THAÍS COSTA CONTENTE

**Associação do quimioterápico daunorrubicina a uma
nanoemulsão rica em colesterol: estudos de regressão
tumoral e farmacocinética**

Tese apresentada à Faculdade de
Medicina da Universidade de São Paulo
para obtenção do título de Doutor em
Ciências

Programa de: Ciências Médicas
Área de concentração: Distúrbios
Genéticos de Desenvolvimento e
Metabolismo

Orientador: Prof. Dr. Raul Cavalcante
Maranhão

São Paulo

2010

THAÍS COSTA CONTENTE

**Associação do quimioterápico daunorrubicina a uma
nanoemulsão rica em colesterol: estudos de regressão
tumoral e farmacocinética**

Tese apresentada à Faculdade de
Medicina da Universidade de São Paulo
para obtenção do título de Doutor em
Ciências

Programa de: Ciências Médicas
Área de concentração: Distúrbios
Genéticos de Desenvolvimento e
Metabolismo

Orientador: Prof. Dr. Raul Cavalcante
Maranhão

São Paulo - SP

2010

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Contente, Thaís Costa

Associação do quimioterápico daunorrubicina a uma nanoemulsão rica em colesterol : estudos de regressão tumoral e farmacocinética / Thaís Costa Contente. -- São Paulo, 2010.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Programa de Ciências Médicas. Área de concentração: Distúrbios Genéticos de Desenvolvimento e Metabolismo.

Orientador: Raul Cavalcante Maranhão.

Descritores: 1.Daunorrubicina/análogos & derivados 2.Ensaio de Seleção de Medicamentos Antitumorais 3.Receptores de LDL 4.Nanotecnologia

USP/FM/DBD-456/10

DEDICATÓRIA

**“Você pode até me empurrar de um penhasco que eu vou
dizer: E daí...Adoro voar!”
(Clarice Lispector)**

Eu dedico este trabalho a você que me incentivou tanto para que eu fizesse esse doutorado. Insistiu e me convenceu! Tenho certeza que onde quer que você esteja está torcendo por mim, me dando força para continuar minha caminhada. Ainda bem que eu tive a oportunidade de lhe dizer que você é a referência da minha vida.

Está ai, mais um trabalho que você me abriu os olhos e me mostrou que eu sou capaz! Muito obrigada por ser sempre um grande Pai! Você me faz muita falta e vive eternamente no meu coração. Com todo o meu amor....

AGRADECIMENTOS

**"Felicidade é ter algo o que fazer, ter algo que amar e algo
que esperar..."**

(Aristóteles)

*Ao meu (agora) marido Diogo obrigada por fazer parte da minha
vida, por acreditar nos meus sonhos e ideais, por me apoiar
integralmente neste projeto. Meu companheiro, amigo e grande
amor, agradeço sua força, paciência e inspiração. Te amo sempre!!!*

**“Para obter algo que você nunca teve, precisa fazer algo
que nunca fez”
(autor desconhecido)**

*A minha mãe Déa e ao meu irmão André o meu obrigada por
estarem sempre ao meu lado, por acreditarem na minha formação
e na minha escolha. Obrigada por terem me ajudado a seguir em
frente...sempre em busca da minha felicidade!!!! Amo muito
você!!!!*

**“A amizade desenvolve a felicidade e reduz o sofrimento,
duplicando a nossa alegria e dividindo a nossa dor.”
(Joseph Addison)**

*Quero de forma especial agradecer as minhas amigas
“SUPERPODEROSAS” Iara e Fabíola! Vocês duas merecem cada
pedacinho desse projeto e dessa realização. Vocês que estiverem ali
no dia a dia, lado a lado, me apoiando e me dando força, me
incentivando sempre...fica aqui registrado o meu eterno
agradecimento. Obrigada pela nossa amizade e companheirismo.
Vocês são pessoas especiais !*

AGRADECIMENTOS

Meus sinceros agradecimentos:

Ao Prof. Dr. Raul C. Maranhão por ter me recebido e acreditado que tudo isso seria possível. Obrigada pela orientação, oportunidade e confiança.

Ao Prof. Durvanei A. Maria do Instituto Butantan por toda atenção, oportunidade e ensinamentos. Agradeço aos alunos do laboratório e a funcionária D. Vilma por me receberem e me ensinarem tantas coisas. Sem a ajuda de vocês tudo teria sido mais difícil!

Ao Prof. Ernai Pinto Jr da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP muito obrigada pela força, suporte, amizade e grande torcida. Agradeço aos alunos do grupo por estarem sempre ao meu lado colaborando para o bom andamento do projeto.

Ao Prof. Pio Colepicolo do Instituto de Química da USP muito obrigada por ter aberto as portas do laboratório, pela força e torcida. Agradeço aos alunos do grupo e a os funcionários Ed, Sandra e Leonardo por me receberem e dividirem comigo um pedacinho de bancada.

Ao Prof. Ricardo A. Fock da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP pelas valiosas contribuições, dicas e ensinamento. Agradeço de forma especial suas alunas de Iniciação Científica Gabriela Marques e Tatiane Capeto pela ajuda na condução das análises de perfil hematológico. .

As queridas estagiárias Vivi, Paty e Carol – muito obrigada por toda a ajuda, disposição e força de vontade. Vocês são participantes ativas desse projeto!

Ao técnico especialista Msc. Felipe A. Dorr da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP e grande amigo o meu agradecimento pelas valiosas sugestões, paciência e dedicação.

A Profa. Dra. Claudete Valduga da Universidade Bandeirantes o meu e carinhoso agradecimento. Obrigada pelo suporte, dicas e valiosos ensinamentos. Obrigada por sempre ter acreditado em mim e nesse projeto.

A Profa. Dra. Carmen Vinagre pelas dicas, apoio e amizade.

A minha eterna professora, Profa. Dra. Maria Luiza Cruz por ter me apresentado o mundo da Ciência, por sempre ter acreditado em mim e me incentivado a seguir em frente. *“Continuamos no mundo dos imortais...”*

Aos meus amigos(as) do Laboratório de Metabolismo de Lípidos INCOR/HCFMUSP o meu eterno agradecimento. Obrigada pelo suporte, pela paciência, torcida, desabafos, choros e risadas. Aos funcionários e amigos Cristiane, Débora, Fátima, Alekssandra, Priscila, Elaine, Rosane, Maria das Dores, Maria Augusta, Conceição e Wanderlei agradeço a atenção, apoio e dedicação. A ajuda de vocês foi fundamental na execução desse projeto. Muito obrigada!

A querida Sheila obrigada por TUDO! Pela força, carinho, pelo ombro amigo e por todos os “favorzinhos” prestados!!!

A toda minha família: os **COSTA**, os **CONTENTE** e os **DE OLIVEIRA SILVA** obrigada por toda força e paciência, pelo amor, incentivo e dedicação. É uma alegria dividir essa conquista com vocês!

A seção de Pós Graduação da Faculdade de Medicina (FMUSP) e Departamento de Ciências Médicas, especialmente à Rose e Angélica, pela paciência, amizade, ajuda e valiosas dicas.

A FAPESP e CNPq pela bolsa concedida e apoio financeiro.

A todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para realização desse trabalho.

SUMÁRIO

Lista de tabelas	
Lista de figuras	
Lista de símbolos e abreviaturas	
Resumo	
Summary	
1. INTRODUÇÃO	24
1.1 Antraciclinas	25
1.1.1 Daunorrubicina	27
1.2 Nanoemulsões lipídicas artificiais ricas em colesterol	30
2. JUSTIFICATIVA	34
3. OBJETIVO GERAL	35
3.1. Objetivos específicos	35
4. MATERIAL E MÉTODOS	36
4.1 Material	36
4.1.1 Animais de experimentação e linhagem celular	37
4.2 Métodos	37
4.2.1 Preparo da nanoemulsão lipídica rica em colesterol (LDE)	37
4.2.2 Extração da daunorrubicina (DNR)	38
4.2.3 Síntese do derivado N-oleil-daunorrubicina (ODNR)	38
4.2.4 Incorporação do N-oleil-daunorrubicina à nanoemulsão lipídica (LDE-ODNR)	39
4.2.5 Avaliação da estabilidade das preparações LDE e LDE-ODNR	39
4.2.5.1 Determinação do tamanho de partícula e polidispersidade	40
4.2.5.2 Determinação do potencial Zeta	40
4.2.5.3 Determinação do índice de lipoperoxidação (LPO) - Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)	40
4.2.5.4 Avaliação do pH	41
4.2.5.5 Determinação do rendimento de incorporação do derivado ODNR a LDE	41

4.2.6 Determinação da citotoxicidade	41
4.2.7 Avaliação da toxicidade aguda <i>in vivo</i>	42
4.2.8 Avaliação comparativa da toxicidade <i>in vivo</i> das formulações DNR comercial LDE-ODNR	42
4.2.9 Implante de células de melanoma B16F10 em camundongos	43
4.2.10 Estudo farmacocinético da LDE-ODNR em camundongos – Cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas (LC-MS/MS)	43
4.2.10.1 Coleta de plasma e tecido dos animais	43
4.2.10.2 Método bioanalítico LC-MS/MS	44
4.2.11 Avaliação da atividade antitumoral das formulações DNR comercial e LDE-ODNR	47
4.2.11.1 Avaliação do efeito do tumor melanoma B16F10 sobre o peso corporal dos animais	47
4.2.11.2 Avaliação do efeito da terapia antitumoral sobre o desenvolvimento de metástases	48
4.2.11.3 Perfil hematológico	48
4.2.11.4 Análise de viabilidade celular	48
4.2.12 Análise estatística	49
4.2.13 Aspectos Éticos	49
5. RESULTADOS	50
5.1 Preparo da nanoemulsão lipídica rica em colesterol (LDE)	50
5.2 Extração da daunorrubicina (DNR)	50
5.3 Síntese do derivado N-oleil-daunorrubicina (ODNR)	50
5.4 Incorporação do N-oleil-daunorrubicina à nanoemulsão lipídica (LDE-ODNR)	50
5.5 Avaliação da estabilidade das preparações LDE e LDE-ODNR	51
5.6 Determinação da citotoxicidade	54
5.7 Avaliação da toxicidade aguda <i>in vivo</i>	56
5.8 Avaliação comparativa da toxicidade <i>in vivo</i> das preparações DNR comercial e LDE-ODNR	58

5.9 Implante de células de melanoma B16F10 em camundongos C57BL/6J	62
5.10 Estudo farmacocinético da LDE-ODNR em camundongos – Cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas (LC-MS/MS)	63
5.10.1 Desenvolvimento do método bioanalítico LC-MS/MS	63
5.10.2 Análise de amostras de plasma com concentrações desconhecidas. Estudo preliminar da farmacocinética da LDE-ODNR em camundongos portadores de tumor melanoma B16F10 por LC-MS/MS	70
5.11 Avaliação da atividade antitumoral das formulações DNR e LDE-ODNR	76
5.11.1 Massa tumoral e sobrevida dos animais	76
5.11.2 Avaliação do efeito do tumor melanoma B16F10 sobre o peso	82
5.11.3 Avaliação do efeito das formulações sobre o desenvolvimento de metástases	84
5.11.4 Avaliação do perfil hematológico	90
5.11.5 Análise de viabilidade celular	92
6. DISCUSSÃO	98
7. CONCLUSÕES	110
8. ANEXOS	111
9. REFERÊNCIAS	113
Apêndice	

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Caracterização da LDE e LDE-ODNR quanto ao tamanho de partícula, polidispersidade, potencial zeta, lipoperoxidação, pH e incorporação ODNR à LDE durante 180 dias

Tabela 2 – Relação dose administrada e mortes após administração de única dose de DNR na sua forma comercial e LDE-ODNR (n=3)

Tabela 3 – Valores referentes a DMT, DL₁₀ e DL₅₀ após administração de única dose intraperitoneal de DNR na sua forma comercial e LDE-ODNR

Tabela 4: Parâmetros utilizados para testes das condições cromatográficas

Tabela 5: Parâmetros otimizados para o método multi-analítico

Tabela 6: Estudo preliminar para protocolos de extração

Tabela 7: Dados de validação para corrida analítica para quantificação das amostras em plasma. Curva da calibração para ODNR

Tabela 8: Dados de validação para corrida analítica para quantificação das amostras em plasma. Curva da calibração para DNR

Tabela 9: Dados dos controles de qualidade para ODNR (CQ 550 ng/mL)

Tabela 10: Dados dos controles de qualidade DNR (CQ 550 ng/mL)

Tabela 11 - Peso dos animais no 13º dia (inicial) e no 26º dia (final)

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estrutura das principais antraciclina antitumorais

Figura 2: Estruturas dos principais metabólitos da daunorrubicina. Esquema adaptado de (ARNOLD, SLACK *et al.*, 2004)

Figura 3: Reação de obtenção do derivado N-oleil-daunorrubicina (ODNR) a partir da DNR e do ácido oléico na presença de DCC e 4-DMAP a temperatura ambiente

Figura 4: Tamanho das partículas (nm) das preparações LDE-ODNR e LDE durante 180 dias

Figura 5: Potencial zeta (mV) das preparações LDE-ODNR e LDE durante 180 dias

Figura 6: Lipoperoxidação (nmol MDA/mL) das preparações LDE-ODNR e LDE durante 180 dias

Figura 7: Células de melanoma B16F10 após 24 horas de cultura na presença dos tratamentos em estudo (A) Controle, (B) LDE (10% v/v), (C) DNR 400 μ M e (D) LDE-ODNR 600 μ M – aumento de (20x)

Figura 8: Células de melanoma B16F10 após 48 horas de cultura na presença dos tratamentos em estudo (A) Controle, (B) LDE (10% v/v), (C) DNR 400 μ M e (D) LDE-ODNR 600 μ M – aumento de (20x)

Figura 9: Citotoxicidade da preparação LDE-ODNR em cultura de células NIH3T3 e B16F10. Valores expressos em porcentagem de células viáveis (não coradas), n=3

Figura 10: Variação do peso dos animais (g) registrados na determinação da DMT, porcentagem de ganho e perda de peso em 14 dias de observação

Figura 11: Variação do peso dos animais dos grupos salina, LDE, DNR e LDE-ODNR. Os números acima das barras indicam porcentagem de ganho ou perda de peso em 30 dias de observação. Resultados expressos em média $\pm$ desvio padrão

Figura 12: Fotos ilustrativas do aspecto físico dos animais tratados com LDE-ODNR (a) e DNR (b)

Figura 13: Contagem de hemácias nos grupos salina, LDE, DNR, LDE-ODNR ao longo do período experimental. Valor de referência: $8,34 \pm 0,65$

Figura 14: Contagem de leucócitos nos grupos salina, LDE, DNR, LDE-ODNR ao longo do período experimental. Valor de referência: $5,9 \pm 0,7$

Figura 15: Contagem de plaquetas nos grupos salina, LDE, DNR, LDE-ODNR ao longo do período experimental. Valor de referência: $560,5 \pm 65,7$

Figura 16: Ilustração da técnica de implante de tumor melanoma murino B16F10 (a) e tumor após 10 dias de inoculação (b)

Figura 17: Estrutura química, massa exata, peso molecular dos compostos: DNR (analito 1); ODNR (analito 2) e DOX (padrão interno)

Figura 18: Espectro de fragmentação DNR. Destaque para a formação do íon de produto $m/z = 321,2$

Figura 19: Espectro de fragmentação ODNR. Destaque para a formação do íon de produto $m/z = 379,2$

Figura 20: Espectro de fragmentação DOX. Destaque para a formação do íon de produto $m/z = 361,1$

Figura 21: Cromatograma de análise: DNR e DOX

Figura 22: Cromatograma de análise: ODNR

Figura 23 Cromatograma dos compostos DOX (IS), DNR e ODNR e seus tempos médio de retenção (TR): 4,9, 6,7 e 11,8 minutos, respectivamente. Corrida realizada em ESI+ (0 a 9 minutos) e em ESI- (9 a 17 minutos)

Figura 24 Curva de calibração do derivado ODNR. $r = 0,9969$

Figura 25: Curva de calibração DNR. $r = 0,9981$

Figura 26: Curvas concentração ODNR e DNR em 15, 30 e 45 minutos, 1, 2, 6, 8, 12, 24, 48 e 72 horas

Figura 27: Massa tumoral dos grupos salina (■), DNR 7,5 µmol/kg (▲), LDE-ODNR 7,5 µmol/kg (*) (figura a), salina (■), DNR (1,8 µmol/kg) (▼) e LDE-ODNR (1,8 µmol/kg) (►)(figura b) em 35 dias. Destaques (↓) para 26°, 30° e 35° dias, últimos dias de registro de medidas dos grupos DNR (7,5 µmol/kg), DNR (1,8 µmol/kg) LDE-ODNR (7,5 µmol/kg) e LDE-ODNR (1 µmol/kg), respectivamente. Resultados expressos em média ± desvio padrão

Figura 28: Evolução da massa tumoral para os grupos salina, DNR(a) 7,5 µmol/kg, LDE-ODNR(a) 7,5 µmol/kg, DNR(b) (1,8 µmol/kg) e LDE-ODNR(b) (1,8 µmol/kg) do 23 ao 35º dias de observação . Destaques: 26º, 30º e 35º dias para redução do tumor (↓) e aumento de tumor (↑). Resultados expressos em média ± desvio padrão

Figura 29: Probabilidade de sobrevida dos animais na avaliação atividade antitumoral em resposta aos tratamentos com salina (●), LDE (○), DNR 7,5 µmol/kg (■), DNR 1,8 µmol/kg (□), LDE-ODNR 7,5 µmol/kg (▲) e LDE-ODNR 1,8 µmol/kg (△)

Figura 30: Probabilidade de sobrevida dos animais na avaliação atividade antitumoral em resposta aos tratamentos salina (●), DNR (■) e LDE-ODNR (▲) 7,5 µmol/kg

Figura 31: Probabilidade de sobrevida dos animais na avaliação atividade antitumoral em resposta aos tratamentos salina(●), DNR (■) e LDE-ODNR (▲) 1,8 µmol/kg

Figura 32: Imagens representativas da evolução da massa tumoral (melanoma murino B16F10) dos grupos controles salina e LDE

Figura 33: Imagens representativas da evolução da massa tumoral (melanoma murino B16F10) dos grupos tratamento DNR e LDE-ODNR 7,5 µmol/kg (→ área de necrose)

Figura 34. Imagens representativas da evolução da massa tumoral (melanoma murino B16F10) dos grupos tratamento DNR LDE-ODNR 1,8 µmol/kg (→ área de necrose)

Figura 35: Variação do peso dos animais entre 13° (inicial) e 26° dias (final) dos grupos salina, LDE, DNR e LDE-ODNR (7,5 µmol/kg), DNR e LDE-ODNR (1,8 µmol/kg). O número em cima das barras representa a porcentagem referente à variação de peso no mesmo grupo (peso inicial/peso final). Resultados expressos em média ± desvio padrão

Figura 36: Percentual de nódulos metastáticos encontrados durante a necropsia nos animais dos grupos salina, LDE; DNR e LDE-ODNR (7,5 µmol/kg) e DNR e LDE-ODNR (1,8 µmol/kg). Resultados expressos em média ± desvio padrão

Figura 37: Fotos ilustrativas do estudo de necrópsia nos grupos salina e LDE. (a) tumor com grande área hemorrágica; (b) tumor invasivo, encapsulado, deslocamento da coluna cervical do animal; (c) tumor; (d) linfonodo de drenagem; (e) lobo pulmonar direito metastático; (f) fígado. (→) área de metástase

Figura 38: Imagem ilustrativas do estudo de necrópsia para o grupo DNR 7,5 µmol/kg (→) vaso em direção ao tumor, (→) pontos de metástase, tumor invasivo, deslocamento do rim direito do animal; (→) vascularização ao redor do tumor, (→) deslocamento da coluna cervical do animal; (→) inóculo; (→) metástase

Figura 39: Imagens ilustrativas do estudo de necrópsia para o grupo LDE-ODNR 7,5 µmol/kg (a) tumor localizado apenas na região do inóculo, (→) região de hemorragia circundando a área do tumor; (b) tumor externalizado, (→) área de necrose, (c) região dorsal muito pouco vascularizada; (d) (→) vaso na região do tumor; (e) (→) linfonodo de drenagem

Figura 40: Imagens ilustrativas do estudo de necrópsia para grupo DNR 1,8 µmol/kg (a) (→) metástase na região do abdômen e no baço; (b) (→) tumor invasivo, englobou e deslocou o rim direito do animal, rim totalmente metastisado; (c) pulmão metastisado

Figura 41: Imagens ilustrativas do estudo de necrópsia para o grupo LDE-ODNR 1,8 µmol/kg (a) tumor encapsulado, linfonodo sentinela metastático; (b) (→) inóculo, tumor vascularizado e região hemorrágica; (c) tumor avançado, deslocamento da coluna cervical do animal

Figura 42 Número de hemácias dos animais dos grupos salina, LDE, DNR e LDE-ODNR (7,5 $\mu\text{mol/kg}$); DNR e LDE-ODNR (1,8 $\mu\text{mol/kg}$). Valor de referência: $8,8 \pm 1,6$

Figura 43: Número de leucócitos dos animais dos grupos salina, LDE, DNR e LDE-ODNR (7,5 $\mu\text{mol/kg}$); DNR e LDE-ODNR (1,8 $\mu\text{mol/kg}$). Valor de referência: $9,8 \pm 1,7$

Figura 44: Número de plaquetas dos animais dos grupos salina, LDE, DNR e LDE-ODNR (7,5 $\mu\text{mol/kg}$); DNR e LDE-ODNR (1,8 $\mu\text{mol/kg}$). Valor de referência: 560 ± 102

Figura 45: Distribuição populacional de células de tumor melanoma murino B16F10 dos grupos salina, LDE, DNR e LDE-ODNR (7,5 $\mu\text{mol/kg}$), e DNR e LDE-ODNR (1,8 $\mu\text{mol/kg}$)

Figura 46: Análise do ciclo celular, por citometria de fluxo. Distribuição população de células (%) dos grupos salina, LDE, DNR e LDE-ODNR (7,5 $\mu\text{mol/kg}$), e DNR e LDE-ODNR (1,8 $\mu\text{mol/kg}$)

Figura 47: Porcentagem de células viáveis ($\square$) e não viáveis ($\blacksquare$) nos tumores dos grupos salina, LDE, DNR e LDE-ODNR (7,5 $\mu\text{mol/kg}$), e DNR e LDE-ODNR (1,8 $\mu\text{mol/kg}$)

Figura 48: Análise da função mitocondrial por citometria de fluxo. Células viáveis e não-viáveis (%) dos grupos salina, LDE, DNR e LDE-ODNR (7,5 $\mu\text{mol/kg}$), e DNR e LDE-ODNR (1,8 $\mu\text{mol/kg}$)

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

IARC - Agência Internacional para Pesquisa em Câncer

OMS – Organização Mundial da Saúde

DDS - Drug Delivery Systems

MDR - resistência a múltiplos fármacos

NCI - National Cancer Institute (EUA)

FDA – Federal Drug Administration

DNR – daunorrubicina

DOX - doxorubicina (DXR),

EPR - epirubicina

IDR - idarrubicina

DNR-*ol* - daunorrubicinol

DOX-*ol* - doxorubicinol

LDL - lipoproteínas de baixa densidade

LMA - leucemia mielocítica aguda

LLA - leucemia linfóide aguda

ODNR - N-oleil-daunorrubicina

LDE-ODNR - nanoemulsão-N-oleil-daunorrubicina

MTT - brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazólio

DCC - N,N'-dicicloexilcarbodiimida

DMAP - 4-dimetilaminopiridina

CH₃COOH - ácido acético

TCA - ácido tricloroacético

AF - ácido fórmico

TBA - ácido tiobarbitúrico

DMSO - dimetilsulfóxido

Na₂S₂O₃ - tiosulfato de sódio

Na₂SO₄ - sulfato de sódio

NaOH- hidróxido de sódio

NaCl - cloreto de sódio

KCl - cloreto de potássio

AcONH₄ - acetato de amônio

ACN - acetonitrila

MeOH - metanol

CH₂Cl₂ - diclorometano

CHCl₃ - clorofórmio

THF - tetraidrofurano

ZnSO₄ - sulfato de zinco

Tris-HCl – solução tampão Tris-HCl

N₂ - atmosfera inerte de nitrogênio

CCD - cromatografia em camada delgada

HPLC - líquida de alta eficiência

UV - ultra-violeta

z- potencial *zeta*

LPO - lipoperoxidação

TBA – ácido tiobarbitúrico

TCA - ácido tricloroacético

SFB - de soro fetal bovino

RPMI – meio cultura RPMI 1640

DMT - dose máxima tolerada

DL₅₀ – dose letal 50

DL₁₀ – dose letal 10

ALT/TGP - alanina aminotransferase

AST/TGO - aspartato aminotransferase

CK-total - creatinínofosfoquinase

CK-MB - fração MB da creatinínofosfoquinase (quantitativa).

LC/MS/MS - Cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas

IS - padrão interno

SPE - extração em fase sólida

PI - iodeto de propídio

R 123 - rodamina 123

IMF - intensidade média de fluorescência

HE - hematoxilina/eosina

TR – tempo de retenção

CV% - coeficiente de variação

CQ - Controle de qualidade

LIQ - limite inferior de quantificação

Resumo

A nanoemulsão lipídica (LDE) se concentra nas células neoplásicas e pode ser utilizada como transportador de derivado lipofílico da daunorrubicina, como o N-oleil-daunorrubicina (oDNR). Neste estudo, a LDE-oDNR foi preparada por homogeneização em alta pressão e sua toxicidade e atividade anti-tumoral testadas. A associação LDE-oDNR teve rendimento elevado e permaneceu estável por longo período. Em camundongos C57BL/6J, a dose máxima tolerada (DMT) foi 65 vezes maior e a DL_{50} 48 vezes maior no tratamento LDE-oDNR comparado ao tratamento DNR comercial, resultando em alta redução da toxicidade. Em camundongos implantados com células de melanoma B16, a preparação LDE-oDNR (7,5 μ mol/kg) levou a redução de $59 \pm 2\%$ do crescimento do tumor comparado a redução de $23 \pm 2\%$ para o tratamento DNR comercial na mesma dose ($p < 0,001$). A probabilidade de sobrevida teve aumento pronunciado nos animais tratados com LDE-oDNR comparado à DNR comercial ($p < 0,01$). Além disso, apenas 30% dos animais portadores de melanoma submetidos ao tratamento com LDE-oDNR apresentaram metástases, comparado a 82% quando tratados com DNR comercial. Uma forte redução de toxicidade também foi observada pela redução da anemia e leucopenia nos animais tratados com LDE-oDNR, em comparação com DNR comercial. A preparação LDE-oDNR foi eficaz também no quadro de trombocitose induzida por tumor. Os testes com fragmentos extraídos de tumores dos animais tratados mostraram que a LDE-oDNR foi mais eficaz na destruição das células neoplásicas comparado ao tratamento DNR comercial (9% de células viáveis com tratamento LDE-oDNR, 27% sob tratamento DNR). O estudo mostrou que o tratamento proposto com o derivado ODNR associado à nanoemulsão (LDE-oDNR) é efetivo no combate às células tumorais, seletivo, menos tóxico e melhor tolerado. Os estudos de farmacocinética e biodistribuição somam a este protocolo informações importantes relacionadas às propriedades de absorção, distribuição, metabolismo e excreção da formulação em estudo comparado à DNR comercial.

Descritores: 1.Daunorrubicina/análogos & derivados 2.Ensaio de Seleção de Medicamentos Antitumorais 3.Receptores de LDL 4.Nanotecnologia

Summary

A lipidic nanoemulsion (LDE) that concentrates in neoplastic cells can be used as vehicle to daunorubicin lipophylic derivatives, such as *N*-oleyl-daunorubicin (oDNR). Here, LDE-oDNR was prepared by high pressure homogenization to test toxicity and anti-tumor activity. LDE-oDNR association yield was high and stable for long period. In mice, maximum tolerated dose was 65 and LD₅₀ was 48-fold greater in LDE-oDNR than in commercial DNR treatment, showing very strong toxicity reduction. In melanoma B16-tumor bearing mice, LDE-oDNR (7.5 µmol/Kg) reduced tumor-growth by of 59±2%, and DNR by only 23±2% at same dose level ($p<0.001$). Survival was pronouncedly increased in LDE-oDNR compared to DNR treatment ($p<0.01$). Furthermore, the number of melanoma-bearing mice with metastasis was 30% under LDE-oDNR, compared to 82% under DNR treatment. Strong reduction of toxicity was also observed by reduction of anemia and leucopenia under LDE-oDNR, compared to commercial DNR tumor-induced thrombocytosis was more effective with LDE-oDNR than with DNR. Tests with fragments extracted from tumors of treated animals showed that LDE-oDNR was more effective in killing neoplastic cells than DNR (9% of viable cells under LDE-oDNR; 27% under DNR). The pharmacokinetics and biodistribution studies add important information to this protocol related to the properties of absorption, distribution, metabolism and excretion of the formulation under study compared to free DNR. The remarkable toxicity reduction and increase in pharmacological action supports novel LDE-oDNR as a promising weapon in cancer treatment.

Descriptors: 1.Daunorubicin 2 Drug Screening Assays, Antitumor 3.Receptors,LDL 4.Nanotechnology

1. INTRODUÇÃO

Segundo recente relatório da Agência Internacional para Pesquisa em Câncer (IARC)/OMS, o impacto global do câncer mais que dobrou em 30 anos (WHO, 2009). Estimou-se que, no ano de 2008, ocorreriam cerca de 12 milhões de casos novos de câncer e 7 milhões de óbitos. Contudo, o contínuo crescimento populacional, bem como seu envelhecimento, afetará de forma significativa o impacto do câncer no mundo. Nesse cenário, fica clara a necessidade de continuidade em investimentos no desenvolvimento de ações abrangentes para o controle do câncer, nos diferentes níveis de atuação, como: na promoção da saúde, na detecção precoce da doença, na assistência aos pacientes, na vigilância, na formação de recursos humanos, na comunicação e mobilização social, na gestão dos sistemas de saúde e na pesquisa (INCA/MS, 2009).

Avanços nas pesquisas sobre câncer tem resultado em aumento de conhecimento específico sobre as alterações celulares e moleculares da doença em suas diferentes formas, proporcionando que novas estratégias para o tratamento e combate da doença sejam propostas. Como o tratamento e a cura do câncer ainda são um desafio para a ciência, as estratégias de *Drug Delivery Systems* (DDS) para o tratamento do câncer têm ganhado destaque nas pesquisas médicas da atualidade. Alvos específicos e terapias direcionadas e sequenciais são hoje alternativas para melhor desempenho dos fármacos, muitas vezes já existentes e pouco utilizados na prática clínica por apresentarem graves efeitos adversos. O foco principal do *Cancer Drug Delivery* não é mais simplesmente o acondicionamento de fármacos em novas formulações para diferentes vias de administração, mas sim uma terapia direcionada, para se atingir um alvo, com aumento dos níveis terapêuticos e melhora da seletividade e especificidade do tratamento. Além disso, as abordagens mais recentes não visam apenas complementar a quimioterapia convencional e a radioterapia, mas também evitar danos aos tecidos normais e prevenir a resistência a múltiplos fármacos (MDR).

Terapias inovadoras contra o câncer são baseadas em conceitos atuais a respeito da biologia da célula cancerosa através de técnicas moleculares. As novas estratégias terapêuticas neste campo abrangem o uso de agentes antiangiogênicos, inibidores de metaloproteinases, inibidores imunogênicos com o uso de anticorpos monoclonais, de citocinas; inibidores de transdução de sinal bloqueando o sítio de tirosina quinase de receptores de superfície, denominados, inibidores de tirosina quinase (TKI), abordagens no ciclo celular através das quinases ciclina-dependentes (CDK), abordagens de modificação da expressão gênica pela terapia genética e mais atualmente, pelas técnicas que utilizam oligonucleotídeos *antisense* de RNA de interferência (RNAi); além de vírus oncolíticos, vacinas, e ainda, a combinação de vários desses métodos (CARTER, 2001).

Um dos métodos inovadores atualmente utilizados na terapia do câncer é o uso de micro e nanopartículas na administração e transporte de agentes anticancerígenos. Após serem injetadas na circulação, elas são direcionadas até o tumor por várias vias, por exemplo, via campo magnético (BERRY, WELLS *et al.*, 2003; GUPTA e GUPTA, 2005), através da adição de ligantes, como pequenas moléculas, peptídeos, proteínas ou anticorpos, e também através de receptores específicos (DAVIS, CHEN *et al.*, 2008). Estratégias em nanotecnologia e *target drug delivery* já apresentam resultados de mudança na terapia do câncer, e como previsto pelo *National Cancer Institute* (NCI) a nanotecnologia junto às estratégias de DDS corroboram com todos os aspectos atuais de prevenção, diagnóstico e tratamento do câncer.

1.1 Antraciclinas

Os antibióticos do grupo das antraciclinas são compostos importantes no tratamento do câncer, com atividade tanto em tumores sólidos como em neoplasias hematológicas (TEWEY, ROWE *et al.*, 1984; WEISS, SAROSY *et al.*, 1986; LOTFI, ZACKRISSON *et al.*, 2002). Os principais fármacos aprovados para uso pelo FDA que fazem parte deste grupo são: daunorrubicina (DNR), doxorrubicina (DXR), epirrubicina (EPR) e idarrubicina (IDR) (Figura 1).

Figura 1: Estrutura das principais antraciclínas antitumorais

Os antibióticos antraciclínicos possuem um esqueleto aglicona ligado a um açúcar, a daunosamina, ligados através de ligação glicosídica no carbono 7. Todos os fármacos desta classe possuem os componentes quinona e hidroquinona nos anéis adjacentes, que lhes permitem funcionar como agentes aceptores e doadores de elétrons (ARNOLD, SLACK *et al.*, 2004; MINOTTI, MENNA *et al.*, 2004).

Embora muito semelhantes estruturalmente, a DNR e IDR são utilizadas principalmente nas leucemias agudas, enquanto que a DOX exibe atividade ampla em neoplasias, incluindo tumores sólidos (CALABRESI e CHABNER, 1996; GROCHOW e AMES, 1998; HANDE, 2003; MINOTTI, MENNA *et al.*, 2004; TAKIMOTO, 2005).

A ação citotóxica das antraciclínas é devido à sua interferência no DNA. O mecanismo de ação primário consiste na inibição da topoisomerase II, e também favorece a formação de metabólitos reativos que interagem com moléculas da célula tumoral e com as membranas celulares (CALABRESI e CHABNER, 1996; HANDE, 2003; ARNOLD, SLACK *et al.*, 2004; MINOTTI, MENNA *et al.*, 2004; MARTINCIC e HANDE, 2005; LIU, YANG *et al.*, 2008).

As antraciclínas são metabolizadas no fígado e excretadas principalmente pela bile. Apesar de uma pequena fração (<10%) ser eliminada pela urina (ROBERT, 1988), a maior parte da dose administrada, aproximadamente 50%, é removida do organismo sem metabolização (JOERGER, HUITEMA *et al.*, 2005); (KASSNER, HUSE *et al.*, 2008). Em modelo experimental com ratos, foi estimado que 22% da dose injetada sofre por reciclagem enterohepática (COX, WILKE *et al.*, 1991).

1.1.1 Daunorrubicina

A daunorrubicina (DNR) é originalmente obtida de cepas de *Streptomyces peucetius*. É fármaco de primeira linha no tratamento da leucemia mieloide aguda (LMA), e considerado um importante agente antitumoral comumente utilizado nesse tipo de afecção (TEWEY, ROWE *et al.*, 1984; WEISS, SAROSY *et al.*, 1986; BINASCHI, FARINOSI *et al.*, 1998; HANDE, 2003). Tem atividade antitumoral também em outras malignidades como linfomas, neuroblastoma, sarcoma de Ewing's e outros tumores sólidos (YOUNG, OZOLS *et al.*, 1981). A ação antitumoral da DNR decorre de vários mecanismos, entre eles a formação de complexos metálicos, indução de apoptose e geração de intermediários reativos de O₂ que atuam como radicais livres (LOWN, 1993; LOTFI, ZACKRISSON *et al.*, 2002; MINOTTI, MENNA *et al.*, 2004)

Apesar de apresentar atividade antitumoral favorável, o emprego da DNR também é limitado devido à alta toxicidade, principalmente mielo e cardiotoxicidade. Estomatite, alopecia, distúrbios gastrintestinais e manifestações dermatológicas são outras toxicidades causadas pelo quimioterápico (CALABRESI e CHABNER, 1996; DEVITA, HELLMAN *et al.*, 2005). A toxicidade cardiovascular causada pela DNR e outros agentes antraciclínicos é caracterizada por taquicardia, arritmias, dispnéia, hipotensão, derrame pericárdico e insuficiência congestiva. A miocardiopatia é característica desses compostos. Duas formas de miocardiopatias podem ocorrer: (a) aguda, caracterizada por alterações eletrocardiográficas anormais, sendo breve e raramente um problema sério; e (b) crônica, cumulativa relacionada à dose, manifestada por insuficiência cardíaca congestiva que não responde a tratamento com digitálicos. Toxicidade cardíaca de início retardado, com instalação de insuficiência cardíaca congestiva anos após tratamento, pode ocorrer em populações pediátricas e adultas (LIPSHULTZ, COLAN *et al.*, 1991; CALABRESI e CHABNER, 1996; DEVITA, HELLMAN *et al.*, 2005). A cardiotoxicidade é relacionada à dose acumulada e é fator limitante no uso deste fármaco. Isso é particularmente problemático para crianças, pacientes já tratados com quaisquer

das antraciclina e os tratados simultaneamente com outros agentes cardiotóxicos (SHAN, LINCOFF *et al.*, 1996; MINOTTI, RECALCATI *et al.*, 2004).

A formação de metabólitos reativos está diretamente relacionada à toxicidade do fármaco, são formados a partir de reações enzimáticas resultando em metabólitos aglicona e hidroxilados de estrutura semelhante. O metabólito primário da daunorrubicina, por exemplo, o daunorrubicinol (DNR-ol), é produzido por aldeto redução NADPH-dependente na carbonila do carbono 13 (C13) da molécula (TAKANASHI e BACHUR, 1976). A deglicosidação do açúcar daunosamina na posição do C7 gera o metabólito daunorrubicinona (DNR-ona) e daunorrubicinolona (DNR-olona). O grupo hidroxila restante pode ser metabolizado a 7-deoxidaunorrubicinona (7-DNR-ona) ou 7-deoxidaunorrubicinolona (7-DNR-olona) (Figura 2). Metabólitos sulfonados e glicosilados têm sido identificados na urina, mas essa biotransformação pode estar limitada aos humanos (TAKANASHI e BACHUR, 1976; LE BOT, BEGUE *et al.*, 1988; INNOCENTI, IYER *et al.*, 2001)

Figura 2: Estruturas dos principais metabólitos da daunorrubicina. Esquema adaptado de (ARNOLD, SLACK *et al.*, 2004)

As atividades terapêuticas e tóxicas dos metabólitos da DNR e das antraciclinas em geral ainda não estão totalmente elucidadas. No entanto, alguns estudos com a DOX mostram que o DOX-*ol* tem certa importância clínica, embora seja menos ativo que a DOX (SCHOTT e ROBERT, 1989). Alguns autores mostram que o DOX-*ol* e metabólitos similares podem promover a formação de radicais livres contribuindo para cardiotoxicidade dose-dependente (OLSON, MUSHLIN *et al.*, 1988; LICATA, SAPONIERO *et al.*, 2000; MENNA, RECALCATI *et al.*, 2007). Assim, compostos antraciclínicos pouco formadores de metabólitos álcoois são considerados menos cardiotóxicos e a lesão do miocárdio está fortemente relacionada ao acúmulo do metabólito primário (DNR-*ol*; DOX-*ol*) no tecido cardíaco. Estudos mostram que uma superexpressão de DOX-redutase no tecido cardíaco de ratos leva a um acúmulo do DOX-*ol* no coração e acelera o processo de cardiomiopatia. De modo oposto, animais *knock-out* para DOX-redutase cardíaca foram menos sensíveis a antraciclinas (FORREST, GONZALEZ *et al.*, 2000; OLSON, BEDJA *et al.*, 2003; KASSNER, HUSE *et al.*, 2008)

Sendo os metabólitos-*ol* das antraciclinas são menos ativos na inibição da topoisomerase (FERRAZZI, WOYNAROWSKI *et al.*, 1991) e na morte de células tumorais (DORR, SHIPP *et al.*, 1991), essa atividade antitumoral reduzida pode levar a um processo de resistência do tumor. Assim, variações individuais na metabolização dos compostos podem afetar tanto o efeito antitumoral e a indução de resistência como o risco de cardiotoxicidade.

Em vários estudos têm-se procurado aumentar a especificidade dos quimioterápicos às células tumorais, empregando-se transportadores, exemplos como os polímeros (KAN, CHEN *et al.*, 1999), lipossomas, lipossomas carregados positivamente (SENGUPTA, TYAGI *et al.*, 2000; WU, LEE *et al.*, 2007), hormônios, anticorpos (JUNGHANS *et al.*, 1996), e emulsões lipídicas (GRAZIANI, IGREJA *et al.*, 2002; MARANHÃO, GRAZIANI *et al.*, 2002; PIRES, HEGG *et al.*, 2009). Com o aumento da especificidade e seletividade do agente pelo tecido neoplásico, espera-se que o uso desses transportadores diminua os efeitos colaterais e aumentem a atividade farmacológica dos quimioterápicos.

Formulações lipossomais de antraciclinas são conhecidas em tratamentos quimioterápicos com estes fármacos, visando diminuição de toxicidade e aumento do espectro de ação (FORSEN, COULTER *et al.*, 1992; WU, LEE *et al.*, 2007). Apesar de muitas dessas formulações já estarem no mercado, ainda possuem o grande inconveniente de serem extremamente caras e dispendiosas para uma rotina de tratamento de quimioterapia.

1.2 Nanoemulsões lipídicas artificiais ricas em colesterol

As células neoplásicas apresentam aumento do número de receptores de lipoproteínas de baixa densidade (LDL) (HO, SMITH *et al.*, 1978), como consequência da maior demanda de colesterol e outros lipídios para a síntese de novas membranas, atendendo à proliferação celular exagerada característica da doença.

Surgiu então a proposta de usar a LDL como veículo para quimioterápicos antitumorais, concentrando-os, através da endocitose mediada por receptores, nos tecidos neoplásicos com superexpressão dos receptores de LDL (GAL, OHASHI *et al.*, 1981; MOSLEY, GOLDSTEIN *et al.*, 1981; RUDLING, COLLINS *et al.*, 1983) (MASQUELIER, VITOLS *et al.*, 1986; DE SMIDT e VAN BERKEL, 1990; TOKUI, TAKATORI *et al.*, 1995). Porém, na prática, a utilização da LDL natural é totalmente inadequada para rotina de tratamento quimioterápico, pelo difícil e dispendioso processo de isolamento do plasma humano, através de plasmaferase, e as alterações em sua estrutura durante a sua manipulação para incorporação de fármacos. Além disso, o uso heterólogo de um hemoderivado como a LDL é acompanhado do risco de transmissão de doenças infecciosas e de reações imunológicas.

A solução para o uso do fenômeno da superexpressão dos receptores de LDL e da via de endocitose das lipoproteínas para o direcionamento de quimioterápicos foi descrita por (MARANHÃO, GARICOCHA *et al.*, 1992), que propuseram o uso de nanoemulsões lipídicas com estrutura parecida a da LDL como veículo de fármacos, em substituição à lipoproteína natural.

As nanoemulsões, por composição lipídica semelhante à da LDL, são ricas em ésteres de colesterol, mas desprovidas de proteína (MARANHÃO, CESAR *et al.*, 1993). Ao serem injetadas na circulação plasmática e em contato com as lipoproteínas naturais adquirem apolipoproteínas, entre elas a apo E. Esta é reconhecida pelo receptor da LDL e funciona como ponte para a nanoemulsão ligar-se ao receptor e ser captada pela célula (MARANHÃO, CESAR *et al.*, 1993; HIRATA, HIRATA *et al.*, 1999). A apo E ligada às nanoemulsões tem afinidade pelo receptor da LDL trinta vezes maior do que a apo B existente na própria LDL natural (BROWN e GOLDSTEIN, 1986) e que também a liga aos receptores.

Por ser obtida artificialmente, as nanoemulsões lipídicas não apresentam riscos relacionados a utilização de hemoderivados e são passíveis de fabricação em escala industrial. O uso das nanoemulsões lipídicas como transportador de fármacos poderia, então, substituir a LDL natural e direcionar quimioterápicos aos tecidos neoplásicos, evitando órgãos e tecidos normais, o que aumentaria a eficiência do tratamento e reduziria os efeitos colaterais dos quimioterápicos

Esta hipótese foi comprovada em pacientes com leucemia mielocítica aguda (LMA) com acentuada superexpressão dos receptores de LDL comparados com pacientes com leucemia linfóide aguda (LLA) (MARANHÃO, GARICOCHEA *et al.*, 1994). Observou-se que a taxa de remoção plasmática da nanoemulsão foi três vezes maior nos pacientes com LMA do que nos pacientes com LLA, indicando que as células de LMA com superexpressão de receptores de LDL seqüestram a nanoemulsão, que se concentra nos tecidos neoplásicos. Foi demonstrada também a captação da nanoemulsão pela medula óssea infiltrada de células de LMA de maneira direta, através de imagens de medicina nuclear obtidas com nanoemulsão marcada com Tecnécio^{99m}. Nos estudos cinéticos, 66% da nanoemulsão injetada foi captada pelas células leucêmicas e apenas 34% pelas células normais (MARANHÃO, GARICOCHEA *et al.*, 1994).

Em experimentos posteriores, confirmou-se a captação e concentração da nanoemulsão em tumores sólidos, como no carcinoma de ovário (ADES, CARVALHO *et al.*, 2001) e no de mama (GRAZIANI, IGREJA *et al.*, 2002).

A tecnologia de associação de fármacos à nanoemulsão foi utilizada com os quimioterápicos carmustina (MARANHÃO, GRAZIANI *et al.*, 2002), paclitaxel (RODRIGUES, COVOLAN *et al.*, 2002; RODRIGUES, MARIA *et al.*, 2005; DIAS, CARVALHO *et al.*, 2007), etoposídeo (VALDUGA, FERNANDES *et al.*, 2003; AZEVEDO, CARVALHO *et al.*, 2005; LO PRETE, MARIA *et al.*, 2006; PINHEIRO, HUNGRIA *et al.*, 2006) e daunorrubicina (TEIXEIRA, VALDUGA *et al.*, 2008). Além das preparações mostrarem-se estáveis, os estudos em animais de experimentação mostram redução acentuada da toxicidade dos quimioterápicos sem perda da ação antitumoral. Por fim, os ensaios clínicos em pacientes com câncer em estágio avançado também mostraram importante redução de toxicidade. Esses estudos demonstram que o sistema de nanoemulsões lipídicas é promissor como transportador de agentes quimioterápicos, com potencial de revolucionar o tratamento quimioterápico das neoplasias malignas.

Sendo a DNR um fármaco de primeira linha no tratamento da LMA, (DORLHIAC-LLACER, MARQUEZINI *et al.*, 2001) verificaram que quando incorporada à nanoemulsão, a DNR resultou em maior efeito citotóxico às células de LMA do que às células normais correspondentes. Em contraste, a DNR livre apresentou citotoxicidade igual nas linhagens celulares K562 e células blásticas leucêmicas, indistintamente.

Apesar dos resultados promissores, o projeto do laboratório nanoemulsão-DNR não havia sido levado adiante devido à baixa taxa de associação da DNR à nanoemulsão (<1%), o que inviabilizaria qualquer intenção de aplicação clínica futura. Para solucionar este problema, a DNR foi modificada quimicamente visando maior lipofilicidade e aumento da taxa de incorporação à nanoemulsão. Com a derivatização da DNR, a taxa de incorporação foi otimizada, atingindo em média 85% (TEIXEIRA, VALDUGA *et al.*, 2008). Os compostos N-oleil-daunorrubicina (ODNR) e nanoemulsão-N-oleil-daunorrubicina (LDE-ODNR) mostram-se estáveis e, conforme dados já publicados na literatura, a permeação das antraciclinas aumenta com o aumento da sua lipofilicidade (SPETH, MINDERMAN *et al.*, 1989; LOTFI, ZACKRISSON *et al.*, 2002; TEIXEIRA, VALDUGA *et al.*, 2008)

Os resultados dos estudos de atividade antitumoral, farmacocinética e biodistribuição da formulação LDE-ODNR comparado a formulação comercial DNR são de grande importância para a completa caracterização da preparação proposta. A preparação apresenta atividade antitumoral *in vitro* satisfatória e marcante redução da toxicidade *in vivo*, com cardiotoxicidade quase inexistente, comprovada por histopatologia e microscopia eletrônica (TEIXEIRA, 2005; TEIXEIRA, VALDUGA *et al.*, 2008).

2. JUSTIFICATIVA

O desenvolvimento e realização de testes de atividade antitumoral com a preparação daunorrubicina associada a nanoemulsão lipídica é de extrema importância. Um dos fatores mais importantes é a grande capacidade de vetorização da nanoemulsão às células neoplásicas principalmente às leucemias. O fenômeno de superexpressão dos receptores de LDL foi descrito primeiramente nesta neoplasia, onde o aumento dos receptores pode atingir até 100 vezes, propiciando um poderoso mecanismo de direcionamento de fármacos via nanoemulsão. Além das aplicações no tratamento da LMA, a DNR é um fármaco importante na quimioterapia combinada de outras neoplasias de importância epidemiológica, como carcinomas de ovário, mama, gástrico, melanomas, neoplasias de linhagem hematológica (linfomas e leucemias), mielomas múltiplos, entre outros. A redução de toxicidade permite a ampliação das indicações clínicas da DNR e também a continuidade dos tratamentos, muitas vezes abandonados pela alta toxicidade do composto comercial.

A formulação apresenta baixo custo já que o processo de obtenção é simples e seus componentes lipídicos pouco adicionam ao custo do princípio ativo. A toxicidade reduzida deverá propiciar também grande economia de custos no tratamento.

Estes dados experimentais são fundamentais para a avaliação do composto nanoemulsão-N-oleil-daunorrubicina e realização de futuros ensaios clínicos, dada importância do tempo de exposição das células neoplásicas ao agente quimioterápico para o alcance da atividade antitumoral máxima verificada pelo aumento da sobrevida global.

3. OBJETIVO GERAL

Verificar a farmacocinética e biodistribuição, a eficácia antitumoral e a probabilidade de sobrevida obtida com a preparação nanoemulsão-N-oleil-daunorrubicina comparado à DNR em sua formulação comercial, em camundongos com implante de tumor de melanoma murino B16F10.

3.1. Objetivos específicos

- Determinar a eficácia da terapia antitumoral da associação nanoemulsão-N-oleil-DNR em comparação à da DNR comercial;
- Avaliar efeitos no perfil hematológico e viabilidade celular comparando as formulações nanoemulsão-N-oleil-DNR e DNR comercial;
- Determinar a farmacocinética da preparação nanoemulsão-N-oleil-DNR em camundongos e comparar com a DNR em sua formulação comercial;
- Investigar a presença do metabólito ativo daunorrubicinol na circulação e tecidos comparando a formulação nanoemulsão-N-oleil-DNR e a DNR comercial;

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Material

A DNR foi obtida da Meizler Biopharma S/A (Daunocin®). Os reagentes (grau pró-análise) foram: ácido oléico, brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazólio (MTT), migliol, oleato de colesterol, colesterol livre adquiridos da Sigma Chemical Co. (St. Luis, MO, EUA), fosfatidilcolina de ovo da LIPOID E80® (Gerbrás Química Farmacêutica Ltda (São Paulo, SP, Brasil). N,N'-dicicloexilcarbodiimida (DCC) e 4-dimetilaminopiridina (4-DMAP) da Acros Organics (New Jersey, NY, EUA), ácido acético (CH₃COOH), ácido tricloroacético (TCA), ácido fórmico (AF), ácido tiobarbitúrico (TBA), dimetilsulfóxido (DMSO), tiosulfato de sódio (Na₂S₂O₃), sulfato de sódio (Na₂SO₄), polissorbato 80 (Tween 80®), hidróxido de sódio (NaOH), cloreto de sódio (NaCl), cloreto de potássio (KCl), acetato de amônio (AcONH₄), acetona, acetonitrila (ACN), metanol (MeOH), diclorometano (CH₂Cl₂), clorofórmio, (CHCl₃), tetraidrofurano (THF), da MERCK (Darmstadt, Alemanha).

Os equipamentos utilizados foram: sonificador Branson Ultrasonic Corporation (Danbury, CT EUA), ultracentrífuga rotor Beckman SW41 (Beckman Coulter Inc., Brea, CA, EUA), Laser Scattering Zeta PALS® - Zeta Potential Analyser equipado com eletrodo, fonte de tensão e software Zeta Potencial Analyser® (Brookhaven Instruments Co, Holtsville, NY, EUA), ELISA BioRad (Bio-Rad Laboratories, Philadelphia, PA EUA), rotaevaporador, HPLC Shimadzu SPD-10AV (Shimadzu Scientific Instruments, Columbia, MD, EUA), Homogeneizador EmulsiflexC5® (Avestin Inc., Ottawa, Canada); HemoCounter ABCVet® (Horiba ABX, Irvine, CA, EUA), HPLC Agilent Technologies, 1200 Series, coluna Discovery® HS PEG 15 cm x 4,6 mm, 5µm, SUPELCO®; MS 3200 QTRAP LC/MS/MS Applied Biosystems MDS SCIEX®; agitador vórtex Thermolyn® 37600 mixer, centrífuga de tubos Eppendorf (Hamburg, Alemanha), centrífuga de placa Eppendorf 5810R (Hamburg, Alemanha), citômetro FACScalibur® (Becton & Dickinson, San Jose, CA, EUA).

4.1.1 Animais de experimentação e linhagem celular

Utilizou-se camundongos isogênicos C57BL/6J machos e Balb/c fêmeas, com peso mínimo de 20g. Para os estudos de eficácia antitumoral, utilizou-se modelo de tumor murino melanoma B16F10. Os camundongos e as células do modelo experimental foram cedidos pelo Prof. Dr. Durvanei Augusto Maria do Laboratório de Bioquímica e Biofísica da Divisão de Desenvolvimento Científico do Instituto Butantan (São Paulo, Brasil).

Durante o período de experimentação, os animais foram mantidos no Biotério da Divisão de Desenvolvimento Científico do Instituto Butantan, com ciclo de luz claro/escuro de 12 horas, temperatura constante de 20°C, água filtrada e esterilizada e ração *ad libitum*.

Todos os experimentos *in vivo* seguiram as normas éticas indicadas pelo COBEA (Colégio Brasileiro de Experimentação Animal).

4.2 Métodos

4.2.1 Preparo da nanoemulsão lipídica rica em colesterol (LDE)

Para o preparo da nanoemulsão lipídica seguiu-se a técnica descrita por (MARANHÃO, CESAR *et al.*, 1993). Cada um dos lipídios utilizados para o preparo da nanoemulsão foram previamente solubilizados e armazenados a -20 °C. Para o fosfolípido foi feita solução estoque 200 mg/mL em CHCl₃:MeOH (2:1, v/v), para o éster de colesterol, 100 mg/mL em CHCl₃:MeOH (2:1, v/v) e para o colesterol livre 50 mg/mL em CHCl₃:MeOH (2:1, v/v). Foi utilizada mistura desses lipídios, sendo 333 mg de fosfatidilcolina de ovo, 135 mg éster de colesterol, 6 mg de colesterol livre, 132 mg de migliol (grau de pureza ≥ 99%). Em seguida, a mistura de lipídios foi seca sob fluxo de nitrogênio e mantida em dessecador a vácuo, por 12 horas a 4 °C. Após a adição de 100 mg de polissorbato 80 (Tween 80®) e 10 mL de solução tampão Tris-HCl 0,01mol/L, pH 8,05, a mistura de lipídios foi pré-emulsificada por irradiação ultra-sônica e emulsificada em homogeneizador de alta pressão EmulsiflexC5. Ao término dos ciclos de homogeneização, a emulsão formada foi

centrifugada a 3700 rpm, por 20 minutos e esterilizada por filtração em membrana Millipore® (0,22µm de porosidade) em fluxo laminar, analisada e armazenada em frascos estéreis a 4 °C.

4.2.2 Extração da daunorrubicina (DNR)

A apresentação comercial da DNR, composto por cloridrato de daunorrubicina e manitol, foi previamente pesada e solubilizada em *qs* de água destilada. A esta solução adicionou-se tampão Tris-HCl, pH 8,0 e a extração feita com clorofórmio (3 a 5 extrações) e 0,5 mL de solução hidróxido de sódio (NaOH) 1M. A fase orgânica foi lavada com água destilada (2 a 3 lavagens) e em seguida com solução saturada de tiosulfato de sódio (Na₂S₂O₃). Em seguida, a fase orgânica foi filtrada na presença de sulfato de sódio (Na₂SO₄), concentrada em rotaevaporador e armazenada ao abrigo da luz em frasco âmbar a 4 °C.

4.2.3 Síntese do derivado N-oleil-daunorrubicina (ODNR)

Para a reação de derivatização da DNR, mostrada na Figura 3, utilizou-se: 2,76 g (5,238 mmol) de DNR livre de manitol, 1,66 g (5,753 mmol) de ácido oléico, 0,638 g (5,238 mmol) de 4-DMAP e 2,158 g (5,238 mmol) de DCC. Adicionou-se o ácido oléico em 5,0 mL de diclorometano anidro (CH₂Cl₂), o DCC e em seguida o 4-DMAP. A reação permaneceu sob agitação magnética por 20 minutos. Adicionou-se a esta reação a DNR previamente solubilizada em CH₂Cl₂. O meio reacional permaneceu sob agitação em atmosfera inerte (N₂) por duas horas à temperatura ambiente. A reação foi monitorada por cromatografia em camada delgada (CCD) utilizando como fase móvel MeOH/CHCl₃ e por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), em coluna de sílica, LUNA®C18 Phenomenex®, e pré-coluna de sílica C8, fase móvel 100% MeOH, detector UV/visível, 234 nm. Após a identificação da formação do produto final, a fase orgânica foi concentrada em rotaevaporador. Em seguida, foram realizadas sucessivas extrações líquido-líquido com éter etílico e água, e clorofórmio e água, na presença de ácido e/ou base (solução CH₃COOH 10%, solução NaOH 1M). Após eliminação completa dos resíduos da reação, a fase

orgânica foi lavada com solução saturada de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$, filtrada na presença de Na_2SO_4 e seca em rotaevaporador. Segue abaixo o esquema da reação proposta.

Figura 3: Reação de obtenção do derivado N-oleil-daunorubicina (ODNR) a partir da DNR e do ácido oléico na presença de DCC e 4-DMAP a temperatura ambiente

4.2.4 Incorporação do N-oleil-daunorubicina à nanoemulsão lipídica (LDE-ODNR)

O preparo da LDE com o derivado ODNR incorporado, foi feito conforme descrição no item 4.2.1. Na mistura de lipídios, adicionou-se 60 mg do fármaco ODNR mantendo-se a proporção fármaco:lipídios 1:10. A sequência do preparo da formulação seguiu conforme descrito no item citado.

4.2.5 Avaliação da estabilidade das preparações LDE e LDE-ODNR

A estabilidade das nanoemulsões LDE e LDE-ODNR foi avaliada pelos seguintes testes: determinação do tamanho e da polidispersidade das partículas (item 4.2.5.1), do potencial zeta (item 4.2.5.2); do índice de lipoperoxidação (item 4.2.5.3); determinação do valor de pH das preparações (item 4.2.5.4) e taxa de incorporação do derivado N-oleil-DNR à LDE (item 4.2.5.5). Todos os testes foram feitos durante 180 dias, em triplicata. Ao final das três leituras, estabeleceu-se um valor médio e o desvio padrão correspondente.

4.2.5.1 Determinação do tamanho de partícula e polidispersidade

O diâmetro e a polidispersidade das preparações foram analisados por *Laser Scattering*.- ZetaPals® (Brookhaven Instruments) empregando-se medidas de espalhamento de luz dinâmico. Em cubeta descartável, 35 µL das amostras foram diluídas em solução tampão tris-HCl 0,01M, pH 8,05.

4.2.5.2 Determinação do potencial Zeta

O potencial zeta (z) das nanopartículas foi determinado por espalhamento de luz utilizando-se Zeta Plus® (eletrodo, fonte de tensão e software Zeta Potencial Analyser®, Brookhaven Instruments). Trinta µL de amostra foram diluídas em 1 mL solução KCl 1 mM em cubeta descartável e as medidas feitas a 25 °C utilizando-se eletrodo de prata em modo *Phase Analysis Light Scattering*.

4.2.5.3 Determinação do índice de lipoperoxidação (LPO) - Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)

A lipoperoxidação (LPO) das preparações foi calculada como índice de peroxidação de lipídios. Verificou-se a formação de substâncias reativas ao aquecimento do ácido tiobarbitúrico (TBARS) medido por espectrofotômetro de UV (532 nm). A análise foi feita em duas etapas: na primeira etapa em tubo de vidro foram adicionados 100 µL de nanoemulsão e 0,5 mL ácido tricloroacético 20% (TCA); em segundo tubo, foram adicionados 100 µL de amostra (nanoemulsão) e 0,5 mL ácido tiobarbitúrico 0,86% (TBA). Os tubos foram agitados por 30 segundos, deixados em banho de água a 100 °C durante 20 minutos seguidos de outros 20 minutos em banho de gelo. As amostras foram novamente agitadas em vórtex e centrifugadas por 4 minutos a 8000 rpm. As leituras foram realizadas em espectrofotômetro UV, comprimento de onda 535 nm. O índice de lipoperoxidação foi calculado através da equação:

$$\text{LPO} = \frac{\text{TBA} - \text{TCA}}{0,0312}$$

4.2.5.4 Avaliação do pH

Para as leituras de pH utilizou-se pHmetro digital. Após calibração do eletrodo nas soluções padrão, este foi cuidadosamente imerso em volume suficiente e as medidas realizadas.

4.2.5.5 Determinação do rendimento de incorporação do derivado ODNR a LDE

Após incorporação ODNR à nanoemulsão, a preparação foi centrifugada e filtrada em membrana Millipore® (0,22 µm de porosidade) sob fluxo laminar. A amostra (10 µL) foi analisada por cromatografia líquida de alta eficiência, em modo isocrático, fase móvel 100% MeOH, detector UV-Visível (234 nm). A concentração final da preparação e o rendimento foram calculados utilizando curva de calibração (0,001 a 1 mg/mL) previamente estabelecida.

4.2.6 Determinação da citotoxicidade

A avaliação da citotoxicidade da preparação LDE-ODNR foi realizada a partir de ensaio de viabilidade celular pela técnica de exclusão do azul tripan e pela técnica de redução do brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazólio (MTT) (HAYON, DVILANSKY *et al.*, 2003; WANG, HENNING *et al.*, 2010). Para tanto, foram utilizadas as linhagens de melanoma murino B16F10 e de fibroblastos NIH3T3. As células foram plaqueadas a uma densidade de $5 \times 10^3/\text{cm}^2$ em meio RPMI 1640 suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) e mantidas por no mínimo doze horas para a completa adesão celular. As células foram então tratadas com DNR (400 µM), LDE-ODNR (600 µM) ou LDE (concentração equivalente às demais, v/v) e mantidas em cultura durante 24 ou 48 horas. Para o ensaio de exclusão com azul de tripan, as células foram descoladas dos poços com quantidades iguais de tripsina e coletadas em 300 µL de meio RPMI. Após homogeneização, uma alíquota de 20 µL (tanto do sobrenadante, quanto das células) foi coletada e corada com quantidades iguais do corante vital azul de tripan 0,25%. As amostras foram analisadas em hemocitômetro (Neubauer Improved®). As células coradas (inviáveis)

e não coradas (viáveis) foram contadas e os resultados expressos em porcentagem de células viáveis.

Para o teste de MTT, as células foram tratadas com concentrações crescentes de DNR (177,6 µM; 355,2 µM; 532,9 µM; 710,5 µM; 888 µM; 1065 µM; 1243 µM), LDE-ODNR (315 µM; 631 µM; 946 µM; 1262 µM; 1578 µM; 1893 µM; 2209 µM) ou LDE (concentrações equivalentes v/v) e mantidas em cultura durante 48 horas. Após este período, foram adicionados às células, 20 µL de solução de MTT (5 mg/mL em PBS) e a placa foi incubada a 37 °C por 3 horas. Após este período, o sobrenadante foi retirado e adicionado 200 µL de DMSO para a completa dissolução dos cristais de formazan. A leitura foi realizada em leitor de microplaca em comprimento de onda de 490 nm. As células controle foram consideradas 100% de sobrevivência.

$$\text{Sobrevida (\%)} = \frac{\text{média de absorbância dos poços para cada concentração}}{\text{média da absorbância do grupo controle}} \times 100$$

4.2.7 Avaliação da toxicidade aguda *in vivo*

Para rastreamento da dose tóxica aguda das formulações LDE-ODNR e DNR na sua forma comercial, foram utilizados grupos de 3 camundongos Balb-c. Doses entre 2,3 a 28,125 µmol/kg da DNR e doses entre 150 a 600 µmol/kg da LDE-ODNR foram administradas via intraperitoneal. A sobrevivência dos animais foi acompanhada durante 30 dias. O peso dos animais foi aferido a cada dois dias durante os primeiros quinze dias iniciais e a cada quatro na metade final. A dose máxima tolerada (DMT) foi determinada segundo critério estabelecido por (ECOBICHON e COMEAU, 1973).

4.2.8 Avaliação comparativa da toxicidade *in vivo* das formulações DNR comercial LDE-ODNR

A avaliação da toxicidade inerente às formulações foi feita em grupos de 4 camundongos Balb-c sem tumor, divididos nos seguintes grupos: salina, LDE, DNR e LDE-ODNR (ambos tratamentos em dose equimolar, 7,5 µmol/kg). Os tratamentos

foram administrados via intraperitoneal nos dias 1, 3, 7 e os animais acompanhados durante trinta dias. Foram avaliados o peso dos animais, sobrevida, perfil hematológico e perfil bioquímico-enzimático - alanina aminotransferase (ALT/TGP), aspartato aminotransferase (AST/TGO), creatinina fosforilada, creatinínofosfoquinase (CK-total) e fração MB da creatinínofosfoquinase (CK-MB quantitativa). As coletas de sangue foram feitas do plexo submandibular vinte e quatro horas após cada administração e a cada semana após o último dia de tratamento. As análises do perfil hematológico foram realizadas com sangue total em equipamento Hemocounter® do laboratório de Hematologia Clínica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas USP em colaboração com o Prof. Dr. Ricardo Fock, e as análises de perfil enzimático em plasma foram realizadas no Laboratório Central HCFMUSP (Protocolo de Pesquisa/PR657).

4.2.9 Implante de células de melanoma B16F10 em camundongos

Aproximadamente 100 µL contendo 5×10^4 células viáveis em solução tampão fosfato foram injetadas via subcutânea na região dorsal de camundongos C57BL/6J. Após o implante do tumor, os animais foram observados a cada 72 horas e o crescimento tumoral acompanhado até atingir diâmetro médio de 0,5 cm³ sem a presença de ulcerações ou necroses. Entre o 10º e 14º dias após a inoculação, os tumores foram visualizados macroscopicamente. A escolha destes modelos se fez a partir de protocolos estabelecidos pelo *National Cancer Institute* (NCI) (PLOWMAN, CREAMER *et al.*, 1997).

4.2.10 Estudo farmacocinético da LDE-ODNR em camundongos – Cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas (LC-MS/MS)

4.2.10.1 Coleta de plasma e tecido dos animais

O estudo farmacocinético da formulação LDE-ODNR foi realizado em camundongos C57BL/6J com implante de tumor de melanoma murino B16F10. Foi administrado, em dose única, 75 µmol/kg de LDE-ODNR via endovenosa no plexo

retro-orbital após 12 dias do implante do tumor. Amostras de sangue (coletadas em tubos heparinizados) e tecidos foram coletados em intervalos pré-estabelecidos durante 72 horas (15 e 30 minutos, 1, 2, 6, 8, 12, 24, 48 e 72 horas). As amostras de sangue foram centrifugadas para separação do plasma. Plasma e tecidos foram congelados imediatamente em freezer -80°C e analisadas por ensaio de cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrômetro de massas (LC-MS/MS).

4.2.10.2 Método bioanalítico LC-MS/MS

O método bioanalítico de LC-MS/MS seguiu os critérios da RE 899 de Maio de 2003, descrito pela ANVISA para estudos de farmacocinética e biodisponibilidade (ANVISA, 2003). O processo de validação não foi seguido a rigor por não se tratar de um estudo regulatório e sim de um estudo preliminar.

O estudo quantitativo foi realizado em colaboração com o Prof. Dr. Ernani Pinto Jr (Laboratório de Análises Toxicológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, USP), e com o Prof. Dr. Pio Colepícolo (Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular de Algas do Instituto de Química, USP). O especialista de laboratório Msc. Felipe Augusto Dörr e o Prof. Dr. Diogo de Oliveira Silva (UNIFESP, Diadema, SP) colaboraram na condução das análises.

Para o desenvolvimento do método, foram utilizadas amostras em solução de ressuspensão e em plasma humano contaminado com as soluções de trabalho em metanol:água (MeOH:H₂O) provenientes de diluições seriadas das seguintes soluções estoque: DNR (10 mg/mL, MeOH:H₂O, 1:1, v/v) ODNR (10 mg/mL, THF:MeOH, 1:1, v/v); e a doxorrubicina (DOX), utilizada como padrão interno (IS) (10 mg/mL, MeOH:H₂O, 1:1, v/v).

As amostras de plasma foram extraídas por precipitação de proteínas com solvente (ACN) gelada (aprox. -20 °C). Foram adicionados 50 µL de DOX (IS) a 300 µL da amostra em tubo de vidro e agitados em vórtex por 15 segundo. Em seguida foram adicionados 750 µL de ACN gelada e a mistura foi agitada vigorosamente em vórtex por 30 segundos e mantida em repouso em banho de gelo (0 °C) por 30

minutos. As amostras foram centrifugadas por 20 minutos a 3220 *g* em centrífuga Eppendorf 5810R. Foram transferidos 950 μ L do sobrenadante de cada amostra para tubos de vidro limpos e o solvente evaporado completamente em SpeedVac®. A amostra foi reconstituída em 100 μ L de solução de ressuspensão (composição inicial do gradiente) e analisada por LC-MS/MS (ARNOLD, SLACK *et al.*, 2004; WEI, XIAO *et al.*, 2008).

Utilizou-se equipamento HPLC Agilent 1200® composto por autoinjeter, forno de coluna, degaseificador e bomba quaternária. O volume de injeção foi 20 μ L, o autoinjeter foi mantido a 10 °C, e a coluna 40 °C. A separação cromatográfica utilizou a coluna Synergi Polar-RP® (150 x 2.0 mm, 4 μ m) eluída com gradiente composto por fase móvel A (água + acetato de amônio 5 mM + ácido fórmico 0,1%) e metanol (B). A seguir a descrição do gradiente de eluição.

✓ Gradiente da bomba binária

Etapas	Tempo Total (min)	Fluxo (μ L/min)	A (%)	B (%)
0	0	200	30	70
1	3	200	2	98
2	4	200	2	98
3	6	200	30	70
4	6.5	200	30	70

A: água + AcONH₄ 5 mM + AF 0,1%
B: metanol (MeOH)

A detecção por espectrometria de massas utilizou o equipamento QTRAP-3200 Applied Biosystems®/SCIEX com fonte turbo-V. Segue abaixo os parâmetros de fonte e ionização para períodos 1 (0 a 9 minutos) e 2 (9 a 17 minutos). Para análise dos resultados foi utilizado o software Analyst®, versão 1.4.2 (Applied Biosystems/Sciex).

✓ Parâmetros da fonte período 1 (DNR e DOX)

Temperatura	CUR	IS	GS1	GS2	jhe	CAD	CEP
600°C	10.00	5500.00	40.00	10.00	on	medium	26.00

✓ Período 1: Scan MRM, ESI(+), de 0 a 9 minutos

	IPRE (Q1)	I PRO (Q3)	DWELL(msec)	DP	EP	CE	CXP
DNR	528.20	321.30	200	36	3	26	10
DOX (Pi)	544.20	361	200	38	2	36	11

✓ Parâmetros da fonte período 2 (ODNR)

Temperatura	CUR	IS	GS1	GS2	jhe	CAD	CEP
600°C	10.00	-4500.00	40.00	25.00	on	medium	26.00

✓ Período 2: Scan MRM, ESI (-) de 9 a 17 minutos

	IPRE (Q1)	I PRO (Q3)	DWELL(msec)	DP	EP	CEP	CE	CXP
ODNR	790.40	379	200	-57	-11	-22.	-38	-4

A curva de calibração construída para quantificação da DNR empregou a área relativa (analito/IS) e a do ODNR área absoluta. Os pontos de construção das curvas foram (ng/mL): 10, 100, 200, 500; 800; 1000, 1500 e 2000 em duplicata. A concentração das amostras de controle de qualidade utilizadas na corrida analítica foi de 500 ng/mL. As amostras de controle de qualidade (n=9) foram intercaladas com as amostras desconhecidas para verificar o desempenho da corrida analítica. Em virtude da grande quantidade de matriz biológica necessária, utilizou-se plasma humano para o preparo das amostras de curva de calibração e de controle de qualidade.

4.2.11 Avaliação da atividade antitumoral das formulações DNR comercial e LDE-ODNR

A atividade antitumoral das formulações DNR comercial e LDE-ODNR foi avaliado de acordo com o protocolo estabelecido pelo NCI (PLOWMAN, CREAMER *et al.*, 1997). O estudo foi feito em grupos de 10 camundongos C57BL/6J, divididos nos grupos: salina, LDE, DNR e LDE-ODNR (dose 7,5 µmol/kg) e DNR e LDE-ODNR (dose 1,8 µmol/kg). Após doze dias do implante do tumor, salina e as formulações foram administradas via intraperitoneal nos dias 13, 15 e 19. Os tumores de melanoma B16F10 foram medidos com auxílio de paquímetro, a cada dois dias, após o início do tratamento. As medições foram feitas de forma longitudinal e transversal do tumor. A massa do tumor foi estimada a partir do seu diâmetro calculada de acordo com a expressão (GERAN, GREENBERG *et al.*, 1972):

$$\text{massa tumoral (mg)} = \frac{[\text{comprimento (mm)} \times \text{largura (mm)}]^2}{2}$$

Os parâmetros analisados foram peso corpóreo dos animais e a massa tumoral, e sobrevida dos animais durante 60 dias (FREIREICH, GEHAN *et al.*, 1966) e perfil hematológico. Após a morte dos animais, realizou-se estudo de necrópsia, análise do desenvolvimento de metástase e coleta de órgãos e tumor para análise histopatológica e análise de viabilidade celular das células tumorais.

A taxa de redução da massa tumoral foi calculada a partir da média da massa tumoral dos grupos tratados em relação à média do grupo controle, de acordo com padrões do *National Cancer Institute* (NCI) descritos por (PLOWMAN, CREAMER *et al.*, 1997).

4.2.11.1 Avaliação do efeito do tumor melanoma B16F10 sobre o peso corporal dos animais

O peso corpóreo e a massa tumoral dos camundongos foram acompanhados a partir do início do tratamento (12^o dia após o implante do tumor). Estes parâmetros foram avaliados 3 vezes por semana até o 35^o dia após o início do experimento. Do peso corpóreo total foi subtraído o valor da massa tumoral,

distinguindo-se, portanto o peso real do animal. O percentual de redução do peso real dos animais dos diferentes grupos foi estimado através da relação entre o peso real (ao final do experimento – massa corpórea sem tumor) e peso corpóreo total na data do início do tratamento dos animais (12^º dia).

4.2.11.2 Avaliação do efeito da terapia antitumoral sobre o desenvolvimento de metástases

Após o 60^º dia de experimentação, os animais sobreviventes foram sacrificados por deslocamento cervical e em seguida realizou-se necropsia, análise de tumores dorsais, identificação e medidas das lesões internas macroscópicas. Os animais que morreram ao longo do experimento foram imediatamente separados conforme seu grupo de tratamento e congelados. Posteriormente, foram selecionados de forma aleatória para necropsia. O percentual de animais de cada grupo com metástases e a multiplicidade dos nódulos metastáticos foi determinado na necropsia.

4.2.11.3 Perfil hematológico

A análise das mudanças no perfil hematológico dos camundongos C57BCL/6J foi realizada antes e depois do tratamento. As amostras de sangue foram coletadas do plexo submandibular com ponteira metálica. Avaliou-se o número de hemácias, leucócitos e plaquetas. As análises do perfil hematológico foram realizadas com sangue total em equipamento *Hemocounter*® no laboratório de Hematologia Clínica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas USP, em colaboração com o Prof. Dr. Ricardo A. Fock.

4.2.11.4 Análise de viabilidade celular

Durante a necropsia, amostras do tumor melanoma B16F10 foram coletadas e imediatamente congeladas a -20 °C até o momento da análise. A viabilidade celular das células do tumor foi estimada por citometria de fluxo utilizando iodeto de propídio (PI) e rodamina 123 como marcadores. Foram preparados macerados

dos tumores em tampão-fosfato salino. A suspensão celular foi filtrada, a esta adicionada solução de álcool-RNAase e em seguida centrifugada. O sobrenadante foi desprezado e ao *pellet* celular adicionou-se tampão FACSFlow®. As fases do ciclo celular foram analisadas utilizando-se iodeto de propídio (PI) em tampão de lise e para a função das mitocôndrias utilizou-se a sonda rodamina 123. Para cada 100 µL de suspensão celular, utilizou-se 10 µL do reagente PI (0,1% de citrato de sódio, 0,1% TritonX-100 e 1,8 mg/dL de PI), ou 10 µL do reagente rodamina 123 (5 mg/mL). Utilizou-se citômetro FACScalibur® (Becton & Dickinson – BD, San Jose, CA, USA) no canal FL2-A (560-580 nm) para o PI e canal FL1-H (515-530 nm) para a sonda rodamina 123. Foram coletados dados de pelo menos 10.000 eventos para cada amostra utilizando-se o programa CellQuest®. Os dados foram analisados nos programas CellQuest®, FlowJo® e WinMDI® e os resultados reportados como porcentagem de células positivas e intensidade média de fluorescência (IMF) como número médio do canal em escala logarítmica de histograma de 10^0 a 10^4 .

4.2.12 Análise estatística

Os resultados obtidos foram apresentados com média e desvio padrão da média analisados estatisticamente pelo teste *t* de *Student* ou ANOVA, seguida de testes complementares apropriados (*Bonferroni* e *Tukey*). A probabilidade de sobrevida foi analisada com curvas de sobrevivência de *Kaplan-Meir*. As contagens de metástases foram analisadas por testes de contingência. Para as análises estatísticas foram utilizados os programas Graphpad Prism® 5.0 e Origin® 5.0. Os níveis críticos para significância foram de $P < 0,05$.

4.2.13 Aspectos Éticos

O presente projeto foi aprovado pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa – CAPPesq – do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo e do Instituto Butantan, onde os ensaios *in vivo* foram realizados. Ambas as Comissões aprovaram a realização deste projeto de pesquisa. As cartas de aprovação localizam-se na Seção Apêndice.

5. RESULTADOS

5.1 Preparo da nanoemulsão lipídica rica em colesterol (LDE)

A composição final da preparação foi de aproximadamente 55% de fosfolipídio, 23% de éster de colesterol, 20% de triacilglicerol, 1% colesterol livre e 1% polisorbato (Tween 80). Os lipídios apresentaram pureza de pelo menos 99% comprovada por análise de cromatografia em camada delgada (CCD). Ao término do processo de emulsificação, a emulsão foi centrifugada e esterilizada por filtração em membrana e analisada.

5.2 Extração da daunorrubicina (DNR)

A formulação comercial de daunorrubicina (Daunocin®) apresenta-se na forma de líofilo injetável, de cor laranja, composto por 20 mg de cloridrato de daunorrubicina e 100 mg de manitol. A extração líquido-líquido proposta foi eficaz, com rendimento de 98%. A DNR livre ($C_{27}H_{29}NO_{10}$) é um sólido vermelho com peso molecular de 527,52 g/mol. Mostrou-se solúvel em diversos solventes orgânicos como metanol (MeOH), clorofórmio ($CHCl_3$), diclorometano ($CHCl_2$) e tetrahydrofurano (THF) e possui ponto de fusão 208-209°C (MERCK INDEX, 2001).

5.3 Síntese do derivado N-oleil-daunorrubicina (ODNR)

A reação apresentou rendimento de $88\pm 2\%$. O derivado ODNR ($C_{45}H_{61}NO_{11}$) é um sólido vermelho escuro, com peso molecular de 791,966 g/mol, ponto de fusão 104°C. O derivado ODNR apresentou tempo de retenção 6,73 minutos e o DNR 11,8 minutos. O fármaco modificado e purificado foi armazenado em frasco estéril a 4°C até sua incorporação na nanopartícula.

5.4 Incorporação do N-oleil-daunorrubicina à nanoemulsão lipídica (LDE-ODNR)

A análise de incorporação do derivado ODNR à nanopartícula foi monitorada por HPLC. Mantendo a proporção fármaco:lipídio (1:10, m/m) a taxa de incorporação do derivado ODNR à LDE foi de $93\pm 2\%$.

5.5 Avaliação da estabilidade das preparações LDE e LDE-ODNR

Para a avaliação da estabilidade das preparações LDE e LDE-ODNR foram realizados os seguintes testes: tamanho de partícula; polidispersidade, potencial *Zeta*; índice de lipoperoxidação (LPO); pH e incorporação do fármaco modificado à LDE. As formulações foram acompanhadas e os testes realizados por um período de 180 dias como mostram as figuras abaixo.

O tamanho das partículas de LDE e LDE-ODNR tendem a aumentar ao longo do período. Para a LDE, as partículas foram obtidas com um diâmetro médio de $48 \pm 1,2$ nm mantiveram-se estáveis por cerca de 90 dias. Observou-se que a LDE-ODNR tendeu a intumescer atingindo um tamanho médio de $65 \pm 2,8$ nm como mostra a Figura 4. Do início ao fim do período de observação, o índice de polidispersidade foi baixo, variando entre $0,235 \pm 0,007$ para LDE e $0,174 \pm 0,021$ para LDE-ODNR, sugerindo que ambos LDE e LDE-ODNR são feitas predominantemente monodispersas e esta característica foi mantida por mais de 180 dias. O potencial zeta para LDE e LDE-ODNR foi $-25 \pm 1,4$ mV e $-29 \pm 1,5$, respectivamente, durante o período de observação (Figura 5). Nos testes de lipoperoxidação, realizados pelo método de TBARS, houve um aumento do índice a partir do dia 30 para a LDE, o que não ocorreu para a preparação LDE-ODNR, mantendo-se estável (Figura 6). Os valores de pH não tiveram mudanças significativas durante o período, mantendo-se entre 7,6 e 7,8. As preparações mantiveram o aspecto homogêneo e translúcido desde o dia de preparo até o final do período de observação.

Tabela 1 - Caracterização da LDE e LDE-ODNR quanto ao tamanho de partícula, polidispersidade, potencial zeta, lipoperoxidação, pH e incorporação ODNR à LDE durante 180 dias

	Tamanho partícula (nm)		Polidispersidade		Potencial Zeta (mV)	
	Ti	Tf	Ti	Tf	Ti	Tf
LDE	48 ±1,2	55,65±1,2	0,226±0,007	0,235±0,015	-21,1± 1,4	-28,42±1,4
LDE-ODNR	48,6±1,1	64,7±2,8	0,183±0,05	0,174±0,08	-21,25±1,2	-35,5±2
	LPO (nmol MDA/mL)		pH		Incorporação ODNR	
	Ti	Tf	Ti	Tf	Ti	Tf
LDE	19,52±1,4	50,6±1,4	7,6±0,08	7,6±0,06	--	--
LDE-ODNR	18,45±1,1	24,9±2,2	7,8±0,08	7,8±0,06	5,7±0,19	5,1±0,12

Ti – tempo inicial (dia 0)
Tf – tempo final (dia 180)

Figura 4: Tamanho das partículas (nm) das preparações LDE-ODNR e LDE durante 180 dias

Figura 5: Potencial zeta (mV) das preparações LDE-ODNR e LDE durante 180 dias

Figura 6: Lipoperoxidação (nmol MDA/mL) das preparações LDE-ODNR e LDE durante 180 dias

5.6 Determinação da citotoxicidade

Para avaliação da citotoxicidade da preparação LDE-ODNR foi empregado o ensaio de viabilidade celular pela técnica de exclusão do azul tripan e pela técnica de redução do brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazólio) (MTT) (HAYON, DVILANSKY *et al.*, 2003; WANG, HENNING *et al.*, 2010) utilizando-se células de melanoma B16F10 e fibroblastos NIH3T3 . As concentrações utilizadas de DNR comercial e LDE-ODNR variaram de 0,177 a 1,243mM e 0,315 2,209 mM, respectivamente. O IC_{50} da LDE-ODNR foi de $4,26 \times 10^{-4}$ M enquanto que o IC_{50} da DNR comercial foi aproximadamente $0,998 \times 10^{-4}$ M. Esse resultado indica que LDE-ODNR apresenta ação citotóxica aproximadamente 5 vezes menor em relação a formulação comercial. A seguir, seguem as imagens das células de melanoma após 24 e 48 horas de tratamento.

Figura 7: Células de melanoma B16F10 após 24 horas de cultura na presença dos tratamentos em estudo (A) Controle, (B) LDE (10% v/v), (C) DNR 400 μ M e (D) LDE-ODNR 600 μ M – aumento de (20x)

Figura 8: Células de melanoma B16F10 após 48 horas de cultura na presença dos tratamentos em estudo (A) Controle, (B) LDE (10% v/v), (C) DNR 400 μ M e (D) LDE-ODNR 600 μ M – aumento de (20x)

Figura 9: Citotoxicidade da preparação LDE-ODNR em cultura de células NIH3T3 e B16F10. Valores expressos em porcentagem de células viáveis (não coradas), n=3

5.7 Avaliação da toxicidade aguda *in vivo*

A avaliação da toxicidade inerente às formulações foi feita em grupos de 4 camundongos Balb-c sem tumor e os os animais foram observados diariamente durante 14 dias. A tabela 2 mostra a relação dose administrada e mortes dos animais após a última dose de tratamento com DNR e LDE-ODNR. Na tabela 3 os dados apresentados para DMT foram determinados segundo critério estabelecido por (ECOBICHON e COMEAU, 1973). Pode-se afirmar que a toxicidade resultante do tratamento LDE-ODNR foi significativamente menor quando comparada a DNR comercial. A LDE-ODNR teve DMT 65 vezes menor e DL₅₀ 48 vezes menor comparada a DNR.

Tabela 2 – Relação dose administrada e mortes após administração de única dose de DNR na sua forma comercial e LDE-ODNR (n=3).

DNR (comercial)		LDE-ODNR	
Dose ($\mu\text{mol/kg}$)	Mortes	Dose ($\mu\text{mol/kg}$)	mortes
2,3	0	150	0
4,6	1	300	2
9,4	2	450	2
18,8	2	525	3
28,2	3	600	3

Tabela 3 – Valores referentes a DMT, DL_{10} e DL_{50} após administração de única dose intraperitoneal de DNR na sua forma comercial e LDE-ODNR

	DNR	LDE-ODNR
DMT	2,3 $\mu\text{mol/kg}$	150 $\mu\text{mol/kg}$
DL_{10}	2,3 – 4,6 $\mu\text{mol/kg}$	300 - 450 $\mu\text{mol/kg}$
DL_{50}	$\geq 9,4$ $\mu\text{mol/kg}$	≥ 450 $\mu\text{mol/kg}$

continua

Figura 10: Variação do peso dos animais (g) registrados na determinação da DMT, porcentagem de ganho e perda de peso em 14 dias de observação

5.8 Avaliação comparativa da toxicidade *in vivo* das preparações DNR comercial e LDE-ODNR

Em cada grupo do estudo avaliou-se o peso inicial e final dos animais, perfil hematológico (hemácias $10^6/\text{mm}^3$, leucócitos $10^3/\text{mm}^3$ e plaquetas $10^3/\text{mm}^3$) e perfil bioquímico-enzimático.

Os resultados do perfil bioquímico-enzimático não foram apresentados já que os testes foram realizados apenas uma vez devido à pequena quantidade de matriz biológica disponível, não sendo possível realizar qualquer análise estatística. Em análise preliminar, não foi observada qualquer alteração nos níveis de creatinina, TGO e TGP entre os grupos, no entanto, observou-se tendência a aumento de CK-MB no grupo DNR comercial.

Foi observada significativa perda de peso e sinais de caquexia para os animais tratados com DNR comercial comparado aos animais tratados com LDE-ODNR apresentadas nas Figuras 11 e 12.

Figura 11: Variação do peso dos animais dos grupos salina, LDE, DNR e LDE-ODNR. Os números acima das barras indicam porcentagem de ganho ou perda de peso em 30 dias de observação. Resultados expressos em média $\pm$ desvio padrão

Figura 12: Fotos ilustrativas do aspecto físico dos animais tratados com LDE-ODNR (a) e DNR (b)

Na avaliação do perfil hematológico, foi observada evidente queda no número de hemácias dos animais tratados com DNR, em especial na avaliação de sete dias após a administração da última dose ($P<0,001$), o que não ocorreu para os animais tratados com LDE-ODNR (Figura 13). Na análise de leucócitos, foi observada acentuada queda no grupo tratado com DNR logo após a segunda dose do tratamento ($P<0,001$), o que não ocorreu com os animais tratados com LDE-ODNR. Ao 7º dia de análise, registrou-se alta contagem de leucócitos para todos os grupos em estudo. Nas análises seguintes, as contagens foram similares em todos os grupos (Figura 14). Na avaliação de plaquetas (Figura 15), observou-se recuperação dos animais e aumento no número de plaquetas para todos os grupos em estudo. O grupo tratado com DNR comercial apresentou contagem baixa de plaquetas desde o início do experimento, não sendo possível atribuir essa queda ao tratamento.

Figura 13: Contagem de hemácias nos grupos salina, LDE, DNR, LDE-ODNR ao longo do período experimental. Valor de referência: $8,34 \pm 0,65$

Figura 14: Contagem de leucócitos nos grupos salina, LDE, DNR, LDE-ODNR ao longo do período experimental. Valor de referência: $5,9 \pm 0,7$

Figura 15: Contagem de plaquetas nos grupos salina, LDE, DNR, LDE-ODNR ao longo do período experimental. Valor de referência: $560,5 \pm 65,7$

5.9 Implante de células de melanoma B16F10 em camundongos C57BL/6J

As células de melanoma murino B16F10 foram injetadas no dorso os animais, e em média 10 dias após a inoculação os tumores puderam ser visualizados macroscopicamente. A figura 16 mostra o momento da inoculação (Fig 16 a) e o tumor macroscopicamente visível após 10 dias de inoculação (Fig 16 b).

Figura 16: Ilustração da técnica de implante de tumor melanoma murino B16F10 (a) e tumor após 10 dias de inoculação (b)

5.10 Estudo farmacocinético da LDE-ODNR em camundongos – Cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas (LC-MS/MS)

Para a análise das amostras de plasma, de concentração desconhecida, foi realizado primeiramente o desenvolvimento do método bioanalítico por LC-MS/MS baseado nas normas da RE 899 (ANVISA, 2003).

5.10.1 Desenvolvimento do método bioanalítico LC-MS/MS

Para desenvolvimento do método bioanalítico foi realizada padronização para detecção dos compostos (DNR, DOX e ODNR) em solução, por infusão direta. A Figura 17 mostra as estruturas e as razões massa/carga (m/z) dos compostos em estudo. Os espectros a seguir (Figuras 18, 19 e 20) mostram a fragmentação e a formação dos íons produtos dos compostos em análise.

Oleato daunorrubicina (ODNR) Analito 2
Fórmula: $C_{45}H_{61}NO_{11}$ Massa exata: 791,4 g/mol   Peso molecular: 792 g/mol
Doxorrubicina (padrão interno)
Fórmula: $C_{27}H_{29}NO_{11}$ Massa exata: 543,2 g/mol   Peso molecular: 543,5 g/mol

Figura 17: Estrutura química, massa exata, peso molecular dos compostos: DNR (analito 1); ODNR (analito 2) e DOX (padrão interno)

Figura 18: Espectro de fragmentação DNR. Destaque para a formação do íon de produto $m/z=321,2$

Figura 19: Espectro de fragmentação ODNR. Destaque para a formação do íon de produto $m/z=379,2$

Figura 20: Espectro de fragmentação DOX. Destaque para a formação do íon de produto m/z= 361,1

Para a obtenção de uma boa cromatografia, foram testadas as seguintes condições cromatográficas para o desenvolvimento do método:

Tabela 4: Parâmetros utilizados para testes das condições cromatográficas

Parâmetros	Descrição	
Colunas	<u>Phenomenex:</u>	<u>Supelco:</u>
	*Synergi Polar-RP	Discovery HS PEG
	(150 x 2.0 mm, 4 µm)	(100 x 2.1 mm, 3 µm)
	Synergi MAX-RP	Discovery HS PEG
	(150 x 2.0 mm, 4 µm)	(150 x 4.6 mm, 5 µm)
	Luna C18	
	(150 x 2.0 mm, 3 µm)	
Fase Móvel	Combinações variadas de ACN:MeOH:H ₂ O e aditivos (ácido fórmico e acetato de amônio) em modo isocrático e gradiente	
Temperatura de coluna	30 a 45°C	
*coluna utilizada nas análises posteriores		

Foram feitos testes com colunas de características diferentes, sejam no comprimento, diâmetro, compactação ou revestimento. O uso de variadas proporções de solventes como metanol (MeOH), acetonitrila (ACN), fase aquosa e aditivos em gradiente foi primordial para a busca da melhor fase móvel. Para cada analito analisado foram encontrados os seguintes tempos médios de retenção: DNR (6,7 minutos) e DOX (4,9 minutos) (Figura 21); e ODNR (11,8 minutos) (Figura 22).

Figura 21: Cromatograma de análise: DNR e DOX

Figura 22: Cromatograma de análise: ODNR

Encontradas as condições iniciais de cromatografia favoráveis, realizou-se o teste de sensibilidade (detecção) avaliando as condições de ionização no modo de monitoramento de reação múltipla (MRM) com ionização positiva e negativa. O ODNR foi analisado em modo negativo (ESI-) por não apresentar sinal significativo de ionização em modo positivo, devido à funcionalização oleato ocorrer no grupo amina da DNR e comprometer a basicidade da molécula. A DNR e a DOX apresentam maior sensibilidade quando analisados em modo positivo (ESI+). A mudança de modo de ionização dos períodos 1 (0 a 9 minutos) e 2 (9 a 17 minutos) de positivo (ESI+) para negativo (ESI-) foi importante para a sensibilidade do método. A Figura 23 mostra cromatograma de uma corrida feita em ESI+ (0 a 9 minutos) e em ESI- (9 a 17 minutos), elucidando que o método é sensível em diferentes modos de ionização. Foram monitoradas as transições 528.2/321.2; 542.2/361.1 e 790.6/379.2 para a DNR, a DOX (IS) e ODNR, respectivamente conforme nas Figuras 18 a 20.

Figura 23 Cromatograma dos compostos DOX (IS), DNR e ODNR e seus tempos médio de retenção (TR): 4,9, 6.7 e 11,8 minutos, respectivamente. Corrida realizada em ESI+ (0 a 9 minutos) e em ESI- (9 a 17 minutos)

A partir dos resultados obtidos nos testes de sensibilidade foram estabelecidas as condições finais do método multi-analítico conforme tabela abaixo.

Tabela 5: Parâmetros otimizados para o método multi-analítico

Características	Descrição	Características	Descrição
Sistema HPLC	Agilent 1200	Espectrômetro de Massas	Sciex/Applied Biosystems 3200 Q-Trap
Coluna de fase reversa	Synergi Polar-RP (150x2.0 mm 4 µm)	Fonte	electrospray Turbo-V
Temperatura forno da coluna	40°C	Temperatura da fonte	550 °C
Fluxo	200 µL.min	Modo de ionização	Período 1: ESI (+)
Volume de injeção	20 µL	Temperatura autoinjeter	Período 2: ESI (-)
Fase Móvel	*A:MeOH	Duração da corrida	10°C
		Volume de injeção	17 minutos
			20 µL

*Fase Móvel: A:MeOH. A = água + AcONH₄ 5 mM + AF 0,1%

O método desenvolvido foi eficiente, específico e sensível na detecção dos compostos. Não houve detecção cruzada entre os analitos e nenhuma interferência significativa quando uma solução com os três compostos foi analisada. Em nenhuma das análises realizadas (solução ou matriz biológica) houve aparecimento de picos fantasmas nos TR característicos de cada analito.

Foram testadas várias técnicas de extração com diferentes aditivos e mistura de solventes até a escolha final por precipitação de proteínas com ACN gelada. O primeiro lote de testes de extração foi feito em tubos plásticos tipo eppendorf®, no entanto, foi observada alta variação intralote e os materiais plásticos foram substituídos por vidro e as análises refeitas.

A tabela 6 mostra os resultados para alguns testes de extração em duplicata para DNR e ODNR. Observou-se melhor extração para o ensaio realizado com ACN, com boa relação de amostra extraída e baixo coeficiente de variação (CV%).

Tabela 6: Estudo preliminar para protocolos de extração

Analito	Réplica	MÉTODO DE EXTRAÇÃO				
		ACN	Acetona/MeOH (1:1) + ZnSO ₄	Acetona + ZnSO ₄	Acetona	THF/MeOH (1:1)
		ÁREA (AMOSTRA EXTRAÍDA)				
DNR	1	64800	12500	31600	25200	25700
	2	67800	14200	32200	21400	29900
	média	66300	13350	31900	23300	27800
	CV (%)	3.2	9.0	1.3	11.5	10.7
ODNR	1	18600	5140	1330	6460	1080
	2	20300	6300	536	5830	1750
	média	19450	5720	933	6145	1415
	CV (%)	6.2	14.3	60.2	7.2	33.5

Para garantir o bom andamento do método também foi avaliada a estabilidade das amostras no autoinjeter e das soluções estoque e de trabalho por um período de 90 dias. Não foi observada nenhuma variação significativa na estabilidade das amostras de autoinjeter. Os testes de estabilidade para as soluções estoque e de trabalho apresentaram variação na concentração da solução de DOX (IS), o que exigiu preparo de soluções novas a cada etapa de trabalho.

5.10.2 Análise de amostras de plasma com concentrações desconhecidas. Estudo preliminar da farmacocinética da LDE-ODNR em camundongos portadores de tumor melanoma B16F10 por LC-MS/MS

A partir do método desenvolvido, partiu-se para a quantificação das amostras com concentrações desconhecidas.

As curvas de calibração dos dois compostos (DNR e ODNR) foram obtidas em regressão linear, com $r = 0,9969$ para o ODNR e $r = 0,9981$ para a DNR. Ambas as curvas cumprem os critérios de aceitação da RE 899 (ANVISA, 2003). Os critérios obedecidos foram: $r \geq 0,98$, desvio $\leq 20\%$ em relação a concentração nominal para o limite inferior de quantificação (LIQ), desvio $\leq 15\%$ em relação a concentração nominal para outras concentrações da curva e a pelo menos seis níveis de concentração. Seguem abaixo os gráficos e tabelas das curvas de calibração do derivado ODNR (Figura 24 e tabela 7) e da DNR (Figura 25 e tabela 8).

Figura 24 Curva de calibração do derivado ODNR. $r = 0,9969$

Tabela 7: Dados de validação para corrida analítica para quantificação das amostras em plasma. Curva da calibração para ODNR

ODNR (Coef. Correl.: 0.9969)		
Conc. Nominal (ng/mL)	Conc. Calculada (ng/mL)	Exatidão %
10	9.97	99.7
10	9.97	99.7
100	65.7*	65.7
100	96.8	96.8
200	215	108.0
200	217	108.0
500	522	104.0
500	561	112.0
800	739	92.4
800	592*	73.9
1000	1010	101.0
1000	952	95.2
1500	1460	97.1
1500	1180*	78.7
2000	2490*	124.0
2000	1720	86.0
Linear (Ponderada $1/x^2$)		$Y = aX + b$
a (slope)		121
b (intercepto)		-556
Parâmetro de medida		área absoluta
* = ponto excluído (desvio >15%)		

Figura 25: Curva de calibração DNR. $r = 0,9981$

Tabela 8: Dados de validação para corrida analítica para quantificação das amostras em plasma. Curva da calibração para DNR

DNR (Coef. Correl.: 0.9981)		
Conc. Nominal (ng/mL)	Conc. Calculada (ng/mL)	Exatidão %
10	9.72	97.2
10	10.2	102.0
100	100	100.0
100	102	102.0
200	199	99.3
200	210	105.0
500	605*	121.0
500	562	112.0
800	784	98.1
800	719	89.8
1000	979	97.9
1000	1040	104.0
1500	1390	92.6
1500	1490	99.1
2000	2140	107.0
2000	1860	93.2
Linear (Ponderada $1/x^2$)		$Y = aX + b$
a (slope)		0.000151
b (intercepto)		0.00597
Parâmetro de medida		área relativa (analito/PI)
* = ponto excluído (desvio >15%)		

Durante a corrida analítica, as amostras desconhecidas foram intercaladas com amostras do controle de qualidade para avaliação da confiabilidade da análise. A corrida apresentou desempenho satisfatório obedecendo aos critérios de aprovação de corrida analítica conforme a ANVISA (ANVISA, 2003). Os critérios para os controles de qualidade foram: coeficiente de variação da concentração média $\leq 15\%$, exatidão individual e da concentração média entre 85 e 115% e pelo menos 2/3 (67% ou 4 de 6) dos controles aprovados pelos critérios de precisão e exatidão. A seguir, as Tabelas 9 e 10 mostram a análise estatística dos controles de qualidade para ODNR e DNR, respectivamente.

Tabela 9: Dados dos controles de qualidade para ODNR (CQ 550 ng/mL)

ODNR - Controles de Qualidade		
Conc. Nominal (ng/mL)	Conc. Calculada (ng/mL)	Exatidão %
500	449	89.8
	344*	68.8
	296*	59.2
	473	94.5
	418	83.5
	531	106.0
	531	106.0
	483	96.7
	572	114.0
Média (ng/mL)		494
Precisão (CV%)		10.8
Exatidão (%)		98.8
CQ aprovados (%)		77.8%

* = ponto excluído (desvio >15%)

Tabela 10: Dados dos controles de qualidade DNR (CQ 550 ng/mL)

DNR - Controles de Qualidade		
Conc. Nominal (ng/mL)	Conc. Calculada (ng/mL)	Exatidão %
500	539	108.0
	581*	116.0
	498	99.7
	466	93.2
	597	119.0
	544	109.0
	531	106.0
	545	109.0
	546	109.0
Média (ng/mL)		533
Precisão (CV%)		7.2
Exatidão (%)		106.7
CQ aprovados (%)		88.9%

* = ponto excluído (desvio >15%)

O gráfico abaixo (Figura 26) mostra a curva gerada na análise das amostras de plasma dos animais coletadas nos intervalos: 15 e 30 minutos, 1, 2, 6, 8, 12, 24, 48 e 72 horas, preparadas, extraídas e analisadas conforme método multianalítico desenvolvido previamente. As amostras nos tempos 15, 30, 45 minutos, 1 e 2 horas foram diluídas 200 vezes e as amostras 6 e 12 horas diluídas 10 vezes para quantificação do ODNR. Essa diluição foi necessária visto que as amostras apresentavam concentração maior que a faixa da curva de calibração.

Figura 26: Curvas concentração ODNR e DNR em 15, 30 e 45 minutos, 1, 2, 6, 8, 12, 24, 48 e 72 horas

As curvas geradas na análise da concentração das amostras em relação ao tempo mostram comportamento esperado para o ODNR. Visto que a preparação foi administrada via endovenosa, o pico de concentração plasmática é o primeiro ponto de coleta. A queda na concentração do ODNR coincide com o aumento na concentração da DNR, o que está vinculado à metabolização do derivado ODNR e formação da DNR livre. Os dados gerados nesse estudo estão sendo trabalhados para a aquisição dos parâmetros farmacocinéticos.

5.11 Avaliação da atividade antitumoral das formulações DNR e LDE-ODNR

5.11.1 Massa tumoral e sobrevida dos animais

As figuras 27 e 28 mostram que o tratamento com a preparação LDE-ODNR (7,5 $\mu\text{mol/kg}$) levou a uma redução de $35,8 \pm 2\%$ ($P < 0,001$) e $59 \pm 1,6\%$ ($P < 0,001$) do tumor, quando comparado ao grupo DNR comercial e ao grupo salina, respectivamente, ao 26° dia de experimento. Ao 35° dia, houve redução de $78 \pm 2\%$ do tumor do grupo tratado com LDE-ODNR na maior dose ($P < 0,001$) em comparação ao grupo salina e aumento de $23 \pm 1\%$ do tumor do grupo tratado com LDE-ODNR na menor dose (1,8 $\mu\text{mol/kg}$) comparado ao grupo LDE-ODNR na dose 7,5 $\mu\text{mol/kg}$.

Figura 27: Massa tumoral dos grupos salina (■), DNR 7,5 µmol/kg (▲), LDE-ODNR 7,5 µmol/kg (*) (figura a), salina (■), DNR (1,8 µmol/kg) (▼) e LDE-ODNR (1,8 µmol/kg) (►)(figura b) em 35 dias. Destaques (↓) para 26°, 30° e 35° dias, últimos dias de registro de medidas dos grupos DNR (7,5 µmol/kg), DNR (1,8 µmol/kg) LDE-ODNR (7,5 µmol/kg) e LDE-ODNR (1 µmol/kg), respectivamente. Resultados expressos em média ± desvio padrão

Figura 28: Evolução da massa tumoral para os grupos salina, DNR(a) 7,5 $\mu\text{mol/kg}$, LDE-ODNR(a) 7,5 $\mu\text{mol/kg}$, DNR(b) (1,8 $\mu\text{mol/kg}$) e LDE-ODNR(b) (1,8 $\mu\text{mol/kg}$) do 23 ao 35^o dias de observação. Destaques: 26^o, 30^o e 35^o dias para redução do tumor ($\downarrow$) e aumento de tumor ($\uparrow$). Resultados expressos em média $\pm$ desvio padrão

Os grupos DNR e LDE-ODNR em menor dose (1,8 $\mu\text{mol/kg}$) apresentaram redução de $57 \pm 1,4\%$ da massa do tumor, quando comparados ao grupo salina, mas não houve diferença significativa quando comparados entre si no 30^o dia, último dia de medidas registradas para os animais do grupo DNR em menor dose. Já ao 35^o dia, o grupo LDE-ODNR (1,8 $\mu\text{mol/kg}$) apresentou menor massa tumoral comparado ao grupo salina ($P < 0,001$) e ao grupo LDE-ODNR 7,5 $\mu\text{mol/kg}$ ($P < 0,01$). Nota-se retomada na evolução do tumor do grupo LDE-ODNR 1 mg/kg nesta medida final.

As Figuras 29, 30 e 31 mostram as curvas de Kaplan-Meier para probabilidade de sobrevida dos animais tratados com salina, DNR comercial e LDE-ODNR observados por período de 60 dias. Houve morte de 100% dos animais que receberam tratamento com a DNR comercial (ambas as doses) antes mesmo do grupo controle salina.

Figura 29: Probabilidade de sobrevivência dos animais na avaliação atividade antitumoral em resposta aos tratamentos com salina (●), LDE (○), DNR 7,5 µmol/kg (■), DNR 1,8 µmol/kg (□), LDE-ODNR 7,5 µmol/kg (▲) e LDE-ODNR 1,8 µmol/kg (△)

Todos os animais pertencentes ao grupo salina morreram até o 35º dia de observação. Os animais dos grupos tratados com DNR comercial morreram Todos os animais tratados com DNR na dose mais baixa (1,8 mol/kg) morreram até o 34 dia, já os tratados com a maior dose morreram até o 30 dia. A partir do 35º dia permaneceram vivos apenas os animais que receberam tratamento LDE-ODNR, 40% para o grupo LDE-ODNR 7,5 µmol/kg e 11% para o grupo LDE-ODNR 1,8 µmol/kg. Ao final do período de 60 dias de observação, havia 20% dos animais tratados com LDE-ODNR 7,5 µmol/kg vivos ($P < 0,01$).

Figura 30: Probabilidade de sobrevivência dos animais na avaliação atividade antitumoral em resposta aos tratamentos salina (●), DNR (■) e LDE-ODNR (▲) 7,5 µmol/kg

Figura 31: Probabilidade de sobrevivência dos animais na avaliação atividade antitumoral em resposta aos tratamentos salina(●), DNR (■) e LDE-ODNR (▲) 1,8 µmol/kg

As imagens a seguir retratam a evolução dos tumores no decorrer do tratamento sugerido no protocolo.

Figura 32: Imagens representativas da evolução da massa tumoral (melanoma murino B16F10) dos grupos controles salina e LDE

Figura 33: Imagens representativas da evolução da massa tumoral (melanoma murino B16F10) dos grupos tratamento DNR e LDE-ODNR 7,5 $\mu\text{mol/kg}$ ($\rightarrow$ área de necrose)

Figura 34. Imagens representativas da evolução da massa tumoral (melanoma murino B16F10) dos grupos tratamento DNR LDE-ODNR 1,8 $\mu\text{mol/kg}$ ($\rightarrow$ área de necrose)

5.11.2 Avaliação do efeito do tumor melanoma B16F10 sobre o peso

O peso corpóreo e a massa tumoral dos camundongos foram acompanhados a partir da data de início do tratamento do tumor implantando (12° dia). Do peso corpóreo total foi subtraído o valor da massa tumoral resultando no valor do peso real dos animais (g). Esta variação no peso foi demonstrada entre o primeiro (13°) e o 26° dias de tratamento, já que é a última coleta completa dos dados antes da morte de 100% dos animais do grupo DNR comercial ($7,5 \mu\text{mol/kg}$). A figura 35 e a tabela 11 mostram as diferenças de ganho e perda de peso entre os tratamentos com DNR comercial e LDE-ODNR em ambas as doses, comparados aos grupos salina, e LDE. Os animais do grupo salina, sem tratamento perderam cerca de $24 \pm 1,6\%$ de seu peso inicial, resultante da caquexia induzida pelo tumor. Os animais tratados com LDE-ODNR, em ambas as doses, apresentaram ganho de peso ao final do período de observação, $22 \pm 1\%$ para maior dose e $8 \pm 1\%$ para a menor dose ($P < 0,001$). Os animais do grupo DNR comercial apresentaram perda de peso ao final do período, $19 \pm 1\%$ ($P < 0,001$) para maior dose e $15 \pm 1\%$ ($P < 0,01$) para a menor

dose. Quando comparados, os dois tratamentos (DNR e LDO-ODNR) resultaram em diferença significativa ($P < 0,001$). Os animais tratados com DNR comercial não apresentaram diferença de peso no final de período de observação (*ns*). A tabela representativa das diferenças estatísticas entre os grupos está apresentada na seção 8, Anexo B.

Figura 35: Variação do peso dos animais entre 13º (inicial) e 26º dias (final) dos grupos salina, LDE, DNR e LDE-ODNR (7,5 µmol/kg), DNR e LDE-ODNR (1,8 µmol/kg). O número em cima das barras representa a porcentagem referente à variação de peso no mesmo grupo (peso inicial/peso final). Resultados expressos em média $\pm$ desvio padrão

Tabela 11 - Peso dos animais no 13º dia (inicial) e no 26º dia (final)

	Peso Inicial (g)	Peso Final (g)
Salina	24,79	18,7
LDE	20,78	21,5
DNR4	21,1	17,02
DNR1	20,34	17,3
LDE-ODNR6	21,5	26,3
LDE-ODNR1	23,17	25,1

5.11.3 Avaliação do efeito das formulações sobre o desenvolvimento de metástases

A figura 36 destaca o percentual de camundongos que apresentaram nódulos metastáticos observados durante a necropsia. Os animais tratados com DNR comercial apresentaram nódulos metastáticos em ambas a doses, em 82% dos animais tratados com a maior dose (7,5 $\mu\text{mol/kg}$), e em 80% com a menor dose (1,8 $\mu\text{mol/kg}$). Já os animais do grupo LDE-ODNR 7,5 $\mu\text{mol/kg}$ apresentaram metástase em apenas 30% dos animais na sua maior dose, com diferença significativa quando comparados ao grupo controle salina e ao tratamento DNR comercial ($P < 0,01$). Na menor dose (1,8 $\mu\text{mol/kg}$) foram encontradas metástases em 60% dos animais. Todos os animais do grupo controle apresentaram nódulos de metástase. As figuras 37a 41 apresentam registros fotográficos do estudo de necrópsia realizado.

Figura 36: Percentual de animais portadores nódulos metastáticos encontrados durante a necropsia nos animais dos grupos salina, LDE; DNR e LDE-ODNR (7,5 $\mu\text{mol/kg}$) e DNR e LDE-ODNR (1,8 $\mu\text{mol/kg}$). Resultados expressos em média $\pm$ desvio padrão

Figura 37: Fotos ilustrativas do estudo de necrópsia nos grupos salina e LDE. (a) tumor com grande área hemorrágica; (b) tumor invasivo, encapsulado, deslocamento da coluna cervical do animal; (c) tumor; (d) linfonodo de drenagem; (e) lobo pulmonar direito metastático; (f) fígado. (→) área de metástase

Figura 38: Imagem ilustrativas do estudo de necrópsia para o grupo DNR 7,5 $\mu\text{mol/kg}$ ($\rightarrow$) vaso em direção ao tumor, ($\rightarrow$) pontos de metástase, tumor invasivo, deslocamento do rim direito do animal; ($\rightarrow$) vascularização ao redor do tumor, ($\rightarrow$) deslocamento da coluna cervical do animal; ($\rightarrow$) inóculo; ($\rightarrow$) metástase

LDE-ODNR 7,5 $\mu\text{mol/kg}$

Figura 39: Imagens ilustrativas do estudo de necrópsia para o grupo LDE-ODNR 7,5 $\mu\text{mol/kg}$ (a) tumor localizado apenas na região do inoculo, ($\rightarrow$) região de hemorragia circundando a área do tumor; (b) tumor externalizado, ($\rightarrow$) área de necrose, (c) região dorsal muito pouco vascularizada; (d) ($\rightarrow$) vaso na região do tumor; (e) ($\rightarrow$) linfonodo de drenagem

Figura 40: Imagens ilustrativas do estudo de necrópsia para grupo DNR 1,8 $\mu\text{mol/kg}$ (a) (→) metástase na região do abdômen e no baço; (b) (→) tumor invasivo, englobou e deslocou o rim direito do animal, rim totalmente metastisado; (c) pulmão metastisado

Figura 41: Imagens ilustrativas do estudo de necrópsia para o grupo LDE-ODNR 1,8 $\mu\text{mol/kg}$ (a) tumor encapsulado, linfonodo sentinela metastático; (b) (→) inóculo, tumor vascularizado e região hemorrágica; (c) tumor avançado, deslocamento da coluna cervical do animal

5.11.4 Avaliação do perfil hematológico

As coletas para análise do perfil hematológico foram feitas um dias antes do início do tratamento (basal – um dia antes do início tratamento), 24 horas após cada dose (14^o, 16^o e 20^o dias) e no 35^o dia para acompanhamento. Foram realizadas contagens do número de leucócitos, hemácias e plaquetas. As análises do perfil hematológico estão representadas nas figuras 42 a 44.

Como mostra Figura 42, os animais do grupo salina apresentaram queda significativa no número de hemácias resultante do avanço do tumor. No entanto, para os animais tratados com a maior dose de LDE-ODNR (7,5 $\mu\text{mol/kg}$) houve a menor queda na contagem de hemácias em comparação com todos os tratamentos ($P<0,001$). Quanto ao tratamento com DNR comercial, a dose mais baixa (1,8 $\mu\text{mol/kg}$) resultou em diminuição no número de hemácias semelhante ao grupo salina, porém, o tratamento de maior dose (7,5 $\mu\text{mol/kg}$) provocou a maior queda dos glóbulos vermelhos entre todos os tratamentos ($P<0,01$).

Figura 42 Número de hemácias dos animais dos grupos salina, LDE, DNR e LDE-ODNR (7,5 $\mu\text{mol/kg}$); DNR e LDE-ODNR (1,8 $\mu\text{mol/kg}$). Valor de referência: $8,8 \pm 1,6$

A Figura 43 mostra a contagem de leucócitos para os animais tratados com salina, DNR e LDE-ODNR. Ao final do experimento, apenas os animais tratados com a maior dose de DNR comercial (7,5 $\mu\text{mol/kg}$) apresentaram acentuada queda no número de leucócitos. Nas duas últimas coletas, foi observada recuperação dos animais tratados com a LDE-ODNR em ambas as doses.

Figura 43: Número de leucócitos dos animais dos grupos salina, LDE, DNR e LDE-ODNR (7,5 $\mu\text{mol/kg}$); DNR e LDE-ODNR (1,8 $\mu\text{mol/kg}$). Valor de referência: $9,8 \pm 1,7$

Na avaliação das plaquetas, o grupo salina apresentou significativo aumento ($P < 0,001$) no número de plaquetas quando comparado à todos os grupos em todas as coletas. Este aumento está diretamente relacionado ao avanço do tumor (Figura 44). Observa-se indícios da retomada do crescimento do tumor para o grupo tratado com LDE-ODNR na menor dose (1,8 $\mu\text{mol/kg}$).

Figura 44: Número de plaquetas dos animais dos grupos salina, LDE, DNR e LDE-ODNR (7,5 µmol/kg); DNR e LDE-ODNR (1,8 µmol/kg). Valor de referência: 560 ± 102

5.11.5 Análise de viabilidade celular

A viabilidade celular das células do tumor foi estimada por citometria de fluxo pela análise de dois parâmetros, utilizando iodeto de propídio (PI) (Figuras 45 e 46) e rodamina 123 (R 123) (Figuras 47 e 48) como marcadores.

O marcador PI, utilizado nas análises de ciclo celular, mostrou que o grupo tratado com a menor dose LDE-ODNR (1,8 µmol/kg) apresentou de $31 \pm 2\%$ das células com DNA fragmentado, enquanto o grupo tratado com a menor dose de DNR comercial $24 \pm 3\%$. No entanto, os animais submetidos ao tratamento com a maior dose de LDE-ODNR (7,5 µmol/kg) apresentaram $48 \pm 2\%$ de suas células com DNA fragmentado, comparado a $26 \pm 3\%$ para o grupo tratado com a maior dose de DNR comercial ($P < 0,01$). A análise de função mitocondrial, utilizando sonda R 123, mostrou que nos tumores dos animais tratados com a maior dose de LDE-ODNR houve apenas $9 \pm 2\%$ de células viáveis comparado a $27 \pm 2\%$ para os animais tratados com a maior dose de DNR comercial ($P < 0,01$). Nos tratamentos com as

menores doses, o grupo tratado com LDE-ODNR também apresentou o menor número de células não-viáveis ($22 \pm 2\%$, comparado a $34 \pm 3\%$ para DNR, $P < 0,01$).

As figuras 45 e 46 mostram a distribuição populacional das células de tumor melanoma murino B16F10 dos grupos salina, LDE, DNR e LDE-ODNR ($7,5 \mu\text{mol/kg}$), DNR e LDE-ODNR ($1,8 \mu\text{mol/kg}$) nas fases G0/G1, S, G2/M e apresentando DNA fragmentado. O anexo C detalha as diferenças estatísticas entre os grupos.

Figura 45: Distribuição populacional de células de tumor melanoma murino B16F10 dos grupos salina, LDE, DNR e LDE-ODNR ($7,5 \mu\text{mol/kg}$), e DNR e LDE-ODNR ($1,8 \mu\text{mol/kg}$)

A Figura 46 representa os gráficos representativo das populações de células em estudo. As imagens foram geradas no programa WinMDI®.

Figura 46: Análise do ciclo celular, por citometria de fluxo. Distribuição população de células (%) dos grupos salina, LDE, DNR e LDE-ODNR (7,5 µmol/kg), e DNR e LDE-ODNR (1,8 µmol/kg)

A Figura 47 mostra a porcentagem de células viáveis e não viáveis no teste de função mitocondrial, utilizando-se o marcador rodamina 123. O anexo D detalha as diferenças estatísticas entre os grupos.

Figura 47: Percentagem de células viáveis (□) e não viáveis (■) nos tumores dos grupos salina, LDE, DNR e LDE-ODNR (7,5 µmol/kg), e DNR e LDE-ODNR (1,8 µmol/kg)

A figura abaixo apresenta gráficos demonstrativos dos grupos em estudo, as porcentagens de células viáveis e não viáveis. As imagens e sobreposições foram geradas no programa FlowJo®.

Figura 48: Análise da função mitocondrial por citometria de fluxo. Células viáveis e não-viáveis (%) dos grupos salina, LDE, DNR e LDE-ODNR (7,5 µmol/kg), e DNR e LDE-ODNR (1,8 µmol/kg)

6. DISCUSSÃO

O desenvolvimento de nanopartículas com aplicações em *Drug Delivery Systems* (DDS) tem grande destaque nas pesquisas médicas da atualidade (DAVIS, CHEN *et al.*, 2008; ZHANG, SRIVASTAVA *et al.*, 2008) *et al.*, 2008). Partículas estáveis, não-tóxicas e capazes de transportar os fármacos até seu local de ação, aumentando a seletividade e especificidade do tratamento tem grande importância na otimização dos tratamentos quimioterápicos.

O preparo da nanoemulsão (LDE) é prática conhecida no grupo e sua metodologia é bem estabelecida. Para o desenvolvimento e preparo da formulação LDE-ODNR, a extração da daunorrubicina (DNR) do manitol e a síntese do derivado N-oleil-daunorrubicina (ODNR) foi de extrema importância para incorporação do fármaco ao núcleo lipofílico da partícula. Em trabalho realizado pelo grupo, demonstrou-se que derivado mais lipofílico de DNR, o ODNR, quando associado à nanoemulsão lipídica apresenta-se estável e menos tóxico às células e tecidos, principalmente ao tecido cardíaco (TEIXEIRA, VALDUGA *et al.*, 2008). As etapas de purificação do produto de síntese também foram de grande importância, visto que a retirada dos subprodutos da reação, como dicicloexiluréia (DCU), e dos possíveis excessos dos reagentes são passos fundamentais para a obtenção de produto final puro para ser incorporado à nanopartícula.

Neste estudo, uma nova técnica foi utilizada para o preparo da LDE-ODNR. A emulsificação dos lipídios por ultrassonicador seguida de duas etapas de ultracentrifugação foi substituída por etapa única de homogeneização em alta pressão. Essa técnica acelera o processo de produção e permite a preparação de volumes finais maiores, oferecendo vantagens operacionais que permitam a produção em grande escala.

A preparação LDE-ODNR utilizada nesse estudo apresentou bom rendimento de incorporação do derivado ODNR à LDE ($93 \pm 2\%$), o que pode garantir menor custo da preparação final, já que há pouca perda de quimioterápico no processo de fabricação. Para a caracterização das nanoemulsões preparadas nesse estudo testes de estabilidade como tamanho de partícula, polidispersidade, potencial *Zeta* (z),

índice de lipoperoxidação (LPO) e pH foram realizados durante período de 180 dias. Os resultados mostram que as formulações permanecem substancialmente estáveis por pelo menos 120 dias. As diferenças observadas entre as duas preparações (LDE e LDE-ODNR) são esperadas. A presença da molécula de ODNR no núcleo da nanopartícula altera seu tamanho, carga e densidade. Vale destacar que, embora o índice de peroxidação da LDE-ODNR tenha se mantido num platô por todo o período de observação, a preparação LDE teve este índice aumentado a partir do dia 30. Esse resultado pode ser consequência da limitação do método de TBARS para avaliação do estado de peroxidação dos lipídios de uma formulação. A adição de antioxidantes não foi realizada neste estudo, porém, pode eventualmente ser uma estratégia para prolongarmos ainda mais o prazo de validade das preparações. A estabilidade das preparações por longos períodos garante a previsibilidade da produção, controles de estoque, armazenagem e distribuição dos produtos.

O tamanho médio da partícula LDE-ODNR preparada por homogeneização em alta pressão corresponde ao encontrado em outras preparações utilizando LDE descritas anteriormente, como LDE-paclitaxel (RODRIGUES, MARIA *et al.*, 2005) ou LDE-etoposide (VALDUGA, FERNANDES *et al.*, 2003; LO PRETE, MARIA *et al.*, 2006), porém, menor que o da preparação LDE-ODNR produzido por ultrassonicador (TEIXEIRA, VALDUGA *et al.*, 2008). A estabilidade das nanoemulsões está diretamente relacionada ao tamanho das partículas da fase dispersa (GRYMONPRE, STAGGEMEIER *et al.*, 2001; ZHOU, BURGER *et al.*, 2001). Nanoemulsões com partículas de tamanho variando entre 100 e 500 nm são fisicamente estáveis, sendo que o diâmetro da partícula é influenciado pelo conteúdo lipídico da fase dispersa (FLOYD, 1999). As partículas de LDE são preparadas com tamanho entre 50 a 100 nm, caracterizando-as como nanoemulsão. A proporção fármaco:lipídios (1:10) foi mantida para todas preparações LDE-ODNR nesse estudo, já que a maior proporção de lipídios garante melhor incorporação e permanência do derivado ODNR à partícula.

O potencial zeta também pode ser utilizado para analisar a estabilidade de emulsões por ser um indicador da carga elétrica da superfície das partículas.

Demonstra o potencial elétrico da superfície das partículas o qual pode ser influenciado por alterações na interface com o meio dispersante, em razão da dissociação de grupos funcionais na superfície da partícula ou da adsorção de espécies iônicas presentes no meio aquoso de dispersão (HUNTER, MIDMORE *et al.*, 2001). Neste estudo, o potencial zeta das duas preparações (LDE e LDE-ODNR) foram de aproximadamente -25 mV e -29 mV, respectivamente, com pequenas variações ao longo do período de 180 dias de observação. Quanto maior o valor absoluto do potencial zeta, maior é a estabilidade, pois partículas carregadas superficialmente se repelem umas às outras e essa força supera a tendência natural à agregação e garante boa estabilidade coloidal (MULLER, JACOBS *et al.*, 2001; MORA-HUERTAS, FESSI *et al.*, 2010). A redução da carga elétrica superficial proporciona um aumento na taxa de floculação e coalescência das partículas. O valor negativo do potencial zeta encontrado para LDE e LDE-ODNR é provavelmente gerado pela fosfatidilcolina de ovo carregada negativamente presente na composição da nanoemulsão. A utilização de fosfolípidios estabilizadores derivados de ovo e soja é particularmente interessante. Apesar dos componentes majoritários destes fosfolípidios (fosfatidilcolina e fosfatidiletanolamina) não possuírem carga superficial em pH fisiológico, a presença de pequena quantidade de fosfatidilserina e fosfatidilglicerol resulta em partículas com alta carga superficial negativas (WASHINGTON, 1996).

A presença de tensoativos (polisorbatos como Tween e lecitinas) nas formulações de nanoemulsões também auxilia na estabilidade da interface da emulsão, não apenas com a formação de uma barreira mecânica, mas também pela produção de carga elétrica de superfície, produzindo forças repulsivas entre as gotículas de óleo e evitando também a coalescência (GOPPERT e MULLER, 2005).

A estabilidade das preparações, tanto *in vitro* quanto *in vivo*, é muito importante na continuidade do processo de desenvolvimento da formulação. Os parâmetros analisados para esta preparação são comumente utilizados no controle da estabilidade e qualidade das preparações tanto em escala laboratorial quanto industrial.

Com a obtenção de uma nanoemulsão estável e com boa incorporação do derivado ODNR, deu-se início aos protocolos *in vivo*. Prevendo os ensaios de atividade antitumoral *in vivo*, realizaram-se dois ensaios preparatórios para o protocolo de regressão tumoral: citotoxicidade em células melanoma B16F10 e fibroblastos murino, e avaliação da toxicidade para o rastreamento da dose tóxica aguda das formulações DNR comercial e LDE-ODNR.

Para análise da citotoxicidade foi empregado o método MTT segundo (HAYON, DVILANSKY *et al.*, 2003) e o teste de viabilidade por azul de tripan. O IC₅₀ obtido para LDE-ODNR foi de $4,26 \times 10^{-4}$ M enquanto que o IC₅₀ para DNR comercial se aproximou de $0,998 \times 10^{-4}$ M. Esse resultado indicou que LDE-ODNR apresentou ação citotóxica cerca de 4 vezes menor em relação a formulação comercial. Em nosso estudo anterior de citotoxicidade com culturas de células neoplásicas, como K-562, HL-60, L1210 e B16 linhas (TEIXEIRA, VALDUGA *et al.*, 2008), a LDE-ODNR mostrou uma diminuição na citotoxicidade em todas as linhagens testadas, quando comparados com DNR comercial. Em outros estudos com LDE associada a agentes quimioterápicos, tais como paclitaxel e etoposide, a citotoxicidade também foi atenuada quando comparada com as formulações comerciais correspondentes (VALDUGA, FERNANDES *et al.*, 2003; RODRIGUES, MARIA *et al.*, 2005; LO PRETE, MARIA *et al.*, 2006). No caso de etoposide e paclitaxel, este fato pode ser atribuído à soma da toxicidade do fármaco ao veículo utilizado nas preparações comerciais, como Chremophor-L, o que não é o caso da daunorrubicina, veiculada comercialmente em água. Outra possibilidades para atenuação de citotoxicidade em estudos de cultura de células neoplásicas está relacionado ao mecanismo de internalização celular de fármacos livres ou carregados por transportadores.

No estudo para rastreamento da dose tóxica aguda das formulações DNR comercial e LDE-ODNR, a comparação entre as duas apresentações mostrou claramente a eficácia da nanoemulsão lipídica na redução da toxicidade. A DL₅₀ encontrada para a LDE-ODNR foi 48 vezes maior que a encontrada para a forma comercial do fármaco, e a DMT 65 vezes maior. A análise do peso dos animais também está de acordo com o critério estabelecido por (ECOBICHON, 1972) para a

DMT, no qual se considera a dose na qual não haja morte de nenhum animal e a redução de peso observada seja de até 15% em relação ao peso inicial. A perda de peso nos animais tratados com DNR comercial foi mais acentuada quando comparada aos animais tratados com LDE-ODNR. Assim, a partir dos dados de rastreamento de dose tóxica aguda decidiu-se utilizar como ponto inicial para o protocolo de regressão tumoral a dose de 7,5 $\mu\text{mol/kg}$ para DNR comercial e para a preparação LDE-ODNR. Apesar da possibilidade de utilizarmos uma dose cerca de 20 vezes maior para LDE-ODNR sem que houvesse morte de nenhum animal, optou-se por manter o protocolo da LDE-ODNR pareado ao da formulação comercial. Foram testadas também outras duas doses menores – 3,7 e 1,8 $\mu\text{mol/kg}$ tanto para DNR quanto para LDE-ODNR. No entanto estamos apresentando neste trabalho apenas os grupos que receberam a maior e menor dose (7,5 e 1,8 $\mu\text{mol/kg}$), devido à perda de alguns animais do grupo de dose intermediária o que inviabilizou os cálculos estatísticos para este grupo.

Os fármacos do grupo das antraciclinas, como a daunorrubicina (DNR) e a doxorrubicina (DOX), estão entre os agentes antitumorais de importância na prática clínica, porém suas manifestações tóxicas são obstáculo para seu uso. Dentre elas, a mielossupressão é uma importante limitadora da dose e também a toxicidade cardíaca, um efeito adverso grave observado no uso desses agentes. (MINOTTI, LICATA *et al.*, 2000; DEVITA, HELLMAN *et al.*, 2005; KASSNER, HUSE *et al.*, 2008).

Assim, na tentativa de buscarmos outras informações sobre o comportamento das formulações DNR e LDE-ODNR *in vivo*, foi proposto um estudo comparativo de toxicidade dos fármacos na maior dose proposta para o protocolo de regressão tumoral (7,5 $\mu\text{mol/kg}$) com avaliação por 30 dias. Os resultados sugeriram melhor tolerância dos animais à formulação LDE-ODNR. A avaliação do peso dos animais mostrou que o grupo que recebeu a preparação LDE-ODNR ganhou 5% peso comparado ao seu peso inicial (dia 1) e ao final (dia 30) do experimento. Esse ganho teve diferença significativa quando comparado ao grupo salina ($P < 0,01$) e ao grupo que recebeu DNR comercial, que perdeu 11% do seu peso ($P < 0,001$) até o final do período de observação. A análise do hemograma

sugeriu menor efeito no perfil hematológico em nível periférico e melhor recuperação dos animais que receberam a preparação LDE-ODNR. Observou-se uma curva que se assemelha em todos os grupos para as análises de hemácias, leucócitos e plaquetas. Na avaliação das hemácias e plaquetas esta queda inicial pode estar relacionada a coletas seguidas em um curto intervalo de tempo, assim como o aparente pico e mobilização de leucócitos no 7º dia de coleta. As coletas sucessivas e a manipulação quase diária dos animais os debilitam e os causam estresse, e esses fatores também podem alterar as características do perfil hematológico. Na avaliação das hemácias observou-se que, nas coletas finais, no 14º e 30º dias, o grupo tratado com LDE-ODNR se mostrou melhor recuperado quando comparado ao grupo DNR ($P < 0,001$ e $P < 0,01$, dias 14 e 30, respectivamente) e não apresentou diferença (*ns*) quando comparado ao grupo salina. A avaliação das plaquetas mostrou resultados semelhantes com menor queda para o grupo LDE-ODNR comparado ao DNR ($P < 0,05$ para o grupo DNR, *ns* para o grupo LDE-ODNR comparados à salina para o 4º e 7º dias). Nas coletas finais observou-se recuperação de todos os grupos, devido provavelmente ao maior intervalo entre a última dose e as coletas seguintes. Para melhor elucidação dos fatos, uma análise qualitativa e quantitativa das células hematopoiéticas da medula óssea (mielograma) poderia fornecer resultados mais precisos quanto à possível mielossupressão causada pelos fármacos, comparando a formulação comercial ao derivado incorporado à LDE.

O estudo de perfil bioquímico enzimático foi uma avaliação piloto do comportamento metabólico dos animais frente aos tratamentos em estudo. A DNR é um fármaco bem distribuído ao organismo (CALABRESI e CHABNER, 1996; TAKIMOTO, KIEFFER *et al.*, 1997; DEVITA, HELLMAN *et al.*, 2005). Sofre extenso metabolismo no fígado, é excretada em grande parte pela bile e menos de 10% pela urina. Seu metabólito ativo, o daunorrubicinol (DNR-ol), tem afinidade ao tecido cardíaco e é um dos responsáveis pela indução da cardiotoxicidade (ARNOLD, SLACK *et al.*, 2004; ROBERT, 2007b; 2007a; KASSNER, HUSE *et al.*, 2008). Por estas razões buscou-se avaliar algumas enzimas relacionadas à função dos órgãos em questão.

As avaliações da atividade das transaminases hepáticas, aspartato aminotransferase (AST/TGO) e alanina aminotransferase (ALT/TGP) mostraram altos valores para o TGO, porém todos os grupos seguiram o mesmo perfil. Observou-se que a CK-MB estava aumentada no grupo DNR comercial em comparação ao grupo controle salina, tendo um pico na penúltima coleta, duas semanas após a última dose de tratamento (dados não apresentados). Esses resultados podem indicar algum tipo de lesão no tecido cardíaco, entretanto se faz necessária a complementação dos dados para melhor avaliação. Sabe-se que o CK-MB, isoenzima da creatina quinase (CK), é uma importante enzima reguladora na produção e na utilização do fosfato de alta energia nos tecidos contráteis. As medições de CK-MB podem contribuir para o diagnóstico de enfarte do miocárdio e dimensionamento do enfarte. Podem também ser utilizadas para a monitorização da reperfusão durante a terapêutica trombolítica e enfarte do miocárdio perioperatório após cirurgia cardíaca. A CK-MB eleva-se entre três e seis horas após o início dos sintomas de enfarte agudo, com pico entre 16 e 24 horas, normalizando-se entre 48 e 72 horas (WU e LANE, 1995). Infelizmente, a pequena quantidade de sangue obtida nas coletas dos camundongos é um fator limitante para este modelo experimental. Para uma avaliação mais completa, um protocolo longo, com ciclos de quimioterapia pré-definidos, avaliando indivíduo a indivíduo, e um menor número de coletas, apenas com uma coleta basal, intermediária e uma final poderiam elucidar melhor esses resultados.

Além das observações coletadas nos estudos de toxicidade das formulações, a proposta de realização do estudo de farmacocinética e biodistribuição utilizando cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a um espectrômetro de massas (LC-MS/MS) baseou-se em três idéias: (1) fazer uso da tecnologia disponível para um estudo de cinética mais preciso, rápido e confiável (GLISH e VACHET, 2003; STOKVIS, ROSING *et al.*, 2005; MARZO e BO, 2007); (2) observar comportamento cinético do derivado ODNR associado à LDE e (3) investigar a formação dos metabólitos da DNR responsáveis pela indução dos efeitos tóxicos do fármaco. A eficácia e toxicidade de muitos agentes quimioterápicos estão relacionadas as

substâncias de partida ou aos metabólitos encontrado nos fluidos e tecidos biológicos (STOKVIS, ROSING *et al.*, 2005; MARZO e BO, 2007). Durante o processo de desenvolvimento de fármacos, tanto na etapa pré-clínica como na clínica, o conhecimento das propriedades farmacocinéticas (absorção, distribuição, metabolismo e eliminação – ADME) é essencial.

As alternativas de *DDS* podem alterar radicalmente a biodistribuição e cinética dos compostos. Alterações na distribuição do fármaco, associado a diferenças na biotransformação tecido-dependente, pode ter papel importante nos efeitos terapêuticos e tóxicos. Metodologias analíticas que permitam a rápida quantificação da DNR e de seus metabólitos, particularmente aplicadas a modelos animais de pequeno porte, podem auxiliar o aperfeiçoamento de estratégias de *DDS* para o uso das antraciclinas (ARNOLD, SLACK *et al.*, 2004; ALLEN, CHENG *et al.*, 2006).

A proposta de se fazer o estudo cinético por LC-MS/MS ao invés de leitura com compostos radioativos é a certeza de que a curva construída reflete exatamente a razão massa/carga de cada molécula em estudo, seja no primeiro ou no último ponto de coleta. O método desenvolvido foi eficiente, específico e sensível na detecção dos compostos e seguiu os critérios da RE 899 de Maio de 2003, descrito pela ANVISA para estudos de farmacocinética e biodisponibilidade.

Os resultados obtidos no protocolo de atividade antitumoral mostram claramente a superioridade da nova preparação LDE-ODNR na inibição do crescimento do tumor e na redução de toxicidade quando comparada a DNR comercial na dose de 7,5 $\mu\text{mol/kg}$. Curiosamente, quando ambas as preparações foram administradas em dose 4 vezes menor (1,8 $\mu\text{mol/kg}$) não houve diferença entre os dois tratamentos na redução do tumor. A LDE, como documentado em nossos estudos anteriores mostrou-se eficaz no transporte e direcionamento do fármaco ao tumor (GRAZIANI, IGREJA *et al.*, 2002; AZEVEDO, CARVALHO *et al.*, 2005; RODRIGUES, MARIA *et al.*, 2005; LO PRETE, MARIA *et al.*, 2006; TEIXEIRA, VALDUGA *et al.*, 2008; PIRES, HEGG *et al.*, 2009).

A compartimentalização celular do ODNR após a captação celular mediada por receptores de endocitose pode também desempenhar papel importante no aumento da ação farmacológica do fármaco associada à LDE.

Outro dado importante está relacionado à probabilidade de sobrevida dos animais depois dos tratamentos LDE-ODNR e DNR. Os animais tratados com LDE-ODNR tiveram claramente uma maior sobrevida comparada aos animais que receberam tratamento DNR. Os animais que receberam tratamento DNR comercial morreram antes mesmo do grupo controle. Esse aumento na sobrevida é resultado da melhora na ação farmacológica dos fármacos veiculados à LDE assim como a baixa toxicidade da preparação comparada a DNR comercial.

A evolução dos tumores nos diferentes grupos foi visivelmente diferente entre os grupos. Não apenas em relação a massa tumoral, e a sobrevida, mas também em relação a mudanças no peso dos animais, perfil hematológico, desenvolvimento de metástases e viabilidade celular.

Os animais tratados com DNR comercial se mostraram mais debilitados, caquéticos, com perda dos pelos e diarreia. Na avaliação do peso dos dois grupos LDE-ODNR (7,5 e 1,8 $\mu\text{mol/kg}$), ambos apresentaram ganho de peso (22% e 8%, $P<0,001$), respectivamente. O grupo tratado com DNR comercial na maior dose mostrou maior perda, 19% de seu peso inicial (1° ao 30° dia). O grupo salina, sem tratamento apresentou perda de 24% do seu peso.

Na avaliação de nódulos metastáticos observados durante a necrópsia os grupos tratados com DNR comercial (maior e menor doses) também apresentaram as maiores variações, com nódulos em 82% e 80% dos animais analisados em relação ao grupo controle (100%) comparados a apenas 30% dos animais tratados com LDE-ODNR (7,5 $\mu\text{mol/kg}$, $P<0,001$). Para os animais tratados com LDE-ODNR na menor dose, foram encontrados nódulos metastáticos em 60% dos animais. Esse número mostra mais uma vez que o tratamento em menor dose é menos eficaz no controle da progressão do tumor comparado ao de maior dose. Os bons resultados no controle da toxicidade e na disseminação do tumor mostram que o tratamento

direcionado com a LDE é mais efetivo na destruição dos sítios metastáticos ou, na inibição no desenvolvimento de metástases.

As análises do perfil hematológico corroboram para a avaliação dos tratamentos em estudo, mostrando o bom desempenho da preparação LDE-ODNR (7,5 $\mu\text{mol/kg}$) no controle da disseminação e crescimento do tumor e na redução de toxicidade. A redução no número de hemácias observada para o grupo DNR (7,5 $\mu\text{mol/kg}$) comparado ao grupo salina e ao grupo LDE-ODNR (7,5 $\mu\text{mol/kg}$) nos dias 16 e 20, sugerem uma pior evolução do quadro do grupo para uma possível anemia induzida pelo tumor. Estes os pontos de coleta são após a segunda e terceira dose de tratamento. Devido ao fato de não termos um próximo ponto de avaliação, já que houve morte de 100% dos animais ao 30° dia, pode-se pensar em consequência do avanço do tumor - o tratamento além de induzir a maior toxicidade, é menos eficaz no controle de disseminação. O grupo de animais tratados com LDE-ODNR (7,5 $\mu\text{mol/kg}$) apresenta melhor avaliação do número de hemácias quando comparado ao grupo salina e também ao grupo LDE-ODNR (1,8 $\mu\text{mol/kg}$). Mais uma vez, os grupos de menor dose não apresentam diferença significativa quando comparados. O quadro de anemia observado principalmente no grupo salina é um efeito característico do melanoma B16F10, relação direta entre aumento de massa tumoral e anemia. A anemia é de fato um dos efeitos hematológico mais comum no câncer e pode ocorrer por diversos mecanismos como desnutrição, perda de sangue devido à invasão tecidual do tumor nos tecidos, hemólise auto-imune e redução na produção e sobrevivência dos eritrócitos.

Na avaliação de leucócitos, os resultados mostram que todos os tratamentos levaram a redução no número de leucócitos, porém melhor evidenciado no grupo DNR comercial especialmente no 16° e 20° dias. Observou-se a recuperação dos grupos tratados com a nanoemulsão nas duas coletas finais.

Na avaliação das plaquetas ficou clara a relação existente entre o crescimento da massa tumoral e o aumento no número de plaquetas visto que o grupo salina apresentou crescente trombocitose. A trombocitose observada pode ser resultado do aumento da liberação de tromboeritropoietina, resultado do

estímulo da produção e maturação de megacariócitos pela liberação de IL-11 e TGF (DEVITA, HELLMAN *et al.*, 2005) Todos os grupos apresentam diferença significativa comparados ao grupo salina. Observou-se um aumento do número de plaquetas ao final do experimento (35º dia) para o grupo de menor LDE-ODNR (1,8 µmol/kg). Este aumento pode estar relacionado ao avanço do tumor observado no final do protocolo.

Um protocolo de regressão tumoral é um estudo complexo e difícil de ser analisado. Algumas diferenças são visíveis macroscopicamente, como a redução do tumor, a melhora do comportamento e estado físico do animal, peso, queda dos pelos entre outros. No entanto, os tumores possuem um microambiente bastante complexo e de grande importância para seu desenvolvimento e progressão ou regressão.

A análise de viabilidade celular por citometria de fluxo auxilia no entendimento desse microambiente. Os marcadores utilizados nos testes apresentam afinidade específica a organelas ou ao DNA da célula. O iodeto de propídio (PI) é um marcador específico de DNA, e a rodamina 123, corante da família das fluoronas, auxilia na avaliação de células viáveis ou não viáveis por ligar-se especificamente às membranas das mitocôndrias. Os testes de PI e R123 juntos podem estimar de forma mais precisa a viabilidade celular do que apenas métodos convencionais de exclusão por corante (SASAKI, TANAKA *et al.*, 1988).

Finalmente, quando fragmentos de tecido foram extraídos dos tumores dos animais tratados com LDE-ODNR ou DNR para a realização dos testes de viabilidade celular, ficou clara a superior ação farmacológica do tratamento LDE-ODNR sobre o tratamento DNR comercial nas duas doses em estudo. Isso foi demonstrado tanto pela alta porcentagem de células com DNA fragmentado quanto pelo número de células não-viáveis encontradas nos tumores dos animais tratados com LDE-ODNR, indicando que eventos de necrose e apoptose ocorrem em taxas significativamente maiores nos animais tratados com a preparação LDE-ODNR.

Os resultados obtidos no neste projeto são muito promissores. Foi possível estabelecer modelos básicos de experimentação e documentar fatos importantes,

como estudo de estabilidade completo das preparações LDE e LDE-ODNR, a incorporação do fármaco modificado a nanopartícula, a eficácia da nanoemulsão lipídica na tolerabilidade e redução da toxicidade, na regressão de massa tumoral em modelo de melanoma murino B16F10, diminuição do número de animais portadores de metástases e na redução do número de células ativas. O estudo mostrou que o tratamento proposto com a o derivado ODNR e a nanoemulsão (LDE-ODNR) é efetivo no combate às células tumorais, eficaz, seletivo, menos tóxico e melhor tolerado. Os estudos de farmacocinética e biodistribuição somam a este protocolo informações importantes relacionadas às propriedades de absorção, distribuição, metabolismo e excreção da formulação LDE-ODNR em estudo comparada à DNR comercial.

7. CONCLUSÕES

- ✓ A formulação LDE-ODNR desenvolvida utilizando a técnica homogeneização em alta pressão apresentou boa taxa de incorporação e se manteve estável por pelo menos 120 dias;
- ✓ A preparação LDE-ODNR apresentou reduzida toxicidade;
- ✓ O tratamento com LDE-ODNR (dose 7,5 $\mu\text{mol/kg}$) foi eficaz na inibição do crescimento tumoral e na redução do número de células de tumor viáveis;
- ✓ O número de animais portadores de metástase foi menor nos animais tratados com LDE-ODNR (dose 7,5 $\mu\text{mol/kg}$);
- ✓ O efeito dose-resposta dos tratamentos com daunorrubicina, incorporada ou não à nanopartícula foi evidenciado;
- ✓ O método de análise desenvolvido para estudo de farmacocinética e biodistribuição é eficaz, sensível e específico na detecção dos compostos em estudo;

8. ANEXOS

ANEXO A

Análise estatística da variação peso corporal avaliada no protocolo de toxicidade

Grupos/dias	Salina		LDE		DNR (a)		LDE-ODNR (a)	
	1	30	1	30	1	30	1	30
Salina	--	--	***	ns	***	***	***	**
LDE	--	--	--	--	**	***	ns	**
DNR	--	--	--	--	--	--	*	***

(a) – dose (7,5 µmol/kg)
ns não significativo; * P<0,05; ** P<0,01; *** P<0,001

().

ANEXO B

Análise estatística da variação peso corporal avaliada no protocolo de regressão tumoral

	Salina		LDE		DNR(a)		DNR(b)		LDE-ODNR(a)		LDE-ODNR(b)	
	13	26	13	26	13	26	13	26	13	26	13	26
Salina	--	--	***	***	***	***	***	**	***	***	***	***
LDE	--	--	--	--	ns	***	ns	***	ns	***	***	***
DNR(a)	--	--	--	--	--	--	ns	ns	ns	***	***	***
DNR(b)	--	--	--	--	--	--	--	--	*	***	***	***
LDE-ODNR(a)	--	--	--	--	--	--	*	***	--	--	***	*

(a) – dose alta (7,5 µmol/kg); (b) – dose baixa (1,8 µmol/kg)
ns não significativo; *P<0,05; ** P<0,01; *** P<0,001

ANEXO C

Análise estatística da distribuição da população de células avaliada no protocolo de atividade antitumoral

CONTROLE					LDE			
	M1	M2	M3	M4	M1	M2	M3	M4
CONTROLE					ns	***	***	***
DNR (a)					LDE-ODNR (a)			
	M1	M2	M3	M4	M1	M2	M3	M4
CONTROLE	***	***	***	***	***	***	***	***
LDE	***	ns	***	ns	***	ns	***	***
DNR(a)					***	***	***	***
DNR(b)					LDE-ODNR(b)			
	M1	M2	M3	M4	M1	M2	M3	M4
CONTROLE	ns	***	***	***	***	***	***	***
LDE	ns	ns	***	ns	***	ns	***	***
DNR(a)	***	ns	ns	ns	ns	***	ns	***
LDE-ODNR(a)	***	ns	ns	***	***	ns	***	***
DNR(b)					***	ns	***	***

(a) – dose alta (7,5 $\mu\text{mol/kg}$); (b) – dose baixa (1,8 $\mu\text{mol/kg}$)
 ns não significativo, *P<0,05; ** P<0,01; *** P<0,001

ANEXO D

Distribuição função mitocondrial (%) no estudo de atividade antitumoral

	CONTROLE	LDE	DNR (a)	LDE-ODNR(a)	DNR(b)	LDE-ODNR(b)
CONTROLE		***	***	***	***	***
LDE			***	***	***	**
DNR 4				***	*	**
ODNR 6					***	***
DNR1						**

(a) – dose alta (7,5 $\mu\text{mol/kg}$); (b) – dose baixa (1,8 $\mu\text{mol/kg}$)
 ns não significativo, *P<0,05; ** P<0,01; *** P<0,001

9. REFERÊNCIAS

- Ades, A., J. P. Carvalho, *et al.* Uptake of a cholesterol-rich emulsion by neoplastic ovarian tissues. *Gynecol Oncol*, v.82, n.1, Jul, p.84-7. 2001.
- Allen, T. M., W. W. Cheng, *et al.* Pharmacokinetics and pharmacodynamics of lipidic nanoparticles in cancer. *Anticancer Agents Med Chem*, v.6, n.6, Nov, p.513-23. 2006.
- Anvisa. Resolução - RE nº 899, de 29 de maio de 2003. D.O.U. 02/06/2003. Anvisa 2003.
- Arnold, R. D., J. E. Slack, *et al.* Quantification of Doxorubicin and metabolites in rat plasma and small volume tissue samples by liquid chromatography/electrospray tandem mass spectroscopy. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, v.808, n.2, Sep 5, p.141-52. 2004.
- Azevedo, C. H., J. P. Carvalho, *et al.* Plasma kinetics and uptake by the tumor of a cholesterol-rich microemulsion (LDE) associated to etoposide oleate in patients with ovarian carcinoma. *Gynecol Oncol*, v.97, n.1, Apr, p.178-82. 2005.
- Berry, C. C., S. Wells, *et al.* Dextran and albumin derivatised iron oxide nanoparticles: influence on fibroblasts in vitro. *Biomaterials*, v.24, n.25, Nov, p.4551-7. 2003.
- Binaschi, M., R. Farinosi, *et al.* Human DNA topoisomerase II α -dependent DNA cleavage and yeast cell killing by anthracycline analogues. *Cancer Res*, v.58, n.9, May 1, p.1886-92. 1998.
- Brown, M. S. e J. L. Goldstein. A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis. *Science*, v.232, n.4746, Apr 4, p.34-47. 1986.
- Calabresi, P. e B. A. Chabner. *As Bases Farmacológicas da Terapêutica*. : Ed. McGraw-Hill. 1996 (Quimioterapia das doenças neoplásicas)
- Carter, P. Improving the efficacy of antibody-based cancer therapies. *Nat Rev Cancer*, v.1, n.2, Nov, p.118-29. 2001.
- Cox, S. K., A. V. Wilke, *et al.* Determination of adriamycin in plasma and tissue biopsies. *J Chromatogr*, v.564, n.1, Mar 8, p.322-9. 1991.
- Davis, M. E., Z. G. Chen, *et al.* Nanoparticle therapeutics: an emerging treatment modality for cancer. *Nature Reviews - Drug Discovery*, v.7, p.771-782. 2008.
- De Smidt, P. C. e T. J. Van Berkel. Prolonged serum half-life of antineoplastic drugs by incorporation into the low density lipoprotein. *Cancer Res*, v.50, n.23, Dec 1, p.7476-82. 1990.
- Devita, V. T., S. Hellman, *et al.* *Cancer: Principles & Practice of Oncology*: Lippincott Williams & Wilkins. 2005

Dias, M. L., J. P. Carvalho, *et al.* Pharmacokinetics and tumor uptake of a derivatized form of paclitaxel associated to a cholesterol-rich nanoemulsion (LDE) in patients with gynecologic cancers. *Cancer Chemother Pharmacol*, v.59, n.1, Jan, p.105-11. 2007.

Dorlhiac-Llacer, P. E., M. V. Marquezini, *et al.* In vitro cytotoxicity of the LDE: daunorubicin complex in acute myelogenous leukemia blast cells. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, v.34, n.10, Oct, p.1257-63. 2001.

Dorr, R. T., N. G. Shipp, *et al.* Comparison of cytotoxicity in heart cells and tumor cells exposed to DNA intercalating agents in vitro. *Anticancer Drugs*, v.2, n.1, Feb, p.27-33. 1991.

Ecobichon, D. J. Relative amounts of hepatic and renal carboxylesterases in mammalian species. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol*, v.3, n.3, May, p.629-36. 1972.

Ecobichon, D. J. e A. M. Comeau. Hepatic aliesterase sensitivity to dichlorvos and diisopropylfluorophosphate. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, v.26, n.2, Oct, p.260-3. 1973.

Ferrazzi, E., J. M. Woynarowski, *et al.* DNA damage and cytotoxicity induced by metabolites of anthracycline antibiotics, doxorubicin and idarubicin. *Cancer Commun*, v.3, n.6, Jun, p.173-80. 1991.

Floyd, A. G. Top ten considerations in the development of parenteral emulsions. *Pharm Sci Technolo Today*, v.4, n.2, Apr, p.134-143. 1999.

Forrest, G. L., B. Gonzalez, *et al.* Human carbonyl reductase overexpression in the heart advances the development of doxorubicin-induced cardiotoxicity in transgenic mice. *Cancer Res*, v.60, n.18, Sep 15, p.5158-64. 2000.

Forssen, E. A., D. M. Coulter, *et al.* Selective in vivo localization of daunorubicin small unilamellar vesicles in solid tumors. *Cancer Res*, v.52, n.12, Jun 15, p.3255-61. 1992.

Freireich, E. J., E. A. Gehan, *et al.* Quantitative comparison of toxicity of anticancer agents in mouse, rat, hamster, dog, monkey, and man. *Cancer Chemother Rep.*, v.50, n.4, May, p.219-44. 1966.

Gal, D., M. Ohashi, *et al.* Low-density lipoprotein as a potential vehicle for chemotherapeutic agents and radionucleotides in the management of gynecologic neoplasms. *Am J Obstet Gynecol*, v.139, n.8, Apr 15, p.877-85. 1981.

Geran, R. I., N. H. Greenberg, *et al.* Protocols for screening chemical agents and natural products against animal tumors and other biological systems (third ed.). Cancer Chemotherapy Reports. Part 3: 59-61. p. 1972.

Glish, G. L. e R. W. Vachet. The basics of mass spectrometry in the twenty-first century. *Nat Rev Drug Discov*, v.2, n.2, Feb, p.140-50. 2003.

Goppert, T. M. e R. H. Muller. Polysorbate-stabilized solid lipid nanoparticles as colloidal carriers for intravenous targeting of drugs to the brain: comparison of plasma protein adsorption patterns. *J Drug Target*, v.13, n.3, Apr, p.179-87. 2005.

Graziani, S. R., F. A. Igreja, *et al.* Uptake of a cholesterol-rich emulsion by breast cancer. *Gynecol Oncol*, v.85, n.3, Jun, p.493-7. 2002.

Grochow, L. B. e M. M. Ames. A clinicians guide to chemotherapy pharmacokinetics and pharmacodynamics Anthracyclines: Williams&Wilkins. 3rd ed. 1998.

Grymonpre, K. R., B. A. Staggemeier, *et al.* Identification by integrated computer modeling and light scattering studies of an electrostatic serum albumin-hyaluronic acid binding site. *Biomacromolecules*, v.2, n.2, Summer, p.422-9. 2001.

Gupta, A. K. e M. Gupta. Synthesis and surface engineering of iron oxide nanoparticles for biomedical applications. *Biomaterials*, v.26, n.18, Jun, p.3995-4021. 2005.

Hande, K. R. Topoisomerase II inhibitors. *Cancer Chemother Biol Response Modif*, v.21, p.103-25. 2003.

Hayon, T., A. Dvilansky, *et al.* Appraisal of the MTT-based assay as a useful tool for predicting drug chemosensitivity in leukemia. *Leuk Lymphoma*, v.44, n.11, Nov, p.1957-62. 2003.

Hirata, R. D., M. H. Hirata, *et al.* Effects of apolipoprotein B-100 on the metabolism of a lipid microemulsion model in rats. *Biochim Biophys Acta*, v.1437, n.1, Jan 29, p.53-62. 1999.

Ho, Y. K., R. G. Smith, *et al.* Low-density lipoprotein (LDL) receptor activity in human acute myelogenous leukemia cells. *Blood*, v.52, n.6, Dec, p.1099-114. 1978.

Hunter, R. J., B. R. Midmore, *et al.* Zeta Potential of Highly Charged Thin Double-Layer Systems. *J Colloid Interface Sci*, v.237, n.1, May 1, p.147-149. 2001.

Inca/Ms. Estimativa 2010: incidência de câncer no Brasil INCA. Rio de Janeiro: 2009, p.98. 2009

Innocenti, F., L. Iyer, *et al.* Epirubicin glucuronidation is catalyzed by human UDP-glucuronosyltransferase 2B7. *Drug Metab Dispos*, v.29, n.5, May, p.686-92. 2001.

Joerger, M., A. D. Huitema, *et al.* Pharmacokinetics of low-dose doxorubicin and metabolites in patients with AIDS-related Kaposi sarcoma. *Cancer Chemother Pharmacol*, v.55, n.5, May, p.488-96. 2005.

Kan, P., Z. B. Chen, *et al.* Development of nonionic surfactant/phospholipid o/w emulsion as a paclitaxel delivery system. *J Control Release*, v.58, n.3, Apr 19, p.271-8. 1999.

Kassner, N., K. Huse, *et al.* Carbonyl reductase 1 is a predominant doxorubicin reductase in the human liver. *Drug Metab Dispos*, v.36, n.10, Oct, p.2113-20. 2008.

Le Bot, M. A., J. M. Begue, *et al.* Different cytotoxicity and metabolism of doxorubicin, daunorubicin, epirubicin, esorubicin and idarubicin in cultured human and rat hepatocytes. *Biochem Pharmacol*, v.37, n.20, Oct 15, p.3877-87. 1988.

Licata, S., A. Saponiero, *et al.* Doxorubicin metabolism and toxicity in human myocardium: role of cytoplasmic deglycosidation and carbonyl reduction. *Chem Res Toxicol*, v.13, n.5, May, p.414-20. 2000.

Lipshultz, S. E., S. D. Colan, *et al.* Late cardiac effects of doxorubicin therapy for acute lymphoblastic leukemia in childhood. *N. Engl. J. Med.*, v.324, n.12, Mar 21, p.808-15. 1991.

Liu, Y., Y. Yang, *et al.* Quantification of pegylated liposomal doxorubicin and doxorubicinol in rat plasma by liquid chromatography/electrospray tandem mass spectroscopy: Application to preclinical pharmacokinetic studies. *Talanta*, v.74, n.4, Jan 15, p.887-95. 2008.

Lo Prete, A. C., D. A. Maria, *et al.* Evaluation in melanoma-bearing mice of an etoposide derivative associated to a cholesterol-rich nano-emulsion. *J. Pharm. Pharmacol.*, v.58, n.6, Jun, p.801-8. 2006.

Lotfi, K., A. L. Zackrisson, *et al.* Comparison of idarubicin and daunorubicin regarding intracellular uptake, induction of apoptosis, and resistance. *Cancer Lett*, v.178, n.2, Apr 25, p.141-9. 2002.

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

Maranhao, R. C., T. B. Cesar, *et al.* Metabolic behavior in rats of a nonprotein microemulsion resembling low-density lipoprotein. *Lipids*, v.28, n.8, Aug, p.691-6. 1993.

Maranhao, R. C., B. Garicochea, *et al.* Plasma kinetics and biodistribution of a lipid emulsion resembling low-density lipoprotein in patients with acute leukemia. *Cancer Res*, v.54, n.17, Sep 1, p.4660-6. 1994.

Maranhao, R. C., B. Garicochea, *et al.* Increased plasma removal of microemulsions resembling the lipid phase of low-density lipoproteins (LDL) in patients with acute myeloid leukemia: a possible new strategy for the treatment of the disease. *Braz J Med Biol Res*, v.25, n.10, p.1003-7. 1992.

Maranhao, R. C., S. R. Graziani, *et al.* Association of carmustine with a lipid emulsion: in vitro, in vivo and preliminary studies in cancer patients. *Cancer Chemother Pharmacol*, v.49, n.6, Jun, p.487-98. 2002.

Martincic, D. e K. R. Hande. Topoisomerase II inhibitors. *Cancer Chemother Biol Response Modif*, v.22, p.101-21. 2005.

Marzo, A. e L. D. Bo. Tandem mass spectrometry (LC-MS-MS): a predominant role in bioassays for pharmacokinetic studies. *Arzneimittelforschung*, v.57, n.2, p.122-8. 2007.

Masquelier, M., S. Vitols, *et al.* Low-density lipoprotein as a carrier of antitumoral drugs: in vivo fate of drug-human low-density lipoprotein complexes in mice. *Cancer Res*, v.46, n.8, Aug, p.3842-7. 1986.

- Menna, P., S. Recalcati, *et al.* An introduction to the metabolic determinants of anthracycline cardiotoxicity. *Cardiovasc Toxicol*, v.7, n.2, p.80-5. 2007.
- Minotti, G., S. Licata, *et al.* Anthracycline metabolism and toxicity in human myocardium: comparisons between doxorubicin, epirubicin, and a novel disaccharide analogue with a reduced level of formation and [4Fe-4S] reactivity of its secondary alcohol metabolite. *Chem Res Toxicol*, v.13, n.12, Dec, p.1336-41. 2000.
- Minotti, G., P. Menna, *et al.* Anthracyclines: molecular advances and pharmacologic developments in antitumor activity and cardiotoxicity. *Pharmacol. Rev.*, v.56, n.2, Jun, p.185-229. 2004.
- Minotti, G., S. Recalcati, *et al.* Doxorubicin cardiotoxicity and the control of iron metabolism: quinone-dependent and independent mechanisms. *Methods Enzymol*, v.378, p.340-61. 2004.
- Mora-Huertas, C. E., H. Fessi, *et al.* Polymer-based nanocapsules for drug delivery. *Int J Pharm*, v.385, n.1-2, Jan 29, p.113-42. 2010.
- Mosley, S. T., J. L. Goldstein, *et al.* Targeted killing of cultured cells by receptor-dependent photosensitization. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v.78, n.9, Sep, p.5717-21. 1981.
- Muller, R. H., C. Jacobs, *et al.* Nanosuspensions as particulate drug formulations in therapy. Rationale for development and what we can expect for the future. *Adv Drug Deliv Rev*, v.47, n.1, Mar 23, p.3-19. 2001.
- Olson, L. E., D. Bedja, *et al.* Protection from doxorubicin-induced cardiac toxicity in mice with a null allele of carbonyl reductase 1. *Cancer Res*, v.63, n.20, Oct 15, p.6602-6. 2003.
- Olson, R. D., P. S. Mushlin, *et al.* Doxorubicin cardiotoxicity may be caused by its metabolite, doxorubicinol. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v.85, n.10, May, p.3585-9. 1988.
- Pinheiro, K. V., V. T. Hungria, *et al.* Plasma kinetics of a cholesterol-rich microemulsion (LDE) in patients with Hodgkin's and non-Hodgkin's lymphoma and a preliminary study on the toxicity of etoposide associated with LDE. *Cancer Chemother Pharmacol*, v.57, n.5, May, p.624-30. 2006.
- Pires, L. A., R. Hegg, *et al.* Use of cholesterol-rich nanoparticles that bind to lipoprotein receptors as a vehicle to paclitaxel in the treatment of breast cancer: pharmacokinetics, tumor uptake and a pilot clinical study. *Cancer Chemother Pharmacol*, v.63, n.2, Jan, p.281-7. 2009.
- Plowman, J. E., L. K. Creamer, *et al.* Solution conformation of a peptide corresponding to bovine kappa-casein B residues 130-153 by circular dichroism spectroscopy and ¹H-nuclear magnetic resonance spectroscopy. *J Dairy Res*, v.64, n.3, Aug, p.377-97. 1997.
- Robert, J. [Pharmacokinetics of new anthracyclines]. *Bull Cancer*, v.75, n.2, p.167-74. 1988.
- Robert, J. Long-term and short-term models for studying anthracycline cardiotoxicity and protectors. *Cardiovasc Toxicol*, v.7, n.2, p.135-9. 2007a.

Robert, J. Preclinical assessment of anthracycline cardiotoxicity in laboratory animals: predictiveness and pitfalls. *Cell Biol Toxicol*, v.23, n.1, Jan, p.27-37. 2007b.

Rodrigues, D. G., C. C. Covolan, *et al.* 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, Jun, p.765-72. 2002.

Rodrigues, D. G., D. A. Maria, *et al.* Improvement of paclitaxel therapeutic index by derivatization and association to a cholesterol-rich microemulsion: in vitro and in vivo studies. *Cancer Chemother Pharmacol.*, v.55, n.6, Jun, p.565-76. 2005.

Rudling, M. J., V. P. Collins, *et al.* Delivery of aclacinomycin A to human glioma cells in vitro by the low-density lipoprotein pathway. *Cancer Res*, v.43, n.10, Oct, p.4600-5. 1983.

Sasaki, K., K. Tanaka, *et al.* [Estimation of cell viability by FCM using rhodamin 123 and propidium iodide--its application in evaluating the effect of anticancer drugs to tumor cells]. *Gan No Rinsho*, v.34, n.1, Jan, p.13-6. 1988.

Schott, B. e J. Robert. Comparative cytotoxicity, DNA synthesis inhibition and drug incorporation of eight anthracyclines in a model of doxorubicin-sensitive and -resistant rat glioblastoma cells. *Biochem Pharmacol*, v.38, n.1, Jan 1, p.167-72. 1989.

Sengupta, S., P. Tyagi, *et al.* Etoposide encapsulated in positively charged liposomes: pharmacokinetic studies in mice and formulation stability studies. *Pharmacol Res*, v.42, n.5, Nov, p.459-64. 2000.

Shan, K., A. M. Lincoff, *et al.* Anthracycline-induced cardiotoxicity. *Ann Intern Med*, v.125, n.1, Jul 1, p.47-58. 1996.

Speth, P. A., H. Minderman, *et al.* Idarubicin v daunorubicin: preclinical and clinical pharmacokinetic studies. *Semin Oncol*, v.16, n.1 Suppl 2, Feb, p.2-9. 1989.

Stokvis, E., H. Rosing, *et al.* Liquid chromatography-mass spectrometry for the quantitative bioanalysis of anticancer drugs. *Mass Spectrom Rev*, v.24, n.6, Nov-Dec, p.887-917. 2005.

Takanashi, S. e N. R. Bachur. Adriamycin metabolism in man. Evidence from urinary metabolites. *Drug Metab Dispos*, v.4, n.1, Jan-Feb, p.79-87. 1976.

Takimoto, C. H. Can docetaxel dosing be individualized based on cytochrome p450 activity? *Nat Clin Pract Oncol*, v.2, n.9, Sep, p.446-7. 2005.

Takimoto, C. H., L. V. Kieffer, *et al.* DNA topoisomerase I inhibitors. *Cancer Chemother Biol Response Modif*, v.17, p.80-113. 1997.

Teixeira, R. S. *Associação de derivados do quimioterápico daunorrubicina a nanoemulsão lipídica que se liga aos receptores de LDL: estudos pré-clínicos.* Ciências Médicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.

- Teixeira, R. S., C. J. Valduga, *et al.* Delivery of daunorubicin to cancer cells with decreased toxicity by association with a lipidic nanoemulsion that binds to LDL receptors. *J. Pharm. Pharmacol.*, v.60, n.10, Oct, p.1287-95. 2008.
- Tewey, K. M., T. C. Rowe, *et al.* Adriamycin-induced DNA damage mediated by mammalian DNA topoisomerase II. *Science*, v.226, n.4673, Oct 26, p.466-8. 1984.
- Tokui, T., T. Takatori, *et al.* Delivery and cytotoxicity of RS-1541 in St-4 human gastric cancer cells in vitro by the low-density-lipoprotein pathway. *Cancer Chemother Pharmacol*, v.36, n.1, p.1-6. 1995.
- Valduga, C. J., D. C. Fernandes, *et al.* Use of a cholesterol-rich microemulsion that binds to low-density lipoprotein receptors as vehicle for etoposide. *J. Pharm. Pharmacol.*, v.55, n.12, Dec, p.1615-22. 2003.
- Wang, P., S. M. Henning, *et al.* Limitations of MTT and MTS-based assays for measurement of antiproliferative activity of green tea polyphenols. *PLoS One*, v.5, n.4, p.e10202. 2010.
- Washington, C. Stability of lipid emulsions for drug delivery. *Adv. Drug. Deliv. Rev.*, v.v. 20, p.p. 131-145. 1996.
- Wei, G., S. Xiao, *et al.* 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, Nov, p.1252-8. 2008.
- Weiss, R. B., G. Sarosy, *et al.* Anthracycline analogs: the past, present, and future. *Cancer Chemother Pharmacol*, v.18, n.3, p.185-97. 1986.
- Who. World Cancer Report, 2008. International Agency for Research on Cancer / World Health Organization. Lyon. 2009
- Wu, A. H. e P. L. Lane. Metaanalysis in clinical chemistry: validation of cardiac troponin T as a marker for ischemic heart diseases. *Clin Chem*, v.41, n.8 Pt 2, Aug, p.1228-33. 1995.
- Wu, J., A. Lee, *et al.* Vascular targeting of doxorubicin using cationic liposomes. *Int J Pharm*, v.337, n.1-2, Jun 7, p.329-35. 2007.
- Young, R. C., R. F. Ozols, *et al.* The anthracycline antineoplastic drugs. *N Engl J Med*, v.305, n.3, Jul 16, p.139-53. 1981.
- Zhang, J., S. Srivastava, *et al.* Manipulating microparticles with single surface-immobilized nanoparticles. *Langmuir*, v.24, n.13, Jun 1, p.6404-8. 2008.
- Zhou, S., C. Burger, *et al.* Spherical bilayer vesicles of fullerene-based surfactants in water: a laser light scattering study. *Science*, v.291, n.5510, Mar 9, p.1944-7. 2001.

Apêndice

- ✓ **Carta de aprovação do projeto - Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto Butantan**

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS
INSTITUTO BUTANTAN

Av. Vital Brazil, 1500, CEP 05503-900, São Paulo, SP, Brazil
Telefone: (55) (011) 3726-7222 ramal 2106 - Fax: (55) (011) 3726-1505

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Associação do quimioterápico daunorrubicina a uma nanoemulsão rica em colesterol: estudos de farmacocinética e regressão tumoral", protocolo nº 439/07, sob a responsabilidade de Durvanei Augusto Maria e Thais Costa Contente, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS DO INSTITUTO BUTANTAN (CEUAIB) em reunião de 12/03/2008.

"We certify that the Research entitled "Association of a chemotherapeutic agent daunorubicin to a cholesterol-rich nanoemulsion: pharmacokinetics and antitumoral activity studies", protocol nº 439/07, under the responsibility of , Durvanei Augusto Maria and Thais Costa Contente is in agreement with the Ethical Principles in Animal Research, adopted by the Brazilian College of Animal Experimentation, and was approved by the ETHICAL COMMITTEE FOR ANIMAL RESEARCH of BUTANTAN INSTITUTE in the meeting of 03/12/2008".

Vigência do Projeto: 01/2008 – 07/2010	Nº de animais/espécie 200 / camundongos C57BL/6J

São Paulo, 17 de março de 2008.

p/ Dra. Denise V. Tambourgi
Presidente da CEUAIB

De acordo:
Dr. Otávio Azevedo Mercadante
Diretor do Instituto Butantan

- ✓ **Carta de aprovação do projeto – CAPEPesq- Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas – HC/FMUSP**

APROVAÇÃO

A Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 14/05/2008, **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa nº **1100/07**, intitulado: "**ASSOCIAÇÃO DO QUIMIOTERÁPICO DAUNORRUBICINA A UMA NANOEMULSÃO RICA EM COLESTEROL: ESTUDOS DE FARMACOCINÉTICA E REGRESSÃO TUMORAL**" "apresentado pelo Departamento de **CLÍNICA MÉDICA** conforme parecer anexo.

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar à CAPPesq, os relatórios parciais e final sobre a pesquisa (Resolução do Conselho Nacional de Saúde nº 196, de 10/10/1996, inciso IX.2, letra "c").

Pesquisador (a) Responsável: **Prof. Dr. Raul Maranhão**

Pesquisador (a) Executante: **Msc. Thais Costa Contente**

CAPPesq, 19 de Maio de 2008

Prof. Dr. Eduardo Massad
Presidente da Comissão de
Ética para Análise de Projetos
de Pesquisa

Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa do HCFMUSP e da FMUSP Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo Rua Ovídio Pires de Campos, 255, 5º andar - CEP 05403 010 - São Paulo – SP Fone: 011 3069 6442 Fax: 011 3069 6492 e-mail: