

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a)
autor(a), o texto completo desta Tese
será disponibilizado somente a partir
de 23/07/2020.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Campus de Araraquara

Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas

Efeito antitumoral, citotoxicidade e farmacocinética da doxorubicina incorporada em nanopartículas poliméricas e comparada a doxorubicina comercializada na forma cloridrato e lipossomal.

Caroline Damico Candido

Orientador: Profa. Dra. Rosângela Gonçalves Peccinini

Araraquara-SP
2018

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas

Efeito antitumoral, citotoxicidade e farmacocinética da doxorubicina incorporada em nanopartículas poliméricas e comparada a doxorubicina comercializada na forma cloridrato e lipossomal.

Caroline Damico Candido

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de Pesquisa e Desenvolvimento de Fármacos e Medicamentos, para obtenção do título de Doutor em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Rosângela
Gonçalves Peccinini

Araraquara, SP
2018

Ficha Catalográfica

Elaborada Por Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
UNESP – Campus de Araraquara

C217e Candido, Caroline Damico.
Efeito antitumoral, citotoxicidade e farmacocinética da doxorubicina incorporada em nanopartículas poliméricas e comparada a doxorubicina comercializada na forma cloridrato e lipossomal / Caroline Damico Candido. – Araraquara, 2018.
138 f. : il.

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista. “Júlio de Mesquita Filho”. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas. Área de Pesquisa em Desenvolvimento de Fármacos e Medicamentos.

Orientador: Rosângela Gonçalves Peccinini.

1. Doxorubicina. 2. Citotoxicidade. 3. Eficácia terapêutica. 4. Cardiotoxicidade. 5. Farmacocinética. I. Peccinini, Rosângela Gonçalves, orient. II. Título.

CAPES: 40300005

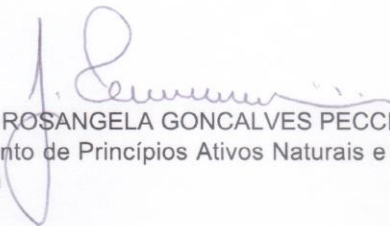
CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: Efeito antitumoral, citotoxicidade e farmacocinética da doxorubicina incorporada em nanopartículas poliméricas comparada à doxorubicina comercializada na forma cloridrato e lipossomal


AUTORA: CAROLINE DAMICO CÂNDIDO


ORIENTADORA: ROSANGELA GONCALVES PECCININI


Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS, área de conhecimento: Sem Área de Conhecimento pela Comissão Examinadora:


Profa. Dra. ROSANGELA GONCALVES PECCININI
Departamento de Princípios Ativos Naturais e Toxicologia / Faculdade de Ciências Farmacêuticas - UNESP - Araraquara

Prof. Dr. ARNÓBIO ANTONIO DA SILVA JUNIOR
Departamento de Farmácia / Universidade Federal do Rio Grande do Norte


Profa. Dra. THALITA PEDRONI FORMARIZ PILON
Departamento de Ciências Biológicas e da Saúde / Universidade de Araraquara - UNIARA


Prof. Dr. ALEXANDER BATISTA DUHARTE
Departamento de Análises Clínicas / Faculdade de Ciências Farmacêuticas - UNESP - Araraquara


Prof. Dr. FERNANDO ROGÉRIO PAVAN
Departamento de Ciências Biológicas / Faculdade de Ciências Farmacêuticas - UNESP - Araraquara

Araraquara, 23 de novembro de 2018

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais Gilmar e Romilda, que sempre me incentivaram e estiveram do meu lado em todos os momentos.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, pelas oportunidades que colocou em minha vida, por conseguir discernir e saber aproveitar os acontecimentos. Pela realização de um sonho, que me traz imensa felicidade, por ser o amparo nos momentos de agonia, e luz que me guia todos os dias.

Aos meus pais, Gilmar e Romilda, que embora humildes, sempre me proporcionaram o mais importante, todo amor e tudo que lhes era possível. A pessoa que sou hoje, devo a vocês, que sempre me apoiaram e incentivaram a estudar, ser independente e evoluir sempre. Dedico este trabalho a vocês, que mesmo sem entender, me proporcionaram aconchego nas horas difíceis e comemoram os momentos felizes.

Ao meu irmão, Guilherme, e toda minha família, que sempre me impulsionaram e acreditaram em mim. Amo cada um de vocês.

Ao meu companheiro, Leandro, que conheci no começo dessa jornada, que tornou meus dias leves, e me ajudou a segurar firme todas as vezes que fraquejei.

Aos meus parceiros de laboratório, Jonata, Evelin, Taisa e Bruna, amigas que vou levar pra vida, todas as risadas, fotos sem lógica alguma, comidas exageradas, e por tudo, foi uma honra trabalhar com vocês, e que tudo isso nos traga frutos valiosos, por que lembranças boas nós já temos

A minha orientadora, Rosângela, ainda me lembro da primeira vez que falei com você, sou eternamente grata pela confiança, por acreditar no meu potencial, por ouvir meus chororôs (que não foram poucos), me espelho em você, e o sentimento que levo é de gratidão, por tudo que aprendi debaixo das suas “asas”.

A minha ex-professora que virou uma amiga, Kelly, muito obrigada por tudo, pelas conversas, conhecimentos, fumos, etc.

Ao laboratório de imunologia da FCFar/Unesp-Araraquara, em especial ao pós graduandos Lucas e Francine por todo o apoio técnico e conversas sobre as dificuldades da vida.

Aos amigos que fiz em Portugal, especialmente a Luciana e Morgana, vocês foram alento nos momentos difíceis, e apesar do pouco tempo de convivência, a admiração e carinho que possuo por vocês é imensa.

Agradeço a CAPES pelo apoio financiamento deste trabalho e pela bolsa concedida e pela bolsa PDSE nº 88881.132300/2016-01.

A faculdade de ciências farmacêuticas – Unesp/Araraquara pela infraestrutura disponibilizada para a realização do meu doutorado.

Aos amigos e todos os envolvidos nessa minha conquista, sozinhos não somos nada, e sem todo o apoio que tive em todos os sentidos (do emocional ao intelectual), eu não chegaria até aqui (pelo menos, não gozando de sanidade mental).

“Por vezes, sentimos que aquilo que fazemos não é, senão uma gota de água no mar. Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota”.

Madre Teresa de Calcutá

RESUMO

A Doxorubicina (Dox) é uma antraciclina modelo amplamente utilizada em diversos tipos de neoplasias e, assim como a maioria dos quimioterápicos antineoplásicos, a Dox apresenta uma série de efeitos adversos, dentre eles os mais significativos são os efeitos cardiovasculares como hipotensão, taquicardia e insuficiência cardíaca congestiva (ICC), que limitam a terapia com este fármaco. A cardiotoxicidade é favorecida pela sua ampla distribuição no miocárdio, e a Dox tem sido considerada a de maior efeito tóxico sobre o tecido cardíaco. A utilização de recursos em tecnologia farmacêutica que modifiquem o perfil farmacocinético e a toxicidade é uma importante ferramenta para a introdução de um novo produto no mercado cuja resulte em desfecho clínico mais favorável ao paciente. Pesquisadores da Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN) desenvolveram um sistema de nanopartículas (Np) para a veiculação de Dox com o intuito de modificar suas características farmacocinéticas e de toxicidade. No presente trabalho o objetivo foi avaliar a nova formulação proposta e compará-la às formulações comerciais de Dox (na forma de cloridrato e lipossomal) quanto a atividade antitumoral *in vitro* e *in vivo* e quanto às suas características farmacocinéticas. Foi abordada a atividade *in vitro* em ensaios de citotoxicidade como o ensaio de Resazurina (RSZ), sulforrubina B (SRB) e a determinação de Trifosfato de Adenosina (ATP) realizados em cardiomioblasto (H9c2 (2-1), ATCC® CRL 1446™) e células epiteliais mamárias humanas (MCF-12A, ATCC® CRL 10782™), e em duas linhagens tumorais humanas (MCF-7, ATCC® CRL HTB-22™ e MDA MB 231, ATCC HTB-26™) e na linhagem tumoral de Ehrlich (TSE). Para a avaliação da eficácia *in vivo* grupos de camundongos swiss fêmeas portadoras de tumor sólido de Ehrlich (TSE) (n=9) submetidas a três ciclos de tratamento, por administração intraperitoneal (ip), divididos em grupos, que receberam as formulações de Dox (dose 10 mg/Kg), assim como os grupos controles que receberam a formulação livre do fármaco e solução salina. Foi realizada a comparação do peso dos animais a cada ciclo, e a medida da massa tumoral foi utilizada como parâmetro comparativo de eficácia. Foi avaliada a biodistribuição da Dox em tecido cardíaco e tumoral de camundongos swiss fêmeas portadoras de TSE (n=7) que receberam administração ip das formulações de Dox (dose 10 mg/Kg). Os animais foram eutanasiados 15 minutos após a administração e coletado coração e a massa tumoral. O perfil farmacocinético da Dox foi avaliado em ratos wistar hípidos após a administração intravenosa (iv) do fármaco (dose = 6 mg/Kg, Dox-Cl e Dox-Lp; 3 mg/Kg, Dox-PLGA/Pei). Para a determinação das concentrações plasmáticas de Dox um método bioanalítico foi parcialmente validado. Nos ensaios de citotoxicidade, não foi possível observar diferenças significativas entre as formulações, com exceção ao ensaio de SRB para a linhagem MCF-7 que apresentou diferença, com diminuição da massa proteica, quando comparada a formulação nanoparticulada a forma cloridrato. Os resultados de eficácia *in vivo* não apresentaram diferença estatística entre as formulações avaliadas, porém, apontaram que a nanopartícula, assim como o lipossoma, podem melhorar a qualidade de vida do paciente, pois diminuíram a perda de peso, indicando que o efeito de anorexia do fármaco foi diminuído. A biodistribuição da Dox em tecido cardíaco apresentou diferença estatística quando comparada a Dox-Cl e as formulações Dox-Lp e Dox-PLGA/Pei,

demonstrando que as formulações lipossomal e nanopartículada foram capazes de modificar a biodistribuição para este tecido com consequente expectativa de redução do efeito cardiotoxico. Não foi possível realizar a comparação do perfil farmacocinético da Dox-Lp com as demais formulações. As formulações Dox-CI e Dox-PLGA/Pei promoveram a construção dos perfis e a comparação estatística entre os grupos não apresentou diferenças significativas. Os resultados obtidos neste trabalho apontam para a continuidade dos estudos com a nova formulação nanopartículada em protocolos diversos e modelos animais diferentes, com a finalidade de elucidar os mecanismos biológicos envolvidos neste sistema de liberação modificada de fármacos.

Palavras-chave: Doxorubicina, citotoxicidade, eficácia terapêutica, cardiotoxicidade, farmacocinética.

ABSTRACT

Doxorubicin (Dox) is an anthracycline model widely used in several types of neoplasias and, like most antineoplastic chemotherapeutics, Dox has a number of adverse effects, among them the most significant are the cardiovascular effects such as hypotension, tachycardia and insufficiency congestive heart failure (CHF), which limit therapy with this drug. Cardiotoxicity is favored by its wide distribution in the myocardium, and Dox has been considered to have a higher toxic effect on cardiac tissue. The use of pharmaceutical technology resources that modify the pharmacokinetic profile and toxicity is an important tool for the introduction of a new product on the market, resulting in a more favorable clinical outcome for the patient. Researchers at the Federal University of Rio Grande do Norte (UFRN) developed a nanoparticle (Np) system for the use of Dox in order to modify its pharmacokinetic and toxicity characteristics. In the present work the objective was to evaluate the proposed new formulation and to compare it to the commercial formulations of Dox (as hydrochloride and liposomal) as to the antitumor activity in vitro and in vivo and its pharmacokinetic characteristics. In vitro activity in cytotoxicity assays such as the Reszurin (RSZ), sulforubin B (SRB) and the determination of Adenosine Triphosphate (ATP) in cardiomyoblasts (H9c2 (2-1), ATCC® CRL 1446™) and human mammary epithelial cells (MCF-12A, ATCC® CRL 10782™), and in two human tumor lines (MCF-7, ATCC® CRL HTB-22™ and MDA MB 231, ATCC HTB-26™) tumor of Ehrlich (TSE). For the evaluation of the in vivo efficacy, groups of swiss Ehrlich solid tumor (TSE) (n = 9) female swiss mice submitted to three cycles of treatment by intraperitoneal (ip) administration, divided into groups, receiving the Dox formulations (10 mg / kg dose), as well as the control groups that received the drug free formulation and saline. The weight of the animals was compared to each cycle, and the tumor mass measurement was used as a comparative efficacy parameter. The dox biodistribution in cardiac and tumor tissues of TSE (n = 7) female swiss mice receiving ip administration of the Dox formulations (dose 10 mg / kg) was evaluated. The animals were euthanized 15 minutes after administration and collected heart and tumor mass. The pharmacokinetic profile of Dox was evaluated in healthy wistar rats following intravenous iv administration of the drug (dose = 6 mg / kg, Dox-Cl and Dox-Lp, 3 mg / kg, Dox-PLGA / Pei). For the determination of plasma Dox concentrations a bioanalytical method was partially validated. In the cytotoxicity assays, it was not possible to observe significant differences between the formulations, except for the SRB assay for the MCF-7 lineage that presented difference, with decrease of the protein mass, when compared to the nanoparticle formulation with hydrochloride form. The results of in vivo efficacy did not show statistical difference between the formulations evaluated, however, they pointed out that the nanoparticle, as well as the liposome, can improve the quality of life of the patient, since they decreased the weight loss, indicating that the effect of anorexia of the drug was decreased. The dox-Lp and Dox-PLGA / Pei formulations showed a statistically significant difference when compared to Dox-Cl and Dox-PLGA / Pei, demonstrating that liposomal and nanoparticle formulations were able to modify the biodistribution for this tissue with a consequent expectation of reduction cardiotoxic effect. It was not possible to compare the pharmacokinetic profile of Dox-Lp with the other formulations. The Dox-Cl and Dox-PLGA / Pei formulations promoted the construction of the profiles and the statistical comparison between the groups did

not present significant differences. The results obtained in this work point to the continuity of the studies with the new nanoparticle formulation in different protocols and different animal models, in order to elucidate the biological mechanisms involved in this system of modified drug release.

Keywords: Doxorubicin, cytotoxicity, therapeutic efficacy, cardiotoxicity, pharmacokinetics.

LISTA DE FIGURAS

CAPITULO 1

Figura 1: Fluxograma apresentando o tratamento das realizados no Center for Neuroscience and Cell Biology (CNC) da Universidade de Coimbra.....	43
Figura 2: Fluxograma apresentando o tratamento das células tumorais de Ehrlich para avaliação da eficácia através de ensaio de citotoxicidade.....	46
Figura 3: Ensaio de RSZ realizado em células tumorais de Ehrlich.....	50
Figura 4: Ensaio de RSZ nas diferentes linhagens celulares.....	52
Figura 5: Ensaio de SRB nas diferentes linhagens celulares.....	53
Figura 6: Ensaio de ATP nas diferentes linhagens celulares.....	54
Figura 7: Gráfico que expressa a média dos pesos dos animais divididos por grupo de tratamento em cada ciclo (n=9).....	56
Figura 8: Média da massa tumoral em gramas e comparação estatística dos grupos de tratamento (n=9).....	58
Figura 9: Média das dimensões tumorais em mm ³ e comparação estatística dos grupos de tratamento (n=9).....	59

CAPITULO 2

Figura 10- Representação esquemática e gráfica do decaimento das concentrações nos modelos monocompartimental e bicompartimental.....	66
Figura 11: Fluxograma do sistema cromatográfico.....	82
Figura 12: Representação gráfica do decaimento, onde (A) modelo monocompartimental e (B) modelo bicompartimental.....	89
Figura 13: Método dos resíduos em representação gráfica.....	90
Figura 14: Curva bioanalítica em plasma. Valores expressos como média e DPR (n=3).....	92
Figura 15: Cromatogramas sobrepostos referentes às amostras branco, branco zero e amostras de plasma adicionada de Dox na concentração de 1 ug/mL.....	93
Figura 16: Curva bioanalítica da Dox em tecido cardíaco. Valores expressos como média e DPR(n=3).....	94
Figura 17: Cromatogramas sobrepostos referentes às amostras branco, branco zero e de amostra de tecido cardíaco adicionada de Dox na concentração de 1 ng/mg.....	95

Figura 18: Curva bioanalítica da Dox em tecido tumoral. Valores expressos como média e DPR(n=3).....	96
Figura 19: Cromatogramas sobrepostos referentes às amostras branco, branco zero e de amostra de tecido tumoral adicionado de Dox na concentração de 75 ng/mg.....	97
Figura 20: Distribuição da Dox em tecido cardíaco.	99
Figura 21: Perfil farmacocinético da Dox veiculada por lipossoma (Doxopeg®)...	102
Figura 22: Perfil farmacocinético da Dox administrada pela via intravenosa, na forma de cloridrato em ratos wistar (n=5; 6 mg/Kg) na dose de XX mg/Kg. Resultados expressos como média e desvio padrão.....	105
Figura 23: Perfil farmacocinético da Dox veiculada pela formulação nanoparticulada (Dox-PLGA/Pei) administrada pela via intravenosa em ratos wistar (n=5) na dose de 3 mg/Kg. Resultados expressos como média e desvio padrão.	105

LISTA DE TABELAS

CAPITULO 1

Tabela 1: Expressa os valores obtidos no ensaio *in vitro* com células tumorais de Ehrlich, através da média e DPR, expostas a concentrações crescentes de Dox veiculada por diferentes formulações (n=3).....51

CAPITULO 2

Tabela 2: Precisão e Exatidão do método para a determinação de Dox em amostras de plasma.....93

Tabela 3: Precisão e Exatidão intraensaios da determinação de Dox em tecido cardíaco.....95

Tabela 4: Precisão e Exatidão intraensaios da determinação de Dox em tecido tumoral.....97

Tabela 5: Precisão e Exatidão da determinação de Dox em solução (n=3).....98

Tabela 6: Concentrações de Dox no tecido tumoral do grupo Dox-Cl.....100

Tabela 7: Concentrações plasmáticas de Dox nos animais que receberam Doxopeg® (6 mg/Kg) pela via intravenosa (n=4).....102

Tabela 8: Parâmetros farmacocinéticos observados no estudo de Vail et al. (2004).....103

Tabela 9: Parâmetros farmacocinéticos da Dox em ratos wistar que receberam Dox pela via intravenosa das diferentes formulações (média; DPR, n=5 por grupo).....106

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

β – constante de eliminação da fase terminal

α – constante de distribuição

ADME - absorção, distribuição, metabolização e excreção

ANVISA -Agencia Nacional de Vigilância Sanitária

ALT - alanina transaminase

ASC - área sob a curva

AST - aspartato aminotransferase

ATP - Trisfosfato de Adenosina () realizados em

B - intersecção da reta de eliminação

CEMIB - Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica

CK – creatinafosfoquinase

Cl - clearance

CNC - Center for Neuroscience and Cell Biology

CQA - controle de qualidade alto

CQB - controle de qualidade baixo

CQD – controle de qualidade diluição

CQM - controle de qualidade médio

Cp – concentração plasmática

CV – coeficiente de variação

CYP – citocromo P450

Dox – Doxorrubicina

Dox-Cl – cloridrato de Dox

Dox-Lp- lipossomal de Dox

Dox-PLGA/Pei - nanopartícula de co-polímero ácido polilactico-co-glicólicoassociado apolietilenoimina de Dox

DPR – Desvio padrão relative

DMEM - Dulbecco's Modified Eagle's Medium

DMEM-HG - Dulbecco's Modified Eagle's high glucose

DNA – ácido desoxido ribonucleico

EMA - Europe Medicine Agency

EPP - eritrodisestesia palmo-plantar

ErbB2 - oncogene localizado no cromossomo 17

FDA - Food and Drug Administration
H9c2 - cardiomioblasto
HP – human plasma
HPLC – high performance liquid chromatography
IBILI - Institute for Biomedical Imaging and Life Sciences
IC – intervalo de confiança
ICC - insuficiência cardíaca congestiva
INCA - Instituto Nacional de Câncer
ip – intraperitoneal
IV – intravenosa
 K_{el} – constante de eliminação
LDH - lactato desidrogenase
LDL - lipoproteína de baixa densidade
LIQ – limite inferior de quantificação
Log P - coeficiente de partição
MCF-12A - células epiteliais mamárias humanas
MCF-7 - células tumorais humanas
MDA MB 231 - células tumorais humanas
MPR-1- proteína 1 associada a resistência de múltiplos fármacos
MPS - sistema fagocitário mononuclear
MRT – tempo de residência médio
MTT - {brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difenil tetrazolium]}

N_p – nanopartícula
 N_p -PLGA - nanopartícula de co-polímero ácido polilactico-co-glicólico associado a polietilenoimina livre de Dox
PEI – polietilenoimina
P.I. – padrão interno
PEG – polietileno glicol
PLA – ácido polilático
PLGA - co-polímero ácido polilático-co-glicólico
RSZ - Resazurina
ROS - espécies reativas de oxigênio (do inglês “reactive oxygen species”)
RNA – ácido ribonucleico

RT-PCR - reação em cadeia da polimerase em tempo real

SRB - sulfarrubina B

$t_{1/2}$ - meia vida

$t_{1/2\beta}$ - meia vida de eliminação

t_{max} - tempo da concentração plasmática máxima

TAE - tumor ascítico de Ehrlich

TGI - trato gastrointestinal

PTX - paclitaxel

UFRN - Universidade Federal do Rio Grande do Norte

UHPLC - ultra high performance liquid chromatography

V_c - volume de distribuição no compartimento central

V_d - volume de distribuição

Vero E6 - células de epitélio renal de macacos

$V_{d\acute{a}rea}$ - volume de distribuição no pseudoequilíbrio

V_i - volume de distribuição inicial

V_{ss} - o volume de distribuição no estado de equilíbrio

Sumário

1. INTRODUÇÃO	21
1.1 Características do sistema nanoparticulado.	23
Capítulo 1 – Citotoxicidade in vitro em cultura de células hígdas e tumorais e atividade in vivo. Erro! Indicador não definido.	
1. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.
1.1. Avaliação da segurança e eficácia de novos medicamentos....	Erro! Indicador não definido.
1.1.2. Cardiomioblastos na avaliação da cardiotoxicidade: linhagem H9c2.	Erro! Indicador não definido.
1.1.3. Linhagens celulares humanas para comparação de eficácia e segurança de novas formulações.	Erro! Indicador não definido.
1.1.3.1. Linhagem MCF-12A: controle epitelial hígdido de mama. Erro! Indicador não definido.	
1.1.3.2. Linhagem celular tumoral de mama MCF-7	Erro! Indicador não definido.
1.1.3.3. Linhagem celular tumoral MDA MB 231 – câncer de mama triplo negativo.	Erro! Indicador não definido.
1.1.4. Células tumorais de Ehrlich: correlação <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> . .	Erro! Indicador não definido.
2.OBJETIVO GERAL;.....	ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.
2.1. Objetivos específicos:	Erro! Indicador não definido.
3. METODOLOGIA	ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.
3.1. Ensaio em diferentes linhagens celulares realizados no Center for Neuroscience and Cell Biology (CNC) da Universidade de Coimbra.....	Erro! Indicador não definido.
3.1.1. Ensaio de citotoxicidade por Resazurina (RSZ).	Erro! Indicador não definido.
3.1.2. Ensaio de massa celular por Sulforodamina B (SRB)	Erro! Indicador não definido.
3.1.3. Determinação de Trisfosfato de Adenosina (ATP)	Erro! Indicador não definido.
3.2. Manutenção da linhagem celular do Tumor de Ehrlich.	Erro! Indicador não definido.

3.2.1. Tratamento das células tumorais de Ehrlich para avaliação da eficácia através de ensaio de citotoxicidade. **Erro! Indicador não definido.**

3.3. Análise estatística **Erro! Indicador não definido.**

3.4. Estudo da atividade *in vivo* de Dox veiculada por diferentes formulações... **Erro! Indicador não definido.**

3.4.1. Protocolo experimental para o ensaio de atividade *in vivo* em camundongos *swiss*.
..... **Erro! Indicador não definido.**

3.4.2 Análise estatística do ensaio de atividade *in vivo*. **Erro! Indicador não definido.**

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO **ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.**

4.1. Ensaios de citotoxicidade..... **Erro! Indicador não definido.**

4.2. Estudo da atividade *in vivo* de Dox veiculada por diferentes formulações... **Erro! Indicador não definido.**

4.2.1. Avaliação do peso dos animais antes e após o protocolo de tratamento. **Erro! Indicador não definido.**

4.2.2. Avaliação da massa e dimensões dos tumores após o protocolo de tratamento. **Erro! Indicador não definido.**

5. CONCLUSÕES **ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.**

Capítulo 2 – Biodistribuição e Farmacocinética. **Erro! Indicador não definido.**

1. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA..... **ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.**

1.1. Doxorubicina: da ação terapêutica a toxicidade **Erro! Indicador não definido.**

1.1.1. Farmacologia das antraciclinas **Erro! Indicador não definido.**

1.1.2. Farmacocinética: parâmetros e modelos. **Erro! Indicador não definido.**

1.1.2.1. Modelos farmacocinéticos..... **Erro! Indicador não definido.**

1.2. Cardiotoxicidade induzida por Dox **Erro! Indicador não definido.**

1.3. Novas formulações de Dox para direcionamento em tecido alvo e diminuição da toxicidade. **Erro! Indicador não definido.**

1.4. Lipossoma Peguilado contendo Dox (Doxil®)..... **Erro! Indicador não definido.**

- 1.4.1. Primeiro estudo clinico e farmacocinética do Doxil® **Erro! Indicador não definido.**
- 1.4.2. Toxicidade induzida pelos lipossomas contendo Dox..... **Erro! Indicador não definido.**
 - 1.4.2.1. Mucosite **Erro! Indicador não definido.**
 - 1.4.2.2. Toxicidade da pele **Erro! Indicador não definido.**
 - 1.4.2.3. Mielossupressão **Erro! Indicador não definido.**
 - 1.4.2.4. Reação de Infusão Aguda **Erro! Indicador não definido.**
- 1.4.3. Formulações nanoparticuladas capazes de veicular Dox .. **Erro! Indicador não definido.**

2. OBJETIVO GERAL;.....ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.

- 2.1. **Objetivos específicos:** Erro! Indicador não definido.

3. METODOLOGIAERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.

- 3.1. **Determinação de Dox em amostras biológicas.** Erro! Indicador não definido.

- 3.2. **Sistema Cromatográfico.** Erro! Indicador não definido.

- 3.3. **Processamento da Amostra Biológica** Erro! Indicador não definido.

- 3.4. **Validação Parcial do Método Bioanalítico**..... Erro! Indicador não definido.

- 3.4.1. Estudo de Linearidade – Curva bioanalitica..... **Erro! Indicador não definido.**

- 3.4.2. Precisão **Erro! Indicador não definido.**

- 3.4.3. Exatidão **Erro! Indicador não definido.**

- 3.4.4. Controle de Qualidade Diluído **Erro! Indicador não definido.**

- 3.4.5. Quantificação de Dox no sistema nanoparticulado PLGA/Pei **Erro! Indicador não definido.**

definido.

- 3.5. Protocolo experimental para o estudo de distribuição tecidual da Dox em camundongos
..... **Erro! Indicador não definido.**

- 3.5.1. **Análise Estatística** Erro! Indicador não definido.

- 3.6. **Análise Farmacocinética** Erro! Indicador não definido.

- 3.6.1. **Análise Estatística** **Erro! Indicador não definido.**

4. RESULTADOS.....ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.

- 4.1. **Validação parcial do método bioanalitico para determinação de Dox em amostra biológica.** Erro! Indicador não definido.

4.1.1. Quantificação de Dox no sistema nanoparticulado PLGA/Pei **Erro! Indicador não definido.**

4.2. Avaliação da biodistribuição tecidual da Dox em camundongos portadores de TSE Erro!
Indicador não definido.

4.2.1. Avaliação da biodistribuição cardíaca de Dox em camundongos portadores de TSE **Erro!**
Indicador não definido.

4.2.2. Avaliação da biodistribuição em tecido tumoral de Dox em camundongos portadores
de TSE **Erro! Indicador não definido.**

4.3. Avaliação do perfil farmacocinético da Dox veiculada por diferentes formulações. Erro!
Indicador não definido.

4.3.1. Avaliação do perfil farmacocinético do lipossoma contendo Dox..... **Erro! Indicador não
definido.**

4.3.2. Avaliação e comparação dos perfis farmacocinéticos de Dox veiculada pelo sistema
nanoparticulado Dox-PLGA/Pei e Dox-Cl..... **Erro! Indicador não definido.**

5. CONCLUSÃO..... ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.

6. REFERÊNCIAS 27

APÊNDICES.....121

ANEXOS..... 129

1. INTRODUÇÃO

A Doxorubicina (Dox) é uma antraciclina modelo, derivada de culturas de *Streptomyces peucetius*, cuja classe de fármacos é caracterizada por um anel tetracíclico ligado a um aminoglicósido (LUCAS et al., 2016). Seu uso é amplo na oncologia clínica para o tratamento de uma grande variedade de doenças neoplásicas, desde tumores sólidos até leucemias, principalmente na forma de cloridrato (HANG, et al., 2016).

A indicação para o uso da Dox é a partir de 1 ano de idade, podendo ser administrada desde pacientes idosos até crianças, sendo que o sucesso terapêutico aumentou a taxa de sobrevivência para pacientes pediátricos em 80% nos últimos 20 anos (KANKEU, et al., 2016).

Assim como a maioria dos quimioterápicos antineoplásicos, a Dox apresenta uma série de efeitos adversos incluindo náuseas, vômitos e estado febril, etc. (BRUNTON, 2010). A utilidade clínica da Dox e os regimes de dosagem são frequentemente limitados por efeitos agudos ou crônicos graves (KANKEU et al., 2016) e, além disso, uma incidência significativa de efeitos cardiovasculares como hipotensão, taquicardia e insuficiência cardíaca congestiva (ICC) foram descritos em pacientes que utilizaram o fármaco (SINGAL; ILISKOVIC, 1998). Os efeitos adversos agudos da Dox incluem pericardite, miocardite ou arritmias geralmente reversíveis e clinicamente contornáveis (BRUNTON, 2010; CHEN et al., 2013, PUGAZHENDHI et al., 2018).

A incidência de ICC aumenta quando os pacientes são expostos a doses sucessivas (PEREIRA et al., 2016), apesar da maioria dos efeitos serem reversíveis com a interrupção do tratamento, a mortalidade foi descrita em 50% para aqueles pacientes que desenvolvem esta patologia (CHATTERJEE et al, 2010)

A cardiotoxicidade da Dox ainda não foi completamente elucidada, mas sua capacidade de gerar espécies reativas de oxigênio (ROS) é conhecida, fato este que sobrecarrega o sistema antioxidante presente no miocárdio e induz danos na estrutura, sinalização e metabolismo celulares deste tecido (CARVALHO et al, 2014; PEREIRA et al., 2016; PUGAZHENDHI et al., 2018).

A cardiotoxicidade da Dox é favorecida pela sua ampla distribuição no miocárdio. E, embora sua distribuição seja considerável em todo o organismo,

não ocorre penetração no sistema nervoso central devido a alta seletividade da barreira hematoencefálica. A Dox, entre as antraciclinas, tem sido considerada a de maior efeito tóxico sobre o tecido cardíaco (BRUNTON et al, 2010; PUGAZHENDHI et al., 2018).

Assumpção et al. (2012) avaliaram a farmacocinética da Dox na forma cloridrato em ratos *wistar* machos (6 mg/Kg, dose única), e um alto volume de distribuição foi encontrado para este modelo animal (68.85L.Kg^{-1}). A concentração do fármaco em tecido tumoral e cardíaco em camundongos *swiss* fêmeas portadoras de tumor sólido de Ehrlich foi avaliada por Candido et al. (2014) após administração intraperitoneal da forma cloridrato em dose única (10 mg/Kg) e foi observada a relação de 0.23 ($0.44\pm 0.24\text{ ng.mg}^{-1}$ e $1.85\pm 0.34\text{ ng.mg}^{-1}$, respectivamente). Esses resultados demonstram que a distribuição da Dox é mais favorável ao seu efeito cardiotoxico do que ao seu efeito terapêutico.

A Dox encontra-se disponível no mercado na forma livre (cloridrato) e na forma lipossomal (COWENS et al, 1993), entretanto, as pesquisas para modificar sua distribuição no organismo e favorecer seu direcionamento para tecidos alvos continuam, como as formulações que envolvem sistemas poliméricos (MOSAFER et al., 2016; MAZZUCCHELI et al., 2016; MANSOUR; EID; ARNAOUTY, 2017).

O tratamento utilizando a forma lipossomal da Dox apresentou diminuição do seu efeito cardiotoxico e alterações do perfil farmacocinético (COWENS et al, 1993; KANTER et al, 1993). Entretanto, tem sido relatada também toxicidade da forma lipossomal da Dox sobre o sistema fagocitário mononuclear (MPS) (IWAMOTO, 2013; WATERHOUSE et al, 2001; GORDON et al, 2001). Os lipossomas são fagocitados e digeridos pelas células do MPS, processo em que a Dox é então liberada e, uma vez livre no citosol, ela é capaz de interagir com diferentes componentes intracelulares e exercer seu efeito citotóxico. A toxicidade sobre MPS pode ser um problema impactante em pacientes imunossuprimidos, como por exemplo, portadores do vírus HIV (WATERHOUSE et al., 2001). Outras formulações lipossomais contendo PEG (DoxoPeg[®]-Zodiac; Doxil[®]- Janssen) causam eritrodisestesia palmo-plantar (EPP) devido à acumulação da Dox na pele (WATERHOUSE et al, 2001; SOLOMON; GABIZON, 2008). Entretanto, embora a EPP seja atribuída principalmente a forma

peguilada da Dox, há também casos reportados com formulações não peguilhadas (TAMAYO-ORBEGOZO et al, 2011).

Como já discutido anteriormente, a baixa seletividade na distribuição da Dox é primordial para a ocorrência de seus efeitos cardiotoxicos, assim como a limitação de sua distribuição no tecido tumoral é causa de resistência e falha terapêutica (PATEL; TREDAN; TANNOCK, 2013). Desta forma, é possível que a utilização de recursos em tecnologia farmacêutica, que modifiquem o perfil farmacocinético, incremente a eficácia deste anti-neoplásico.

Steiniger (2004) demonstrou com experimentos *in vivo* que a Dox incorporada em nanopartículas (Np) é capaz de atravessar a barreira hematoencefálica íntegra, característica não observada com a Dox na forma livre, o que poderia ampliar seu uso terapêutico para o tratamento de glioblastoma cerebral.

Np são caracterizadas por sistemas coloidais de tamanho em torno de 100 -300nm, com grande superfície de contato e capacidade de incorporar e veicular uma grande variedade de substâncias, com perspectivas de melhorar sua permeação através das membranas biológicas.

As Np são capazes de viabilizar a penetração de fármacos através de barreiras biológicas (CHENG et al, 2014) e há expectativas de que a aplicação de Np na terapêutica torne eficiente a utilização de quantidades de fármacos 100 vezes inferiores para atingir os objetivos terapêuticos (BEDUNEAU; SAULNIER; BENOIT, 2007).

Segundo este contexto, pesquisadores da Universidade Federal do Rio Grande do Norte(UFRN) desenvolveram um sistema de Np para a veiculação de Dox com o intuito de modificar suas características farmacocinéticas e de toxicidade. Estas nanopartículas foram produzidas pela técnica de deslocamento do solvente, utilizando o co-polímero ácido polilactico-co-glicólico (PLGA) 50:50 e a biocompatibilidade do sistema foi avaliada, com resultados promissores à continuidade do desenvolvimento de um produto farmacêutico.

1.1 Características do sistema nanoparticulado.

Entre os polímeros sintéticos utilizados para a preparação de Np, o ácido polilactico (PLA) e ácido polilactico-co-glicólico (PLGA) apresentam vantagens

em decorrência da sua biocompatibilidade e biodegradabilidade e baixo potencial imunogênico (JAIN, 2000; ALVAREZ-ROMAN et al, 2001; LEE; ZHANG;FENG, 2007).

LIU et al. (2017) desenvolveram uma formulação nanoparticulada de PLGA a fim de melhorar a solubilidade da nuciferina e a sua biodisponibilidade na administração oral, permitir a sua liberação prolongada, bem como inibir a acumulação de lipídios. O estudo foi realizado em ratos machos Sprague-Dawley que receberam administração intravenosa (IV) da nuciferina livre (0,2 mg/Kg) e administração oral do fármaco livre e veiculado pela Np em grupos distintos (5 mg/Kg). Os autores observaram diferenças estatísticas significativas na comparação nos parâmetros farmacocinéticos como a meia vida – 0.8 ± 0.4 h fármaco livre e 1.8 ± 0.2 h fármaco veiculado pela Np – no tempo de ocorrência da concentração máxima (t_{max} - 0.6 ± 0.2 h fármaco livre e 1.3 ± 0.3 h fármaco veiculado pela Np, o que demonstra a liberação modificada, e na biodisponibilidade absoluta - $4.2 \pm 1.3\%$ fármaco livre e $13.5 \pm 1.9\%$ fármaco veiculado pela Np. Além das diferenças farmacocinéticas, também observaram a diminuição significativa dos níveis séricos de colesterol total, triglicérides e de lipoproteína de baixa densidade (LDL-C) após a administração da formulação incrementada.

Bhatnagar et al. (2016) desenvolveram uma formulação nanoparticulada a base de PLGA e ácido hialurônico que foi capaz de direcionar fármacos para células tumorais com eficiência. Outros autores observaram que as mesmas Np aumentam o desempenho *in vivo* do fármaco, aumentando sua biodisponibilidade e diminuindo sua toxicidade (MUNDARGI et al, 2008).

As nanopartículas planejadas pelos pesquisadores da UFRN foram produzidas pela técnica de deslocamento do solvente ou nanoprecipitação, utilizando o co-polímero PLGA 50:50 – polímero biodegradável, pois o mesmo sofre hidrólise e é convertido em ácido lático e ácido glicólico, que são metabolizados no ciclo de Krebs.

Este polímero é amplamente utilizado para sistemas de liberação modificada de fármacos e em processos de reconstituição óssea, aprovado pelo Food and Drug Administration (FDA) e Europe Medicine Agency (EMA) (JOSE et al., 2014).

A metodologia foi otimizada para obter partículas com tamanho próximo de 100nm, testando diferentes tipos de tensoativos (álcool polivinílico, polissorbato 80, polissorbato 85, monooleato de sorbitano 80, poloxamer 188 e poloxamer 407), diferentes razões copolímero/tensoativo, e diferentes métodos de titulação do surfactante. Para obtenção das partículas usadas na formulação, a solução do PLGA 0,5% m/v em acetona foi titulada em solução aquosa contendo 1% m/v de poloxamer188 (na razão de 30:70v/v) sob agitação magnética (700rpm), a qual permaneceu sob agitação a temperatura ambiente e por 24 horas para evaporação do solvente orgânico.

Para funcionalização da carga catiônica na superfície das partículas, diferentes razões copolímero/polietilenoimina (Pei) (1:7, 1:5 e 1:2 m/m) foram testadas. Para preparar as formulações contendo a Dox, o fármaco foi dissolvido na solução orgânica na razão fármaco:copolímero 1:10 m/m.

O diâmetro das partículas e o potencial zeta foi determinado pela técnica de espalhamento de luz dinâmico em um analisador de tamanho de partículas Zeta Potential Analyser (Brook haven Instruments, USA) com luz incidente no comprimento de 659 nm, com ângulo de detecção de 90°, sob temperatura de 25°C. As amostras foram diluídas em água purificada na razão de 1:100 v/v, a fim de ajustar a viscosidade das mesmas de acordo com os parâmetros de leitura do equipamento para a viscosidade da água. As formulações foram acompanhadas por seis semanas.

A citototoxicidade das nanopartículas foi avaliada em comparação com a solução salina na linhagem celular de células de epitélio renal de macacos africanos (Vero E6). Camadas monocelulares foram cultivadas em placas de 96 poços e incubadas na presença das formulações contendo diferentes concentrações de partículas (5 a 160 g/mL). As placas foram incubadas por 24 e 48 horas em estufa a 37 °C e 5% de CO₂, utilizando meio de cultura Leibovitz (L-15) para células Vero E6. Todos os ensaios foram realizados com seis replicatas. Ao final do processo, a viabilidade celular foi avaliada pelo ensaio do já estabelecido na literatura.

As etapas anteriores demonstraram que o poloxamer 188 (pluronic F68) foi o melhor tensoativo para estabilização das nanopartículas de PLGA produzidas nas condições selecionadas. As partículas se apresentaram estáveis com tamanho em torno de 160 nm e com potencial zeta em torno de -10mV. A

adição de polietilenoimina (PEI) na razão PEI/PLGA de 1:7 w/w levou a redução do tamanho de partículas em torno de 85 nm devido ao caráter anfifílico da PEI e neutralização do potencial zeta, indicando a distribuição do polícatión na superfície das partículas. O aumento da razão PEI/PLGA para 1:5 e 1:3 foi realizado fixando a concentração de PEI em 0,1% e diminuindo a de PLGA para 0,5 e 0,25%, a qual contribuiu ainda mais para a redução do tamanho das partículas e para o aumento do potencial zeta, tornando possível a escolha da formulação contendo PEI/PLGA na razão de 1:5 (0,5% de PLGA e 0,1% de PEI), que apresentou tamanho em torno de 60 nm e potencial zeta em torno de +20 mV. Após a incorporação do fármaco na razão Dox/PLGA 1:10 m/m, foi verificada uma eficiência de incorporação de $73,53\% \pm 0,34\%$, que contribuiu para o aumento do tamanho de partícula para em torno de 72nm.

A PEI 25KDa é amplamente utilizada para muitas finalidades, mas possui como fator limitante a citotoxicidade, inerente das polietilenoiminas de cadeia hiper ramificada longa. Assim, além do estudo do efeito da razão de PEI no tamanho e carga de superfície das partículas, foi realizado um estudo de viabilidade celular para as formulações sem PEI e com diferentes razões PEI/PLGA de 1:7, 1:5 e 1:3, respectivamente. O ensaio foi realizado pelo método do MTT em células VERO expostas a diferentes concentrações de partículas 160, 80, 40, 20,10 e 5 $\mu\text{g/mL}$ em 24 horas e 48 horas.

Uma vez comprovada a biocompatibilidade deste sistema, e mais precisamente da concentração de PEI utilizada, este estudo demonstrou as propriedades físico-químicas e biocompatibilidade necessárias para avançarmos nos estudos de comparação da formulação proposta e das formulações já disponíveis no mercado.

No presente trabalho o objetivo foi avaliar a nova formulação proposta pelos pesquisadores da UFRN e compará-la às formulações comerciais de Dox (na forma de cloridrato e lipossomal), quanto a atividade antitumoral *in vitro* e *in vivo* e suas características farmacocinéticas.

Esta investigação trouxe informações relevantes sobre a utilidade prática das nanopartículas para veicular este antineoplásico, de forma que seu efeito terapêutico seja mantido ou melhorado, e seus efeitos tóxicos sejam minimizados através de uma formulação desenvolvida nacionalmente e com o escopo de competitividade no mercado.

6. REFERÊNCIAS

AHMAD, N. et al. Enhancement of oral bioavailability of doxorubicin through surface modified biodegradable polymeric nanoparticles. **Chemistry Central Journal**. v. 12, n. 65, p.1-14. 2018. DOI <https://doi.org/10.1186/s13065-018-0434-1>.

ALHARETH, K. Conformation of surface-decorating dextran chains affects the pharmacokinetics and biodistribution of Doxorubicin-loaded nanoparticles. **European Journal of Pharmaceuticals and Biopharmaceutics**.; v. 81, n. 2, p.453-457. 2012.

ALVAREZ-ROMAN, R. et al. Biodegradable polymer nanocapsules containing a sunscreen agent: preparation and photoprotection. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**.v.52, n. 2, p.191-195.2001.

ANDERS, C. K. et al. Pharmacokinetics and Efficacy of PEGylated Liposomal Doxorubicin in an Intracranial Model of Breast Cancer. **PLoS ONE**. v.8, n5:. doi:10.1371/journal.pone.0061359. 2013

ASSUMPCAO, J. U. et al. Biocompatible microemulsion modifies the pharmacokinetic profile and cardiotoxicity of Doxorubicin. **Journal of Pharmaceutical Science**. v. 102, n. 1, p.289-96. 2013.

BARENHOLZ, Y. C. Doxil® — The first FDA-approved nano-drug: Lessons learned. **Journal of Controlled Release**. v. 160, p. 117–134. 2012. DOI 10.1016/j.jconrel.2012.03.020.

BERNDT, E. R.; COCKBURN, I. M.; GREPIN K. A. The impact of incremental innovation in biopharmaceuticals: drug utilisation in original and supplemental indications. **Pharmacoeconomics**. v. 24, n. 2, p. 69-86. 2006.

BEDUNEAU, A.; SAULNIER, P.; BENOIT, J.P. Active targeting of brain tumors Using nanocarriers. **Biomaterials**. v. 28, n. 33, p. 4947-67. 2007.

BHATNAGAR, P. et al. Hyaluronic acid grafted PLGA copolymer nanoparticles enhance the targeted delivery of Bromelain in Ehrlich's Ascites Carcinoma. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**. n. 105, p. 176–192.2016.

BICKER, J. et al. Falcao A. Blood-brain barrier models and their relevance for a successful development of CNS drug delivery systems: a review. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**. v. 87, n. 3, p. 409-32.2014.

BJORNSSON, T.D. Practical uses of individual pharmacokinetic parameters in drug development and clinical practice: examples and simulations. **European Journal of Drug Metabolism and Pharmacokinetics**. v. 22, n.1, p. 1-14. 1997.

BOROUJERDI, M. **Pharmacokinetics**: principles and applications. New York:Appleton & Lange, 2001.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA. Resolução RDCnº 27, de 17 de maio de 2012. **Guia para validação de métodos bioanalíticos**. Diário Oficial da União, Brasília, 10 de abril de 2013. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br>. Acesso em: 20 dezembro de 2016.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA. **Guia para a condução de estudos não clínicos de toxicologia e segurança farmacológica necessários ao desenvolvimento de medicamentos.**/ Gerência de Avaliação de Segurança e Eficácia – GESEF. p. 05, Brasília, 31 de janeiro de 2013 – Versão 2. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/documents/33836/351410/Guia+para+a+Condu%C3%A7%C3%A3o+de+Estudos+N%C3%A3o+Cl%C3%ADnicos+de+Toxicologia+e+Seguran%C3%A7a+Farmacol%C3%B3gica+Necess%C3%A1rios+ao+Desenvolvimento+de+Medicamentos/0afb3f3b-7a32-4232-a7e2-de8ef460c9f7>. Acesso em: agosto de 2016.

BRASIL. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA). **Estimativa 2018: Incidência de Câncer no Brasil**. Ministério da Saúde, Rio de Janeiro, INCA, 2017. Disponível em: Biblioteca Virtual em Saúde Prevenção e Controle de Câncer (<http://controlecancer.bvs.br/>) e no Portal do INCA (<http://www.inca.gov.br>). Acesso em: Agosto de 2018.

BRISTOW, M. R. et al. Clinical spectrum of anthracycline antibiotic cardiotoxicity. **Cancer Treatment Reviews**.v.62, n. 6, p.873-879.1978.

BRUNTON, L. L. (Ed.) et al. **Goodman & Gilman**: As bases Farmacológicas da Terapêutica. 11ª ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill Interamericana do Brasil.2010, p. 2112.

CAILLEAU, R. et al. Long-term human breast carcinoma cell lines of metastatic origin: preliminary characterization. **In Vitro**. v 14, n. 11, p. 911-915. 1978.

CANDIDO, C. D. et al. Biocompatible Microemulsion Modifies the Tissue Distribution of Doxorubicin. **Journal of Pharmaceutical Science**. v. 103, n. 10,p.3297-3301. 2014.

CARON, J.; NOHRIA, A. Cardiac Toxicity from Breast Cancer Treatment: Can We Avoid This? **Current Oncology Reports**. v. 20, p. 60-68. 2018. DOI <https://doi.org/10.1007/s11912-018-0710-1>

CARVALHO, F. S. et al. Doxorubicin-induced cardiotoxicity: from bioenergetic failure and cell death to cardiomyopathy. **Medicinal Research Reviews**. v. 34,n.1, p. 106-35. 2014.

CHATTERJEE, K. Doxorubicin cardiomyopathy. **Cardiology**. v. 115, n. 2,p. 155-62. 2010.

CHEN, Z. C.; CHEN, L. J.; CHENG, J.T. Doxorubicin-Induced Cardiac Toxicity Is Mediated by Lowering of Peroxisome Proliferator-Activated Receptor δ Expression in Rats. **PPAR Research**. v. 2013, p. 8. 2013.

CHENG, Y. et al. Multifunctional nanoparticles for brain tumor imaging and therapy. **Advanced Drug Delivery Reviews**. v. 66, p. 42-57. 2014.

COWENS, J. W. et al. Initial clinical (phase I) trial of TLC D-99 (Doxorubicin encapsulated in liposomes). **Cancer Research**. v. 53, n. 12, p. 2796-802. 1993.

DEUS, C. M. et al. Stimulating basal mitochondrial respiration decreases doxorubicin apoptotic signaling in H9c2 cardiomyoblasts. **Toxicology**. v 334, p. 1–11. 2015. DOI <http://dx.doi.org/10.1016/j.bcp.2013.09.007>.

DEUS, C. M. et al. Sirtuin 1-dependent resveratrol cytotoxicity and pro-differentiation activity on breast cancer cells. **Archives of Toxicology**. v 91, p. 1261–1278. 2017. DOI [10.1007/s00204-016-1784-x](https://doi.org/10.1007/s00204-016-1784-x).

FAN, J.; LANNOY, I. A. M. Pharmacokinetics. **Biochemical Pharmacology**, 87, p. 93–120, 2014. DOI <http://dx.doi.org/10.1016/j.bcp.2013.09.007>.

FORMARIZ, T. P. **Formulação e caracterização físico-química e Biofarmacêutica de microemulsões lipídicas contendo Doxorubicina**. 2008. 164 p. Tese (Doutorado em Faculdade de Ciências Farmacêuticas), Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2008.

FORMARIZ, T. P. et al. Biotecnologia de sistemas coloidais aplicável na otimização do efeito terapêutico de fármacos usados no tratamento do câncer. **Infarma**. v. 16, n. 1-2, janeiro/fevereiro 2004.

GABIZON, A.; SHMEEDA, H.; BARENHOLZ, Y. Pharmacokinetics of Pegylated Liposomal Doxorubicin Review of Animal and Human Studies. **Clinical Pharmacokinetics**. v.42, n.5, p.419-436. 2003.

GABIZON, A.; SHMEEDA, H.; GRENADER, T. Pharmacological basis of pegylated liposomal doxorubicin: Impact on cancer therapy. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**. v. 45, p. 388–398. 2012. DOI [doi:10.1016/j.ejps.2011.09.006](https://doi.org/10.1016/j.ejps.2011.09.006)

GABIZON, A.; PATIL, Y.; LA-BECK, N. New insights and evolving role of pegylated liposomal doxorubicin in cancer therapy. **Drug Resistance Updates** v. 29, p. 90–106. 2016.

GHAFFARI, F. et al. Comparing Apoptosis and Necrosis Effects of Arctium Lappa Root Extract and Doxorubicin on MCF7 and MDA-MB-231 Cell Lines. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**. v 18, n. 3, p.795-802.2017.

GLUE P. et al. Pegylated interferon-alpha2b: pharmacokinetics, pharmacodynamics, safety, and preliminary efficacy data. Hepatitis C Intervention Therapy Group. **Clinical Pharmacology & Therapeutics**. v. 68, n.5, p. 556-567. 2000.

GORDON, A. N. et al. Recurrent epithelial ovarian carcinoma: a randomized phase III study of pegylated liposomal Doxorubicin versus topotecan. **Journal Clinical Oncology**. v. 19, n.14, p. 3312-22. 2001.

GORINI, S. et al. Chemotherapeutic Drugs and Mitochondrial Dysfunction: Focus on Doxorubicin, Trastuzumab, and Sunitinib. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**. v. 2018, p. 15. 2018. DOI <https://doi.org/10.1155/2018/7582730>.

GOVENDER, J. et al. Mitochondrial catastrophe during doxorubicin-induced cardiotoxicity: a review of the protective role of melatonin. **Journal of Pineal Research**. v. 57, p. 367-380. 2014. DOI 10.1111/jpi.12176.

GREENE, R. J.; HARRIS, N. D. **Patologia e Terapêutica para Farmacêuticos: Bases para a prática da Farmácia Clínica**. 3ª ed. Porto Alegre:2012. p. 968.

HANG, P. et al. Brain-derived neurotrophic factor attenuates Doxorubicin-induced cardiac dysfunction through activating Akt signalling in rats. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**. V. XX, n. X, p. 1-12. 2016.

IWAMOTO, T. Clinical application of drug delivery systems in cancer chemotherapy: Review of the efficacy and side effects of approved drugs. **Biological Pharm Bull**. v. 36, n. 5, p. 715-718. 2013.

JANG, G. R.; HARRIS, R. Z.; LAU, D. T. Pharmacokinetics and its role in small molecule drug discovery. **Medicinal Research Reviews**, v. 21, n. 5, p. 382-396, 2001.

JOSE, S. et al. Surface modified PLGA nanoparticles for brain targeting of Bacoside-A. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**. v. 63, p. 29-35.2014.

KANKEU, C. et al. Doxorubicin-induced chronic dilated cardiomyopathy—theapoptosis hypothesis revisited. **Journal Molecular Medicine**. DOI 10.1007/s00109-016-1494-0.2016.

KANTER, P. M. et al. Comparison of the cardiotoxic effects of liposomal Doxorubicin (TLC D-99) versus free Doxorubicin in beagle dogs. **In Vivo**. v. 7, n.1, p. 17-26. 1993.

KIMES, B. W. and BRANDT, B. L. Properties of a clonal muscle cell line from rat heart. **Experimental Cell Research**. v. 98, p. 367 – 381. 1976.

KOEHN, H. et al. Differential regulation of DNA repair protein Rad51 in human tumour cell lines exposed to doxorubicin. **Anti-Cancer Drugs**.v 18, p. 419–425. 2007.

KOLEINI, N.; KARDAMI, E. Autophagy and mitophagy in the context of doxorubicin-induced cardiotoxicity. **Oncotarget**. v. 8, n. 28, p. 46663-46680. 2017.

LEE, S. H.; ZHANG, Z.; FENG, S. S. Nanoparticles of poly(lactide)-tocopherylpolyethylene glycol succinate (PLA-TPGS) copolymers for protein drug delivery. **Biomaterials**.v. 28, n. 11, p. 2041-50. 2007.

LEONG,N.J., et al. Doxorubicin Conjugation and Drug Linker Chemistry Alter theIntravenous and Pulmonary Pharmacokinetics of a PEGylated Generation 4 Polylysine Dendrimer in Rats. **Journal of Pharmaceutical Sciences**. v. 107, n. 9, p. 2509–2513. 2018. DOI <https://doi.org/10.1016/j.xphs.2018.05.013>.

LI, M. et al. Physiologically Based PharmacokineticModeling of Nanoparticles. **ACS Nano** v. 4, n. 11, p. 6303–6317. 2010. DOI 10.1021/nn1018818.

LI, M. et al. Physiologically Based Pharmacokinetic (PBPK) Modeling of PharmaceuticalNanoparticles. **American Association of Pharmaceutical Scientists Journal**. v. 19, n. 1, p. 26–42. 2017. DOI 10.1208/s12248-016-0010-3

LIN, J. H.; LU, A. Y. H. Role of Pharmacokinetics and Metabolism in DrugDiscovery and Development. **Pharmacological Reviews**. v. 49, n. 4, p. 403 – 449. 1997.

LIU, D. A Rapid biochemical method for measuring chemical toxicity. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**. v.26, p. 145-9. 1981

LIU, Y. et al. PLGA nanoparticles for the oral delivery of nuciferine: preparation, physicochemical characterization and in vitro/in vivo studies. **Drug Delivery**. v. 1, n.24, p. 443-451. 2017.

LUCAS, A. T. et al. A sensitive high performance liquid chromatography assay for the quantification of Doxorubicin associated with DNA in tumor and tissues. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**. v. 119, p. 122–129. 2016.

MANSOUR, H.H.; EID, M.; EL-ARNAOUTY, M. B. Effect of silver nanoparticles synthesized by gamma radiation on the cytotoxicity of Doxorubicin in human cancer cell lines and experimental animals. **Human and Experimental Toxicology**.DOI: 10.1177/0960327116689717. 2017.

MAZZUCHELLI, S. et al. Nanometronomic treatment of 4T1 breast cancer with nanocaged Doxorubicin prevents drug resistance and circumvents cardiotoxicity. **Oncotarget**. 2016.

MCGOWAN, J. V., et al. Anthracycline Chemotherapy and Cardiotoxicity. **Cardiovascular Drugs and Therapy**. v. 31, p. 63–75. 2017. DOI 10.1007/s10557-016-6711-0.

MINOTTI, G.; MENNA, P.; SALVATORELLI, E.; CAIRO, G.; GIANNI, L. Anthracyclines: Molecular advances and pharmacologic developments in antitumor activity and cardiotoxicity. **Pharmacological Reviews**. v. 56, n. 2, p. 185-229, 2004. Disponível em: <http://pharmrev.aspetjournals.org/content/56/2/185.long>. Acesso em: julho de 2017.

MOSAFER, J. et al. In vitro and in vivo evaluation of anti-nucleolin-targeted magnetic PLGA nanoparticles loaded with Doxorubicin as a theranostic agent for enhanced targeted cancer imaging and therapy. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**. v. 113, p. 60–74. 2017.

MOSAFER, J. et al. Study and evaluation of nucleolin-targeted delivery of magnetic PLGA-PEG nanospheres loaded with Doxorubicin to C6 glioma cells compared with low nucleolin-expressing L929 cells. **Materials Science and Engineering C**. v. 72, p. 123–133. 2017.

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

MUNDARGI, R. C. et al. Nano/micro technologies for delivering macromolecular therapeutics using poly(D,L-lactide-co-glycolide) and its derivatives. **Journal of Controlled Release**. v. 125, n. 3, p. 193-209. 2008.

NIU, M. et al. Biodistribution and in Vivo Activities of Tumor-Associated Macrophage-Targeting Nanoparticles Incorporated with Doxorubicin. **Molecular Pharmaceutics**. v. 11, p. 4425-4436. 2014. DOI [dx.doi.org/10.1021/mp500565q](https://doi.org/10.1021/mp500565q).

OLIVEIRA, A. G. et al. Microemulsões: Estrutura e Aplicações como Sistema de Liberação de Fármacos. **Revista Química Nova**. v. 27, n. 01 p. 131-138, janeiro/fevereiro, 2004.

PAINE, T. M. et al. Characterization of epithelial phenotypes in mortal and immortal human breast cells. **International Journal of Cancer**. v. 50, p. 463 - 473. 1992.

PAN, Y. et al. The Application of Physiologically Based Pharmacokinetic Modeling to Predict the Role of Drug Transporters: Scientific and Regulatory Perspectives. **The Journal of Clinical Pharmacology**. v. 56, p. S122–S131. 2016. DOI: 10.1002/jcph.740.

PATEL, K. J.; TREDAN, O.; TANNOCK, I. F. Distribution of the anticancer drugs Doxorubicin, mitoxantrone and topotecan in tumors and normal tissues. **Cancer Chemotherapy Pharmacology**. v. 72, n. 1, p. 127-138. 2013.

PAYNE, D. L.; NOHRIA, A. Prevention of Chemotherapy Induced Cardiomyopathy. **Current Heart Failure Reports**. v. 14, p. 398–403. 2017. DOI 10.1007/s11897-017-0353-9

PEREIRA, G. C. et al. Cardiac cytochrome c and cardiolipin depletion during anthracycline-induced chronic depression of mitochondrial function. **Mitochondrion**.v. 30, p. 95–104. 2016.

PIPPA, L.F. **Farmacocinética, metabolismo e excreção renal da Doxorubicina em pacientes com câncer de mama**. 2016. Dissertação. (Mestrado em Toxicologia pela Faculdade de Ciências Farmacêuticas), Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2016.

PRIYA, L. B. et al. Neferine ameliorates cardiomyoblast apoptosis induced by doxorubicin: possible role in modulating NADPH oxidase/ROSmediatedNFκB redox signaling cascade. **Scientific Reports**. v. 7, n. 12283, p. 1 – 13. 2017.

PUGAZHENDHI, A. et al. Toxicity of Doxorubicin (Dox) to different experimental organsystems. **Life Sciences**. v.1, n. 200, p. 26-30. 2018. DOI 10.1016/j.lfs.2018.03.023.

QUILLES, M. B. **Atividade Anti – Tumoral e Imunomodulatória decomplexos de Paládio (II) Utilizando Modelo Experimental de Ehrlich**.2010. 107 f. Dissertação (Mestrado em Biociências e Biotecnologia Aplicada á Farmácia) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – UNESP, Araraquara,2010.

RAI, G. et al. Resveratrol improves the anticancer effects of Doxorubicin in vitro and in vivo models: A mechanistic insight. **Phytomedicine**. v. 23, p. 233–242. 2016.

RANG, H. P.; DALE, M. M. Rang & Dale's pharmacology. 7th. Edinburg; New York: Elsevier/Churchill Livingstone, 2016.

REN, S. et al. Comparison of pharmacokinetics, tissue distribution and pharmacodynamics of liposomal and free doxorubicin in tumour-bearing mice following intratumoral injection. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, V. 66, p. 1231–1239. 2014.

RODALLEC. A. et al. Pharmacokinetics variability: Why nanoparticles are not just magic-bullets in oncology. **Critical Reviews in Oncology / Hematology**.v. 129, p. 1–12. 2018. DOI <https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2018.06.008>.

SAAD-HOSSNE, R.; SAAD-HOSSNE, W.; PRADO, R. G. Efeito da solução aquosa de fenol, ácido acético e glicerina sobre o tumor ascítico de Ehrlich: Estudo experimental in vitro. **Apta Cirúrgica Brasileira**. v. 19, n. 1, p. 54-58, janeiro 2004.

SINGAL, P.K.; Iliskovic, N. Doxorubicin-induced cardiomyopathy. **The NewEngland Journal of Medicine**. DOI: 10.1056/NEJM199809243391307. v.339,n. 13, p. 900-905. 1998.

SINGH, G.; PAI, R. S. Pharmacokinetics and in vivo biodistribution of optimized PLGA nanoparticulate drug delivery system for controlled release of emtricitabine. **Drug Delivery**. v. 21, n. 8, p. 627-635. 2013. DOI 10.3109/10717544.2013.867382.

SILVA, C. E. V.; CAMACHO, A. A. Alterações ecocardiográficas em cães sob tratamento prolongado com doxorubicina. **Arquivo Brasileiros de Medicina Veterinária Zootecnia**. v. 57, n. 3, p.300-306, junho 2005.

SOULE, H. D. et al. A Human Cell Line From a Pleural Effusion Derived From a Breast Carcinoma. **Journal of the National Cancer Institute**. v. 51, n.5, p.1409 – 1416. 1973.

STEINIGER S. C., KREUTER J., KHALANSKY A.S., et al. Chemotherapy of glioblastomain rats using Doxorubicin-loaded nanoparticles. **International Journal Cancer**. v. 109, n. 5, p. 759-67. 2004.

TAGLIAFERRI P. et al. New pharmacokinetic and pharmacodynamic tools forinterferon-alpha (IFN-alpha) treatment of human cancer. **Cancer Immunol Immunother**. v. 54, n. 1, p 1-10. 2005.

TAMAYO-ORBEGOZO E. et al. Palmar-plantar erythrodysaesthesia and non pegylated lipossomal Doxorubicin.A case study.**Farm Hosp**.v.35, n. 1, p. 46-47.2011.

TOUTAIN, P. L., BOUSQUET-MELOU, A. Plasma Clearance. **Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics**, v. 27, n. 6, p. 415-25, 2004a.

TOUTAIN, P. L., BOUSQUET-MELOU, A. Plasma terminal half-life. **Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics**, v. 27, n. 6, p. 427-39, 2004b.

TOUTAIN, P. L., BOUSQUET-MELOU, A. Volumes of distribution. **Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics**. v. 27, n. 6, p. 441-53, 2004c.

TOZER, T. N.; ROWLAND M. **Introduction to Pharmacokinetics and Pharmacodynamics**: the quantitative basis of drug therapy, 1^a edition. Artemed, Porto Alegre, 2009, p 75 - 116.

VAIL, D.M. et al. Pegylated Lipossomal Doxorubicin: Proof of Principle Using Preclinical Animal Models and Pharmacokinetic Studies. **Seminars in Oncology**. v.31, n.13, p.16-35. 2004.

VARRICHI, G. et al. Antineoplastic Drug-InducedCardiotoxicity: A Redox Perspective. **Frontiers in Physiology**. v.7, n. 167, p. 1-18. 2018. DOI 10.3389/fphys.

VILLANI, F.; BERETTA, G.; GUINDANI A. Evaluation of early doxorubicin induced cardiotoxicity by means of systolic time intervals.**Cancer Chemother Pharmacology**.v.3, n.4, p.249-51. 1979.

WALZL, A. et al. The resazurin reduction assay can distinguish cytotoxic from cytostatic compounds in spheroid screening assays. **Journal of Biomolecular Screening**. v. 19, n.7, p. 1047– 1059. 2014.

WANG, C. et al. Extending half-life of H-ferritin nanoparticle by fusing albumin binding domain for doxorubicin encapsulation. **Biomacromolecules**. v.12, n. 19(3), p. 773-781. 2018. DOI: 10.1021/acs.biomac.7b01545.

WANG, C. et al. In vivo pharmacokinetics, biodistribution and the anti-tumor effect of cyclicRGD-modified doxorubicin-loaded polymers in tumor-bearing mice. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**. v. 146, n. 1, p. 31-38. 2016. DOI <http://dx.doi.org/doi:10.1016/j.colsurfb.2016.05.054>

WANG, J. et al. Improved oral absorption of doxorubicin by amphiphilic copolymer of lysine-linked di-tocopherol polyethylene glycol2000 succinate: In vitro characterization and in vivo evaluation. **Molecular Pharmaceutics**. v. 12, n. 2, p. 463-473. 2015. DOI 10.1021/mp500833m.

WANG, J. et al. A Micelle Self-Assembled from Doxorubicin-Arabinosyl Conjugates with pH-Cleavable Bond for Synergistic Antitumor Therapy. **Nanoscale Research Letters**. v. 12, n.73. DOI 10.1186/s11671-017-1836-z.2017.

WATERHOUSE, D. N. et al. A comparison of liposomal formulations of Doxorubicin with drug administered in free form: changing toxicity profiles. **Drug Safety**. v.24, n. 12, p.903-920. 2001.

ZAMBONI, W. C. Liposomal, Nanoparticle, and Conjugated Formulations of Anticancer Agents. *Clinical Cancer Research*. v. 11, n. 23, p. 8230-8234. 2005. DOI 10.1158/1078-0432.CCR-05-1895

ZHANG, C. et al. Quantification of Dox bioavailability in biological samples of mice by sensitive and precise HPLC assay. **Pharmaceutical Biology**. v. 54, n. 1, p. 55-61. 2016. DOI: 10.3109/13880209.2015.1014918

ANEXO

Anexo i-

Protocolo CEUA/FCF/CAr nº 55/2015

Interessada: CAROLINE DAMICO CANDIDO

Orientadora: Profa. Dra. Rosângela Gonçalves Peccinini

Projeto: Farmacocinética da Doxorrubicina: Um estudo comparativo entre a forma cloridrato, lipossomal e nanopartículas poliméricas

Parecer nº 07/2016 – Comissão de Ética no Uso de Animais

A Comissão de Ética no Uso de Animais desta Faculdade, reunida em 03 de março de 2016, considerou que o protocolo para uso de animais na pesquisa: "Farmacocinética da Doxorrubicina: Um estudo comparativo entre a forma cloridrato, lipossomal e nanopartículas poliméricas", apresentado pela Pós-graduanda CAROLINE DAMICO CANDIDO, sob orientação da Professora Doutora Rosângela Gonçalves Peccinini, do Departamento de Princípios Ativos Naturais e Toxicologia desta Faculdade, está estruturado dentro dos princípios éticos na experimentação animal do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal - CONCEA, manifestando-se FAVORÁVEL à sua execução.

O relatório final do protocolo de pesquisa deverá ser entregue em SETEMBRO de 2016 em formulário para este fim.

Araraquara, 09 de março de 2016.



Prof. Dr. CARLOS CESAR CRESTANI
Coordenador da CEUA

Anexo II-

Protocolo CEUA/FCF/CAr nº 56/2015

Interessada: CAROLINE DAMICO CANDIDO

Orientadora: Profa. Dra. Rosângela Gonçalves Peccinini

Projeto: Farmacocinética da Doxorrubicina: Um estudo comparativo entre a forma cloridrato, lipossomal e nanopartículas poliméricas

Parecer nº 08/2016 – Comissão de Ética no Uso de Animais

A Comissão de Ética no Uso de Animais desta Faculdade, reunida em 03 de março de 2016, considerou que o protocolo para uso de animais na pesquisa: "Farmacocinética da Doxorrubicina: Um estudo comparativo entre a forma cloridrato, lipossomal e nanopartículas poliméricas", apresentado pela Pós-graduanda CAROLINE DAMICO CANDIDO, sob orientação da Professora Doutora Rosângela Gonçalves Peccinini, do Departamento de Princípios Ativos Naturais e Toxicologia desta Faculdade, está estruturado dentro dos princípios éticos na experimentação animal do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal - CONCEA, manifestando-se FAVORÁVEL à sua execução.

O relatório final do protocolo de pesquisa deverá ser entregue em JUNHO de 2016 em formulário para este fim.

Araraquara, 09 de março de 2016.



Prof. Dr. CARLOS CESAR CRESTANI
Coordenador da CEUA

Anexo III-

Protocolo CEUA/FCF/CAr nº 57/2015

Interessada: CAROLINE DAMICO CANDIDO

Orientadora: Profa. Dra. Rosângela Gonçalves Peccinini

Projeto: Farmacocinética da Doxorrubicina: Um estudo comparativo entre a forma cloridrato, lipossomal e nanopartículas poliméricas

Parecer nº 09/2016 – Comissão de Ética no Uso de Animais

A Comissão de Ética no Uso de Animais desta Faculdade, reunida em 03 de março de 2016, considerou que o protocolo para uso de animais na pesquisa: "Farmacocinética da Doxorrubicina: Um estudo comparativo entre a forma cloridrato, lipossomal e nanopartículas poliméricas", apresentado pela Pós-graduanda CAROLINE DAMICO CANDIDO, sob orientação da Professora Doutora Rosângela Gonçalves Peccinini, do Departamento de Princípios Ativos Naturais e Toxicologia desta Faculdade, está estruturado dentro dos princípios éticos na experimentação animal do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal - CONCEA, manifestando-se FAVORÁVEL à sua execução.

O relatório final do protocolo de pesquisa deverá ser entregue em JANEIRO de 2018 em formulário para este fim.

Araraquara, 09 de março de 2016.



Prof. Dr. CARLOS CESAR CRESTANI
Coordenador da CEUA