UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

FARMACOCINÉTICA PRÉ-CLÍNICA E CARDIOTOXICIDADE DA DOXORRUBICINA VEICULADA POR SISTEMA MICROEMULSIONADO

Juliana Uruguay Corrêa Vidigal Assumpção

ARARAQUARA- SP

2011

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

FARMACOCINÉTICA PRÉ-CLÍNICA E CARDIOTOXICIDADE DA DOXORRUBICINA VEICULADA POR SISTEMA MICROEMULSIONADO

Juliana Uruguay Corrêa Vidigal Assumpção

Dissertação apresentada ao Programa Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de Pesquisa e Desenvolvimento de Fármacos e Medicamentos, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP, como parte dos requisitos para obtenção do Título de Mestre em Ciências Farmacêuticas

Orientadora Profª Drª: Rosângela Gonçalves Peccinini

Araraquara-SP

2011

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

Assumpção, Juliana Uruguay Corrêa Vidigal
A851f Farmacocinética pré-clinica e cardiotoxicidade da doxorrubicina veiculada por sistema microemulsionado / Juliana Uruguay Corrêa Vidigal Assumpção. – Araraquara, 2011
87 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

. 1.Cardiotoxicidade. 2. Doxorrubicina. 3. Farmacocinética. 4. Sistema reservatório. I. Peccinini, Rosângela Gonçalves, orient. II. Título.

CAPES: 40300005

DEDICATÓRIA

Antes de tudo agradeço a **Deus** por sempre me iluminar e me guiar, por me mostrar o caminho certo, pelo dom do discernimento e por me fazer acreditar em mim.

"Deus, me dê Serenidade para aceitar as coisas
que não posso mudar, Coragem para mudar
aquilo de que sou capaz e Sabedoria
para ver a diferença."

AGRADECIMENTOS

É com muita satisfação que expresso aqui o mais profundo agradecimento a todos aqueles que tornaram a realização deste trabalho possível.

À **professora Drª. Rosângela Gonçalves Peccinini**, na posição de orientadora, pelos tantos e inesquecíveis ensinamentos, paciência e os preciosos conselhos. Sou inteiramente grata por essa orientação que vai além desta dissertação, bem como o carinho de mãe, amizade e principalmente pelo bom convívio e agradeço por acreditar no meu potencial. Agradeço pela possibilidade trabalhar em um tema para o qual você tanto vem contribuindo, a hospitalidade com quem me recebeu em seu laboratório - Toxicologia FCFAR. Já tenho um carinho enorme por você!

À **minha querida e amada família, meu pai (José) e minha mãe (Júlia),** deixo poucas palavras, mas aquelas que me são mais caras. Obrigada por toda dedicação, ao amor incondicional, pelos bons conselhos, a força, incentivo e a compreensão da minha ausência durante o período do mestrado. Amo muito vocês!

Ao meu namorado **Bruno**, agradeço pela compreensão nas minhas ausências, pelo incentivo e pelos momentos de felicidade e descontração e pela valiosa ajuda na reta final da elaboração dissertação. Te Amo!

Agradecimento mais que importante aos amigos e pessoas fundamentais para realização deste trabalho**, Kelly Chrystina Pestana, Helen Mariana Baldan (Berê) e Michel Leandro**, sempre solidários, agradeço pelos aos auxílios nas pesquisas, na elaboração da dissertação, pela força e a palavra amiga na hora certa, enfim agradeço

por toda ajuda prestada e pela amizade. E à nova amiga, **Fabíola** pela ajuda na elaboração do abstract para dissertação, agradeço pela disposição, companheirismo, pelas caronas, por fim pela amizade.

Ao Professor Dr.° Anselmo Gomes de Oliveira, sou imensamente grata pelo suporte técnico e acompanhou com sincero interesse e pela grande contribuição neste trabalho.

Manifesto aqui minha gratidão **a toda equipe da Professora Drª. Rosângela: Marcelo (Tereso), Marco, Elias, Rodrigo, Ana Paula. E aos novatos: Diego,Caroline, Carla,** pela alegre convivência, pelos auxílios nos experimentos, pelas sugestões. Muito obrigada!

Agradeço aos funcionários da Bioequivalência, **Marcão, Simone e Andreia,** pelos auxílios, pelas muitas ajudas, nos "quebra-galhos", sempre prestados com muito carinho.

Às técnicas da Toxicologia, Maria e Valéria, suporte técnico, pelos ensinamentos, pelos auxílios e pelo carinho.

Aos funcionários da biblioteca pelo apoio na correção das referências bibliográficas.

Ao pessoal da Farmacologia e à técnica Beth, agradeço pelo suporte prestado nas análises deste trabalho e aos ensinamentos.

Ao Programa de Pós-graduação de Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP (Araraquara), agradeço pela atenção.

Aos os amigos conquistados em Araraquara, Lucas, Andressa, Mariana, Thaisa, Vânia, Valéria, Adriana Rodrigues, Raquel Turcci, Lucas, Patrícia Alessio, Tatiane, Hilris, Flávia, Eliete, Lucélia, Bruna, Guilherme, Andressa, Mariana, Gisele, Fernanda K., Jaque, Cris Franzini, Geiseane e aos amigos mais que especial de Jaboticabal, Joyce,

Alex Braz, Mariana, Renata, Camila. Agradeço pelo incentivo, amizade e bom humor que amenizaram momentos difíceis e divertiram momentos leves.

Aos meus parentes, principalmente aos meus queridos tios e padrinhos, Tia Beth, Tio Zé, por quem eu tenho um imenso carinho e amor de neta, agradeço pelas orações, pela força, por toda ajuda.

Agradecimento especial à Dona Zilda, proprietária da pensão que morei os dois anos do mestrado, que me acolheu com muito carinho.

Pelos amigos especiais Jucelena e José Antônio, pelas orações, pelas colaborações e principalmente pela amizade.

Ao professor Dr.° Georgino Honorato da Faculdade de Ciências Farmacêuticas Araraquara, agradeço pelos valiosos conselhos e pela ajuda.

Ao CNPq, pela bolsa que permitiu que eu me dedicasse, integralmente, ao longo de todo o mestrado, à minha pesquisa.

A todos aqueles que de forma direta ou indireta colaboraram para a realização desta dissertação, meu agradecimento.

“O que importa, não é a vitória, mas o esforço, não é o talento, mas a vontade, não é quem você é, mas quem você quer ser.” William Douglas

FARMACOCINÉTICA PRÉ-CLÍNICA E CARDIOTOXICIDADE DA DOXORRUBICINA VEICULADA POR SISTEMA MICROEMULSIONADO

RESUMO

Neste estudo investigou-se o perfil farmacocinético da DOX administrada na forma de microemulsão lipídica, em dose única i.v (6 mg/kg), a ratos Wistar (n=12; 250 g) e comparou-se ao perfil farmacocinético da doxorrubicina administrada na forma de cloridrato em solução aquosa. Ainda, avaliou-se a atividade da CKMb nos dois grupos de animais antes e após a administração das formulações com o objetivo de evidenciar a cardiotoxicidade do produto. Para a avaliação do perfil farmacocinético foram colhidas amostras seriadas de sangue (0 – 16 h) através de cânulas previamente implantadas na veia femoral, e para a avaliação da atividade de CKMb foram colhidas amostras de sangue nos tempos zero, 1 h e 12 h após a administração das formulações. Para a determinação da doxorrubicina em amostras de sangue e nas formulações, desenvolveu-se e validou-se um método analítico por HPLC com detecção por fluorescência (λ_{exc}= 480 nm; λ_{em}= 560 nm), empregando-se coluna Xterra® (C18, 5 μm, 3,9 x 150 mm) e fase móvel composta por 25% de acetonitrila e 75% de água na presença de ácido fórmico (0,1%) e de solução de amônia 25% (0,1%), pH 3,0 , com fluxo de 0,8 mL/min, em modo gradiente. Para as determinações da atividade da CKMb utilizou-se o kit labtest. O método analítico desenvolvido demonstrou limites de confiança adequados para a sua aplicação na determinação da DOX em formulações e em amostras de plasma para a avaliação do seu perfil farmacocinético. Os parâmetros farmacocinéticos que apresentaram diferenças estatisticamente significativas ($p<0,05$, Mann-Whitney) entre a microemulsão e solução aquosa, apresentados como média (IC 95), foram respectivamente: Vd (L/kg) = 38,23 (24,94 – 51,50) *vs* 68,85 (55,69 – 82,00); tss (h) = 45,33 (39,45 – 58,20) *vs* 33,23 (27,7 – 38,75); $\beta(h^{-1})$= 0,0014 (0,00072 – 0,00208) vs 0,00078 (0,0004386 – 0,001076) e $t_{1/2}$ (h) = 9,24 (5,31 – 13,17) *vs* 16,51 (7,64 – 17,61). Assim, evidenciou-se que o equilíbrio das concentrações do fármaco no compartimento periférico ocorre mais lentamente quando está inserido no sistema microemulsionado assim como ocorreu diminuição do volume de distribuição do fármaco. Isto pode ser explicado pela retenção da DOX na fase interna-oleosa e nas gotículas do sistema, comportamento característico de sistema reservatório. Os valores de CKMB do grupo de animais que recebeu a DOX veiculada na microemulsão não apresentaram alterações significativas como as evidenciadas na administração da DOX na forma de cloridrato em solução aquosa, demonstrando que o sistema modificou o acesso do fármaco aos locais susceptíveis aos seus efeitos tóxicos. As características farmacocinéticas e o menor potencial cardiotóxico da DOX veiculada pela microemulsão evidenciados neste estudo tornam o produto promissor para a condução de novos estudos que proporcionarão maior elucidação com relação à sua utilidade terapêutica.

Palavras chaves:Doxorrubicina; microemulsão; farmacocinética; CKMB; cardiotoxicidade; sistema reservatório.

PRECLINICAL PHARMACOKINETICS AND CARDIOTOXICITY OF DOXORUBICIN CARRIED BY MICROEMULSION SYSTEM

ABSTRACT

The present study investigated the DOX pharmacokinetic profile when administered as a lipid microemulsion in a single dose (6 mg/kg, IV) to Wistar rats (n=12; 250g) and compared it to the pharmacokinetic profile of doxorubicin administered as hydrochloride in aqueous solution. With the purpose of demonstrating the cardiotoxicity of the product it also evaluated the CKMB activity in both animal groups before and after administration of the formulations. Serial blood samples were obtained (0 – 16h) through cannulas previously implanted into the femoral vein to evaluate the pharmacokinetic profile. To evaluate the CKMB activity, blood samples were collected after the formulation was administered at times zero, 1h and 12h. An analytical method by HPLC with fluorescence detection (λ_{exc}= 480 nm; λ_{em}= 560 nm) was developed and validated for the determination of doxorubicin in blood samples and in the formulations. The column used as stationary phase was Xterra® (C18, 5 μm, 3.9 x 150 mm) and the mobile phase was composed of 25% of acetonitrile and 75% of water in presence of formic acid (0.1%) and ammonia solution 25% (0.1%), pH 3.0 at a flow rate of 0.8 mL/min, gradient mode. The developed method demonstrated appropriate safety limits to its use in determining doxorubicin in formulations and in plasma samples, and therefore to evaluate the DOX pharmacokinetic profile. For the determination of CKMB activity it was used the Labtest. The pharmacokinetic parameters that showed statistically significant differences ($p<0.05$, Mann-Whitney) between the microemulsion and the aqueous solution, presented as medians (IC 95), were respectively: Vd (L/kg) = 38.23 (24.94 – 51.50) *vs* 68.85 (55.69 – 82.00); tss (h) = 45.33 (39.45 – 58.20) *vs* 33.23 (27.70 – 38.75); $\beta(h^{-1})$= 0.0014 (0.00072 – 0.00208) vs 0.00078 (0.0004386 – 0.001076) and $t_{1/2}$ (h) = 9.24 (5.31 – 13.17) *vs* 16.51 (7.64 – 17.61). Thereby, it became evident that the balance of the drug concentration at the peripheral compartment occurs more slowly when it is inserted into the microemulsified system and that was a reduction in the drug distribution volume. This can be explained by DOX retention in the oily internal phase of the microemulsion and in the droplets of the system, typical behavior of reservoir systems. The values of CKMB from the group that received DOX in form of lipid microemulsion did not exhibit significant changes as those presented by the group that received the DOX in form of hydrochloride in aqueous solution, what demonstrates that the drug access to sites that are susceptible to its toxic effects were modified by the system. The pharmacokinetics and the lower cardiotoxic potential from DOX carried by microemulsion evidenced in this study makes it a promising product to future studies that can provide further clarifications regarding its therapeutic utilities.

Keywords:Doxorubicin; microemulsion; pharmacokinetics; CKMB; cardiotoxicity; reservoir system

LISTA DE ABREVIATURAS

β ou Kel: constante de velocidade de elimitação

6-PG: (6-fosfogluconato)

A/O: microemulsão água em óleo

ALT: alanina aminotransferase

AST: aspartato aminotransferase

ATP: adenosina trifosfato

AUC $^{0-16}$: área sob a curva plasmática *versus* tempo no intervalo de dose de 16 horas

AUC: área sob a curva plasmática *versus* tempo

CEP: comitê de ética em pesquisa

CHO: cholesterol

CK: creatinina quinase

CKMB: creatina quinase

Cl: clearance

Cmax: concentração plasmática máxima

CPn: última concentração

CV: coeficiente de variação

DAU: daunorrubicina

DL_{50}: dose letal capaz de matar 50% da população testada

DNA: ácido desoxirribonucleico

DOX: doxorrubicina

DRX: difração de raios-X

EDTA: ácido etilenodiamino tetra-acético

EM: emulsão

F: biodisponibilidade

FS: fosfatidilcolina de soja

G-6-PHD (6-fosfato desidrogenase)

HK: hexoquinase

HPLC: cromatografia líquida de alta eficiência

IC: intervalo de confiança

IAM: infarto agudo do miocárdio

IV: intravenosa

$K_{\alpha:}$ fase de distribuição

$K_{\beta:}$ fase de eliminação

$k_{\alpha;}$ constante de distribuição

LD: limite de detecção

LDE: microemulsão lipídica

LDL: lipoproteína de baixa densidade

LDH: lactato desidrogenase

LQ: limite de quantificação

ME: microemulsão

O/A: microemulsão óleo em água

ORPH: eumulgin

OS: oleato de sódio

PI: padrão interno

PK: policetídeo sintase

RNA: ácido ribonucleico

RNAm: ácido ribonucleico mensageiro

SAXS: espalhamento de luz a baixo ângulo

t1/2: meia-vida

tmax: tempo máximo para que ocorra Cmax

tss: tempo para o estado de equilíbrio das concentrações entre o compartimento central e periférico

UV: ultravioleta

Vd: volume de distribuição

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura molecular das principais antraciclinas.....21
Figura 2. Estrutura química da DOX e seu metabólito.....27
Figura 3. Esquema de representa dos tipos de microemulsão 32
Figura 4. Cromatogramas: branco e DOX 5 μg/mL.....52
Figura 5. Curva analítica da DOX em solução.....53
Figura 6. Curva analítica da DOX em plasma.....54
Figura 7. Cromatograma da DOX incorporada na ME. 61
Figura 8. Perfil farmacocinético da DOX a partir da administração da formulação comercial e da ME (6 m/kg) pela via intravenosa (n = 24). 63

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Apresentações farmacêuticas da DOX no mercado brasileiro 23

Tabela 2. Sistema cromatográfico modo gradiente 41

Tabela 3. Precisão e exatidão inter- ensaio do método bioanalítico da DOX em plasma55

Tabela 4. Precisão e exatidão intra- ensaio do método bioanalítico da DOX em plasma55

Tabela 5. LD E LQ para análise do método de análise da DOX em plasma.....56

Tabela 6. Valores de recuperação da DOX em plasma 57

Tabela 7. Estudo de estabilidade da DOX em plasma.....58

Tabela 8. Valores de CKMB (em U/L) nos tempos 0, 1 h e 12 h após a administração de DOX comercial e da ME (6 mg/kg) 59

Tabela 9. Comparação do perfil farmacocinético da DOX comercial e na forma de ME (6 mg/kg) 66

Tabela 10. Parâmetros farmacocinéticos da DOX comercial e na forma de ME(6 mg/kg) após administração iv 68

SUMÁRIO

I. INTRODUÇÃO 14
II. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA 20
2.1 Antraciclinas 20
2.2 Microemulsões 30
III. JUSTIFICATIVA 36
IV. OBJETIVO 37
V. MATÉRIAL E MÉTODOS 38
5.1.1 Matérias primas, reagentes e solventes 38
5.1.2 Equipamentos 39
5.1.3 Preparo do oleato de sódio 39
5.1.4 Preparo da ME 40
5.2 Determinação da DOX em plasma por HPLC 40
5.2.1 Soluções padrões 40
5.2.2 Sistema cromatográfico 40
5.2.3 Processamento das amostras em plasma 41
5.2.4 Validação do método 42
5.3 Determinação da atividade da isoenzima MB da creatinina quinase (CKMB) 45
5.3.1 Determinação do nível de incorporação da DOX na ME 47
5.4 Modelo animal 47
5.5 Protocolo experimental 48
5.6 Análise farmacocinética 49
5.7 Análise estatística 50
VI. RESULTADOS E DISCUSSÃO 51
6.1. Validação do método para determinação de DOX em formulação e plasma HPLC 51
6.2. Atividade da isoenzima CKMB 58
6.3. Incorporação da DOX na ME 60
6.4. Análise farmacocinética 61
VII. CONCLUSÕES 74
VIII. REFERÊNCIAS 75
IX. ANEXOS 93

I. INTRODUÇÃO

Os efeitos produzidos por um fármaco no organismo são resultantes de uma série complexa de eventos que envolvem as fases biofarmacêutica, farmacocinética e farmacodinâmica (SIMPSON et al., 2001).

A fase farmacocinética compreende o movimento dos fármacos e seus metabólitos em um organismo - absorção, distribuição e eliminação - a partir da sua administração, que pode ser quantificada através da aplicação de modelos matemáticos (SIMPSON et al., 2001; SMOLEN, 1978).

Considerando que a intensidade da resposta farmacológica ou tóxica é proporcional ao complexo fármaco-receptor formado após a sua administração, e que existem inter-relações da resposta farmacológica com a concentração plasmática e o tempo de permanência do fármaco no organismo, pode-se afirmar que a farmacocinética constitui uma importante ferramenta para a previsão dos efeitos terapêuticos e/ou tóxicos (CASARETT; DOULL's, 2001).

Vários fatores podem influenciar o perfil farmacocinético de uma substância, como propriedades físico-químicas, a forma farmacêutica e sua técnica de elaboração, assim como os componentes da formulação e a via de administração utilizada (LI; JASTI, 2006). Ainda, características do paciente, como idade, raça, peso, doença hepática ou renal, podem modificar significativamente o perfil farmacocinético (SIMPSON et al., 2001).

O desenvolvimento de medicamentos aplicáveis na terapêutica necessariamente permeia as avaliações pré-clínicas, como os testes de toxicidade e investigação do perfil farmacocinético.

A farmacocinética pré-clínica oferece suporte para os estudos toxicológicos, permitindo determinar a taxa e a extensão da exposição, a fim de correlacionar posteriormente os efeitos tóxicos em animais com a toxicologia clínica (MARSH et al., 2008; SMYTH; HOTTENDORF, 1980). Os modelos animais permitem a caracterização da farmacocinética e da farmacodinâmica e determinam as relações entre a concentração nos tecidos e fluidos biológicos e os efeitos do produto (ANDES; CRAIG, 2002).

Um dos objetivos dos estudos em farmacocinética pré-clínica no desenvolvimento de novos fármacos e formulações é a obtenção de informações básicas sobre o comportamento do produto no organismo viabilizando as modificações necessárias para melhorar a performance deste produto (RUIZ-GARCIA et al., 2008; SIMPSON et al., 2001).

Os estudos de farmacocinética pré-clínica são úteis para a obtenção dos primeiros parâmetros farmacocinéticos, tais como biodisponibilidade (F), clearance (Cl), volume de distribuição (Vd), meia-vida ($t_{1/2}$) entre outros; que sofrem interferência da técnica de elaboração do produto, ou fase biofarmacêutica. Assim, a fase biofarmacêutica e a farmacocinética estão intimamente ligadas.

Na fase biofarmacêutica consideramos os aspectos relacionados à formulação e à técnica de elaboração de um medicamento e sua influência sobre a ação terapêutica. Os fenômenos intervenientes na liberação do fármaco a partir do produto farmacêutico determinam a intensidade e velocidade com que ocorre a entrada da substância ativa no organismo. Estes fenômenos interferem basicamente na liberação e na dissolução do fármaco contido no produto farmacêutico com consequências sobre as concentrações plasmáticas da substância ativa no organismo (PANCHAGNULA; TOMAS, 2000).

Mediante a aplicação de recursos farmacotécnicos adequados é possível modular a velocidade de liberação da substância ativa e alterar os seus efeitos sobre o organismo (LI; JASTI, 2006; DOMÍNGUEZ-GIL, 1993).

Com o intuito de manter as concentrações terapêuticas por um período prolongado e minimizar os efeitos colaterais, tem-se dado atenção especial aos sistemas de liberação controlada (SUGIYAMA, 1996). Ainda, estes sistemas podem ser utilizados para direcionar fármacos, impedindo a sua penetração em tecidos não específicos, com consequente diminuição da toxicidade e aumento da sua concentração no alvo terapêutico (OLIVEIRA et al., 2004; OLIVEIRA; SCARPA, 2001) tais aspectos são particularmente interessantes para fármacos que possuem aplicação terapêutica limitada devido à sua alta toxicidade, como por exemplo os antineoplásicos, produtos cuja aplicação terapêutica restringe-se em decorrência dos seus efeitos tóxicos (MITRA et al., 2001).

A doxorrubicina (DOX) é um dos antineoplásicos do grupo das antraciclinas mais utilizados na terapêutica (MITRA et al., 2001; HANAI et al., 1996) no tratamento de tumores sólidos e leucemias, com ação efetiva tanto em seres humanos quanto em animais (DAGLI, 2002). No entanto, devido à sua ação pouco específica, a DOX provoca também efeitos tóxicos, principalmente cardiotoxicidade e mielossupressão, efeitos dose-dependentes (SACCO et al., 2001). A DOX estimula a produção de radicais livres de oxigênio, altamente reativos e capazes de lesar as membranas celulares e alterar suas funções, o que pode desempenhar um papel importante tanto nas ações antitumorais quanto na toxicidade cardíaca causada por este fármaco (DAGLI, 2002; CHABNER; CALABRESI, 2001; PRATT et al., 1994; COPPOC, 1992).

A diminuição dos efeitos tóxicos destes quimioterápicos sobre os tecidos normais e o aumento da sua eficácia contra diversas patologias tem sido obtido através do uso de vetores nanoestrutrurados (RODRIGUES et al., 2002; GIBAUD et al., 1996).

Com o intuito de melhorar os resultados na terapêutica com mínimo de efeitos tóxicos da DOX, foram desenvolvidos dois sistemas lipossomais: Caelyx ® (Europa) e Doxil® (USA). A DOX incorporada a estes sistemas é direcionada para as células tumorais, com redução significativa na toxicidade (CALTEL et al., 2003). Mas estes novos produtos apresentam algumas desvantagens: devem ser reconstituídos no momento do uso - devido à estabilidade restrita por apenas 24 horas após reconstituição - e seu custo elevado (FORMARIZ, 2008).

Neste contexto, Formariz et al. (2008) desenvolveu uma microemulsão (ME) contendo DOX que apresentou cardiotoxicidade reduzida – avaliada através da atividade da enzima MB da creatinina quinase (CKMB) - em relação ao produto comercial disponível no mercado (pó liofilizado na forma de cloridrato), além do aumento da DL_{50} em ratos wistar e camundongos e manutenção da DE_{50}, com consequente aumento da margem de segurança do produto (FORMARIZ, 2008).

Os sistemas microemulsionados permitem a incorporação de componentes terapêuticos lipofílicos e/ou hidrofílicos e são opticamente transparentes em decorrência do diminuto tamanho de gotícula, que não espalha a luz visível (OLIVEIRA et al., 2009).

As MEs apresentam vantagens sobre formas farmacêuticas convencionais por possuírem partículas com tamanho reduzido, que promovem a sua permanência por um período prolongado na circulação sanguínea (efeito reservatório) (JADHAV et al., 2006). Esses sistemas melhoram a adesão do paciente ao tratamento, devido à redução na frequência de administração e

possibilidade de diminuição da dose (OJEWOLE et al., 2008). Estes aspectos estão relacionados ao fato de que a incorporação de fármacos nestes sistemas leva a modificações na sua disposição cinética em decorrências das diferentes taxas de liberação do produto a partir da forma farmacêutica (BODDY; AARONS, 1989).

A nova formulação contendo DOX desenvolvida por Formariz (2008) tende a proporcionar menor distribuição do fármaco para os tecidos não desejados como coração, rins e fígado, quando comparada com a DOX na forma farmacêutica convencional. A esperada redução da distribuição da DOX nos tecidos cardíacos fundamenta-se na expectativa de que haverá retenção do fármaco no colesterol da fase interna e interface da ME com consequente diminuição da velocidade de liberação do fármaco e dos efeitos cardiotóxicos da DOX.

Ainda, a expectativa é de que a presença do colesterol na ME deverá aumentar a permeabilidade da célula tumoral ao fármaco com consequente aumento de captação do produto por estas células e aumento do efeito antitumoral (FORMARIZ et al., 2008).

Desta forma é evidente que, se estas alterações ocorrerem, o perfil farmacocinético da DOX incorporada à microemulsão será diferente do perfil farmacocinético da formulação comercial disponível, com conseqüências sobre o seu efeito farmacológico e efeitos tóxicos.

A realização dos estudos em farmacocinética requer a disponibilidade de métodos bioanalíticos com sensibilidade e especificidade adequadas (ATKINSON; KUSHNER, 1979) e assim, neste trabalho, um método bioanalítico foi desenvolvido e validado para tal finalidade.

O método bioanalítico desenvolvido foi utilizado para avaliar o perfil farmacocinético da microemulsão contendo DOX em ratos wistar e para avaliar o perfil da DOX disponível no mercado (pó liofilizado na forma de cloridrato). Ainda, neste trabalho, avaliou-se a

cardiotoxicidade do produto veiculado nestas diferentes formas farmacêuticas, através da determinação da atividade da isoenzima MB da creatinina quinase (CKMB).

II. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Antraciclinas

As antraciclinas são metabólitos secundários - sintetizados pela policetídeo sintase (PKS) tipo II - de bactérias filamentosas aeróbicas do gênero *Streptomyces* e compreendem uma série de compostos, tais como a epirrubicina, doxorrubicina, idarrubicina, doxorrubicinona, daunorrubicinona, daunorrubicina e epi-daunorrubicina (SCULLY et al., 2010; JAIN, 2000).

Estas substâncias possuem atividade antibiótica e outras atividades de grande interesse farmacológico e, entre estas, a atividade antitumoral - especialmente a doxorrubicina e a daunorrubicina (DAU) – o que tem ampliado sua aplicação no tratamento de uma grande variedade de neoplasias, tais como os adenocarcinomas mamários, leucemias, linfomas e sarcomas. Atualmente, as antraciclinas são consideradas os fármacos antitumorais mais efetivos do mercado farmacêutico (SAWYER et al., 2010; GEWIRTZ, 1999;).

Estes compostos apresentam em sua estrutura molecular um anel tetraciclina hidrofóbico e uma daunisamina, unidos por uma ligação glicosídica e, ainda, núcleos quinônicos que permitem a sua participação em reações de transferência eletrônica para gerar radicais livres (LOWN, 1993). Todos estes compostos são de característica catiônica em pH fisiológico, o que favorece a sua interação com o DNA. A estrutura molecular destes compostos está representada na **Figura 1**.

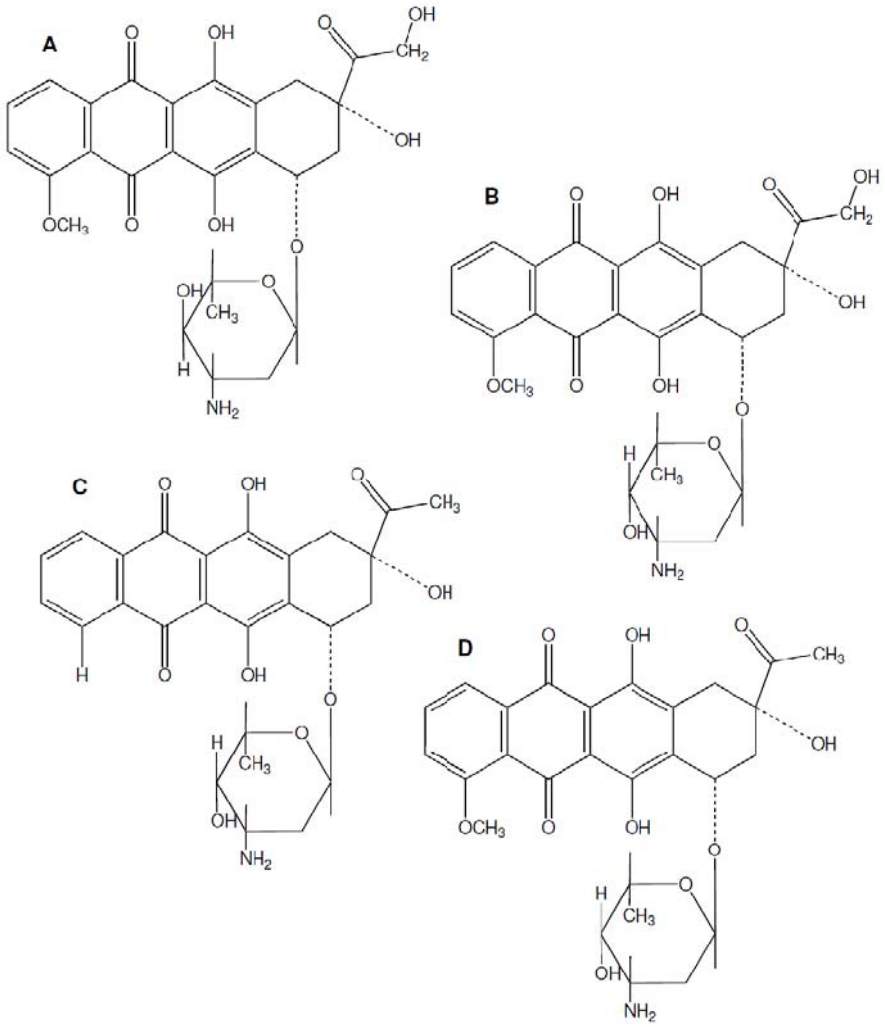


Figura 1. Estrutura molecular das principais antraciclinas a) doxorrubicina; b) doxorrubicina; c) idarrubicina e d) daunorrubicina.

A doxorrubicina difere da daunorrubicina apenas pela presença de uma hidroxila no C_{14}, que determina um diferente espectro de ação antitumoral. O anel fenólico presente na molécula

de doxorrubicina lhe confere características ácidas, enquanto o grupo amino lhe confere características básicas, tornando-a uma molécula anfifílica (LOWN, 1993).

As antraciclinas são altamente reativas em solução e produzem uma série de efeitos sobre os sistemas biológicos, como a citotoxicidade – provavelmente devido à sua capacidade de participar de reações de oxi-redução - e produzem alterações que interferem na síntese de DNA e RNA. Ainda, são capazes de gerar espécies reativas de oxigênio que causam danos ao DNA, RNAm, proteínas e lipídeos (SCULLY et al., 2010; JAIN, 2000; GEWIRTZ, 1999).

As antraciclinas podem ser administradas em diferentes doses e esquemas terapêuticos. Esquemas de baixas doses semanais ou de infusão contínua por 96 horas, em geral, resultam em baixa citotoxicidade com grande eficácia no tratamento das neoplasias. A administração destes compostos por infusão contínua aumenta a incidência e severidade de mucosites, mas diminui as manifestações de mielossupressão, náuseas e vômitos (EKSBORG et al., 1985; KOLARIC et al., 1983).

A DOX é indicada no tratamento de tumores sólidos (mama, bexiga, tireoide, gástrico, ovariano), no tratamento de linfomas de Hodgkin's e leucemias linfoblásticas e mieloblásticas (CHABNER; CALABRESI, 2001; FU et al., 1990).

A DOX comercial é encontrada na forma farmacêutica de pó de liofilizado e deve ser dissolvida em solução de cloreto de sódio 0,9% ou água para injetáveis e na forma lipossomal. O fármaco não é ativo por via oral, não é absorvido pelo trato gastrintestinal e não deve ser administrado por via intramuscular devido à sua toxicidade local (BRISTISH, 2010; KOROLKOVAS, 2009). A DOX - pó liofilizado - está presente no mercado nas dosagens de 10 e 50 mg e comercializada pelos laboratórios farmacêuticos Pfizer, Libbs, Glenmark, Eurofarma, Biosintética,

Zodiac e Meizler. Mais recentemente o antitumoral foi lançado no mercado na forma lipossomal pela Jassen. Na **Tabela 1** estão relacionadas as principais apresentações farmacêuticas disponíveis no mercado e seu custo estimado.

Tabela 1. Apresentações farmacêuticas da DOX no mercado brasileiro.

Forma farmacêutica	**Empresa**	**Dosagem**	**Custo (R$)**	**Nome - comercial**
Pó liofilizado	Pfizer	50 mg	125,89	Adriblastina®
Pó liofilizado	Pfizer	10 mg	35,47	Adriblastina®
Pó liofilizado	Glenmark	50 mg	194,39	Cloridrato de DOX
Pó liofilizado	Glenmark	10 mg	34,74	Cloridrato de DOX
Pó liofilizado	Eurofarma	50 mg	150,00	Cloridrato de DOX
Pó liofilizado	Eurofarma	10 mg	75,00	Cloridrato de DOX
Pó liofilizado	Biosintética	50 mg	408,43	Biorrub®
Pó liofilizado	Biosintética	10 mg	92,09	Biorrub®
Pó liofilizado	Meizler	50 mg	351,41	KU DOX®
Pó liofilizado	Meizler	10 mg	83,43	KU DOX®
Lipossoma	Jassen	2 mg/ml	2.743,48	Caelyx®

* Referente ao mês de maio de 2011

A dose mais freqüentemente recomendada em humanos para se obter um efeito tumoricida máximo e uma toxicidade reduzida é de 50 a 75 mg/m^2 de superfície corpórea. Esta dose corresponde a 1,875 mg/kg, de acordo com a equação SC (m^2) = 0,007184 x (altura cm)^{0,725} x (peso kg)^{0,425}, onde SC representa a superfície corpórea (DUBOIS; DUBOIS, 1989).

A DOX deve ser administrada intravenosamente, em infusão rápida única, então repetida após 21 dias. O fármaco deve ser administrado cuidadosamente para evitar o extravasamento**,** o que pode resultar em ação vesicante local grave e necrose tecidual (CHABNER; CALABRESI, 2001) e que se caracteriza por infiltração do produto nos tecidos próximos do local de punção do fármaco administrado por via parentérica (GEWIRTZ, 1999).

Este extravasamento pode causar lesão local que se instala ao longo de 7 a 10 dias, iniciando-se por eritema e que pode progredir para um processo de necrose tecidual extensa com dor severa e com ulceração progressiva, que pode estender-se durante 2 a 3 meses. A necrose total da pele ocorre com frequência e a cicatrização, em geral, não ocorre espontaneamente **(**LANGER, 2010).

Além da manifestação de ulceração cutânea, pode ocorrer efeito sobre tendões e estruturas neurovasculares. Esta complicação ocorre mais frequentemente quando a administração do fármaco ocorre no dorso das mãos, na fossa antecubital e região flexora anterior do punho. Nestas regiões é comum o aparecimento de contraturas articulares e lesões permanentes com alterações sensomotoras e, em geral, a intervenção cirúrgica é necessária para que ocorra a cicatrização (LANGER, 2010).

O extravasamento de DOX disponibiliza o fármaco na região para a formação de radicais livres que alteram o DNA celular, incapacitando a regeneração tecidual local. Os complexos

DNA-DOX que se formam nas células mortas são liberados e penetram nas células adjacentes por endocitose, prolongando os seus efeitos a outras células, que podem ser observados durante meses após o extravasamento (LANGER, 2010).

A daunorrubicina é administrada intravenosamente na dose de 30 a 60 mg/m^2 diariamente por três dias para o tratamento de leucemias agudas; sua eficácia sobre tumores sólidos é limitada (CHABNER; CALABRESI, 2001; GEWIRTZ, 1999; MUGGIA; GREEN, 1991).

A idarrubicina é também administrada intravenosamente na dose de 15mg/m^2 diariamente por três dias para o tratamento de leucemias agudas em combinação com outros fármacos (MUGGIA; GREEN, 1991).

A dose utilizada de epirrubicina é de 100 a 120 mg/m^2 por iv "*bolus*" a cada três semanas ou de 40 a 50 mg/m^2 em dois dias consecutivos (KOLARIC et al., 1983) e possui eficácia semelhante à DOX no tratamento do câncer de mama (BONTENBAL et al*.,* 1998).

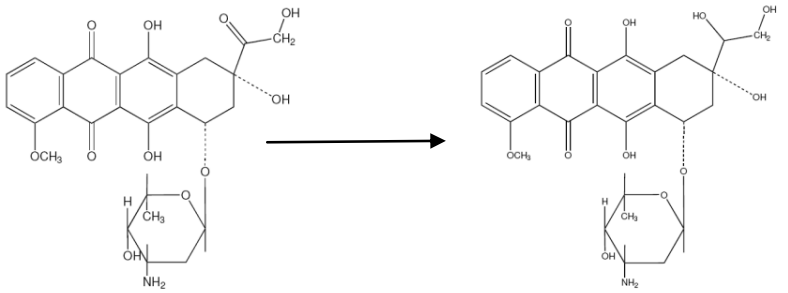
Após a administração intravenosa, as antraciclinas são rapidamente distribuídas. Cerca de 80% do fármaco que permanece no sangue liga-se às proteínas plasmáticas (GREENE et al*.,* 1983). Nos tecidos, estes fármacos ligam-se ao DNA de tal forma que as concentrações teciduais das antraciclinas correlacionam-se com o conteúdo de DNA e são de 10 a 500 vezes maiores do que as concentrações plasmáticas (TERASAKI et al., 1982).

As antraciclinas apresentam, em geral, perfil farmacocinético multicompartimental, e o decaimento das concentrações plasmáticas é prolongado na fase terminal, sustentando concentrações terapêuticas por longos períodos após administração intravenosa (GREENE et al., 1983).

O perfil farmacocinético da formulação comercial da DOX, determinado em pacientes com vários tipos de tumores em dose única ou múltipla, tem apresentado disposição linear (doses de 30 a 70 mg/m^2) e multicompartimental. A primeira fase dura em torno de 11 minutos, representa a sua rápida distribuição para o fígado, pulmões, coração, rins e baço. Na fase final há declínio lento das concentrações plasmáticas com meia-vida de eliminação de aproximadamente 30 horas, após administração intravenosa (PRATT et al., 1994). Em estudo realizado com dez pacientes tratados com DOX, após infusão por 15 minutos de 75 mg/m^2, a meia-vida de distribuição foi de 8 minutos e meia-vida de eliminação de 30 horas. As concentrações iniciais da DOX apresentam valores cerca de 50 vezes maiores quando comparadas às concentrações da fase terminal. Nesta fase terminal ocorre cerca de 75% da exposição total ao fármaco, que se mantém em concentrações citotóxicas por vários dias ($t_{½}$ de 30 horas) (GREENE et al., 1983).

A DOX é rapidamente distribuída para os tecidos, tais como, fígado, baço, rim, pulmão, coração e não atravessa a barreira hematoencefálica (CHABNER; CALABRESI, 2001).

A DOX é metabolizada no tecido hepático pela aldoceto redutase e glicosidases microssomais para originar doxorrubicinol (**Figura 2**), seu principal metabólito que apresenta algum efeito antitumoral, agliconas e outros derivados e é excretada pela bile (CHABNER; CALABRESI, 2001; DE BEER et al., 2001; SUSANECK, 1983).



Doxorrubicina Doxorrubicinol

Figura 2. Estruturas químicas da DOX e seu metabólito doxorrubicinol

A deglicosidação no açúcar daunosamina em C7 produz doxorrubicinona e doxorrubicinolona. O grupo hidroxila resultante pode ser metabolizado em 7-deoxidoxorrubicinona ou 7-deoxidoxorrubicinolona (TAKANASHI; BACHUR, 1976).

Os metabólitos sulfonados ou glucorinudados podem ser encontrados na urina, porém esta etapa da biotransformação é limitada em humanos (TAKANASHI; BACHUR, 1976) e todos os metabólitos da DOX são essencialmente eliminados por secreção biliar (GREENE et al., 1983). O clearance plasmático estimado da DOX é de 17 ± 8 mL/min.kg e é menor em pacientes que apresentam cirrose hepática e obesidade (CHABNER; CALABRESI, 2001).

Aproximadamente 40% da dose é excretada via bile num período de 5 dias, enquanto apenas 5 a 12% da forma inalterada e seus metabólitos são excretados na urina no mesmo período de tempo. A DOX pode ser excretada pelo leite, com pico de concentração nas 24 h após administração (CHABNER; CALABRESI, 2001).

Todas as antraciclinas produzem efeitos tóxicos sobre o músculo cardíaco, sendo mais comum no uso da DOX e daunorrubicina. A insuficiência cardíaca congestiva – decorrente de doses cumulativas - é uma das manifestações mais comuns e de maior significado clínico; sendo a taxa de mortalidade cerca de 30% (OUTOMURO et al., 2007; JAIN, 2000; FU et al., 1990; BRISTOW et al., 1978; LEFRAK et al., 1973). Este efeito tem sido atribuído à capacidade destes produtos de produzir espécies reativas de oxigênio e à produção de peróxido de hidrogênio com consequente peroxidação lipídica no miocárdio (SIMUNEK et al., 2009; CHRISTIANSEN; AUTSCHBACH, 2006). Ainda, as antraciclinas depletam a glutationa, molécula protetora contra processos oxidativos nas células (SAWYER et al., 2010; BIELACK et al., 1989).

Há maior predisposição aos efeitos cardiotóxicos das antraciclinas em pacientes com história anterior de cardiopatias, hipertensão, uso anterior de antraciclinas e outras substâncias cardiotóxicas (LEFRAK et al., 1973).

Em geral, as manifestações cardíacas são observáveis em doses de DOX entre 40 e 75 mg/m^2 em uso iv "*bolus*" a cada 3 a 4 semanas e deve ser realizado controle das funções cardíacas durante este período através, por exemplo, do eletrocardiograma (SAWYER et al., 2010).

Os mecanismos relacionados aos efeitos antineoplásicos da DOX têm sido investigados, porém ainda não estão completamente elucidados. Evidências experimentais indicam que a DOX forma um complexo com o DNA pela intercalação entre os pares de bases, causando a inibição da síntese de DNA e de RNA dependente de DNA pela inibição das polimerases (DE BEER, et al., 2001; MITRA et al., 2001; MIGLIETTA et al., 2000; GEWIRTZ, 1999). A DOX também inibe a

síntese de proteínas ativas em todo o ciclo de divisão celular, inclusive na interfase (SAWYER et al., 2010).

Biomarcadores cardíacos bioquímicos são extensamente utilizados para o diagnóstico de lesão cardíaca, para o auxílio nas emergências médicas e para o tratamento de infarto agudo do miocárdio (IAM). Os marcadores cardíacos compreendem CKMB, AST (alanina aspartato desidrogenase), LDH (lactato desidrogenase) e troponinas (HERREN; WAY-JONES, 2001; HUDSON et al., 1999).

A creatinina quinase (CK) é uma molécula dímera, composta de 2 subunidades, a subunidade B presente principalmente na região cerebral e a subunidade M mais abundante no músculo esquelético. Na região cerebral é encontrado a subunidade CKBB, no músculo esquelético a subunidade CKMM e no miocárdio a subunidade CKMB (JOHNSTON et al., 1982).

Danos às células do miocárdio resultam na liberação desta enzima intracelular e a liberação é dependente do tempo (HEDGES, 1995). Assim, a CKMB é um marcador sensível à necrose do miocárdio para detecção de danos cardíacos (RAJAPPA; SHARMA, 2005; HEDGES, 1995; LOUIS; GANDHI, 1994).

Considerando que a CKMB é um marcador de maior especificidade para avaliação de danos cardíacos, é possível utilizá-la para o diagnóstico precoce de IAM. No entanto, esta especificidade mantém-se apenas até 6 horas após o início dos sintomas (RAJAPPA; SHARMA, 2005; HERREN; WAY-JONES, 2001; HUDSON et al*.,* 1999; MAIR, 1997).

A CKMB deve auxiliar na decisão clínica, sendo um complemento para o diagnóstico de IAM em emergências médicas (SAENGER; JAFFE, 2008; JAFFE et al., 2006; HEDGES, 1995;

JOHNSTON et al., 1982). Ainda, este biomarcador pode ser utilizado como parâmetro para avaliação de toxicidade em estudos pré-clínicos (LOCK; BONVENTRE, 2008; SAENGER; JAFFE, 2008; JAFFE, 2006; RAJAPPA; SHARMA, 2005).

2.2. Microemulsões

Os avanços na área farmacêutica têm acelerado o desenvolvimento de novos sistemas de liberação de fármacos (LAWRENCE e REES, 2000). O emprego da nanotecnologia nos sistemas de liberação prolongada teve início na década de 80. Esses sistemas representam alternativas para a liberação controlada, permitindo a modulação da velocidade de penetração do fármaco através das barreiras biológicas até o alvo farmacológico (OLIVEIRA et al., 2004; OLIVEIRA; SCARPA, 2001).

Os sistemas micro e nanoemulsionados são capazes de compartimentalizar fármacos nas gotículas da fase interna, as quais possuem propriedades físico-químicas bastante diferentes das do meio dispersante, induzindo modificações nas propriedades biológicas dos fármacos incorporados (BHARGAVA et al., 1987). Esses novos sistemas apresentam grande potencial como carreador de fármacos, conferindo melhora na solubilidade, aumento da biodisponibilidade e estabilidade e diminuição da toxicidade (OLIVEIRA et al., 2009). Assim, o desenvolvimento de novos sistemas de liberação de fármacos antitumorais para administração endovenosa tem sido um dos principais temas de pesquisa em tecnologia farmacêutica nos últimos anos. Entre as alternativas avaliadas, destacam-se principalmente as microemulsões (FORMARIZ et al., 2006).

O termo microemulsão (ME) foi introduzido por Hoar e Schulman, em 1943, que descreveram estes sistemas como transparentes ou translúcidos, obtidos por titulação a partir

de uma emulsão comum, que apresenta aspecto leitoso e quando adicionado um álcool de cadeia média (cotensoativo) se clarifica (GROSH; MURTHY, 2006; EZRAHI et al., 1996).

As MEs são definidas como sistemas transparentes, caracterizados pela mistura de óleo, água, tensoativo e cotensoativo, formando um sistema termodinamicamente estável. São capazes de solubilizar fármacos hidrofílicos, lipofílicos e anfifílicos (GROSH; MURTHY, 2006; LAWRENCE; REES, 2000; TENJARLA, 1999).

O tensoativo pode ser uma substância pura ou uma combinação de vários componentes, com a função principal de reduzir a tensão interfacial. Os tensoativos não-ionicos e zwiteriônicos são os mais aceitáveis para aplicações farmacêuticas, por possuírem baixa toxicidade e por não alterar a força iônica nem o pH (LAWRENCE; REES, 2000). As moléculas do cotensoativo se intercalam entre as moléculas do tensoativo na interface óleo-água, mudando assim a curvatura da gotícula.

O tamanho das gotículas de uma ME varia de 100 a 1.000 Å, nas emulsões (EM) as gotículas podem ter até 5000 Å de diâmetro (LAWRENCE; REES, 2000). A adição do cotensoativo proporciona a diminuição do tamanho das gotículas, que ocorre devido à redução da tensão interfacial entre óleo-água (TROTTA et al., 2002). Dessa forma, o sistema resultante possui baixa tensão interfacial (próxima de zero), formação espontânea, sem a necessidade de força externa e maior estabilidade termodinâmica (TENJARLA, 1999).

As MEs e as EMs podem ser diferenciadas pelo fato de que as MEs possuem menor tamanho de gotículas e estabilidade termodinâmica. Outra importante diferença é aparência das formulações: enquanto as EMs são opacas, as MEs são claras e transparentes, devido ao diminuto tamanho das gotículas (LAWRENCE; RESS, 2000).

Dois tipos de MEs podem ser formados, O/A e A/O, além de estruturas bicontínuas em que água e óleo estão separados por uma monocamada de tensoativo **(Figura 3)** (LAWRENCE; RESS, 2000).

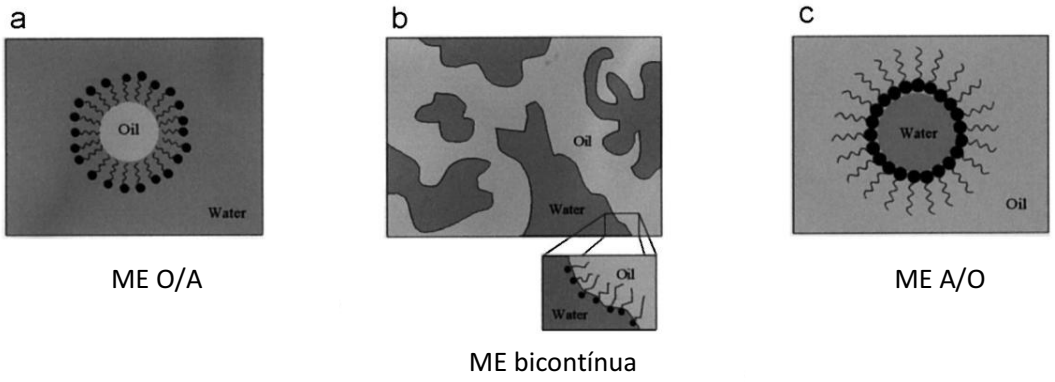


Figura 3. O esquema representa os três tipos de microemulsão: (a) óleo em água (O/A), (b) estrutura bicontínua e (c) água em óleo (A/O). Fonte: LAWRENCE; REES, 2000.

O tipo de ME formada depende do balanço entre as propriedades hidrofílicas e lipofílicas do tensoativo, característica dependente da sua estrutura química e de outros fatores, tais como a temperatura, força iônica e presença de co-tensoativo (ANSEL et al., 2000). A existência de uma mistura de tensoativos com equilíbrio hidrofílico–lipofílico adequado proporciona a maior solubilização do óleo e da água (LAWRENCE; RESS, 2000).

A incorporação de fármacos através desses sistemas proporciona aumento da solubilidade de fármacos lipofílicos em água, melhora a permeabilidade aos tecidos tumorais - aumentando

sua retenção – e os protege contra hidrólise enzimática com consequente aumento da eficácia terapêutica (FORMARIZ et al., 2005).

As MEs lipídicas têm a capacidade de solubilizar uma quantidade considerável de fármacos de caráter lipofílico no domínio hidrofóbico da fase interna oleosa, e por isso são consideradas carreadoras de fármacos lipofílicos (LUNDBERG et al., 1996).

As MEs lipídicas sintéticas são semelhantes às lipoproteínas de baixa densidade (LDL), principais transportadoras de colesterol no plasma. As LDLs são removidas da circulação através de receptores específicos na membrana plasmática, que têm a capacidade de reconhecê-las. Esse tipo de ME é usada para transportar quimioterápicos até as células tumorais, que apresentam maior captação de LDL em relação às células normais, devido à maior velocidade de divisão com consequente maior necessidade de colesterol para a síntese de membrana plasmática, nuclear e mitocondrial. O número de receptores para LDL em células tumorais pode chegar de 3 a 100 vezes o número disponível das células normais (PINHEIRO et al., 2006; AZEVEDO et al., 2005). No estudo de Ho e colaboradores (1978) foi observado que na leucemia mielóide aguda e em outras doenças malignas há um aumento da remoção de lipoproteínas da circulação sanguínea com consequente menor concentração de colesterol total e LDL.

Em 2009, Yin e colaboradores desenvolveram uma ME lipídica O/A contendo Docetaxel (antineoplásico), para administração via oral. Neste trabalho foi observado um perfil farmacocinético mais adequado, quando comparado ao perfil de uma suspensão, principalmente aumento da biodisponibilidade em decorrência do aumento da solubilidade do fármaco e do aumento da permeabilidade.

Nornoo e colaboradores (2009) incorporaram paclitaxel (antineoplásico) em uma ME que proporcionou aumento da solubilidade em água e consequentemente aumento na biodisponibilidade oral. Ainda, foi desenvolvida uma ME contendo vincristina (antineoplásico) por Saad e colaboradores (2001), para administração intravenosa, a fim de diminuir sua toxicidade. A nova formulação permitiu distribuição mais seletiva do fármaco, com consequente menor toxicidade e aumento da permeabilidade no tecido tumoral.

No trabalho realizado por Formariz (2008), foi desenvolvido um sistema microemulsionado contendo óleo de rícino polioxil-40-hidrogenado (ORPH), fosfatidilcolina de soja (FS) e oleato de sódio (OS) como tensoativos, colesterol (CHO) como fase oleosa e tampão Tris-HCl 0,01 *M* pH 7,2 como fase aquosa.

A ME O/A utilizada neste trabalho, desenvolvida por Formariz, foi caracterizada por reologia, microscopia de luz polarizada, espalhamento de luz a baixo ângulo (SAXS) e difração de raios-X (DRX). Os estudos de microscopia de luz polarizada, SAXS e DRX confirmaram a existência de sistema microemulsionado, enquanto a análise reológica evidenciou comportamento plástico e tixotrópico, que possibilita sua aplicação por via parenteral (FORMARIZ, 2008).

Observou-se, ainda, que a proporção utilizada de colesterol juntamente com o sistema tensoativo resultou na cristalização do colesterol com consequente restrição da mobilidade das moléculas de DOX na fase interna da ME, que pode influenciar na velocidade de liberação do fármaco incorporado. Ainda, a adição de OS à formulação favoreceu sua estabilidade pela redução da tensão interfacial, com formação de gotículas na ordem de nanômetros (FORMARIZ, 2008).

Experimentos de toxicidade aguda e parâmetros bioquímicos (marcadores de cardio e hepatotoxicidade) indicaram redução da toxicidade da ME quando comparada à DOX convencional, o que permite sugerir que a retenção da DOX pelo sistema alterou a distribuição do fármaco para os tecidos, impedindo a penetração nos tecidos não alvo e, consequentemente, diminuindo sua toxicidade (FORMARIZ, 2008).

Os resultados de atividade antitumoral "*in vivo*" mostraram que a DOX incorporada à ME teve seu efeito antitumoral potencializado, por maior captação do produto nestas células em decorrência da presença do colesterol na formulação.

Assim, o sistema desenvolvido foi capaz reduzir o efeito tóxico da DOX e potencializar seu efeito antitumoral, sugerindo uma ampliação na margem de segurança do produto e a possibilidade de sua aplicação no tratamento das neoplasias (FORMARIZ, 2008).

III. JUSTIFICATIVA

Em estudos anteriores realizados por Formariz (2008), a administração da ME contendo DOX resultou em um perfil de toxicidade diferente da formulação comercial, sugerindo que o uso desse recurso farmacotécnico alterou o seu perfil farmacocinético, assim como contribuiu para a diminuição dos seus efeitos tóxicos.

A investigação da farmacocinética pré-clínica constitui etapa fundamental do desenvolvimento de novos fármacos e medicamentos, devido a sua utilidade na elucidação de parâmetros farmacocinéticos, base para a construção dos regimes posológicos.

Assim, o presente trabalho teve como objetivo comprar o perfil farmacocinético e cardiotoxicidade da DOX incorporada na ME desenvolvida por Formariz (2008) com a formulação comercial de DOX na forma de cloridrato.

IV. OBJETIVOS

- Desenvolver e validar um método bioanalítico para quantificar a DOX em formulações e em plasma por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC);
- Determinar as concentrações de DOX na ME;
- Avaliar o perfil farmacocinético da DOX administrada na forma farmacêutica convencional (Cloridrato de Doxorrubicina, Eurofarma, Brasil), por via intravenosa em dose única a ratos Wistar;
- Avaliar o perfil farmacocinético da DOX incorporada na ME, administrada por via intravenosa em dose única a ratos Wistar;
- Avaliar e comparar a atividade da CKMB sérica como expressão da cardiotoxicidade nos dois grupos.

V. MATERIAL E MÉTODOS

5.1.1 Matérias primas, reagentes e solventes

- Acetonitrila J.T. Baker, HPLC; USA;
- Ácido fosfórico, Synth, Brasil;
- Ácido oleico, Synth, Brasil;
- Ácido perclórico, Merck, Brasil
- Água deionizada em sistema Milli Q com condutividade 18,2µS. cm^{-1};
- Colesterol, Sigma-Aldrich, USA;
- Cloridrato de doxorrubicina, Eurofarma, Brasil (50 mg de Cloridrato de doxorrubicina, 200 mg de manitol e 250 mg de lactose);
- Daunorrubicina, Pfizer, Brasil
- EDTA, Vetec, Brasil;
- Fosfatidilcolina de soja (Epikuron® 200), Lucas Meyer, Alemanha;
- Hidróxido de amônio, Merck, Brasil;
- Hidróxido de sódio, PA-ACS, Grupo Química Brasil;
- Kit labtest CKMB (ref: 118-2/30);
- Metanol J. T. Baker, HPLC, USA;
- Oleato de sódio;
- Óleo de rícino polioxil-40-hidrogenado (Eumulgin® HRE40), Pharma Special, Brasil;

5.1.2 Equipamentos

- Agitador Vórtex;
- Balança Shimadzu;
- C18, 5 cm, 3,9 x 150 mm (X-Terra®; Waters);
- Cubetas de quartzo para espectrofotometria, Spectrocell;
- Centrífuga Excelesa® II, Mod 206 BL;
- Detector de fluorescência Waters® modelo 2475;
- Espectrofotômetro HP 8453;
- peagâmetro digital pG 1800 Gehaka;
- Sistema de cromatografia líquida (HPLC) Waters® modelo 600 E;
- Software Empower®;
- Sonicador Sonics®, Vibra-Cell;
- Ultracentrífuga Sorval Biofuge;
- Ultrassom de haste - Sonicador® Ultrasonic Liquid Processor modelo XL2020™.

5.1.3. Preparo do oleato de sódio

O oleato de sódio foi preparado a partir da reação de esterificação. O hidróxido de sódio (NaOH) 40,0 g foi dissolvido em água pura. Pesou-se 282,47 g de ácido oleico. Adicionou-se por gotejamento a solução de NaOH sobre o ácido, sob agitação constante. Obteve-se uma massa viscosa amarela, cujo pH foi de aproximadamente 14,0. A mistura ficou em repouso em temperatura ambiente por 24 horas. Após as 24 horas, a mistura foi lavada com acetona e o procedimento foi repetido por 3 vezes,

obtendo-se uma substância clara, com pH próximo de 6,0. Em seguida, o produto obtido foi mantido em repouso durante 48 horas a vácuo, até a secagem total.

5.1.4. Preparo da ME

As MEs foram obtidas 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 a ultrassom de haste, em modo descontínuo, por 20 minutos à temperatura ambiente.

Após homogeneização, a DOX foi adicionada até atingir a concentração final de 7,0 mg/mL e o sistema foi centrifugado a 2500 rpm por 10 minutos, a fim de verificar se houve separação de fases do sistema.

5.2. Determinação da DOX em plasma por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)

5.2.1. Soluções- padrão

As soluções estoque de DOX e daunorrubicina na concentração de 100 μg/mL foram diluídas em metanol, e as soluções de trabalho nas concentrações de 0,03125; 0,06125; 0,125; 0,25; 0,5; 1,0; 2 e 5 μg/mL foram obtidas através da diluição com fase móvel.

5.2.2. Sistema cromatográfico

A determinação da DOX por HPLC foi realizada a partir dos métodos publicados por Urva et al. (2009), Al-Abd et al. (2009), Wei et al. (2008) e envolveu a separação em coluna C18, 5 μm, 3,9 x 150 mm (X-Terra®; Waters), à temperatura

ambiente e fase móvel composta por 25% de acetonitrila e 75% de água na presença de ácido fórmico (0,1%) e de solução de amônia 25% (0,1%), pH 3,0, com fluxo de 0,8 mL/min, em modo gradiente (**Tabela 1**). Foi utilizado o equipamento Waters® modelo 600 E, com detector de fluorescência Waters® modelo 2475 operando em comprimento de onda de excitação de 480 nm e 560 nm de emissão. Os resultados das análises foram processados através do software Empower®.

Tabela 2. Sistema cromatográfico modo gradiente

Tempo (minutos)	**Acetonitrila (%)**	**Água ácida pH 3,0 (%)**
0	25	75
10	25	75
15	27	73
20	25	75

5.2.3. Processamento das amostras de plasma

A 200 µL de plasma foram adicionados 25 µL da solução de PI e 50 µL de ácido perclórico 35% para a precipitação de proteínas. Em seguida, adicionou-se 100 µL de fase móvel e agitou-se em vórtex por 15 segundos. As amostras foram centrifugadas a 15000g por 15 minutos e 200 µL do sobrenadante foram introduzidos no sistema cromatográfico.

5.2.4. Validação do método

O processo de validação envolveu os procedimentos necessários para a determinação dos limites de confiança do método, segundo as normas estabelecidas pela ANVISA (RESOLUÇÃO-RE nº 899, de 29 de maio de 2003) e tem como objetivo avaliar se o método analítico desenvolvido pode ser aplicado em estudos de farmacocinética da DOX.

Os parâmetros fundamentais para se determinar o limite de confiança do método, segundo a ANVISA são: linearidade, limite de detecção (LD), limite de quantificação (LQ), precisão e exatidão intra e inter ensaios e estabilidade.

Estudos de Linearidade - Curva analítica em fase móvel

A curva analítica foi construída no intervalo de concentração de 30,25 a 2000 ng/mL de DOX para soluções diluídas com fase móvel com o objetivo de determinar o nível de incorporação do fármaco na formulação. As determinações foram feitas em triplicatas e o critério de aceitação da curva foi o coeficiente de correlação maior que 0,99 e coeficiente de variação menor que 15%.

Estudos de Linearidade - Curva em plasma

A avaliação da linearidade foi realizada através da análise de amostras de plasma adicionadas de diferentes concentrações no intervalo de concentração de 30,25 a 5000 ng/mL, utilizando-se um "pool" de plasma branco de ratos. O método foi considerado linear até a maior concentração analisada com coeficiente de variação menor que 15% e o critério de aceitação para linearidade foi o coeficiente de correlação superior a 0,99. As amostras foram analisadas em triplicata.

Recuperação

A recuperação mede a eficiência do procedimento de extração de um método analítico dentro de um limite de variação. Porcentagens de recuperação do analito e do padrão interno próximos a 100% são desejáveis, porém, admite-se valores menores, desde que a recuperação seja precisa e exata.

Este teste deve ser realizado comparando-se os resultados analíticos de amostras extraídas a partir de três concentrações (baixa, média e alta), contemplando a faixa de linearidade do método, com os resultados obtidos com soluções padrão não-extraídas, que representam 100% de recuperação. Foram utilizadas as concentrações de 0,5; 2 e 1 μg/mL para o estudo de recuperação, em triplicata.

Limite Inferior de Quantificação (LQ)

Foi considerado como a menor quantidade de um analito numa amostra que pode ser determinada quantitativamente com precisão e exatidão aceitáveis**.** Deve ser no mínimo, cinco vezes superior a qualquer interferência da amostra branco. O critério de aceitação utilizado foi o coeficiente de variação de 20 % para a precisão e exatidão de 80-120%. Este parâmetro foi estabelecido por meio da análise de matriz biológica contendo concentrações decrescentes do analito até o menor nível quantificável com precisão e exatidão aceitáveis, utilizando-se 5 replicatas.

Limite de Detecção (LD)

É definido como a menor concentração de um analito que o procedimento bioanalítico consegue diferenciar confiavelmente do ruído de fundo e estabelecido por meio da análise de amostras adicionadas do analito em concentrações conhecidas e decrescentes, até o menor nível detectável. Recomenda-se que o LD seja de 2 a 3 vezes

superior ao ruído da linha de base ou ruído de fundo quando se analisa o branco de amostra.

Precisão intraensaio (repetibilidade) e interensaios (reprodutibilidade)

A precisão do método foi avaliada através dos coeficientes de variação da análise de replicatas de amostras de plasma, em 3 níveis de concentração (0,5 μg/mL; 1 μg/ mL e 2 μg/mL) de DOX, durante 3 dias consecutivos (interensaios) e em 5 replicatas num mesmo ensaio (intraensaio).

Exatidão

A exatidão (% de erro sistemático) foi obtida pela concordância dos resultados obtidos experimentalmente com os valores teóricos do fármaco na amostra. Foram analisadas amostras de plasma adicionadas de DOX nas concentrações de 0,5 μg/mL; 1 μg/mL e 2 μg/mL durante 3 dias consecutivos (interensaios) e em 5 replicatas num mesmo ensaio (intraensaio).

Estabilidade

O estudo de estabilidade consiste em avaliar se o analito sofre alterações em um período específico de armazenamento pré e pós-processamento (CHANG, 2002).

Alíquotas de plasma foram preparadas nas concentrações de 0,5 e 2,0 μg/mL, em triplicata.

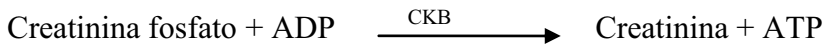
- **Estabilidade de curta duração:** As amostras permaneceram à temperatura ambiente (20°C) por 24 horas, foram analisadas e os resultados comparados com aqueles obtidos na análise das amostras recém-preparadas;
- **Estabilidade após ciclos de congelamento e descongelamento**: As amostras foram congeladas à temperatura de -20°C por 24 horas sendo então submetidas ao descongelamento à temperatura ambiente. Quando completamente descongeladas,

foram novamente congeladas à -20 °C por 24 horas, e assim sucessivamente até completar 3 ciclos. O fármaco foi quantificado após o terceiro ciclo e os valores comparados com os obtidos na análise das amostras recém-preparadas;

- **Estabilidade de longa duração:** O tempo de armazenamento deve exceder o intervalo de tempo compreendido entre a coleta da primeira amostra e análise da última, de acordo com o cronograma do projeto. A temperatura deve reproduzir a recomendada para armazenamento da amostra, geralmente -20°C. A estabilidade de longa duração foi determinada ao final de 7 dias de armazenamento.

5.3. Determinação da atividade da isoenzima MB da creatinina quinase (CKMB).

A determinação de CKMB foi realizada através de método cinético pela reação otimizada por SZASZ e colaboradores (1976). O processamento da amostra de soro envolveu a sua incubação com o reagente da isoenzima MB da creatinina quinase (CKMB) que contém um anticorpo específico para subunidade CKM, que inibe completamente a atividade enzimática do monômero CKM. A atividade do monômero CKB, que não é inibida pelo anticorpo, é obtida pela seqüência de reações:



Assim, CK-B catalisa a desfosforilação da creatinina fosfato para produzir adenosina trifosfato (ATP).

Subsequentemente, o ATP irá reagir com a glicose na presença da hexoquinase (HK) formando glicose 6-fosfato.

$$\text{ATP + Glicose} \xrightarrow{\text{HK}} \text{ADP + Glicose-6-fosfato}$$

A glicose 6-fosfato, na presença de glicose 6-fosfato desidrogenase (G-6-PDH), é oxidada a 6-fosfogluconato (6-PG) e reduz o NAD a NADH.

$$\text{Glicose-6-fosfato + NAD} \xrightarrow{\text{G-6-PDH}} \text{6-PG +NADH}$$

O cálculo da atividade da enzima é realizado através do aumento da absorvância em 340 nm decorrente das reações acima descritas.

O procedimento analítico envolveu a utilização de um calibrador, em seguida iniciou-se a leitura das absorvâncias, através da adição de 40 µL de plasma e 800 µL de reagente de trabalho, que foram incubados a 37 °C por 5 minutos.

As amostras para a determinação da atividade de CKMB foram colhidas nos tempos zero (imediatamente anterior à administração do fármaco) e no momento da decapitação do animal (1 e 12 horas após a administração).

5.3.1. Determinação do nível de incorporação da DOX na ME

Para a determinação da incorporação da DOX na ME, a formulação foi diluída em água estéril e analisada por HPLC nas condições cromatográficas anteriormente descritas. Todas as análises foram realizadas em triplicatas e o critério de aceitação foi coeficiente de variação inferior a 15% entre as replicatas.

5.4. Modelo Animal

Foram utilizados ratos Wistar machos, com peso médio de 300 g, provenientes do biotério central da Universidade Estadual Paulista-Unesp. Os animais foram transferidos para o biotério do Departamento de Princípios Ativos Naturais e Toxicologia da Faculdade de Farmácia Bioquímica da Unesp de Araraquara, mantidos em condições controladas de temperatura (23 ± 1º C), umidade (55 ± 5%) e luz (ciclo 12/12h, luzes acesas as 7h) e com ração balanceada e água *ad libitum*. Os experimentos foram realizados na fase de claro. O protocolo experimental foi previamente aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP/Araraquara, protocolo sob o número 33/2009 – CEP (em anexo).

Foram utilizados 24 animais, distribuídos nos seguintes grupos:

Grupo I: Tratados com cloridrato de doxorrubicina (n= 12; 6 mg/kg)

Grupo II: Tratados com ME contendo DOX (n= 12; 6 mg/kg).

Utilizando a dose obtida de acordo com a equação de DUBOIS; DUBOIS (1989), a dose para humanos é de 1, 875 mg/kg, com base no cálculo de extrapolação alométrica, obtendo-se a dose para ratos de aproximadamente 6 mg/kg.

5.5. Protocolo Experimental

Grupo I: Doxorrubicina cloridrato (pó liofilizado)

As soluções do cloridrato de DOX foram preparadas em água estéril e administradas por via intravenosa em dose única (6 mg/kg).

Neste grupo foram obtidos os parâmetros farmacocinéticos da DOX a partir da administração da formulação convencional disponível no mercado. A administração da formulação se deu através de cânula previamente implantada na veia femoral do animal e após jejum de 4 h. Após a administração foram realizadas coletas seriadas de sangue através da veia caudal do animal. Foram coletados 500 μL de sangue em eppendorffs, com EDTA, nos tempos 0,08; 0,25; 0,5; 1,0; 2; 4; 8; 12 e 16 horas após a administração. Para cada coleta foram empregadas 5 replicatas. Para cada animal foram realizadas 3 coletas pela cauda e a 4ª coleta por decapitação. Esses procedimentos foram feitos de acordo com o Guia de Boas Práticas de administração de substâncias e coleta de sangue de animais (DIEHL et al., 2001).

As amostras coletadas no tempo zero e no momento da decapitação do animal foram utilizadas para a determinação da atividade da isoenzima CKMB.

Grupo II: Doxorrubicina incorporada em microemulsão (6 mg/kg)

Neste grupo foram obtidos os parâmetros farmacocinéticos da DOX a partir da administração da formulação desenvolvida por Formariz (2008). A administração da formulação foi realizada através de cânula previamente implantada na veia femoral do

animal e após jejum de 4 h. Após a administração foram realizadas coletas seriadas de sangue através da veia caudal do animal. Foram coletados 500 μL de sangue em eppendorffs, com EDTA, nos tempos 0,08; 0,25; 0,5; 1,0; 2; 4; 8; 12 e 16 horas após a administração. Para cada tempo de coleta foram empregadas 5 replicatas. Para cada animal foram realizadas 3 coletas pela cauda e a 4ª coleta foi realizada por decapitação. Esses procedimentos foram executados de acordo com o Guia de Boas Práticas de administração de substância e coletas de sangue de animais (DIEHL et al., 2001).

As amostras coletadas no tempo zero e no momento da decapitação do animal foram utilizadas para a determinação da atividade da isoenzima CKMB.

5.6. Análise Farmacocinética

A disposição cinética DOX foi avaliada após a administração de dose única de 6 mg/kg de cloridrato de DOX e da ME contendo DOX na mesma dose, pela via intravenosa. Os parâmetros farmacocinéticos foram calculados através das curvas de concentração plasmática *x* tempo. As meias-vidas e as constantes de velocidade (distribuição e eliminação) foram determinadas através do modelo bicompartimental, que melhor se adaptou aos dados experimentais.

As constantes de velocidade foram calculadas com base na equação $0,693/t_{1/2}$. As áreas sob as curvas de concentração plasmática *x* tempo (AUC^{0-16}) foram calculadas através do método dos trapezóides. A AUC^{0-inf} foi calculada através da equação $AUC^{0-inf} = AUC^{0-16}+(CPn/\beta)$, sendo CPn a última concentração quantificada 16 horas após a administração. Para o cálculo de clearance total aparente (Cl) utilizou-se a equação modelo independente $Cl=dose/AUC^{0-inf}$ e para o cálculo de volume aparente de distribuição (Vd) foi utilizada a equação $Vd= Cl/\beta$. O Cmáx, assim como o tmáx foram

obtidos diretamente dos dados experimentais. A meia-vida de eliminação foi calculada através do método gráfico e a meia-vida de distribuição foi calculada através do método dos resíduos. O tempo para o estado de equilíbrio das concentrações entre o compartimento central e periférico (tss) foi calculado a partir da equação tss= $\ln(\alpha/\beta)/(\alpha-\beta)$.

5.7. Análise Estatística

Os parâmetros farmacocinéticos de cada grupo foram apresentados através das medianas, médias e IC 95. A comparação dos parâmetros farmacocinéticos para DOX foi feita através da aplicação do teste de Mann Whitney, utilizando-se o software GraphPad Instat® (GADDIS et al., 1990).

Para avaliação das diferenças na atividade da isoenzima CKMB antes e após a administração da DOX foi aplicado o teste de Tukey.

Os cálculos das curvas analíticas e coeficientes de variação (CV%) foram realizados utilizando-se o programa Origin®.

VI. RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1. Validação do método para a determinação de DOX em formulações e plasma por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)

O sistema microemulsionado estudado apresentou aspecto transparente a olho nu, com cor amarelada e após a incorporação de DOX o sistema apresentou coloração avermelhada. O sistema foi submetido à centrifugação a 2500 rpm durante 10 minutos e pode-se observar que não houve separação de fases demonstrando estabilidade.

Neste estudo desenvolveu-se um método bioanalítico para a separação da DOX em formulações e plasma utilizando-se a DAU como padrão interno. O sistema cromatográfico proposto foi capaz de separar os compostos adequadamente, conforme demonstrado na **Figura** 4. Pode-se ainda observar que a matriz biológica livre de doxorrubicina (branco), processada conforme descrito no item 5.2.3 e analisada no sistema cromatográfico proposto não apresentou picos interferentes nos tempos de retenção de interesse.

Estes resultados demonstram que a utilização do detector de fluorescência permite a detecção do composto satisfatoriamente em decorrência das propriedades fluorescentes das antraciclinas (KARUKSTIS, 1998). Estão disponíveis na literatura uma série de métodos analíticos para a determinação de DOX por HPLC através da detecção por UV (ultravioleta) (BARPE et al., 2010; RODRIGUES et al., 2009; LARSON et al., 2003; LOADMAN; CALABRESE, 2001), eletroquímico (RICCIARELLO et al., 1998) e massas. Entretanto a detecção por UV pode não demonstrar sensibilidade suficiente para estudos em farmacocinética e as técnicas com detecção eletroquímica apresentam a desvantagem da necessidade frequente de manutenção e limpeza do eletrodo, que pode saturar em curto espaço de tempo com

consequente diminuição da sensibilidade do método (CHMIELEWSKA et al., 2006). Os detectores de massas apresentam alta sensibilidade e especificidade, no entanto são equipamentos de alto custo e nem sempre disponíveis (ARNOLD et al., 2004; LACHÂTRE, 2000). A utilização do detector de fluorescência apresentou boa relação custo-benefício, quando comparado a estas outras técnicas descritas. Ainda, a extração líquido-líquido aplicada neste método desenvolvido, é de baixo custo, de processamento rápido e, portanto, aplicável para a análise de DOX incorporada na ME ou em plasma.

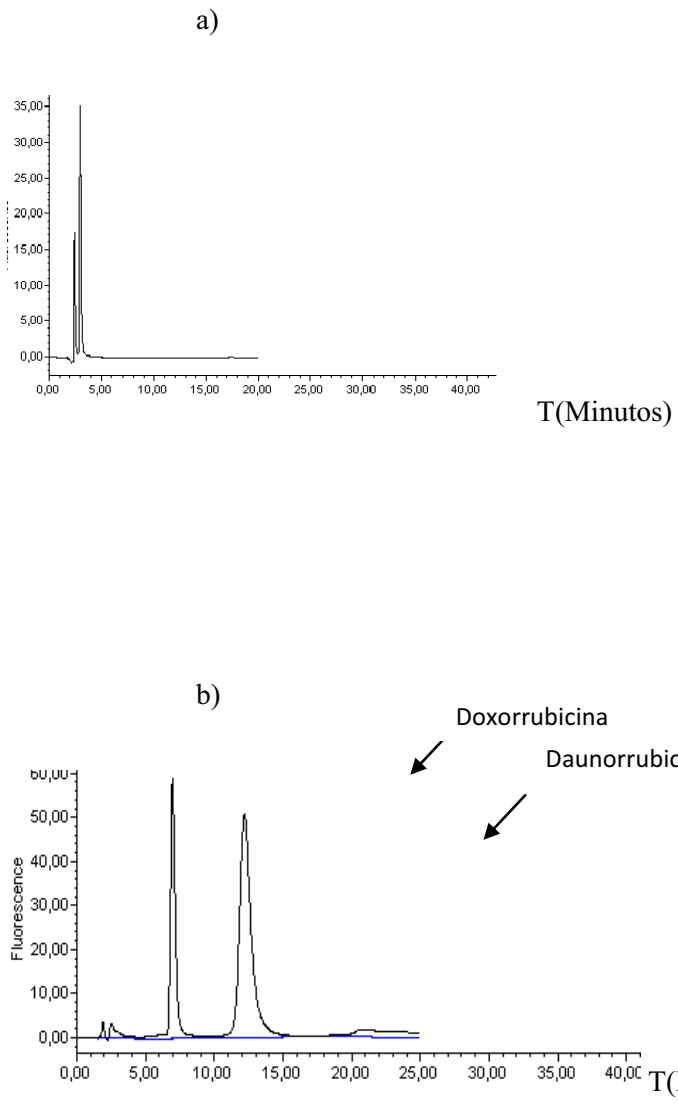


Figura 4. Cromatogramas: (a) matriz biológica-plasma branco; (b) DOX 5 µg/mL e DAU em plasma.

No sistema cromatográfico proposto, o tempo de retenção da DOX foi de aproximadamente 6,6 minutos e da DAU foi de 11 minutos. Não houve diferença entre os tempos de retenção identificados na análise do fármaco na matriz biológica e em fase móvel, indicando a robustez do método quanto a este aspecto. Não foi detectada qualquer interferência de componente das matrizes neste tempo de retenção, indicando especificidade e seletividade para o método.

O estudo de linearidade da DOX diluída em fase móvel, para a faixa de concentração de 30,25 a 2000 ng/mL, resultou em coeficiente de correlação superior a 0,99, com coeficientes de variação para as replicatas inferiores a 15 % e exatidão dentro da faixa de 80-120% em relação ao valor teórico. A curva analítica está representada na **Figura 5** e a equação da reta foi utilizada para a quantificação da DOX na microemulsão.

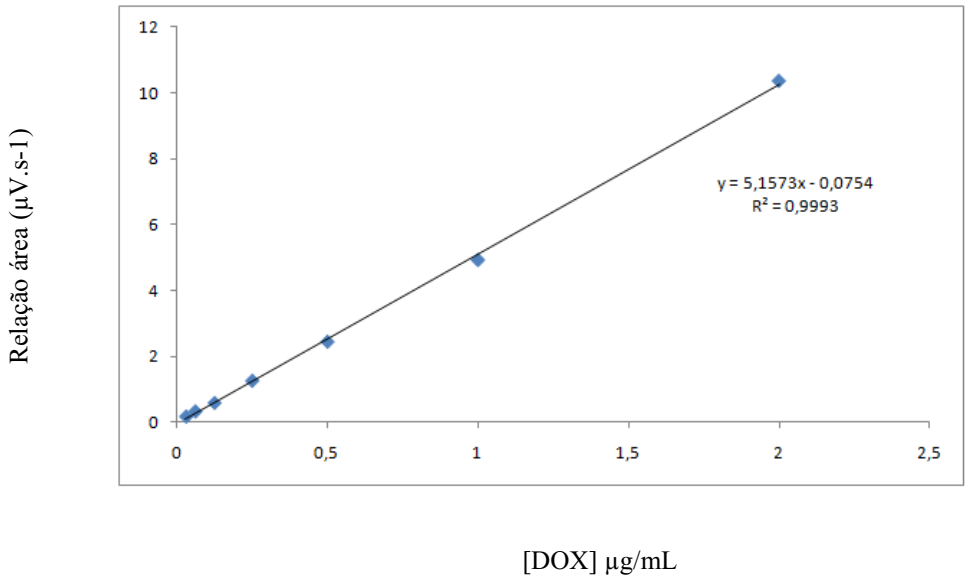


Figura 5. Curva analítica da DOX em fase móvel obtida para a faixa de concentração de 30,25 a 2000 ng/mL.

O coeficiente de correlação de 0,9993 demonstra linearidade satisfatória do método bioanalítico na faixa de estudo. Resultados semelhantes foram obtidos por Al-Abd et al. (2009), Urva et al. (2009) e Wei et al. (2008) em faixas de concentrações semelhantes.

A curva analítica da DOX em plasma, construída na faixa de concentração de 30,25 a 5000 ng/mL apresentou coeficiente de correlação superior a 0,99 e está representada na **Figura 6**. A equação da reta foi utilizada para a quantificação do fármaco nas amostras de ratos que receberam o produto por administração intravenosa.

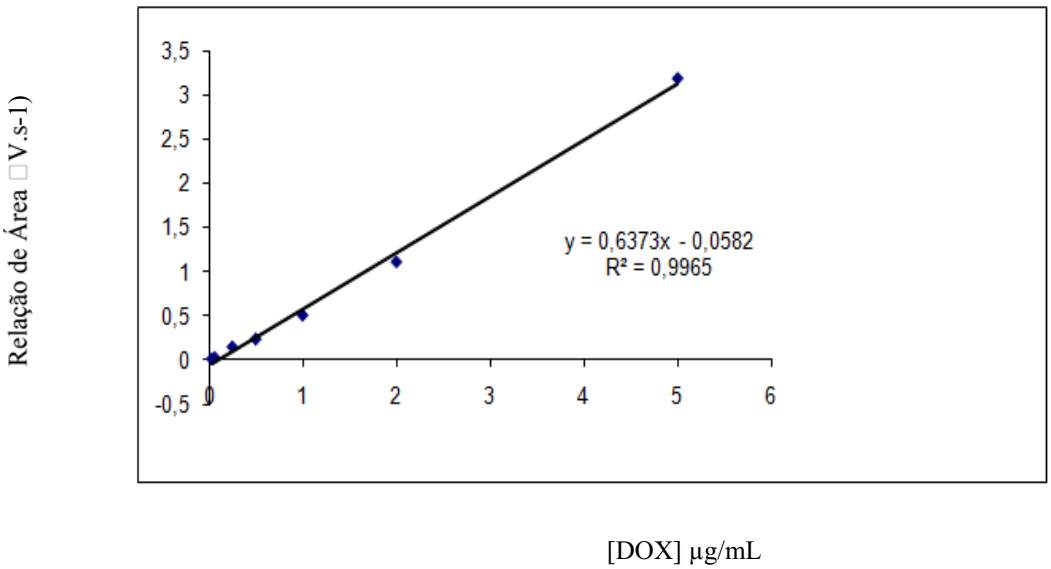


Figura 6. Curva analítica de DOX em plasma na faixa de concentração de 30,25 a 5000 ng/mL.

Os resultados obtidos no estudo de precisão e exatidão intra e interensaios estão descritos na **Tabela 3 e 4** e apresentaram valores adequados de CV (precisão) demonstrando repetibilidade e reprodutibilidade satisfatória para a aplicação do método no estudo em farmacocinética, uma vez que os valores de CV% foram inferiores a 15%.

Tabela 3. Precisão e exatidão inter-ensaio do método bioanalítico para a determinação da DOX em plasma (n=15).

Concentração (µg/mL)	Precisão*	Exatidão	Precisão*	Exatidão	Precisão*	Exatidão
0,5	9,23	-16,37	5,53	-8,26	14,5	4,52
1	11,05	-7	10,34	-3,59	10,69	3,95
2	13,15	-7,12	14,54	-1,08	5,49	1,98

* Valores expressos como coeficiente de variação

Tabela 4. Precisão e exatidão intra-ensaio do método bioanalítico da DOX em plasma (n=5).

Concentração (µg/mL)	Precisão (CV%)*	Exatidão
0,5	13,98	1
1	11,04	-2,21
2	11,48	-2,09

*Valores expressos como coeficiente de variação

A sensibilidade de um método bioanalítico é condição fundamental para a sua aplicabilidade em estudos de farmacocinética, uma vez a necessidade de quantificação do fármaco por um período de tempo relativamente longo após sua administração, e a expectativa é de que ocorram concentrações plasmáticas extremamente pequenas. Assim, a capacidade de quantificação do método determina a viabilidade de detecção do produto em tempo suficiente para que os parâmetros farmacocinéticos calculados a partir da curva de concentração plasmática *versus* tempo sejam de maior confiabilidade.

Na **Tabela 5** estão apresentados os resultados obtidos para os limites de detecção e quantificação da DOX na matriz biológica através da aplicação do método bioanalítico desenvolvido neste estudo. O limite de quantificação obtido (31 ng/mL) foi considerado satisfatório para a aplicação do método no protocolo experimental proposto para estudo em farmacocinética.

Tabela 5. Limites de detecção e quantificação do método de análise de DOX em plasma (n=5).

Limite de quantificação (µg/mL)	0,031
CV (%)	12,1
Limite de detecção (µg/mL)	0,02
CV (%)	5,13

CV= coeficiente de variação

O estudo da recuperação do método bioanalítico avalia as perdas do analito em decorrência do processamento das amostras. Na **Tabela 6** estão apresentados os resultados do estudo de recuperação da DOX no fluido biológico após processamento pelo método desenvolvido neste projeto. Os valores ideais de recuperação para um método bioanalítico são aqueles próximos à totalidade, ou seja, indicando que o analito seja completamente recuperado da matriz durante o procedimento de extração ou processamento da amostra. No entanto, como o procedimento envolveu simplesmente um processo de diluição da amostra, é esperado que a recuperação esteja abaixo da totalidade e de acordo com a proporção de diluição. A adição de um volume total de 175 µL à 200 µL de plasma leva a uma diluição proporcional ao resultado de

recuperação obtido (cerca de 50%). Resultados semelhantes de recuperação foram obtidos no trabalho publicado por Al-Abd et al. (2009).

A baixa recuperação do método tem consequências sobre a sua sensibilidade, com valores de limites de quantificação e detecção superiores aos métodos bioanalíticos que utilizam extração líquido-líquido ou em fase sólida com fase posterior de concentração do extrato. No entanto, é conhecida a instabilidade da DOX na exposição à luz, e consideramos que um procedimento de rápido processamento - sem exposição da matriz biológica à luz - resultaria em determinações mais confiáveis a despeito da limitação da sensibilidade do método.

Tabela 6. Valores de recuperação da DOX em plasma (n=3). Dados apresentados como média e coeficiente de variação (CV %).

Concentração teórica (µg/mL)	Recuperação	CV
0,5	51,99	11,92
1	52,89	3,93
2	56,65	6,9

CV= coeficiente de variação

A estabilidade do analito da matriz biológica limita o tempo de seu processamento e de análise e, assim, conhecer esta limitação é importante para a obtenção de resultados confiáveis. Na **Tabela 7** estão demonstrados os resultados do estudo de estabilidade da DOX no fluido biológico sob diferentes condições, conforme descrito no item 5.2.2. (Materiais e Métodos). Os resultados obtidos ressaltam a necessidade de processamento rápido quando a matriz biológica for armazenada em temperatura ambiente, pois há perda significativa do analito no período de 24 horas. No

entanto, a manutenção da matriz em temperatura de -20 °C mantém a estabilidade do analito o suficiente para análise posterior num período máximo de 72 horas.

Tabela 7. Estudo de estabilidade da DOX em amostra biológica (plasma). Resultados apresentados como porcentagem de analito nas diferentes situações de exposição da amostra.

Concentração (ug/mL)	**Curta duração (24 h;T °C amb.)**	**3 Ciclos de congelamento (-20°C/24h)**	**Longa duração (-20 C/ 7 dias)**
0,50	25,17	88,06	92,58
2,00	42,13	100,00	83,30

Assim, estes resultados demonstram que há estabilidade do fármaco na matriz biológica quando acondicionada na temperatura de -20^{o}C por 24h, permitindo que seu armazenamento para posterior análise.

Os resultados da validação demonstraram que o método desenvolvido e validado apresentou limites de confiança adequados para a sua aplicação na determinação de DOX nas formulações estudadas e nos estudos de farmacocinética da DOX.

6.2. Atividade da isoenzima CKMB

A atividade sérica da CKMB constitui-se como um dos marcadores mais específicos para avaliação de lesões de miócitos, dada a sua concentração no músculo cardíaco (MELO, 2001).

Os resultados de CKMB para o grupo de animais que recebeu dose única de cloridrato de DOX (6 mg/kg) estão apresentados na **Tabela 8** como mediana, média (IC95). As amostras de sangue foram colhidas nos tempos zero, 1 hora e 12 horas após administração do fármaco.

Tabela 8. Valores de CKMB (em U/L) nos tempos zero, 1 hora e 12 horas após administração da DOX comercial e da ME (6 mg/kg). Dados expressos como mediana, média (IC95); (n=6).

	DOX cloridrato		
T0H	**T1H**	**T0H**	**T12H**
143,55	306,61	278,55	490,12*
157,43 (43,73-271,14)	322,27 (210,70 - 433,92)	263,27 (195,77-330,79)	428,57 (284,97-572,17)
	DOX ME		
T0H	**T1H**	**T0H**	**T12H**
298,54	182,04	222,41	189,07 #
239,46 (79,134-399,80)	180,16(119,90-240,41)	196,40(286,15-106,65)	219,53 (332,39-106,68)

*apresentou diferença estatística significativa em relação ao tempo zero (Tuckey)

apresentou diferença estatística significativa em relação ao tempo 12 horas do grupo cloridrato (ANOVA)

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. Pode-se observar que 12 horas após a administração de ME DOX, 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 ME DOX indicando cardiotoxicidade para o primeiro. A ausência de cardiotoxicidade no grupo tratado com ME pode ser explicada pela composição lipídica da ME, que proporciona um "efeito reservatório" para o fármaco, conferindo menor distribuição para o miocárdio e consequente diminuição de efeitos tóxicos.

Alterações na atividade de CK têm sido relatadas após administração de DOX na forma de cloridrato em modelos animais. Abdel-Raheem e Abdel-Ghany (2009) obtiveram valores basais de CK - em ratos Wistar - na ordem de 200 U/L e, 48 horas após administração intraperitoneal de cloridrato de DOX (20 mg/kg), os valores da atividade de CK foram na ordem de 450 U/L. Estes resultados sugerem que a cardiotoxicidade da DOX manifesta-se rapidamente e após a administração de dose única do produto. No trabalho de Singh e colaboradores (2008), em ratos Wistar (machos) tratados com cloridrato de DOX (20 mg/kg), os valores basais de CKMB foram na ordem de 2230 U/L e, 48 h após administração de DOX, os valores de CKMB foram na ordem de 3303 U/L; demonstrando a cardiotoxicidade inerente a DOX. Ainda, Saad e colaboradores (2001) observaram em ratos Wistar (machos) tratados com DOX (25 mg/kg) valores basais de CKMB na ordem de 280 U/L e, após 48h da administração do produto, valores de CKMB na ordem de 1397 U/L.

6.3. Incorporação da DOX na ME

O método analítico desenvolvido foi aplicado para a determinação do teor de DOX na ME após o processo de incorporação (**Figura 7**). A concentração de DOX na ME foi de 6,6 mg/mL, que representa 94 % do total de fármaco adicionado na formulação. O método apresentou sensibilidade para a determinação de DOX quando incorporada no sistema microemulsionado, apresentando limites de confianças adequados.

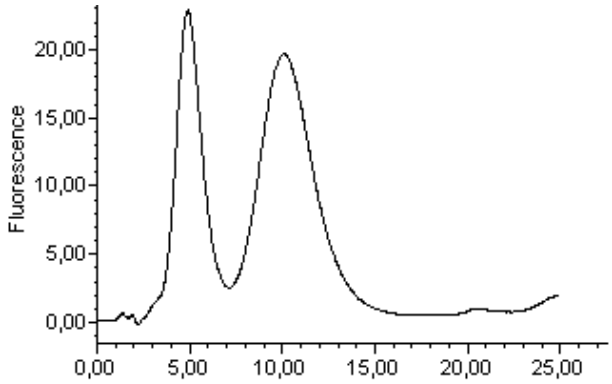


Figura 7. Cromatograma de DOX incorporada na ME, diluída em água estéril, concentração de 6,6 mg/mL .

6.4. Análise farmacocinética

O objetivo desta etapa foi comparar o perfil farmacocinético da formulação comercial - pó liofilizado - com o sistema microemulsionado contendo DOX.

A disposição cinética da DOX foi avaliada após a administração intravenosa da formulação comercial – cloridrato de doxorrubicina em solução aquosa – e da ME, em dose única (6 mg/kg) em ratos Wistar e através da construção da curva de concentração plasmática *versus* tempo.

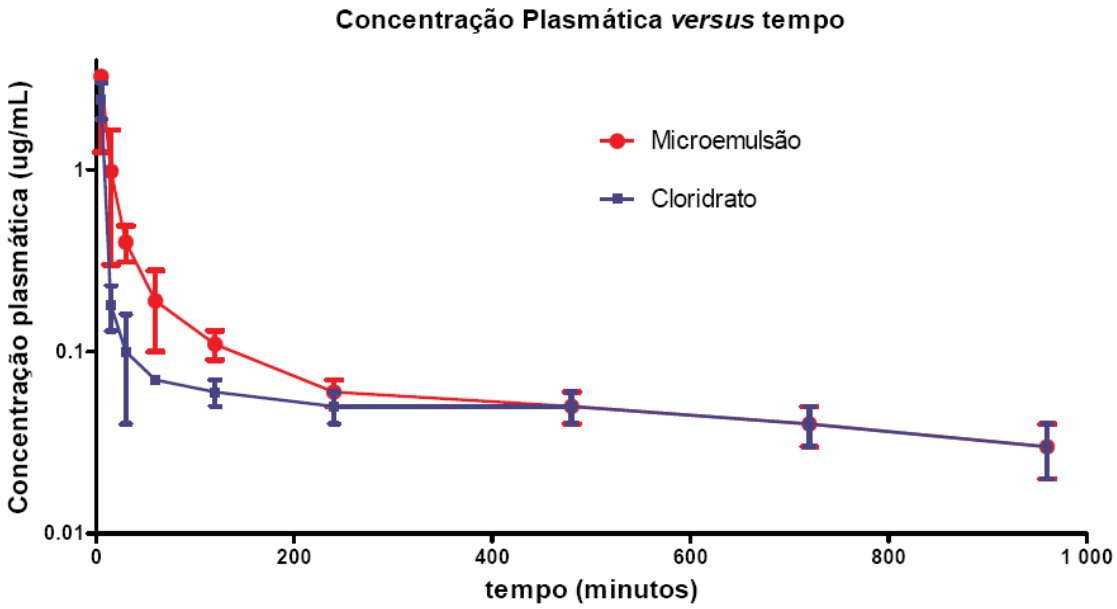
As curvas de concentração plasmática *versus* tempo permitem a aquisição de uma série de parâmetros farmacocinéticos, tais como Cmax (concentração plasmática máxima), tmax (tempo para a ocorrência de Cmax), ASC (área sob a curva), constantes de velocidade de cada processo (absorção, distribuição e eliminação), meia vida de cada processo, clearance e volume de distribuição.

Ressalta-se que o perfil farmacocinético observado através da curva de concentração plasmática *versus* tempo reflete todos os processos do movimento do fármaco no organismo que ocorrem simultaneamente. Estes processos envolvem a introdução direta do fármaco no organismo (administração intravenosa) ou absorção (quando a administração é extravascular), a distribuição, a biotransformação e excreção do fármaco; sendo que no primeiro – introdução ou absorção - há o favorecimento da concentração plasmática e nos três subsequentes há desfavorecimento desta concentração. Assim, existem forças oponentes entre os processos que determinam os níveis plasmáticos observados após administração de uma determinada formulação de características peculiares (TOUTAIN; BOUSQUET-MÉLOU, 2004).

Para a obtenção dos parâmetros farmacocinéticos é preciso construir relações matemáticas a partir da compreensão dos processos que ocorrem após a administração do fármaco. A construção dessas relações é viável quando utilizamos os modelos farmacocinéticos (SIMPSON et al*.,* 2001).

Assim, os parâmetros farmacocinéticos da DOX e ME-DOX foram calculados com base na curva concentração plasmática *versus* tempo demonstrada na **Figura 8**. Os valores de concentração plasmática *versus* tempo obtidos estão demonstrados na **Tabela 8** e expressos como mediana, média e IC 95.

Figura 8. Perfil farmacocinético da DOX a partir da administração da formulação comercial e da ME (6 mg/kg), pela via intravenosa (n=24). Dados apresentados como média (IC 95).



Pode ser observado que a curva de concentração plasmática da DOX *versus* tempo apresenta duas velocidades de decaimento da concentração plasmática. Na primeira fase, há decaimento mais rápido, que ocorre nos primeiros 30 minutos após a administração e na segunda fase a velocidade de decaimento é mais lenta. Este tipo de comportamento caracteriza-se como modelo farmacocinético bicompartimental, onde a distribuição do fármaco nos diferentes tecidos e fluidos do organismo ocorre em velocidades diferentes.

Do ponto de vista prático, a aplicação de um modelo mono ou bicompartimental leva a diferenças na construção das equações para cálculo da evolução temporal do movimento do fármaco no organismo. Neste caso, o modelo bicompartimental permite

o cálculo da constante de distribuição e meia-vida de distribuição (α e $t_{1/2\alpha}$) (TOUTAIN; BOUSQUET-MÉLOU, 2004).

O modelo de dois compartimentos é caracterizado pela existência de um compartimento central, para o qual o fármaco será distribuído de maneira instantânea e homogênea a partir de sua administração; e outro periférico, para o qual o fármaco será distribuído em uma velocidade diferente. Nesse modelo observa-se a constante alfa (α - fase de distribuição) e a constante beta (β - fase de eliminação). Assim, o fármaco distribui-se inicialmente de forma muito rápida em um conjunto de tecidos e órgãos que formam um hipotético compartimento central, e o faz mais lentamente em outros tecidos que formam o compartimento periférico. Ambos os compartimentos são interligados e, em geral, o compartimento central é constituído pelo sangue e pelos órgãos de maior perfusão sanguínea. À medida que ocorre o equilíbrio de distribuição do fármaco no compartimento periférico, a velocidade de decaimento da concentração plasmática diminui e o perfil de decaimento das concentrações plasmáticas observado graficamente passa a representar apenas a velocidade de eliminação do fármaco (TOZER; ROWLAND, 2009; TOUTAIN; BOUSQUET-MÉLOU, 2004).

A velocidade de distribuição sofre interferência de alguns fatores fisiológicos como fluxo sanguíneo e características da membrana, das propriedades físico-químicas do fármaco, que determinam a sua capacidade para atravessar as membranas e sua afinidade para ligar-se com proteínas plasmáticas, além das características do sistema biológico e da fase biofarmacêutica (TOUTAIN; BOUSQUET-MÉLOU, 2004).

Pode-se calcular o tempo em que ocorre o equilíbrio das concentrações no compartimento periférico (tss) e, assim, a modificação da velocidade de decaimento das concentrações plasmáticas através da aplicação da equação $tss= \ln(\alpha/\beta)/(\alpha-\beta)$. Para a

DOX administrada na forma de ME, o tss foi de 48,45 min; e para a DOX na forma de cloridrato este tempo foi de 31,45 min, estatisticamente diferentes. Isto demonstra que o equilíbrio das concentrações do fármaco no compartimento periférico ocorre mais lentamente quando está inserido no sistema microemulsionado, comportamento característico de sistema reservatório.

No entanto, não foram encontradas diferenças estatísticas significativas entre as constantes de distribuição (α) da DOX contida na formulação ME e da DOX convencional (0,1056 *vs* 0,1652). Isto pode ser explicado pela alta variabilidade do parâmetro farmacocinético, que o torna menos sensível para a detecção de diferenças na velocidade do processo de distribuição, assim como a meia vida de distribuição.

Nas formulações de liberação imediata a expectativa é de que a maciça liberação do fármaco leve ao aparecimento de concentrações plasmáticas máximas elevadas decorrentes da rápida absorção do produto seguida do decaimento rápido destas concentrações como consequência do predomínio dos processos de distribuição e eliminação na disposição cinética.

Os parâmetros farmacocinéticos da DOX, obtidos a partir da curva de concentração plasmática *versus* tempo obtida, estão apresentados na **Tabela 9**, como mediana, média e intervalo de confiança 95 % (IC95).

Tabela 9. Comparação do perfil farmacocinético da DOX comercial e na forma de ME (6mg/kg). Dados expressos como mediana, média (IC95).

Tempo (minutos)	**Conc. plasmática (µg/mL) ME**	**Conc. plasmática (µg/mL) DOX comercial**	**p**
5	3,55 3,7 (1,24-5,27)	2,25 2,45 (1,8-3,1)	p = 0,6905 (NS)
15	1,94 1,71 (0,29-1,66)	0,174* 0,179 (0,15-0,21)	p = 0,0079
30	0,31 0,33 (0,31-0,49)	0,10* 0,10 (0,083-0,122)	p = 0,079
60	0,16 0,20 (0,1-0,28)	0,07* 0,073 (0,055-0,091)	p = 0,0079
120	0,11 0,11 (0,09 -0,13)	0,050* 0,056 (0,055 -0,067)	p = 0,079
240	0,069 0,065 (0,053 -0,075)	0,050* 0,052 (0,046 -0,058)	p = 0,0159
480	0,043 0,046 (0,035-0,057)	0,05 0,050 (0,041-0,059)	p = 0,4585 (NS)
720	0,037 0,037 (0,031 -0,049)	0,04 0,038 (0,032 -0,044)	p = 0,7445 (NS)
960	0,03 0,034 (0,027 -0,041)	0,03 0,032 (0,026 -0,038)	p = 0,6634 (NS)

NS- não significante

* $p < 0,05$: diferença estatística significativa

Os perfis farmacocinéticos obtidos neste estudo foram diferentes entre as duas formulações e podem-se observar diferenças estatísticas significativas entre as concentrações plasmáticas de DOX. Os animais que receberam DOX na forma de ME apresentam concentrações plasmáticas mais elevadas quando comparadas aos valores de concentrações plasmáticas da formulação comercial. Estes resultados revelam que a DOX incorporada na ME permanece em maiores concentrações no sangue circulante, o que significa menor distribuição para os tecidos, incluindo-se o miocárdio.

O valor médio de Cmax obtido para microemulsão contendo DOX não foi diferente estatisticamente quando comparado com a formulação comercial (3,7 μg/mL *vs* 2,45 μg/mL), na administração da mesma dose do cloridrato de DOX. No entanto, para os momentos subsequentes e até 480 minutos após a administração, as concentrações plasmáticas foram estatisticamente diferentes e superiores para a DOX administrada na forma de ME.

No trabalho publicado por Wei e colaboradores (2008), a administração da mesma dose de cloridrato de DOX (6 mg/kg) a ratos Wistar machos com peso médio de 190 a 230 g resultou em concentrações plasmáticaas máximas (Cp_0 extrapolado) de 8,7 μg/mL para o cloridrato de DOX e 35,9 μg/mL para uma formulação de DOX peguilada lipossomal. Estes resultados corroboram com o fato de que a formulação pode servir como sistema reservatório no sangue circulante, como observado nos resultados da DOX ME em nosso trabalho.

Os parâmetros farmacocinéticos da DOX cloridrato e incorporada na ME estão apresentados na **Tabela 10**, como mediana, média e intervalo de confiança 95 % (IC95).

Tabela 10. Parâmetros farmacocinéticos da DOX comercial e na forma de ME (6mg/kg) obtidos após administração iv. Dados expressos como mediana, média (IC95).

Parâmetro	**ME DOX**	**Formulação comercial DOX**	**P**
Cmax experimental (μg/mL)	3,55 3,7 (1,24 – 5,27)	2,25 2,45 (1,8 - 3,10)	p = 0,6905 (NS)
Cpo extrapolado (μg/mL)	5,16 4,42 (1,5-7,3)	3,32 3,26 (2,44 – 4,1)	p= 0,4375 (NS)
β (min^{-1})	0,001 0,0014 (0,00072 - 0,00208)	0,0009* 0,00078 (0,0004836 - 0,001076)	p = 0,0276
α (min^{-1})	0,095 0,1056 (0,0433-0,1679)	0,167 0,1652 (0,1389-0,1915)	p = 0,1167 (NS)
ASC 0-inf (ug/mL.min)	158,45 142,45 (101,45 - 183,45)	106,86 121,61 (78,48 - 164,74)	p = 0,09167 (NS)
Vd (L/kg)	37,1 38,23 (24,94 -51,50)	66,30* 68,85 (55,69 -82,00)	p = 0,0162
Cl (mL/min/kg)	56,15 50,23 (35,64 – 64,82)	56,15 51,81 (38,34 – 65,29)	p = 0,9167 (NS)
t ½β (h)	11,55 9,24 (5,31 - 13,17)	12,83* 16,51 (7,64 - 25,40)	p = 0,0276
t ½ α (min)	7,29 7,50(4,27 – 10,73)	4,15 4,25(3,54 - 5,13)	p = 0,1167 (NS)
tss (min)	48,45 45,33 (39,45-58,20)	31,68* 33,23 (27,7-38,75)	p=0,0434

NS – não significante

* $p < 0,05$: diferença estatística significativa

As concentrações plasmáticas atingidas por um fármaco após sua administração possuem relação de proporcionalidade com a intensidade de seus efeitos farmacológicos e tóxicos, e estão relacionadas com a dose administrada, com o tipo de forma farmacêutica, via e forma de administração, entre outros fatores (TOZER; ROWLAND, 2009).

No entanto, as concentrações plasmáticas superiores de DOX encontradas na administração da ME resultaram em menor cardiotoxicidade do que a encontrada na administração de cloridrato de DOX, cujos valores de concentrações plasmáticas são inferiores e, desta forma, pode-se inferir que as características da nova formulação proposta proporcionaram alterações na relação entre os efeitos tóxicos esperados e as concentrações plasmáticas do fármaco.

A área sob a curva (ASC) da concentração plasmática pelo tempo é uma medida da exposição sistêmica total do organismo ao fármaco. A ASC é expressa em concentração x tempo (μg/mL.h ou μg/mL.min) (SHARGEL et al., 2005), pode ser determinada pelo método dos trapezóides e o valor numérico da ASC representa a quantidade do fármaco disponível no sistema biológico após a sua administração.

O valor médio da $ASC_{0\text{-}inf}$ da DOX ME, quando comparada a formulação comercial (142,45 μg/mL.min *vs* 121,61 μg/mL.min), não apresentou diferença estatística significativa; e resultados semelhantes foram encontrados por Wei e colaboradores (2008) na administração de cloridrato de DOX (6 mg/kg) a ratos Wistar machos ($ASC_{0\text{-}inf}$ de 87,5 μg/mL.min).

O clearance (Cl) (ou depuração) é um termo usado para indicar a remoção completa de determinada substância de um volume específico de sangue na unidade de tempo. O clearance é expresso em volume por unidade de tempo (mL/min ou L/h), e

compreende todos os processos que resultem na eliminação do fármaco do organismo. Assim, a biotransformação hepática somada à excreção renal de um determinado fármaco leva ao que se chama de depuração sistêmica total, ou clearance total (TOZER; ROWLAND, 2009). O Cl constitui o principal parâmetro farmacocinético para avaliar a eliminação de um fármaco. O clearance plasmático, ou depuração é o termo melhor empregado, pois o plasma é o fluido biológico mais utilizado para determinar a concentração de fármaco circulante. É um dos parâmetros de maior aplicação em farmacocinética clínica e permite o cálculo da dose necessária para manter a concentração plasmática média no estado de equilíbrio na administração de doses múltiplas (TOUTAIN; BOUSQUET-MÉLOU, 2004).

De maneira geral, a eliminação de uma substância é constante e a taxa absoluta de eliminação é uma função linear da concentração do fármaco no plasma. A maioria dos fármacos obedece à cinética de 1ª ordem (uma fração constante da substância é eliminada por unidade de tempo). Em alguns casos, a eliminação de fármacos obedece cinética de ordem zero - quando o fármaco tem seus mecanismos de eliminação saturados (TOUTAIN; BOUSQUET-MÉLOU, 2004) .

Os valores médios de Cl obtidos para a DOX na administração das duas formulações não apresentaram diferenças estatísticas significativas, indicando que as características da nova formulação não representaram obstáculos à remoção do fármaco por ação dos sistemas enzimáticos responsáveis por seu metabolismo. Urva e colaboradores (2009) encontraram os valores de Cl na ordem de 70 mL/min.kg após a administração de cloridrato de DOX (10 mg/kg) em ratos machos.

O volume de distribuição (Vd) é definido como volume necessário para conter a quantidade de fármaco no organismo numa concentração igual a do plasma. O Vd é expresso volume por peso (mL/kg ou L/kg). Também denominado de volume aparente,

uma vez que o volume de distribuição não é fisiologicamente verdadeiro, em termos de espaço anatômico. Este parâmetro reflete o processo que consiste na migração do fármaco do local de administração para os tecidos periféricos (TOZER; ROWLAND, 2009). O Vd é um parâmetro usado para avaliar a quantidade de fármaco no organismo a partir da medida da concentração do composto no plasma, sendo uma constante de proporcionalidade entre a quantidade total do fármaco no organismo e no plasma. A principal aplicação do Vd é calcular a dose de ataque (a primeira dose em um regime de dose múltipla) para alcançar a imediatamente a concentração plasmática média terapêutica. A distribuição do fármaco para os tecidos depende de vários fatores, como solubilidade em componentes lipofílicos (distribuição para o tecido adiposo), ligação a proteína plasmática, em especial à albumina para os fármacos ácidos e à glicoproteína α_1-ácida para fármacos básicos e afinidade por componentes de outros tecidos (TOUTAIN; BOUSQUET-MÉLOU, 2004).

O valor médio de Vd obtido para a DOX na forma de microemulsão foi inferior, quando comparado com a DOX da formulação comercial (38,23 L/kg *vs* 68,85 L/kg). Isto pode ser explicado pela retenção da DOX na fase interna-oleosa e nas gotículas do sistema, possibilitando a menor distribuição para os tecidos não desejados, como o coração. Este aspecto é extremamente vantajoso considerando-se a potencial cardiotoxicidade do produto. No trabalho realizado por Wei e colaboradores (2008), a utilização de uma formulação lipossomal com DOX peguilada resultou em diminuição significativa do volume de distribuição do composto comparado ao volume observado na administração da DOX na forma de cloridrato. Estes resultados reforçam que o uso destes sistemas especiais de veiculação pode restringir significativamente o acesso do fármaco citotóxico, bloqueando possíveis ações inespecíficas e indesejáveis como

aquelas observadas sobre o miocárdio na administração da formulação convencional do cloridrato de DOX.

A meia-vida ($t_{½}$) de eliminação é definida como o tempo necessário para que a concentração plasmática caia pela metade, e é um dos parâmetros farmacocinéticos de maior aplicação farmacocinética clínica. Pode ser expressa em minutos ou em horas. A meia-vida de eliminação é importante principalmente para a seleção do intervalo de doses em regimes de dose-múltipla, para determinar o grau de flutuação das concentrações, o acúmulo do fármaco a partir do estabelecimento do intervalo de doses, do tempo necessário para o estado de equilíbrio e wash-out (tempo para que o fármaco seja totalmente elimando do organismo, que corresponde a 10 meia-vidas) (TOUTAIN; BOUSQUET-MÉLOU, 2004).

A $t_{1/2}$ é um parâmetro híbrido, dependente do clearance e da extensão de distribuição (TOUTAIN; BOUSQUET-MÉLOU, 2004), apresenta relação direta com o Vd e inversa com a depuração. Assim, quanto maior o volume de distribuição, maior será a meia vida de eliminação; e quanto maior for a depuração, menor será a meia vida de eliminação.

O valor médio da meia vida de eliminação obtida para a DOX contida na microemulsão foi inferior e significativamente diferente ao da formulação comercial (9,2 h *vs* 16,5h). Isto pode ser explicado pela diminuição do Vd da DOX observado no sistema microemulsionado, com consequente menor acúmulo periférico.

Assim, o perfil farmacocinético da DOX veiculada através do sistema microemulsionado proposto apresenta diferenças significativas com relação ao perfil da DOX administrada na forma de cloridrato em solução aquosa em animais não portadores de tumores sólidos, com consequências vantajosas sobre os efeitos

cardiotóxicos característicos do quimioterápico. No entanto, há expectativas de que na presença de tumores ocorra captação do fármaco pelas células tumorais em decorrência da presença do colesterol na formulação, com consequências sobre a disposição cinética do fármaco e sobre a sua capacidade de exercer efeitos cardiotóxicos.

Os resultados promissores obtidos neste trabalho apontam novas perspectivas de estudos pré-clínicos em diferentes modelos animais, cujo enfoque deve abranger as características da disposição cinética da DOX veiculada pela ME na presença de tumores e avaliações da eficácia terapêutica, assim como a avaliação dos seus efeitos sobre o coração através de exames ecocardiográficos.

VII. CONCLUSÕES

- O método analítico desenvolvido demonstrou limites de confiança adequados para a sua aplicação na determinação da DOX em formulações e em amostras de plasma para a avaliação do seu perfil farmacocinético;

- O perfil farmacocinético da DOX veiculada na microemulsão apresentou diferenças significativas do perfil da DOX veiculada na forma de cloridrato em solução aquosa, com concentrações plasmáticas maiores e menor volume de distribuição;

- Os valores de CKMB do grupo de animais que recebeu a DOX veiculada na microemulsão não apresentaram alterações significativas como os evidenciados na administração da DOX na forma de cloridrato em solução aquosa, demonstrando que o sistema modificou o acesso do fármaco aos locais susceptíveis aos seus efeitos tóxicos;

- As características farmacocinéticas e o menor potencial cardiotóxico da DOX veiculada pela microemulsão evidenciados neste estudo tornam o produto promissor para a condução de novos estudos que proporcionarão maior elucidação com relação à sua utilidade terapêutica.

VIII. REFERÊNCIAS

ABDEL-RAHEEM, I.T; ALDEL-GRANY, A.A. Hesperidin alleviates doxorubicin-induced cardiotoxicity in rats. **J. Egypt. Natl. Canc Inst.**, v.21, n.2, p. 175- 184, 2009.

AL-ABD, M.A.; KIM, H.N.; SONG, C.S.; LEE, S.J.; KUH, H.J. A simple HPLC method for doxorubicin in plasma and tissue of nude mice. **Arch. Pharm. Res.**, v.32, n.4, p.605-611, 2009.

ANDES, D.; CRAIG, W.A. Animal model pharmacokinetics and pharmacodynamics: a critical. **Int. J. Antimicrob. Agents,** v.19, p. 261-268, 2002.

ANSEL, H.C.; POPOVICH, N.G.; ALLEN, L.V. **Farmacotécnica:** formas armacêuticas e sistemas de liberação de fármacos. São Paulo: Editorial Premier, 2000, 568p.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RE 899, de 29 de maio de 2003. **Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos**. Disponível em http://www.anvisa.gov.br. Acesso em: 13 abr. de 2011.

ARNOLD, R.D.; SLACK, J.E.; STRAUBINGER, R.M. Quantification of doxorubicin and metabolites in rat plasma and small volume tissue sample by liquid chromatograpry/electrospray tandem mass spectroscopy. **J. Chromatogr. B. Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.**, v.808, n. 2, p. 141-152, 2004.

ATKINSON JR, A.J KUSHNER, W. Clinical pharmacokinetics. **Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.**, v.19, p. 105-127, 1979.

AZEVEDO, C.H.; CARVALHO, J.P.; VALDUGA, C.J.; MARANHAO, R.C Plasma kinetics and uptake of a tumor of a cholesterol-rich microemulsion (LDE) associated to etoposide oleate in pacients with ovarian carcinoma**. Gynecol Oncol.,** v.97, n.1, p.178-182, 2005.

BARPE, D.R.; ROSA. D.D.; FROEHLICH, P.E. Pharmacokinetics evaluation of doxorubicin plasma levels in normal and overweight patients with cancer and simulation of dose adjustment by different indexes of body mass. **Eur. J. Pharm. Sci**., v.3-4, n.41, p.458-463, 2010.

BHARGAVA. H. N., NARURKAR, A. LIEB, L. M. Using microemulsions for drug delivery. **Pharm. Technol.**, v.3, p. 46-54, 1987.

BIELACK, S.S.; ERTTMANN, R.; WINKLER, K.; LANDBECK, G. Doxorubicin: effect of different schedules on toxicity and anti-tumor efficacy. **Eur. J. Cancer Clin. Oncol.,** v.25, n.5, p.873-882, 1989.

BODDY, A; AARONS, L. Pharmacokinetics and pharmacodynamic aspect of site-specific drug delivery. **Adv. Drug Deliv. Rev.,** v3, n.2, p. 155- 163, 1989.

BONTENBAL, M.; ANDERSSON, M.; WILDIERS, J.; COCCONI, G.; JASSEM, J.; PARIDAENS, R.; ROTMENSZ, N.; SYLVESTER, R.; MOURIDSEN, H. T.; KLIJN, J. G.;

OOSTEROM VAN, A. T. Doxorubicin *vs* epirubicin, report of a secondline randomized phase I/III study in advanced breast cancer. **Br. J. Cancer***,* v.77, n.12, p. 2257-2263, 1998.

BP. BRITISH Pharmacopoeia 2010. London: Her Majesty Stationery Office, 2010 p. 1533-1534.

BRISTOW, M.R.; BILINGHAM, M.E.; MASON, J.W.; DANIELS, JR. Clinical spectrum of antracycline antibiotic cardiotoxicity. **Cancer Treat. Rep.**, v. 62, n.6, p.873-879, 1978.

CALTEL, L.; CERUTI, M.; DOSEO, F. From convencional to stealth liposomes: a new frotier in cancer chemotherapy. **Tum**., v.89, n.3, p.237-239, 2003.

CHABNER, A.; CALABRESI, P. Chemoterapy neoplasic diseases. In: GOODMANe GILMAN'S. **The pharmacological bais of therapeutics**. 10th ed. USA: The McGraw-Hill Companies, 2001. cap.25, p.1381-1459.

CHANG, K.H. Avaliação da bioequivalência de comprimidos contendo hidroclorotiazida, 188f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2002.

CASARETT, L.J.; DOULL, J. **Toxicology:** the basic science of poisons. New York: Pergamon Press, 1991. p.21-22.

CHMIELEWSKA, A.; KONIECZA, L.; PLENIS, A.; LAMPAREZYK, H. Sensitive quantification of chosen drugs by reversed-phase chromatography with electrochemical detection at a glassy carbon electrode. **J. Chromatogr. B. Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.**, v.839, n.1-2, p. 102-111, 2006.

CHRISTIANSEN, S.; AUTSCHBACH, R. Doxorubicin in experimental and clinical heart failure. **Eur. J. Cardiothorac. Surg.,** v.30, n.4, p.611-616, 2006.

COPPOC, G. L. Quimioterapia das doenças neopláscias. In: BOTH, NH; McDonald, L.E. (Ed). **Farmacologia e terapêutica em veterinária**. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1992. p. 693-706.

DAGLI, M. L. Z. Agentes antineoplásicos. In: SPINOSA, H. S.; GÓRNIAK, S.L.; BERNARDI, M. M. (Ed). Farmacologia aplicada á medicina veterinária. 3 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002. p.581-595,

DE BEER, E.L.; BOTTONE, A.E.; VOEST, E.E. Doxorubicin and mechanical performance of cardiac trabeculae after acute chronic treatment: a review**. Eur. J. Pharmacol.,** v.415, n.1 p.1-11, 2001.

DIEHL, K.H.; HULL, R.; MORTON, D.; PFISTER, R.; RABEMANPIANINA,Y.; SMITH, D.; VIDAL, J.M; VORTENBOSCH VAN, C. A good practice guide to the administration of

substances and removal of blood, incluing routes and volumes. **J. Appl. Toxicol.,** v.21, n.1, p. 15-23, 2001.

DOMIINGUEZ-GIL, A. Contribution of biopharmaceutics and pharmacokinetics to improve drug therapy. **Eur J Drug Metab Pharmacokinet.,** v.18, n.1, p.1-5, 1993.

DUBOIS, D.; DUBOIS, E.F. A formula to estimate the approximate surface area if height and weight be known.1916. **Nutrition***,* v. 5, n.5, p. 303-311, 1989.

EKSBORG, S.; STRANDLER, H-S.; NASLUND, I.; TAHVAINEN, P. Pharmacokinetics study of i.v. insufion of adriamycin.**Eur. J. Pharmacol**., v.28, n.2, p.205-212., 1985.

EZRAHI, S.; ASERIN, A.; GARTI, N. Aggregation behavior in one-phase (Winsor IV) microemulsion systems. In: KUMAR, P.; MITTAL, K.L., Ed. **Handkook of microemulsion science and technology.** New York: Marcel Dekker, 1999, p.195-240.

FORMARIZ, T.P.; URBAN, M.C.C.; SILVA-JÚNIOR, A.A.; GREMIÃO, M.D.; OLIVEIRA, A.G. Microemulsões e fases líquidas cristalinas como sistemas de liberação de fármacos. **Rev. Bras. Ciên. Farmac**., v.41, p.301-313, 2005.

FORMARIZ, T.P.; SARMENTO, V.H.V.; SILVA-JÚNIOR, A.A.; SCARPA, M.V.; SANTILLI, C.V.; OLIVEIRA, A.G. Doxorubicin biocompatible O/W microemulsion stabilized

by mixed surfactant containing soya phosphatidyl coline. **Colloids Surf B Biointerfaces**, v.51, p. 54-61, 2006.

FORMARIZ, T.P.; CHIAVACCI, L.A.; SARMENTO, V.H.S.; FRANZINI C.M.; SILVA-JÚNIOR, A.A.; SCARPA, M.V.; SANTILLI, C.V.; EGITO, E.S.T.; OLIVEIRA, A.G. Structural changes of biocompatible neutral microemulsions stabilized by mixed surfactant containing soya phosphatidylcholine and its relationship with doxorubicin release**. Colloids asurfaces B-Bionterfaces**, v.63.p.287-295, 2008.

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

FU, L.X.; WAAGSTEIN, F.; HJALMARSON, A. A new insight into adriamycin- induced cardiotoxicity. **Int. J. Cardiol.,** v.29, n.1, p.15-20, 1990.

GADDIS, G.M.; GADDIS, M.L.; MISSOURI, K.C. Introduction to biostatistics: Part 5, statistical interference techniques for hypothesis testing nonparametric data. **Ann. Emerg. Med**., v.9, n.19, p.1054-1059, 1990.

GEWIRTZ, D.A. A critical evaluation of the mechanisms of effects of the anthracycline antibiotics adriamycin and daunorubicin. **Biochem. Pharmacol.,** v.57, n.7, p.727-741, 1999**.**

GIBAUD, S.; DEMOY, M.; ANDREUX, J.P.; WEINGARTEN, C.; GOURITIN, B.; COUVREUR,P. Cell involved in the capture of nanoparticles in hematopoetic organs. **J. Pharm. Sci**., v.85, n.9, p. 994-950, 1996.

GREENE, R.; COLLINS, J.M.; JENKINS, J.F.; SPEYER, J.L.; MYERS, C.E. Plasma pharmacokinetics of adriamycin and adriamycinol implication for the desing of in vitro experiments and treatment protocols. **Cancer Res.**, v.43, n.7, p. 3417-3421, 1983.

GROSH, P.K.; MURTHY, R.S.R. Microemulsions a potencial drug delivery system. **Curr. Drug. Deliv.,** v.3, n.2, p.167-180, 2006.

HANAI, K.; TAKABA, K.; MANABE, S.; NAKANO, M.; KOHDA, A.; MATSUO, M. Evaluation of cardiac function by echocardiography in dogs treated with doxorubicin**. J. Toxicol. Sci.**, v.21, n.1, p.1-10, 1996.

HEDGES, J.R. The role of CK-MB in chest pain decision-making. **J. Accid. Emerg. Med.,** v.12, n.2, p.101-106, 1995.

HERREN, H.R.; WAY-JONES, K.M. Emergency management of cardiac chest pain: a review. **Emerg. Med. J.**, v.18, n.1, p.6-10, 2001.

HO, Y.K; SMITH, R.G; BROWN, M.S; GOLSTEIN, J.L. Low-density lipoprotein (LDL) receptor activity in human acute myelogenous leukemia cells. **Blood**, v.52, n.6, p.1099–1014, 1978.

HUDSON, M.P.; CHRISTENSON, R.H.; NEWBY, L.K.; KAPLAN, A.L.; OHMAN, E.M. Cardiac markers: point of care testing. **Clin. Chim. Acta.,** v.284, n.2, p.223-237, 1999.

JADHAV, K.R.; SHAIKN, I.M.; AMBADE, K.W.; KADAM, V.J. Applications of microemulsion based drug delivery system. **Curr. Drug Deliv.**, v.3, n.3, p.267-273, 2006.

JAFFE, A.S. Use of biomarkers in the emergency department and chest pain unit. **Cardiol. Clin.**, v.23, n.4, p.453-465, 2005.

JAFFE, A.S.; BABUIN, L.; v APPLE, F.S. Biomarkers in acute cardiac diseases: the present and future. **J. Am. Coll. Cardiol.**, v. 48, n.1, p.1-11, 2006.

JAIN, D. Cardiotoxicity of doxorubicin and other anthracycline derivatives**. J. Nucl. Cardiol**., v.7, n.1, p.53-62, 2000.

JOHNSTON, C.C.; BOLTON, E.C.; LLLINOIS, C. Cardiac enzymes. **Ann. Emerg. Med**., v.11, n.1, p.27-35, 1982.

KARUKSTIS, K.K.; THOMPSON, E.H..; WHILES, J.A.; ROSENFELD, J.R. Deciphering the fluorescence signature of daunomycin and doxorubicin. **Biophys. Chem**., v.73, n.3, p. 249-263, 1998.

KOLARIC, K., POTREBICA, V.; CERVEK, J. Phase-II clinical trial of 4'-epidoxorubicin in metastatic solid tumors. **J. Cancer Res. Clin. Oncol.**, v.106, n.2, p. 148-152, 1983.

KOROLKOVAS, A.; FRANÇA, F.F.A. **Dicionário terapêutico guanabara.** Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008-2009. 721 p.

LACHÂTRE, F. Simultaneous determination of four anthracyclines and three metabolites in human serum by liquid chromatography electrospray mass spectrometry. **J. Chromatogr. B. Biomed. Sci. Appl.**, v. 738, n.2, p. 281- 291, 2000.

LANGER, S.W. Extravasation of chemotherapy. **Curr. Oncol. Rep.**., v.4, n.12, p.242-246, 2010.

LARSON, R.R.; KHAZAELI, M.B.; DILLON, H.K. Development of a HPLC method for simultaneous analysis of five antineoplastic agents**. J. Occup. Environ Hyg.**, v.2, n.18, p. 109-119, 2003.

LAWRENCE, M. J.; REES, G.D. Microemulsion-based media as novel drug delivery systems. **Adv. Drug Deliv. Rev.**, v.45, n.1, p. 89–121, 2000.

LEFRAK, E.A.; PITHA, J.; ROSENHEIM, S.; GOTTLIEB, J.A. A clinicopathologic analysis of adrimycin cardiotoxicity**. Cancer,** v.32, n.2, p. 302-314, 1973.

LI, X.; JASTI, B. R. **Design of controlled release drug delivery system**, NEW YORK: McGraw-Hill, 2005. p.435.

LOADMAN, P.M.; CALABRESE, C.R. Separation methods for anthraquinone related anti-cancer drugs. **J. Chromatogr B. Biomed. Sci. Appl.**, v.764, n.1-2, p.193-206, 2001.

LOCK, E.A.; BONVENTRE, J.V. Biomarkers in translation; past, present and future. **Toxicology.,** v.245, n.5, p.163-166, 2008.

LOUIS, P. St.; GANDHI, S. Cardiac contusion and creatine kinase- MB: a pertinent case history and brief review of the utility of CK-MB. **Clin. Biochem.,** v.27, n.2, p. 105-111, 1994.

LOWN, J.W. Anthracycline and anthraquinone anticancer agents: current status and recent developments. **Pharmacol. Ther.**, v.60, n.2, p. 185-214, 1993.

LUNDBERG, B.B.; MORTIMER, B.C.; REDGRAVE, T.G. Submicron lipid emulsions containing amphipathic polyethylene glycol for use as drug-carriers with prolonged circulation time. **Int. J. Pharm.**, v.134, n.1-2, p. 119-127, 1996.

MAIR, J. Cardiac troponin I and troponin T: are enzymes still relevant as cardiac markers? **Clin. Chim. Acta.,** v.257, n.1, p.99-115, 1997.

MARSH, R.E.; RIAUKA, T.A; McQUARRIE, S.A. A review of basic principles of fractals and their application to pharmacokinetics. **Q. J. Nucl. Med. Mol. Imaging**, v.52, n.3, p.278-288, 2008.

MELO, L.C.A **Tópicos da medicina laboratorial**: marcadores de injúria cardíaca. Lab Lâmina: 2001.

MIGLIETTA, A.; CAVALLI, R.; BOCCA, C. GABRIEL, L. GASCO. M.R. Cellular uptake and cytotoxicity of solid lipid nanospheres (SLN) incorporating doxorubicin or paclitaxel. **Int. J. Pharm.,** v.210, n.1-2, p.61-67, 2000.

MITRA, S.; GAUR, U.; GHOSH, P.C.; MAITRA, A.N. Tumor targeted delivery of encapsulated dextran-doxorubicin conjugate using chitosan nanoparticles as carrier. **J. Control. Release**, v.74, n.1-3, p. 317-323, 2001.

MUGGIA, F.M.; GREEN, M.D. New anthracycline antitumor antibiotics. **Crit. Rev. Oncol. Hematol.**, v.11, n.1, p.43-64, 1991.

NORNOO, A.O.; ZHENG, H.; LOPES, L.B.; JOHNSON-RESTREPO, B.; KANNAN, K.; REED, R. Oral microemulsions of paclitaxel: in situ and pharmacokinetics studies. **Eur J. Pharm. Biopharm.**, v.71, n.2, p.310-307, 2009.

OLIVEIRA, A.G.; SCARPA, M.V. Microemulsões I: fundamentos teóricos da formação do sistema microemulsionado. **Infarma**., v.13, n.9, p.73-79, 2001.

OLIVEIRA, A.G; SCARPA, M.V.; CORREA, M.A.; CERA, L.F.R.; FORMARIZ, T.P. Microemulsões: estrutura e aplicações como sistema de liberação de fármacos**. Quim. Nova**, v. 27, n.1, p.131-138, 2004.

OLIVEIRA, A.G.; CHIVACCI, L.A.; SCARPA, M.V.; EGITO, E.S.T. Microemulsions: physico-chemical approaches on the system for pharmaceutical applications. In: SONGJUN, LI. (Ed.). **Current focus on colloids and surfaces.** Kerala, India: Transworld Research Network, 2009. p.57-84.

OJEWOLE, E.; MACKRAJ, I; NAIDOO, P.; GOVENDER, T. Exploring the use of novel drug delivery systems for antiretroviral drugs. **Eur. J. Pharmaceut. Biopharm.,** v.70, n.3, p.697-710, 2008.

OUTOMURO, D.; GRANA, D.R.; AZZATO, F.; MILEI, J. Adriamycin –induced myocardical toxicity: new solutions for an old problem? **Int. J. Cardiol.,** v.117, n.1 p.6-15, 2007.

PANCHAGNULA, R.; THOMAS, N.S. Biopharmaceutics and pharmacokinetics in drug research. **Int. J. Pharm.**, v. 210, n. 2, p.131-150, 2000.

PINHEIRO, K.V.; HUNGRIA, V.T.; FICKER, E.S.; VALDUGA, C.J.; MESQUITA, C.H.; MARANHÃO, R.C. Plasma kinetics of a cholesterol-rich microemsulsion (LDE) in patients with Hodgkin's and non- Hodgkin's lymphoma and preliminary study on the toxicity of etoposide associated with LDE. **Cancer Chemother. Pharmacol.**, v.57, n.5, p.624-630, 2006.

PRATT, W. B. RUDDON, R.W.; ENSMINGER, W.D. MAYBAUM, J.; Noncovalent DNA-binding drugs. **In Anticancer drug**. : New York :Oxford University Press; 1994. p. 155-182.

RAJAPPA, M.; SHARMA, A. Biomarkers of cardiac injury: an update. **Angiology**, v.56, n.6, p. 677-691, 2005.

RICCIARELLO, R.; PICHINI, S.; PACIFICI, R.; ALTIERI, I.; PELLEGRINI, M.. FATTOROSSI, A.; ZUCCARO, P. Simultaneous determination of epirubicin doxorubicin and their principal metabolites in human plasma by high performance liquid chromatography and electrochemical detection**. J. Chromatogr. B. Biomed. Sci. Appl.**, v.707, n.1-2, p. 219-25, 1998.

RODRIGUES, D.G.; COVOLAN, C.C.; CORADI, S.T.; BARBOZA, R.; MARANHÃO, R.C. Use of a cholesterol-rich emulsion that binds to low-density lipoprotein receptors as a vehicle for paclitaxel. **J. Pharm. Pharmacol.**, v. 54, n.6, p. 765-772, 2002.

RODRIGUES, A.S.; LOPES, A.R.; LEÃO, A.; COUCEIRO, A.; RIBEIRO, A.B.; RAMOS, F.; SILVEIRA, N.M.I.; RESENDE, O.C. Development of an analytical methodology for simultaneous determination of vincristine and doxorubicin in pharmaceutical preparations for oncology by HPLC UV. **J. Chromatogr. Sci.,** v.47, n.5, p.387-391, 2009.

RUIZ-GARCIA, A.; BERMEJO, M.; MOSS, A.; CASABO, V.G. Pharmacokinetics in drug Discovery. **J. Pharm. Sci**., v.97, n.2, p.654-690, 2008.

SAAD, S.Y.; NAJJAR, T.A.; AMMAR, C.; AL-RIKABI, A.C. The preventive role of deferoxamine against acute doxorubicin-induced cardiac, renal and hepatic toxicity in rats. **Pharmacol. Res.**, v.43, n.3, p.311-318, 2001.

SACCO, G.; BIGIONI, M.; EVANGELISTA, S.; GOSO, C; MANZINI, S.; MAGGI, C.A. Cardioprotective effects of zofenopril, a new angiotensin-converting enzyme inhibitor, on doxorubicin- induced cardiotoxicity in the rat**. Eur. J. Pharmacol.**, v.414, n.1, p.71-78, 2001.

SAENGER, A.K.; JAFFE, A.S. Requiem for a heavyweight: the demise of creatine kinase-MB. **Circulation**, v.118, n. 21, p. 2200-2206, 2008.

SAWYER, D.B.; PENG, X.; CHEN, B.; PENTASSUGLIA, L.; LIM, C.C. Mechanisms of anthracycline cardiac injury: can we identify strategies for cardioprotection? **Prog. Cardiovasc Dis**, v.53, n. 2, p.105-113, 2010.

SCULLY, R.; MILLER, A.; GRANT, Y.; LIPSHULTZ, S.E. Anthracycline, herceptin and cv toxicity. **Comprehensive Toxicol**., cap. 6.22, p. 413-427, 2010.

SHARGEL, L.; WU-PONG, S.; YU, A.B.C. Applied biopharmaceutics e pharmacokinetics. 5 ed. New York: McGraw-Hill Medical Publishing Division, 2005. 892 p.

SIMPSON, J.A.; AARONS, L.; WHITE, J.N. How can we do pharmacokinetic studies in the tropics. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v.95, n.4, p. 347-351, 2001.

SIMUNEK, T.; STÉRBA, M.; POPELOVÁ, O.; ADAMCOVA, M.; HRDINA, R.; GERSL, V. Anthracycline-induced cardiotoxicity: overiew of studies examining the roles of oxidative stress and free cellular iron. **Pharmacol. Rep**., v.61, n.1, p.154- 171, 2009.

SINGH, G.; SINGH, A.T.; ABRAHAM, A.; BHAT, B.; MUKHERJEE, R.; VERME, R. AGARWAL, S.K.; JHA, S.; MUKEHERJEE, R.; BURMAN, A.C. Protective effects of *Terminalia arjuna* against doxorubicin-induced cardiotoxicity. **J. Ethnopharmacol**., v.117, n.1, p. 123-129, 2008.

SMOLEN, V. F. Bioavailability and pharmacokinetic analysis of drug responding systems. **Annu. Rev Pharmacol. Toxicol.,** v. 18, p. 495- 522, 1978.

SMYTH, R.D.; HOTTENDORF, G.H. Application of pharmacokinetics and biopharmaceutics in the design of toxicological studies. **Toxicol. Appl. Pharmacol.**, v.52, n.2, p.179-195, 1980.

SUGIYAMA, Y. Importance of pharmacokinetics considerations in the development of drug delivery systems. **Adv. Drug Delivery Rev.**, v. 19, p. 333-334, 1996.

SUSANECK, S. J. Doxorubicin theraphy in the dog. **J. Am. Anim. Hosp. Assoc**.,v. 182, n.1, p. 70-72, 1983.

SZASZ, G.; GRUBER, W.; BERNT, E. Creatine kinase in serum: 1. Determination of optimum reaction conditions. **Clin. Chem**., v.22, n.5, p.650-656, 1976.

TAKANASHI, S.; BACHUR, N.R. Adriamycin metabolism in man.Evidence from urinary metabolites. **Drug Metab. Dispos.**, v.4, n.1, p. 79-87, 1976.

TENJARLA, S. Microemulsions: an overview and pharmaceutical applications. **Crit. Rev. Ther Drug Carrier Syst.**, v.16, n.5, p.461-521, 1999.

TERASAKI T.; IGA, T.; SUGIYAMA, Y.; HANANO, M. Experimental evidence of characteristic tissue distribution of adriamycin. Tissue DNA concentration as determinant. **J. Pharm. Pharmacol.**, v.34, n.9, p. 597-600, 1982.

TOUTAIN, P.L.; BOUSQUET-MÉLOU, A. Plasma clearance. **J. Vet. Pharmacol. Ther.**, v.27, n.6, p. 415-425, 2004a.

TOUTAIN, P.L.; BOUSQUET-MÉLOU, A. Plasma terminal half-life. **J. Vet. Pharmacol. Ther.**, v.27, n.6, p. 427-439, 2004b.

TOUTAIN, P.L.; BOUSQUET-MÉLOU, A. Volume of distribution**. J. Vet. Pharmacol. Ther.**, v.27, n.6, p. 441-453, 2004c.

TOZER, T.N; ROWLAND, M. (Ed.). **Introdução à farmacocinética e à farmacodinâmica. As bases quantitativas da terapia farmacológica**. Porto Alegre: Artmed, 2009. p.601.

TROTTA, M.; PATTARINO, F.; IGNONI, T. Stability of drug-carrier emulsions containing phosphatidylcholine mixtures. **Eur. J. Pharm. Biopharm.**, v.53, n.2, p.2063-208, 2002.

URVA, S.R.; SHIN, S.B.; YANG, C.V.; BALTHASAR, J.P. Sensitive high performance liquid chromatographic assay for assessment of doxorubicin pharmacokinetics in mouse plasma tissue. **J. Chromatogr. B Analyt. Technol Biomed Life Sci**, v.877, n.8-9, p. 837-841, 2009.

WEI, G.; XIAO, S.; SI, D; LIU, C. Improved HPLC method for doxorubicin quantification in rat plasma to study the pharmacokinetics of micelle-encapsulated and liposome-encapsulated doxorubicin formulations. **Biomed Chromatogr.,** v.22, n.11, p. 1252- 1258, 2008.

YIN, Y-M.; CUI, F-D.; MU, C-F.; CHOI, M-K.; KIM, J.S.; CHUNG, S-J.; SHIM, C-K, KIM, D-D.Docetaxel microemulsion for enhanced oral bioavailability: Preparation and in vitro and in vivo evaluation. **J.Contol. Release**, v.140, n.2, p.86-94, 2009.

IX. ANEXOS

unesp UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Câmpus de Araraquara

Protocolo CEP/FCF/CAr nº 11/2009

Interessado: Juliana Uruguay Corrêa Vidigal Assumpção

Orientador: Profa. Dra. Rosângela Gonçalves Peccinini

Projeto: Farmacocinética pré-clínica de microemulsão contendo doxorrubicina

Parecer nº 33/2009 – Comitê de Ética em Pesquisa

O Comitê de Ética em Pesquisa desta Faculdade, considerou o protocolo para uso de animais na pesquisa "Farmacocinética pré-clínica de microemulsão contendo doxorrubicina", estruturado dentro dos princípios éticos na experimentação animal do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal – COBEA, manifestando-se FAVORÁVEL à sua execução.

O relatório final do protocolo de pesquisa, com no máximo três folhas (espaço 1,5 e letra 12) deverá ser entregue em agosto de 2011.

Araraquara, 05 de agosto de 2009.

Profª. Drª. AURELUCE DEMONTE
Coordenadora do CEP

Anexo 1. Perfil farmacocinético da DOX comercial (6mg/kg) obtidos após administração iv.

Tempo (min)	Curva1	Curva 2	Curva 3	Curva 4	Curva 5	Mediana	Média	DP	CV
5	2,200	3,340	2,225	2,460	2,022	2,25	2,45	0,52	21,30
15	0,170	0,216	0,180	0,153	0,174	0,17	0,18	0,02	13,12
30	0,080	0,110	0,123	0,100	0,100	0,10	0,10	0,02	15,30
60	0,060	0,060	0,070	0,080	0,095	0,07	0,07	0,01	20,31
120	0,050	0,050	0,050	0,060	0,070	0,05	0,06	0,01	15,97
240	0,050	0,050	0,050	0,050	0,060	0,05	0,05	0,00	8,60
480	0,040	0,050	0,050	0,050	0,060	0,05	0,05	0,01	14,14
720	0,040	0,040	0,030	0,040	0,040	0,04	0,04	0,00	11,77
960	0,030	0,040	0,030	0,030	0,030	0,03	0,03	0,00	13,98

Anexo 2. Perfil farmacocinético da DOX incorporada na ME (6mg/kg) obtidos após administração iv.

Tempo (min)	Curva1	Curva 2	Curva 3	Curva 4	Curva 5	Mediana	Média	DP	CV
5,00	1,00	1,47	5,36	7,10	3,55	3,55	3,70	2,58	69,75
15,00	0,93	0,79	2,21	2,69	1,93	1,94	1,7	0,83	48,27
30,00	0,46	0,32	0,48	0,24	0,17	0,31	0,33	0,14	40,45
60,00	0,16	0,14	0,31	0,24	0,13	0,16	0,20	0,08	38,57
120,00	0,11	0,12	0,11	0,08	0,12	0,11	0,11	0,02	13,89
240,00	0,07	0,07	0,06	0,05	0,07	0,069	0,065	0,01	13,19
480,00	0,05	0,04	0,04	0,04	0,06	0,043	0,046	0,01	16,72
720,00	0,04	0,04	0,03	0,04	0,05	0,037	0,037	0,00	11,94
960,00	0,04	0,03	0,03	0,04	0,04	0,03	0,034	0,00	9,68

Anexo 3. Parâmetros farmacocinéticos da DOX comercial (6mg/kg) obtidos após administração iv.

ME DOX

Parâmetros	**C1**	**C2**	**C3**	**C4**	**C5**	**Mediana**	**Media**	**DP**	**CV**
kel (min)	0,001	0,002	0,001	0,002	0,001	0,001	0,0014	0,00055	39,12
asc 0-t (ug/ml.min)	121,73	85,95	128,45	84,03	76,86	85,95	99,40	23,81	23,95
asc0-inf (ug/ml.min)	161,73	100,95	158,45	114,00	177,13	158,45	142,45	33,02	23,18
relação áreas	75,27	85,14	81,07	84,85	71,93	81,07	79,65	5,88	7,38
Cl (ml/min.kg)	37,10	59,44	37,87	60,59	56,15	56,15	50,23	11,75	23,40
Vd (L/kg)	37,10	29,72	37,87	30,30	56,15	37,10	38,23	10,70	27,99
t 1/2 ß (min)	693,00	346,50	693,00	346,50	693,00	693,00	554,40	189,79	34,23
kalfa(min)	0,10	0,08	0,10	0,07	0,19	0,10	0,11	0,05	47,50
t 1/2 α (min)	7,29	9,12	7,00	10,50	3,61	7,29	7,50	2,60	34,65

Anexos 4. Parâmetros farmacocinéticos da DOX forma de ME (6mg/kg) obtidos após administração iv.

DOX comercial

Parâmetros	**Curva 1**	**Curva 2**	**Curva 3**	**Curva 4**	**Curva 5**	**Mediana**	**Media**	**DP**	**CV**
kel (min)	0,0007	0,0004	0,0009	0,0009	0,001	0,0009	0,0008	0,0002	30,61
asc 0-t (ug/ml.min)	67,78	83,42	67,22	73,26	76,86	73,26	73,71	6,74	9,15
asc0-inf (ug/ml.min)	110,63	183,42	100,55	106,59	106,86	106,861	121,61	34,74	28,57
relação áreas	61,26	45,48	66,85	68,73	71,93	66,85	62,85	10,45	16,63
Cl (ml/min.kg)	54,23	32,71	59,67	56,29	56,15	56,15	51,81	10,85	20,95
Vd (L/kg)	77,48	81,78	66,30	62,54	56,15	66,30	68,85	10,60	15,39
t 1/2 ß (min)	990	1732,5	770	770	693	770	991,1	429,04	43,29
kalfa(min)	0,18	0,16	0,14	0,17	0,19	0,17	0,17	0,02	12,83
t 1/2 α (min)	3,96	4,41	5,13	4,15	3,61	4,15	4,25	0,57	13,46