

Raphael Nunes Leles¹
Caroline Rego Rodrigues¹
Fernando Gomes Ferreira Oliveira²
César Bariani¹
Andryne Rego Rodrigues¹
Luiz Carlos da Cunha¹

¹Núcleo de Estudos e Pesquisas Tóxico-Farmacológicas (NEPET-UFG) / Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Goiás;

²Associação de Combate ao Câncer de Goiás (ACCG) / Hospital Araújo Jorge, Goiânia.

*rodrigues.caroline.r@gmail.com



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE GOIÁS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
Endereço: BR-153 – Quadra Área
75.132-903 – Anápolis – revista.prp@ueg.br

GERÊNCIA DE PESQUISA

Coordenação de Projetos e Publicações

Artigo original

Recebido em: 21/12/2016

Avaliado em: 15/02/2017

Publicado em: 21/04/2017

VALIDAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO PARA MONITORAMENTO TERAPÊUTICO DE METOTREXATO EM PACIENTES PORTADORES DE LEUCEMIA LINFOBLÁSTICA AGUDA

RESUMO

O metotrexato (MTX) é um fármaco de elevada toxicidade utilizado no tratamento de neoplasias. Este estudo objetivou desenvolver uma técnica analítica em cromatografia líquida de alta eficiência por arranjo de fotodiodos (CLAE-PDA) para dosagem do MTX em plasma, e monitorar seus níveis em pacientes. As seguintes condições cromatográficas foram definidas: coluna C18 (100 mm x 4,6 mm), fase móvel ácido acético:metanol:acetonitrila com gradiente de concentração, fluxo 1,5 mL/min. Padrão interno: teofilina (10 µg/mL) monitorada a 271 nm. O MTX foi monitorado a 304 nm. Como resultados, obteve-se precisão $6,5 \pm 5,3$ %; exatidão $96,2 \pm 7,9$ % e recuperação $70,7 \pm 10,8$ %. Estabilidade de longa duração CV % = 1,45 e 2,65, para 3 e 15 µg/mL, respectivamente. O método demonstrou ser específico e seletivo. Das 42 amostras analisadas de 7 pacientes, obteve-se que os valores médios dos parâmetros cinéticos foram: $K_{el} = 0,2586 \pm 0,036$ h⁻¹; $t_{(1/2)\beta} = 2,73 \pm 0,409$ h; $V_d = 12,575 \pm 8,091$ L e $CL_T = 3,038 \pm 1,485$ L/h. A técnica analítica mostrou-se eficaz para a detecção e quantificação do fármaco e observou-se grande variabilidade nos parâmetros farmacocinéticos, o que comprova a necessidade da realização do monitoramento terapêutico.

Palavras-chave: Leucemia, Monitoramento terapêutico, Metotrexato, CLAE, Farmacocinética.

Abstract

Methotrexate (MTX) is a highly toxic drug with application in the treatment of neoplasms. This study aimed to develop a High Performance Liquid Chromatography Photodiode Array analytical technique (HPLC-PDA) for the measure of MTX in plasma, and its monitoring in patients. The following chromatographic conditions were set: C18 column (100 mm x 4.6 mm), mobile phase acetic acid:methanol:acetonitrile with gradient, flow 1.5 mL/min. Internal standard, theophylline (10 µg/mL) monitored at 271 nm. MTX was monitored at 304 nm. As a result, a calibration curve with precision 6.5 ± 5.3 %, accuracy 96.2 ± 7.9 % and recuperation 70.7 ± 10.8 % were obtained. Long stability CV = 1.45 % and 2.65 to 3 and 15 µg/mL, respectively. The method showed specificity and selectivity. From 42 samples from 7 patients, it was found that the mean values of the kinetic parameters of MTX were $K_{el} = 0.2586 \pm 0.036$ h⁻¹, $t_{(1/2)\beta} = 2.73 \pm 0.409$ h $V_d = 12.575 \pm 8.091$ L, $CL_T = 3.038 \pm 1.485$ L/h. The developed analytical technique was effective for the detection and quantification of the drug and it was found high variability in pharmacokinetic parameters, which increases the need to perform therapeutic monitoring.

Keywords: Leukemia, Therapeutic Monitoring, Methotrexate, HPLC-UV, Pharmacokinetics.

INTRODUÇÃO

A leucemia linfóide aguda (LLA) é o tipo mais comum de câncer infantil, e representa aproximadamente um terço do número total de neoplasias infantis (ELMAN; SILVA, 2007; NEHMY et al., 2011; OLIVEIRA; DINIZ; VIANA, 2004; PEDROSA; LINS, 2002). O metotrexato (MTX) é um dos fármacos utilizados na terapia devido ao seu baixo índice terapêutico, mas deve ter administração e acompanhamento criteriosos, necessitando de avaliação tanto da eficácia, quanto da tolerância (STANCZYK et al., 2012; DeRYCKERE et al., 2016).

Os pacientes que utilizam MTX raramente fazem doseamento plasmático do mesmo. Desta forma, o perfil de concentrações plasmáticas do fármaco é desconhecido, sendo que quaisquer ajustes de doses são realizados empiricamente, com base na experiência clínica e em protocolos pré-estabelecidos, desconsiderando as variações interindividuais. Entre outras situações nas quais o monitoramento terapêutico desempenha importância destacam-se: a identificação prévia de pacientes que apresentam risco de desenvolverem toxicidade, em especial nas terapias de altas dosagens; avaliação da baixa biodisponibilidade; identificação de falha terapêutica e aderência do paciente ao tratamento farmacológico prescrito (HALLWORTH; CAPP, 1993).

Quando há risco de toxicidade pelo MTX, administra-se ácido fólico (Leucovorin®), um ácido fraco de alta solubilidade que promove a recuperação, ou “resgate” da atividade celular, resultando na restauração de folatos reduzidos para a síntese de DNA (HALLWORTH; CAPP, 1993; SCHUMACHER, 1995). A administração deve ocorrer dentro de um período de até 36 h, pois após 42-44 h, o ácido fólico não mais reverte a citotoxicidade do MTX e de outros antagonistas do ácido fólico, sendo que o “resgate” deve continuar até que a concentração de MTX esteja abaixo dos níveis citotóxicos (menor que 5×10^{-8} mol/L) (HALLWORTH; CAPP, 1993; SCHUMACHER, 1995).

Dessa forma, torna-se necessário desenvolver um método bioanalítico simples e rápido que facilite a monitoração terapêutica do MTX em pacientes diminuindo o risco de toxicidade (STANCZYK et al., 2012).

O objetivo deste estudo consiste no desenvolvimento e validação de método analítico por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a detector de arranjo de diodos (PDA) para monitoramento terapêutico do MTX em crianças diagnosticadas com LLA, além do

estabelecimento dos parâmetros farmacocinéticos deste fármaco em plasma, visando o acompanhamento dos pacientes sob tratamento.

MATERIAL E MÉTODOS

Preparo das Soluções

Solução padrão inicial: metotrexato 1,0 mg/mL (Sigma-Aldrich®) em água ultrapura (Waters Millipore Simplicity 185®). Padrão interno: teofilina 47,0 µg/mL (Sigma-Aldrich®) em metanol 50% (Tedia®).

Condições Cromatográficas

Sistema CLAE Shimadzu modelo LC-20A Prominence®. Coluna cromatográfica: RP 18 5 µm (100 x 4,6 mm) Chromolith Performance®. Tempo de corrida: 13 minutos. Fase Móvel: ácido acético 0,1% em água ultrapura pH 3,0 / metanol / acetonitrila (Tedia®). Gradiente de concentração: 0 a 4 minutos - ácido acético 0,1%, metanol e acetonitrila (90:8:2); 4 a 10 minutos - ácido acético 0,1% e acetonitrila (90:10) e de 10 a 13 minutos - ácido acético 0,1%, metanol e acetonitrila (90:8:2). Fluxo: 1,5 mL/min. Temperatura da coluna: 23 °C. Volume de injeção: 20 µL. Detector: PDA em 304 nm (MTX) e 271 nm (teofilina).

Curva de calibração

Soluções de MTX padrão primário em 6 pontos de concentrações 0,1; 0,5; 2,5; 5,0; 10,0 e 20,0 µg/mL adicionadas a plasma humano branco e a padrão interno (10 µg/mL). Três soluções de concentrações 3, 8 e 15 µg/mL correspondentes aos controles de qualidade baixo, médio e alto respectivamente.

Foi também preparada uma solução com plasma humano livre de fármacos adicionado ao padrão interno (amostra branco = sem MTX).

Validação de Método Cromatográfico

Foram adotados os critérios precisão, exatidão, linearidade, limite de detecção e limite de quantificação, especificidade, reprodutibilidade, estabilidade e recuperação dentro dos limites de variação previstos (BRASIL, 2012).

Para a análise de seletividade/especificidade da técnica analítica foram adicionados ao plasma em concentração final 10 µg/mL: ácido fólico (Eurofarma®), 6-mercaptopurina (GlaxoSmithKline®), dipirona (Eurofarma®), cafeína (Farmacia Artesanal®), ondansetrona (Laboratório Biosintética®), dimenidrato (Altana Pharma®) e furosemida (Medley®); fármacos prescritos aos pacientes aos quais o método foi aplicado.

A recuperação foi obtida da seguinte forma:

Foram preparadas soluções de MTX em concentração conhecida (controle alto, médio e baixo) (não foram submetidas à extração pois não foram adicionadas ao plasma).

Foram também preparadas amostras de plasma contaminadas com as mesmas soluções de concentração conhecida e submetidas ao método de extração (amostra simulada).

As soluções de MTX foram comparadas com as amostras simuladas.

Também foram comparadas soluções contendo teofilina (47 µg/mL) e amostras de plasma contaminadas com a mesma solução de teofilina e submetidas ao método de extração.

O limite inferior de quantificação (LIQ) deve apresentar uma relação de no mínimo 5:1 em relação ao ruído da linha de base, além de ser identificável e quantificável, com precisão de até 20% e exatidão de 80 a 120%.

Para determinação da precisão e da exatidão foram analisados 3 lotes de amostras recém extraídas de plasma branco, contendo apenas padrão interno e curva de calibração contendo 6 pontos, além de 5 amostras contendo controle alto, médio e baixo.

No momento em que foi feita a primeira coleta de plasma, foi feito também o congelamento de um lote de plasma branco, contendo os 6 pontos da curva de calibração, juntamente com 5 amostras contendo controle alto e baixo. Ao término de todas as análises de amostras de pacientes, as amostras para estabilidade de longa duração foram descongeladas, analisadas e comparadas com amostras recém-preparadas de curva de calibração e controles alto e baixo.

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

Adequação da Coluna Cromatográfica

Foram estimados os valores dos parâmetros número de pratos teóricos (N) e Resolução (R) e o desvio padrão relativo (DPR) entre as injeções.

Pacientes

Participaram do estudo 7 pacientes com idade entre 2 e 12 anos, internados na Ala Pediátrica do Hospital Araújo Jorge, Associação de Combate ao Câncer em Goiás (ACCG), no município de Goiânia/GO, os quais apresentaram diagnóstico estabelecido de leucemia linfoblástica aguda (LLA), e estavam recebendo tratamento com protocolo quimioterápico contendo MTX, em esquema de dose única de 2 g/m² de superfície corporal, sendo 10% da dose administrada por via intratecal e 90 % administrada por via endovenosa, resultando em tempo total de infusão de 6 h, seguindo protocolo adotado pelo Serviço de Pediatria do Hospital.

Os pacientes apresentaram funções hepática e renal normais durante o período de coleta. Os responsáveis pelos pacientes foram instruídos a respeito da pesquisa e assinaram um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, elaborado para esse estudo e aprovado pelo Comitê de Ética da ACCG (nº 051/2006). A pesquisa foi conduzida de acordo com a Declaração de Helsinque revisada em 2008 (ASSOCIAÇÃO MÉDICO MUNDIAL, 1964).

Obtenção, processamento e conservação das amostras coletadas dos pacientes

As amostras de plasma foram obtidas a partir da coleta de sangue venoso por profissionais do corpo de enfermagem do Hospital com sistema de coleta de sangue a vácuo (BD-Vacutainer®), em tubos contendo EDTA (7,2 mg), cedidos pelo NEPET/UFG. Foram 6 coletas programadas de sangue, sendo a primeira coleta realizada momentos antes do início da infusão do MTX e a segunda assim que a infusão do medicamento chegou ao fim. Foram coletadas ainda amostras de plasma em 24, 48, 72 e 96 h após o início da infusão do medicamento. Todas as coletas foram realizadas em locais do corpo diferentes daquele onde havia sido feita a infusão com MTX. As amostras foram extraídas em cartuchos de extração em fase sólida (C-18) Oasis® Waters.

Estimativa dos parâmetros farmacocinéticos do MTX

Para a estimativa dos parâmetros farmacocinéticos do MTX, foi usado o modelo monocompartimental aberto. A Kel foi calculada a partir da linha de decaimento de concentração, em papel monolog, de acordo com a equação 1:

$$-kel = \frac{\ln C_1 - \ln C_2}{t_2 - t_1}$$

Kel = constante de eliminação; C_1 = concentração do MTX no plasma no tempo 1; C_2 = concentração do MTX no plasma no tempo 2; t_1 = tempo 1 e t_2 = tempo 2.

A área sob a curva de concentração versus tempo total (ASC_T) foi calculada de acordo com a equação 2:

$$ASC_T = ASC_{(0-10h)} + ASC_{(10-\infty)}$$

Foi calculado primeiro a área sob a curva de 0 a 10 h (ASC_{0-10h}) pelo método trapezoidal e posteriormente a curva foi extrapolada ao infinito ($ASC_{10-\infty}$).

A equação 3 foi utilizada para o cálculo de $t_{(1/2)}$:

$$t_{1/2} = \frac{0.693}{kel}$$

O $Cl_{T/F}$ foi calculado a partir da razão entre a dose e o valor de ASC_T de acordo com a equação 4:

$$Cl_{T/F} = \frac{Dose * F * S}{ASC_T}$$

F = biodisponibilidade (considerada = 1); S = fator sal (=1).

O Vd foi obtido a partir da razão entre $Cl_{T/F}$ e Kel de acordo com a equação 5:

$$Vd = \frac{Cl_{T/F}}{kel}$$

Esses dados foram obtidos após plotar os valores de concentração *versus* tempo de decaimento em escala semilogarítmica.

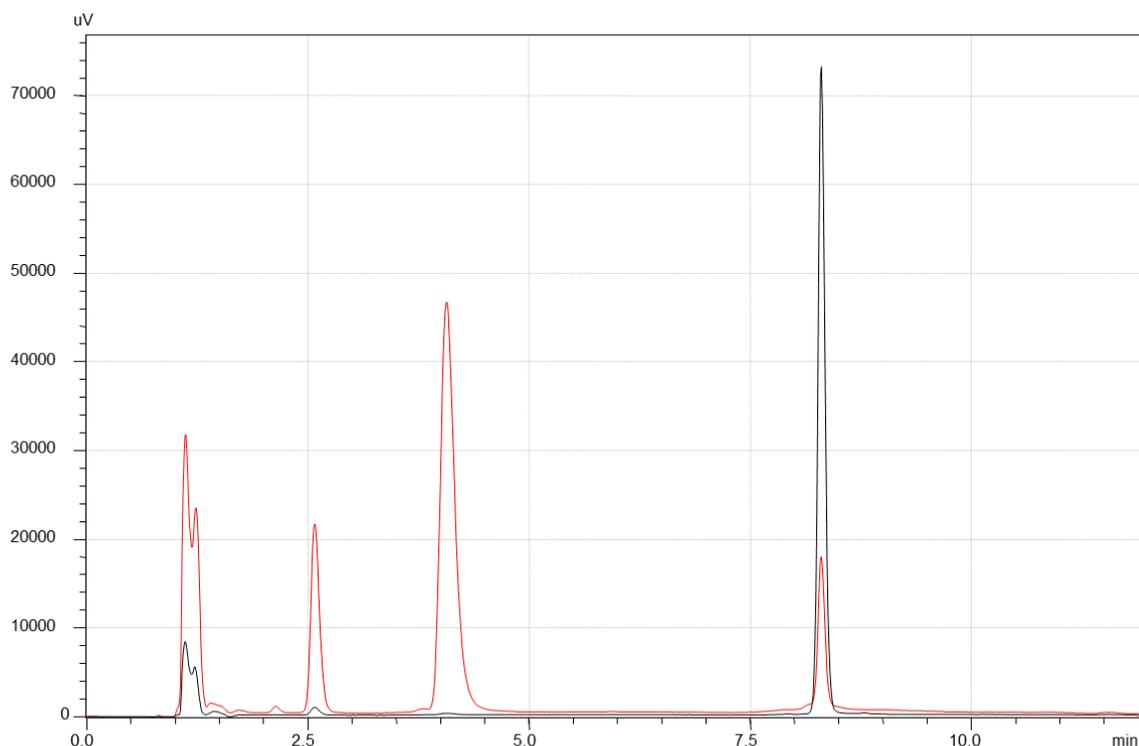
Análise estatística dos resultados

Foi usada estatística descritiva para a análise dos dados, sendo expressos na forma de média, desvio padrão e coeficiente de variação, utilizando software Microsoft Office Excel e software Origin® para a obtenção dos coeficientes de correlação da validação da metodologia bioanalítica.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A adequação do sistema foi avaliada durante a corrida cromatográfica de acordo com ReviewerGuidance, Validation of Chromatographic Methods (FDA, 1994). O método proposto apresentou resolução de 9,33 entre o analito e o padrão interno. A teofilina demonstrou absorção máxima em comprimento de onda 271 nm, enquanto o MTX apresentou absorção máxima no comprimento de onda de 304 nm, dado que corrobora outros trabalhos já publicados (KIFFMEYER; GOTTZE; JURSH, 1998; PALMISANO et al., 1989), conforme Figura 1.

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



Especificidade

Não foi possível detectar nenhum sinal analítico dos possíveis interferentes nos comprimentos de onda em que foram testados a teofilina e o MTX.

Recuperação

A recuperação absoluta para o MTX teve uma média total de 71% ($\pm 10,78$), valor estabelecido como alto (CHEN; CHIOU, 1982; RUBINO, 2001). A teofilina apresentou recuperação de 80% ($\pm 5,98$).

Limites Superior e Inferior de Quantificação

A concentração de 0,1 $\mu\text{g/mL}$ de analito em amostra de plasma humano foi definida como o limite inferior de quantificação. Para efeito de construção da curva de calibração, foi estabelecida uma concentração de 20 $\mu\text{g/mL}$ como limite superior para incluir as amostras de concentração acima desse valor (controle de qualidade de diluição).

Precisão e Exatidão

Os resultados obtidos para precisão e exatidão estão representados na Tabela 2.

Tabela 2. Precisão e exatidão intra e inter-ensaio do MTX no plasma.

Nível (MTX)	Lote	Média \pm DP	Intra-ensaio		Inter-ensaio	
			Precisão	Exatidão	Precisão	Exatidão
			(CV%)	(%)	(CV%)	(%)
CQB (3 $\mu\text{g/mL}$)	1 (n= 5)	2,50 \pm 0,27	10,83	83,33		
	2 (n= 5)	2,61 \pm 0,25	9,77	83,67	2,02	84,78
	3 (n= 5)	2,53 \pm 0,07	2,62	84,33		
CQM (8 $\mu\text{g/mL}$)	1 (n= 5)	7,46 \pm 0,55	7,33	93,25		
	2 (n= 5)	7,63 \pm 0,59	7,67	93,38	7,99	98,83
	3 (n= 5)	8,63 \pm 0,97	11,31	107,88		
CQA (15 $\mu\text{g/mL}$)	1 (n= 5)	15,56 \pm 1,14	7,29	103,73		
	2 (n= 5)	15,66 \pm 0,60	3,84	104,4	3,29	102,13
	3 (n= 5)	14,74 \pm 1,18	7,99	98,27		

Estabilidade

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

Curva de calibração

A curva de calibração obtida para a técnica obedece aos desvios de 20% para o LIQ e 15% para as demais concentrações, além de apresentar um valor de coeficiente de correlação linear (r) de 0,999, superior ao valor mínimo de 0,98, exigido pela legislação vigente (BRASIL, 2012).

Estimativa dos parâmetros farmacocinéticos

A área sob a curva total foi estimada segundo o método trapezoidal, feito a partir das curvas de decaimento, desenhadas para cada paciente, levando-se em consideração as concentrações plasmáticas encontradas e o intervalo de tempo necessário para que fossem atingidas tais concentrações. O valor médio obtido para a área sob a curva neste trabalho equivale a 626,493 µg/mL x h.

O MTX apresentou um tempo de meia vida de eliminação médio de 2,73 ±0,409 h, em que o maior valor correspondeu a 3,4 e o menor valor encontrado foi de 2,25 h, como demonstra a Tabela 3.

Tabela 3. Parâmetros farmacocinéticos estimados para o MTX.

Paciente	D. Adm. (mg)	S. C. (cm ²)	D. Aju. (mg cm ⁻²)	C após 6 horas +/- DP µM	C após 24 horas +/- DP µM	Kel (h ⁻¹)	Meiavida (h)	Vd (L)	Cl. total (L h ⁻¹)	ASC (µg/mL.h)
DRCV	1972	1,014	2000	43,822 (±1,815)	1,095 (± 0,07)	0,2038	3,4	28,188	5,745	348,133
ADS	2127	0,846	1800	57,817 (±2,645)	1,106 (±0,063)	0,22	3,15	17,047	3,75	479,932
ERS	1972	0,507	1000	122,508 (±1,833)	1,087	0,2616	2,65	4,757	1,244	803,855
NMP	2035	0,786	1600	84,854 (±5,933)	0,341 (±0,002)	0,308	2,25	8,133	2,505	638,683
KCRS	1989	0,553	1100	81,544 (±0,105)	0,426	0,2887	2,4	5,954	1,719	639,829
TSC	1935	1,137	2200	81,095 (±4,427)	0,836 (±0,068)	0,2566	2,7	13,332	3,421	643,046
MLS	1961	1,224	2400	133,849 (±1,296)	1,036 (± 0,02)	0,2717	2,55	10,617	2,884	831,975
Média (± DP)	1998,71 (± 64,26)	0,8667 (± 0,27)	1728,57 (±531,39)	86,498 (±32,246)	0,846 (±0,330)	0,2586 (±0,036)	2,73 (±0,409)	12,575 (± 8,091)	3,038 (± 1,485)	626,493 (±169,924)
Mediana	1972	0,846	1800	81,544	1,036	0,2616	2,65	10,617	2,884	639,829

A concentração plasmática do fármaco imediatamente após o término da infusão, momento em que foi realizada a primeira coleta, apresentou uma variação de valores bastante considerável, atingindo uma concentração máxima de 133,849 µmol/L para um paciente avaliado, enquanto o menor valor foi de 43,822 µmol/L, obtido para outro paciente, tendo uma concentração média de 86,498 ±32,246 µmol/L. Em outros trabalhos observaram-se concentrações semelhantes, quando comparados aos dados de pacientes pediátricos (AUMENTE et al., 2006; PIARD et al., 2006).

Defende-se que, por apresentar taxa de eliminação mais rápida em pacientes pediátricos, a administração seja feita em altas doses, no sentido de aumentar os efeitos benéficos em pacientes leucêmicos, sem que haja elevação dos riscos de desenvolvimento de toxicidade associada ao uso do fármaco (AUMENTE et al., 2006; STANCZYK et al., 2012).

O fármaco foi rapidamente eliminado, obtendo um valor de concentração médio de 0,846 ±0,330 µmol/L, não sendo o fármaco detectado em nenhuma das análises correspondentes às demais coletas (48, 72 e 96 h), o que indica um risco inexistente de toxicidade tardia relacionada ao uso do MTX nesses pacientes, além de indicar que o

processo de resgate utilizando-se o ácido folínico, iniciado após 24 h do início da infusão, foi bastante eficiente, o que demonstra que o protocolo adotado pela equipe médica do hospital possibilita a utilização do fármaco em altas doses para o tratamento de pacientes com LLA, sem a exacerbação dos efeitos tóxicos associados à utilização da medicação.

O valor do *clearance* total foi estimado a partir dos valores de ASC_T , obtendo-se um valor médio de $3,038 \pm 1,485$ L/h, sendo que o valor máximo obtido por essa estimativa foi de 5,745 L/h para um paciente, o que está de acordo com trabalhos descritos em literatura, que apontam um *clearance* total que varia de 3,5 a 7,1 L/h segundo um modelo base populacional para parâmetros farmacocinéticos sendo que valores menores de *clearance* poderiam estar associados à utilização do metotrexato em doses mais altas (AUMENTE et al., 2006; REISS et al., 2016).

A constante de eliminação estimada para os pacientes analisados apresentou um valor médio de $0,2586 \pm 0,036$ h⁻¹, sendo que a faixa de variação encontrada foi de 0,2038 a 0,3080 h⁻¹. Schumacher (1995) afirma que a constante de eliminação pode variar de acordo com a idade dos pacientes, de forma que em pacientes pediátricos pode-se encontrar um valor médio de 0,578 h⁻¹, enquanto que para pacientes adultos, esse valor pode cair para 0,306 h⁻¹ (SHUMACHER et al., 1995), valor semelhante ao obtido durante a estimativa dos parâmetros farmacocinéticos nesse trabalho.

Piard et al. (2006) citam como valor mediano para a constante de eliminação, 0,360 h⁻¹ (RUBINO, 2001). Nesse mesmo trabalho há a citação de outros autores que encontraram valores de constante de eliminação da ordem de 0,410 h⁻¹. Esses dados demonstram a grande variabilidade existente na farmacocinética do MTX (AUMENTE et al., 2006; WALL et al., 2000).

Outro parâmetro farmacocinético estimado corresponde ao volume de distribuição, cujo valor médio encontrado foi de $12,575 \pm 8,091$ L, com uma faixa de variação de 5,954 a 28,188 L. Outros trabalhos citam valores que variaram de 8,67 a até 25,7 L (AUMENTE et al., 2006; WALL et al., 2000).

Os parâmetros farmacocinéticos estimados para o MTX nos pacientes do Hospital Araújo Jorge demonstraram que o protocolo utilizado pelo serviço médico do hospital possibilita um tratamento eficaz, uma vez que houve decaimento das concentrações plasmáticas do fármaco a valores considerados não-tóxicos no intervalo de 24 h.

CONCLUSÃO

Os parâmetros farmacocinéticos do MTX apresentaram grande variabilidade, fato que dá subsídio à realização do monitoramento terapêutico para este fármaco. O método analítico desenvolvido e validado para a quantificação demonstrou ser rápido e de fácil execução, o que torna viável sua implantação em serviços de emergência de hospitais, além de laboratórios de análises clínicas e toxicológicas, dada a importância do acompanhamento terapêutico dos pacientes.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Goiás (FAPEG), à Fundação de Apoio à Pesquisa da Universidade Federal de Goiás (FUNAPE) e ao Biotério Central da Universidade Federal de Goiás.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ASSOCIAÇÃO MÉDICO MUNDIAL. Declaração de Helsinque da Associação Médica Mundial (WMA). Princípios Éticos para Pesquisa Médica envolvendo Seres Humanos. Helsinque, Finlândia, Junho 1964; Revisada em 2008.
- AUMENTE, D.; BUELGA, D. S.; LUKAS, J. C.; GOMEZ, P.; TORRES, A.; GARCÍA, M. J. Population Pharmacokinetics of High-Dose Methotrexate in Children with Acute Lymphoblastic Leukaemia. **Clinical Pharmacokinetics**. v. 45, n. 12, p. 1227-1238, 2006.
- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução da Diretoria Colegiada nº 27 de 2012.
- CHEN, M. L.; CHIOU, W. L. Adsorption of methotrexate onto glassware and syringes. **Journal of Pharmaceutical Sciences**. v. 71, p. 129, 1982.
- DeRYCKERE, D.; SHERICK, A. B. L.; HUEY, M. G.; HILL, A. A.; TYNER, J. W.; JACOBSEN, K. M.; PAGE, L. S.; KIRKPATRICK, G. D.; ERYILDIZ, F.; MONTGOMERY, S. A.; ZHANG, W.; WANG, X.; FRYE, S. V.; EARP, H. S.; GRAHAM, D. K. UNC2025, a MerTK small molecule inhibitor, is therapeutically effective alone and in combination with methotrexate in leukemia models. **Clinical Cancer Research**. 2016.
- ELMAN, I.; SILVA, M. E. M. P. Crianças Portadoras de Leucemia Linfóide Aguda: Análise dos Limiares de Detecção dos Gostos Básicos. **Revista Brasileira de Cancerologia**. v. 53, n.3, p. 297-303, 2007.
- FDA. Reviewer Guidance. Validation of Chromatographic Methods, Center for Drug Evaluation and Research, United States Food and Drug Administration, 1994.
- HALLWORTH, M.; CAPPS, N. Therapeutic drug monitoring. London: ACB Venture Publications. 1993.
- KIFFMEYER, T. K.; GOTTZE, H. J.; JURSCH, M.; LUDERS, U. Trace enrichment, chromatographic separation and biodegradation of cytostatic compounds in surface water. **Journal of Analytical Chemistry**. v. 361, p.185-191, 1998.

NEHMY, R. M. Q.; BRITO, A. C.; MOTA, J. A. C.; OLIVEIRA, B. M. A perspectiva dos pais sobre a obtenção do diagnóstico de leucemia linfóide aguda em crianças e adolescentes: uma experiência no Brasil. **Revista Brasileira de Saúde Materno Infantil**. v. 11, n. 3, p. 293-299, 2011.

OLIVEIRA, B. M.; DINIZ, M.S.; VIANA, M. B. Leucemias agudas na infância. **Revista Médica de Minas Gerais**. v. 14, n. 1, p. 33-9, 2004.

PALMISANO, F.; GUERRIERI, A.; ZAMBONIN, P. G.; CATALDI, T. R. Determination of methotrexate in untreated body fluids by micellar liquid chromatography. **Analytical Chemistry**. v. 61, n. 9, p. 946-950, 1989.

PEDROSA, F.; LINS, M. Leucemia Linfóide Aguda: uma doença curável. **Revista Brasileira de Saúde Materno Infantil**. v. 2, n. 1, p.63-68, 2002.

PIARD, C.; BRESSOLLE, F.; FAKHOURY, M.; ZHANG, D.; YACOUBEN, K.; RIEUTORD, A. A limited sampling strategy to estimate individual pharmacokinetic parameters of methotrexate in children with acute lymphoblastic leukemia. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**. v. 60, n. 4, p. 609-620, 2007.

REISS, S. N.; BUIE, L. W.; DEBRA, A. G.; A.; DEVLIN, S. M.; DOUER, D. Hypoalbuminemia is significantly associated with increased clearance time of high dose methotrexate in patients being treated for lymphoma or leukemia. *Annals of Hematology*. v. 95, n. 12, p. 2009-2015, 2016.

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

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

STANCZYK, M.; SLIWINSKI, T.; TRELINSKA, J.; CUCHRA, M.; MARKIEWICZ, L.; DZIKI, L. Role of base-excision repair in the treatment of childhood acute lymphoblastic leukaemia with 6-mercaptopurine and high doses of methotrexate. **Mutation Research**. v. 741, p.13-21, 2012.

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