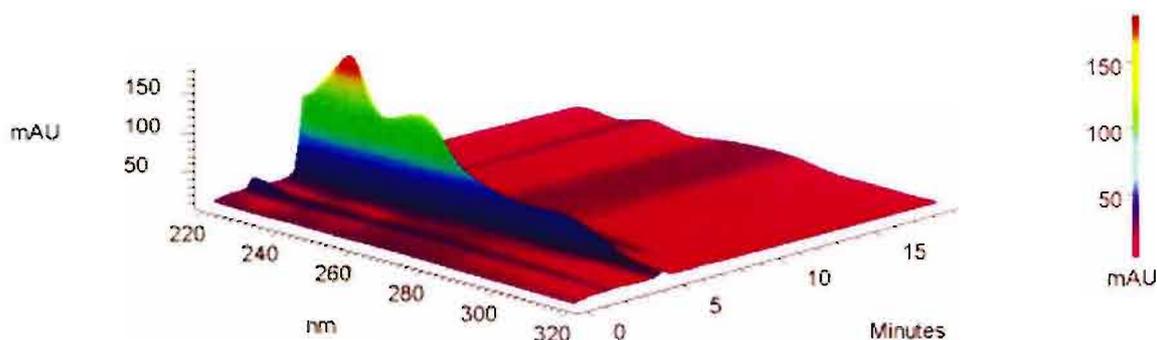


Figura 45: Varredura – Doxorubicina em asepto, tempo 6 horas.

Na avaliação da citotoxicidade in vitro para esta amostra, ocorreu a diminuição do grau de reatividade de 3 (moderado) para 0 (nenhum). O processo de degradação foi efetivo para a redução da citotoxicidade da doxorubicina.

Injetando-se somente o inativante hipoclorito de sódio diluído no diluente do método observamos que não há interferência do mesmo na região do cromatograma em que aparece a doxorubicina e o mesmo possui máxima de absorvância em torno de 240 nm (conforme figuras 46 e 47).

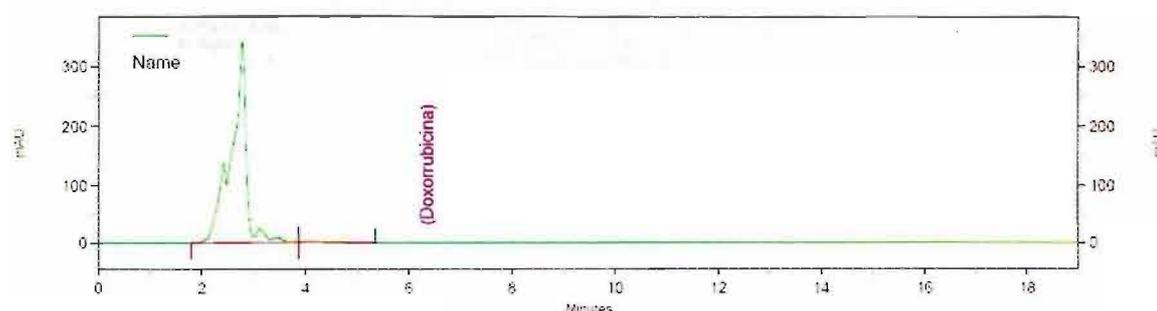


Figura 46: Cromatograma – Doxorubicina, Branco Hipoclorito de Sódio

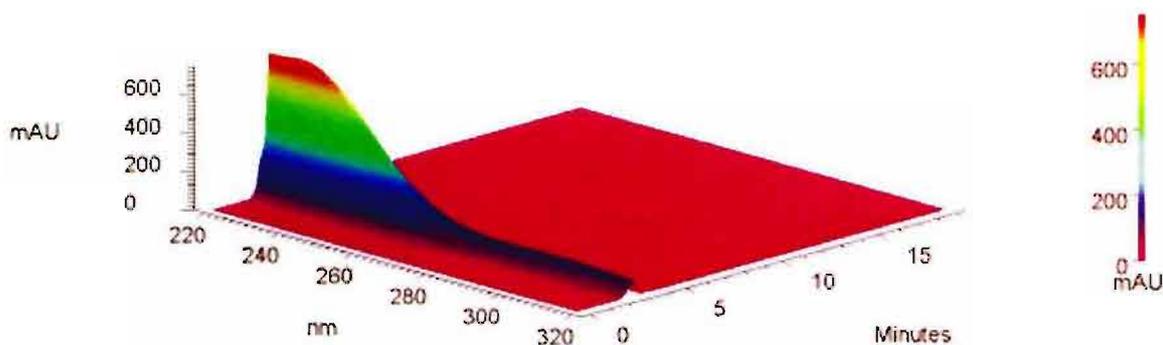


Figura 47: Varredura – Doxorubicina, Branco Hipoclorito de sódio.

A exposição da doxorubicina ao hipoclorito de sódio produz degradação imediata, com aumento da máxima de absorvância na região de 230 a 260 nm (figuras 48 e 49).

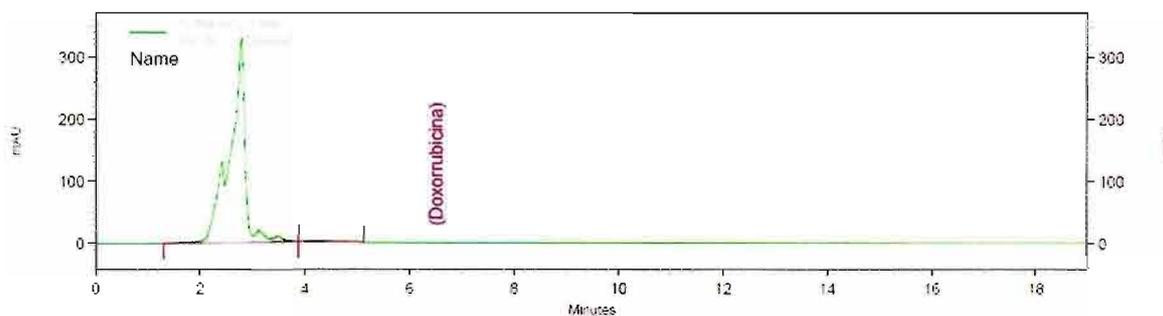


Figura 48: Cromatograma – Doxorubicina em hipoclorito de sódio, tempo 0 hora.

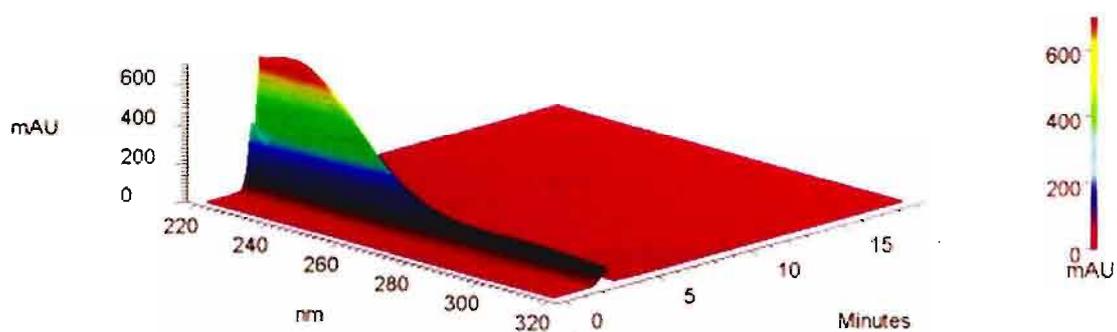


Figura 49: Varredura – Doxorubicina em hipoclorito de sódio, tempo 0 hora.

Não houve alteração do produto de degradação no período subsequente, apenas incremento da formação do degradado (1 hora e 6 horas), conforme figuras 50 a 53.

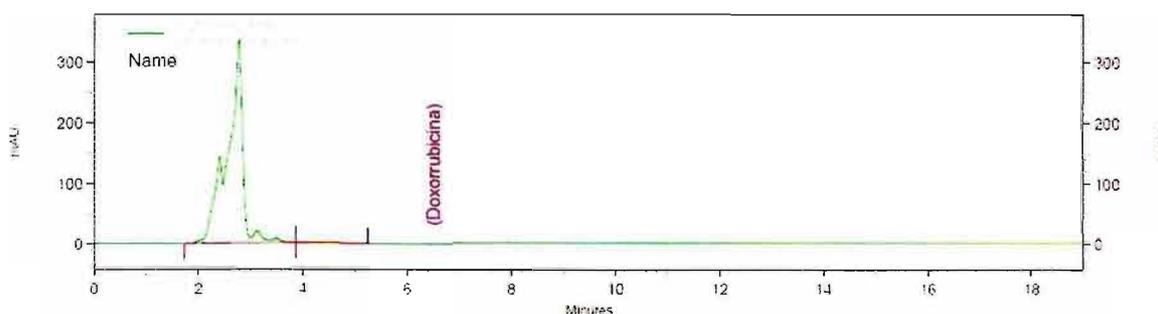


Figura 50: Cromatograma – Doxorubicina em hipoclorito de sódio, tempo 1 hora.

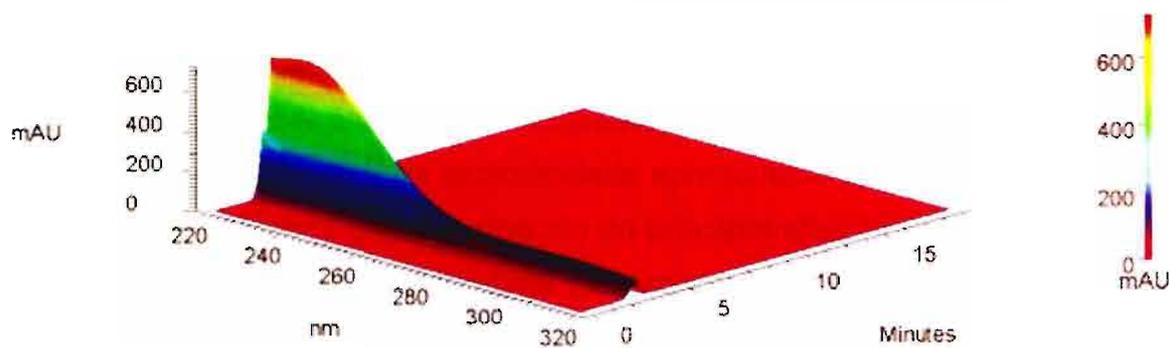


Figura 51: Varredura – Doxorrubicina em hipoclorito de sódio, tempo 1 hora.

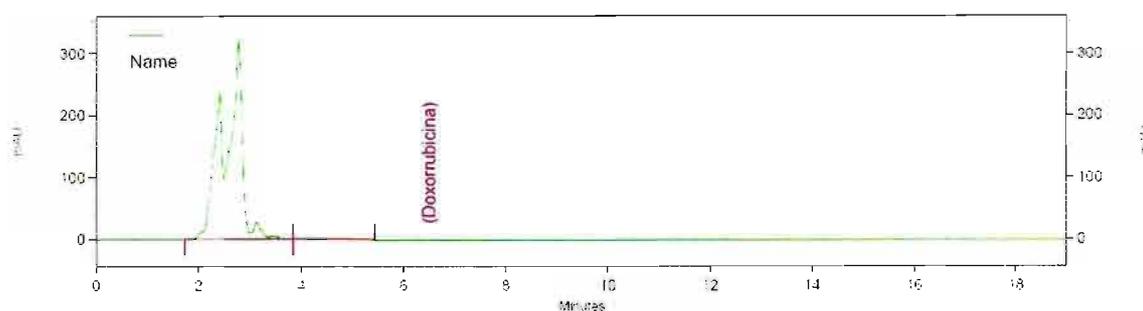


Figura 52: Cromatograma – Doxorrubicina em hipoclorito de sódio, tempo 6 horas.

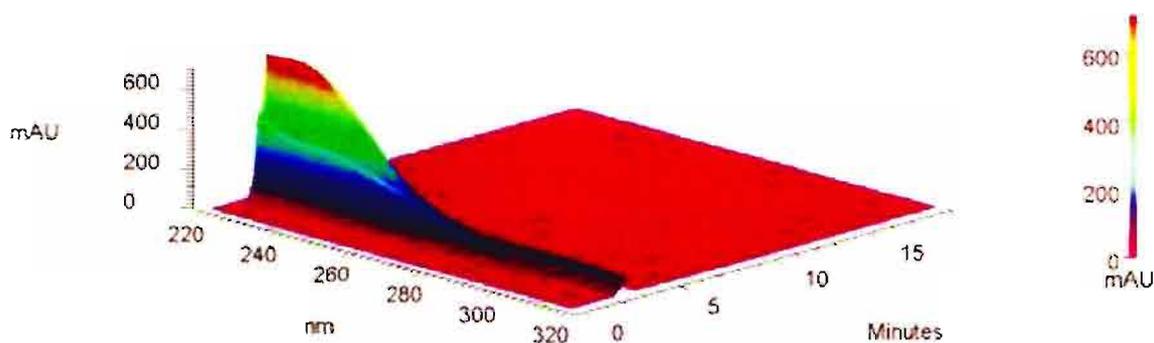


Figura 53: Varredura – Doxorrubicina em hipoclorito de sódio, tempo 6 horas.

O ensaio de citotoxicidade do hipoclorito de sódio revelou que o mesmo apresenta características citotóxicas, tendo sido encontrado um grau de citotoxicidade moderado no ensaio do branco.

As amostras submetidas à inativação com hipoclorito de sódio apresentaram um grau de citotoxicidade moderado. Da mesma forma que em relação à cisplatina, tendo em vista que a análise cromatográfica demonstrou a total degradação do princípio ativo e o alto grau de citotoxicidade apresentado pelo reagente hipoclorito de sódio, pode-se inferir que a inativação do princípio ativo foi efetiva, observando-se um grau moderado de citotoxicidade na amostra testada em função da presença de resíduos de hipoclorito. Realizando-se o teste com uma concentração menor do inativante, obteve-se um grau de citotoxicidade menor ($IZ=2$), o que corrobora a inferência.

Injetando-se somente o inativante tiosulfato de sódio diluído no diluente do método observamos que não há interferência do mesmo na região do cromatograma em que aparece a doxorubicina e o mesmo não possui máxima de absorvância entre 220 e 260 nm (conforme figuras 54 e 55).

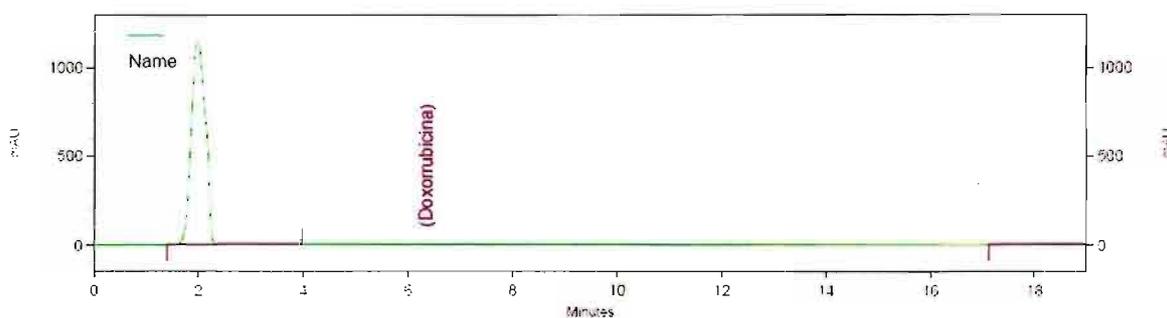


Figura 54: Cromatograma – Doxorubicina, Branco Tiosulfato de Sódio.

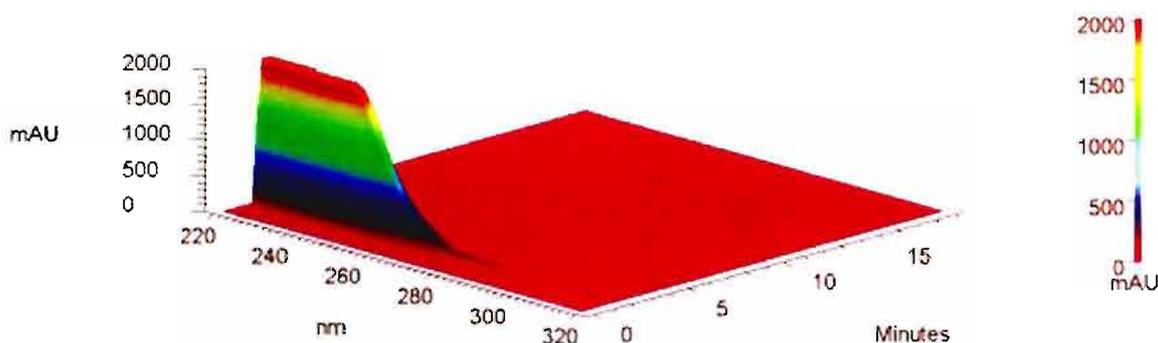


Figura 55: Varredura – Doxorubicina, Branco Tiosulfato de Sódio.

O cromatograma de doxorubicina em contato com o inativante tiossulfato de sódio mostra que não houve degradação da doxorubicina, e nem o aparecimento de novos picos no mesmo comprimento de onda (254 nm) ou adjacentes, conforme observado nas figuras 56 e 57.

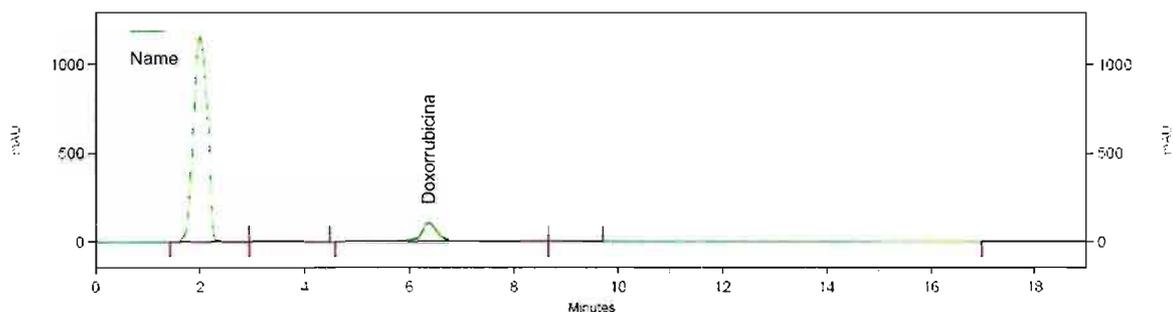


Figura 56: Cromatograma – Doxorubicina em tiossulfato de sódio, tempo 0 hora.

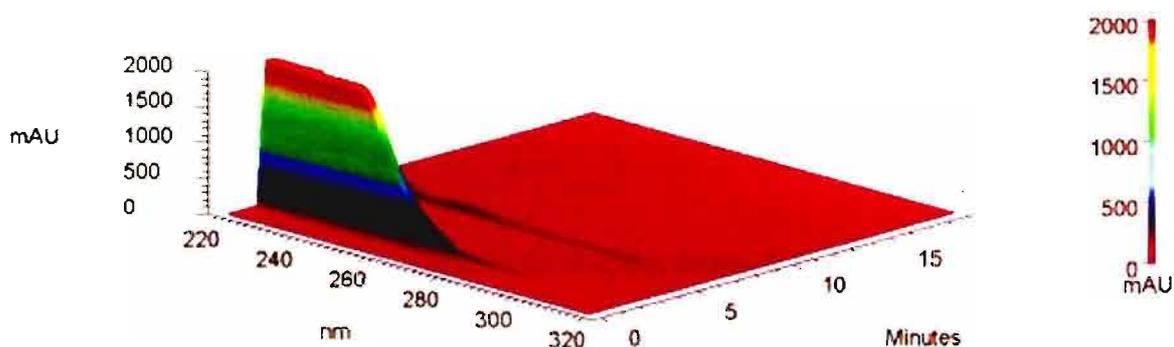


Figura 57: Varredura – Doxorubicina em tiossulfato de sódio, tempo 0 hora.

Não houve alteração na formação do produto de degradação no período subsequente (1 hora e 6 horas), conforme figuras 58 a 61.

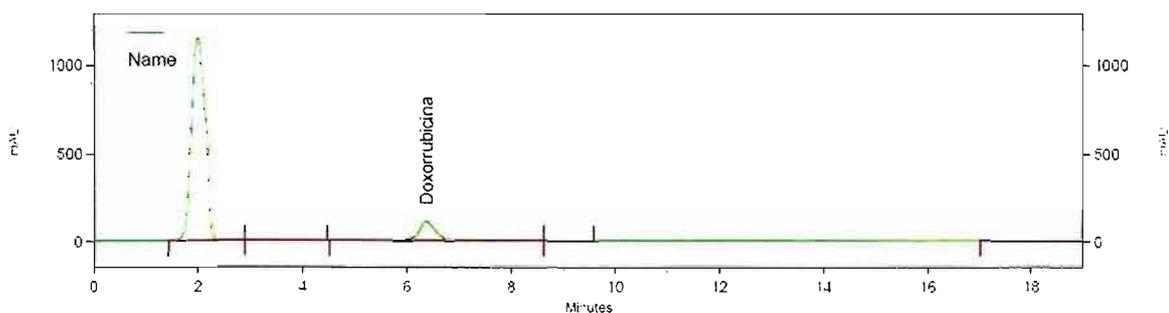


Figura 58: Cromatograma – Doxorubicina em tiossulfato de sódio, tempo 1 hora.

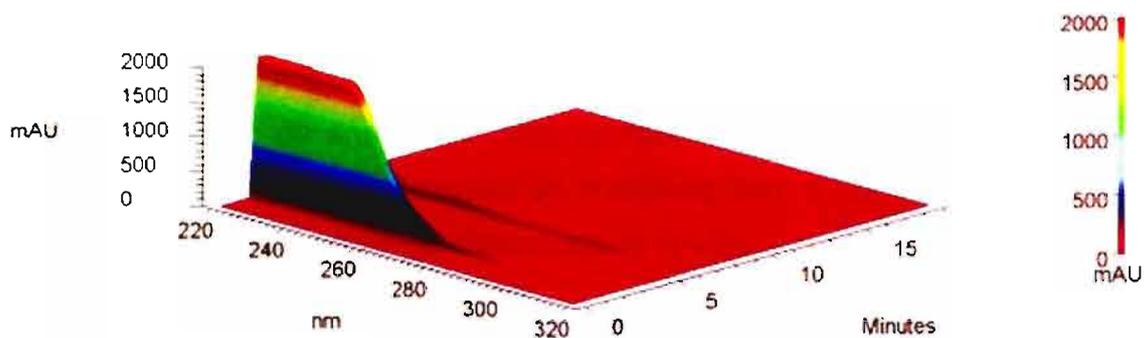


Figura 59: Varredura – Doxorubicina em tiosulfato de sódio, tempo 1 hora.

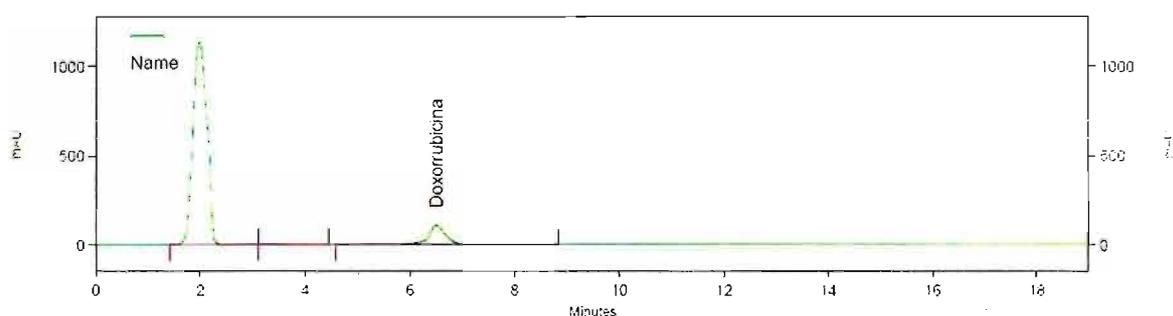


Figura 60: Cromatograma – Doxorubicina em tiosulfato de sódio, tempo 6 horas.

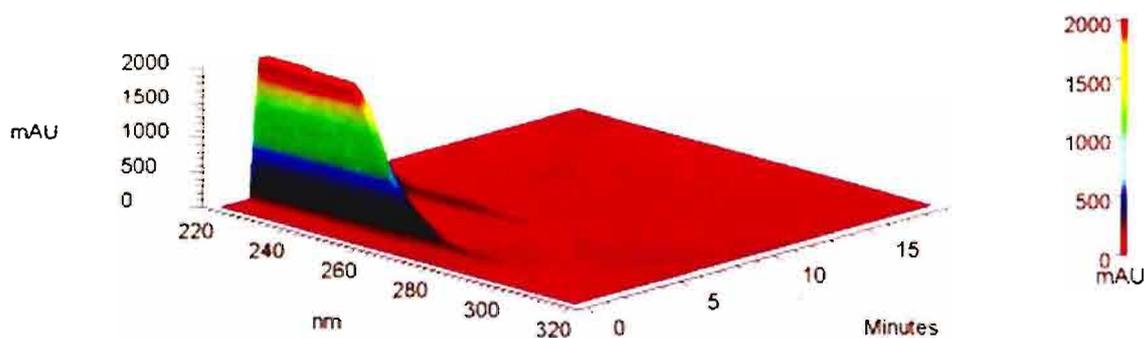


Figura 61: Varredura – Doxorubicina em tiosulfato de sódio, tempo 6 horas.

Os estudos de citotoxicidade para estas amostras demonstraram que não ocorreu a total inativação da doxorubicina. O tiosulfato não apresenta citotoxicidade quando

testado sozinho e houve redução do grau de reatividade nas amostras de 3 (moderado) para 2 (leve) após os ensaios.

Apesar de não ter havido degradação da doxorubicina na análise cromatográfica, o grau de reatividade da análise de citotoxicidade foi menor que o inicial. Isto pode dever-se ao tempo maior de contato do inativante com a doxorubicina em função das características do estudo de citotoxicidade in vitro.

A análise de paclitaxel é realizada em 227 nm, região em que o espectro exibe máximo de absorvância (conforme figuras 62 e 63).

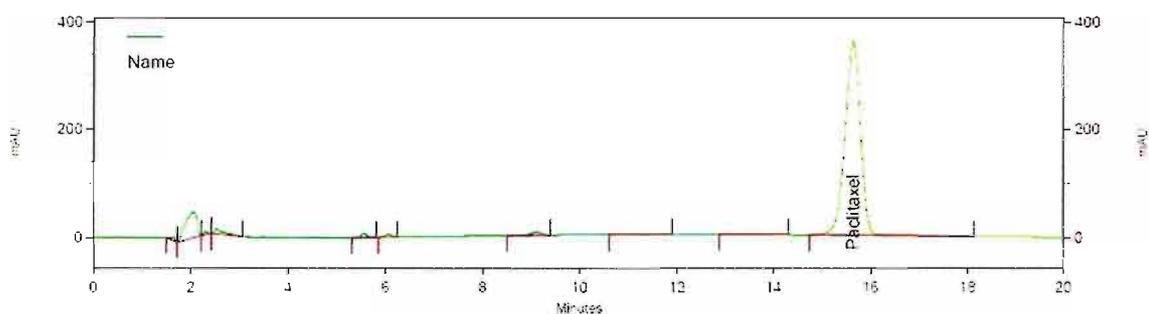


Figura 62: Cromatograma – Paclitaxel, Padrão 100%.

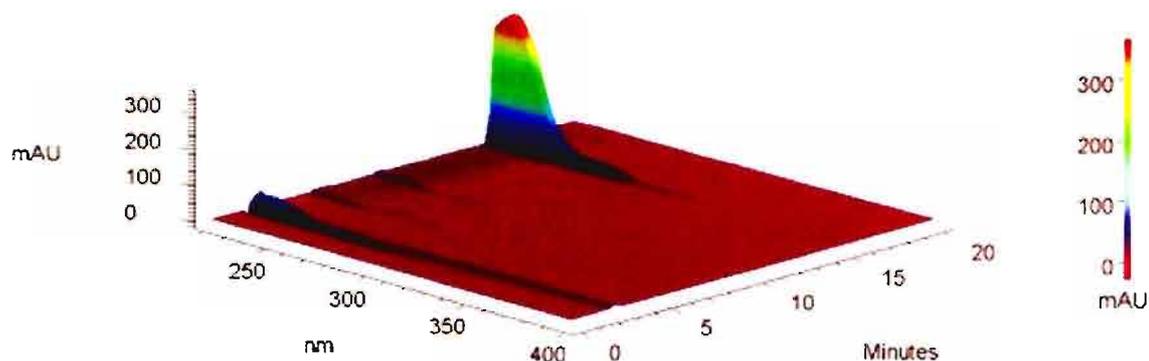


Figura 63: Varredura – Paclitaxel, Padrão 100%.

Da mesma forma, o cromatograma da amostra da solução injetável é similar ao do padrão, apresentando picos secundários nos mesmos tempos de retenção do padrão, conforme figuras 64 e 65.

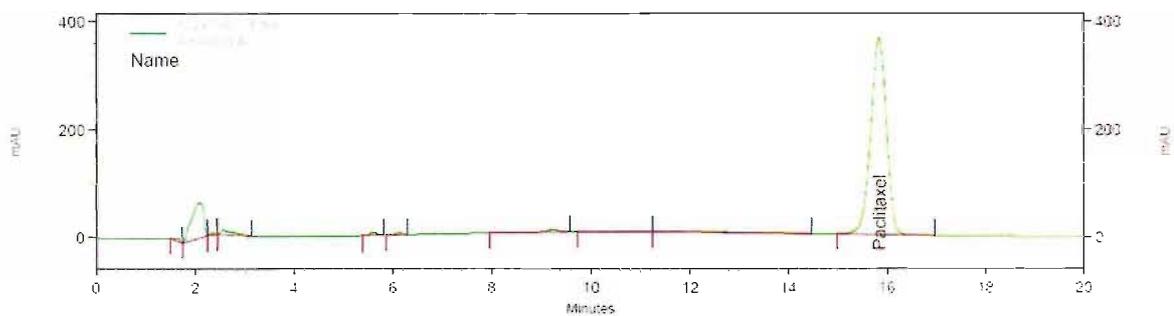


Figura 64: Cromatograma – Amostra de paclitaxel

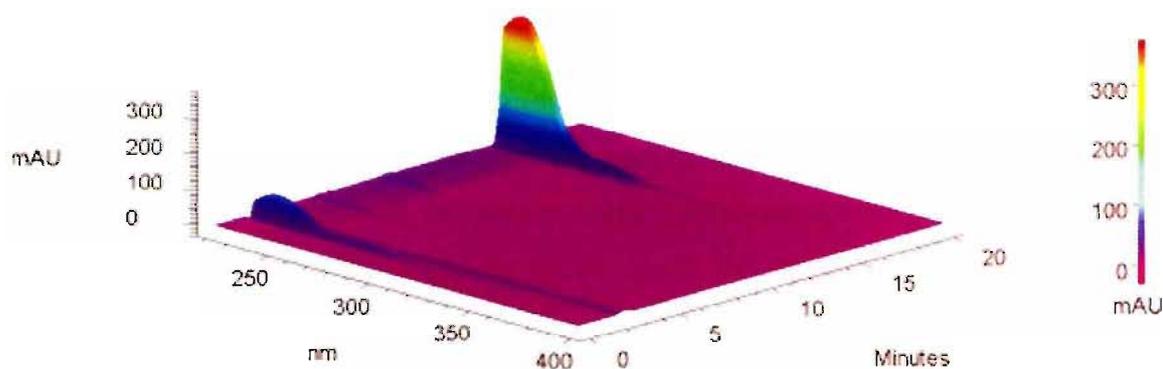


Figura 65: Varredura – Amostra de paclitaxel

Injetando-se somente o inativante aseptado diluído no diluente do método observamos que o mesmo possui absorvância em 227 nm, entretanto em tempo de retenção diferente da doxorrubicina, o que não causa interferência na detecção desta (conforme figuras 66 e 67).

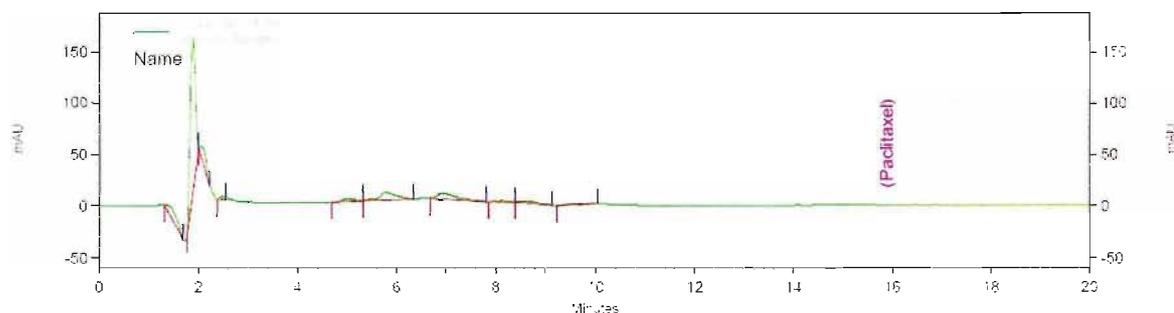


Figura 66: Cromatograma – Paclitaxel, Branco Aseptado.

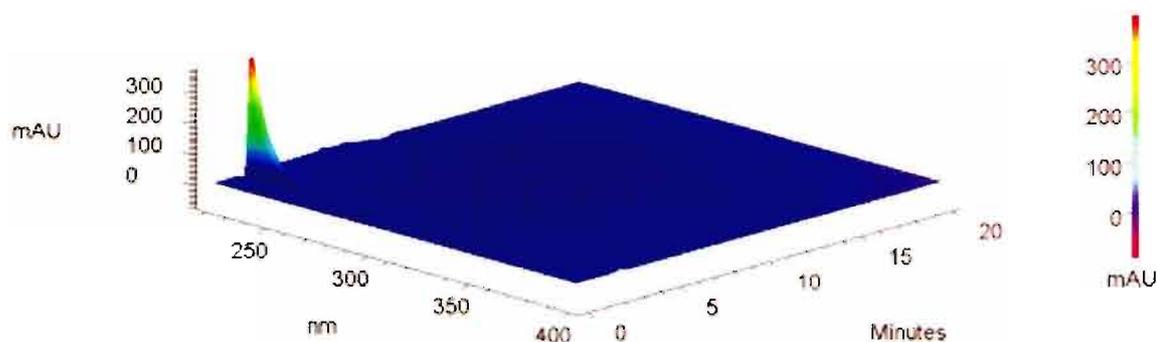


Figura 67: Varredura – Paclitaxel, Branco Aseptico.

O cromatograma da amostra em contato com o diluente no tempo zero (figura 68) já mostra uma redução na área do pico de paclitaxel com formação e incremento de picos secundários, resultante da reação entre o dicloroisocianurato de sódio (asepto) e o paclitaxel. Ocorre a formação de picos em outros comprimentos de onda (figura 69).

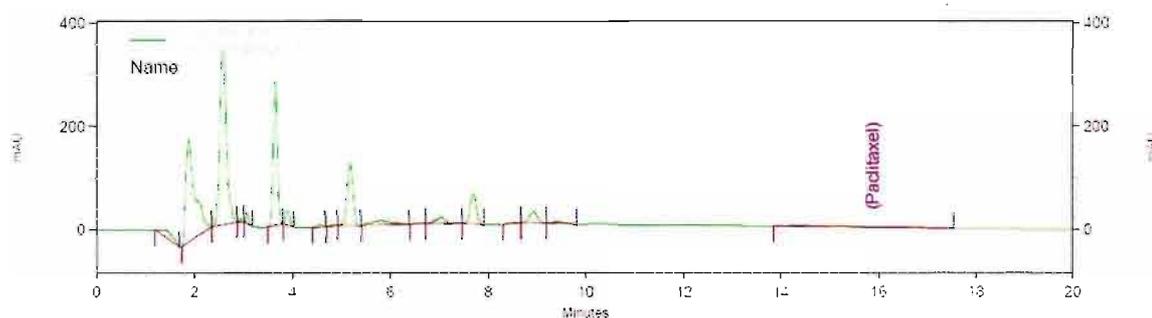


Figura 68: Cromatograma – Paclitaxel em asepto, tempo 0 hora.

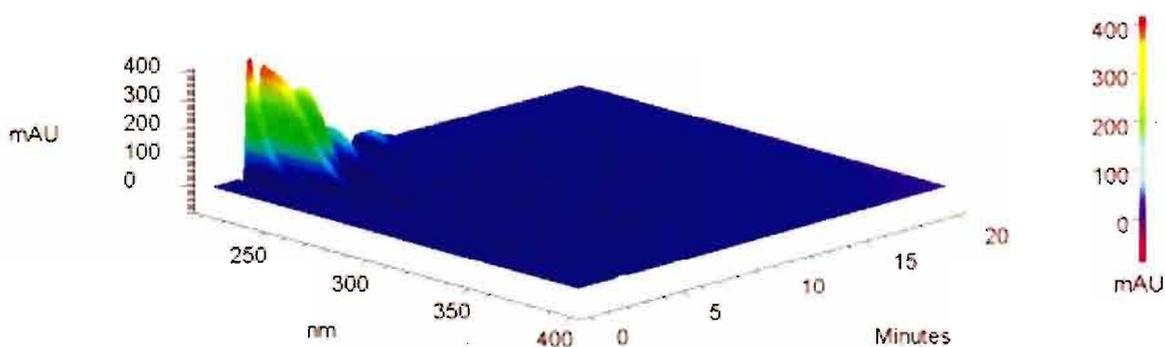


Figura 69: Varredura – Paclitaxel em asepto, tempo 0 hora.

Observa-se a continuação da reação nos tempos de 1 hora e 6 horas, tendo ocorrido degradação quase total do paclitaxel no período avaliado (conforme figuras 70 a 73).

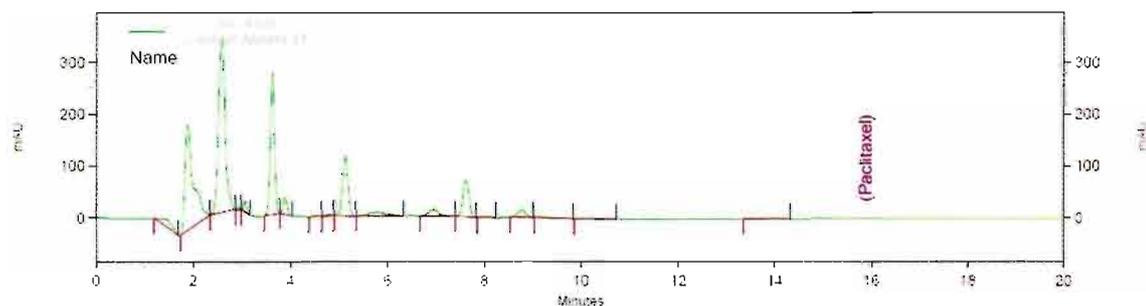


Figura 70: Cromatograma – Paclitaxel em asepto, tempo 1 hora.

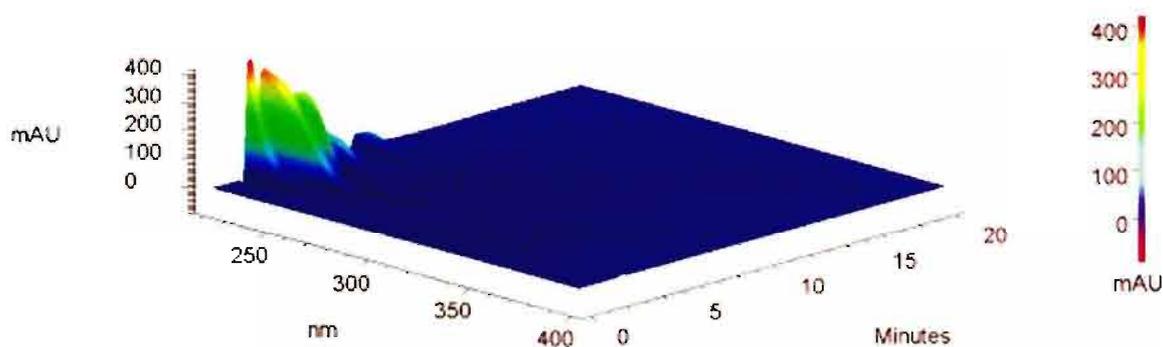


Figura 71: Varredura – Paclitaxel em asepto, tempo 1 hora.

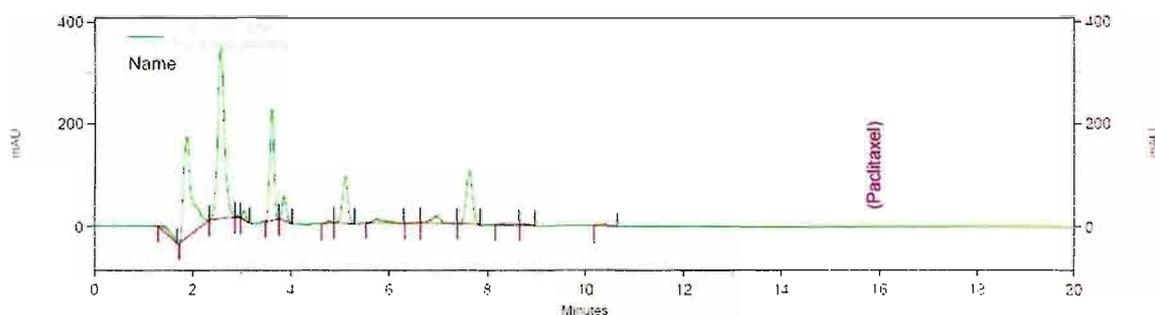


Figura 72: Cromatograma – Paclitaxel em asepto, tempo 6 horas.

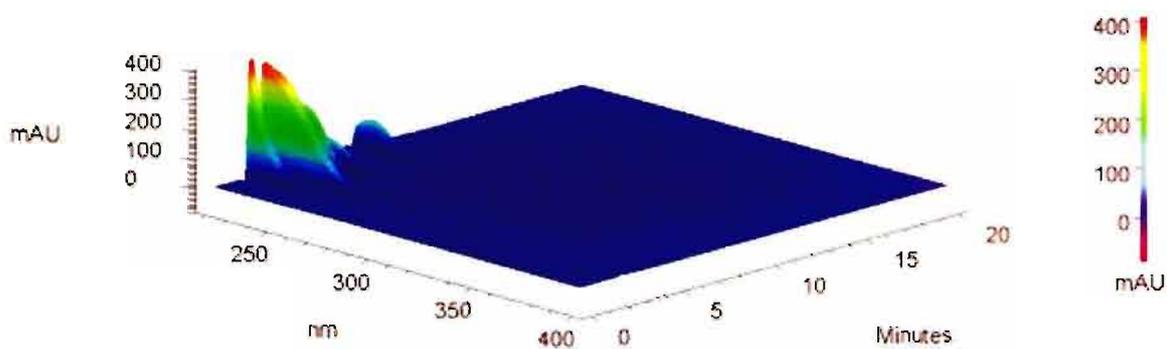


Figura 73: Varredura – Paclitaxel em asepto, tempo 6 horas.

Na avaliação da citotoxicidade *in vitro* para esta amostra, ocorreu a diminuição do grau de reatividade de 3 (moderado) para 2 (suave). O inativante produziu efeito de redução do grau de reatividade do paclitaxel, entretanto não inativou completamente a amostra.

Injetando-se somente o inativante hipoclorito de sódio diluído no diluente do método observamos que não há interferência do mesmo na região do cromatograma em que aparece o paclitaxel e o mesmo possui máxima de absorbância em torno de 240 nm (conforme figuras 74 e 75).

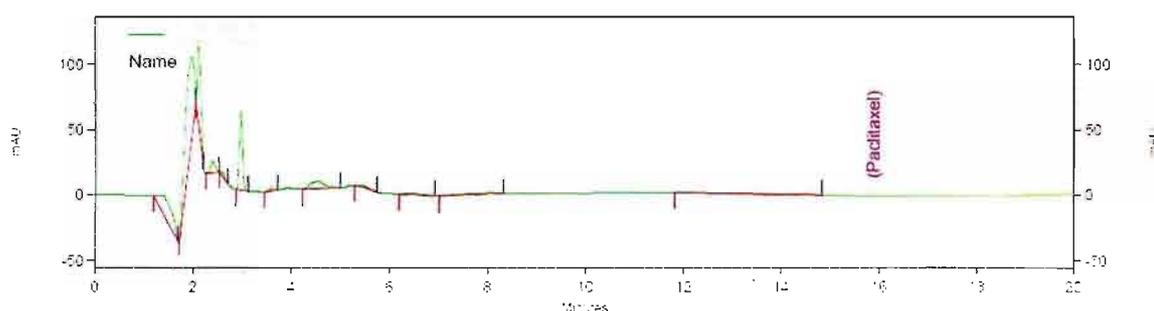


Figura 74: Cromatograma – Paclitaxel, Branco Hipoclorito de Sódio

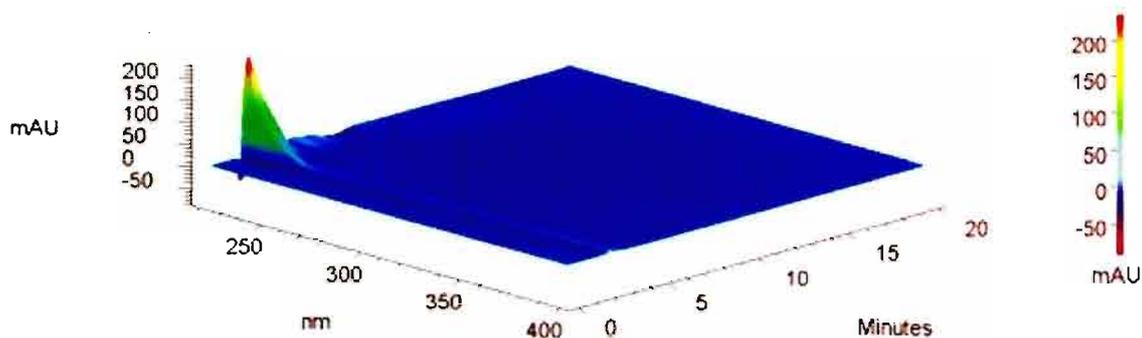


Figura 75: Varredura – Paclitaxel, Branco Hipoclorito de sódio.

A exposição do paclitaxel ao hipoclorito de sódio produz degradação imediata, com aumento da máxima de absorvância na região de 230 a 260 nm e formação de diversos picos secundários (figuras 76 e 77).

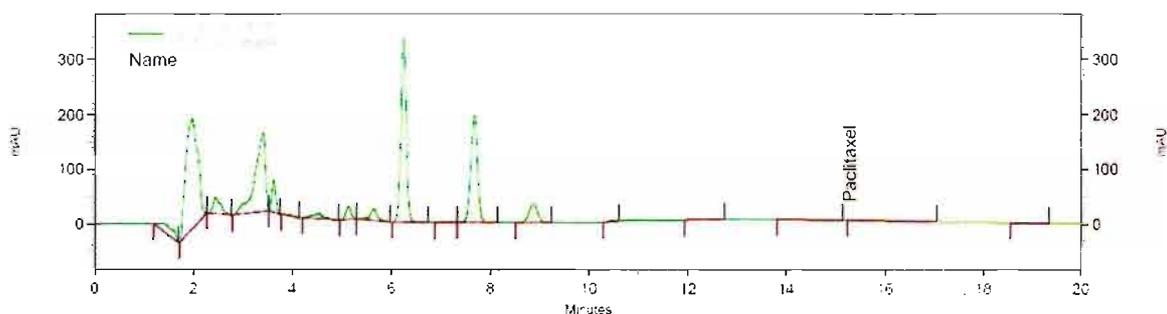


Figura 76: Cromatograma – Paclitaxel em hipoclorito de sódio, tempo 0 hora.

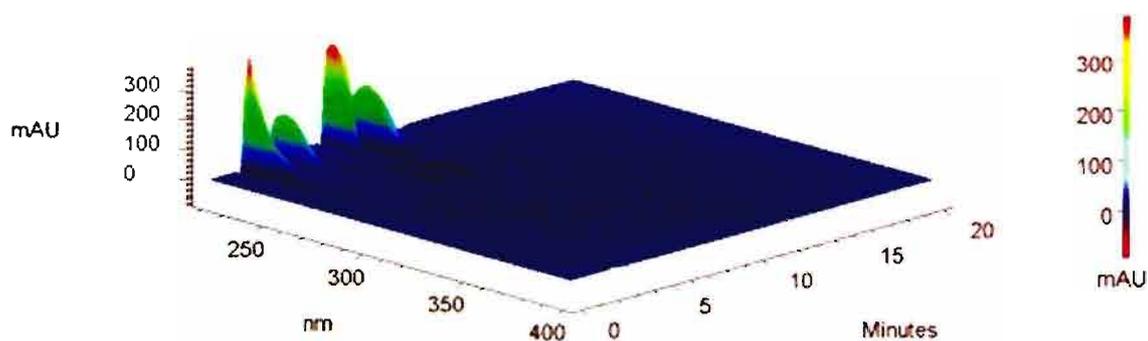


Figura 77: Varredura – Paclitaxel em hipoclorito de sódio, tempo 0 hora.

Não houve alteração do produto de degradação no período subsequente, apenas incremento da formação do degradado (1 hora e 6 horas), conforme figuras 78 a 81.

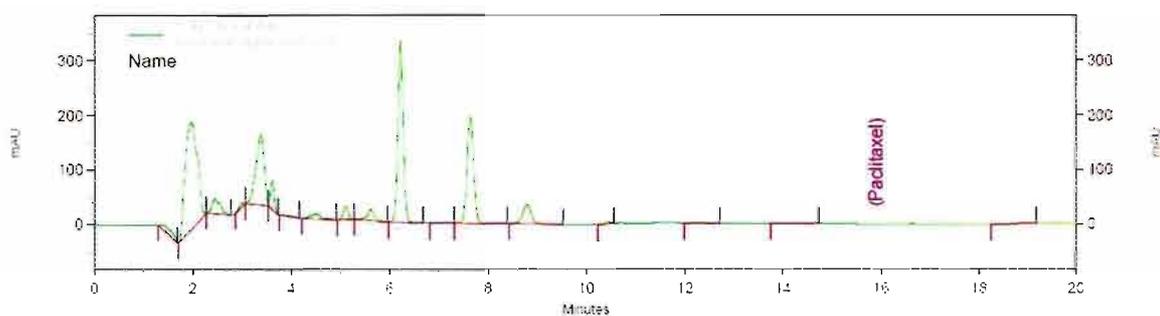


Figura 78: Cromatograma – Paclitaxel em hipoclorito de sódio, tempo 1 hora.

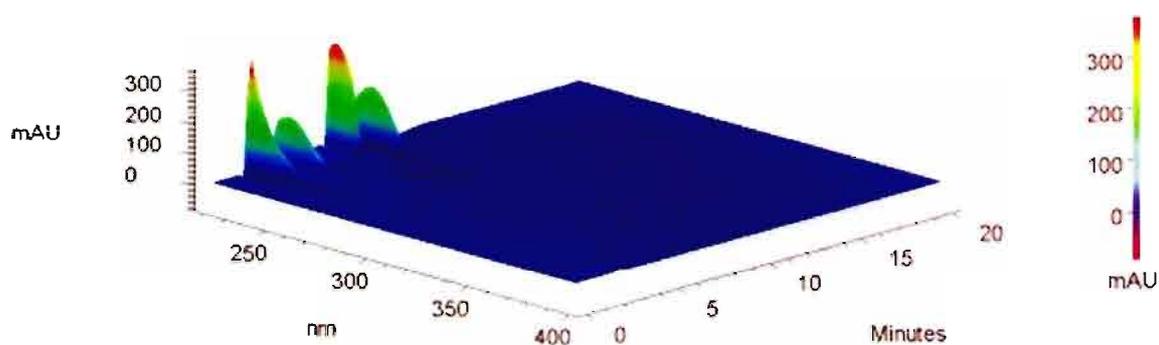


Figura 79: Varredura – Paclitaxel em hipoclorito de sódio, tempo 1 hora.

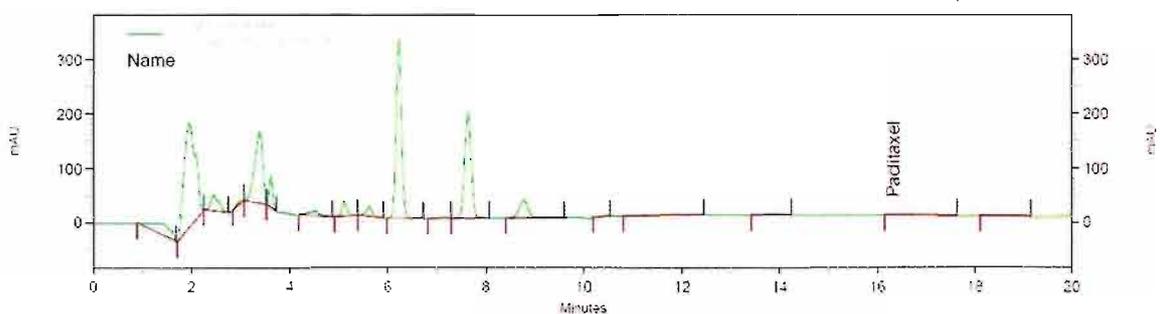


Figura 80: Cromatograma – Paclitaxel em hipoclorito de sódio, tempo 6 horas.

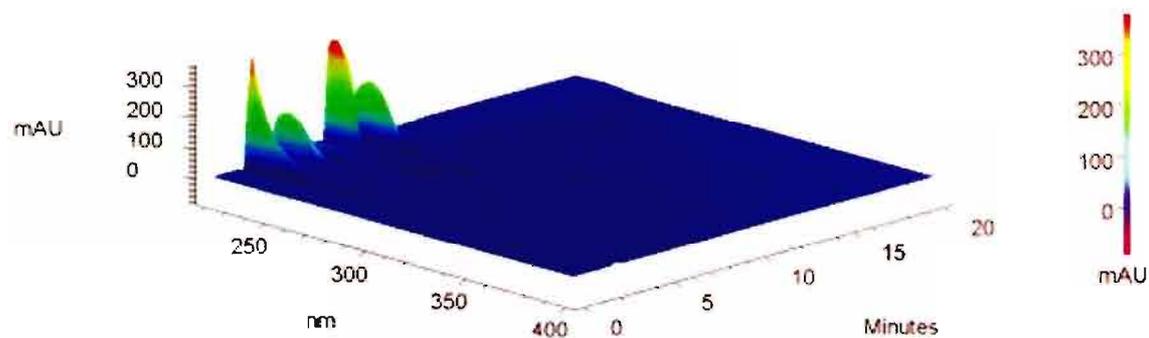


Figura 81: Varredura – Paclitaxel em hipoclorito de sódio, tempo 6 horas.

O ensaio de citotoxicidade do hipoclorito de sódio revelou que o mesmo apresenta características citotóxicas, tendo sido encontrado um grau de citotoxicidade moderado no ensaio do branco.

As amostras submetidas à inativação com hipoclorito de sódio apresentaram um grau de citotoxicidade moderado. Da mesma forma que em relação à cisplatina, tendo em vista que a análise cromatográfica demonstrou a total degradação do princípio ativo e o alto grau de citotoxicidade apresentado pelo reagente hipoclorito de sódio, pode-se inferir que a inativação do princípio ativo foi efetiva, observando-se um grau moderado de citotoxicidade na amostra testada em função da presença de resíduos de hipoclorito. Realizando-se o teste com uma concentração menor do inativante, obteve-se um grau de citotoxicidade menor ($IZ=2$), o que corrobora a inferência.

Neste caso é necessário também estudar a composição dos picos secundários e sua influência na manutenção do grau de reatividade do produto formado após a degradação.

Injetando-se somente o inativante tiosulfato de sódio diluído no diluente do método observamos que não há interferência do mesmo na região do cromatograma em que aparece o paclitaxel e o mesmo possui máxima de absorbância entre 220 e 300 nm (conforme figuras 82 e 83).

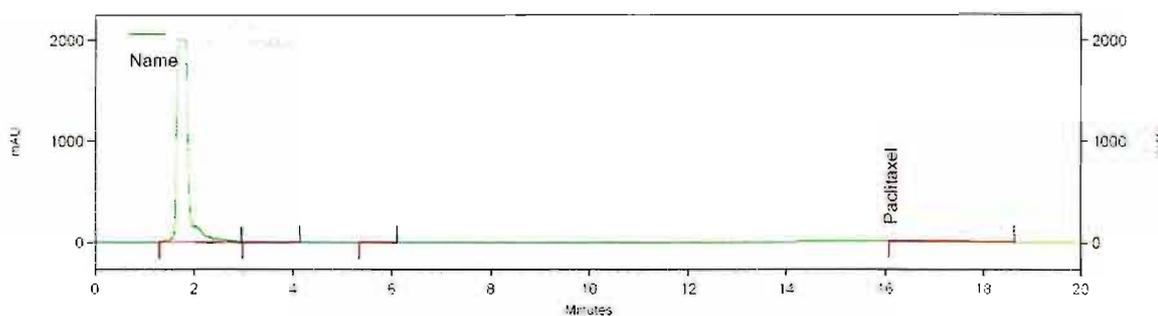


Figura 82: Cromatograma – Paclitaxel, Branco Tiosulfato de Sódio.

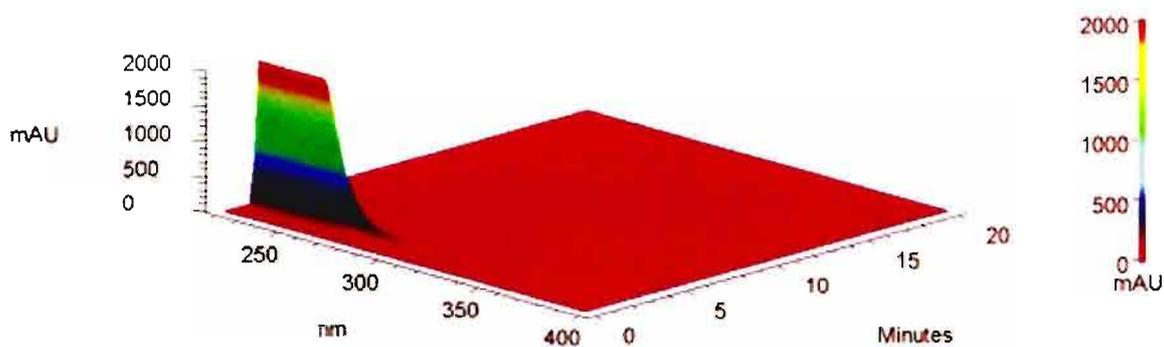


Figura 83: Varredura – Paclitaxel, Branco Tiosulfato de Sódio.

O cromatograma de paclitaxel em contato com o inativante tiosulfato de sódio mostra que não houve da degradação do paclitaxel, e nem o aparecimento de novos picos no mesmo comprimento de onda (227 nm) ou adjacentes, conforme observado nas figuras 84 e 85.

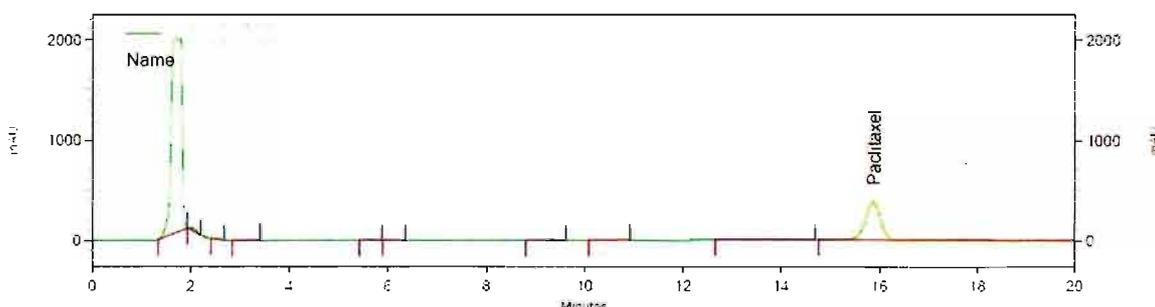


Figura 84: Cromatograma – Paclitaxel em tiosulfato de sódio, tempo 0 hora.

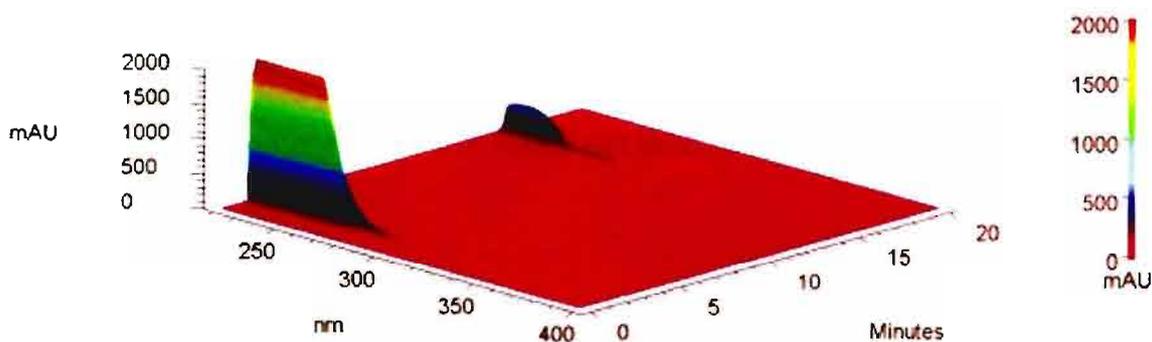


Figura 85: Varredura – Paclitaxel em tiosulfato de sódio, tempo 0 hora.

Não houve alteração na formação do produto de degradação no período subsequente (1 hora e 6 horas), conforme figuras 86 a 89.

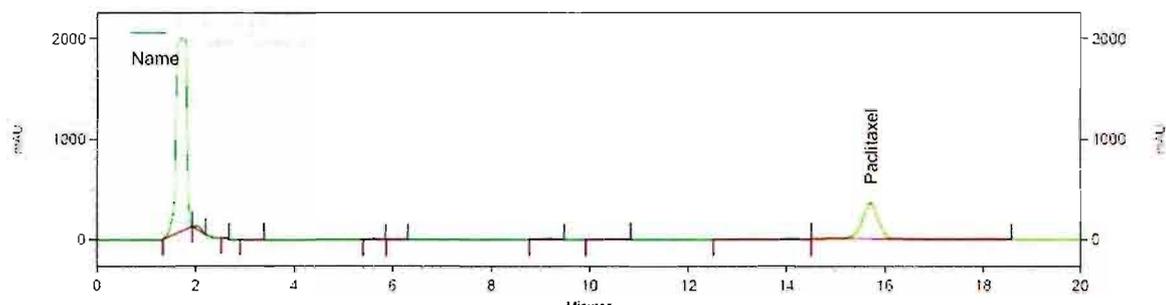


Figura 86: Cromatograma – Paclitaxel em tiosulfato de sódio, tempo 1 hora.

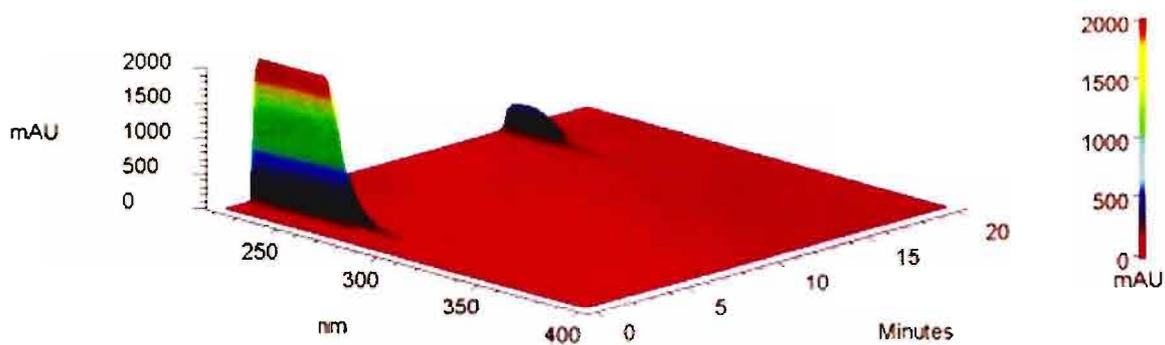


Figura 87: Varredura – Paclitaxel em tiosulfato de sódio, tempo 1 hora.

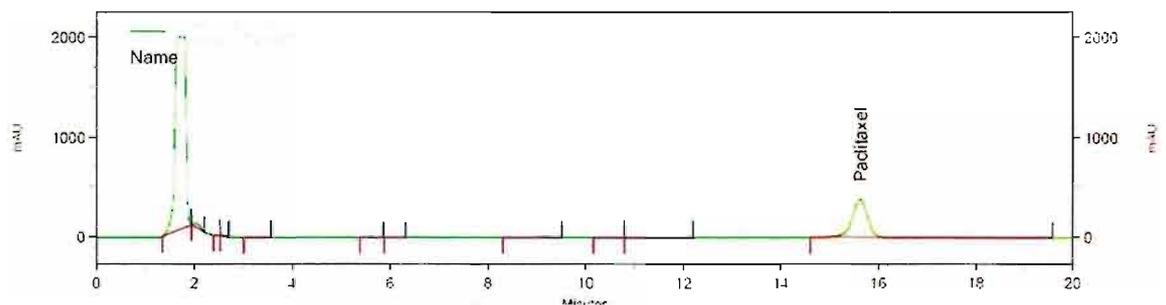


Figura 88: Cromatograma – Paclitaxel em tiosulfato de sódio, tempo 6 horas.

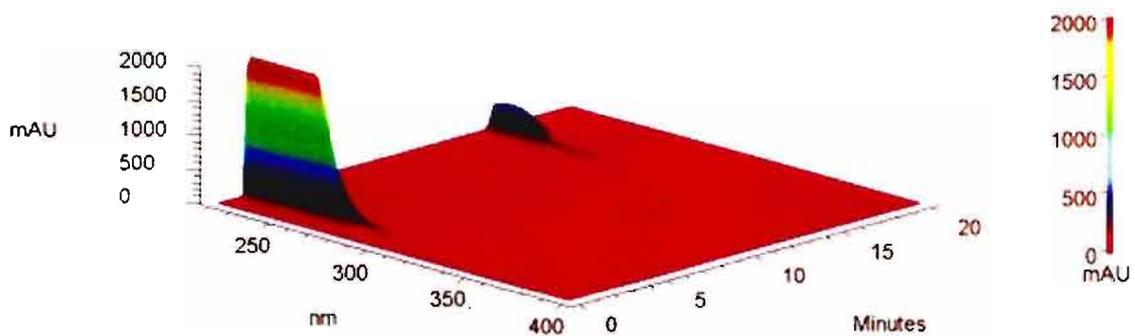


Figura 89: Varredura – Paclitaxel em tiosulfato de sódio, tempo 6 horas.

Os estudos de citotoxicidade para estas amostras demonstraram que não ocorreu a total inativação da doxorubicina. O tiosulfato não apresenta citotoxicidade quando testado sozinho e houve redução do grau de reatividade nas amostras de 3 (moderado) para 2 (leve) após os ensaios.

Apesar de não ter havido degradação do paclitaxel na análise cromatográfica, o grau de reatividade da análise de citotoxicidade foi menor que o inicial. Isto pode dever-se ao tempo maior de contato do inativante com o paclitaxel em função das características do estudo de citotoxicidade in vitro.

Além disso, no caso do paclitaxel foi testado também o diluente, por tratar-se de mistura de etanol com Cremophor EL, porém o mesmo não mostrou-se citotóxico nas concentrações estudadas.

7. Conclusão

Dos três inativantes estudados contra os três princípios ativos, o que se mostrou de aplicação mais ampla, sendo menos tóxico e atuando sobre os três princípios ativos foi o asepto 75, porém o seu uso deve ser monitorado com relação ao tempo de exposição para se obter uma inativação mais eficaz.

O hipoclorito de sódio, já amplamente utilizado para a inativação de produtos citotóxicos (Castegnaro et al., 1997, Barek et al., 1998) também mostrou-se eficiente para produzir degradação química dos ativos, entretanto não houve diminuição da citotoxicidade in vitro, sendo necessário aprofundar o estudo para avaliar se o grau de reatividade encontrado deveu-se aos produtos de degradação formados a partir da reação com o hipoclorito ou deveu-se à presença do próprio hipoclorito em contato com a cultura celular.

O uso do tiosulfato de sódio como pode ser indicado somente no caso da cisplatina, pois não houve degradação química nos estudos com doxorubicina e paclitaxel, e não foi possível estabelecer se a redução do grau de citotoxicidade nos ensaios in vitro deveu-se à ação do inativante.

8. Referências bibliográficas

AMERICAN SOCIETY FOR TESTING MATERIALS. Standard test method for agar diffusion cell culture screening for cytotoxicity: designation: F 895-84. Philadelphia: ASTM, 1995, p.276-279.

ARNOLD, R.; DUBOIS, J.; ABIKHALIL, F.; Libert, A.; GHANEM, G.; ATASSI, G.; HANOCQ, M.; LEJEUNE, F.J. Comparison of two cytotoxicity assays – tetrazolium derivative reduction (MTT) and tritiated thymidine uptake – on three malignant mouse cell lines using chemotherapeutic agents and investigational drugs. *Anticancer Res.* v.10, n.1, p.54-145, 1990.

AZEVEDO, J.C.; CRUZ, A.S.; PINTO, T.J.A. A proposal of an alternative in vitro method for the evaluation of the safety of shampoos. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, v.62, p.189-193, 2003.

BABICH, H.; BABICH, J.P. Sodium lauryl sulfate and triclosan: in vitro cytotoxicity studies with gingival cells. *Toxicol Lett.* v.91, p. 189-196, 1997.

BABICH, H.; BORENFREUND, E. Applications of the neutral red cytotoxicity assay to in vitro toxicology. *ATLA Altern. Lab. Anim.*, Nottingham, v.18, p.129-144, 1990.

BAGLEY, D.M.; GARDNER, J.R.; HOLLAND, G.; LEWIS, R.W.; REGNIER, J.F.; STRINGER, D.A.; WALKER, A.P. Skin irritation: reference chemicals data bank. *Toxicol In vitro.* v.10, p.1-6, 1996.

BALASUBRAMANIAN, S.V.; ALDERFER, J.L. Straubinger Solvente and concentration dependent molecular interactions of taxol (Paclitaxel). *J Pharm Sci.* v.83, p.1470-1476, 1994.

BAREK, J.; CVACKA, J.; ZIMA, J.; DE MÉO, M.; LAGET, M.; MICHELON, J.; CASTEGNARO, M. Chemical Degradation of Wastes of Antineoplastic Agent Amsacrine, Azathioprine, Asparaginase and Thiotepa. *Ann. Occup. Hyg.* v.42, n.4, p. 259-266, 1998.

BARRATT, M.D. QSARS for the eye irritation potential of neutral organic chemicals. *Toxicol In Vitro.* v.11, p. 1-8, 1991.

BASSI, M. D.; MORETTON, J. Mutagenicity of antineoplastic Drug Residues Treated in Health Care Waste Autoclave. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* v.71, p.170-175, 2003.

BATES, C.J.; LEVENE, C.I. Growth and macromolecular synthesis in the 3T6 mouse fibroblast II. The role of serum. *J Cell Sci.* v.7, p.683-693, 1970.

BENVENUTO, J. A.; CONNOR, T. H.; MONTEITH, D. K.; LAIDLAW, J. L.; ADAMS, S. C.; MATNEY, T. S.; THEISS, J. C. Degradation and Inactivation of Antitumor Drugs. *Journal of Pharmaceutical Sciences.* v.82, n.10, p.988-991, 1993.

BLAGOSKLONNY, M.V.; FOJO, T. Molecular effects of Paclitaxel: Myths and reality (a critical review). *Int. J. Cancer.* v.83, p.151-156,1999.

BORENFREUD, E.; PUENER, J.A. A simple quantitative procedure using monolayer cultures for citotoxicity assays (HTD/NR-90). *J Tissue Cult Methods.* v.9, p.7-9, 1984.

BORENFREUND, E.; PUERNER, J.A. Toxicity determined in vitro by morphological alterations and neutral red absorption. *Toxicol. Lett., Amsterdam,* v.24, p.119-124, 1985. Apud: *Chem. Abstr., Columbus,* v.102, n.abstr. 180295f, 1985.

BRABEC, V.; KASPARKOVA, J. Modifications of DNA by platinum complexes Relation to resistance of tumors to platinum antitumor drugs. *Drugs Resist Updat* n.8. v.3, p.131-146,2005.

BRUCE, A.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER. *Molecular biology of the cell.* Fourth Edition. New York and London, Garland Science, c2002.

BUTLER, M. Animal cell cultures: recent achievements and perspectives in the production of biopharmaceuticals. *Appl Microbiol Biotechnol.* V.68, p.283-291, 2005.
CÂNCER relacionado ao trabalho: leucemia mielóide aguda – síndrome mielodisplásica decorrente da exposição ao benzeno. Editora do Ministério da Saúde, Brasília, 2006, p.48.

CASTEGNARO, M.; De MÉO, M.; LAGET, M.; MICHELON, J.; GARREN, L.; SPORTOUCH, M. H.; HANSEL, S. Chemical degradation of wastes of antineoplastic Agents 2: Six anthracyclines: idarubicin, doxorubicin, epirubicin, pirarubicin, aclarubicin, and daunorubicin. *International Archives of Occupational and Environmental Health.* v.70, n. 6, p.378-384,1997.

CHAMBERLAIN, M.; GAD, S.C.; GAUTHERON, P.; PRINSEN, M.K. Organotopic models for the assessment/prediction of ocular irritation. *Food Chem Toxicol.* v.35, p.23 -37, 1997.

CHAMBERLAIN, M.; PARISH, W.E. Hazard and risk based on in vitro test data. *Toxicol In vitro.* v.4, n.4/5, p.694-697, 1990.

CHANEY, S.G.; CAMPBELL, S.L.; TEMPLE, B.; BASSETT, E.; MUZIKANSKY, A.; LOEFFLER, J.S. The platinum-DNA adducts: from structure to function. *J Inorg Biochem.* n.98, v.10, p.1551-1559,2004.

CHIBA, K.; KAWAKAMI, K.; TOHYAMA, K. Simultaneous evaluation of cell viability by neutral red, MTT and crystal violet staining assays of the same cells. *Toxicol In vitro.* v.13, p.713-717, 1999.

COHEN, S.M.; LIPPARD, S.J. Cisplatin: from DNA damage to cancer chemotherapy. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol.* n.67, p.93-130, 2001.

CONNOR, T. H. Permeability of nitrile rubber, latex, polyurethane and neoprene gloves to 18 antineoplastic drugs. *Am. J. Health-Syst. Pharm.* v.56, p. 2450-2453, 1999.

CONNOR, T. H.; ANDERSON, R. W.; SESSINK, P. J. M.; BROADFIELD, L.; POWER, L. A. Surface contamination with antineoplastic agents in six cancer treatment center in Canada and the Unites States. *Am. J. Health-Syst. Pharm.* v.56, p.1427-1432,1999.

CONNOR, T. H.; SESSINK, P. J. M.; HARRISON, B. R.; PRETTY, J.R.; PETERS, B. G.; ALFARO, R. M.; BILO, A.; BECKMANN, G.; BING, M. R.; ANDERSON, L. M.; DECRISTOFORO, R. Surface contamination of chemotherapy drug vials and evaluation of new vial-cleaning techniques: Results of three studies. *Am. J. Health-Syst. Pharm.* V.62, 2005.

DE ANGELIS, I.; GIUNILEI, L.; STAMMATI, A.; ZAMPAGLIONI, F.; ZUCCO, F.; BARTOLINI, G.; SALVATORE, G. In vitro toxicity of some cosmetic ingredients. *Food Chem. Toxicol.* v.24, n.6/7, p.477-479, 1986.

DOERGER, J. U.; MEIER, J. R.; DOBBS, R. A.; JOHNSON R. D.; ANKLEY G. T. Toxicity reduction evaluation at a municipal wastewater treatment plant using mutagenicity as an endpoint. *Springer- Verlag.* v.22, n.4, 1992.

DOROSHOW, J.H. Anthracyclines and anthracenediones. In: Chabner BA, Longo DL, eds, *Cancer chemotherapy and biotherapy: principles and practice*, 3 rd ed. Lippincott Williams & Wilkins, p.500, 2001.

EAGLE, H. Nutrition needs of mammalian cells in tissue culture. *Science.* V.122, n.3168, p.501-504, 1995.

ERDTMANN, B.; MALUF S. W. Follow-up study of the genetic damage in lymphocytes of pharmacists and nurses handling antineoplastic drugs evaluated by cytokinesis-block micronuclei analysis and single cell gel electrophoresis assay. *Mutation Research.* V.471, p.21-27, 2007.

ESTIMATIVA 2008: Incidência de Câncer no Brasil. INCA, Rio de Janeiro, out. 2007, p.94.

FRESHNEY, R.I. *Culture of animal cells - A manual Of basic technique.* Third edition. Wiley-liss, New York 1994.

FRESHNEY, R.I. *Culture of animal cells: a manual of basic technique.* 2.ed. New York: Wiley-Liss, 1987. p.397.

FRESHNEY, R.I.; SHERRY, A.; HASSANZADH, M.; FRESHNEY,M,; CRILLY, P.; MORGAN, D. Control of cell proliferation in human by glucocorticoids. *Br J Cancer.* v.42, n.6, p. 857-866, 1980.

FUCIC, A.; JAZBEC, A.; MIJIC, A.; SESO-SIMIC, D.; TOMEK, R. Cytogenetic consequences after occupational exposure to antineoplastic drugs. *Mutation Research*. v.416, p.59-66, 1998.

FUERTES, M.A.; ALONSO, C.; PEREZ, J.M. Biochemical modulation of Cisplatin mechanisms of action: enhancement of antitumor activity and circumvention of drug resistance. *Chem Rev*. n.103, v.3, p.645-662, 2003.

GOULET, F.; POITRAS, A.; ROUABHIA, M.; GERMAIN, L.; AUGER, F.A. Stimulation of human keratinocyte proliferation through growth factor exchanges with dermal fibroblast in vitro. *Burns*. v.22, n.1, p.107-112, 1996.

HANAWALT, P.C. Controlling the efficiency of excision repair. *Mutat Res*. n.485, v.1, p.3-13, 2001.

HANSEL, S.; CASTEGNARO, M.; SPORTOUCH, M. H.; DE MÉO, M.; MILHAVET, J.C.; LAGET, M.; DUMÉNIL, G. Chemical degradation of wastes of antineoplastic agents: cyclophosphamide, ifosfamide and melphalan. *Int. Arch. Occup. Environ. Health*. v.69, p.109-114, 1997.

HARBELL, J.W.; KOONTZ, S.W.; LEWIS, R.W.; LOVELL, D.; ACOSTA, D. Cell cytotoxicity assays. *Food Chem Toxicol*. v.35, p.79-126, 1997.

HEYWANG, C.; CHAZALET, M.S.; MASSON, M.; BOLARD, J. Orientation of anthracyclines in lipid monolayers and planar asymmetrical bilayers: a surface-enhanced resonance Raman scattering study. *Biophysical Journal*, v.75, p.2368-2381, 1998.

HIROSE, J.; KONDO, F.; NAKADO, T.; KOBAYASHI, T.; HIRO, N.; ANDO, Y.; TAKENAKA, H.; SANO, K. Inactivation of antineoplastics in clinical wastewater by electrolysis. *Chemosphere*. v. 60, p.1018-1024, 2005.

HORWITZ, S.B. Mechanism of action of taxol. *Trends Pharmacol Sci*. v.13, p.134-136, 1992.

HORWITZ, S.B.; COHEN, D.; RAO, R.R.; SHEN, H.J.; YANG, C.P. Taxol: mechanisms of action and resistance. *J Natl Cancer Inst Monogr*. v.15, p.55-61, 1993.

HOWE, HL et al. Annual report to the nation on the status of cancer (1973 through 1998), featuring cancers with recent increasing trends. *J.Natl. Cancer Inst.*, v. 93, p.824-842, 2001.

HUNTER, W.J. Carcinogenic substances: *Encyclopedia of Occupational Health and Safety*. 3rd ed. Italy, p.401-404, 1989.

HUSOY, T.; SYVERSEN, T.; JENSSEN, J. Comparisons of four in vitro cytotoxicity tests: the MTT assay, NR assay, uridine incorporation and protein measurements. *Toxicol In vitro*. v.7, n.2, p.149-154, 1993.

INTERNATIONAL Programme on Chemical Safety. Laboratory Handling of Mutagenic and Carcinogenic Products. 1998, p.118.

ISRAEL, V.P.; GARCIA, A.G.; ROMAN, L.; MUDERPACH, L.; BURNETT, A.; JEFFERS, S.; MUGGIA, F.M.; Phase II Study of liposomal doxorubicin in advanced gynecologic cancers. *Gynecologic Oncology*, v.78, p.143-147, 2000.

KARTALOU, M.; ESSIGMANN, J.M. Mechanisms of resistance to cisplatin. *Mutat Res.* n.478, v.4, p.23-43, 2001.

KATSUTA, H.; TAKAOKA, T.; HOSAKA, S.; HIBINO, M. OTSUKI, I.; HATTORI, K.; SUZUKI, S.; MITAMURA. *K Jap J Exp Med.* v.29, p.438-441, 1977.

KEIZER, H. G.; PINEDO, H. M.; SCHUURHUIS, G. J.; JOENJE, H. Doxorubicin (Adriamycin): A critical review of free radical-dependent mechanisms of cytotoxicity. *Pharmac. Ther.* v. 47, p. 219-231, 1990.

KELLAND, L. The resurgence of platinum-based cancer chemotherapy. *Nature Publishing group.* v.7, p.573-584, 2007.

KIM, Y.; MCBRIDE, J.; CHANG,R.; ZHOU, X.; WONG, D.T. P12(CDK2-AP1) mediates DNA damage responses induced by cisplatin. *Oncogene.* n.24, v.3, p.407-418, 2005.

LEE, J.W.; LU, J. Y.; LOW, P.S.; FUCHS, P. L. Synthesis and Evaluation of Taxol-Folic Acid Conjugates as targeted antineoplastics. *Bioorganic & medicinal Chemistry*, v.10, p.2397-2414, 2002.

LIU, X.; CHEN, Z.; CHUAN, C.C.; MAY, S.; YOUNGBERG, G.A.; HANDY, R.; CHUAN, B.H. Melatonin as a effective protector against doxorubicin-induced cardiotoxicity. *Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol.*, v.283, p.254-263,2002.

LUNN, G.; SANSONE, E. B.; ANDREWS, A. W.; HELLWING, L. C. Degradation and disposal of some antineoplastic drugs. *Journal of Pharmaceutical Sciences.* V.78, n.8 p.652-659, 2006.

MALU, S.W.; ERDTMANN, B. Follow-up study of the genetic damage in lymphocytes of pharmacists and nurses handling antineoplastic drugs evaluated by cytokinesis-block micronucleic analysis and single cell gell electrophoresis assay. *Mutat. Res.* v.471, p.21-27, 2000.

MANDIC, A.; HANSSON, J.; LINDER,S.; SHOSHAN, M.C. Cisplatin induces endoplasmic reticulum stress and nucleus-independent apoptosis. *J Cell Biol.* n.278, v.11, p.9100-9106, 2003.

MANFREDI, J.J.; HORWITZ, S.B. Taxol: an antimitotic agent with a new mechanism of action. *Pharmacol Ther.* v. 25, p. 83-125,1984.

MARTINS, I.; DELLA ROSA, H. V. Considerações Toxicológicas da Exposição Ocupacional aos Fármacos Antineoplásicos. *Rev. Bras. Med. Trab.* v. 2, n. 2, p. 118-125, 2004.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods.* v.65, p.55-63, 1983.

PAPOULI, E.; CEJKA, P.; JIRICNY, J. Dependence of the cytotoxicity of DNA-damaging agents on the mismatch repair status of human cells. *Cancer Res.* n.64, v.10, p.3391-3394, 2004.

PELCZAR, M.J.; CHAN, E.C.; KRIEG, N.R. *Microbiologia: conceitos e*
PERES, C.M.; CURI, R. *Como cultivar células.* Guanabara, Koogan, Rio de Janeiro, 2005.

PINTO, T. J. A.; AZEVEDO, J. C. de; CRUZ, A.S. Comparative study of epithelial and fibroblastic cell lines as an alternative cytotoxicity test to the Draize method. *J.AOAC Int.*, v.83, n.3, p.665-668, 2000.

PIZZOFERRATO, A.; CIAPETTI, G.; STEA, S.; CENNI, E.; ARCIOLA, C. R.; GRANCHI, D.; SAVARINO, L. Cell culture methods for testing biocompatibility. *Clin Mater.* v. 15, p. 175-190, 1994.

RIBEIRO, F.S.N.; WÜNSCH FILHO, V. Avaliação retrospectiva da exposição ocupacional a cancerígenos: abordagem epidemiológica e aplicada em vigilância em saúde. *Cad. Saúde Pública*, v.20, n.4, p. 881-890, 2004.

RIDDELL, R.J.; CLOTHIER, R.H.; BALLS, M. An evaluation of three in vitro cytotoxicity assays. *Food Chem Toxicol.* v.24, n.6/7, p.469-471, 1986.

RIZZO, E.; TUCHIYA, H.N.; MARTINEZ, C.H. *Técnicas básicas de cultura celular.* 4.ed. São Paulo: Instituto Butantan, 1983. 123p.

ROBERTS, S.; KHAMMO, N.; MCDONELL, G.; SEWELL, G.J. Studies on the decontamination of surfaces exposed to cytotoxic drugs in chemotherapy workstation. *Journal of Oncology Pharmacy Practice.* v.12, n. 2, p.95-104, 2006.

ROGERO, S. O.; LUGÃO, A. B.; IKEDA, T. I.; CRUZ A. S. Teste in vitro de Citotoxicidade: Estudo Comparativo entre Duas Metodologias. *Materials Research*, v.6, n. 3, p.317-320, 2003.

ROWINSKY, E.K.; BURKE, P.J.; KARP, K.E.; TUCKER, R.W.; ETTINGER, D.S.; DANEHOWER, R.C. Phase I and pharmacodynamic study of taxol in refractory acute leukemias. *Cancer res.* v.342, p.1428, 1993.

ROWINSKY, E.K.; CAZENAVE L.A.; DONEHOVER R.C.; Taxol: a novel investigational antimicrotubule agent. *J Natl Cancer Inst.*, v.82, p.1247 -1259, 1990.

SCHIFF, P.B.; HORWITZ, S.B. Taxol stabilizes microtubules in mouse fibroblast cells. *Proc Natl Acad Sci USA.* v. 77, p. 1561-1565, 1980.

SEDLITSKA, Y.; GIRAUD-PANIS, J.M.; MALINGE, J.M. Cisplatin is a DNA-damaging antitumor compound triggering multifactor biochemical responses in cancer cells: importance of apoptotic pathways. *Curr Med Chem Anti-Canc Agents*. n.5, v.3, p. 251-265, 2005.

SHARMA, U.S. BALASUBRAMANIAN, S.V.; STRAUBIGER, R.M. Pharmaceutical and physical properties of paclitaxel (Taxol) complexes with cyclodextrins. *J Pharm Sci*. v.84, p.1223-1230, 1995.

SHIMIZU, S.; KATAYAMA, K.; MATSUKAWA, H.; GOTOH, H.; MATSUMOTO, A.; YOKOYAMA, H. SUDA, T.; ARITA, M.; JOJIMA, T. Clinical evaluation of adriamycin ointment in advanced or local recurrent breast cancer. *Gan to Kagaku Ryoho*, v.13, p. 590-592, 1986.

STEWART, D. J. Mechanisms of resistance to cisplatin and carboplatin. *Critical Reviews in Oncology/ Hematology*. v.63, p.12-31, 2007.

UNITED States pharmacopeia. 22.ed. Rockville: United States Pharmacopeial Convention, 1990. p. 1495 –1497.

UNITED States pharmacopeia. 23.ed. Rockville: United States Pharmacopeial Convention, 1995. p. 1697 –1699.

UNITED States pharmacopeia. 24.ed. Rockville: United States Pharmacopeial Convention, 1999. p. 1831 –1832.

UNITED States pharmacopeia. 25.ed. Rockville: United States Pharmacopeial Convention, 2002. p. 1893 –1895.

UNITED States pharmacopeia. 28.ed. Rockville: United States Pharmacopeial Convention, 2005. p. 1697 –1703.

UNITED States pharmacopeia. 30.ed. Rockville: United States Pharmacopeial Convention, 2007.

WORLD Health Organization. Safe management of wastes from health-care activities. Geneva, 1999, p.240.

ZAGO, A.; PEREIRA, L. A. A.; BRAGA, A. L. F.; BOUSQUAT, A. Mortalidade por câncer de mama em mulheres na Baixada Santista, 1980 a 1999. *Rev. Saúde Pública*, v.39, p.641-645, 2005.