

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA FILHO”

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE ARARAQUARA

**Avaliação de distribuição de doxorubicina incorporada em
microemulsão lipídica em tecido tumoral e cardíaco em
camundongos.**

CAROLINE DAMICO CANDIDO

Araraquara

2013

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA FILHO”

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE ARARAQUARA

**Avaliação de Distribuição de doxorrubicina incorporada em
microemulsão lipídica em tecido tumoral e cardíaco em
Camundongos.**

CAROLINE DAMICO CANDIDO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de Pesquisa e Desenvolvimento de Fármacos e Medicamentos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas UNESP, para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Prof^a. Dra. Rosângela Gonçalves Peccinini

Co- Orientadora: Prof^a Dra. Iracilda Zeppone Carlos

Araraquara

2013

Ficha Catalográfica

Elaborada Pelo Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
UNESP – Campus de Araraquara

C217a Candido, Caroline Damico
Avaliação de distribuição de doxorrubicina incorporada em
microemulsão lipídica em tecido tumoral e cardíaco em camundongos /
Caroline Damico Candido. – Araraquara. 2013
63 f.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista. “Júlio de
Mesquita Filho”. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós
Graduação em Ciências Farmacêuticas
Orientador: Rosângela Gonçalves Peccinini
Coorientador: Iracilda Zeppone Carlos

1. Doxorrubicina. 2. Microemulsão e distribuição. I. Peccinini.
Rosângela Gonçalves, orient. II. Carlos, Iracilda Zeppone, coorient. III.
Título.

Agradecimentos

Agradeço primeiramente a Deus por ter me abençoado com a oportunidade do estudo, e principalmente a vontade de sempre ir mais além.

Aos meus pais e toda família, pela compreensão e o apoio por todos esses anos, que nunca me deixaram faltar coragem e alegria para trabalhar apesar das adversidades sempre ao meu lado segurando em minhas mãos, sem eles jamais conseguiria tudo que consegui até aqui.

À minha orientadora Prof^a Dra. Rosangela Gonçalves Peccinini por acreditar em mim e me acompanhar nesse trabalho, e aos conhecimentos que me transmitiu, ajudando-me a evoluir profissionalmente.

Ao grupo de pesquisa do laboratório de Imunologia e a Prof^a Dra. Iracilda pelos conhecimentos, a paciência e a companhia nesses anos de trabalho.

Aos colegas de laboratório, pela indescritível companhia e compressão, guardarei no meu coração eternamente cada momento junto, pois além do título levo daqui crescimento pessoal, o que aprendi nesses anos jamais sairá de minha memória. E a todos aqueles me ajudaram e torceram nesta fase de minha vida que se encerra, agradeço com toda minha sinceridade.

"Você pode sonhar, criar e construir a idéia mais maravilhosa do mundo, mas são necessárias pessoas para fazer o sonho virar realidade" (Walt Disney).

Resumo

A doxorubicina (DOX) é o antineoplásico mais utilizado na terapêutica no tratamento de tumores sólidos e leucemias, porém sua cardiotoxicidade limita, muitas vezes, a continuidade do tratamento. Neste contexto, Formariz (2008) desenvolveu uma microemulsão (ME) contendo DOX (DOX-ME) que apresentou cardiotoxicidade reduzida – avaliada através da atividade da enzima MB da creatinina quinase (CKMB) - em relação ao produto comercial (pó liofilizado na forma de cloridrato). A DOX incorporada nessa nova ME apresentou aumento da DL_{50} em ratos *Wistar* e camundongos com manutenção da DE_{50} , com consequente aumento da sua margem de segurança. Em estudos de farmacocinética pré-clínica foi observado que a DOX incorporada a esta microemulsão lipídica teve seus parâmetros farmacocinéticos modificados, apresentando menor volume de distribuição e diminuição da cardiotoxicidade, fato que sugere menor captação do fármaco pelo miocárdio. Neste estudo investigou-se a distribuição da DOX em tecido cardíaco e tumoral em camundongos *Swiss* fêmeas, nas quais foi inoculado e desenvolvido o tumor de Ehrlich. Esses animais foram distribuídos em dois grupos ($n=7$ cada) que receberam, por via intraperitoneal e em dose única (10 mg/kg), a DOX veiculada por microemulsão (DOX-ME) ou na forma de cloridrato (DOX-Cl). Quinze minutos após a administração os animais foram sacrificados por deslocamento cervical e a massa tumoral total e o coração foram coletados. Após a coleta as amostras foram processadas e analisadas em um sistema UPLC Waters® com detecção por fluorescência ($\lambda_{exc} = 480$ nm; $\lambda_{em} = 560$ nm), utilizando coluna Acquity CSH C18 1,7 μm (2,1 x 100 mm), protegida por coluna de guarda Vanguard C18 1,7 μm (2,1 x 50 mm). A fase móvel foi constituída de acetonitrila : ácido fórmico 0,1% (40:60), em modo isocrático, em fluxo de 0,4 mL/min. O volume de injeção foi de 10 μL de amostra no sistema cromatográfico. O método bioanalítico desenvolvido foi validado de acordo com resoluções da ANVISA e com o guia do FDA, e demonstrou limites de confiança adequados para a sua aplicação na determinação da DOX em amostras de ambos os tecidos. A concentração média (IC95) de DOX encontrada no tecido cardíaco foi de 1,8 ng/mg (1,59-2,24) e 0,92 ng/mg (4,9 – 1,47) e em tecido tumoral 0,47 ng/mg (3,0 – 6,37) e 0,85 ng/mg (-0,14-1,85) para a DOX-Cl e DOX-ME respectivamente. A distribuição da DOX veiculada pela ME em tecido cardíaco apresentou valores significativamente inferiores com relação à distribuição da DOX-Cl ($p=0,0175$). As concentrações de DOX no tecido tumoral não apresentaram diferenças estatísticas significativas ($p=0,4557$). A diminuição da disponibilidade de fármaco para o tecido cardíaco observada neste estudo demonstra que o sistema microemulsionado é capaz de diminuir a cardiotoxicidade da DOX e manter o efeito terapêutico, tendo em vista a distribuição direcionada ao tecido alvo. Esses resultados evidenciam que esse sistema microemulsionado é uma alternativa promissora para melhorar a eficácia do antineoplásico e sua utilização na terapêutica.

Palavras chaves: doxorubicina, microemulsão e distribuição

Abstract

Doxorubicin (DOX) is the most used antineoplastic in the therapy for the treatment of solid tumors and leukemias but its cardiotoxicity often limits the continuity of the treatment. In this context, Formariz (2008) developed a microemulsion (ME) containing DOX (DOX-ME) that showed reduced cardiotoxicity - assessed by the activity of the enzyme creatine kinase MB (CK-MB) - in relation to the commercial product (in the form of hydrochloride lyophilized powder). The DOX incorporated into the new ME showed an increase of LD₅₀ in rats and mice with the maintaining of the ED₅₀, consequently increasing its safety margin. In preclinical pharmacokinetic studies was observed that the DOX lipid microemulsion had its pharmacokinetic parameters modified, with smaller volume of distribution and reduced cardiotoxicity, which suggests less drug uptake by the myocardium. In this study was investigated the distribution of DOX in cardiac tissue and tumor in female Swiss mice, which were inoculated and developed Ehrlich tumor. These animals were divided in two groups (n = 7) that received intraperitoneal dose (10 mg / kg) of DOX microemulsion (ME DOX) or hydrochloride (DOX-Cl) . Fifteen minutes after the administration, the animals were sacrificed by cervical dislocation and the total tumor mass and heart were collected. After collecting, the samples were processed and analyzed on a Waters ® UPLC System with fluorescence detection (λ exc = 480 nm; λ em = 560 nm) using column Acquity CSH C18 1.7 micrometre (2.1 x 100 mm) protected by guard column C18 Vanguard 1.7 micrometre (2.1 x 50 mm). The mobile phase consisted of acetonitrile: 0.1% formic acid (40:60) in isocratic flow at 0.4 ml / min. The injection volume was 10 μ L of sample into the chromatographic system. The bioanalytical method was validated in accordance with resolutions of ANVISA and the guidance of the FDA, and demonstrated confidence limits appropriate for their application in the determination of DOX in samples of both tissues. The average concentration (IC₉₅) of DOX found in cardiac tissue was 1.8 ng / mg (1.59 to 2.24) and 0.92 ng / mg (4.9 to 1.47) in tumor tissue and 0, 47 ng / mg (3.0 to 6.37) and 0.85 ng / mg (-0,14-1,85) to DOX and DOX-Cl ME respectively. The distribution of DOX conveyed by ME in cardiac tissue showed significantly lower values with respect to the distribution of DOX-Cl (p = 0.0175). The concentrations of DOX in tumor tissue showed no statistically significant differences (p = 0.4557). The decreased supply of drug to the cardiac tissue observed in this study demonstrates that the microemulsion system is capable of reducing the cardiotoxicity of DOX and maintain a therapeutic effect in view of the distribution directed to the target tissue. These results show that the microemulsion system is a promising alternative to improve the efficacy of anticancer and expand its use in therapy.

Key words: doxorubicin. microemulsion and distribution

Lista de abreviaturas

Apo E: apoliproteína E

ASC: área sob a curva

CHO: colesterol

CKMB: creatinafosfoquinase fração MB

CV: coeficiente de variação

DAU: daunorrubicina

DL₅₀: dose letal média

DNA: Deoxyribonucleic acid (ácido desoxirribonucleico)

DOX: doxorrubicina

DOX-Cl: doxorrubicina na forma de cloridrato

DOX-ME: doxorrubicina incorporada na microemulsão

EM: Álcool cetosteárilico etoxilado (emulgin)

FDA: Food and Drug Administration

FI: fluorescência

FS: fosfatidilcolina de soja

HPLC: high performance liquid chromatography (cromatografia líquida de alta eficiência)

IC: intervalo de confiança

LD: limite de detecção

LDL: low density lipoprotein (lipoproteína de baixa densidade)

LIQ: limite inferior de quantificação

ME: microemulsão

OS: oleato de sódio

PPAR α : Peroxisome proliferator-activated receptor (Receptor ativado por proliferadores de peroxissoma)

PBS: solução salina tamponada com fosfatos

PI: padrão interno

RPMI- 1640: *Roswell Park Memorial Institute* (meio de cultura – série 1640)

SD: Sprague Dawley

SNC: sistema nervoso central

TAE: tumor ascítico de Ehrlich

UPLC: ultra performance liquid chromatography (cromatografia líquida de ultra eficiência).

Vd: volume de distribuição

Lista de Figuras

Figura 1: Técnica para inoculação e manutenção das células tumorais <i>in vivo</i>	24
Figura 2: Animal recebendo inoculação subcutânea do tumor sólido no flanco da pata.....	26
Figura 3: Fluxograma do processamento das amostras.....	28
Figura 4: Animal com Tumor ascítico de Ehrlich desenvolvido, observar aumento expressivo do abdômen.....	34
Figura 5: Demonstra células tumorais viáveis não coradas, e células tumorais não viáveis coradas por Azul de tripan.....	35
Figura 6: Cromatograma de solução de DOX (2,5 µg/mL e PI (2 µg/mL).....	36
Figura 7: Cromatograma de amostra de tecido branco com adição de PI (0,5 µg/mg) (A), e cromatograma adicionado de DOX(1 µg/mg) e PI (0,5 µg/mg) (B).....	37
Figura 8: Curva analítica de DOX em tecido tumoral (n=3).....	38
Figura 9: Curva analítica de DOX em tecido cardíaco (n=3).....	39
Figura 10: Distribuição da DOX na forma de cloridrato em solução aquosa e incorporada a ME em tecido tumoral e cardíaco nas diferentes formulações...	46

Lista de Tabelas

Tabela 1. Precisão e Exatidão intra-ensaio em tecido Tumoral (n=5).....	40
Tabela 2. Precisão e Exatidão intra-ensaio em tecido cardíaco (n=3).....	40
Tabela 3. Precisão e Exatidão inter-ensaio em tecido tumoral (n=5).....	41
Tabela 4. Precisão e Exatidão inter-ensaio em tecido cardíaco (n=3).....	41
Tabela 5: Limite inferior de Quantificação.....	42
Tabela 6: Recuperação em tecido cardíaco expressa em porcentagem.....	42
Tabela 7: Recuperação em tecido tumoral expressa em porcentagem.....	43
Tabela 8: Estabilidade em Tecido Tumoral.....	44
Tabela 9: Estabilidade em Tecido Cardíaco.....	44
Tabela 10: Distribuição da DOX na forma de cloridrato em solução aquosa e incorporada a ME em tecido cardíaco e tumoral apresentados como media e mediana.....	46
Tabela 11: Concentração tecidual encontrada em cada animal com a respectiva formulação administrada	61

Sumário

1. Introdução	1
2. Revisão.....	7
2.1. Antraciclinas: aspectos farmacológicos e de toxicidade.....	7
2.2.Doxorrubicina e novas formulações com sistemas de liberação prolongada.....	10
3. Objetivos.....	18
3.1. Objetivo Geral.....	18
3.2. Objetivo Específico.....	18
4. Materiais e Métodos.....	19
4.1.Lista de Materiais	19
4.1.1. Matérias-primas, reagentes e solventes.....	19
4.1.2.Equipamentos.....	20
4.2. Modelo Animal.....	21
4.2.1. Protocolo Experimental	21
4.3.Preparo da Microemulsão de DOX.....	23
4.4.Linhagem celular tumoral utilizada e manutenção do tumor de Ehrlich <i>in vivo</i>	24
4.5. Inoculação de tumor sólido de Ehrlich.....	24
4.6. Desenvolvimento e validação do método bioanalítico para a determinação de DOX em tecido tumoral e cardíaco	26
4.6.1.Sistema cromatográfico	26
4.6.2. Processamento das amostras	27
4.6.3. Validação do método bioanalítico	28
4.6.3.1 Linearidade	29
4.6.3.2 Precisão intraensaios (repetibilidade) e interensaios (reprodutibilidade).....	29

4.6.3.3 Exatidão	30
4.6.3.4 Limite Inferior de Quantificação (LIQ)	30
4.6.3.5 Limite de Detecção (LD).....	31
4.6.3.6 Recuperação.....	31
4.6.3.7 Estabilidade	31
4.7. Análise Estatística	33
5. Resultados e Discussão	34
5.1. Manutenção da viabilidade das células tumorais <i>in vivo</i>	34
5.2. Inoculação do tumor sólido de Ehrlich.....	34
5.3. Desenvolvimento e validação do método bioanalítico	36
6. Avaliação da Distribuição da DOX em tecido tumoral e cardíaco de camundongos	44
7. Conclusões	49
8. Referências	50
9. Anexos.....	61

1. Introdução

A mutação e o crescimento descontrolado de um grupo de células indiferenciadas em uma região do organismo é denominado tumor, isto ocorre devido uma desorganização nos genes que controlam os processos de apoptose (FORMARIZ et al.,2004; BRANDÃO et al. 2009). Essas mutações podem ser provenientes de três etiologias, tais como genes que provocam alterações na seqüência do ácido desoxirribonucleico (DNA); ruptura de cromossomos, e a presença de vírus que possuem a capacidade de introduzir diferentes DNAs em células normais. A literatura mostra que hábitos alimentares, estilo de vida e condições ambientais são alguns fatores que contribuem para a manifestação clínica da doença originada dessas desordens gênicas (BRASIL, 2011).

Esta patologia pode ser benigna, caracterizada pelo crescimento de uma massa de células tumorais com crescimento lento e com grande probabilidade de cura, ou maligna, caracterizada por células de alta capacidade de multiplicação e neovascularização. Essas características tornam possível o aparecimento de metástase, com disseminação das células tumorais através do sistema linfático no estágio mais avançado da doença (GREENE e HARRIS, 2012).

A doença apresenta mais de 100 tipos de variações e acomete milhões de pessoas em todo o mundo (QUILLES, 2010). Dentre as formas mais encontradas estão o câncer de pulmão e de mama, este último, é considerado a principal causa de morte entre as mulheres, representando cerca de 23% de todos os tipos de câncer em todo o mundo (BRASIL, 2011).

Embora existam inúmeras formas de tratamento da doença, como a radioterapia e a imunoterapia, a quimioterapia ainda é a alternativa terapêutica mais utilizada e, na maioria dos casos, a mais eficaz. A quimioterapia é o tratamento de escolha para vários tipos de câncer, como o de mama e o de próstata podendo ser aplicada antes do procedimento cirúrgico tornando-o menos invasiva, pois devido a ação do quimioterápico pode ocorrer a regressão tumoral com diminuição dos riscos de metástase. Assim, a quimioterapia pode ser utilizada tanto em associação à outra terapia ou isoladamente, de acordo com a avaliação clínica da doença (BANKER e RHODES, 2009; FORMARIZ, 2004; BRASIL, 2010; BRASIL, 2011).

É reconhecido que a grande maioria das substâncias dotadas de atividade farmacológica sobre o organismo possui multiplicidade de efeitos. Esta característica, em algumas situações isoladas, apresenta vantagens sob o ponto de vista terapêutico. Por outro lado, também pode determinar o aparecimento de efeitos indesejados e nocivos, denominados efeitos adversos (TOZER e ROWLAND, 2009).

A quimioterapia consiste na administração de fármacos que atuam a nível celular para impedir o crescimento das células portadoras das alterações genéticas indesejáveis. Não obstante, esses fármacos não são seletivos, fato que determina o aparecimento de efeitos adversos durante o tratamento. Os efeitos adversos relacionados ao mecanismo de ação do fármaco são proporcionais à dose e às concentrações plasmáticas atingidas (BANKER e RHODES, 2009).

Um dos maiores problemas encontrados no tratamento com fármacos quimioterápicos é o aparecimento de efeitos adversos sistêmicos devido à falta

de seletividade do agente antitumoral para as células alvo, e a distribuição indiscriminada aos tecidos saudáveis (UPADHYAY et al., 2012).

Após a administração de formas farmacêuticas convencionais é comum ocorrer grandes oscilações das concentrações plasmáticas e teciduais do fármaco. Este fato decorre da existência de inúmeras barreiras químicas, físicas e biológicas entre o local de administração e os locais de distribuição, assim como da existência dos processos simultâneos de distribuição e eliminação enquanto ainda ocorre a absorção do fármaco. Neste percurso, encontram-se os tecidos “saudáveis” - não alvo - do organismo, susceptíveis aos efeitos tóxicos dos fármacos (OLIVEIRA et al., 2004; TOZER & ROWLAND, 2009).

Nos últimos anos, a procura pela utilização efetiva de sistemas de liberação de fármacos tem sido relevante no sentido de se estabelecer alternativas terapêuticas mais eficientes, que possibilitem administração com maior segurança e menor aparecimento de efeitos adversos (ASSUMPÇÃO et al., 2013).

Os sistemas de liberação modificada de fármacos são capazes de direcionar a substância ativa aos sítios onde esta deverá exercer o efeito farmacológico (OLIVEIRA et al., 2004).

Entre os sistemas de liberação modificada, as microemulsões (ME) têm sido aplicadas com a finalidade de introduzir no mercado medicamentos mais eficientes do ponto de vista farmacológico, com menor efeito tóxico e maior eficácia clínica. De forma geral, a literatura mostra que as MEs lipídicas apresentam grande potencial terapêutico como sistemas reservatórios, sendo capazes de direcionar fármacos para tecidos ou células específicas do

organismo, como por exemplo, as células tumorais (OLIVEIRA et al., 2004; FORMARIZ et al., 2010).

A doxorubicina (DOX) é um antibiótico antineoplásico do grupo das antraciclinas, isolado a partir de culturas fúngicas de *Streptomyces peucetius*, de uso corrente em oncologia, na forma de cloridrato (SILVA e CAMACHO, 2005). Apresenta um anel antraciclina em sua estrutura, que se intercala entre os pares de nucleotídeos da dupla fita de DNA nas fases de transcrição e replicação. Produz radicais livres altamente reativos, que conseqüentemente lesam a membrana celular e o DNA, induzindo lesões no miocárdio, o que limita a dose a ser administrada (MINOTTI et al., 2004)

O composto apresenta ampla distribuição no organismo - com exceção do sistema nervoso central (SNC) - e este fato contribui para o seu efeito cardiotoxico. Vale ressaltar que, entre as antraciclinas, a DOX tem sido considerada a de maior efeito danoso sobre o tecido cardíaco (ROSSI et al, 2010).

A doxorubicina é um dos antineoplásicos mais utilizados na terapêutica no tratamento de tumores sólidos e leucemias. Porém, embora o fármaco possua relevante atividade antineoplásica, a sua toxicidade tem limitado sua aplicação terapêutica (ASSUMPÇÃO et al., 2013).

Considerando esses aspectos, FORMARIZ (2008) desenvolveu uma ME incorporada de doxorubicina (DOX-ME) contendo em sua fase interna o colesterol, com o intuito de direcionar o fármaco para o tecido tumoral e diminuir sua distribuição para o miocárdio, reduzindo assim sua toxicidade. Os ensaios de DL_{50} realizados por FORMARIZ (2008) demonstraram menor toxicidade para a DOX-ME com relação à doxorubicina na forma de cloridrato

em camundongos e ratos Wistar. Além disso, para a DOX-ME, Formariz (2008) constatou eficácia antitumoral nos ensaios em camundongos portadores de tumor de Ehrlich.

Assumpção et al. (2013) comparou o perfil farmacocinético da DOX-ME com o perfil da doxorrubicina cloridrato em ratos Wistar. Os resultados mostraram que o perfil farmacocinético da DOX-ME apresentou diferenças significativas em relação a DOX na forma de cloridrato. Além disso, os animais que receberam a microemulsão apresentaram maiores concentrações plasmáticas de DOX e o fármaco apresentou menor volume de distribuição (Vd) quando comparado à doxorrubicina administrada na forma de cloridrato.

Neste mesmo trabalho, os autores compararam os efeitos da administração em dose única das formulações sobre o tecido cardíaco nesse modelo animal, através da determinação da atividade de CKMB sérica. Foi possível observar que 12 horas após a administração de DOX na forma de cloridrato os valores de atividade da CKMB sérica apresentaram elevação significativa em relação aos valores basais, anteriores à exposição dos animais ao fármaco. Foi possível observar ainda que, 12 horas após a administração de DOX-ME, os valores de CKMB sérica não apresentaram diferença significativa em relação aos valores basais. Assim, o grupo tratado com cloridrato de DOX apresentou aumento significativo em relação ao grupo tratado com DOX-ME, indicando cardiotoxicidade para o primeiro. Nesse trabalho atribuiu-se à ausência de cardiotoxicidade no grupo tratado com ME à composição lipídica da ME, o que lhe confere menor distribuição para o miocárdio, com conseqüente diminuição de efeitos tóxicos (ASSUMPÇÃO et al, 2013).

Assim, nesses estudos, foi possível observar que a microemulsão lipídica desenvolvida por FORMARIZ (2008) apresentou eficácia antitumoral aliada à menor cardiotoxicidade (ASSUMPÇÃO et al., 2013), aspectos que a tornam promissora para futura aplicação clínica.

A comparação da distribuição da DOX em tecido tumoral a partir da administração da ME e da solução aquosa na forma de cloridrato livre em camundongos com tumor de Ehrlich induzido foi realizada no presente trabalho com intuito de observar se a nova formulação realmente é capaz de direcionar o fármaco para o sítio alvo, conforme planejado. Para a realização desse trabalho, foi desenvolvido e validado um novo método bioanalítico para a determinação de doxorubicina em tecido tumoral e cardíaco por UPLC/FI. As informações obtidas nesse estudo são fundamentais para justificar a próxima etapa do desenvolvimento da formulação proposta, o ensaio clínico.

2. Revisão.

2.1. Antraciclinas: aspectos farmacológicos e de toxicidade.

As antraciclinas são fármacos antibióticos que estão entre os agentes antitumorais mais utilizados para o tratamento de neoplasias, em diferentes fases de seu desenvolvimento (CHEN; CHEN; CHENG, 2013).

As antraciclinas possuem um anel tetracíclico fixado a um açúcar incomum (daunosamina), além de componentes quinona e hidroquinona em anéis adjacentes, o que o torna propício à transferência de elétrons (BRUNTON, 2010).

Essa classe de fármacos é produzida pelo fungo *Streptomyces peucetius* var. *caesius*, e apresenta-se basicamente como epirrubicina, idarrubicina, daunorrubicina (DAU) e doxorrubicina (DOX), sendo este último um dos fármacos mais importantes na terapêutica de tumores sólidos como por exemplo câncer de mama e ovário, como no tratamento de leucemias (GUSTAFSON, 2002 ; SMITH et al., 2007).

Estes fármacos apresentam um grande potencial para a formação de radicais livres de oxigênio devido a presença principalmente dos grupamentos quinona, principais responsáveis pela miocardiopatia incomum e irreversível, porém dose dependente (MINOTTI et al., 2004; BRUNTON, 2010; CHEN; CHEN; CHENG, 2013).

Os mecanismos principais aos quais esta classe de agentes antitumorais exerce sua função citotóxica são classificados basicamente em três. Ao qual o primeiro deles é caracterizado pela capacidade destes compostos se intercalarem com as bases do DNA, danificando diretamente os processos de

transcrição e replicação. Essa ligação é de alta afinidade e promove a ruptura dos filamentos (BRUNTON, 2010).

O segundo mecanismo de citotoxicidade descrito, e um dos mais importantes, é a formação de um complexo tripartido com a topoisomerase II. Essa enzima é fundamental para a replicação e o reparo do DNA, e a ligação com compostos das antraciclinas inibe a religação dos filamentos do DNA, induzindo a célula aos processos de apoptose (SMITH et al., 2007; BRUNTON, 2010).

Esses fármacos, devido aos grupamentos quinonas, geram radicais livres tanto em solução quanto em tecidos. Essa característica das antraciclinas é a principal responsável pela sua cardiotoxicidade acentuada, sendo este o terceiro mecanismo responsável pela apoptose das células que entram em contato com o fármaco (BRUNTON, 2010).

As antraciclinas também podem formar complexos com oxigênio formando radicais superóxidos e promovendo a oxidação das bases nitrogenadas do DNA. O processo de formação de radicais livres está relacionado também à interação com o ferro. Este efeito pode ser amenizado através do uso de agentes antioxidantes, que estimulam a superóxido desmutase e a catalase, que desempenham um papel importante na defesa das células (BRUNTON, 2010; GREENE e HARRIS, 2012).

Os principais efeitos tóxicos das antraciclinas consistem em estomatite, náuseas e vômitos, alopecia e manifestações dermatológicas, além da depressão temporária da medula óssea, mas sem dúvida os principais são danos cardíacos como taquicardia, arritmias, hipotensão, derrame pericárdio e insuficiência cardíaca congestiva. Devido à mielossupressão, pacientes que

recebem tratamento principalmente com DAU e DOX não devem receber vacinas por vários meses após a interrupção do tratamento (CAETANO, 2008; LEE, 2009).

Segundo estudos recentes aproximadamente metade dos pacientes que utilizam a DOX desenvolvem doenças cardíacas até 10 a 20 anos após o termino das seções de quimioterapia (SMITH et al., 2007; SONTAG, et al., 2013, ECKMAN, et al., 2013). Esse dano cardíaco ainda não foi muito bem esclarecido, porém sabe-se que é dose-dependente, a complexação com o ferro, formação de radicais livres superóxidos, disfunção mitocondrial e alterações do receptores PPAR α , são os fatores principais envolvidos nesse processo de dano cardíaco (CHEN; CHEN; CHENG, 2013).

ECKMAN et al. (2013) realizaram estudos com ratos *Sprague Dawley* (SD) recebendo dose de 2,5 mg/Kg/ semana de DOX e além de estudos histológicos que comprovaram desorganização morfológica miofibrilar, vacuolização miocelular, necrose e fibrose intersticial a nível cardíaco, também observaram espessamento das artérias coronarianas, o que também aumenta o risco de enfarto agudo do miocárdio, mesmo após o termino do tratamento (ECKMAN et al., 2013)

As antraciclinas, em geral, são administradas pela via endovenosa e devem ser administrados com cautela, sem que haja extravasamento do mesmo para tecidos adjacentes, em decorrência da possibilidade da geração de grave processo inflamatório e ação vesicante, fato que pode levar à necrose local. (LEE, 2009; ASSUMPÇÃO, 2011)

Essa classe de fármacos é metabolizada por um complexo sistema de enzimas hepáticas e sua principal forma de excreção é através da bile. Não

apresentam distribuição no sistema nervoso central devido à sua incapacidade de atravessar a barreira hematoencefálica (GUSTAFSON, 2002).

A DOX é comprovadamente excretada pelo leite materno e, assim, não deve ser utilizada em lactantes e mulheres grávidas, devido sua toxicidade. É comum que pacientes em tratamento com DOX apresentem alteração na coloração da urina, pois embora sua excreção seja essencialmente biliar, seu principal metabólito, o doxorubicinol, pode ser encontrado na urina até 7 dias após a administração (CAETANO, 2008).

2.2.Sistemas de liberação modificada contendo doxorubicina.

A doxorubicina é um dos fármacos antineoplásicos mais utilizados no tratamento de inúmeros tipos de neoplasias, que vão desde tumores de mama, cólon de útero até leucemias, porém sua cardiotoxicidade e mielossupressão restringem o tratamento (CHEN; CHEN; CHENG, 2013). Desta maneira é cada vez maior o estudo de novas formulações capazes de direcionar o fármaco para o tecido tumoral com o intuito de minimizar sua distribuição para tecidos não alvo e garantindo eficácia clínica (OLIVEIRA et al., 2004).

Neste contexto, BIBBY et al. (2005) analisaram a farmacocinética e a distribuição da DOX carregada por nanopartículas composta por peptídeos. Este estudo foi realizado em camundongos fêmeas Balb/c, inoculadas com tumores de mama do tipo CI-66 e que receberam dose de 7,5 mg/ g de DOX. Os autores observaram que a DOX veiculada pelo sistema proposto apresentou distribuição diminuída para o coração e para o pulmão ao longo do tempo, porém observou-se acúmulo do fármaco no tecido hepático e no baço, além do tecido tumoral.

CUI et al. (2007) compararam a farmacocinética e a distribuição da DOX veiculada por duas formulações lipossomais revestidos por diferentes polímeros, em camundongos saudáveis (4 mg/kg) e com tumor (8 mg/kg). Neste estudo, a presença de tumor assim como as diferenças na composição dos lipossomas não acarretou diferenças significativas na farmacocinética da DOX administrada no modelo animal. Porém, quando observada a distribuição do fármaco em diferentes órgãos como fígado, baço, coração e pulmão, os autores constataram que o tamanho da cadeia do polímero utilizado na formação do lipossoma tem relação de proporcionalidade direta com a toxicidade da DOX sobre tecidos normais.

Em estudos envolvendo DOX carregada por polímeros, os autores avaliaram a biodistribuição do fármaco livre e veiculado pela formulação em camundongos Balb/c fêmeas com tumor ascito de Ehrlich (TAE) divididos em 2 grupos (n=3) e coletados órgãos como coração, pulmão, fígado, rins, baço, estômago, intestinos, músculos que circundavam a região tumoral e o próprio tumor. A dose utilizada foi de 5 mg/Kg administrada pela via intravenosa. Foi analisada a distribuição após a dissecação das amostras e avaliadas por radiofrequência cintilante. Observou-se aumento na distribuição da DOX veiculada em polímeros em relação a sua forma livre no tecido tumoral, além de aumento na retenção a nível hepático, porém houve diminuição na distribuição para o tecido cardíaco (UPADHYAY et al., 2011).

AYEN e KUMAR (2012) compararam a farmacocinética pré-clínica, a eficácia e a cardiotoxicidade da DOX veiculada em nanopartículas e em relação à formulação de DOX lipossomal, já disponível no mercado (LIPODOX[®]). As formulações foram administradas na dose de 6 mg/Kg em ratos Wistar com

tumores experimentais. Neste estudo os autores observaram diferenças farmacocinéticas, tais como o aumento da meia-vida terminal, e diminuição do clearance e do volume de distribuição para a DOX em nanopartículas, além da redução do efeito cardiotoxico do fármaco quando veiculado nessa formulação.

Em outro estudo, a DOX foi incorporada em dois sistemas distintos de nanopartículas, foi avaliado o perfil de concentrações plasmáticas e a distribuição em diversos tecidos - coração, pulmão, rins e fígado - de ratos Wistar hígidos. Esses animais receberam as formulações de DOX na dose de 6 mg/Kg. Os autores observaram influência significativa da superfície do sistema nanoparticulado sobre a distribuição do fármaco (ALHARETH et al., 2012).

HOSSAIN et al. (2013) desenvolveram um sistema nanoparticulado pH ácido dependente contendo DOX e realizaram testes de atividade e avaliação do crescimento e manutenção celular *in vitro* com células de ovário cancerígenas expostas ao fármaco na forma livre e incorporado ao sistema nanoparticulado proposto, analisadas por citometria de fluxo (dose 150 nM/mL). Os testes *in vivo* foram realizados em camundongos Balb/c inoculados por via subcutânea com células humanas cancerígenas do tipo HCT116 padronizadas. Os autores observaram maior regressão tumoral nos animais tratados com nanopartículas em relação ao fármaco livre.

LI et al. (2013) realizaram testes de eficácia e avaliação da farmacocinética da DOX veiculada por uma formulação nanoparticulada pH dependente. Os autores realizaram testes de hemólise e citotoxicidade *in vitro* demonstrando que, quando veiculada pela formulação proposta no estudo, os danos provocados pelo fármaco diminuiriam consideravelmente. Os ensaios de farmacocinética foram realizados em ratos *sprague dawley* (SD) que

receberam a dose de 4 mg/kg da DOX livre ou veiculada pela formulação. Os autores identificaram aumento significativo na meia vida terminal e da área sob a curva (ASC), além da diminuição do clearance do fármaco veiculado em relação a sua forma livre. A análise da distribuição da DOX foi realizada após administração das formulações em camundongos Balb/c machos, com desenvolvimento de tumores de pulmão - linhagem A549 humano - que foram divididos em 5 grupos, solução salina tamponada com fosfatos (PBS), DOX-Cl 2 mg/Kg e 4 mg/Kg, e DOX veiculada, doses correspondentes), por 4 ciclos (com intervalo de 3 dias). Foi realizada a coleta dos órgãos (coração, pulmão, fígado, baço e rins) e da massa tumoral, analisados por fluorescência *ex vivo*. Os autores observaram que a nova formulação foi capaz de direcionar o fármaco preferencialmente ao tecido tumoral, onde foram encontradas concentrações do fármaco superiores quando veiculado pela nanopartícula.

Outros estudos demonstram a utilização de formas alternativas para a distribuição diferenciada de DOX, como por exemplo, o estudo de PU et al. (2013), os pesquisadores utilizaram dendrímeros como carregadores do fármaco por administração intravenosa na dose de 5 mg/Kg, em 3 ciclos de tratamento realizados de 7 em 7 dias. Os testes foram realizados em camundongos Balb/C portadores de tumor do tipo 4T1 de câncer de mama. Os autores obtiveram resultados de eficácia superiores do fármaco carregado por dendrímeros constatados pela regressão do tumor em relação ao grupo que recebeu a DOX na forma de cloridrato.

Nos estudos de YUAN et al. (2013) foi desenvolvida uma formulação a base de albumina capaz de direcionar a DOX para tecidos tumorais, diminuindo sua distribuição para o tecido cardíaco. Foram utilizados camundongos ICR

machos, que receberam inoculação de suspensão de células tumorais de pulmão (H22). Após o desenvolvimento da massa tumoral esses animais receberam DOX intravenosamente, na forma livre e na forma carregada pela formulação proposta (5 mg/kg). Após 48 horas, esses animais foram sacrificados e órgãos - coração, pulmão, cérebro, fígado, baço e rins - e a massa tumoral foram analisados por fluorimetria. Os autores observaram que o sistema aumentou significativamente a distribuição de DOX para o tecido tumoral e manteve os níveis de distribuição nos demais órgãos. Para os testes de eficácia, no trabalho de YUAN et al. (2013) foram avaliados o tamanho do tumor e o peso corpóreo do animal após administração intravenosa de DOX na dose de 10 mg/kg. Os autores observaram que a nova formulação não só foi capaz de reduzir o tamanho do tumor como também manteve o peso dos animais que receberam tal formulação. Quanto à cardiotoxicidade, foram analisados os parâmetros CKMB, lactato desidrogenase, superóxido dismutase e malonaldeído, com seqüência de ecocardiograma para avaliação ventricular. Os resultados obtidos comprovaram a redução da cardiotoxicidade da DOX veiculada pela nova formulação.

XU, et al. (2013) desenvolveram e avaliaram a biodistribuição de micelas incorporadas de DOX, contendo em sua superfície aptâmeros, que são fragmentos de nucleotídeos altamente capazes de serem reconhecidos por proteínas de membrana específicas para cada tipo celular, tornando o sistema altamente seletivo, neste caso, para células de câncer de próstata. Neste estudo os autores realizaram testes *in vivo* com camundongos nude atímicos, inoculados com células tumorais e divididos em 3 grupos (n=4), que receberam uma dose intravenosa de 2,5 mg/Kg de DOX na forma livre, carregada pelas

micelas portadoras do aptâmero e de micelas não portadoras. Após 6 horas da administração, esses animais foram sacrificados, e coletados os órgãos como coração, pulmão, fígado, rins, baço e aparatos urogenitais, além da massa tumoral, e analisados *ex vivo* por imagens fluorescentes dos órgãos completos. Desta maneira foi possível observar a maior distribuição do fármaco em tecido tumoral carregado pelas micelas portadoras de aptâmeros em relação a não portadoras, que por sua vez apresentou maior distribuição quando comparados a DOX na forma livre.

FORMARIZ et al. (2006) desenvolveu e caracterizou uma microemulsão lipídica (ME) contendo fosfatidilcolina de soja, oleato de sódio e colesterol incorporada com DOX. Essa ME contendo DOX, foi preparada contendo diversas concentrações de colesterol e sistema tensoativo que em estudos *in vitro*, apresentou diferentes perfis de liberação proporcionais a concentração do colesterol presentes na fase interna (FORMARIZ et al. 2007). Em estudos subsequentes, FORMARIZ (2008) realizou o teste de eficácia em camundongos Swiss portadores de tumor de Ehrlich em fase sólida (n=9) com a DOX-ME em 3 doses (2,5; 5 e 10 mg/kg). Nesse estudo foi incluído um grupo controle negativo tratado com solução salina 0,9% e um grupo controle do sistema que recebeu a formulação (ME) livre do fármaco, avaliando o peso da massa tumoral após 3 ciclos de tratamento realizados de 7 em 7 dias. Neste estudo foi possível observar a regressão do tumor nos animais tratados com a ME-DOX em relação aos grupos tratados com salina e ME não incorporada. Também foi calculado a dose letal média (DL₅₀) da DOX administrada em ratos *Wistar* e camundongos *Swiss* machos divididos em 5 grupos (n=5) que receberam doses de 7,5; 8; 10 e 15 mg/Kg, e 5; 10; 20 e 30 mg/Kg de DOX-CI

respectivamente, além do grupo controle negativo que recebeu solução salina. Para o experimento da DL₅₀ da DOX-ME, foram utilizados 7 grupos (n=5) de ratos Wistar e camundongos Swiss machos, que receberam doses de 12; 15; 18 e 20 mg/Kg e 35; 50; 60 e 70 mg/Kg, respectivamente, além de um grupo que recebeu solução salina e outro que recebeu a ME não contendo dose. Os resultados deste estudo demonstraram que em ratos *Wistars* a DL₅₀ foi de 9,05 mg/Kg para 25,39 mg/Kg, e para camundongos *Swiss* de 12,25 mg/Kg para 54,65 mg/Kg, quando veiculada pela ME comparada com a DOX-Cl.

O sistema microemulsionado apresentou-se como um reservatório, incorporando o fármaco no interior da nanogotícula. A autora sugere que a microemulsão lipídica tem sua composição semelhante a LDL humana, com exceção de sua porção protéica que, em contato com plasma humano ou animal, adquire Apo E, que é reconhecida por receptores lipídicos e esses, por sua vez, encontram-se em grande quantidade em membranas de células tumorais devido principalmente a grande atividade mitótica, característica peculiar dessas células. Dessa forma, a toxicidade sistêmica do produto diminui, uma vez que as células do tecido cardíaco não apresentam quantidade expressiva desses receptores quando comparada as células tumorais.

ASSUMPÇÃO et al. (2013) realizaram estudos de farmacocinética pré-clínica em ratos *Wistar*, comparando a DOX na forma de cloridrato não incorporada e a DOX-ME. Os autores observaram maior volume de distribuição (Vd) - 68,85 vs 38,23 L/kg - para o fármaco na forma de cloridrato, e também maior meia vida de eliminação ($t_{1/2}$) também para essa forma do fármaco (16,51 vs 9,24 h) em relação ao incorporado a microemulsão. O tempo de ocorrência do estado de equilíbrio (tss) foi prolongado no grupo que recebeu a

DOX-ME (48,45 vs 31,68 minutos) quando comparado à DOX cloridrato. O menor volume de distribuição e o aumento da meia vida de eliminação encontrados na DOX-ME é compatível com o perfil de sistema reservatório planejado para essa formulação. O tss aumentado demonstra que o fármaco permanece por um maior tempo na circulação sistêmica e gradualmente é disponibilizado aos compartimentos periféricos do organismo.

No trabalho de ASSUMPÇÃO et al. (2013), ainda, avaliou-se a cardiotoxicidade do produto através da quantificação da enzima creatinofosfoquinase fração MB (CKMB). Não foram encontradas diferenças significativas entre os resultados pré e pós-exposição ao tratamento com DOX-ME. Para os animais que receberam a DOX na forma de cloridrato os valores de CKMB aumentaram significativamente. Assim concluiu-se que a formulação provavelmente foi capaz de modificar o acesso do fármaco ao miocárdio com redução da toxicidade uma vez que a mesma é dependente da concentração ao qual o tecido é exposto. No entanto, somente a quantificação do fármaco nesses tecidos poderia consolidar essa hipótese, objetivo de nosso trabalho.

3. Objetivos

3.1. Objetivo Geral

❖ Avaliar a distribuição de DOX incorporada em ME lipídica em tecidos tumoral e cardíaco de camundongos *Swiss* portadores de Tumor sólido de Ehrlich.

3.2. Objetivos Específicos

❖ Desenvolver e manter tumor de Ehrlich sólido em camundongos *Swiss* fêmeas;

❖ Desenvolver e validar um método bioanalítico para quantificar a DOX no tecido tumoral por UPLC;

❖ Determinar as concentrações de DOX em tecido tumoral e no tecido cardíaco do grupo tratado com a DOX-ME e com a formulação de comercial (DOX-Cl);

❖ Comparar as concentrações teciduais de DOX entre o grupo que recebeu a DOX-Cl e o grupo que recebeu o fármaco incorporado a ME.

4. Materiais e Métodos

4.1. Lista de Materiais

4.1.1. Matérias-primas, reagentes e solventes.

- Acetonitrila J.T. Baker[®], grau HPLC; USA;
- Acetato de Etila, Labsynth[®], Diadema-SP;
- Ácido perclórico, Merck[®], Brasil;
- Água ultrapura obtida em sistema Milli Q[®] com condutividade 18,2 $\mu\text{S} \cdot \text{cm}^{-1}$;
- Colesterol, Sigma-Aldrich[®], USA;
- Cloridrato de doxorubicina, Eurofarma[®], Brasil (50 mg de Cloridrato de doxorubicina, 200 mg de manitol e 250 mg de lactose);
- Cloreto de amônio, Labsynth[®] Ind. Bras. Ltda
- Daunorrubicina, Pfizer[®], Brasil
- Álcool cetoestearílico etoxilado (Emulgin)
- Fosfatidilcolina de soja (Epikuron[®] 200), Lucas Meyer, Alemanha;
- Metanol J. T. Baker[®], grau HPLC, USA;
- Oleato de sódio;
- meio de cultura RPMI – série 1640 (*Roswell Park Memorial Institute*)
- Solução Fisiológica.
- Solução salina tamponada com fosfato (PBS)
- Tampão Tris-HCl;

4.1.2.Equipamentos

- Agitador vortex, AP-56 Phoenix Luferco[®];
- Balança AY220, Shimadzu[®];
- Câmera de Neubauer (BOECO, Alemanha);
- Coluna Acquity[®] CSH C18 1,7 μ m (2,1 x 100 mm);
- Centrífuga Excelesa[®] II, Mod 206 BL;
- Centrífuga Fanem[®], Ind. Bras.;
- Detector de fluorescência Waters[®];
- Filtro de seringa PVDF, poro de 0,22 μ m, Flowsupply[®];
- MiniVac Sample Concentrator Range- Genevac[®];
- peagometro digital pG 1800 Gehaka[®];
- Coluna de guarda Vanguard[®] C18 1,7 μ m (2,1 x 5 mm);
- Seringa 1 mL BD[®];
- Sistema de cromatografia líquida de ultra-eficiência (UPLC) automático Waters[®];
- Software Empower[®];
- Sonicador Sonics[®], Vibra-Cell;
- Ultracentrífuga Sorval Biofuge[®];
- Ultrassom de haste - XL2020TM Sonicador Ultrasonic Liquid Processor[®]

4.2.Modelo Animal

Neste estudo foram utilizados camundongos Swiss fêmeas, com massa corporal de 20-25g, provenientes do Biotério Central da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Unesp- Araraquara. Esses animais foram transferidos para o Biotério do Departamento de Bioquímica desta mesma Instituição, em que receberam água tratada e ração balanceada *ad libitum*, além de ambiente com condições controladas como temperatura 23 ± 1 °C, umidade relativa do ar 55 ± 5 % e ciclo de luz de 12/12h. Os experimentos foram realizados na fase de claro.

O protocolo experimental foi aprovado pelo comitê de ética em pesquisa da Faculdade de Ciências Farmacêutica da Unesp- Araraquara/SP, sob o numero 36/2012.

Foram utilizados 14 animais, distribuídos em 2 grupos distintos:

- Grupo I: animais tratados DOX-CI (n=7, dose 10 mg/kg);
- Grupo II: animais tratados DOX-ME (n=7, dose 10 mg/kg);

4.2.1.Protocolo experimental

Após os animais receberem a inoculação do tumor sólido de Ehrlich e alcançado o desenvolvimento ideal (aproximadamente 25 dias), esse animais receberam uma administração intraperitoneal de DOX-CI ou DOX-ME (10 mg/kg). Quinze minutos após a administração os animais foram mortos para a retirada do coração e da massa tumoral para a determinação das concentrações teciduais de DOX através do método bioanalítico por UPLC anteriormente validado.

O numero de animais por grupo foi calculado segundo equação sugerida por CHOW e WANG (2001), onde:

$$n \geq [t(a, 2n - 2) + t(1 - b/2, 2n - 2)]^2 \times (cv / 20)^2$$

$$n \geq [t(0,05, 2 \times 3 - 2) + t(0,1, 2 \times 3 - 2)]^2 \times (17 / 20)^2$$

$$n \geq (2,132 + 1,533)^2 \times 0,7225$$

$$n \geq 13,432225 \times 0,7225$$

$$n \geq 9,7 \sim 10$$

e confirmado através da interação:

$$n \geq [t(0,05, 2 \times 10 - 2) + t(0,1, 18)]^2 \times (17 / 20)^2$$

$$n \geq [1,734 + 1,330]^2 \times 0,7225$$

$$n \geq 9,388096 \times 0,7225$$

$$n \geq 6,78 \sim 7$$

o nível de significância foi 5% (a) e o poder do teste de 80%, e valor inicial e o coeficiente de variação (cv) foi considerado segundo ALHARETH et al. (2012).

A dose utilizada nesse estudo (10 mg/kg) foi calculada através de extrapolação alométrica a partir da dose utilizada em ratos Wistar no estudo de ASSUMPÇÃO et al. (2013).

Grupo I: Cloridrato de Doxorrubicina (pó liofilizado).

Neste grupo, 7 animais receberam a dose de DOX-Cl, solubilizada em água estéril, através de administração intraperitoneal e foram mantidos em gaiolas por 15 minutos. Passado o tempo determinado após a administração, esses animais foram mortos por deslocamento cervical; o coração e a massa tumoral total foram imediatamente retirados, lavados com solução salina gelada e levados para o processamento descrito conforme item 4.3.2.

Grupo II: Doxorrubicina incorporada na microemulsão.

A microemulsão foi preparada anteriormente e a DOX comercial (pó liofilizado) incorporada na dose adequada. Em seguida este grupo composto também por 7 animais recebeu a dose de DOX-ME, através de administração intraperitoneal e foi mantido em gaiolas por 15 minutos. Após, esses animais também foram mortos por deslocamento cervical; o coração e a massa tumoral total foram imediatamente retirados, lavados com solução salina gelada e levados para o processamento descrito conforme item 4.3.2.

Em estudo piloto preliminar foram avaliados os tempos 15, 30 e 45 minutos para a coleta de órgãos após administração das formulações. O tempo de 15 minutos apresentou resultados satisfatórios, sendo selecionado para o protocolo experimental.

4.3.Preparo da Microemulsão contendo DOX

A ME foi preparada dissolvendo-se Eumulgin/FS/OS (35:35:30 p/p) na fase oleosa (CHO) em proporção previamente estabelecida (18,5% Eumulgin:FS:OS), 1,5% de CHO e 80% de água. A fase aquosa foi adicionada e, em seguida, o sistema foi submetido à ultrassom de haste, em modo descontínuo, por 20 minutos à temperatura ambiente (Formariz,2008).

Após homogeneização, a DOX-CI (pó liofilizado) foi adicionada na concentração de 1,5 mg/mL e o sistema foi centrifugado a 1.050 x g por 10 minutos, a fim de verificar se houve separação de fases do sistema.

4.4.Linhagem celular tumoral utilizada e manutenção do tumor de Ehrlich *in vivo*

As células tumorais foram obtidas no Laboratório de Imunologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Unesp/Araraquara através de punção do líquido intraperitoneal de um camundongo eutanasiado com crescimento aparente da forma ascítica do tumor de Ehrlich no abdômen. Para a manutenção da viabilidade celular foram realizados repiques no intervalo de 7 dias. Essa técnica consiste na punção do líquido peritoneal de um camundongo com tumor ascítico de Ehrlich desenvolvido, que foi então inoculado no peritônio de outro animal saudável (200ul) (Figura 1) (SAAD-HOSSNE, et al., 2004; QUILLES, 2010).

Figura 1: Técnica para inoculação e manutenção das células tumorais *in vivo*



4.5. Inoculação de tumor sólido de Ehrlich

Para a inoculação do tumor sólido de Ehrlich, foi realizada a punção de 1mL do fluido ascítico peritoneal de um animal que recebeu a inoculação sete dias antes ao experimento. Esse fluido, contendo células tumorais, foi então

transferido para um tubo cônico de plástico de 15 mL e adicionado 10 mL de solução de NH_4Cl estéril, para a retirada do fluido hemolisado, que foi levado a agitação em vórtex por 30 segundos, centrifugação ($200g \times 10$ minutos, a 27°C) e o sobrenadante descartado, esse procedimento foi realizado até a obtenção de um precipitado celular branco e denso. Para a retirada total do NH_4Cl foi adicionado ao precipitado 10 mL de tampão PBS pH 7,2 também estéril, agitado em vórtex por 30 segundos e centrifugado ($200g \times 5$ minutos).

Após a lavagem, descartou-se o sobrenadante e foi adicionado ao precipitado 1 mL de meio RPMI-1640-Completo estéril, e agitado em vortex por 30 segundos novamente. Dessa suspensão celular realizou-se então o teste de viabilidade celular por exclusão, onde foram pipetados 10 μL da suspensão celular e transferido para uma placa de 96 poços contendo 90 μL de azul de tripan em uma das cavidades, a suspensão então foi homogeneizada e novamente diluída na proporção de 1:9 (suspensão celular: azul de tripan). O homogeneizado foi então levado a leitura em microscopia óptica em câmara de Neubauer. As células consideradas viáveis são aquelas que não são coradas pelo azul tripan. Seguiu-se após a contagem de células viáveis, o ajuste de concentração de células para 1×10^7 células/mL, para a inoculação do tumor sólido. A suspensão de células em meio RPMI-1640-Completo, ajustada na concentração ideal, foi então inoculada em camundongos fêmea saudáveis, com peso de 20 – 25 g, no flanco da pata posterior esquerda, através de inoculação subcutânea de 200 μL da suspensão (Figura 2)

Figura 2: Animal recebendo inoculação subcutânea do tumor sólido no flanco da pata.



4.6. Desenvolvimento e validação do método bioanalítico para a determinação de DOX em tecido tumoral e cardíaco

O desenvolvimento do método bioanalítico é uma etapa fundamental para análise de fármacos em amostras biológicas. A técnica deve ser eficiente, rápida e de execução plausível tanto na extração do fármaco a partir da matriz biológica quanto na separação e quantificação do analito de interesse. O método bioanalítico desenvolvido foi baseado no método anteriormente desenvolvido por ASSUMPÇÃO et al. (2013) para determinação de DOX em plasma por HPLC. As condições cromatográficas do referido método foram transpostas no software Empower® do equipamento de UPLC e ajustadas para melhorar a performance cromatográfica.

4.6.1. Sistema cromatográfico

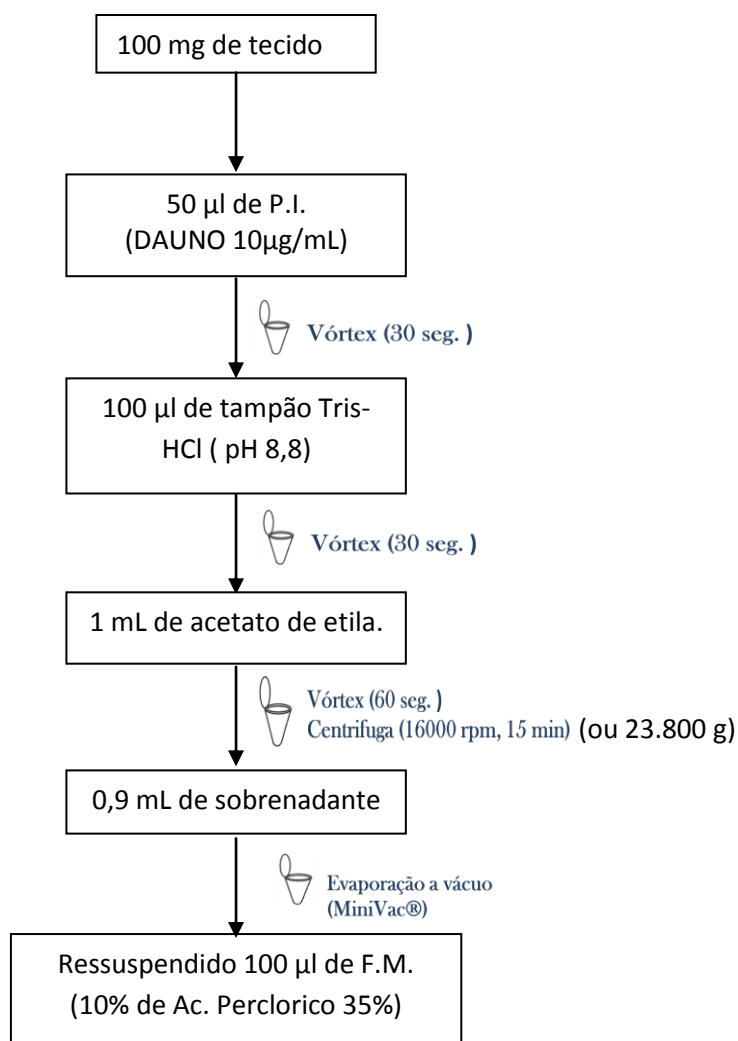
Foi utilizado um sistema de cromatografia líquida de ultra-eficiência (UPLC) Waters® automático, equipado com detector de fluorescência,

operando em comprimento de onda de excitação de 480 nm e de emissão de 560 nm. Para a análise do fármaco foi utilizada coluna Acquity[®] CSH C18 1,7 µm (2,1 x 100 mm), protegida por uma coluna de guarda Vanguard[®] C18 1,7 µm (2,1 x 5 mm). A fase móvel foi constituída de acetonitrila: ácido fórmico 0,1% (40:60), em modo isocrático, em fluxo de 0,4 mL/min. O volume de injeção foi de 10 µL de amostra processada. O injetor de amostras foi mantido a 10° C.

4.6.2. Processamento das amostras

O procedimento de extração da DOX de tecido tumoral e cardíaco foi desenvolvido a partir do método descrito por ALHARETH et al. (2012), com as adaptações necessárias à finalidade analítica de nosso estudo.

Deste modo 100 mg de tecido foram adicionados 50 uL de solução aquosa de DAU (10 ug/ml), agitando-se por 30 segundos em vortex, e 100 µL de tampão Tris-HCL (pH 8,8, 1M), agitando-se em vórtex por 30 segundos. Após agitação foi adicionado 1 mL de acetato de etila, procedendo-se novamente a agitação em vortex por 1 minuto e centrifugando-se por 15 minutos a 23.800 x g O sobrenadante foi retirado (900 uL), filtrado em filtro PVDF 0,22 µm e então evaporado à secua a vácuo (miniVac Sample Concentrator Range- Genevac[®]). O extrato seco foi ressuscendido em 100 uL de solução de fase móvel acrescida de 10 uL de solução de ácido perclórico 35%, novamente filtrado e injetado imediatamente no sistema cromatográfico descrito anteriormente. Na figura 3 é possível observar o fluxograma do processamento das amostras.

Figura 3: Fluxograma do processamento das amostras.

4.6.3. Validação do método bioanalítico

A validação do método bioanalítico compreende na etapa em que são determinados os seus limites de confiança. Em nosso trabalho a validação fundamentou-se nas resoluções da ANVISA RE- nº899, de 29 de maio de 2003, na RDC 27 de 17 de maio de 2012, e no Food and Drug Administration (FDA) segundo seu Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation, de maio de 2001. Os parâmetros que foram analisados para a validação do método proposto foram linearidade, precisão e exatidão intra-corrida e inter dia, limite inferior de quantificação (LIQ), recuperação e estabilidade.

4.6.3.1 Linearidade

Este parâmetro mostra a capacidade do método de produzir resultados diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra biológica, dentro de um intervalo específico de concentrações.

Foi construída uma curva analítica para cada uma das amostras plotando-se a razão dos picos DOX e DAUNO (padrão interno). O intervalo foi de 0,25 - 2,5 ng/mg, em 7 níveis diferentes de concentrações, em tecido cardíaco e tecido tumoral separadamente. As amostras foram analisadas em triplicata para ambos os tecidos. O critério de aceitação para este parâmetro é o coeficiente de correlação, onde os valores devem ser superiores a 0,98, demonstrando assim que o método foi linear. Através deste parâmetro também se obteve a equação da curva analítica, pois através dessa foi possível calcular as concentrações das amostras a partir dos resultados obtidos pela análise cromatográfica.

4.6.3.2 Precisão intraensaios (repetibilidade) e interensaios (reprodutibilidade)

A precisão do método foi avaliada através dos coeficientes de variação da análise de replicatas de amostras de tecido, em 3 concentrações 0,50; 0,75; 1,5 ng/mg para tecido tumoral em cinco replicatas, e de 0,5; 0,75; 1,50 ng/mg para tecido cardíaco em três replicatas adicionadas de DOX e DAUNO. A precisão inter-ensaios foi realizada em 2 dias diferentes de análise.

O critério de aceitação da precisão foi o coeficiente de variação, que avalia o quanto o resultado variou em uma mesma concentração não podendo exceder $\pm 15\%$, exceto para LIQ, onde é aceitável $\pm 20\%$.

4.6.3.3 Exatidão

Este parâmetro foi obtido através da concordância dos resultados obtidos experimentalmente e os valores teóricos de concentração do analito em cada uma das amostras biológicas, representando assim a porcentagem de erro sistemático que possa ocorrer durante o processamento.

A exatidão do método foi avaliada através da razão da concentração real obtida a partir da equação gerada pela curva analítica, pela concentração teórica experimental, e o resultado expresso em porcentagem após análise de replicatas de amostras de tecido, em 3 níveis de concentração: 0,5; 0,75 e 1,5 ng/mg em cinco replicatas para tecido tumoral, e de 0,5; 0,75 e 1,5 ng/mg em triplicata para tecido cardíaco adicionado de DOX e P.I (intraensaios) em dois dias diferentes (interensaios). Este parâmetro tem como critério de aceitação uma variação de 85 – 115%.

4.6.3.4 Limite Inferior de Quantificação (LIQ)

O LIQ corresponde à menor concentração quantificável do analito extraído de uma amostra biológica. A resposta do equipamento para o LIQ deve ser 5 vezes maior que o ruído da linha de base do cromatograma da amostra branco e deve apresentar coeficiente de variação de 20% para precisão e exatidão de 80-120%. Este ensaio foi realizado analisando-se amostras contaminadas com concentrações de analito decrescentes. Para o

tecido cardíaco foram realizadas 3 replicatas e para o tecido tumoral 5 replicatas.

4.6.3.5 Limite de Detecção (LD)

O LD é definido como a menor concentração de analito que o método conseguir identificar sem interferências do ruído da linha de base, sendo no mínimo 3 vezes superior ao ruído da amostra branco. Foi realizado analisando-se amostras com concentrações decrescentes até o menor nível detectável.

4.6.3.6 Recuperação

A recuperação avalia a perda do analito decorrente do processamento da amostra e, assim, a eficiência da extração do analito a partir da amostra biológica. Valores próximos de 100% de recuperação são desejáveis, porém se os valores forem inferiores, devem ser constantes em todos os níveis de concentração.

A recuperação foi realizada através da adição de DOX, ao extrato branco ressuspendido, obtido a partir do processamento de amostras teciduais separadamente livres do analito, em 3 replicatas para 3 níveis de concentração, sendo um nível baixo (0,5 ng/mg), um médio (0,75 ng/mg) e um nível alto (1,5 ng/mg).

4.6.3.7 Estabilidade

Este parâmetro demonstra o quanto o analito é estável na amostra biológica em diferentes condições de armazenamento, para a realização destes

ensaios, as amostras foram adicionadas de solução aquosa de DOX nas concentrações definidas. A amostra é considerada estável até enquanto apresentar menos de 10% de degradação do analito, em relação ao tempo zero analisado.

Para a obtenção das amostras de cada tecido na concentração de 0,5 e 1,5 ng/mg foram adicionados 25 e 75 µL de solução aquosa de DOX (10 µg/mL) respectivamente, e levado a agitação em vortex por 1 minuto, após as amostras foram pesadas em 100 mg, para a obtenção de 3 replicatas. Para a obtenção da concentração de 2,0 ng/mg foram adicionados 50 µL de solução aquosa de DOX (20 µg/mL) e levado a agitação em vortex por 1 minuto, após as amostras foram pesadas em 100 mg, para a obtenção de 3 replicatas. Após a adição do fármaco foi realizado o processamento, conforme descrito no item 4.3.2.

A estabilidade de curta duração foi realizada em amostra de ambos os tecidos, adicionadas de DOX nas concentrações de 0,5 e 2 ng/mg para tecido tumoral e 0,5 e 1,5 ng/mg para tecido cardíaco, mantidas a temperatura ambiente (25°C) por 4 horas, e então processada e injetada no sistema cromatográfico.

A estabilidade pós-processamento também foi realizada, e consiste no tempo necessário para análise da primeira até a última amostra processadas no mesmo momento. Após a adição de DOX às amostras nas concentrações de 0,5 e 2 ng/mg para tecido tumoral e 0,5 e 1,5 ng/mg para tecido cardíaco, os extratos ressuspensos foram mantidos no interior do equipamento - compartimento *Sample Manager* - em temperatura controlada (10°C) por 4 h e injetadas no sistema cromatográfico.

4.7. Análise Estatística

As quantidades de DOX por mg de cada tipo de tecido analisado estão apresentados através das medianas e médias (IC 95). A comparação das quantidades de DOX nos tecidos entre os diferentes grupos foi realizada pelo Teste t não paramétrico (Mann-Whitney) com nível de significância de 0,05, utilizando o programa GraphPad Prism versão 5.0.

5.Resultados e Discussão

5.1. Manutenção da viabilidade das células tumorais *in vivo*.

O TAE apresenta crescimento rápido quando inoculado em um animal saudável. Após a inoculação na cavidade intraperitoneal, o crescimento tumoral se divide basicamente em 2 fases de desenvolvimento; uma fase de proliferação com crescimento celular exponencial e uma fase de platô ou repouso o qual o número de células permanece estável. Este modelo tumoral é totalmente maligno, levando o animal portador a morte em média até 13,2 dias após a inoculação (OZASLAM et al., 2011). Na figura 4 é possível observar o crescimento expansivo abdominal de um animal que recebeu repique de suspensão de células a 7 dias.

Figura 4: Animal com Tumor ascítico de Ehrlich desenvolvido, observar aumento expressivo do abdômen.



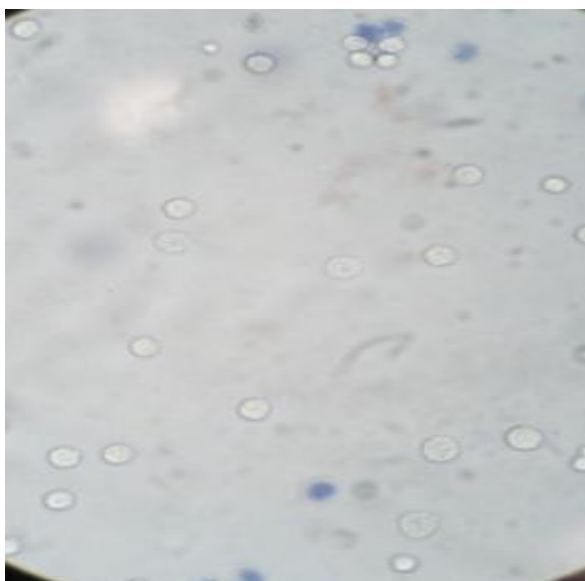
5.2. Inoculação do tumor sólido de Ehrlich

A partir do TAE é possível inocular a forma sólida do Tumor de Ehrlich, essa forma é obtida através da inoculação subcutânea de células tumorais retiradas do peritônio de um animal com o TAE desenvolvido, para um animal

saudável. Esta forma tumoral apresenta crescimento mais lento, porém exponencial, sendo menos invasivo e apresentando sobre vida de em média 30 dias. (BALLIF, 1954)

Para a inoculação do tumor sólido de Ehrlich, é necessário verificar a viabilidade das células tumorais presentes no fluido ascítico peritoneal de um animal que recebeu a inoculação. A viabilidade das células tumorais foi verificada por microscopia conforme descrito anteriormente no item 4.4. material e métodos. Na figura 5 está demonstrada a imagem de uma lâmina com células viáveis e inviáveis. As células inviáveis são coradas com o corante azul Tripán.

Figura 5: Demonstra células tumorais viáveis não coradas, e células tumorais não viáveis coradas por Azul de tripan.



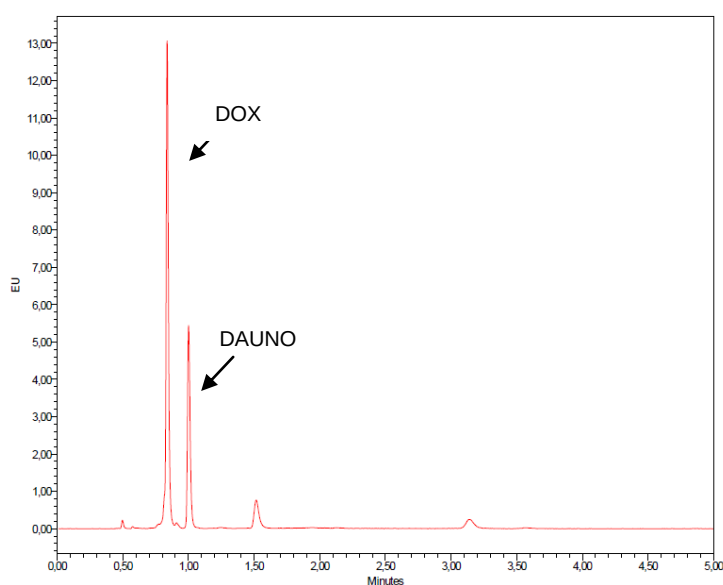
Após a contagem de células viáveis, foi feito o ajuste de concentração de células para 1×10^7 células/mL. Essa suspensão foi inoculada pela via subcutânea no flanco da pata posterior para o desenvolvimento do tumor sólido em camundongos fêmea saudáveis. Assim, o modelo tumoral necessário à

avaliação da distribuição tecidual da DOX foi apropriadamente desenvolvido e mantido durante todo o experimento.

5.3. Desenvolvimento e validação do método bioanalítico

Neste estudo foi desenvolvido e validado um método bioanalítico para a determinação de DOX em tecido tumoral e cardíaco de camundongos Swiss, utilizando daunorrubicina como padrão interno. O sistema cromatográfico utilizado, UPLC, resultou na separação efetiva do analito de interesse em um curto período de tempo de análise, conforme demonstrado na Figura 6.

Figura 6: Cromatograma de solução de DOX (2,5 µg/mL) e DAUNO (2 µg/mL).

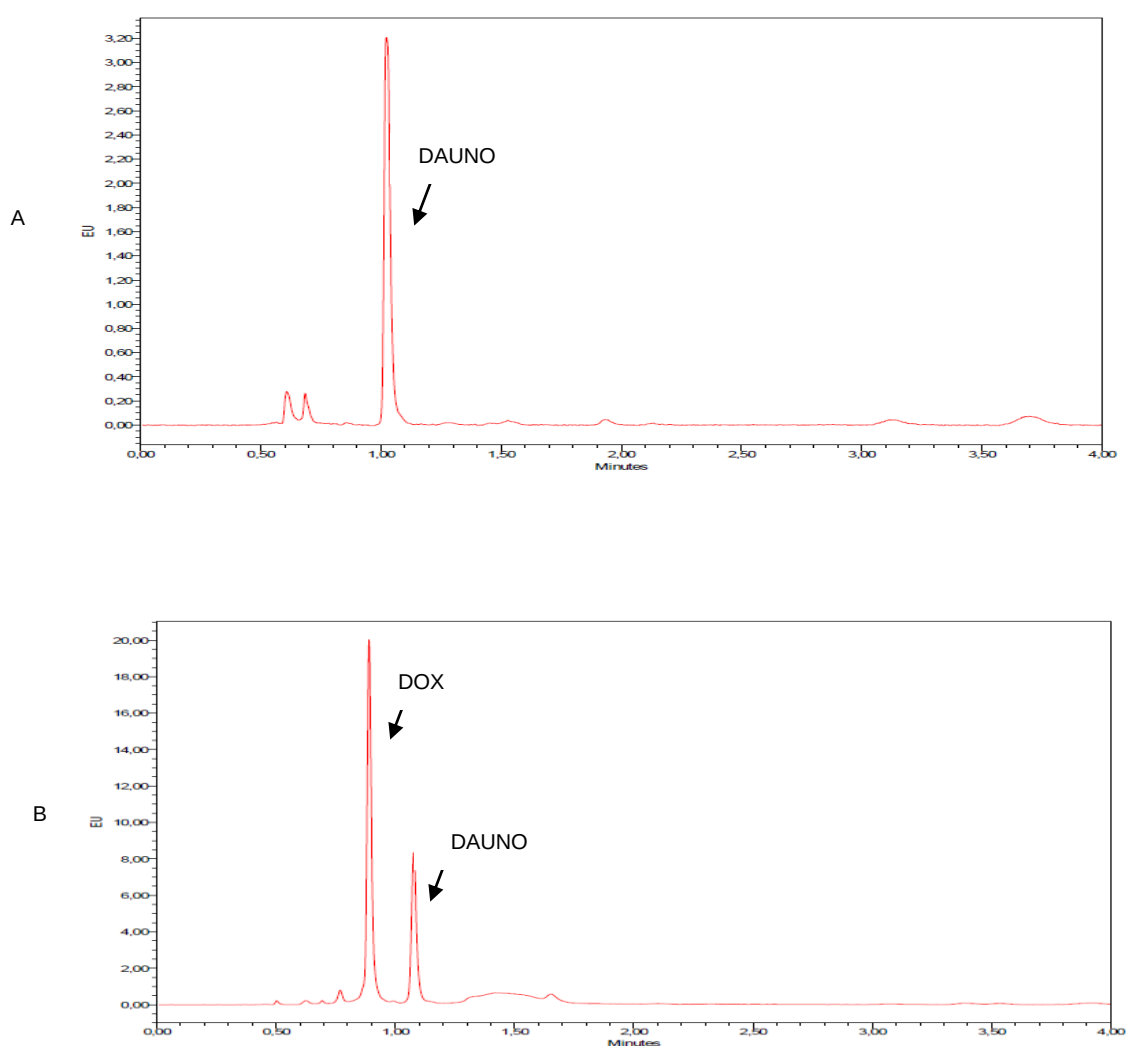


No sistema cromatográfico proposto o tempo de retenção da DOX foi de 0,8 minutos e da DAUNO de 1,2 minutos, demonstrando boa separação e definição entre os picos.

Pode-se observar que na matriz biológica sem adição do analito (branco) não apresenta picos interferentes no tempo de retenção da DOX. Fato este que

favorece a quantificação do analito sem interferentes da amostra biológica ou outros reagentes utilizados no processamento da mesma. A Figura 7 apresenta os cromatogramas das amostras adicionadas de analito e padrão interno e a ausência do picos interferentes.

Figura 7: Cromatograma de amostra de tecido branco com adição de DAUNO (0,5 $\mu\text{g}/\text{mg}$) (A), e cromatograma adicionado de DOX(1 $\mu\text{g}/\text{mg}$) e DAUNO (0,5 $\mu\text{g}/\text{mg}$) (B).



A utilização de um método por UPLC diminui o tempo de análise em relação ao sistema de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). A separação do analito e do padrão interno é mais eficiente quando comparada a

este outro sistema devido ao menor tamanho de partícula presente nas colunas cromatográficas utilizadas (1,7 μm), que propiciam uma melhor separação do composto, uma vez que a área de superfície de contato é maior, fato isso que promove interação do analito, e da fase móvel com a coluna cromatográfica muito mais eficaz, melhorando a definição e intensidade da resposta dos picos obtidos.

O estudo de linearidade envolveu a construção de uma curva analítica de DOX em tecido tumoral, nas concentrações de 0,2; 0,25; 0,5; 0,75; 1,0; 1,5; 2,0 ng/mg, e no tecido cardíaco, nas concentrações de 0,25; 0,3; 0,5; 0,75; 1,0; 1,5 e 2,5 ng/mg de tecido para ambas as amostras. As curvas analíticas em tecido tumoral e cardíaco (Figuras 8 e 9) foram construídas através da relação de áreas das respostas obtidas a partir da DOX e do PI (daunorrubicina). As curvas apresentaram coeficiente de correlação 0,990 e 0,9842 para tecido tumoral e coração, respectivamente.

Figura 8: Curva analítica de DOX em tecido tumoral (n=3).

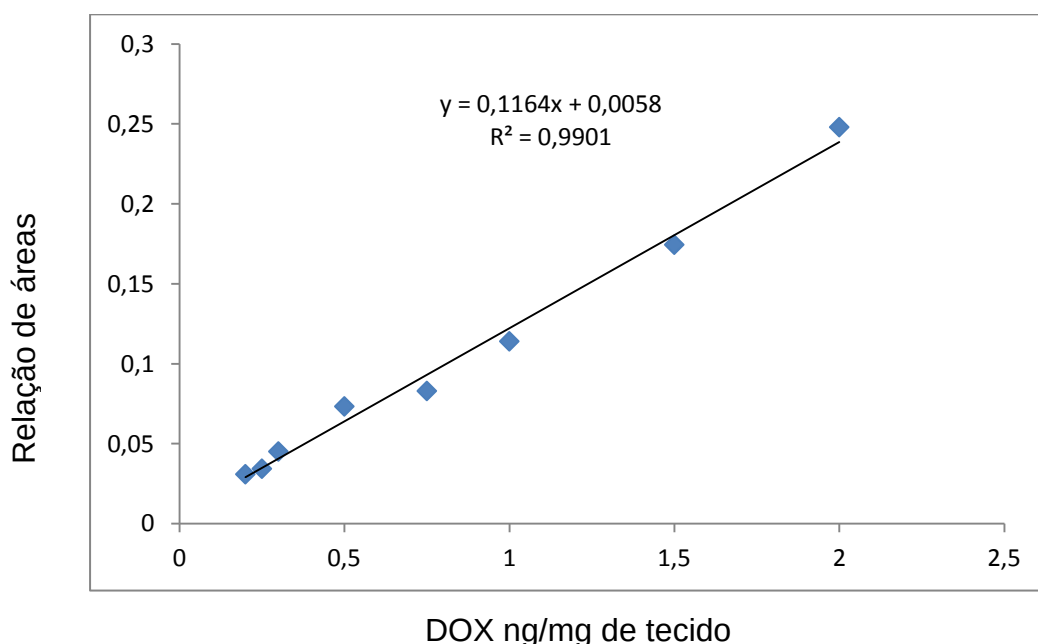
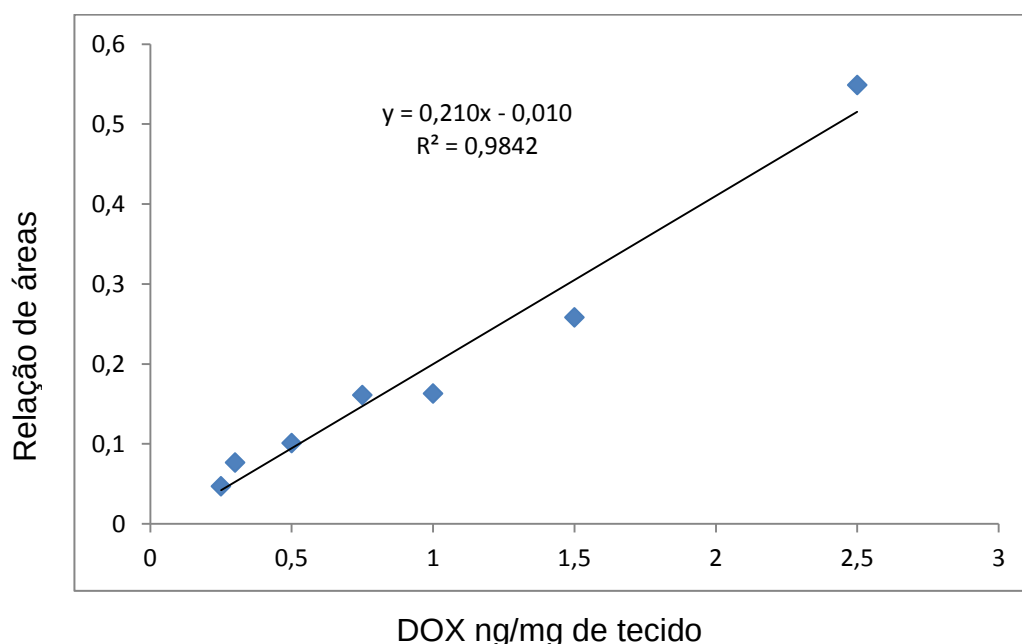


Figura 9: Curva analítica de DOX em tecido cardíaco (n=3)..



Os coeficientes de correlação apresentados em ambos os tecidos foram superiores a 0,98, demonstrando linearidade no intervalo de concentração estabelecido para cada tipo de amostra, em concordância com as RE 899 e a RDC 27 da ANVISA além do guia do FDA para validação de métodos bioanalíticos.

As equações correspondentes a cada tipo de tecido, $y = 0,0013x - 0,0058$, para tecido tumoral e $y = 0,0021x - 0,0103$ para tecido cardíaco obtidas foram utilizadas para o cálculo de concentrações de DOX nas amostras dos animais que receberam a administração do fármaco nas diferentes formas farmacêuticas apresentadas neste estudo (CI e ME).

A precisão do método bioanalítico foi avaliada através dos coeficientes de variação (CV%) da análise de replicatas de amostras de tecido, assim como a exatidão, em 3 concentrações 0,50; 0,75 e 1,50 ng/mg de tecido tumoral em 5 replicatas, e de 0,50; 0,75 e 1,50 ng/mg de tecido cardíaco em 3 replicatas

adicionadas de DOX e PI. A precisão inter-ensaios foi realizada em 2 dias diferentes de análise.

Segundo resultados apresentados nas tabelas 1 e 2, o método bioanalítico proposto demonstrou limites de confiança adequados para a determinação da DOX em tecido tumoral e cardíaco (precisão $\pm 15\%$; exatidão 85-115%).

Concentração nominal (ng/mg)	Concentração calculada (ng/mg)	Precisão (CV%)*	Exatidão %
0,5	0,58	12,41	114,86
0,75	0,66	6,87	88,39
1,5	1,45	13,91	103,99

Tabela 1. Precisão e Exatidão intra-ensaio em tecido Tumoral(n=5).

*Valores expressos como coeficiente de variação.

Concentração nominal (ng/mg)	Concentração calculada	Precisão (CV%)*	Exatidão %
0,5	0,53	11,03	106,11
0,75	0,82	7,78	108,84
1,50	1,28	11,30	85,23

Tabela 2. Precisão e Exatidão intra-ensaio em tecido cardíaco (n=3).

*Valores expressos como coeficiente de variação.

Concentração nominal (ng/mg)	Concentração calculada (ng/mg)	Precisão (CV%)*	Exatidão %
0,5	0,57	13,85	113,13
0,75	0,83	9,75	110,31
1,5	1,28	1,25	85,44

Tabela 3. Precisão e Exatidão inter-ensaio em tecido tumoral (n=5).

*Valores expressos como coeficiente de variação.

Concentração nominal (ng/mg)	Concentração calculada (ng/mg)	Precisão (CV%)*	Exatidão %
0,5	0,54	5,54	107,43
0,75	0,67	7,02	89,46
1,5	1,28	1,25	85,44

Tabela 4. Precisão e Exatidão inter-ensaio em tecido cardíaco (n=3).

*Valores expressos como coeficiente de variação.

Neste estudo foram utilizados 3 replicatas para a precisão e exatidão em tecido cardíaco, embora a legislação brasileira indique a utilização de no mínimo 5 replicatas para cada ponto, o guia do FDA para validação de métodos bioanalíticos – que também foi utilizado como base para a validação deste método - indica que quando a amostra biológica for de difícil aquisição o numero de replicatas pode ser reduzido. Este critério foi adotado a fim de diminuir o numero de animais, pois a massa da amostra utilizada foi de 100 mg, peso este correspondente ao coração de um camundongo adulto, porém os limites já citados acima se mantiveram dentro dos critérios de confiança.

O método desenvolvido apresentou cromatograma com linhas de base praticamente sem ruídos e interferentes no tempo de retenção da DOX e da DAUNO, o que favorece a sensibilidade do método.

Na tabela 5 estão demonstrados os resultados obtidos no ensaio de determinação do LIQ nas amostras teciduais:

	Coração	Tumor
	0,25 ng/mg	0,2 ng/mg
Média	0,27	0,21
CV (%)*	6,43	19,98
Exatidão	109,49	107,94

Tabela 5: Limite inferior de Quantificação

*Valores expressos como coeficiente de variação.

O LID foi determinado em 0,15 ng/ mg para tecido tumoral e em 0,2 ng/mg em tecido cardíaco.

A recuperação em tecido cardíaco foi de 84,3% ($\pm 1,8$) e em tecido tumoral foi de 103,61% ($\pm 5,9$), expressos como porcentagem remanescente do analito na amostra. Estes resultados estão expressos nas tabelas 6 e 7 através da média das concentrações que foram analisadas em triplicata e a porcentagem da recuperação em relação a concentração teórica.

Coração		
Concentração (ng/mg)	Media (ng/mg)	Recuperação (%)
0,5	0,42	83,39
0,75	0,64	85,17
1,5	1,27	84,81

Tabela 6: Recuperação em tecido cardíaco expressa em porcentagem.

Tumor		
Concentração (ng/mg)	Media (ng/mg)	Recuperação (%)
0,5	0,51	97,71
0,75	0,68	109,51
2,0	2,06	99,18

Tabela 7: Recuperação em tecido tumoral expressa em porcentagem.

Os estudos de estabilidade realizados neste trabalho foram os de curta duração em temperatura ambiente, em que amostras de tecido adicionadas de DOX, em 3 replicatas e em duas concentrações diferentes foram mantidas a temperatura ambiente por 4 horas, depois analisadas e os resultados obtidos foram comparados aos resultados das mesmas amostras analisadas imediatamente após a coleta. Com base nos resultados obtidos consideramos que o analito foi estável no período de 4 horas em ambos os tecidos à temperatura ambiente e no interior do sample manager a 10°C.

Outro estudo de estabilidade realizado foi o de pós-processamento, em que se avalia a estabilidade do analito depois do processamento. Neste estudo deve-se respeitar o tempo necessário para a análise de todas as amostras, além das condições de armazenamento, como temperatura por exemplo.

As amostras foram analisadas 4 horas após serem processadas, e armazenadas no *Sample Manager* a 10° C. Foi possível observar que o analito se manteve estável nas condições em que as amostras foram submetidas. Na tabela 8 e 9 estão apresentados os resultados do estudo de estabilidade para as amostras de tecido tumoral e tecido cardíaco ao qual foi possível observar, nesse período, que não houve degradação significativa do analito na amostra biológica.

Concentração (ng/mg)	Curta duração (4 horas, T °C amb.)	Pós-processamento (Sample Manager 10°C)
0,5	90,88	90,19
2,0	91,90	89,63

Tabela 8: Estabilidade em Tecido Tumoral

*Tabela expressa valores remanescente em porcentagem.

Concentração (ng/mg)	Curta duração (4 horas, T °C amb.)	Pós-processamento (Sample Manager 10°C)
0,5	90,02	94,36
1,5	92,52	93,45

Tabela 9: Estabilidade em Tecido Cardíaco

*Tabela expressa valores remanescente em porcentagem.

6. Avaliação da Distribuição da DOX em tecido tumoral e cardíaco de camundongos

Este estudo visou comparar a distribuição de DOX veiculada por uma ME biocompatível em relação à forma comercial mais utilizada nos tratamentos quimioterápicos antineoplásicos. Como já discutido anteriormente este fármaco pode provocar cardiotoxicidade severa nos pacientes que o utiliza. Essa formulação proposta por FORMARIZ et al 2006 tem por objetivo direcionar o fármaco para o tecido tumoral, evitando sua distribuição principalmente em tecido cardíaco.

Após a administração e análise das amostras foi possível observar que a DOX na forma de cloridrato é amplamente distribuída para o coração, o que não acontece quando a mesma é incorporada pela ME ($p = 0,0175$). Por outro

lado, não houve diferença significativa na distribuição do fármaco veiculado na microemulsão lipídica para o tecido tumoral ($p = 0,4557$), indicando assim que o sistema proposto não altera disponibilidade do fármaco neste tecido, o que sugere que o efeito antitumoral pode ser mantido. Esses resultados comprovam a eficiência do sistema microemulsionado, que modifica a distribuição do fármaco para o tecido cardíaco, com consequente diminuição da cardiotoxicidade, anteriormente observada por Assumpção et al. (2013).

A concentração média de DOX no coração dos animais que receberam ME foi de 0,99 ng/mg, enquanto que nos animais que receberam o fármaco na forma de cloridrato foi de 1,8 ng/mg. Esses valores, estatisticamente diferentes ($p < 0,05$, Mann-Whitney) demonstram claramente que houve redução da distribuição do fármaco para este tecido. Entretanto a concentração média de DOX no tecido tumoral dos animais que receberam a ME foi de 0,85 ng/mg e de 0,44 ng/mg quando administrado na forma de cloridrato, porém estatisticamente não houve diferença significativa entre os grupos que apresentaram $p > 0,05$. Esses resultados podem ser observados na tabela 10, onde são expressos através de media, mediana e IC 95. A figura 12 apresenta o gráfico da distribuição em ambos os tecidos.

Vale ressaltar que a DOX é substrato da glicoproteína P. Essa proteína de membrana é capaz de promover o efluxo de diferentes fármacos do interior das células e dificultar sua absorção, sendo um dos fatores mais comuns nos casos de resistência tumoral a antineoplásicos diversos (SHI, et al., 2012). A utilização de modelos tumorais que apresentem essa proteína – como o de Ehrlich - é fundamental para observar o comportamento do fármaco quando incorporado a ME. A manutenção *in vivo* do tumor de Ehrlich promove a

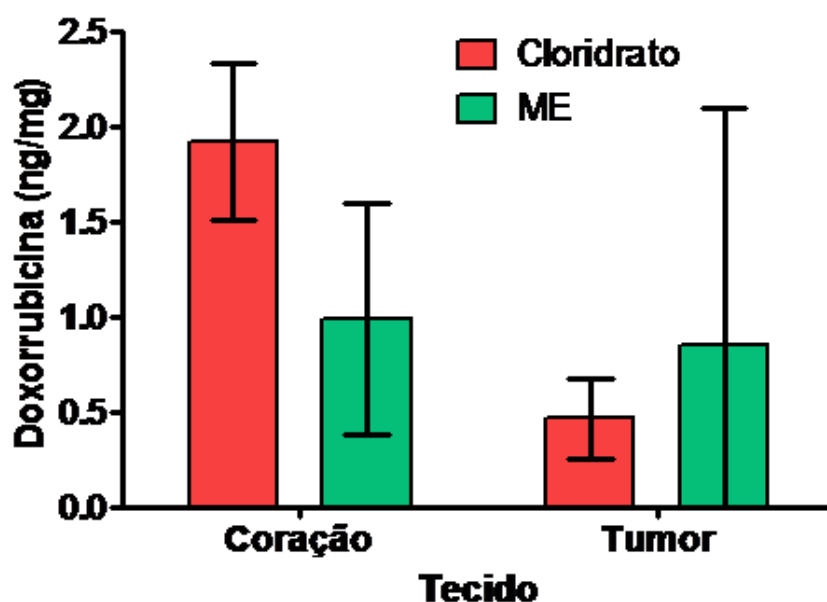
ocorrência de mutação com aumento expressivo dessa proteína, com consequências sobre a quantidade disponível do fármaco na massa tumoral.

	Coração ng/mg	Tumor ng/mg
	1,9*	0,47
DOX-CI	1,8 (1,59 – 2,25)	0,44 (0,30 – 0,63)
	0,99*	0,85
DOX-ME	0,92 (0,49 – 1,47)	0,27 (-0,14 – 1,85)

Tabela 10: Distribuição da DOX na forma de cloridrato em solução aquosa e incorporada a ME em tecido cardíaco e tumoral apresentados como média e mediana.

*p < 0,05 (diferença estatisticamente significativa. Mann – Whitney)

Figura 10: Distribuição da DOX na forma de cloridrato em solução aquosa e incorporada a ME em tecido tumoral e cardíaco nas diferentes formulações.



Nos estudos de ALHARETH et al. (2012), foi avaliada a distribuição da DOX veiculada em nanopartículas após administração em ratos (6mg/kg). Os

autores observaram mudanças na distribuição para o tecido cardíaco ($0,8 \mu\text{g/g} \pm 0,4\%$ na forma carregada vs $1,8 \mu\text{g/g} \pm 0,2\%$ na forma livre do fármaco), os resultados desses autores coincidem com os valores encontrados neste estudo para a distribuição em tecido cardíaco (tabela 8).

CUI e colaboradores (2007) avaliaram a distribuição de DOX veiculada por nanopartículas peguiladas em tecido tumoral e cardíaco de camundongos (8mg/kg), e encontraram concentrações de $9,11$ e $1,73 \mu\text{g/g}$, respectivamente.

BIBBY et al. (2005) estudaram a distribuição também de nanopartículas carregando DOX em camundongos portadores de tumor (10 mg/kg). Os autores observaram que em 15 minutos no tecido tumoral havia $0,51 \mu\text{g/g}$ enquanto no tecido cardíaco havia $0,08 \mu\text{g/g}$ de DOX.

Formariz (2008) realizou a avaliação da atividade da DOX incorporada no sistema microemulsionado proposto. Este estudo foi realizado em camundongos *Swiss* portadores de tumor sólido de Ehrlich. Os animais foram divididos em diferentes grupos que, após inoculação e crescimento da fase sólida do modelo tumoral, receberam administração i.p. da ME livre do fármaco, solução salina, DOX-Cl (5 mg/mL) e DOX-ME ($2,5 \text{ mg/kg}$ e 5 mg/kg). Neste estudo foi possível observar que o fármaco incorporado a ME apresenta efeito semelhante ao fármaco na forma livre, porém com menor toxicidade, pois ocorreu o aumento da DL_{50} , como já citado anteriormente.

Nos estudos de ASSUMPÇÃO et al. (2013), além da alteração dos parâmetros farmacocinéticos, houve a diminuição da cardiotoxicidade do fármaco quando veiculado pela ME em relação a forma livre . Esse fato pode ser confirmado uma vez que a distribuição do mesmo foi reduzida em tecido cardíaco quando incorporado a ME. A cardiotoxicidade, como já citado

anteriormente, é um efeito dose-dependente e tendo em vista que a oferta de fármaco diminuiu neste tecido há expectativa de que o dano cardíaco seja reduzido.

Os estudos disponíveis na literatura científica, embora com diferentes formulações, confirmam que através da tecnologia farmacêutica é possível modificar o perfil de distribuição do fármaco. Assim, novos estudos e técnicas avançadas de modulação da liberação de fármacos devem ser conduzidos com a perspectiva de implementar novos produtos para o tratamento das neoplasias, com incremento da resposta farmacológica e diminuição dos possíveis efeitos tóxicos provenientes da não seletividade desses compostos.

7. Conclusões

Segundo os resultados obtidos neste estudo é possível concluir que:

- A técnica de desenvolvimento e manutenção do tumor de Ehrlich foi satisfatória;
- O método desenvolvido e validado pelo sistema cromatográfico UPLC/ fluorescência foi eficiente para a separação e detecção do fármaco nas amostras biológicas propostas;
- A DOX-ME foi capaz de direcionar o fármaco para o tumor, diminuindo sua distribuição para o coração.

8. Referências

ALHARETH, K. et al. HPLC quantification of doxorubicin in plasma and tissues of rats treated with doxorubicin loaded poly(alkylcyanoacrylate) nanoparticles. **Journal of Chromatography B**. v. 887-888, p 128-132. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1570023212000554>. Acesso em : 15 fevereiro de 2012., 2012.

ALHARETH, K. et al. Conformation of surface-decorating dextran chains affects the pharmacokinetics and biodistribution of doxorubicin-loaded nanoparticles. **European Journal of Pharmaceuticals an Biopharmaceutics**. v. 81, n. 2, p. 453-457. Disponível em <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0939641112000847>. Acesso em: 24 de outubro de 2012., 2012

ASSUMPÇÃO, J. U. C. V. **Farmacocinética Pré-Clínica e Cardiotoxicidade da Doxorubicina Veiculada por Sistema Microemulsionado**. 2011. 99p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – UNESP, Araraquara, 2011.

ASSUMPÇÃO, J. U. C. V. et al. Biocompatible Microemulsion Modifies the Pharmacokinetic Profile and Cardiotoxicity of Doxorubicin. **Journal of Pharmaceutical Sciences**. v. 102, n.1, p. 289-296. Disponível em: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/jps.23368/abstract;jsessionid=67F01BE1FC42909162D0E6FBE2FCE22C.f02t04>. Acesso em 21 de janeiro 2013., 2012

AYEN, W.Y.; KUMAR, N. *In vivo* evaluation of doxorubicin-loaded (PEG)₃-PLA nanopolymersomes (PolyDoxSome) using DMBA-Induced mammary carcinoma rat model and comparison with marketed LipoDox™. **Pharmaceutical Research**. v. 29, n. 9, p. 2522-2533. Disponível em: <http://link.springer.com/article/10.1007%2Fs11095-012-0783-8>. Acesso em: 17 de outubro de 2012., 2012.

BAILLIF, R.N. The solid phase of the Ehrlich Ascites Tumor in mice. **Cancer Research**. EUA. v.14, p. 554-558. Disponível em: <http://cancerres.aacrjournals.org/content/14/8/554.long>. Acesso em: fevereiro de 2012.,1954.

BANKER, G. S.; RHODES, C. T. (Ed.); **Modern Pharmaceutics**: Fourth Edition, Revised and Expanded . 4ª ed. Estados Unidos: Marcel Dekker Inc. 2009, p. 1216

BIBBY, D.C. et al. Pharmacokinetics and biodistribution of RGD-targeted doxorubicin-loaded nanoparticles in tumor bearing mice. **International Journal of Pharmaceutics**. v. 293, n. 1-2, p. 281-291. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378517305000566>. Acesso em: 15 de abril de 2012., 2005.

BRANDÃO, H.N. et al. Química e Farmacologia de Quimioterápicos Antineoplásicos derivados de Plantas. **Química Nova**. v. 33, n. 6, p. 1364-1365. Disponível em: [ttp://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422010000600026](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422010000600026). Acesso em: maio de 2012., 2010.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA. Resolução RE 899, de 29 de maio de 2003. Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. Diário Oficial da União, Brasília, 02 de junho de 2003. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br/e-legis/>> Acesso em: 15 de maio de 2012.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Regulação, Avaliação e Controle. Coordenação-Geral de Sistemas de Informação. **Oncologia**: Manual de Bases Técnicas. SUS/ Sistema de Informações Ambulatoriais. ed. 11^a , p. 102. Brasília, agosto de 2010. Disponível em : http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/manual3_drac.pdf. Acessado em: fevereiro de 2013.

BRASIL. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. Coordenação Geral de Ações Estratégicas. Coordenação de Prevenção e Vigilância. **Estimativa 2012**: incidência de câncer no Brasil / Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva, Coordenação Geral de Ações Estratégicas, Coordenação de Prevenção e Vigilância. p. 118, Rio de Janeiro INCA, 2011. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/estimativa/2012/estimativa20122111.pdf>. Acesso em: maio de 2013.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA. Resolução RDC nº 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 julho de 2012.

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

CAETANO, N. (Ed.). **BPR - Guia de Remédios**. 9^a ed. São Paulo: BPR-Consultoria, Projetos e Comercio Ltda. 2008. p. 247-248.

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, n. 2013, p. 8. Disponível em: <http://www.hindawi.com/journals/ppar/2013/456042/>. Acesso em janeiro de 2013.

CHOW, S.C; WANG, H. On Sample Size Calculation in Bioequivalence Trials. **Journal of Pharmacokinetics and Pharmacodynamics**. v.28 n. 2. Disponível em: <http://link.springer.com/article/10.1023%2FA%3A1011503032353>. Acesso em: setembro de 2011.

CUI, J.X. *et al.* Direct comparison of two pegylated liposomal doxorubicin formulations: Is AUC predictive for toxicity and efficacy? **Journal of Controlled Release**. v. 118, n. 2, p. 204-215, abril 2007. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168365906006985>. Acesso em: fevereiro de 2012.

ECKMAN, D. M. et al. Weekly Doxorubicin Increases Coronary Arteriolar Wall and Adventitial Thickness. **PlosOne**. v. 8, n. 2, fevereiro 2013. Disponível em: <http://www.plosone.org/article/info:doi/10.1371/journal.pone.0057554>. Acesso em: maio de 2013.

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. Disponível em: http://www.cff.org.br/sistemas/geral/revista/pdf/82/i02-infarma_002.pdf. Acesso em: agosto de 2011.

FORMARIZ, T. P. et al. Microemulsões e Fases Líquidas Cristalinas como Sistemas de Liberação de Fármacos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**. v. 41, n. 03, p. 301-313, julho/setembro 2005. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/rbcf/v41n3/a03v41n3.pdf>. Acesso em: agosto de 2011.

FORMARIZ, T. P. et al. Doxorubicin biocompatible O/W microemulsion stabilized by mixed surfactant containing soya phosphatidylcholine. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**. v. 51, n. 2006, p. 54-61, maio 2006. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0927776506001512>. Acesso em: setembro de 2012.

FORMARIZ, T. P. et al. Relationship between structural features and *in vitro* release of doxorubicin from biocompatible anionic microemulsion. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**. v. 60, n. 2007, p. 28-35, junho 2007. Disponível em:

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0927776507002111>. Acesso em: janeiro de 2012.

FORMARIZ, T. P. et al. Structural changes of biocompatible neutral microemulsions stabilized by mixed surfactant containing soya phosphatidylcholine and their relationship with doxorubicin release. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**. v. 63, n. 2008, p. 187-295, janeiro 2008. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0927776508000088>. Acesso em: março de 2012.

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

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

GUO, H. et al. Functional alginate nanoparticles for efficient intracellular release of doxorubicin and hepatoma carcinoma cell targeting therapy. **International Journal of Pharmaceutics**. v. 451, n. 1-2, p.1-11, julho 2013. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378517313003268>. Acesso em: julho de 2013

GUSTAFSON, D. L. *et al.* Doxorubicin Pharmacokinetics: Macromolecule Binding, Metabolism, and Excretion in the Context of a Physiologic Model. **Journal of Pharmaceutical Sciences**. v.91, n. 6, p. 1488-150. junho 2002. Disponível em: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/jps.10161/abstract;jsessionid=9F0D2B9553BD928FE57A934C414FC7F0.f04t01>. Acesso em: julho de 2012.

HOSSAEN, S. *et al.* Fabrication and intracellular delivery of doxorubicin/ carbonate apatite nanocomposites: Effect on growth retardation of established colon tumor. **PlosOne**. v. 8, abril 2013. Disponível em: <http://www.plosone.org/article/info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.pone.0060428>. Acesso em: junho de 2013.

LEE, A. **Reações Adversas a Medicamentos**. 2ª ed. Porto Alegre: ArtMed, 2009. p. 488.

LI, M. *et al.* Nanoescaled Poly(L-glutamic acid)/ doxorubicin- amphiphile complex as pH- responsive drug delivery system for effective treatment of nonsmall cell lung cancer. **ACS Applied Materials & Interfaces**. v. 5, n. 5, p. 1781-1792, março 2013. Disponível em: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/am303073u>. Acesso em: maio de 2013.

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 2013.

MOFFAT, A. C. (Ed.) **Clarke's Isolation and Identification of Drugs** in pharmaceuticals, body fluids, and post-mortem. Londres: The Pharmaceutical Press. 2ª ed. v. 1, p. 575, 1986.

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. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0100-40422004000100023&script=sci_arttext. Acesso em: agosto de 2011.

OZASLAM, M. et al. Ehrlich ascites carcinoma. **African Journal of Biotechnology**. v. 10, n. 13, p. 2375-2378, março 2011. Disponível em: http://www.ajol.info/index.php?main_page=error404. Acesso em maio de 2012.

PU, Y. et al. The anti-tumor efficiency of poly(L-glutamic acid)/ dendrimers with polyhedral oligomeric silsesquioxane cores. **Biomaterials**. v. 34, n. 14, p. 3658-3666, maio 2013. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0142961213001373>. Acesso em: junho de 2013.

QUILLES, M. B. **Atividade Anti – Tumoral e Imunomodulatória de complexos de Paládio (II) Utilizando Modelo Experimental de Ehrlich.**

2010. 107 f. Dissertação (Mestrado em Biociências e Biotecnologia Aplicada à Farmácia) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – UNESP, Araraquara, 2010.

ROSSI, L. F. et al. Resistência de tumor venéreo transmissível disseminado ao sulfato de vincristina. In: SIMPÓSIO MOSTRA CIENTÍFICA, 2010, Pelotas. **Anais...** Pelotas: UFPel, 2010.

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.

SHI, Z. et al. Enhanced chemosensitization in multidrug-resistant human breast cancer cells by inhibition of IL-6 and IL-8 production. **Breast Cancer Research and treatment**. v. 135, n. 3, p. 737-747, agosto 2012.

SILVA, A. E. et al. Efeito do Hipotireoidismo no Tumor de Ehrlich Sólido em Camundongos Fêmeas Castradas e Não Castradas. **Arquivos Brasileiros Endocrinologia & Metabologia**. v. 48, n. 6, p.867-874. dezembro 2004.

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.

SMITH, L. A. et al. Cardiotoxicity of anthracycline agents for the treatment of cancer: Systematic review and meta-analysis of randomised controlled trials. **BioMed Central**. v. 10, p. 337- 350, junho 2010.

SONTAG, D. P. et al. FGF-2 and FGF-16 Protect Isolated Perfused Mouse Hearts from Acute Doxorubicin-Induced Contractile Dysfunction. **Cardiovascular Toxicology**. DOI 10.1007/s12012-013-9203-5, fevereiro 2013.

TOZER, T. N.; ROWLAND, M. **Introdução à Farmacocinetica e a Farmacodinamica**: As Bases Quantitativas da Terapia Farmacologica. 1ª ed. Porto Alegre: ArtMed. 2009.p. 336.

UPADHYAY, K. K. et al. The *in vivo* behavior and antitumor activity of doxorubicin-loaded poly(γ -benzyl L-glutamate)-block-hyaluronan polymersomes in Ehrlich ascites tumor-bearing BalB/c mice. **Nanomedicine**: Nanotechnology, Biology, and Medicine. v. 8, n. 1, p. 71-80, janeiro 2012.

U.S.A. Food and Drug Administration (FDA) Guidance document: Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation. Rockville: U.S. Department of Health and Human Services, Center for Drug Evaluation and Research (CDER), Center for Veterinary Medicine (CVM). p.25, 2001.

XU, W. et al. Aptamer conjugated and doxorubicin-loaded unimolecular micelles for targeted therapy of prostate cancer. **Biomaterials**. v. 34, n. 21, p. 5244 – 5253, abril 2013.

YUAN, A. *et al.* A Novel Self-Assembly Albumin Nanocarrier for Reducing Doxorubicin-Mediated Cardiotoxicity. **Journal of Pharmaceutical Sciences.** v. 102, n. 5, p. 1626-1635, maio 2013.

9. Anexos

Animal	Coração ng/mg		Tumor ng/mg	
	DOX-CI	DOX-ME	DOX-CI	DOX-ME
1	2,01	2,38	0,39	0,37
2	1,53	0,92	0,25	0,27
3	2,36	0,45	0,47	0,81
4	2,62	1,05	0,24	3,86
5	1,42	0,62	0,90	0,21
6	1,63	0,48	0,56	0,17
7	1,85	1,00	0,44	0,24
Média	1,9*	0,99*	0,47	0,85
Mediana	1,8	0,92	0,44	0,27
IC 95	(1,59 – 2,25)	(0,49 – 1,47)	(0,30 – 0,63)	(-0,14 – 1,85)

Tabela 9: Concentração tecidual encontrada em cada animal com a respectiva formulação administrada

*p < 0,05 (diferença estatisticamente significativa. Mann – Whitney)

Protocolo CEUA/FCF/CAr nº 36/2012

Interessado: CAROLINE DAMICO CÂNDIDO

Orientador: Prof^aDr^a Rosângela Gonçalves Peccinini

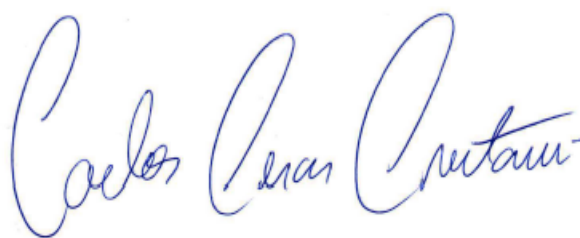
Projeto: Avaliação da distribuição de doxorrubicina em tecido tumoral em camundongos

Parecer nº 60/2012 – Comissão de Ética no Uso de Animais

O Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais, desta Faculdade, aprovou **ad-referendum** as adequações feitas no protocolo do projeto de pesquisa “Avaliação da distribuição de doxorrubicina em tecido tumoral em camundongos”, apresentado pela pós-graduanda CAROLINE DAMICO CÂNDIDO, sob orientação da Professora Doutora Rosângela Gonçalves Peccinini, desta Faculdade.

O relatório final do protocolo de pesquisa deverá ser entregue em NOVENBRO de 2014, em formulário para este fim.

Araraquara, 23 de novembro de 2012.

A handwritten signature in blue ink, reading 'Carlos Cesar Crestani'.

Prof.Dr. CARLOS CESAR CRESTANI
Coordenador da CEUA