



UFG

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS**

ANDRYNE REGO RODRIGUES

***ESTUDO DO PERFIL CINÉTICO E ALOMÉTRICO DO
PROTÓTIPO DE FÁRMACO ANTINEOPLÁSICO LQFM018
EM MODELOS EXPERIMENTAIS
POR LC-MS/MS***

**Goiânia
2015**

ANDRYNE REGO RODRIGUES

***ESTUDO DO PERFIL CINÉTICO E ALOMÉTRICO DO
PROTÓTIPO DE FÁRMACO ANTINEOPLÁSICO
LQFM018 EM MODELOS EXPERIMENTAIS
POR LC-MS/MS***

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Goiás como requisito para obtenção do Título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. Luiz Carlos da Cunha

**Goiânia
2015**

Ficha catalográfica elaborada automaticamente
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a), sob orientação do Sibi/UFG.

Rego Rodrigues, Andryne

Estudo do Perfil Cinético e Alométrico do Protótipo de Fármaco
Antineoplásico LQFM018 em Modelos Experimentais por LC-MS/MS
[manuscrito] / Andryne Rego Rodrigues. - 2015.
cvii, 107 f.: il.

Orientador: Prof. Dr. Luiz Carlos da Cunha.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Goiás, Faculdade
Farmácia (FF), Programa de Pós-Graduação em Ciências
Farmacêuticas, Goiânia, 2015.

Bibliografia. Anexos.

Inclui siglas, abreviaturas, símbolos, tabelas, lista de figuras, lista de
tabelas.

1. Nutlins. 2. LQFM018. 3. Farmacocinética pré-clínica. 4. LC
MS/MS. I. da Cunha, Luiz Carlos, orient. II. Título.

Dedico este trabalho

*A todos aqueles que um dia se beneficiarão com sua contribuição científica em
prol da preservação da vida e da saúde.*

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me guiar nos momentos de dúvida e indecisão.

Aos meus amados pais, pelo apoio, confiança, carinho e amor incondicionais.

À minha irmã Caroline Rego Rodrigues, por estar sempre presente nos momentos de necessidade, por seu companheirismo e cumplicidade, carinho e dedicação, não saberia agradecer o suficiente.

Ao meu querido orientador professor Dr. Luiz Carlos da Cunha, não apenas pela confiança de me ter como sua orientanda, mas também pela sua grandiosidade como pessoa, integridade moral, exemplo de humildade e simplicidade.

A todos os amigos do Núcleo de Estudos e Pesquisas Tóxico-Farmacológicas (NEPET), da Universidade Federal de Goiás (UFG), pelo apoio e amizade. Em especial ao Iury Zoghaib e Alarisse Zoghaib pela valiosa ajuda e conhecimentos compartilhados.

Aos profissionais do Laboratório de Química Farmacêutica Medicinal Ricardo Menegatti e Flávio Silva de Carvalho pela síntese da molécula estudada.

À equipe do ICF - Instituto de Ciências Farmacêuticas pela cooperação na realização das análises laboratoriais.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela bolsa de estudos e pelo apoio ao NEPET.

SUMÁRIO

	TABELAS E FIGURAS.....	X
	SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIATURAS.....	Xii
	RESUMO.....	Xiv
	ABSTRACT.....	Xv
1	INTRODUÇÃO.....	16
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	20
2.1	Câncer.....	20
2.2	Tratamento contra o câncer.....	22
2.3	Pesquisa e desenvolvimento de fármacos contra o câncer.....	25
2.4	Nutlins: A proteína p53 como alvo potencial de fármacos antitumorais.....	29
2.5	LQFM018.....	35
2.6	Farmacocinética pré-clínica.....	39
2.7	Validação de metodologias bioanalíticas.....	43
2.8	Alometria e escalas alométricas.....	46
3	OBJETIVO.....	50
4	MATERIAIS E MÉTODOS.....	51
4.1	Aspectos gerais.....	51

4.2	Aspectos éticos.....	51
4.3	Materiais.....	52
4.3.1	<i>Reagentes e animais.....</i>	52
4.3.2	<i>Equipamentos.....</i>	53
4.4	Análise instrumental.....	53
4.4.1	<i>Cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC).....</i>	53
4.4.2	<i>Preparo da solução padrão do LQFM018 e soluções reagentes.</i>	55
4.4.3	<i>Padrão interno.....</i>	56
4.4.4	<i>Extração líquido-líquido do LQFM018 da matriz biológica.....</i>	56
4.5	Validação bioanalítica.....	58
4.5.1	<i>Definição das concentrações das amostras de controle de qualidade (CQ) em plasma.....</i>	58
4.5.2	<i>Linearidade/curva de calibração.....</i>	59
4.5.3	<i>Precisão e exatidão intraensaio e interensaio.....</i>	60
4.5.4	<i>Validação por diluição.....</i>	61
4.5.5	<i>Seletividade.....</i>	61
4.5.6	<i>Recuperação.....</i>	61
4.5.7	<i>Efeito matriz.....</i>	62
4.5.8	<i>Efeito residual.....</i>	62
4.5.9	<i>Estudo da estabilidade em matriz biológica.....</i>	63
4.6	Experimentação em animais.....	64
4.7	Parâmetros farmacocinéticos.....	65
4.8	Processamento de dados.....	66

5	PUBLICAÇÃO – Artigo a ser submetido: Study of the kinetic and allometric profile of antineoplastic prototype drug LQFM018 in experimental models by LC-MS/MS.....	68
	Abstract	69
1	Introduction	70
2	Results and Discussion	71
3	Experimental Section	77
3.1	<i>General Aspects</i>	77
3.2	<i>Ethical Aspects</i>	77
3.3	<i>Materials</i>	77
3.3.1	Reagents and Animals.....	77
3.3.2	Equipments.....	78
3.4	<i>Instrumental Analysis</i>	78
3.4.1	High Performance Liquid Chromatography (HPLC).....	78
3.4.2	Standard Solution and Reagents.....	78
3.4.3	Internal Standard.....	78
3.4.4	Liquid-liquid Extraction of LQFM018.....	78
3.5	<i>Bioanalytical Validation</i>	79
3.5.1	Concentrations of Quality Control (QC) Samples in Plasma.....	79
3.5.2	Linearity/Calibration Curve.....	79
3.5.3	Precision and Accuracy.....	79
3.5.4	Dilution Validation.....	80
3.5.5	Selectivity.....	80
3.5.6	Recovery.....	80

3.5.7	Matrix Effect.....	80
3.5.8	Residual Effect.....	80
3.5.9	Stability.....	81
3.6	<i>Experiment on Animals</i>	81
3.7	<i>Pharmacokinetic Parameters</i>	82
3.8	<i>Data Processing</i>	82
4	Conclusions	82
	Acknowledgments	83
	Author Contributions	83
	Conflicts of Interest	83
	References and Notes	83
6	CONCLUSÕES	87
7	CONSIDERAÇÕES FINAIS	88
	REFERÊNCIAS	90
	ANEXOS	98
	ANEXO 1 – Parecer Consubstanciado do Comitê de Ética no Uso de Animais/CEUA da Universidade Federal de Goiás	98
	ANEXO 2 – Normas para publicação de artigos no periódico Revista <i>Molecules</i>	104
	ANEXO 3 – Justificativa para não submissão de artigo	107

TABELAS E FIGURAS

Figura 1.	Fármacos utilizados no tratamento das doenças infecciosas e do câncer.....	23
Figura 2.	Processo de pesquisa e desenvolvimento de novos fármacos.....	28
Figura 3.	Fórmulas estruturais dos análogos de nutlin.....	34
Figura 4.	Estrutura molecular do LQFM018.....	36
Figura 5.	Estrutura molecular do LQFM030.....	36
Figura 6.	Estrutura molecular do LQFM018 com o anel de piperazina em destaque.....	38
Figura 7.	Absorção, distribuição, metabolismo e excreção dos fármacos.....	40
Figura 8.	Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência acoplado ao espectrômetro de massas utilizado para as análises do LQFM018.....	54
Figura 9.	Fluxograma mostrando as etapas realizadas na extração líquido-líquido do LQFM018 a partir da matriz biológica.....	58

Artigo a ser submetido – Study of the kinetic profile of antineoplastic prototype drug LQFM018 in experimental models by LC-MS/MS

Figure 1.	(a) Chemical structure of LQFM018 prototype. (b) Chemical structure of LQFM030 prototype.....	70
Figure 2.	Calibration curve to determine the LQFM018 by HPLC-MS/MS ($r = 0.9997$).....	71
Figure 3.	Chromatograms obtained by analyzing the selectivity of	

	LQFM018 by LC-MS/MS. (a) White rat plasma (peak not found). (b) LLQ extracted from rat plasma, RT for LQFM018 of 3.16 min. (c) IS extracted from rat plasma, RT for domperidone of 1.81 min.....	72
Table 1.	Pharmacokinetic parameters of LQFM018 in rats (n = 3), submitted to dose 100 mg/kg body weight, i.p., by Pharsight software WinNonlin 5.0.....	73
Figure 4.	Kinetic profile of plasma concentrations vs time of LQFM018 at 100 mg/kg, i.p. (n = 3 ± SD), by GraphPad PRISM®, version 5.01.....	73
Table 2.	Comparison between the pharmacokinetic parameters of LQFM018 (Rodrigues, 2014) and LQFM030 (Zoghaib, 2013). Values from animals (± SD) and extrapolated to 70 kg adults through allometric scaling (Equation 4).....	75

SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIATURAS

ASC	Área sob a curva de concentração <i>versus</i> tempo
AUC	<i>Area under curve</i>
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
CI₅₀	Concentração inibitória 50% (mediana)
Cl_{T/F}	<i>Clearance</i> total com biodisponibilidade desconhecida
C_{max}	Concentração plasmática máxima
CQA	Controle de qualidade alto
CQB	Controle de qualidade baixo
CQM	Controle de qualidade médio
CV	Coefficiente de variação
DAD	Arranjo de diodos
DPR	Desvio padrão relativo
ESI	Ionização por eletrospray
FDA	Food and Drug Administration
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência, <i>high performance liquid chromatography</i>
HPV	Papiloma vírus humano
ICF	Instituto de Ciências Farmacêuticas
INCA	Instituto Nacional do Câncer
i.p.	Via intraperitoneal
IS	<i>Internal Standard</i>
i.v.	Via intravenosa
K_{el}	Constante da velocidade de eliminação
LC	Cromatografia Líquida, <i>liquid chromatography</i>
LQFM	Laboratório de Química Farmacêutica Medicinal
LIQ	Limite inferior de quantificação

MDM2	<i>Mourine double minute protein</i>
MS/MS	Espectrometria de massas em série
MTBE	Éter metil-terc-butil, methyl-tert-butyl ether
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)2,5-difenil brometo de tetrazolium
NEPET	Núcleo de Estudos e Pesquisas Tóxico-Farmacológicas
PI	Padrão interno
p.o.	Via per oral
r	Coeficiente de correlação linear
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada
t_{1/2}	Meia-vida de eliminação plasmática
t_{max}	Tempo para atingir a concentração plasmática máxima
TR	Tempo de retenção
UFG	Universidade Federal de Goiás
UV	Ultravioleta
UV-Vis	Ultravioleta visível
Vd/F	Volume de distribuição com biodisponibilidade desconhecida
vs	<i>Versus</i>

RESUMO

O composto LQFM018 é um protótipo de fármaco com comprovada atividade antineoplásica *in vitro* (citotoxicidade contra a linhagem celular K-562 com $IC_{50} = 0,07652$ mM) que foi obtida através de simplificação molecular a partir de compostos antitumorais denominados nutlins, inibidores da interação MDM2-p53. O presente trabalho objetivou a realização do estudo de seu perfil farmacocinético, empregando-se, para tal, método bioanalítico validado em LC-MS/MS. Os parâmetros analíticos utilizados em LC-MS/MS foram: coluna ACE[®] C18 (100 mm x 4,6 mm, 5 μ m), fase móvel tampão 2 mM acetato de amônio com ácido fórmico 0,025% e metanol (50%:50%, v/v), fluxo de 1,2 mL/min, temperatura da coluna de 40°C, padrão interno (PI) domperidona, extração líquido-líquido com éter metil-terc-butil (MTBE) e volume de injeção de 3,0 μ L. O método apresentou linearidade de 10 a 15.000 ng/mL ($r = 0,9997$). A precisão intracorrida variou de 0,6% a 5,5% e a intercorrida de 1,8% a 6,7%. A exatidão encontrada foi de 99,0% a 107,0% e a recuperação média dos controles foi de $74,1\% \pm 4,9\%$. Os tempos de retenção foram de 3,16 min para o LQFM018 e 1,81 min para a domperidona (PI). O LQFM018 foi administrado em três ratos Wistar na dose de 100 mg/kg, i.p. Após a administração, foram coletadas amostras de 0,5 mL de sangue, por canulação da veia jugular esquerda, com seringa heparinizada, nos tempos de 1 h, 2 h, 3 h, 4 h, 5 h, 6 h, 7 h, 8 h e 9 h. As amostras sanguíneas foram identificadas e centrifugadas para obtenção do plasma, que foi congelado a -20 °C até o momento da análise. Os parâmetros farmacocinéticos (média \pm DPR) foram: $t_{1/2} = 2,89 \pm 2,0$ h; $Cl_T/F = 22,01 \pm 13,5$ mL/min/kg; $Vd/F = 5,48 \pm 3,6$ L/kg. Os valores de Vd/F , $t_{1/2}$ e Cl_T/F extrapolados, através de escala alométrica, para um indivíduo de 70 kg foram de 1.954,3 L/kg, 12,6 h e 1800,4 mL/min/kg, respectivamente. O método bioanalítico foi adequado para a detecção e quantificação do LQFM018 em plasma de rato. O perfil farmacocinético, extrapolado em escala alométrica, apresentou alto valor de $t_{1/2}$, elevado Vd e extenso valor de Cl_T , permitindo entender que o protótipo estudado demonstrou um bom perfil de distribuição tecidual e foi extensivamente eliminado.

Palavras-chave: Nutlins. LQFM018. Farmacocinética pré-clínica. LC-MS/MS.

ABSTRACT

Study of the kinetic and allometric profile of antineoplastic prototype drug LQFM018 in experimental models by LC-MS/MS

LQFM018 is a prototype drug with proven anticancer activity *in vitro* (cytotoxicity against K-562 cell line, $IC_{50} = 0.07652$ mM), which was obtained by molecular simplification from antitumor compounds called nutlins, inhibitors of the interaction MDM2-p53. This study aimed to determine its pharmacokinetic profile, using, to this end, validated bioanalytical method in LC-MS/MS. The parameters used in analytical LC-MS/MS were: ACE[®] C18 column (100 mm × 4.6 mm, 5 μm), mobile phase buffer 2 mM ammonium acetate with 0.025% formic acid and methanol (50%:50% v/v), flow 1.2 mL/min, temperature of the column 40 °C, internal standard (IS) domperidone, liquid-liquid extraction with methyl tert-butyl ether (MTBE) and injection volume of 3.0 μL. The method was linear from 10 to 15,000 ng/mL ($r = 0.9997$). Intrarun precision was ranged from 0.6% to 5.5% and interrune from 1.8% to 6.7%. The accuracy found was 99.0% to 107.0% and the average recovery of controls was $74.1\% \pm 4.9\%$. The retention times were 3.16 min for LQFM018 and 1.81 min to domperidone. LQFM018 was administered to 3 females Wistar rats at 100 mg/kg, i.p. After administration, 0.5 mL samples of blood were collected by cannulation of the left jugular vein with heparinized syringe, at 1h, 2 h, 3 h, 4 h, 5 h, 6 h, 7 h, 8 h and 9 h. Blood samples were identified and centrifuged to obtain plasma which was frozen at -20 °C until the time of analysis. The pharmacokinetic parameters (mean ± SD) were $t_{1/2} = 2.89 \pm 2.0$ h; $Cl_T/F = 22.01 \pm 13.5$ mL/min/kg; $Vd/F = 5.48 \pm 3.6$ L/kg. The values of Vd/F , $t_{1/2}$ and Cl_T/F extrapolated using allometric scaling for a person weighing 70 kg were 1954.3 L/kg, 12.6 h and 1800.4 mL/min/kg, respectively. The bioanalytical method was suitable for the detection and quantification of LQFM018 from plasma rat. The kinetic profile, extrapolated on allometric scaling, revealed a high value of $t_{1/2}$, high Vd and long value of Cl_T , allowing understand that the studied prototype showed good tissue distribution profile and was extensively eliminated.

Keywords: Nutlins. LQFM018. Pre-clinical pharmacokinetics. LC-MS/MS.

1 INTRODUÇÃO

O câncer é uma das doenças que mais causa temor na sociedade, por ter se tornado um estigma de mortalidade e dor. Existem quase 200 tipos de câncer que correspondem aos vários sistemas de células do corpo, possuindo variedade de causas e história natural. Sua primeira definição como uma doença de mau prognóstico foi feita por Hipócrates, na Grécia, em 500 a.C. (ALMEIDA et al., 2005; NETTO; SANTOS, 2010).

O tratamento contra o câncer consiste em três abordagens principais: excisão cirúrgica, radioterapia e quimioterapia. O papel de cada uma delas dependerá do tipo de tumor e do estágio de seu desenvolvimento. A quimioterapia pode ser utilizada como terapia propriamente ou como adjuvante de outras formas de tratamento. Esses tratamentos podem provocar diversos efeitos adversos, sendo agressivos aos pacientes (RANG et al., 2012).

A procura por novos fármacos com ação antitumoral e propriedades menos agressivas se justifica pela necessidade de drogas mais seletivas para a quimioterapia antineoplásica, visto que, além dos efeitos adversos causados pelos tratamentos atuais, alguns tipos de câncer ainda não possuem terapia farmacológica adequada (PAGNO, 2004; BUSKÜHL, 2007).

Para a realização de estudos envolvendo novos fármacos há a necessidade de se passar por duas etapas: a pré-clínica e a clínica. A etapa

pré-clínica é realizada em modelos celulares e animais, enquanto a etapa clínica é feita com seres humanos. A pesquisa pré-clínica deve gerar informações que permitam justificar a realização de pesquisas em seres humanos (GOLDIM, 2007).

Os testes pré-clínicos, de maneira geral, avaliam parâmetros farmacocinéticos, farmacológicos e toxicológicos, de forma a avaliar a segurança e a eficácia dos compostos candidatos a fármacos, por meio de estudos realizados *in vitro*, *in vivo*, *in silico* e *ex vivo*. Sendo assim, os ensaios pré-clínicos tanto podem propiciar a inovação quanto interromper uma pesquisa em andamento (DICKSON; GAGNON, 2004).

Os estudos farmacocinéticos de uma substância química devem obter informações sobre sua absorção, distribuição, metabolismo e excreção, visando auxiliar o estabelecimento de uma relação entre a concentração ou a dose do fármaco com uma possível toxicidade, além de auxiliar no entendimento do mecanismo de tal ocorrência (GOMES, 2011).

Em 2004, Vassilev e colaboradores identificaram, através de análises em bibliotecas de produtos químicos sintéticos, um grupo de moléculas que possuíam atividade antitumoral *in vitro* e *in vivo*, denominando-as nutlins.

O mecanismo antitumoral desses compostos consiste em inibir a interação entre duas proteínas envolvidas no câncer: a molécula MDM2 (*murine double minute protein*) e a proteína p53 que tem atividade supressora tumoral (VASSILEV et al., 2004; ZHANG et al., 2011). A proteína MDM2 atua associando-se à molécula p53, impedindo a manifestação desta última e promovendo sua posterior destruição (VAN MAERKEN et al., 2006). Em cerca

de 50% dos tumores humanos há superprodução do inibidor MDM2 e diminuição da atividade da proteína p53 (SECCHIERO et al., 2008; PINOTTI et al., 2011).

No ano de 2011, foi desenvolvida uma linha de pesquisa no Laboratório de Química Farmacêutica Medicinal (LQFM) da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Goiás (UFG) com o intuito de obter compostos com o mesmo mecanismo de ação dos nutlins, na qual, através da simplificação molecular, conseguiu-se elaborar o desenho, a síntese e a avaliação do perfil antineoplásico de novos candidatos a protótipos de fármaco, obtidos a partir do composto nutlin-3. As moléculas obtidas foram denominadas LQFM018 e LQFM030.

As moléculas sintetizadas apresentaram atividade citotóxica contra a linhagem celular leucêmica K-562, por intermédio do método de redução do 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il) 2,5-difenil brometo de tetrazolium (MTT), e menor concentração inibitória 50% (CI₅₀) em relação a outros protótipos em estudo sendo considerados promissores agentes citotóxicos (CARVALHO, 2011; COSTA, 2011).

Considerando os resultados farmacológicos iniciais, que revelaram a ação benéfica dos protótipos LQFM018 e LQFM030 para perfil de atividade antineoplásica, e os estudos cinéticos em camundongos, já realizados pelo Núcleo de Estudos e Pesquisas Tóxico-Farmacológicas (NEPET) da UFG, entende-se que é necessário continuar estes estudos visando o estabelecimento de sua segurança, toxicidade e perfil cinético de forma mais precisa (CARVALHO, 2011; COSTA, 2011; LABRE, 2012; ZOGHAIB, 2013).

Para tal, foi necessário o desenvolvimento e a validação de uma metodologia bioanalítica, uma vez que a validação metodológica garante, por meio de estudos experimentais, que o método bioanalítico atenda às exigências das aplicações analíticas, assegurando a confiabilidade dos resultados (BRASIL, 2012).

Tendo-se em vista o exposto, o presente estudo teve como objetivo avaliar o perfil farmacocinético e alométrico do protótipo de fármaco antitumoral LQFM018 com o intuito de determinar parâmetros farmacocinéticos em ratos, via intraperitoneal, utilizando-se, para tal, método desenvolvido e validado em cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas (LC-MS/MS).

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Câncer

O câncer é uma doença caracterizada pela multiplicação e propagação descontroladas de formas anormais das próprias células corporais, ocorrendo um desvio nos mecanismos de controle que regulam a sobrevivência, proliferação e diferenciação dessas células (RANG et al., 2012; KATZUNG, 2013).

O termo neoplasia significa novo crescimento. Os termos câncer, neoplasia maligna e tumor maligno são sinônimos e distinguem-se dos tumores benignos pelas suas propriedades de dediferenciação, poder de invasão e capacidade de causar metástase, ou seja, disseminar-se para outras partes do corpo. É importante ressaltar ainda que tanto os tumores benignos quanto os malignos exibem proliferação descontrolada (RANG et al., 2012).

A doença constitui uma das principais causas de morte nos países desenvolvidos (RANG et al., 2012). Em 2005, o câncer foi a causa mais comum de morte por doença nos Estados Unidos, sendo responsável por mais de 500.000 casos fatais (KATZUNG, 2013).

No Brasil, a estimativa para o ano de 2014, que será válida também para o ano de 2015, aponta para a ocorrência de aproximadamente 576 mil casos novos de câncer, reforçando a magnitude do problema do câncer no país. Em

2030, a carga global será de 21,4 milhões de casos novos de câncer e 13,2 milhões de mortes por câncer, em consequência do crescimento e do envelhecimento da população, bem como da redução na mortalidade infantil e das mortes por doenças infecciosas em países em desenvolvimento (INCA, 2014).

A incidência, distribuição geográfica e comportamento dos diferentes tipos de câncer estão relacionados com múltiplos fatores, como sexo, idade, raça, predisposição genética e exposição a carcinógenos ambientais (KATZUNG, 2013). A maioria dos casos (cerca de 80%) está relacionada ao meio ambiente, onde é encontrado um grande número de fatores de risco. Dentre os fatores ambientais, destacam-se os agentes químicos (nitrito, álcool), físicos (radiação ultravioleta – UV) e biológicos (*Helicobacter pylori*, papiloma vírus humano – HPV). As mudanças provocadas no meio ambiente pelo próprio homem, os hábitos e estilos de vida adotados pelas pessoas podem determinar os diferentes tipos de câncer (ALMEIDA et al., 2005).

Entretanto, é sabido que modificações em genes que controlam o crescimento celular são a origem de todo câncer, sendo que estas podem ser herdadas ou adquiridas ao longo da vida do indivíduo. O aparecimento dessas características anormais reflete padrões alterados de expressão gênica nas células cancerosas em decorrência de mutações genéticas (LOPES et al., 2002; PINTO, 2005; MARTINEZ et al., 2009).

Atualmente existem variadas abordagens para tratamento de câncer. As três principais são excisão cirúrgica, irradiação e quimioterapia (RANG et al.,

2012). No campo farmacológico, os agentes antineoplásicos ou quimioterápicos antineoplásicos são medicamentos utilizados para destruir células malignas, com a finalidade de inibir o crescimento e disseminação de tumores (ALMEIDA, 2010).

2.2 Tratamentos contra o câncer

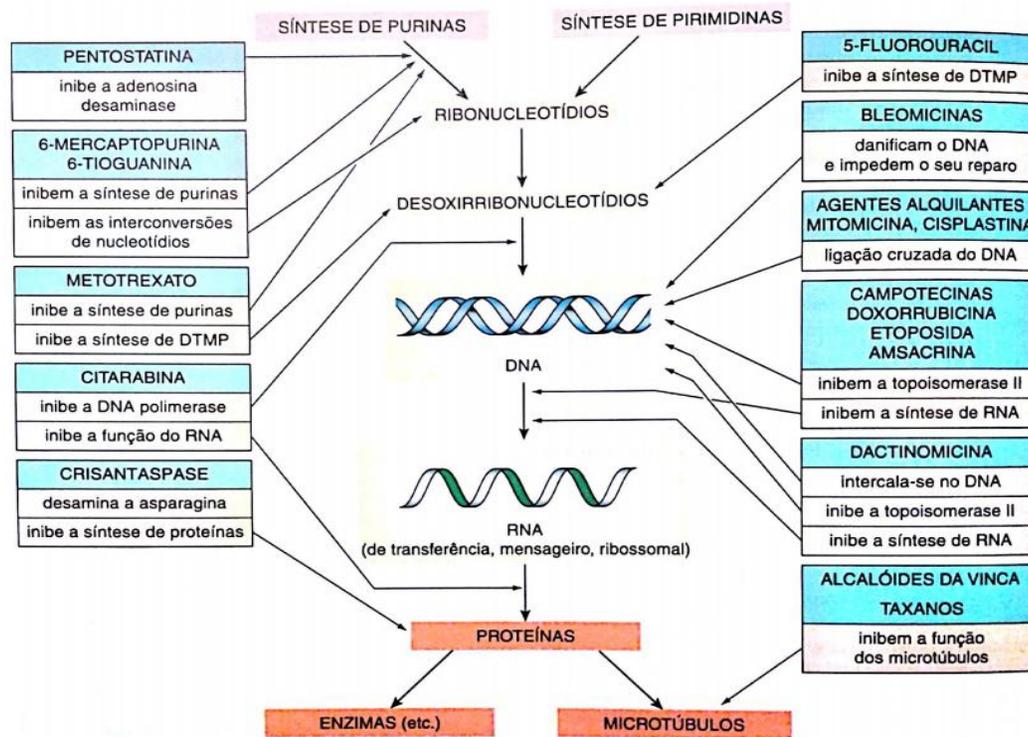
O câncer é reconhecido como entidade diagnóstica há muitos anos, entretanto, as primeiras observações de regressão tumoral induzida por fármacos datam do início da década de 1940, com as mostardas nitrogenadas. Nos próximos 50 anos, diversas tentativas de identificação em modelos experimentais de substâncias com atividade antitumoral foram realizadas (SILVA, 2010).

Nas últimas décadas, métodos de avaliação laboratorial e mecanismos intercelulares e intracelulares de câncer trouxeram à luz informações sobre o crescimento e a manutenção de células cancerosas. Etapas enzimáticas e vias de estimulação específica da célula maligna foram identificados, criando inúmeras oportunidades de intervenção farmacológica (SILVA, 2010).

Os métodos atuais de tratamento são capazes de obter a cura em cerca de 33% dos pacientes através de modalidades locais, como cirurgia ou radioterapia, que são muito efetivas quando o tumor ainda não sofreu metástase. O diagnóstico precoce pode resultar em maior taxa de cura com estes tipos de tratamento local. A quimioterapia consegue curar apenas cerca de 10 a 15% dos pacientes com câncer (KATZUNG, 2013).

O tratamento quimioterápico constitui-se de fármacos que atuam na destruição de células malignas, impedindo a formação de um novo DNA (ácido desoxirribonucleico), bloqueando funções essenciais da célula ou induzindo a apoptose. Os principais agentes quimioterápicos são os agentes citotóxicos, como os agentes alquilantes, os antibióticos citotóxicos, os antimetabólitos e os derivados vegetais (Figura 1). Hormônios e anticorpos monoclonais também estão incluídos nessa modalidade de tratamento (TARTARI et al., 2010; RANG et al., 2012).

Figura 1. Fármacos utilizados no tratamento das doenças infecciosas e do câncer.



Fonte: RANG et al., 2012.

O objetivo primário da quimioterapia é destruir as células neoplásicas, preservando as normais. Entretanto, a maioria dos agentes quimioterápicos atua de forma não-específica, lesando tanto células malignas quanto normais, particularmente as células de rápido crescimento, como as gastrointestinais, capilares e as do sistema imunológico. Isto explica a maior parte dos efeitos colaterais da quimioterapia: náuseas, perda de cabelo e maior susceptibilidade às infecções (MURAD; KATZ, 1995; MACHADO, 2000; OLIVEIRA; ALVES, 2002).

A prática da quimioterapia do câncer pode ser curativa em certas neoplasias que sofreram disseminação macroscópica ou microscópica por ocasião do diagnóstico. Há um crescente número de cânceres em que o uso da quimioterapia associada à radioterapia, seguidas de cirurgia, pode aumentar o índice de cura, incluindo o câncer de bexiga localmente avançado, câncer de mama, câncer de esôfago, cânceres de cabeça e pescoço e câncer retal (KATZUNG, 2013).

A técnica cirúrgica consiste na remoção propriamente dita de tumores. A radioterapia, geralmente raios gama, radioisótopos como cobalto-60, raios-X e até prótons e mésons pi negativos, é usada comumente em conjunto com a cirurgia, com incremento da eficiência do tratamento. A radioterapia, mesmo isoladamente, pode diminuir tumores grandes, sua recorrência e a chance de metástase, sendo uma metodologia antineoplásica muito usada (MURAD; KATZ, 1995).

A técnica antineoplásica de fotorradiação é um importante avanço no tratamento contra o câncer, pois permite a localização e a destruição com maior

seletividade pelo uso de radiação específica com fluorescência (λ de 620-640 nm), para detecção e destruição de tumores com uso de fibras óticas. Todavia, essa técnica possui a limitação de ser usada clinicamente apenas em tumores superficiais (MACHADO, 2000).

Outro tipo de tratamento mais atual consiste na utilização do estímulo das próprias defesas do corpo pela imunoterapia, como o interferon α ou a interleucina-2. Entretanto, apesar de promissora, a imunoterapia é ainda uma técnica antineoplásica adjuvante, usada especialmente para destruir as células cancerosas residuais após intervenção cirúrgica ou outro tratamento (MACHADO, 2000; ALMEIDA et al., 2005).

2.3 Pesquisa e desenvolvimento de fármacos antineoplásicos

Há mais de três décadas, enormes esforços estão sendo despendidos para desenvolver fármacos contra o câncer através de triagem empírica e planejamento racional de novos compostos (KATZUNG, 2013).

A importância da procura por novos fármacos com ação antitumoral consiste no fato de que ainda existem diversos tipos de tumores que não possuem tratamento ou são resistentes aos fármacos existentes no mercado. Existe ainda a necessidade de diminuir a agressividade dos tratamentos existentes, como a quimioterapia e a radioterapia, que afetam principalmente o sistema imunológico do paciente (NEVIN; VIJAYAMMAL, 2003). Dessa forma, a pesquisa e desenvolvimento de novos fármacos antitumorais têm sido bastante

incentivados por órgãos fomentadores e pela indústria farmacêutica (BUSKÜHL, 2007).

Uma das primeiras etapas do desenvolvimento de um novo fármaco consiste na descoberta ou síntese de uma potencial nova molécula e a busca da compreensão de sua interação com alvos biológicos apropriados. Além dos estudos *in vitro*, os efeitos biológicos relevantes, metabolismo do fármaco, perfis farmacocinéticos e avaliação de sua segurança relativa, devem ser caracterizados em animais, antes dos experimentos serem iniciados em seres humanos (YUNES et al., 2001; KATZUNG, 2013).

Dessa forma, a descoberta de uma molécula promissora, com o potencial de tornar-se medicamento, levará a experimentos para testar seus aspectos de segurança e eficácia. Estes testes são realizados em espécies animais e são denominados ensaios pré-clínicos. Os estudos pré-clínicos duram, em média, 4 anos e podem gerar custos milionários, sendo divididos, de uma maneira geral, em farmacológicos e toxicológicos. Os estudos farmacológicos abordam aspectos funcionais ou farmacodinâmicos e quantitativos ou farmacocinéticos (SILVA, 2010).

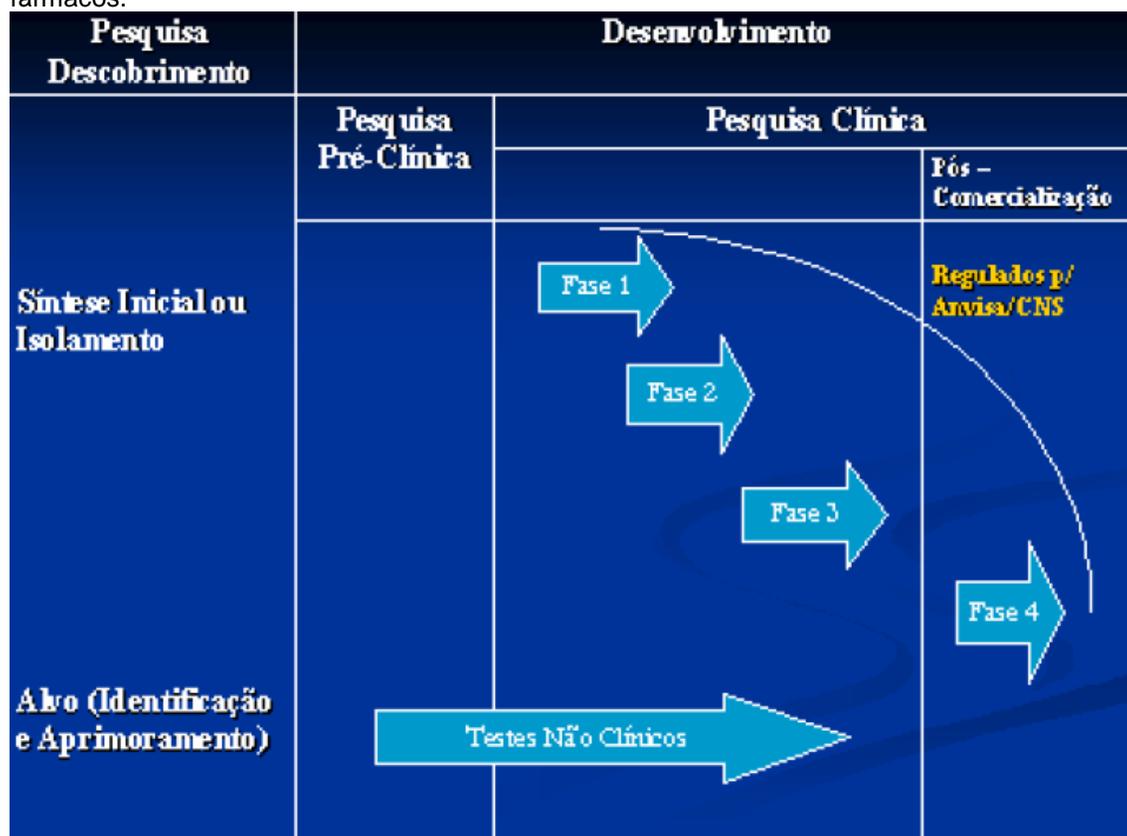
É na fase farmacêutica que se observam os principais problemas farmacotécnicos, tais como falta de solubilidade adequada, que pode comprometer a dissolução, passo determinante na ação do fármaco e estreitamente ligado à biodisponibilidade. Outros problemas que podem ser identificados nessa etapa consistem em falta de estabilidade das formulações e

propriedades organolépticas indesejáveis das mesmas (CHIN; FERREIRA, 1999).

Os agentes promissores que apresentam características aceitáveis passam para estudos clínicos de fase I, no qual, os seus efeitos farmacológicos e tóxicos são avaliados, no caso de pesquisas relacionadas ao desenvolvimento de novos fármacos antitumorais, em pacientes com câncer avançado (KATZUNG, 2013).

Os ensaios clínicos são realizados em humanos e duram, em média, 6 a 8 anos, envolvendo custos superiores a 200 milhões de dólares. Esses ensaios se dividem em quatro fases: fase I, que avalia a segurança e a faixa de dosagem; fase II, que visa estabelecer o nível de eficácia do novo fármaco; fase III, na qual haverá um aprofundamento acerca do estudo do perfil do fármaco; e fase IV, que trata da farmacovigilância (SILVA, 2010). O processo de pesquisa por novos fármacos encontra-se ilustrado na figura 2.

Figura 2. Processo de pesquisa e desenvolvimento de novos fármacos.



Fonte: OLIVEIRA et al., 2006.

Atualmente, muitos candidatos a protótipos de fármaco para tratamento de câncer encontram-se na fase de experimentos clínicos ou revisão pelo *Food and Drug Administration* (FDA). Em 2011, foi divulgada uma lista com 887 candidatos a protótipos de fármacos, dos quais muitos contemplam alta tecnologia para combater a doença, enquanto outros envolvem pesquisas inovadoras aplicadas ao melhoramento de medicamentos existentes (CASTELLANI, 2011).

Em circunstâncias ideais, os fármacos antineoplásicos devem erradicar as células cancerosas sem danificar os tecidos normais. Contudo, não existem, fármacos disponíveis totalmente desprovidos de toxicidade, o que exige, de seu

uso clínico, que os benefícios sejam confrontados com a toxicidade, buscando um índice terapêutico favorável (KATZUNG, 2013).

As classes de fármacos antitumorais recentemente desenvolvidas incluem: inibidores da transdução de sinais, que atuam em vias de sinalização críticas, essenciais para o crescimento e proliferação das células; inibidores dos microtúbulos, dirigidos contra o aparelho do fuso mitótico; agentes que induzem ao processo de diferenciação, desenvolvidos para forçar as células antineoplásicas a formar células de estágio terminal com diminuição acentuada do potencial proliferativo; agentes antimetastáticos, destinados a reduzir o potencial invasivo das células neoplásicas através de alterações nas propriedades da superfície dessas células; agentes antiangiogênicos, desenvolvidos para inibir a formação da vasculatura do tumor; agentes radiosensibilizantes tumorais e radioprotetores de tecidos normais, que objetivam aumentar a eficácia terapêutica da radioterapia; agentes citoprotetores, desenvolvidos para proteger os tecidos normais dos efeitos tóxicos da quimioterapia; e, por fim, os agentes modificadores da resposta biológica, que alteram as reações metabólicas e imunológicas entre o tumor e o hospedeiro (KATZUNG, 2013).

2.4 Nutlins: A proteína p53 como alvo potencial de fármacos antitumorais

Diversos genes encontram-se envolvidos no processo da carcinogênese, particularmente os que regulam a estabilidade e o reparo do DNA, crescimento celular, imunidade e quimio-resistência aos fármacos. Um importante grupo de

genes envolvidos nesse processo são aqueles denominados genes supressores tumorais, os quais agem como reguladores da proliferação celular. O gene p53 pertence a esse grupo e sua mutação ou inativação implica no surgimento do câncer por levar a um aumento de uma população celular com maior instabilidade genética (HARRIS; HOLLSTEIN, 1993; YONISH-ROUACH, 1997).

Mutações do gene p53 são consideradas as alterações genéticas mais freqüentes nos tumores malignos humanos, ocorrendo em cerca de 60% das neoplasias (CAVALCANTI JÚNIOR et al., 2002; PINOTTI et al., 2011).

O gene supressor tumoral p53 encontra-se situado no braço curto do cromossomo 17 e apresenta peso molecular de 20 Kb. O produto da transcrição desse gene é uma proteína nuclear de 53 kD, denominada proteína 53 ou simplesmente p53, que é uma fosfoproteína nuclear constituída de 375 aminoácidos. A proteína p53 foi descrita pela primeira vez em 1979, sendo inicialmente referida como proteína oncogênica. Somente em 1989, a proteína foi descrita como gene supressor tumoral (HARRIS; HOLLSTEIN, 1993; MOWAT, 1998; JAYRAMAN; PRIVES, 1999).

A p53 selvagem ou *wild type* é a forma funcionalmente ativa da proteína e apresenta uma estrutura molecular tetramérica, ou seja, com quatro subunidades básicas idênticas entre si. Essas subunidades são formadas por quatro domínios que representam unidades funcionais distintas. O segmento da região amino-terminal é composto por 80 aminoácidos e está relacionado com a capacidade de transativação de outros genes. O domínio localizado entre os aminoácidos 100 e 300 representa a parte central e é responsável pela

capacidade de ligação com a molécula de DNA. Na porção carboxi-terminal, localizam-se os sítios de dimerização, existindo ainda a região de tetramerização das quatro unidades básicas da molécula p53. Essas quatro subunidades da proteína p53 se juntam, constituindo a forma funcionalmente ativa da molécula que possui vida média curta, sendo degradada em torno de 6 minutos, o que pode dificultar sua detecção (WOLKOWIC; ROTTER, 1997; YONISH-ROUACH, 1997; MOWAT, 1998).

A função básica da p53 é monitorar a integridade do genoma e impedir a proliferação de células com DNA mutado. No caso de lesão no DNA por agentes físicos tais como radiação ultravioleta, raios gama ou ainda, por produtos químicos mutagênicos, o gene p53 é ativado, levando à transcrição da proteína p53. O acúmulo dessa proteína no núcleo da célula inibe o ciclo mitótico no início da fase G1 e ativa a transcrição de genes de reparo do DNA, impedindo desta forma a propagação do erro genético para as células filhas. No entanto, se o reparo do DNA não for efetuado de forma satisfatória, a proteína p53 dispara o mecanismo de morte celular programada denominado apoptose. Devido à sua ação protetora do DNA, a p53 é denominada “guardiã do genoma” (LANE, 1992; PROKOCIMER; ROTTER, 1994; MORGAN; KASTAN, 1997; ALMONG; ROTTER, 1998).

Após realizado o reparo do DNA, a proteína p53 é degradada pela ação de uma outra proteína denominada MDM2, produto do gene *mouse double minute 2* (*mdm-2*). Em células que apresentam inativação da proteína p53, devido a mutações no gene p53, não ocorre a parada do ciclo celular necessária para o reparo do DNA ou não ocorre a ativação do mecanismo de

apoptose. Essas células, geneticamente instáveis, tendem a acumular mutações e rearranjos cromossômicos adicionais, levando a uma rápida proliferação de clones de células com DNA mutado e transformação neoplásica (ALMONG; ROTTER, 1998).

A proteína p53 pode sofrer perda de sua função devido a fatores como alteração genética, interação da proteína p53 com proteínas virais, como a EBNA5 do vírus Epstein Barr, ou interação da proteína p53 com outras proteínas regulatórias do ciclo celular, como a proteína MDM2 (SOUSSE, 2000).

A proteína MDM2 é o principal regulador negativo da atividade e estabilidade da p53. A p53 ativa a expressão da MDM2 que, em resposta, a reprime, através da sua ligação ao seu domínio de transativação. A MDM2 promove a regulação da p53 através de três mecanismos: bloqueio de sua capacidade de ativar transcrição; age como uma ubiquitina ligase e promove sua degradação; e favorece seu transporte para fora do núcleo (MOMAND, 2000). Em cerca de 50% dos tumores humanos há superprodução do inibidor MDM2 e diminuição da atividade da proteína p53 (PINOTTI et al., 2011).

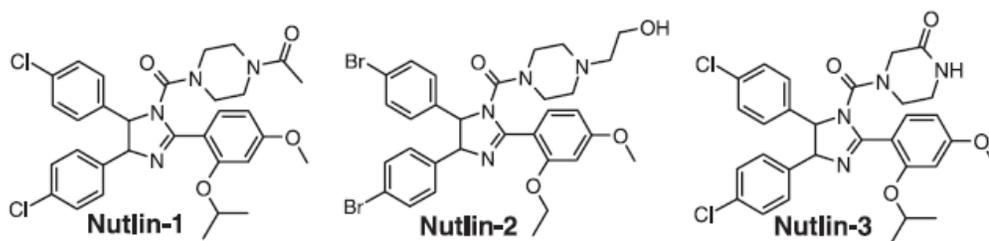
Dessa forma, a ativação da via da p53 através da inibição da MDM2 vem sendo proposta como uma nova alternativa terapêutica antitumoral, uma vez que diversos estudos têm demonstrado que a ruptura da interação p53-MDM2 por diferentes abordagens macromoleculares ou pela supressão da expressão da MDM2 pode levar à ativação da p53 e inibição do crescimento do tumor (ZHANG; WANG, 2003; ANDREOTTI et al., 2011; NAG et al., 2013).

Essas descobertas têm levado a estudos de diversos potenciais agentes antitumorais que atuem na interação p53-MDM2, tais como os nutlins, o oxindol

e o quinolinol, cuja eficácia ainda deve ser determinada (DESILET et al., 2010). Além disso, as drogas genotóxicas, doxorubicina (antibiótico da família das antraciclinas) e fosfato de etoposido (inibidor da enzima topoisomerase II) foram analisadas demonstrando induzir o acúmulo de p53 ativa (PIMENTA et al., 2013). Dentre os compostos citados, os nutlins têm recebido maior atenção por parte dos pesquisadores por conta de sua potente e específica atividade inibitória da interação p53-MDM2 (VASSILEV et al., 2004).

Os nutlins (Figura 3) são análogos da cis-imidazolina, constituindo compostos centrados em um heterociclo contendo nitrogênio que possuem a capacidade de deslocar a proteína p53 do seu complexo com a MDM2 com valores IC_{50} que variam na faixa de 100 nM a 300 nM. Teoricamente, eles se ligam ao domínio hidrofóbico do MDM2, deslocando a proteína p53. A visualização dessa ligação foi possível com o uso de análises cristalográficas da estrutura tridimensional do processo. Os nutlins mimetizam a região de ligação helicoidal da p53, interagindo com a fenda hidrofóbica da MDM2. Verificou-se que os nutlins são capazes de bloquear a ligação MDM2-p53, conduzindo a apoptose e inibição do crescimento de xenotransplantes tumorais humanos em camundongos *nude* (VASSILEV et al., 2004; SHANGARY; WANG, 2009).

Figura 3. Fórmulas estruturais dos análogos de nutlin.



Fonte: VASSILEV et al., 2004.

Portanto, os nutlins agem como antagonistas potentes e seletivos da MDM2, que ativam a via p53, ocasionando a interrupção do ciclo celular e levando à apoptose em células cancerosas que possuem o tipo selvagem do gene p53. Dessa forma, os nutlins, por proporcionarem a restauração da função do gene p53, possuem um potencial uso terapêutico excelente nos casos de tumores que retêm o tipo selvagem da proteína p53, particularmente onde a atividade de MDM2 estiver aumentada inadequadamente (VAN MAERKEN et al., 2006).

Como descrito por Vassilev et al., (2004), existem três análogos estruturais do nutlin. O nutlin-3 apresenta dois enantiômeros, dos quais, apenas um, o chamado enantiômero-a, possui atividade de interação potente, ao passo que o enantiômero-b possui atividade 150 vezes menor. O composto nutlin-3a revelou-se eficaz contra uma variedade de tumores, como neuroblastoma, linfoma, rabdiomiossarcoma e leucemia linfoblástica aguda. Estudos de alterações em sua estrutura molecular tendem a obter novos compostos com diferentes características farmacocinéticas e farmacodinâmicas (VAN

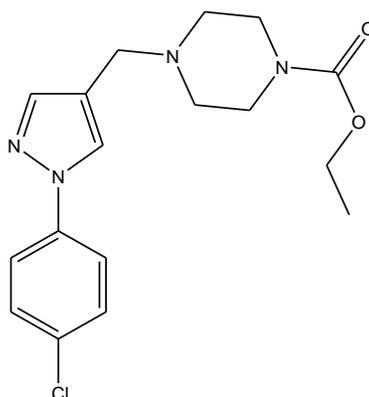
MAERKEN et al., 2006; GU et al., 2008; MIYACHI et al., 2009; TABE et al., 2009).

2.5 LQFM018

Embora os nutlins apresentem comprovada ação na inibição da ligação das proteínas p53 e MDM2, resultando em atividade antitumoral, esses compostos são moléculas grandes e muito lipossolúveis (LogP = 5,43), apresentando diversos grupamentos susceptíveis de sofrer reações metabólicas (CARVALHO, 2011; MENEGATTI, 2011; ChEMBL, 2015).

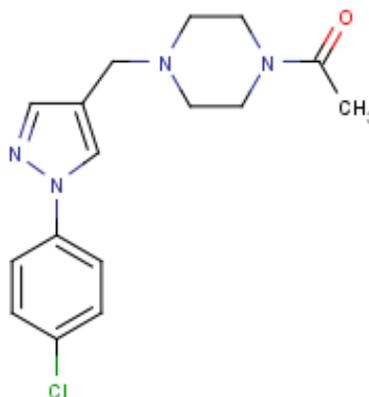
Dessa forma, o Laboratório de Química Farmacêutica Medicinal (LQFM) da Faculdade de Farmácia da UFG investiu em estudos de simplificação molecular destes compostos visando a obtenção de moléculas com mecanismo de ação semelhante, atingindo resultados promissores quanto ao novo desenho molecular, as reações de síntese e o mecanismo antineoplásico. Desta pesquisa, originaram-se novos candidatos a protótipos de fármaco, derivados do protótipo nutlin-3, o LQFM018 ((4-[1-(4-clorofenil)-1H-pirazol-4-ilmetil]-piperazin-1-ácido etil éster carboxílico) (Figura 4) e o LQFM030 (1-(4-((1-(4-clorofenil)-1H-pirazol-4-il)metil)piperazin-1-il)etanone) (Figura 5) (CARVALHO, 2011).

Figura 4. Estrutura molecular do LQFM018.



Fonte: CARVALHO, 2011.

Figura 5. Estrutura molecular do LQFM030.



Fonte: CARVALHO, 2011.

Para a síntese do LQFM018 e do LQFM030 foi empregada uma metodologia com poucas etapas de síntese e bom rendimento químico. Além disso, suas obtenções foram planejadas por meio de sínteses convergentes, demonstradas em relatório de requerimento de patentes (CARVALHO, 2011; MENEGATTI, 2011).

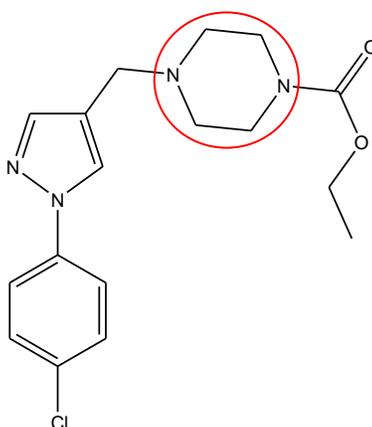
Estudos prévios demonstraram que o LQFM018 e o LQFM030 apresentaram excelentes perfis citotóxicos, aumento de sobrevivência e efeitos estatisticamente significativos identificados sobre o ciclo celular das células K-562, análises feitas através do método de exclusão do azul de tripano e método do MTT (COSTA, 2011; MENEGATTI, 2011).

O mecanismo antitumoral do composto LQFM018 decorre principalmente de necrose, embora ocorra também apoptose celular (COSTA, 2011). O grupamento piperazina presente no LQFM018 pode ser o responsável por sua ação antitumoral. Algumas atividades desse composto heterocíclico demonstram que ele pode agir em vários alvos farmacológicos. Exemplos dessas atividades são: a presença do núcleo piperazínico em uma ampla cadeia de compostos biológicos ativos anti-câncer; o fato de poder atuar bloqueando canais de cálcio; e ainda o fato de funcionar como antagonista da histamina (GILLARD et al., 2002; GUO et al., 2004; KUMAR et al., 2009).

Diversos estudos com substâncias sintéticas contendo o grupamento piperazina vêm sendo desenvolvidos, a fim de comprovar sua atividade antitumoral. Chakrapani e colaboradores (2008) avaliaram a atividade antitumoral de análogos homopiperazínicos concluindo que esses compostos possuíam atividade contra células cancerosas. Estudo realizado por Nandurkikar e colaboradores (2009) também avaliou a atividade antitumoral da piperazina e análogos homopiperazínicos, assim como estudo similar realizado por Gillet e colaboradores (1998), todos comprovaram a ação antineoplásica do grupamento químico. Comprovada a atividade farmacológica anticâncer da

piperazina e partindo-se do conhecimento de que o composto LQFM018 apresenta essa subunidade (Figura 6) em sua estrutura química, o anel piperazínico pode ser apontado como o possível responsável pela ação antitumoral do LQFM018.

Figura 6. Estrutura molecular do LQFM018 com o anel de piperazina em destaque.



Fonte: CARVALHO, 2011 (adaptação).

O LQFM018 promove diminuição da geração de espécies reativas de oxigênio e do potencial de membrana mitocondrial das células tumorais. O IC_{50} do composto é de 0,07652 mM. Testes de toxicidade oral aguda classificaram o composto como sendo de baixa toxicidade, com DL_{50} de 2.500 mg/kg (COSTA, 2011). Além disso, a molécula possui caráter lipofílico, $\log P = 2,48$ (CARVALHO, 2011).

Embora compostos antitumorais, assim como o LQFM018 e o LQFM030 sejam alvos de grande interesse pela indústria farmacêutica, ainda não existem

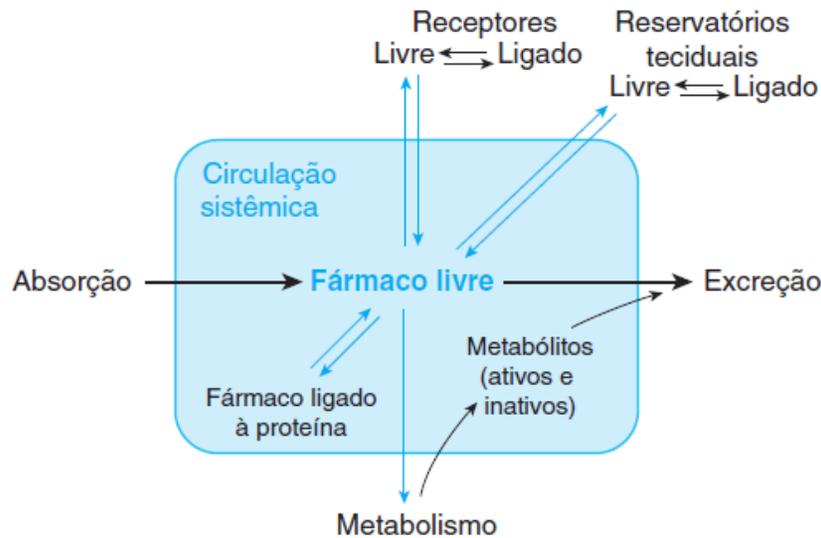
uma disponibilidade razoável de dados na literatura sobre os perfis farmacocinéticos destes agentes.

Estudos em animais auxiliam a compreensão das ações de novos protótipos a candidatos a fármacos, como o LQFM018, permitindo estabelecer seu perfil farmacocinético e com ele sua segurança e toxicidade. O conhecimento dos parâmetros farmacocinéticos básicos e o potencial de acúmulo em tecidos e órgãos da substância testada contribui com estudos de toxicidade, na avaliação da adequação e da sua relevância, possibilitando uma extrapolação para o risco e/ou avaliação de risco em humanos (GOMES, 2011).

2.6 Farmacocinética pré-clínica

A farmacocinética estuda quantitativamente a cronologia dos processos de administração, absorção, distribuição, biotransformação ou metabolismo e excreção dos fármacos (Figura 7), elucidando o movimento do fármaco através do organismo. Estudos farmacocinéticos permitem a melhor compreensão da ação de um fármaco no organismo, uma vez que a intensidade e duração dos efeitos terapêuticos dos fármacos dependem de sua absorção, distribuição, metabolismo e excreção (LIN, 1998; SILVA, 2010; FAN; LANNOY, 2014).

Figura 7. Absorção, distribuição, metabolismo e excreção dos fármacos.



Fonte: GOLAN et al., 2012. 29p.

Segundo Hodgson (2001), não importa quão ativa seja uma entidade química, ela não poderá se tornar um fármaco se não apresentar propriedades absorptivas adequadas, se distribuir para os locais corretos do organismo, não ser metabolizada de uma forma que perca instantaneamente sua atividade e ser eliminada de forma adequada. Sendo assim, a avaliação das propriedades de um composto sem o conhecimento das propriedades farmacocinéticas, mesmo em um nível rudimentar, seria inútil (FAN; LANNON, 2014).

Uma importante aplicação prática da farmacocinética é a pesquisa de aspectos da farmacocinética clínica de medicamentos novos, como, por exemplo, a meia-vida, *clearance* renal, volume aparente de distribuição, alterações de biodisponibilidade, dentre outros (LIN, 1998; SILVA, 2010). No desenvolvimento de um novo fármaco, o estudo farmacocinético é de suma

importância, sendo responsável por 60% das falhas encontradas na fase clínica (HAMSA et al., 2013).

A abordagem clássica para a determinação dos parâmetros farmacocinéticos consiste na obtenção de amostras sanguíneas ou plasmáticas, com posterior análise, a fim de determinar as concentrações do fármaco em relação a curva de tempo (GOMES, 2011; FAN; LANNOY, 2014). Os dois parâmetros básicos são a depuração, que é avaliada pela medida da capacidade do organismo de eliminar o fármaco, e o volume de distribuição, que representa a medida do espaço aparente no organismo capaz de conter o fármaco (ZHANG et al., 2011; KATZUNG, 2013).

No estudo da absorção de fármacos, diversos itens devem ser analisados. Fatores como as propriedades das moléculas do fármaco, os locais de absorção, assim como as vias de administração podem interferir em sua absorção. A distribuição e a excreção do fármaco são igualmente influenciados por esses fatores. Conseqüentemente, nem todo fármaco que é administrado torna-se disponível para uso pelo organismo. Dessa forma, a biodisponibilidade indica a porção do fármaco que atinge a circulação geral na forma inalterada, após a administração (SILVA, 2010; FAN; LANNOY, 2014).

Estudos farmacocinéticos também elucidam a concentração vs tempo de coleta, buscando parâmetros como a concentração plasmática máxima do fármaco (C_{max}); o tempo de concentração máxima do fármaco (t_{max}); e a área situada sob a curva de concentração sanguínea *versus* tempo (ASC) que é a

medida fiel da quantidade de fármaco que penetra na circulação sistêmica (SILVA, 2010).

O parâmetro da meia-vida farmacológica ($t_{1/2}$) indica o tempo necessário para que um determinado valor de concentração plasmática de um fármaco se reduza à metade, além de revelar dados importantes utilizados nas interpretações de seus efeitos terapêuticos ou tóxicos, assim como a duração destes e do adequado regime posológico (SCHELLACK, 2006; SILVA, 2010).

Em seu processo de distribuição, o fármaco é transportado pelo sangue e outros fluidos a todos os tecidos do corpo. O volume aparente de distribuição (Vd) é o parâmetro que relaciona-se com esse processo e representa o volume no qual uma dose específica do fármaco deve ser solubilizada, visando atingir a mesma concentração plasmática (SCHELLACK, 2006).

O *clearance* constitui o parâmetro farmacocinético que representa o índice de eliminação originária do compartimento central, ou seja, o sangue, e depende da constante de eliminação (K_{el}). Sendo assim, o *clearance* representa a remoção completa de determinado soluto ou substância de um volume específico do sangue em determinada unidade de tempo (SILVA, 2010).

O *clearance* é inversamente proporcional ao $t_{1/2}$ e diretamente proporcional ao Vd. Para qualquer valor de Vd, quanto maior for o *clearance* do fármaco, maior será sua eliminação; para qualquer valor da $t_{1/2}$, quanto maior o Vd, maior o *clearance* do fármaco (SILVA, 2010; FAN; LANNOY, 2014).

Entretanto, o estudo de perfil farmacocinético de protótipos ou fármacos, necessita de ferramentas analíticas adequadas à quantificação do fármaco ou de metabólitos em material biológico (FAN; LANNOY, 2014).

2.7 Validação de metodologias bioanalíticas

Dentre os métodos de determinação das concentrações de fármacos nos fluidos corporais, um dos mais utilizados são os métodos cromatográficos, como a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). Esse método apresenta como vantagens sua alta sensibilidade e ampla aplicabilidade a diversas substâncias de interesse nos vários campos da ciência. Além disso, apresenta maior rapidez e simplicidade no preparo das amostras com menor custo em relação à cromatografia gás-líquido (SKOOG et al., 2002).

A separação cromatográfica observada na cromatografia se baseia na migração diferencial dos componentes de uma mistura por diferentes interações entre as fases móvel e estacionária. Essas interações tornam diferentes as velocidades de corrida dos componentes da mistura, formando seus respectivos picos cromatográficos identificados pelos detectores, de diversos tipos e especificidades. Dentre os detectores mais utilizados, pode-se citar o de espectro de massa - MS, ultravioleta visível – UV-Vis, índice de refração e UV com detector de arranjo de diodos – DAD (CASS; DEGANI, 2001).

A Resolução RDC nº 27 de 2012 preconiza que para moléculas passíveis de análise por métodos cromatográficos, estes devem ser a primeira escolha. Esta RDC, que revogou a parte referente à validação de métodos bioanalíticos da RE nº 899 de 2003, possui como objetivo geral estabelecer os requisitos mínimos para a validação de métodos bioanalíticos empregados em estudos para registro e pós-registro de medicamentos no Brasil, servindo como guia oficial para validações de metodologias analíticas (BRASIL, 2012).

Antes da implementação de um método bioanalítico, deve ser realizada sua validação, esta deve conter ensaios que contemplem os parâmetros de precisão, exatidão, curva de calibração, efeito residual, efeito matriz, seletividade e estabilidade, conforme as características e especificações de cada ensaio, como descrito a seguir (BRASIL, 2012).

A curva de calibração é construída para constatar a relação entre a resposta do instrumento e a concentração conhecida do analito. Na curva de calibração, 75% dos padrões de calibração devem estar aprovados, incluindo o limite inferior de quantificação (LIQ) e o limite superior de quantificação (LSQ) para serem utilizados na determinação da equação. O coeficiente de correlação será aceito se for igual ou maior do que 0,98 (BRASIL, 2012).

A análise da precisão indica a proximidade dos resultados obtidos por repetidas aferições de múltiplas alíquotas de uma única fonte de matriz, ao passo que a exatidão indica a concordância entre o resultado de um ensaio e seu valor de referência. As variações desses ensaios não devem exceder 20%

e 15% para o limite inferior de quantificação e para os demais controles, respectivamente (BRASIL, 2012).

A capacidade do método em diferenciar e quantificar o analito e padrão interno na presença de outros componentes da amostra representa a seletividade. A seletividade da técnica bioanalítica deve ser capaz de evitar que picos cromatográficos interferentes nos tempos de retenção dos analitos e padrão interno, caso ocorram, não excedam em mais de 20% para os analitos e 5% para o padrão interno (BRASIL, 2012).

O efeito matriz consiste no efeito de componentes da matriz biológica sobre a resposta do analito ou do padrão interno. O coeficiente de variação obtido através do ensaio não deve ultrapassar 15% (BRASIL, 2012).

A análise do efeito residual tem por finalidade detectar qualquer aumento de sinal do analito ou padrão interno causado por contaminação proveniente de amostras analisadas anteriormente. A técnica bioanalítica deve ser capaz de evitar que picos cromatográficos interferentes e provenientes de injeções anteriores, e que tenham tempos de retenção semelhantes aos tempos de retenção dos analitos e do padrão interno não excedam em mais de 20% para os analitos e 5% para o padrão interno (BRASIL, 2012).

A recuperação consiste na eficiência de extração de um método analítico, dentro de um limite de variação. Valores próximos a 100% são desejados, porém admite-se valores menores, desde que a recuperação seja precisa e exata. O ensaio de recuperação está contido apenas na RE 899 de

2003 (BRASIL, 2003), cujo conteúdo referente à validação bioanalítica foi revogada pela vigente RDC 27 de 2012 (BRASIL, 2012).

Por fim, o estudo de estabilidade visa determinar se a concentração de um analito se mantém dentro de limites estabelecidos, numa dada matriz, sob condições específicas (BRASIL, 2012).

Estudos *in vivo*, antecedidos por suas respectivas validações bioanalíticas, são necessários para compreender as ações de novos candidatos a protótipos de fármacos, visando o estabelecimento de sua segurança e perfil farmacocinético.

Tendo em vista o potencial terapêutico do candidato a protótipo de fármaco antitumoral LQFM018, estudos acerca de seus parâmetros iniciais de caracterização cinética se fazem necessários, visando a elucidação de novas perspectivas e descobertas de possível aplicação antineoplásica, inclusive em humanos, o que exige conhecimento de pesquisa translacional, especialmente visando extrapolar os parâmetros farmacocinéticos de animais para humanos, com base em escalas alométricas (BARBOSA, 2007; FAN; LANNOY, 2014).

2.8 Alometria e escalas alométricas

Os animais são distintos entre si, possuindo formas corporais e tamanhos diferentes, o que lhes confere ajustes em suas estruturas e funções para compensar as mudanças físicas, geométricas e biológicas. O ramo da

biologia que se preocupa com essas mudanças de escala denomina-se alometria (alo = diferente; metria = medida) (BARBOSA, 2007).

Escala farmacocinética é a disciplina que prediz parâmetros farmacocinéticos em humanos baseados em dados obtidos a partir de outra espécie. A escala alométrica fundamenta-se nas diferenças de tamanho corporal, sem a necessidade de examinar seus mecanismos subjacentes, admitindo-se, portanto, que há similaridades anatômicas, fisiológicas e bioquímicas entre alguns animais, as quais podem ser descritas por modelos matemáticos (MORDENTI, 1985; LIN, 1998). Está bem estabelecido que muitos processos fisiológicos e tamanho de órgãos exibem intensa relação com o peso corporal das espécies, e essa relação é a base científica das escalas alométricas (CHAPPELL; MORDENTI, 1991).

Huxley (1936) introduziu à biologia a equação alométrica (Equação 1):

$$Y = a \cdot W^b \quad \text{Equação 1}$$

Onde Y é a variável biológica a ser mensurada; W é o peso corporal do animal ou outra medida de tamanho, como área superficial; e “a” e “b” são constantes, o coeficiente e o expoente alométrico, respectivamente. Quando o parâmetro farmacocinético é avaliado em apenas uma espécie, a equação 2 pode ser utilizada para estimar este parâmetro em humanos (BOXENBAUM, 1980; GUNTHER; MORGADO, 2003; FAN; LANNOY, 2014).

$$Y_{human} = Y_{animal} \cdot \left(\frac{W_{human}}{W_{animal}} \right)^b \quad \text{Equação 2}$$

Onde Y representa o valor do parâmetro farmacocinético e W é o peso corporal. O valor do expoente b é uma constante e está relacionado ao tipo de parâmetro a ser mensurado: 0,25 (para tempo de meia-vida); 1,0 (para volume de distribuição); e 0,75 (*clearance* renal e hepático) (JANG et al., 2001; FAN; LANNOY, 2014). O *clearance*, o volume de distribuição e o tempo de meia-vida são os três parâmetros farmacocinéticos mais frequentemente extrapolados (MAHMOOD, 2007; FAN; LANNOY, 2014).

A estimativa de valores encontrados em estudos farmacocinéticos em animais para seres humanos adultos é realizada com a finalidade de se ter uma melhor noção da realidade dos parâmetros encontrados, uma vez que é evidente que os eventos fisiológicos relacionados à absorção, distribuição, ação e eliminação de drogas no organismo de animais menores sejam diferentes daqueles observados nos animais maiores (PACHALY; BRITO, 2000).

Nesse contexto, entra o método de extrapolação alométrica interespecie que compara matematicamente animais de massas diferentes, colocando-os dentro do mesmo padrão numérico. A comparação alométrica permite que sejam calculadas doses e frequências de administração de medicamentos para indivíduos diferentes daqueles para os quais já se realizaram estudos farmacocinéticos, com base em suas necessidades energéticas (FREITAS; CARREGARO, 2013).

Dessa forma, a extrapolação de dados em animais para prever parâmetros farmacocinéticos em humanos se tornou uma importante ferramenta no processo de desenvolvimento de fármacos, tendo se tornado o

método de escolha para extrapolação interespécies. Essa extrapolação é útil ainda para selecionar a primeira dose em humanos baseada nos parâmetros farmacocinéticos estimados (BOXENBAUM; DiLEA, 1995; SHARMA; McNEIL, 2009; MAHMOOD, 2007).

3 OBJETIVO

Determinar o perfil farmacocinético e alométrico do candidato a protótipo de fármaco antitumoral LQFM018 em ratos, via intraperitoneal, através de metodologia desenvolvida e validada em LC-MS/MS e avaliar esses valores extrapolados para humanos através de escala alométrica.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Aspectos gerais

O estudo é do tipo experimental, analítico e quantitativo, e foi realizado no laboratório do Núcleo de Estudos e Pesquisas Tóxico-Farmacológicas da UFG – NEPET-UFG, no biotério da Faculdade de Farmácia da UFG e no Instituto de Ciências Farmacêuticas de Estudos e Pesquisas, ICF S/A Ltda.

4.2 Aspectos éticos

Este estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UFG (CEUA/UFG), protocolo nº 042/2013.

Os procedimentos envolvendo o manejo e cuidados com os animais foram realizados segundo preceitos legais estabelecidos pela “Lei Arouca”, Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, que regulamenta o inciso VII do § 1º do art. 225 da Constituição Federal, estabelecendo procedimentos para o uso científico de animais (BRASIL, 2008).

4.3 Materiais

4.3.1 Reagentes e animais

Para a realização dos procedimentos do estudo, foram utilizados os seguintes reagentes: propilenoglicol PA (Synth Labsynth Ltda, São Paulo, SP, Brasil); etanol PA (Tedia Brazil Produtos para Laboratórios Ltda, Rio de Janeiro, RJ, Brasil); metanol, grau HPLC (J. T. BAKER, Avantor Performance Materiais, S.A., México); MTBE (éter metil-terc-butil) grau HPLC/Espectro (Tedia Brazil Produtos para Laboratórios Ltda, Rio de Janeiro, RJ, Brasil); ácido fórmico PA (Scharlau, Scharlab S. L., Espanha); hidróxido de sódio PA (Scharlau, Scharlab S. L., Espanha); acetato de amônio PA (J. T. BAKER, Avantor Performance Materiais, S.A., México); água ultrapura, obtida do sistema Milli-Q (Millipore) utilizando o ultrapurificador de água Direct-Q Millipore (São Paulo, SP, Brasil); LQFM018, sintetizado pelo Laboratório de Química Farmacêutica Medicinal da UFG; e domperidona CRS Farmacopeia Europeia, utilizada com padrão interno (PI).

Os animais utilizados para experimentação foram ratas saudáveis, com peso médio de 197 g, idade aproximada de doze (12) semanas, provenientes do Biotério Central da UFG, em Goiânia, GO.

4.3.2 Equipamentos

Para a realização dos procedimentos foram utilizados: Balança Micro-Analítica AUW 220D (Shimadzu[®]), agitador de tubos vórtex Gomixer (MX-S[®]), concentrador de amostras (Tecnal[®] TE-019), lavadora ultrassônica ultraclear (UNIQUE[®]), Centrífuga LS-3 Plus (CELM[®]) e microcentrífuga Centrifuge 5424 (Eppendorf[®]).

4.4 Análise instrumental

4.4.1 Cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)

As análises quantitativas do LQFM018 em plasma de ratos foram realizadas por meio de HPLC Agilent Technologies 1200 series, equipado com Espectrômetro de Massas - Tandem, Applied Biosystems MDS Sciex API 3200 Triplo Quadrupolo (MS/MS) (Figura 8).

Figura 8. Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência acoplado ao espectrômetro de massas utilizado para as análises do LQFM018.



Fonte: Acervo pessoal, ICF, 2014.

Para a análise instrumental, utilizou-se coluna ACE[®] C18 (100 mm × 4,6 mm, tamanho de partícula 5µm) (*Advanced Chromatography TechnologiesLtda., Aberdeen, Scotland*), em temperatura de 40°C. A fase móvel utilizada foi tampão acetato de amônio 2 mM com ácido fórmico 0,025% e metanol (50:50), sob fluxo de 1,2 mL/min, com volume de injeção de 3µL, utilizando domperidona como padrão interno (PI) e detecção com espectrômetro de massas *Applied Biosystems MDS Sciex API 3200* Triplo quadrupolo (MS/MS). O método bioanalítico de quantificação do analito foi desenvolvido e validado segundo a Resolução RDC n° 27 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA, publicada em 17 de maio de 2012 (BRASIL, 2012). Avaliou-se a linearidade/curva de calibração, exatidão e precisões inter e intradia, recuperação, seletividade, efeito matriz, efeito residual e estabilidade.

4.4.2 *Preparo da solução padrão do LQFM018 e soluções reagentes*

Pesou-se 25 mg do composto LQFM018, que foi dissolvido e homogeneizado em metanol 50%, grau HPLC, em balão volumétrico de 10 mL, fornecendo uma solução de 2500 µg/mL. Depois foi retirada uma alíquota de 2 mL desta solução e transferida para balão volumétrico de 10 mL, completado o volume com metanol 50% e homogeneizado, obtendo-se a solução primária de 500 µg/mL. A partir desta solução estoque, preparou-se as soluções de trabalho que foram utilizadas para contaminação das amostras de plasma.

A fase móvel (metanol - acetato de amônio 2 mM com ácido fórmico 0,025% v/v) foi preparada da seguinte maneira: em proveta de 1000 mL contendo 500 mL de água ultrapura adicionou-se 77,08 mg de acetato de amônio e 125 µL de ácido fórmico. Homogeneizou-se e adicionou-se 500 mL de metanol. Homogeneizou-se e sonificou-se por 10 min.

Preparo da solução de hidróxido de sódio 0,01 M: transferiu-se 40 mg de hidróxido de sódio PA para balão volumétrico de 100 mL, solubilizou-se e avolumou-se com água ultrapura. Homogeneizou-se e sonificou-se por 5 min.

Preparo da solução de metanol 50% (v/v): em proveta de 1000 mL contendo 500 mL de água ultrapura, adicionou-se 500 mL de metanol. Homogeneizou-se e sonificou-se por 10 min. Para o preparo da solução de lavagem de agulha metanol 50% (v/v) com 0,1% de ácido fórmico utilizou-se proveta de 1000 mL contendo 500 mL de água ultrapura, adicionou-se 500 mL

de metanol e 1 mL de ácido fórmico. Homogeneizou-se e sonificou-se por 10 min.

4.4.3 Padrão interno

Como padrão interno utiliza-se, em geral, isótopo estável do fármaco a fim de que sejam minimizados possíveis efeitos de matriz do plasma. Entretanto, para o analito LQFM018 não foi possível encontrar isótopos disponíveis comercialmente, optando-se por testar os seguintes compostos disponíveis: alprazolam, citalopram, diazepam, domperidona, haloperidol, paroxetina e propranolol, escolhidos com base em seu comportamento cromatográfico e no percentual de recuperação em plasma. Elegendo-se ao final dos testes, a domperidona como padrão interno.

Para o preparo da solução padrão de domperidona, foram solubilizados 5 mg de padrão domperidona CRS (Farmacopéia Européia) em metanol 50% em um volume final de 100 mL para obter concentração de 50 µg/mL (solução de trabalho).

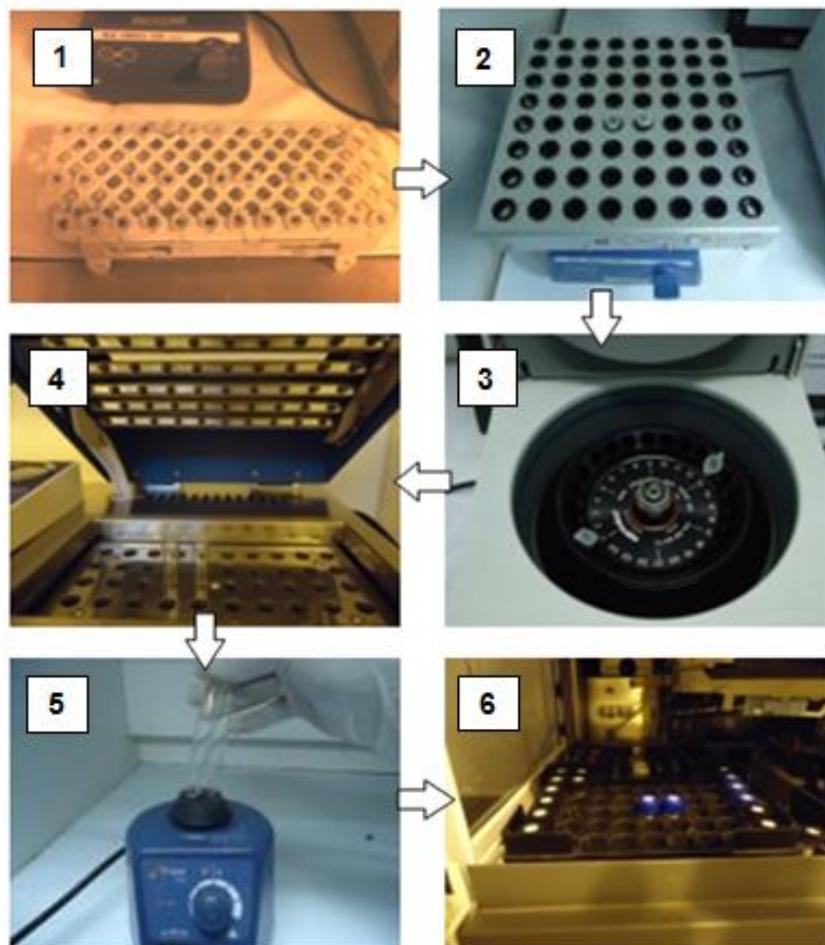
4.4.4 Extração líquido-líquido do LQFM018 da matriz biológica

As amostras de plasma coletadas dos animais foram retiradas do freezer, descongeladas a temperatura ambiente e centrifugadas por 5 min a uma velocidade de 3000 rpm.

Utilizando-se eppendorfs identificados, adicionou-se a cada um deles 125 μL de plasma, 25 μL de padrão interno (domperidona 50.000 ng/mL), 25 μL de hidróxido de sódio 0,01 M, 1000 μL de MTBE. Agitou-se em mesa agitadora por 1 min à temperatura ambiente.

Em seguida, as amostras foram centrifugadas por 5 min a 10.000 rpm a temperatura ambiente. Transferiu-se 500 μL para tubo limpo e secou-se com 10 lbf/pol a uma temperatura de 50°C. As amostras foram ressuspensas com 1000 μL de metanol 50% e agitadas em agitador (vórtex) por 1 min na velocidade máxima. Por fim, as amostras foram transferidas para vials identificados que, por sua vez, foram conduzidos para o rack do auto injetor do cromatógrafo. A sequência dos procedimentos descritos está apresentada nas etapas de 1 a 6 na figura 9.

Figura 9. Fluxograma mostrando as etapas realizadas na extração líquido-líquido do LQFM018 a partir da matriz biológica.



Fonte: Acervo pessoal, ICF, 2014.

4.5 Validação bioanalítica

4.5.1 Definição das concentrações das amostras de controle de qualidade (CQ) em plasma

As concentrações das amostras de controle de qualidade em plasma foram definidas da seguinte forma (BRASIL, 2012):

- LIQ – Concentração do LIQ: 10 ng/mL;
- CQB – Igual (ou menor) a três vezes o valor do LIQ: 30 ng/mL;
- CQM – Aproximadamente a média entre LIQ e LSQ: 7.500 ng/mL;
- CQA – 75 a 85% do LSQ: 12.000 ng/mL;
- CQD – Duas vezes o valor do CQA: 24.000 ng/mL.

O limite inferior de quantificação foi definido considerando-se a sensibilidade, a seletividade, a precisão, a exatidão e a ausência de efeito da matriz biológica. A resposta do pico cromatográfico do analito no LIQ deve ser identificável e reprodutível com precisão de no máximo 20% e exatidão entre 80 a 120% em relação a concentração nominal do padrão, através da análise de seis replicatas de padrões (BRASIL, 2012).

4.5.2 Linearidade/curva de calibração

Para determinação da curva de calibração foram analisadas amostras extraídas da matriz biológica, sendo duas amostras branco (matriz isenta de padrão do analito e do padrão interno), duas amostras zero (matriz isenta de padrão do analito) e oito amostras de concentrações diferentes (10, 30, 250, 2.500, 5.000, 7.500, 12.000 e 15.000 ng/mL) em duplicata. Essas concentrações foram definidas levando-se em consideração a sensibilidade da

técnica bioanalítica e a faixa prevista das concentrações das amostras a serem determinadas.

4.5.3 Precisão e exatidão intraensaio e interensaio

Para realização dessa análise, cinco concentrações distintas, LIQ (10 ng/mL), CQB (30 ng/mL), CQM (7.500 ng/mL), CQA (12.000 ng/mL) e CQD (24.000 ng/mL) foram analisadas em seis simplicatas. A precisão e a exatidão foram determinadas em um mesmo ensaio (precisão e exatidão intraensaio) e em ensaios diferentes (precisão e exatidão interensaio). Os ensaios foram realizados em triplicatas.

A precisão foi expressa como desvio padrão relativo (DPR) ou coeficiente de variação (CV%), segundo a equação 3.

$$CV = \frac{\text{Desvio padrão} \times 100}{\text{Concentração média experimental}} \quad \text{Equação 3}$$

A exatidão foi expressa pelo Erro Padrão Relativo (EPR), segundo a equação 4:

$$EPR = \frac{\text{Concentração média experimental} - \text{Valor nominal} \times 100}{\text{Valor nominal}} \quad \text{Equação 4}$$

4.5.4 Validação por diluição

A validação da diluição deve garantir que as diluições de concentrações superiores ao LSQ (15.000 ng/mL) da curva de calibração tenham resultados precisos e exatos. Para tal análise, utilizou-se a amostra de controle CQD (24.000 ng/mL) que corresponde ao dobro da concentração da amostra de controle CQA (12.000 ng/mL). Durante o processo de extração essa amostra foi diluída a metade e, posteriormente, extraída conforme procedimento.

4.5.5 Seletividade

As amostras branco (plasma) foram testadas a fim de se avaliar interferências nos tempos de retenção do analito e do padrão interno. Os resultados foram comparados com aqueles obtidos com uma amostra extraída de LIQ com padrão interno. Foram testadas quatro amostras normais, uma lipêmica e uma hemolisada.

4.5.6 Recuperação

Os cálculos da recuperação foram realizados comparando-se as áreas dos picos cromatográficos dos controles de qualidade (CQB, CQM e CQA) do analito extraído do plasma com as áreas dos picos cromatográficos de

amostras em solução dos controles de qualidade (CQB, CQM e CQA), denominadas amostras não extraída. O mesmo procedimento foi feito para a análise da recuperação do padrão interno.

4.5.7 Efeito matriz

Foram analisadas oito amostras de matriz biológicas processadas oriundas de fontes distintas, sendo quatro normais, duas lipêmicas e duas hemolisadas, posteriormente adicionadas de analito e padrão interno, e soluções nas mesmas concentrações das amostras de CQB e CQA.

Para o cálculo do coeficiente de variação (CV), obteve-se o fator de matriz normalizado (FMN), conforme a equação 5.

$$FMN = \frac{\textit{Resposta do analito em matriz/Resposta do PI em matriz}}{\textit{Resposta do analito em solução/Resposta do PI em solução}} \quad \text{Equação 5}$$

4.5.8 Efeito residual

Foram analisadas 3 injeções da mesma amostra branco, sendo uma antes e duas logo após a injeção de uma ou mais amostras processadas de LSQ. Os resultados foram comparados com aqueles obtidos de amostras processadas do LIQ.

4.5.9 *Estudo da estabilidade em matriz biológica*

A estabilidade do LQFM018 e do padrão interno em matriz biológica foi demonstrada por meio dos seguintes ensaios: estabilidade ciclos de congelamento e descongelamento (ECCD), estabilidade de curta duração (ECD), estabilidade pós-processamento (EPP) e estabilidade de longa duração (ELD).

Estabilidade após ciclos de congelamento e descongelamento (ECCD):

Com o objetivo de avaliar a estabilidade do LQFM 018 em matriz biológica perante o estresse de congelamento e descongelamento, foram preparadas 6 amostras nas concentrações de CQB e CQA. Estas foram mantidas congeladas por 12 horas a temperatura de -20 °C e -80 °C e então descongeladas a temperatura ambiente. Este ciclo foi repetido por 5 vezes. As amostras foram, então, extraídas e analisadas.

Estabilidade de curta duração (ECD): As amostras do estudo de estabilidade de curta duração foram processadas e analisadas após permanecerem a temperatura de 20 °C por um período de 9 horas.

Estabilidade pós-processamento (EPP): As amostras foram processadas e mantidas nas mesmas condições de análise das amostras durante o estudo, ou seja, na geladeira a temperatura de -2 °C a 8 °C por um período de 77 horas e

17 minutos e no autoinjeter à temperatura de 25 °C por um período de 78 horas e 13 minutos.

Estabilidade em solução (ESP SL): Foram utilizadas amostras da solução primária de maior concentração e da solução de trabalho de menor concentração após permanecerem por um período de 30 dias a temperatura de -2° C a 8 °C e por um período de 10 horas a temperatura de 20 °C. A estabilidade do analito e padrão interno em solução foi analisada por meio de uma diluição apropriada levando-se em consideração a faixa de medição do detector.

4.6 Experimentação em animais

Os animais foram acondicionados, para aclimação, na Sala de Experimentação Animal da Faculdade de Farmácia da UFG, por um período de 7 dias que antecederam ao experimento, à temperatura ambiente ($25 \pm 2^{\circ}\text{C}$) com umidade relativa do ar entre 50% e 70% e ciclo natural claro-escuro de 12/12 h. Receberam água filtrada e ração para roedores (Labina, Purina do Brasil Ltda., Paulínia, SP, Brasil) *ad libitum*.

Para o estudo da farmacocinética, foram utilizadas 3 ratas jovens, tendo sido administrado 100 mg/kg do LQFM018 – dose estabelecida com base em sua DL_{50} (2.500 mg/kg) (COSTA, 2011) e estudos anteriores (ZHANG et al.,

2011; LABRE, 2012; ZOGHAIB, 2013) – por via intraperitoneal no mesmo instante. O veículo utilizado para administração do composto foi etanol, propilenoglicol e água (10:50:40 v/v/v). Os animais foram anestesiados com uma solução de cetamina (87,5%) e xilazina (12,5%), administrada na dose de 0,2 mL/100g de peso do animal, i.p., e colocados em decúbito dorsal sobre suporte firme, para procedimento de canulação da veia jugular esquerda, para posterior coleta sanguínea (KOHN et al., 1997; FLECKNELL, 2009).

Realizado o procedimento de canulação venosa, iniciaram-se os procedimentos de coleta sanguínea. Foi utilizada heparina, 5 UI/mL, como anticoagulante, sendo colocada uma gota em cada tubo eppendorf e feita a ambientação das seringas antes da coleta. Foram retirados volumes de 0,5 mL de sangue, por coleta e restabelecida a homeostase por igual volume de salina estéril, nos tempos de 1 h, 2 h, 3 h, 4 h, 5 h, 6 h, 7 h, 8 h e 9 h.

Após cada coleta, as amostras sanguíneas foram identificadas (animal e tempo da coleta) e centrifugadas a 10000 rpm para obtenção do plasma, sendo armazenadas, em seguida, a -20 °C, para posterior quantificação do protótipo LQFM018, por LC-MS/MS.

4.7 Parâmetros farmacocinéticos

A obtenção dos parâmetros farmacocinéticos foi realizada observando-se os perfis individuais dos animais pertencentes ao grupo experimental. Foram

mensurados os parâmetros farmacocinéticos meia-vida ($t_{1/2}$), *clearance* (Cl), volume aparente de distribuição (Vd), área sob a curva (ASC), concentração plasmática máxima (C_{max}) e o tempo no qual essa concentração foi atingida (t_{max}).

A C_{max} foi o único parâmetro farmacocinético obtido diretamente dos dados experimentais, sendo os demais calculados a partir dos gráficos das curvas de concentração plasmática vs tempo. A meia-vida foi obtida pela análise gráfica e determinado por modelo monocompartimental, sendo este de melhor adaptação aos dados experimentais do presente estudo. O cálculo da constante de velocidade de eliminação (K_{el}) foi realizado por meio da equação $K_{el} = 0,693/t_{1/2}$. As áreas sob as curvas de concentrações plasmáticas vs tempo (ASC), ASC_{0-t} e $ASC_{0-\infty}$ foram obtidas utilizando-se para isso o método dos trapezóides. O valor obtido para o parâmetro $ASC_{0-\infty}$ foi empregado nos cálculos do *clearance* total, onde $Cl_T/F = dose/ASC_{0-\infty}$, e do Vd/F , onde $Vd/F = (Cl_T/F)/K_{el}$ (SILVA, 2010).

4.8 Processamento de dados

Os dados brutos, obtidos a partir da experimentação animal no estudo da farmacocinética pré-clínica do LQFM018, foram processados através do *software* Winnonlin 5.0, fornecido pela empresa Pharsight (St. Louis, MO,

Estados Unidos), a fim de se obter os parâmetros farmacocinéticos como volume de distribuição (Vd), meia-vida ($t_{1/2}$) e *clearance* total (Cl_T).

Os valores dos parâmetros farmacocinéticos de Vd, meia vida e *clearance* total encontrados foram convertidos, através de escala alométrica (Equação 2) (MAHMOOD, 2007; FAN; LANNOY, 2014), para valores em humanos de peso igual 70 kg. Esses valores estimados foram utilizados para posterior discussão.

$$Y_{human} = Y_{animal} \cdot \left(\frac{W_{human}}{W_{animal}} \right)^b \quad \text{Equação (2)}$$

A comparação estatística dos valores de *clearance*, tempo de meia-vida e volume de distribuição assim como a curva média de decaimento do composto testado foram feitas utilizando-se o programa GraphPad Prism® Versão 5.01, 2007. Para a análise estatística, considerou-se o valor de $p < 0.05$ e intervalo de confiança (IC) de 95%.

5 PUBLICAÇÃO

Artigo a ser submetido: Study of the kinetic and allometric profile of antineoplastic prototype drug LQFM018 in experimental models by LC-MS/MS.

Autores: Andryne Rego Rodrigues¹, Caroline Rego Rodrigues¹, Sandro Antônio Gomes², Alarisse Fachetti Zoghaib¹, Iury Valentim Zoghaib¹, Flávia Meira de Oliveira¹, Luciano Morais Lião³, Flávio Silva de Carvalho⁴, Ricardo Menegatti⁴ e Luiz Carlos da Cunha¹

¹ Núcleo de Estudos e Pesquisas Tóxico-Farmacológicas – NEPET, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, Brasil.

² Instituto de Ciências Farmacêuticas – ICF S/A, Goiânia – GO, Brasil.

³ Laboratório de RMN, Instituto de Química – IQ, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, Brasil.

⁴ Laboratório de Química Farmacêutica Medicinal – LQFM, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, Brasil.

Article

Study of the Kinetic and Allometric Profile of Antineoplastic Prototype Drug LQFM018 in Experimental Models by LC-MS/MS

Andryne Rego Rodrigues ^{1,*}, Caroline Rego Rodrigues ¹, Sandro Antônio Gomes ², Alarisse Fachetti Zoghaib ¹, Iury Valentim Zoghaib ¹, Flávia Meira de Oliveira ¹, Luciano Moraes Lião ³, Flávio Silva de Carvalho ⁴, Ricardo Menegatti ⁴ and Luiz Carlos da Cunha ¹

¹ Center of Studies and Research Toxic-Pharmacological, Faculty of Pharmacy, Federal University of Goiás, Goiania 74605-220, GO, Brazil; E-Mails: andrynerodrigues@hotmail.com (A.R.R.); lucacunha@gmail.com (L.C.C.); rodrigues.caroline.r@gmail.com (C.R.R.); alarissefz@gmail.com (A.F.Z.); iuryzoghaib@gmail.com (I.V.Z.); neri.meira@gmail.com (F.M.O.)

² Institute of Pharmaceutical Sciences, Goiania 74175-100, GO, Brazil; E-Mail: sandroagome@hotmail.com (S.A.G.)

³ Nuclear Magnetic Resonance Laboratory, Chemistry Institute, Federal University of Goiás, Goiania 74690-900, GO, Brazil; Email: luciano@quimica.ufg.br (L.M.L.)

⁴ Medicinal Pharmaceutical Chemistry Laboratory, Faculty of Pharmacy, Federal University of Goiás, Goiania 74605-220, GO, Brazil; E-Mail: rm_rj@yahoo.com (R.M.)

* Author to whom correspondence should be addressed;
E-Mail: andrynerodrigues@hotmail.com (A.R.R.);
Tel.: +55 62 3209-6329; Fax: +55 62 3209-6467.

Academic Editor:

Received: / Accepted: / Published:

Abstract: LQFM018 is a candidate to prototype antitumor drug obtained by molecular simplification from anticancer compounds called nutlins, inhibitors of the p53-MDM2 interaction. This study aimed to evaluate the pharmacokinetic of LQFM018 in rats, using a single dose of 100 mg/kg, intraperitoneal, developing, to this end, a bioanalytical method for its quantification in plasma. The bioanalytical method used the following analytical parameters: ACE[®] C18 column (100 mm × 4.6 mm, 5 μm); mobile phase: buffer 2 mM ammonium acetate with 0.025% formic acid and methanol (50%:50% v/v); flow: 1.2 mL/min; internal standard (IS): domperidone; liquid-liquid extraction with methyl tert-butyl ether (MTBE) and injection volume of 3.0 μL. The method was linear from 10 to

15,000 ng/mL, intrarun precision was ranged from 0.6% to 5.5%, interrun from 1.8% to 6.7%, accuracy from 99.0% to 107.0% and recovery of $74.1\% \pm 4.9\%$. Retention times were 3.16 min (LQFM018) and 1.81 min (IS). Pharmacokinetic parameters (mean \pm SD) were: $t_{1/2} = 2.89 \text{ h} \pm 2.0$; $Cl_T/F = 22.01 \text{ mL/min/kg} \pm 13.5$; $Vd/F = 5.48 \text{ L/kg} \pm 3.6$. Results, extrapolated to humans, revealed large half-life, high Vd and high Cl_T , allowing the comprehension that the prototype showed good tissue distribution profile and was extensively eliminated.

Keywords: Nutlins; LQFM018; pre-clinical pharmacokinetics; LC-MS/MS

1. Introduction

Nutlins are drug prototypes able to help the body fight against tumor growth, which have *in vitro* and *in vivo* antitumor activity. For this reason, they were characterized as promising drugs for strategy against cancer [1,2].

This group of molecules inhibits the interaction between two proteins involved in the cancer process: MDM2 (murine double minute protein) and p53, which has tumor suppressor activity [1,3]. MDM2 protein acts involving itself in the p53 molecule, preventing the manifestation of p53 and promoting its subsequent destruction [2]. In approximately 50% of human tumors there is overproduction of MDM2 inhibitor and decreased activity of p53 protein [4,5].

In 2011, the Medicinal Pharmaceutical Chemistry Laboratory (LQFM – Federal University of Goias) began an investigation aiming at molecular simplification of nutlins in order to synthesize less complex compounds with the same mechanism of action. Thus, from nutilin-3a it was obtained the design, synthesis and evaluation of a new anticancer profile prototype drug candidates among which LQFM018 and LQFM30 (Figure 1) were considered the most promising cytotoxic agents [6].

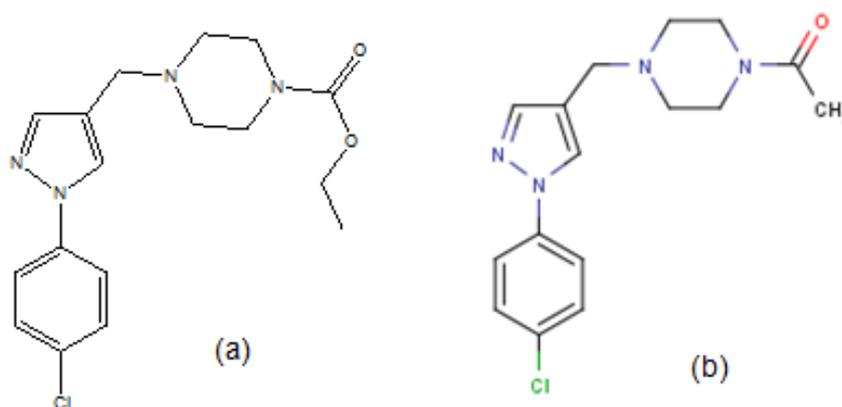


Figure 1. (a) Chemical structure of LQFM018 prototype. (b) Chemical structure of LQFM030 prototype.

The initial pharmacological results of LQFM018 showed anticancer activity and low toxicity [7]. Therefore, we understand the need of pre-clinical studies in order to understand motion of this drug candidate in body, through the elucidation of its pharmacokinetic processes.

Considering the initial pharmacological results, which revealed the beneficial action of LQFM018 prototype for anticancer activity profile and low toxicity [7], we verify the need to continue this line of studies with the performance of pre-clinical *in vivo* tests in order to better understand the action of this drug candidate in the body, through the elucidation of its pharmacokinetic processes.

Therefore, the aim of the study was to evaluate the pharmacokinetic profile of antitumor drug LQFM018 prototype in rats, developing, to this end, a bioanalytical method for detection and quantification of LQFM018 prototype in plasma, using high performance liquid chromatography method coupled with mass spectrometry (LC-MS/MS).

2. Results and Discussion

The good development of the analytical method was demonstrated by meeting the requirements recommended by ICH, 2005 [8]. The method was linear within the range 10-15000 ng/mL ($r = 0.9997$), the limit of detection was 10000 ng/mL and the higher limit of quantification, 15000 ng/mL. Figure 2 presents the linearity curve.

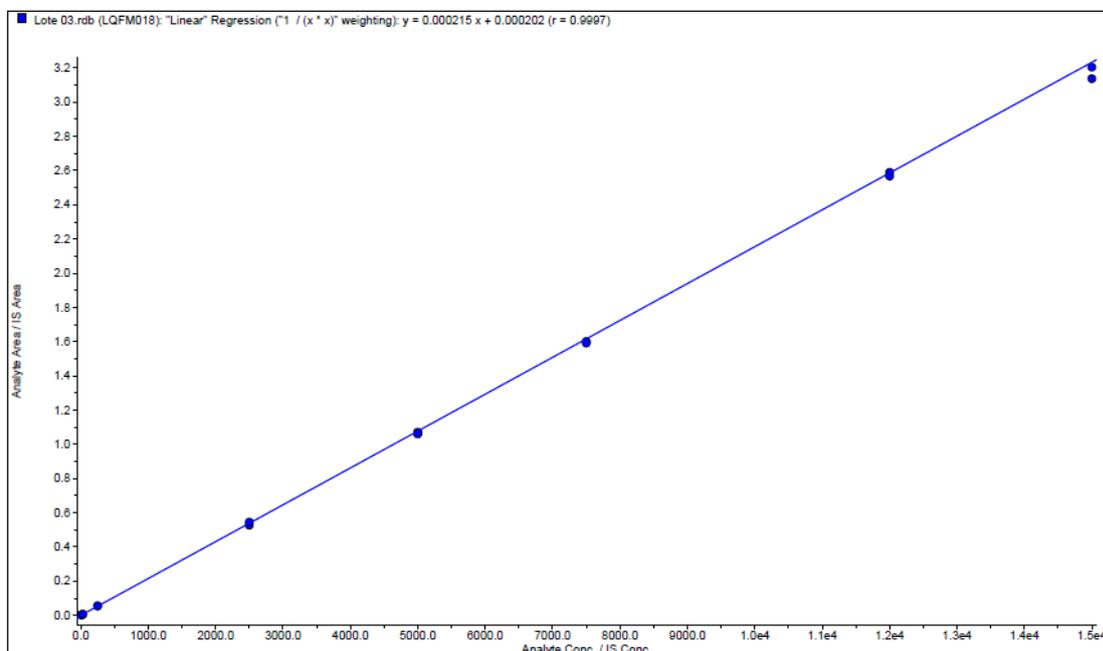


Figure 2. Calibration curve to determine the LQFM018 by HPLC-MS/MS ($r = 0.9997$).

Precision was evaluated in terms of repeatability (intrarun), resulting from 0.6% to 5.5%, and intermediate precision (interrun), resulting from 1.8% to 6.7%. The accuracy found was from 99.0% to 107.0%. The analysis of the matrix effect resulted in a 4.6% coefficient of variation (CV). Stability range was from 0.2% to 10%. During the preliminary tests, no residual effects were verified. The mean recovery of controls was $74.1\% \pm 4.9\%$. Selectivity assay confirmed no interference with the retention time of the analyte or internal standard when comparing chromatograms of blank plasma. Retention times (RT) obtained were 3.16 min (LQFM018) and 1.81 min (domperidone) (Figure 3).

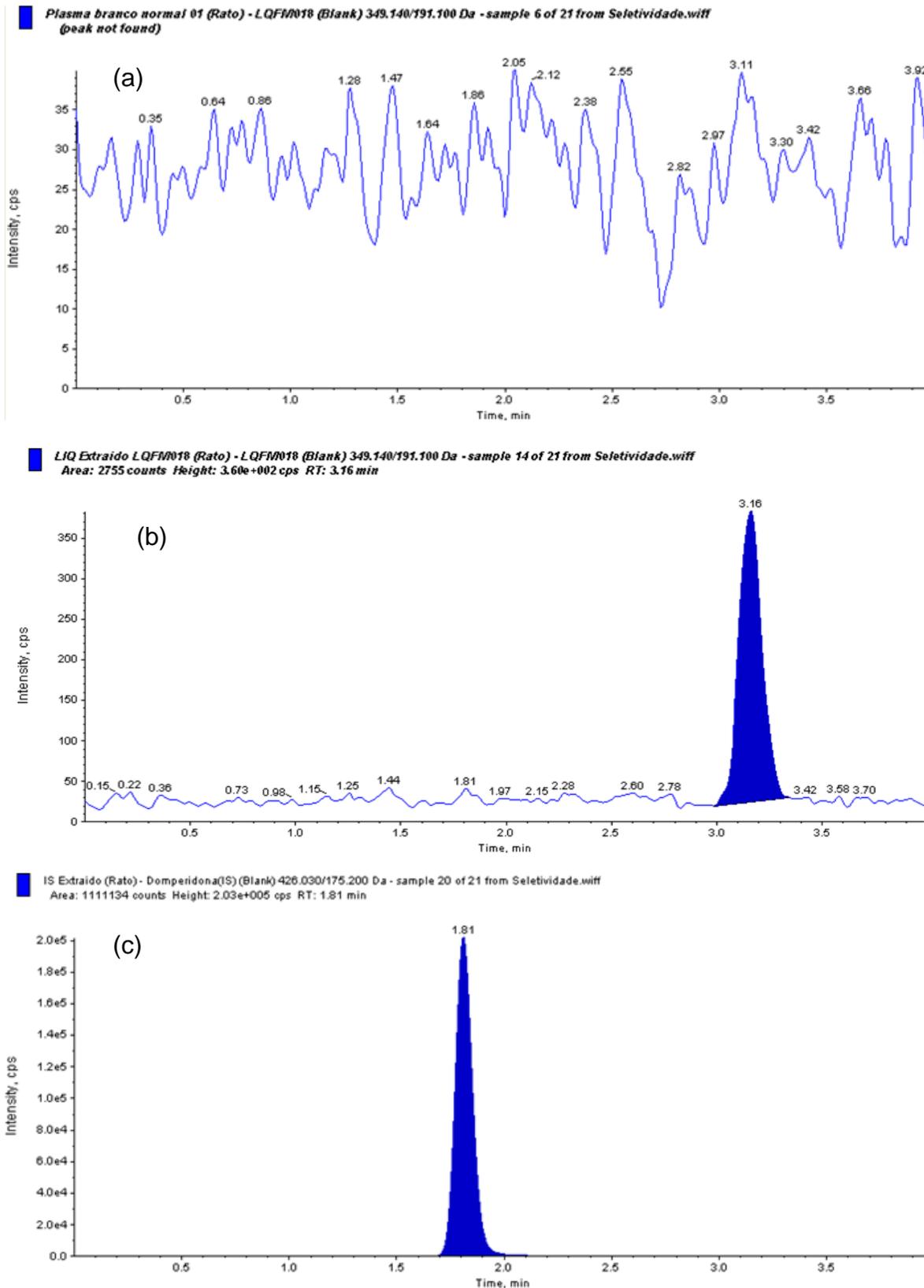


Figure 3. Chromatograms obtained by analyzing the selectivity of LQFM018 by LC-MS/MS. (a) White rat plasma (peak not found). (b) LLQ extracted from rat plasma, RT for LQFM018 of 3.16 min. (c) IS extracted from rat plasma, RT for domperidone of 1.81 min.

The method by LC-MS/MS proved to be suitable for extraction and quantification of the analyte in the biological matrix. Liquid chromatography coupled with mass spectrometry (LC-MS/MS) is a

method which has high selectivity and sensitivity and, thus, became the dominant tool for experiments involving compounds present in biological matrices [9]. Furthermore, analytical methods by LC-MS/MS show high efficiency, time reduction of methods development and high strength [10].

Pharmacokinetic parameters found are shown in Table 1. The kinetic profile of plasma concentrations versus collection time of LQFM018 (Figure 4) was determined by monocompartmental model. This model was the most adapted to the experimental data, showing an instant distribution with rapid-falling concentration and a considerable elimination phase.

Table 1. Pharmacokinetic parameters of LQFM018 in rats (n = 3), submitted to dose 100 mg/kg body weight, i.p., by Pharsight software WinNonlin 5.0.

Animal	t_{\max} (h)	C_{\max} ($\mu\text{g/mL}$)	AUC_{0-t} ($\text{h}\cdot\mu\text{g/mL}$)	AUC_T ($\text{h}\cdot\mu\text{g/mL}$)	Vd/F (L/kg)	$t_{1/2}$ (h)	Cl_T/F ($\text{mL}/\text{min}/\text{kg}$)
1	1.00	22.06	101.65	146.93	5.12	5.22	11.34
2	1.00	21.66	91.80	95.68	1.98	1.31	17.42
3	1.00	19.15	41.142	44.70	9.35	2.14	37.28
Mean \pm SD	1.00 \pm 0.0	20.96 \pm 1.5	78.20 \pm 32.4	95.77 \pm 51.1	5.48 \pm 3.6	2.89 \pm 2.0	22.01 \pm 13.5

AUC_{0-t} = area under curve of concentration versus time until blood collection time; AUC_T = area under curve of concentration versus time 0 to infinity (total); C_{\max} = maximum concentration; t_{\max} = time of the maximum concentration; $t_{1/2}$ = half-life; Vd/F = volume of distribution; Cl_T/F = total clearance.

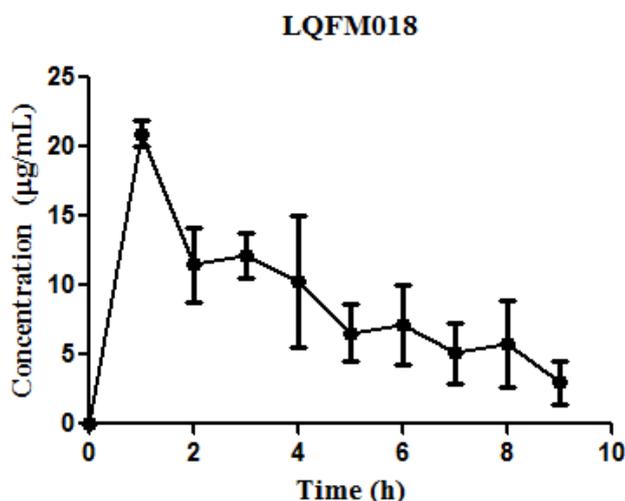


Figure 4. Kinetic profile of plasma concentrations vs time of LQFM018 at 100 mg/kg, i.p. (n = 3 \pm SD), by GraphPad PRISM[®], version 5.01.

Fundamental characteristics of each animal, such as body shape, energy expenditure from basic physiological functions, diet, reproduction and locomotion, vary according to the size and individual

body mass. Size and body weight are the most relevant attributes of the body which directly influence life processes, thus, the relationships between pharmacokinetic parameters observed and the body weight of the animal vary quantitative proportion, demonstrating that certain organic character parameters are influenced by the weight of the animal [11].

Moreover, the study of the pharmacokinetic parameters may also be influenced by experimental and clinical conditions, such as gender, species, age and disease state [12]. The weight variation of the animals in the present study ($197 \text{ g} \pm 25.1$) and the above factors explain the differences in the pharmacokinetic parameters between rats.

AUC_T and C_{max} results of this study were $95.77 \text{ mg/mL}\cdot\text{h}$ and 20.96 mg/mL , respectively, it could also be noted that the substance was rapidly absorbed, reaching its maximum concentration at 1 h (Table 1). However, these quantities themselves have limited utility since they vary with the dose administered. In practice, the shorter the time in which a substance is absorbed, the higher the plasma concentrations achieved by it in comparison with a substance which is absorbed more slowly, causing, therefore, more marked effect [12,13].

The estimated values observed in pharmacokinetic studies in animals for adult humans is performed in order to attain a better sense of reality of the found parameters, since it is clear that physiologic events related to absorption, distribution, action and elimination of drugs in smaller animals' body are different from the ones seen in those of larger animals' [14].

Scale pharmacokinetics is the discipline that predicts human pharmacokinetic parameters based on data obtained from other species. The allometric scaling is based on differences in body size, without the need to examine their underlying mechanisms, assuming, therefore, there are anatomical, physical and biochemical similarities between these species [15-17]. The relationship between these parameters is the scientific basis of allometric scaling [18]. Clearance, volume of distribution and half-life are the three most frequently extrapolated pharmacokinetic parameters [12,19].

The extrapolation of animal data to predict pharmacokinetic parameters in humans has become an important tool in drug development process. This extrapolation is useful to select the first human dose based on the estimated pharmacokinetic parameters [19,20,21].

The V_d/F obtained for the compound LQFM018 was approximately 5.5 L/kg (Table 1). V_d/F data are extrapolated, not demonstrating real physical volume [22,23]. The apparent volume of distribution (V_d) relates the amount of drug in length with the amount contained in the plasma, thus the volume of distribution may widely exceed any bodily physical volume [12,13,22,24], as happened to the V_d found in the study.

Applying allometric scaling (Equation 4) for an adult weighing 70 kg, a value of 1954.3 L/kg is found (Table 2), which suggests extravascular accumulation of the compound, with high distribution, due to the lipophilic nature of the molecule. Zoghaib (2013) [25] conducted a study with the prototype LQFM030 at dose of 100 mg/kg , by gavage, with three male rats and quantified the substance using the same analytical method of the present study, it was found a V_d of 11.4 L/kg , which in an adult of 70 kg corresponds to a very high value of 4264.0 L (Table 2). Although the two studies in question have been carried out with different compounds, there is no statistically significant difference between these results ($CI = 95\%$; $p = 0.056$). Such high volumes of distribution suggest a potential utility of the compounds in the treatment of deep tumors, including bone marrow, as it occurs for nutlin-3a [3].

Table 2: Comparison between the pharmacokinetic parameters of LQFM018 (Rodrigues, 2015) and LQFM030 (Zoghaib, 2013). Values from animals (\pm SD) and extrapolated to 70 kg adults through allometric scaling (Equation 4).

	LQFM018		LQFM030	
	Animal	Human 70 kg	Animal	Human 70 kg
Vd (L/kg)	5.48 \pm 3.6	1954.3	11.41 \pm 1.58	4.264
t _{1/2} (h)	2.89 \pm 2.0	12.6	3.61 \pm 0.68	15.6
Cl _T (mL/min/kg)	22.01 \pm 13.5	1800.4	36.49 \pm 2.24	2986.2

Vd = volume of distribution; t_{1/2} = half-life; CL_T = total clearance. No statistical differences were observed ($p < 0.05$).

A large apparent volume of distribution, such as amiodarone (4620 L/kg) and azithromycin (2170 L/kg), indicates that the drug has extensive tissue concentration compared to the plasma concentration, in other words, they are not homogeneously distributed, as the soluble substances that penetrate better peripheral compartments can accumulate in the tissues, especially fat, which usually raises the Vd far beyond the total body volume, which occurred with the molecule under study, due to its lipid solubility ($\log P = 2.48$) [6,23]. Consequently, substances with high Vd, such as morphine, tricyclic antidepressants and haloperidol are characterized by their difficult removal of the body, making it extremely dangerous and not recommended treatment with these drugs overdose. On the other hand, a low volume of distribution indicates that the substance is limited to plasma and the most perfused tissues, and this may be since the drug molecule is too large to cross the capillary wall or, more often, due to its high bind to plasma proteins [13].

The half-life obtained for the present study was approximately 2.9 hours (Table 1), which was statistically similar to the value obtained by Zoghaib (2013) [25] that was 3.6 hours (CI = 95%; $p = 0.502$). In allometric scaling, for an individual weighing 70 kg, these values correspond to 12.6 h and 15.6 h, respectively (Table 2). Half-life has practical application in interpreting the therapeutic effects, possible toxic effects, pharmacological effects, the appropriate dosing regimen and the time required for the drug is eliminated from the body [26].

The half-life value found may be regarded as a median to large value. The effects of a drug with a long half-life may last several days, for example, the half-life of chloroquine is more than 1 week, and amiodarone, almost 1 month. However, there are also drugs with extremely short half-life, such as dobutamine, of which the value is 2 to 3 minutes. Very short half-lives have the disadvantage of repeated administrations per day, whereas the ones with very long half-lives may accumulate in the body and cause toxicity [23,26].

Half-life is a parameter directly related to the volume of distribution and indirectly to the clearance, it expresses the total rate of elimination in the terminal phase of the concentration versus time curve. This occurs because for the drug to be eliminated it should be available to the agencies responsible for its degradation, which are located generally in the central compartment [26].

The total clearance value found for LQFM018 was 22.01 mL/min /kg (Table 1), resulting in a value of 1800.4 mL/min for a person weighing 70 kg (Table 2), in allometric scaling. Comparing this value with the creatinine clearance, endogenous substance that undergoes complete glomerular filtration with

minimal reabsorption and tubular secretion, of which clearance is 120 mL/min [22], it is possible to realize that the value found is about fifteen times higher, indicating greater participation of hepatic elimination mechanisms once the fact that the fat-soluble molecule of the compound requires a prior biotransformation to increase its polarity so that it can be eliminated. A similar event could be observed by Zoghaib (2013) [25], who found a clearance of 36.49 mL/min/kg, statistically similar to the present study's value (CI = 95%; $p = 0.253$), 2986.2 mL/min for a 70 kg adult (Table 2), in allometric scaling, to the LQFM030 compound.

Clearance is a direct elimination from the central compartment originally (blood) and depends on the elimination constant (K_{el}). The clearance of a drug is inversely proportional to its half-life and directly proportional to the apparent volume of distribution [22,24].

Hepatic clearance characterizes compound elimination based on the blood flow rate, thus the highest possible hepatic clearance is equal to flow rate of blood passing through the liver, which is about 1.5 L/min, in a normal adult. Drugs with a hepatic clearance close to this value would be completely removed from the blood in a single pass through the liver, making oral administration unfeasible [12,22,27].

However, renal excretion is a major route of compound elimination from the body. Compounds eliminated by renal excretion are water-soluble, have a low molecular weight or are slowly biotransformed in the liver. The drugs differ markedly in their rate of excretion by the kidneys, ranging from penicillin, which is almost completely cleared from the blood after a single pass through the kidneys, to diazepam, which is cleared extremely slowly. Therefore, the total clearance refers to the sum of all individual clearances of the drug by different organs and tissues of the body [12,13,22,26].

Labre (2012) [28] conducted a study to determine pharmacokinetic parameters of LQFM030 compound on Swiss mice undergone a dose of 100 mg/kg, i.p., finding a high value of V_d (30 L/kg), extended half-life (40 h) and clearance of 9.4 mL/min/kg. The discrepancy between these values and the values found in this study are due to differences in the allometric parameters of the species involved (rats and mice) once the comparison of pharmacokinetic parameters of LQFM018 prototype in this study and LQFM030 from Zoghaib (2013) [25] have demonstrated a statistical similarity, due, possibly, to the similarity between their chemical structures, since both were developed based on nutlin-3a chemical structure.

The determination of pharmacokinetic parameters among animals is more complicated than that among humans due to the large variety of species with anatomical and physiological differences [19]. One of the most important factors in extrapolating doses between species is the biotransformation of drugs. Different species exhibit unique characteristics that stand out in metabolizing ability [29,30].

In 2009, Bai *et al.* [31] developed and validated a method in LC/MS to identify the concentration of nutlin-3a in mice plasma. It was administered a dose of 100 mg/kg, oral route, in four mice, presenting high absorption rate with strong distribution, peaking between 3 h and 8 h and a slow process of elimination with kinetic profile indicating a two-compartment model.

Zhang *et al.* (2011) [3] carried out a study on the pharmacokinetics of nutlin-3a compound in which plasma and tissue concentrations were measured 0 to 48 hours in rats after a single intravenous dose, i.v., of 10 or 20 mg/kg or single oral dose of 50, 100 or 200 mg/kg. It was shown that after administration by the oral route, the tissue concentrations of nutlin-3a increased rapidly, reaching a maximum value at approximately 2 h, demonstrating rapid absorption. At higher concentrations of

nutlin-3a, the elimination process has proven slow, indicating saturation, making it possible to characterize non-linear elimination in higher plasma concentrations.

In conclusion, the pharmacokinetic parameters found for the prototype LQFM018 had features of rapid absorption and elimination, high distribution and tissue penetration, which could indicate it to treatment of deep tumors, as has been pointed out for nutlins on tumors in bone marrow [32]. The extrapolation of these results to humans must be very careful and only preliminary, since the disposition of drugs in rodents processes can be quite different from those found in humans [21].

This is the first study of the pharmacokinetics of LQFM018 compound. Our findings will provide subsidies for future testing with this substance, proposing the continuation of studies on the pre-clinical pharmacokinetic parameters of this candidate prototype drug.

3. Experimental Section

3.1. General Aspects

The study was conducted through procedures of experimental, analytical and quantitative type. The sites of its development was Center of Studies and Research Toxic-Pharmacological - NEPET-UFG, Institute of Pharmaceutical Sciences - ICF S/A Ltda and the bioterium of the Faculty of Pharmacy, UFG.

3.2. Ethical Aspects

This study was approved by the internal ethics committee UFG (CEUA/UFG - Protocol 042/2013).

The procedures involving the handling and care of animals were performed according to legal requirements established by "Arouca Law," Law No. 11.794, of October 8, 2008, which regulates the item VII of § 1 of Art. 225 of the Brazilian Federal Constitution, establishing procedures for scientific use of animals [33].

3.3. Materials

3.3.1. Reagents and Animals

The following reagents were used: PA propylene glycol (Synth Labsynth Ltda, São Paulo, SP, Brazil); ethanol PA (Tedia Brazil Products Laboratories Ltd., Rio de Janeiro, RJ, Brazil); methanol, HPLC grade (JT Baker, Avantor Performance Materials, SA, Mexico); MTBE (methyl tert-butyl ether) HPLC grade/Spectrum (Tedia Brazil Products Laboratories Ltd., Rio de Janeiro, RJ, Brazil); formic acid PA (Scharlau, Scharlab SL, Spain); PA sodium hydroxide (Scharlau, Scharlab SL, Spain); PA ammonium acetate (JT Baker, Avantor Performance Materials, SA, Mexico); ultrapure water, obtained from Milli-Q system (Millipore) using the Ultra Water Direct-Q Millipore (São Paulo, SP, Brazil); LQFM018, synthesized by the Medicinal Pharmaceutical Chemistry Laboratory of UFG; and domperidone CRS European Pharmacopoeia, used with internal standard (IS).

The animals were healthy female rats, with average weight of 197 g, approximate age of twelve (12) weeks from the central animal bioterium of UFG, in Goiania-GO, Brazil.

3.3.2. Equipments

The following equipments was used: Micro-Analytical Balance AUW 220D (Shimadzu), tubes stirrer vortex Gomixer (MX-S[®]), sample concentrator (Tecnal[®] TE-019), Ultraclear Ultrasonic Washer (Unique[®]) centrifuge LS-3 Plus (CELM[®]) and centrifuge 5424 microcentrifuge (Eppendorf).

3.4. Instrumental Analysis

3.4.1. High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

Quantitative analysis of LQFM018 in rat plasma were performed by HPLC Agilent Technologies 1200 series, equipped with Mass Spectrometer - Tandem, MDS Sciex Applied Biosystems API 3200 Triple Quadrupole (MS/MS).

It was used ACE[®] C18 column (100 mm × 4.6 mm, particle size 5µm) (Advanced Chromatography Technologies Ltda., Aberdeen, Scotland) at 40 °C. The mobile phase utilized was ammonium acetate buffer with 2 mM 0.025% formic acid and methanol (50:50) under flow of 1.2 mL/min with injection volume of 3µL using domperidone as internal standard (IS), and detection with mass spectrometer MDS Sciex Applied Biosystems API 3200 triple quadrupole (MS/MS). The bioanalytical method of quantification of the analyte was developed and validated according to ICH (2005) [8]. It was evaluated the linearity/calibration curve, accuracy and precision interrun and intrarun, recovery, selectivity, matrix effect, residual effect and stability.

3.4.2. Standard solution and Reagents

LQFM018 was weighed (25 mg) and subsequently dissolved and homogenized in 50% methanol, yielding a solution of 2500 mg/mL. This solution was diluted with 50% methanol, providing a primary solution of 500 mg/mL. From this stock solution, working solutions were prepared, which were used for contamination of plasma samples.

Mobile phase (methanol - ammonium acetate with 2 mM formic acid 0.025% v/v) was prepared as follows: It was added 77.08 mg of ammonium acetate and 125 µL of formic acid to ultrapure water. After homogenization, 500 mL of methanol was added.

3.4.3. Internal Standard

The following compounds were tested to select the internal standard: alprazolam, citalopram, diazepam, domperidone, haloperidol, paroxetine and propranolol. At the end of the tests, domperidone was chosen as the internal standard, based on its chromatographic behavior and recovery percentage plasma.

To prepare standard solution of domperidone, 5 mg of domperidone standard CRS (European Pharmacopoeia) were solubilized in 50% methanol in a final volume of 100 mL to obtain a concentration of 50 µg/mL (working solution).

3.4.4. Liquid-liquid Extraction of LQFM018

The plasma samples of the animals were removed from the freezer, thawed at room temperature and centrifuged for 5 min at a speed of 3000 rpm.

Using identified eppendorfs, it was added to each one 125 μL of plasma, 25 μL of internal standard (domperidone, 50,000 ng/mL), 25 μL of 0.01 M sodium hydroxide and 1000 μL of MTBE. The eppendorfs were stirred in a table shaker for 1 min at room temperature.

Then, the samples were centrifuged for 5 min at 10000 rpm at room temperature. 500 μL was transferred to clean tube and dried at 10 lbf/pol, at a temperature of 50 $^{\circ}\text{C}$. The samples were resuspended with 1000 μL of 50% methanol and vortexed for 1 min at maximum speed. Finally, the samples were transferred to vials identified which were conducted to LC-MS/MS autosampler.

3.5. Bioanalytical Validation

3.5.1 Concentrations of Quality Control (QC) Samples in Plasma

Concentrations of plasma quality control samples were defined as follows [8,34]:

- Lower Limit of Quantification (LLQ) – 10 ng/mL;
- Low Quality Control (LQC) - The same (or less) to three times the value of the LLQ: 30 ng/mL;
- Medium Quality Control (MQC) - Approximately the average between LIQ and LSQ: 7500 ng/mL;
- High Quality Control (HQC) - 75 a 85% of Higher Limit of Quantification (HLQ): 12000 ng/mL;
- Dilution Quality Control (DQC) - Twice the value of HCQ: 24000 ng/mL.

The lower limit of quantification was defined based on the sensitivity, selectivity, precision, accuracy and lack of biological effect of the matrix. The response of the chromatographic peak of the analyte in the LLQ must be identifiable and reproducible with a maximum of 20% and accuracy of 80 to 120% compared to standard nominal concentration through six replicates patterns analysis [8,34].

3.5.2. Linearity/Calibration Curve

To determine the calibration curve, the follow samples were taken from the biological matrix: two blank samples (matrix free of analyte standard and internal standard), two zero samples (matrix free of analyte standard) and eight samples of different concentrations (10, 30, 250, 2500, 5000, 7,500, 12000 and 15000 ng/mL) in duplicate. These concentrations were defined taking into consideration the sensitivity of bioanalytical technique and the predicted range of sample concentrations to be determined [8,34].

3.5.3. Precision and Accuracy

To perform this analysis, five different concentrations LLQ (10 ng/mL), LQC (30 ng/mL), MQC (7500 ng/mL), HQC (12000 ng/mL) and DQC (24000 ng/mL) were analyzed in six simplicitas. The precision and accuracy were determined in the same assay (itrarun) and in different runs (interrun). Assays were performed in triplicate [8,34].

The precision was expressed as coefficient of variation (CV%) according to equation 1 [34]:

$$CV = \frac{\textit{Standart deviation} \times 100}{\textit{Average experimental concentration}} \quad (1)$$

The accuracy was expressed by relative standard error (RSE) according to equation 2 [34]:

$$RSE = \frac{\text{Average experimental concentration} - \text{Nominal value}}{\text{Nominal value}} \times 100 \quad (2)$$

3.5.4. Dilution Validation

Dilution validation must ensure that dilutions of concentrations higher than HQC (15000 ng/mL) of the calibration curve have precise and accurate results. For this analysis, it was used CQD control sample (24000 ng/mL), corresponding to double the concentration of the control sample HQC (12000 ng/mL). During the sample extraction process, the sample was diluted to half concentration and then extracted according to the procedure [34].

3.5.5. Selectivity

The blank samples (plasma) were tested in order to assess interference in the retention times of the analyte and the internal standard. The results were compared with those obtained with an extracted sample LLQ internal standard. Four normal samples, one lipaemic and one hemolytic were tested [34].

3.5.6. Recovery

Recovery was performed comparing the areas between the chromatographic peaks of quality controls (LQC, MQC and HQC) of extracted plasma analyte and the areas of the chromatographic peaks of samples in solution of the same quality controls, called non extracted samples. The same procedure was done to analyze the recovery of the internal standard [34].

3.5.7. Matrix Effect

Eight samples were analyzed from biological matrix processed derived from different sources, four normal, two lipemic and two hemolysed, subsequently added analyte and internal standard solutions and the same concentrations of samples LQC and HQC.

For the calculation of the coefficient of variation (CV), it was obtained the normalized matrix factor (NMF), according to equation 3 [34].

$$NMF = \frac{\text{Matrix analyte response} / \text{Matrix IS response}}{\text{Solution analyte response} / \text{Solution IS response}} \quad (3)$$

3.5.8. Residual Effect

Three injections of the same blank sample were analyzed, one before and two immediately after the injection of one or more HQC samples processed. The results were compared with those obtained for the LLQ samples processed [34].

3.5.9. Stability

Stability of LQFM018 and internal standard was demonstrated by the following tests: stability cycles of freezing and thawing, short term stability, post-processing stability and long term stability [34].

Stability after freeze-thaw cycles: In order to evaluate the stability of LQFM 018 in biological matrix before the stress of freezing and thawing, were prepared 6 samples at concentrations of LQC and HQC. These were stored for 12 hours at -20 °C and -80 °C and then thawed at room temperature. This cycle was repeated 5 times. The samples were then extracted and analyzed.

Short-term stability: Samples of short term stability study were processed and analyzed after remaining the temperature to 20 °C for a period of 9 hours.

Post-processing stability: The samples were processed and maintained in the same conditions of analysis of the samples during the study or in the refrigerator at a temperature of -2 °C to 8 °C for a period 77 hours and autoinjector temperature of 25 °C for a period of 78 hours.

Stability in solution: Samples of the primary solution of higher concentration and the working solution were used of lower concentration after remaining for a period of 30 days at a temperature of -2 °C to 8 °C and for a period of 10 hours at 20 °C. The stability of the analyte and internal standard solution was analyzed by means of an appropriate dilution taking into consideration the measurement range of the detector.

3.6. Experiment on Animals

The animals were put up for acclimatization in an animal testing room of the Faculty of Pharmacy-UFG, for a period of 7 days prior to the experiment, at room temperature of 25 ± 2 °C, with relative humidity between 50% and 70% and light-dark natural cycle of 12/12 h. They received filtered water and rodent feed (Labina, Purina of Brazil Ltda., Paulinia, SP, Brazil) *ad libitum*.

For study the pharmacokinetics, it was administered 100 mg/kg of LQFM018 in 3 young rats - dose established based on its LD₅₀ [7] and previous study [3,25] - intraperitoneally. The vehicle used for administration of the compound was ethanol, propylene glycol and water (10:50:40, v/v/v). The animals were anesthetized with a solution of ketamine (87.5%) and xylazine (12.5%) administered at a dose of 0.2 mL/100 g body weight, i.p. and placed supine on a firm support, procedure for the cannulation of the left jugular vein for blood collection later [35,36].

After performed the venous cannulation procedure, the blood collection procedures started. Heparin was used, 5 IU/mL, as anticoagulant, and a drop was put in each eppendorf tube and the ambience of syringes was done before collection. Volumes of 0.5 mL of blood were taken by collecting and returning to the homeostasis of an equal volume of sterile saline at times of 1 h, 2 h, 3 h, 4 h, 5 h, 6 h, 7 h, 8 h 9 h.

After each sampling, the blood samples were identified (animal and time of collection), and centrifuged to obtain the plasma, which subsequently LQFM018 quantification of the prototype were performed by LC-MS/MS.

3.7. Pharmacokinetic Parameters

The measured pharmacokinetic parameters were half-life time ($t_{1/2}$), clearance (Cl), apparent volume of distribution (Vd), area under the time vs concentration curve (AUC), maximum plasma concentration (C_{max}) and the time to achieve it (t_{max}).

C_{max} was the only pharmacokinetic parameter obtained directly from the experimental data, and the others were calculated from the graphs of the curves from plasma concentration time. Half-life was obtained by graphical analysis and determined by monocompartment model, which best fits the experimental data from this study. Calculation of the elimination rate constant (K_{el}) was performed using equation $K_{el} = 0.693/t_{1/2}$. Areas under curves of plasma concentration vs time (AUC), $ASC_{0-\infty}$, AUC_{0-t} , were obtained using the trapezoids method. The value obtained for the $ASC_{0-\infty}$ parameter was used in the calculations of total clearance, in which $CL_T/F = \text{dose}/ASC_{0-\infty}$ and Vd/F , where $Vd/F = (CL_T/F)/K_{el}$ [22].

3.8. Data Processing

Raw data obtained from the study were processed using the software WinNonlin 5.0, supplied by the company Pharsight (St. Louis, MO, USA) to obtain pharmacokinetic parameters such as volume of distribution (Vd/F), half-life time ($t_{1/2}$) and total body clearance (CL_T/F).

The values of Vd/F, half-life and total body clearance found were converted, through allometric scaling, to a human being of 70 kg. To this end, it was used Equation 4 [12,19]. These estimated values were used for discussion.

$$Y_{\text{human}} = Y_{\text{animal}} \cdot \left(\frac{W_{\text{human}}}{W_{\text{animal}}} \right)^b \quad (4)$$

Y is the value of the pharmacokinetic parameter and W is the body weight. Exponent b is a constant and it is related to the type of the parameter to be measured: 0.25 (for half-life time); 1.0 (for volume of distribution); and 0.75 (renal and hepatic clearance) [12,37,38].

The statistical comparison by Student's t-test of clearance, half-life and volume of distribution values as well as the decay average curve of the compound LQFM018 tested with the compound LQFM0130 studied by Zoghaib (2013) [25] were made by GraphPad Prism[®] version 5.01 program, 2007. The null hypothesis is characterized by the similarity of the results, while to the alternative hypothesis, there was not similarity. It was used confidence interval (CI) of 95%.

4. Conclusions

The bioanalytical methodology for identification, detection and quantification of antineoplastic prototype LQFM018 in rat plasma using LC-MS/MS proved to be efficient to this matrix, allowing its application to pharmacokinetic study of antineoplastic LQFM018 prototype.

The pharmacokinetic profile, extrapolated in allometric scaling, presented large half-life, high volume of distribution and high plasma clearance, allowing the comprehension that the prototype studied showed a good tissue distribution profile as well as a high distribution and tissue penetration,

making it suitable for the treatment of deep tumors, as has been pointed out for nutlins on tumors in bone marrow.

Acknowledgments

We would like to thank to Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) for the financial support, Instituto de Ciências Farmacêuticas (ICF) for the support in the analyses and Laboratório de Química Farmacêutica Medicinal (LQFM) for providing the molecule.

Author Contributions

Luiz Carlos da Cunha conceived and designed the experiments; Andryne Rego Rodrigues, Caroline Rego Rodrigues, Alarisse Fachetti Zoghaib and Iury Valentim Zoghaib performed the experiments; Sandro Antônio Gomes helped in instrumental analysis, Flávia Meira de Oliveira performed the statistical part, Flávio Silva de Carvalho, Ricardo Menegatti e Luciano Morais Lião synthesized the molecule and Andryne Rego Rodrigues wrote the manuscript.

Conflicts of Interest

The authors declare no conflicts of interest.

References and Notes

1. Vassilev, L.T.; Vu, B.T.; Graves, B.; Carnival, D.; Podlaski, F.; Filipovic, Z.; Kong, N.; Kammlott, U.; Lukacs, C.; Klein, C.; Fotouhi, N.; Liu, E.A. In vivo activation of the p53 pathway by small-molecule antagonists of MDM2. *Science* **2004**, *303*, 844-848.
2. Van Maerken, T.; Speleman, F.; Vermeulen, J.; Lambertz, I.; De Clercq, S.; De Smet, E.; Yigit, N.; Coppens, V.; Philippé, J.; De Paepe, A.; Marine, J. C.; Vandesompele, J. Small-molecule MDM2 antagonists as a new therapy concept for neuroblastoma. *Cancer Res* **2006**, *66*, 9646–9655.
3. Zhang, F.; Tagen, M.; Throm, S.; Mallari, J.; Miller, L.; Guy, R.; Dyer, M.; Williams, R.; Roussel, M.; Nemeth, K.; Zhu, F.; Zhang, J.; Lu, M.; Panetta, J.; Boulos, N.; Stewart, C. Whole-body physiologically based pharmacokinetic model for Nutlin-3a in mice after intravenous and oral administration. *Drug Metab Dispos* **2011**, *39*, 1910-1915.
4. Secchiero, P.; Di Iasio, M.G.; Gonelli, A.; Zauli, G. The MDM2 inhibitor Nutlins as an innovative therapeutic tool for the treatment of haematological malignancies. *Curr. Pharm. Design* **2008**, *14*, 2100-2110.
5. Pinotti, J.A.; Silva, A.E.R.; Fiori, A.T.M.; Matsumoto, C.; Cruz, A.; Silva, N.M.O.; Bernades, A.C.A.; Carvalho, R.F.; Mazzola, P.G. Levantamento Bibliográfico de Antineoplásicos Padronizados no Hospital da Mulher. Congress of the State Universities of São Paulo Professionals - COMPUESP. São Paulo, Brazil, October 2011.

6. Carvalho, F.S. Avaliação Farmacológica e Toxicológica de Novos Candidatos a Protótipos de Fármacos Antitumorais. Master's Thesis, Federal University of Goiás, Goiânia, GO, Brasil, 2011.
7. Costa, F.B. Avaliação da Atividade Antileucêmica *in vitro* e Toxicológica *in vivo* do Composto LQFM018. Master's Thesis, Federal University of Goiás, Goiânia, GO, Brasil, 2011.
8. ICH. International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use. *ICH Harmonised Tripartite Guideline: validation of analytical procedures: text and methodology Q2(R1)*. Geneva, 2005. Available online: <http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q2_R1/Step4/Q2_R1_Guideline.pdf> (accessed on 19 December 2013).
9. Zhu, H.Y.; Zhang, X.R.; Guan, J.; Cui, B.J.; Zhao, L.S.; Zhao X. Pharmacokinetics and tissue distribution study of schisandrin B in rats by ultra-fast liquid chromatography with tandem mass spectrometry. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2013**, *78*, 136–140.
10. Prestes, O.D.; Friggi, C.A.; Adaime, M.B.; Zanella, R. QuEChERS – um método moderno de preparo de amostra para determinação multirresíduo de pesticidas em alimentos por métodos cromatográficos acoplados à espectrometria de massas. *Quim. Nova* **2009**, *32*, 1620-1634.
11. Freitas, G.C.; Carregaro, A.B. Aplicabilidade da extrapolação alométrica em protocolos terapêuticos para animais selvagens. *Ciê n Rural* **2013**, *43*, 297-304.
12. Fan, J.; Lannoy, I.A.M. Pharmacokinetics. *Biochem. Pharmacol.* **2014**, *87*, 93-120.
13. Rang, H.P.; Dale, M.M.; Ritter, J.M.; Moore, P.K. *Rang and Dale's Pharmacology* 7th ed.; Elsevier Inc: New York, EUA, 2012; pp. 99-105.
14. Pachaly, J.R.; Brito, H.F.V. Emprego do método de extrapolação alométrica no cálculo de protocolos posológicos para animais selvagens. *Hora Vet.* **2000**, *20*, 84-90.
15. Mordenti J. Forecasting cephalosporin and monobactam antibiotic half-lives in humans from data collected in laboratory animals. *Antimicrob. Agents Ch.* **1985**, *27*, 887–891.
16. Huxley, J.S.; Tessier, G. Terminology of relative growth. *Nature.* **1936**, *137*, 780-781.
17. Lin, J. H. Applications and limitations of interspecies scaling and *in vitro* extrapolation in pharmacokinetics. *Drug Metab. Dispos.*, **1998**, *26*, 1202-12.
18. Chappell, W.R.; Mordenti, J.; Extrapolation of toxicological and pharmacological data from animals to humans. *Adv. Drug Res.* **1991**, *22*, 330-330.
19. Mahmood, I. Application of allometric principles for the prediction of pharmacokinetics in human and veterinary drug development. *Adv. Drug Deliver. Rev.* **2007**, *59*, 1177-1192.
20. Boxenbaum, H.; DiLea C. First-time-in-human dose selection: allometric thoughts and perspectives. *J. Clin. Pharm.*, **1995**, *35*, 957-966.

21. Sharma, V.; McNeill, J.H. To scale or not to scale: the principles of dose extrapolation. *Brit. J. Pharmacol.* **2009**, *157*, 907-921.
22. Silva, P. *Farmacologia*, 8th ed.; Guanabara Koogan: Rio de Janeiro, Brasil, 2010; pp. 39-82.
23. Golan, D.E.; Tashjian Jr., A.H.; Armstrong, E.J.; Armstrong, A.W. *Principles of Pharmacology: The Pathophysiologic Basis of Drug Therapy*. 3rd ed.; Lippincott Williams & Wilkins: Philadelphia, EUA, 2012; pp. 34-40.
24. Katzung, B.G. *Basic & Clinical Pharmacology*, 12th ed.; Mc Graw Hill: New York, 2013; pp. 37-69.
25. Zoghaib, I.V.J. Avaliação Pré-clínica do Perfil Farmacocinético do Protótipo Antitumoral LQFM030 em Ratos por LC-MS/MS. Master's Thesis, Federal University of Goais, Goiânia, GO, Brasil, 2013.
26. Pinto, L.S.R. Síntese, Atividade Antibacteriana e Farmacocinética Pré-clínica de Pró-farmaco do Etambutol com Potencial Terapêutico para Meningite Tuberculosa. Master's Thesis, São Paulo State University of Júlio de Mesquita Filho, Araraquara, SP, Brasil, 2010.
27. Watanabe T, Kusuhara H, Maeda K, Shitara Y, Sugiyama Y. Physiologically based pharmacokinetic modeling to predict transporter-mediated clearance and distribution of pravastatin in humans. *J Pharmacol Exp Ther.* **2009**, *328*, 652-662.
28. Labre, L.V.Q. Avaliação Pré-Clínica do Perfil Farmacocinético do Protótipo Antitumoral LQFM030 em Roedores. Master's Thesis, Federal University of Goias, Goiânia, GO, Brazil, 2012.
29. Van Miert, A.S. Extrapolation of pharmacological and toxicological data based on metabolic weight. *Arch. Exp. Vet. Med.* **1989**, *43*, 481-488.
30. Riviere, J.E.; Martin-Jimenez, T.; Sundlof, S.F.; Craigmill, A.L. Interspecies allometric analysis of the comparative pharmacokinetics of 44 drugs across veterinary and laboratory animal species. *J. Vet. Pharmacol. Ther.* **1997**, *20*, 453-463.
31. Bai, F.; Zhu, F.; Tagen, M.; Miller, L.; Owens, T. S.; Mallari, J.; Derrick, E.; Zhang, F.; Stewart, C. F. Determination of nutlin-3a in murine plasma by liquid chromatography electrospray ionization tandem mass spectrometry (LC-ESI-MS/MS). *J of Pharm Biomed. Anal.* **2010**, *51*, 915-920.
32. Menegatti, R. Uso de novos derivados (((fenil)-1H-pirazol-4-il)metil)piperazinínicos como anti-tumorais, composições farmacêuticas contendo os mesmos e processos de preparação. BRA Patent 221106814546 A1, April 2011.
33. Palácio do Planalto. Available online: http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2007-2010/2008/lei/111794.htm (accessed on 3 april 2014).

34. Resolução RDC nº 27, de 17 de maio de 2012. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Available online: <http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/564310004b60537e891f9baf8fded4db/RDC+27+12+Valida%C3%A7%C3%A3o+de+M%C3%A9todos+Bioanal%C3%ADticos.pdf?MOD=AJPERES> (accessed on 19 June 2013).
35. Flecknell, P. *Laboratory Animal Anaesthesia*, 3rd ed.; Elsevier Inc: San Diego, EUA, 2009; pp. 274.
36. Kohn, D.F.; Wixson, S.K.; White, W.J.; Benson, G.J. *Anaesthesia and analgesia in laboratory animals*, 1st ed.; Academic Press: New York, EUA, 1997; pp. 165-200
37. Gunther, B.; Morgado, E. Body mass and body weight: a dual reference system in biology. *Revista Chilena de História Natural*, **2003**, *76*, 57-64.
38. Jang, G.R.; Harris, R.Z.; Lau, D.T. Pharmacokinetics and its role in small molecule drug discovery research. *Med. Res. Rev.* **2001**, *21*, 382–396.

Sample Availability: Samples of the compounds are available from the authors.

© 2015 by the authors; licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>)

6 CONCLUSÕES

A metodologia bioanalítica em LC-MS/MS desenvolvida para identificação, detecção e quantificação do protótipo de fármaco antineoplásico LQFM018 demonstrou ser eficiente em plasma de ratos, enquadrando-se dentro de critérios de validação oficiais, o que possibilitou sua aplicação ao estudo do perfil farmacocinético do referido protótipo.

O perfil farmacocinético do LQFM018, extrapolado para um indivíduo adulto com o uso de escala alométrica, apresentou extenso valor de meia-vida de eliminação, elevado volume de distribuição e alto valor de *clearance* plasmático, permitindo entender que o protótipo estudado deve ter ampla distribuição tecidual e foi extensivamente eliminado, o que o torna indicado para o tratamento de tumores profundos, como já ressaltado para os nutlins.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente trabalho foi desenvolvido como a primeira tentativa de realizar o estudo farmacocinético pré-clínico do protótipo antitumoral LQFM018. Espera-se que os resultados aqui obtidos possam gerar novas perspectivas acerca do composto em questão, produzindo subsídios para estudos subsequentes. Nesse ponto, ressalta-se a necessidade da continuidade do estudo através da realização da administração de outras doses do protótipo a fim de verificar a linearidade de sua cinética e a obtenção de dados através da via intravascular para cálculo da biodisponibilidade do LQFM018.

Ademais, ainda é necessário determinar a taxa de ligação às proteínas plasmáticas, os metabólitos formados e a percentagem de excreção renal, visando conhecer a exata contribuição dos mecanismos de eliminação por metabolismo e por excreção renal (filtração glomerular, secreção e reabsorção tubular ativa), buscando, além disso, o aprimoramento da técnica experimental aplicada aos modelos animais.

A falta de estudos prévios com o composto em questão dificulta a compreensão dos resultados encontrados, devido ao fato de ser uma molécula nova sem relatos descritos na literatura. Em consequência, a comparação dos resultados aqui encontrados foi feita com resultados obtidos em estudos farmacocinéticos para moléculas similares em termos de estrutura química e mecanismo de ação. Outrossim, novos estudos com o composto LQFM018, que foram aprovados

juntamente com o presente (Protocolo n° 042/2013, CEUA/UFG), já estão sendo realizados.

A potencialidade do composto LQFM018 em se tornar, no futuro, um agente antineoplásico utilizado na prática clínica, deixa clara a necessidade da obtenção de novos dados acerca do mesmo, ressaltando que a presente pesquisa foi apenas o primeiro passo para o entendimento desse promissor protótipo antineoplásico.

REFERÊNCIAS

ALMEIDA, J. R. C. *Farmacêuticos em oncologia: uma nova realidade*. 2. ed. São Paulo: Atheneu, 2010.

ALMEIDA, V. L.; LEITÃO, A.; REINA, L. C. B.; MONTANARI, C. A.; DONNICI, C. L. Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-celular específicos e ciclo-celular não específicos que interagem com o DNA: uma introdução. *Quim. Nova*, v. 28, n. 1, p. 118-129, 2005.

ALMONG, A.; ROTTER, V. An insight into life of p53: a protein coping with many functions! *Biochem Biophys Acta*, v. 1378, n. 3, p. 43-54, 1998.

ANDREOTTI, V.; CIRIBILLI, Y.; MONTI, P.; BISIO, A.; LION, M.; JORDAN, J.; FRONZA, G.; MENICHINI, P.; RESNICK, M. A.; INGA, A. p53 transactivation and the impact of mutations, cofactors and small molecules using a simplified yeast-based screening system. *PLoS One*, v. 6, n. 6, 2011.

BAI, F.; ZHU, F.; TAGEN, M.; MILLER, L.; OWENS, T. S.; MALLARI, J.; DERRICK, E.; ZHANG, F.; STEWART, C. F. Determination of nutlin-3a in murine plasma by liquid chromatography electrospray ionization tandem mass spectrometry (LC-ESI-MS/MS). *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 51, n. 4, p. 915–920, 2010.

BARBOSA, L. A. *Leis de Escala Alométricas para as Taxas Metabólicas Interespecíficas e para Cadeias Alimentares*. 2007. 112 f. Dissertação (Doutorado em Ciências) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2007.

BOXENBAUM, H. Interspecies variation in liver weight, hepatic blood flow, and antipyrine intrinsic clearance in extrapolation of benzodiazepines and phenytoin. *J Pharmacokinet Biopharm.*, v. 8, n. 2, p. 165–176, 1980.

BOXENBAUM, H.; DiLEA C. First-time-in-human dose selection: allometric thoughts and perspectives. *Journal of Clinical Pharmacology*, v. 35, n. 10, p.957-966, 1995.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RE 899 de 29 de maio de 2003. Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/4983b0004745975da005f43fbc4c6735f/RE_899_2003_Determina+a+publica%C3%A7%C3%A3o+do+Guia+para+valida%C3%A7%C3%A3o+de+m%C3%A9todos+anal%C3%ADticos+e+bioanal%C3%ADticos.pdf?MOD=AJPERES>. Acesso em: 13 nov. 2013.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC 27 de 17 de maio de 2012. Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. Disponível em:

<http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2012/rdc0027_17_05_2012.pdf>. Acesso em: 13 nov. 2013.

BRASIL, Presidência da República, Casa Civil, Subchefia para assuntos jurídicos. Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008. Regulamenta o inciso VII do § 1º do art. 225 da Constituição Federal, estabelecendo procedimentos para o uso científico de animais; revoga a Lei nº 6.638, de 8 de maio de 1979; e dá outras providências. Disponível em: <http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2007-2010/2008/lei/l11794.htm>. Acesso em: 3 abr. de 2014.

BUSKÜHL, H. *Avaliação in vitro do mecanismo de ação citotóxica de lactonas sesquiterpênicas e outras substâncias isoladas de Vermonia scorpiodes (LAM) PERS.* 2007. 118 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade do Vale do Itajaí, Itajaí, 2007. Disponível em: <<http://siaibib01.univali.br/pdf/Humberto%20Buskuhl.pdf>>. Acesso em: 31 mai. 2013.

CARVALHO, F. S. *Avaliação farmacológica e toxicológica de novos candidatos a protótipos de fármacos antitumorais.* 2011. 95 f. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) – Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2011.

CASS, Q. B.; DEGANI, A. L. G. *Desenvolvimento de métodos por HPLC: fundamentos, estratégias e validação.* São Carlos: EdUFSCar, Série Apontamentos, 2001.

CASTELLANI, J. *Medicines in development for cancer.* 2011 Report. Washington, DC: Pharmaceutical Research and Manufacturers of America, 2011. Disponível em: <http://www.phrma.org/sites/default/files/1000/medicinesindevelopmentcancer2011_0.pdf>. Acesso em: 31 mai. de 2013.

CAVALCANTI JÚNIOR, G. B.; KLUMB, C. E.; MAIA, R. C. P53 e as hemopatias malignas. *Rev Bras Cancerologia*, v. 48, n. 3, p. 419-427, 2002.

CHAKRAPANI, H.; KALATHUR, R. C.; MACIAG, A. R.; CITRO, M. L.; XINHUA, J. I. X.; KEEFER, L. K.; SAAVEDRA, J. E. Synthesis, mechanistic studies, and anti-proliferative activity of glutathione/glutathione S-transferase-activated nitric oxide prodrugs. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, v. 16, p. 9764-9771, 2008.

CHAPPELL, W. R.; MORDENTI, J.; Extrapolation of toxicological and pharmacological data from animals to humans. *Adv. Drug Res.*, v. 22, n. 35, p. 330-330, 1991.

CHIN, C. M.; FERREIRA, E. I. O processo de latenciação no planejamento de fármacos. *Quím Nova*, v. 22, n. 1, p. 75-84, 1999.

COSTA, F. B. Avaliação da atividade antileucêmica *in vitro* e toxicológica *in vivo* do composto LQFM018. 2011. 110 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2011.

DESILET, N. CAMPBELL, T. N.; CHOY, F. Y. P53 based anticancer therapies: an empty promise? *Current Insues in Molecular Biology*, v. 12, n. 3, p. 143-146, 2010.

ChEMBL – European Bioinformatics Institute. Compound Report Card: Nutlin-3. Disponível em: <https://www.ebi.ac.uk/chembl/db/index.php/compound/inspect/ChEMBL191334>. Acesso em: 15 de jan. de 2015.

DICKSON, M.; GAGNON, J. P. Key factors in the rising cost of new drug discovery and development. *Nature Reviews Drug Discovery*, v. 3, n. 5, p. 417–429, 2004.

FAN, J.; LANNOY, I. A. M. Pharmacokinetics. *Biochemical Pharmacology*, v. 87, p. 93-120, 2014.

FLECKNELL, P. *Laboratory Animal Anaesthesia*. 3^a ed. San Diego: Elsevier Inc, 274p., 2009.

FREITAS, G. C.; CARREGARO, A. B. Aplicabilidade da extrapolação alométrica em protocolos terapêuticos para animais selvagens. *Ciência Rural*, v. 43, n. 2, p. 297-304, 2013.

GILLARD, M.; VAN DER PIERREN, C.; MOGUILVSKY, N.; MASSINGHAM, R.; CHATELAIN, P. Binding characteristics of cetirizine and levocetirizine to human H1 histamine receptors: Contribution of Lys191 and Thr194. *Mol. Pharmacol*, v. 61, n. 2, p. 391-399, 2002.

GILLET, R.; JEANNESSON, P.; SEFRAOUI, H.; ARNOULD-GUÉRIN, M. L.; KIRKIACHARIAN, S.; JARDILLIER, J. C.; PIERI, F. Piperazine derivatives as butyric acid differentiating agents in human leukemic cells. *Cancer Chemother Pharmacol*, v. 41, p. 252-255, 1998.

GOLAN, D. E.; TASHJIAN, J. R.; A. H.; ARMSTRONG, E. J.; ARMSTRONG, A. W. *Principles of Pharmacology: The Pathophysiologic Basis of Drug Therapy*. 3^a ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 34-40p., 2012.

GOLDIM, J. R. A avaliação ética da investigação científica de novas drogas: a importância da caracterização adequada das fases da pesquisa. *Revista HCPA*, v. 27, n. 1, p. 66–73, 2007.

GOMES, L. B. Proposta de estruturação de uma plataforma tecnológica para realização de ensaios pré-clínicos toxicológicos na Fundação Oswaldo Cruz. 2011. 108 f. Dissertação (Mestrado) – Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca, Rio de Janeiro, 2011.

GU, L.; ZHU, N.; FINDLEY, H. W.; ZHOU, M. MDM2 antagonist nutlin-3 is a potent inducer of apoptosis in pediatric acute lymphoblastic leukemia cells with wild-type p53 and over expression of MDM2. *Leukemia*, v. 22, n. 4, p. 730–739, 2008.

GUNTHER, B.; MORGADO, E. Body mass and body weight: a dual reference system in biology. *Revista Chilena de História Natural*, v. 76, p. 57-64, 2003.

GUO, C. C.; TONG, R. B.; LI, K. L. Chloroalkyl piperazine and nitrogen mustard porphyrins: synthesis and anticancer activity. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, v. 12, n. 9, p. 2469-2475, 2004.

HAMSA, N.; NAIR, V. P.; CHANDRAMOHAN, V.; PATEL, S. J. Pharmacophore elucidation and docking studies on anti-inflammatory compounds of medicinal plants for ulcerative colitis, *Asian J. Pharm. Clin. Res*, v. 6, n. 3, p. 56–61, 2013.

HARRIS C. C.; HOLLSTEIN, M. Clinical implications of the p53 tumor suppressor gene. *N Engl J Med*, v. 239, n. 18, p. 1318-1326, 1993.

HODGSON, J. ADMET - turning chemicals into drugs. *Nat Biotechnol*, v.19, p. 722–726, 2001.

HUXLEY, J. S.; TESSIER, G. Terminology of relative growth. *Nature*, v. 137, p. 780-781, 1936.

INCA, Instituto Nacional de Câncer. Estimativa 2014 – Incidência de Câncer no Brasil. Disponível em: <<http://www.inca.gov.br/estimativa/2014/>>. Acesso em: 17 mar. de 2014.

JANG, G. R.; HARRIS, R. Z.; LAU, D. T. Pharmacokinetics and its role in small molecule drug discovery research. *Med. Res. Rev.*, v. 21, n. 5, p. 382–396, 2001.

JAYARAMAN, L.; PRIVES, C. Covalent and noncovalent modifiers of the p53 protein. *Cell Mol Life Sci*, v. 55, n. 1, p. 76-87, 1999.

KATZUNG, B. G. *Basic & Clinical Pharmacology*. 12^a ed. New York: Mc Graw Hill, 37-69p., 2013.

KOHN, D. F.; WIXSON, S. K.; WHITE, W. J.; BENSON, G. J. *Anaesthesia and analgesia in laboratory animals*. New York: Academic Press, 1997.

KUMAR, C. S. A.; PRASAD, S. B. B.; VINAYA, K.; CHANDRAPPA, S.; THIMMEGOWDA, N. R.; KUMAR, Y. C. S.; SWARUP, S.; RANGAPPA, K. S. Synthesis and *in vitro* antiproliferative activity of novel 1-benzhydrylpiperazine derivatives against human cancer cell lines. *Eur. J. Med. Chem.*, v. 44, n. 3, p. 1223-1229, 2009.

LABRE, L. V. Q. Avaliação Pré-Clínica do Perfil Farmacocinético do Protótipo Antitumoral LQFM030 em Roedores. 29/07/2012. 109 p. Dissertação. Universidade Federal de Goiás. Goiânia, 2012.

LANE, D. P. P53, guardian of the genome. *Nature*, v. 358, n. 6381, p. 15-16, 1992.

LIN, J. H. Applications and limitations of interspecies scaling and *in vitro* extrapolation in pharmacokinetics. *Drug Metab. Dispos.*, v. 26, n. 12, p. 1202-12, 1998.

LOPES, A. A.; OLIVEIRA, A. M.; PRADO, C. B. C. Principais genes que participam da formação de tumores. *Revista de Biologia e Ciências da Terra*, Campina Grande, v. 2, n. 2, 2002. Não paginado. Disponível em: <<http://eduep.uepb.edu.br/rbct/sumarios/pdf/genes.pdf>>. Acesso em: 13 nov. 2012.

MACHADO, A. E. D. Terapia fotodinâmica: princípios, potencial de aplicação e perspectivas. *Quim. Nova*, v. 23, n. 2, p. 237-243, 2000.

MAHMOOD, I. Application of allometric principles for the prediction of pharmacokinetics in human and veterinary drug development. *Adv. Drug Deliver. Rev.*, v. 59, p. 1177-1192, 2007.

MARTINEZ, C. A. R.; CORDEIRO, A. T.; PRIOLLI, D. G.; MIRANDA, D. D. C.; JÚNIOR, W. B.; MARGARIDO, N. F.; RIBEIRO, M. L. Avaliação da Expressão Tecidual do Gene de Reparo MLH1 e dos Níveis de Dano Oxidativo ao DNA em Doentes com Câncer Colorretal, *Rev Bras Coloproct*, v. 29, n. 3, p. 303-313, 2009.

MENEGATTI, R. *Uso de novos derivados (((fenil)-1H-pirazol-4-il)metil)piperazinínicos como anti-tumorais, composições farmacêuticas contendo os mesmos e processos de preparação.* [S.l.]: [s.n.], 2011. Relatório enviado ao Instituto Nacional da Propriedade Industrial (INPI) para requerimento de patente, protocolo nº 0000221106814546, abril 2011.

MIYACHI, M.; KAKAZU, N.; YAGYU, S.; KATSUMI, Y.; TSUBAI-SHIMIZU, S.; KIKUCHI, K.; TSUCHIYA, K.; IEHARA, T.; HOSOI, H. Restoration of p53 pathway by nutlin-3 induces cell cycle arrest and apoptosis in human rhabdomyosarcoma cells. *Clinical Cancer Research*, v. 15, n. 12, p. 4077–4084, 2009.

MOMAND, J.; WU, H. H.; DASGUPTA, G. MDM2—master regulator of the p53 tumor suppressor protein. *Gene*, v. 242, n. 1-2, p. 15–29, 2000.

MORDENTI J. Forecasting cephalosporin and monobactam antibiotic half-lives in humans from data collected in laboratory animals. *Antimicrob. Agents Ch.*, v. 27, n. 6, p. 887–891, 1985.

MORGAN, S. E.; KASTAN, M.B. P53 and ATM: cell cycle, cell death and cancer. *Adv Cancer Res*, v. 71, p. 2-25, 1997.

MOWAT, M. R. A. P53 in tumour progression: life, death and everything. *Adv Cancer Res*, v. 74, p. 25-48, 1998.

MURAD, A. M.; KATZ, A.; *Oncologia Bases Clínicas do Tratamento*; Guanabara Koogan: Rio de Janeiro, p. 41. 1995.

NAG, S.; QIN, J.; SRIVENUGOPAL, K. S.; WANG, M.; ZHANG, R. The MDM2-p53 pathway revisited. *The Journal of Biomedical Research*. v. 27, p. 254-271, 2013.

NANDURDIKAR, R. S.; MACIAG, A. E.; CITRO, M. L.; SHAMI, P. J.; KEEFER, L. K.; SAAVEDRA, J. E.; CHAKRAPANI, H. Synthesis and evaluation of piperazine and homopiperazine analogues of JS-K an anti-cancer lead compound. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, v. 19, p. 2760-2762, 2009.

NETTO, L. R.; SANTOS, W. M. *Percepção dos profissionais de enfermagem sobre o risco no preparo e administração de antineoplásicos.* 2010. 61 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Enfermagem) – Universidade Federal do Pampa, Uruguiana, 2010. Disponível em: <<http://cursos.unipampa.edu.br/cursos/enfermagem/files/2011/03/NETTO-L.-R-SANTOS-W.-M.-PERCEP%C3%87%C3%83O-DOS-PROFISSIONAIS-DE-ENFERMAGEM-SOBRE-O-RISCO-NO-PREPARO-E>>

ADMINISTRA%C3%87%C3%83O-DE-ANTINEOPL%C3%81SICOS.pdf>. Acesso em: 21 mar. 2013.

NEVIN, K. G.; VIJAYAMMAL, P. L. Effect of *Aerva lanata* on solid tumor induced by DLA cells in mice. *Fitoterapia*, v. 74, n. 6, p. 577-81, 2003.

OLIVEIRA, E. A.; LABRA, M. E.; BERMUDEZ, J. A produção pública de medicamentos no Brasil: uma visão geral. *Cad. Saúde Pública*, v. 22 n. 1, 2006.

OLIVEIRA, R. B.; ALVES, R. J. Agentes antineoplásicos biorredutíveis: Uma nova alternativa para o tratamento de tumores sólidos. *Quim. Nova*, v. 25, n. 6, p. 976-984, 2002.

PACHALY, J. R.; BRITO, H. F. V. Emprego do método de extrapolação alométrica no cálculo de protocolos posológicos para animais selvagens. *A hora veterinária*, v. 20, n. 118, p. 84-90, 2000.

PAGNO, T. Estudos da atividade antineoplásica da fração diclorometano (DCM) da planta *Vernonia scorpioides* (Lam.) Pers. Em modelo animal. 2004. Monografia (Graduação em Farmácia). Universidade Vale do Itajaí, Itajaí, 2004.

PIMENTA, V. S. C.; PRADO, Y. C. L.; SILVA, D. R.; MACHADO, P. A.; ARAÚJO, E. G. Papel da proteína p53 na proliferação neoplásica. *Enciclopédia Biosfera*, v. 9, n. 17, p. 192-208, 2013.

PINOTTI, J. A.; SILVA, A. E. R.; FIORI, A. T. M.; MATSUMOTO, C.; CRUZ, A.; SILVA, N. M. O.; BERNADES, A. C. A.; CARVALHO, R. F.; MAZZOLA, P. G. Levantamento Bibliográfico de Antineoplásicos Padronizados no Hospital da Mulher. Trabalho apresentado no COMPUESP. São Paulo, 2011.

PINTO, L. S. R. *Síntese, atividade antibacteriana e farmacocinética pré-clínica de pró-farmaco do etambutol com potencial terapêutico para meningite tuberculosa*. 2010. 120 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas)–Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Araraquara, 2010.

PINTO, M. *Biologia Molecular do Câncer: Fundamentos para a Prática Médica*. Rio de Janeiro: Revinter, 2005. 228p.

PRESTES, O. D.; FRIGGI, C. A.; ADAIME, M. B.; ZANELLA, R. QuEChERS – um método moderno de preparo de amostra para determinação multirresíduo de pesticidas em alimentos por métodos cromatográficos acoplados à espectrometria de massas. *Quim. Nova*, v. 32, n. 6, p. 1620-1634, 2009.

PROKOCIMER, M.; ROTTER, V. Structure and function of p53 in normal cells and their aberrations in cancer cells: projection on the hematologic cell lineages. *Blood*, v. 84, n. 8, p. 2391-2411, 1994.

RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M.; MOORE, P. K. *Rang and Dale's Pharmacology*. 7ª ed. New York: Elsevier Inc, 99-105p., 2012.

RIVIERE, J. E.; MARTIN-JIMENEZ, T.; SUNDLOF, S. F.; CRAIQMILL, A. L. Interspecies allometric analysis of the comparative pharmacokinetics of 44 drugs across veterinary and laboratory animal species. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, v. 20, n. 6, p.453-463, 1997.

SCHELLACK, G. *Farmacologia na prática clínica da área da saúde*. São Paulo: Fundamento, 2006.

SECCHIERO, P.; di IASIO, M. G.; GONELLI, A.; ZAULI, G. The MDM2 inhibitor Nutlins as an innovative therapeutic tool for the treatment of haematological malignancies. *Current Pharmaceutical Design*, v. 14, n. 21, p. 2100-2110, 2008.

SHANGARY, S.; WANG, S. Small-molecule inhibitors of the MDM2-p53 protein-protein interaction to reactivate p53 function: a novel approach for cancer therapy. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, v. 49, p. 223–241, 2009.

SHARMA, V.; McNEILL, J. H. To scale or not to scale: the principles of dose extrapolation. *British Journal of Pharmacology*, v.157, n.6, p.907-921, jul. 2009. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2737649/>>. Acesso em: 07 set. 2013.

SILVA, P. *Farmacologia*. 8ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2010.

SKOOG, D. A.; HOLLER, F. J.; NIEMAN, T. A. *Princípios de análise instrumental*. Tradução Ignez Caracelli, Paulo Celso Isolani, Regina Helena de Almeida Santos e Regina Helena Porto Francisco. 5. ed. Porto Alegre: Bookman, 2002.

SOUSSI, T. Cycle cellulaire et apoptose: le gene suppresseur de tumeur p53. *Med Sci*, v. 16, n. 4, p. 496-472, 2000.

TABE, Y.; SEBASIGARI, D.; JIN, L.; RUDELIUS, M.; DAVIES-HILL, T.; MIYAKE, K.; MIIDA, T.; PITTALUGA, S.; RAFFELD, M. MDM2 antagonist nutlin-3 displays antiproliferative and proapoptotic activity in mantle cell lymphoma. *Clin Cancer Res*, v. 15, n. 3, p. 933–942, 2009.

TARTARI, R. F.; BUSNELLO, F. M.; NUNES, C. H. A. Perfil nutricional de pacientes em tratamento quimioterápico em um ambulatório especializado em quimioterapia. *Rev Bras Cancerologia*, v. 56, n. 1, p. 43-50, 2010.

VAN MAERKEN, T.; SPELEMAN, F.; VERMEULEN, J.; LAMBERTZ, I.; DE CLERCQ, S.; DE SMET, E.; YIGIT, N.; COPPENS, V.; PHILIPPÉ, J.; DE PAEPE, A.; MARINE, J. C.; VANDESOMPELE, J. Small-molecule MDM2 antagonists as a new therapy concept for neuroblastoma. *Cancer Research*, v. 66, n. 19, p. 9646–9655, 2006.

VAN MIERT, A. S. Extrapolation of pharmacological and toxicological data based on metabolic weight. *Archiv für experimentelle Veterinärmedizin*, v. 43, n. 4, p.481-488, 1989.

VASSILEV, L. T.; VU, B. T.; GRAVES, B.; CARNAVAL, D.; PODLASKI, F.; FILIPOVIC, Z.; KONG, N.; KAMMLOTT, U.; LUKACS, C.; KLEIN, C.; FOTOUHI, N.;

LIU, E. A. In vivo activation of the p53 pathway by small-molecule antagonists of MDM2. *Science*, v. 303, n. 5659, p. 844-848, 2004.

WATANABE T, KUSUHARA H, MAEDA K, SHITARA Y, SUGIYAMA Y. Physiologically based pharmacokinetic modeling to predict transporter-mediated clearance and distribution of pravastatin in humans. *J Pharmacol Exp Ther.*, v. 328, n. 2, p. 652–662, 2009.

WOLKOWIC, R.; ROTTE V. The DNA binding regulatory domain of p53: see the C. *Pathol Biol*, v. 45, n. 10, p. 785-96, 1997.

YONISH-ROUACH, E. A question of life or death: the p53 tumor suppressor gene. *Pathol Biol*, v. 45, n. 10, p. 815-823, 1997.

YUNES, R. A.; PEDROSA, R. C.; CECHINEL FILHO, V. Fármacos e fitoterápicos: a necessidade do desenvolvimento da indústria de fitoterápicos e fitofármacos no Brasil. *Quim nova*, v. 24, n. 1, p. 147-152, 2001.

ZHANG, R.; WANG, H. Antisense oligonucleotide inhibitors of MDM2 oncogene expression. *Methods Mol Med*, v. 85, p. 205, 2003.

ZHANG, Y.; XIONG, Y. A p53 amino-terminal nuclear export signal inhibited by DNA damage-induced phosphorylation. *Science*, v. 292, n. 5523, p. 1910-1915, 2011.

ZHU, H. Y.; ZHANG, X. R.; GUAN, J.; CUI, B. J.; ZHAO, L. S.; ZHAO X. Pharmacokinetics and tissue distribution study of schisandrin B in rats by ultra-fast liquid chromatography with tandem mass spectrometry. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, v. 78–79, p. 136–140, 2013.

ZOGHAIB, I. V. J. Avaliação pré-clínica do perfil farmacocinético do protótipo antitumoral LQFM030 em ratos por LC-MS/MS. 2013. 87 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2013.

ANEXOS

Anexo 1 – Parecer Consubstanciado do Comitê de Ética no Uso de Animais/CEUA da Universidade Federal de Goiás



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS/CEUA



Goiânia, 02 de setembro de 2013.

PARECER CONSUBSTANCIADO REFERENTE AO PROJETO DE
PESQUISA PROTOCOLADO NA CEUA SOB O Nº. 042 /13

PROTÓCOLO Nº:

RECEBIDO EM:

1. **Título do Protocolo de Pesquisa:** Estudo da atividade biológica e do potencial oxidativo de protótipo de fármaco antineoplásico derivado dos nutlins em modelos experimentais

2. **Finalidade Pesquisa (farmacologia):** Projeto de Pesquisa de Pós-graduação

3. **Pesquisadores responsáveis:** Prof. Dr. Luiz Carlos da Cunha

Prof. Ricardo Menegatti

Dra. Vânia Cristina Rodriguez Salazar

Andryne Rego Rodrigues

Msc. Caroline Rego Rodrigues

Sandro Antônio Gomes

Profª. Dra. Aline Carvalho Batista

Msc. Jerônimo Raimundo de Oliveira Neto

Kelly Carolina Frauzino Araújo

5. **Unidade onde será realizada a pesquisa**

Faculdade de Farmácia - NEPET UFV (Núcleo de Estudos e Pesquisas Tóxico-Farmacológicas)

6. **Objetivo(s) da pesquisa**

O objetivo deste trabalho é estudar o perfil farmacocinético da molécula LQFM18 para a obtenção de informações detalhadas como a biodisponibilidade tecidual e a caracterização de metabólitos através do uso de equipamentos de alta tecnologia e sensibilidade.

Dentre os objetivos específicos pode-se citar:

- a) Desenvolver e validar técnicas analíticas de quantificação e caracterização do protótipo LQFM18 por meio de cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrômetro de massas (LC-MS/MS) e a detector por arranjo de diodos (HPLC-PDA) de acordo com os parâmetros preconizados pela Anvisa na RDC 27.

Comissão de Ética no Uso de Animais CEUA

Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação/PRPPG-UFV, Caixa Postal: 131, Prédio da Reitoria, Piso 1, Campus Samambaia (Campus 11) - CEP: 74001-970, Goiânia - Goiás, Fone: (55-62) 3521-1215.
E-mail: ceua.ufv@gmail.com



- b) Quantificar e caracterizar o protótipo LQFM18 nos fluidos biológicos e tecidos coletados.
- c) Comparar os resultados farmacocinéticos da administração por duas vias (intraperitoneal e intravascular) para ratos e via oral (camundongos) em três doses diferentes.
- d) Construir curvas farmacocinéticas de concentração *versus* tempo e obter a constante da velocidade de eliminação (β), meia-vida de eliminação ($t_{1/2 \beta}$), concentração máxima (C_{max}), área sob a curva de concentração *versus* tempo de 0 a 24 h (ASC_{0-24h}), extrapolação da área sob a curva de concentração *versus* tempo para o infinito ($ASC_{24-\infty}$), área sob a curva de concentração *versus* tempo total (ASC_T), volume de distribuição (V_d/F) e *clearance* total (Cl_T/F).
- e) Analisar cortes histológicos dos tecidos coletados quanto a modificações morfológicas decorrentes da administração do protótipo de fármaco.
- f) Analisar o efeito do LQFM18 nos principais grupos de enzimas do sistema antioxidante no sangue.

Propor os mecanismos de absorção, ligação a proteínas plasmáticas, distribuição e eliminação da droga.

7. Animal utilizado (fonte de obtenção/espécie/Nº de grupos/Nº de animais por grupo)

Resumo: São descritos a necessidade de 18 ratos (*Rattus norvegicus*) raça Wistar pesando 220-250 g e 15 camundongos (*Mus musculus*) "Swiss" com peso corpóreo de 35 a 40 g, provenientes do Biotério Central da Universidade Federal de Goiás (UFG) em Goiânia- GO.

Parecer : O número de animais é aceitável.

8. Critérios utilizados para definir o tamanho da amostra. Incluir discussão sobre a possibilidade de métodos alternativos apresentando os descritores da busca bibliográfica.

Descrição: "..... utilização da quantidade de animais descrita nos protocolos experimentais que possibilite uma análise estatística eficiente considerando as condições dos métodos realizados, para que não haja necessidade de repetição do experimento, minimizando assim o número de animais utilizados. Dessa forma, atende-se o proposto pela Lei nº 11.794, de 08.10.2008

Comissão de Ética no Uso de Animais CEUA

Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação/PRPPG-UFG, Caixa Postal: 131, Prédio da Reitoria, Piso 1, Campus Samambaia (Campus II) - CEP:74001-970, Goiânia – Goiás. Fone: (55-62) 3521-1215.
E-mail: ceua.ufg@gmail.com



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS/CEUA



(BRASIL, 2008) que estabelece procedimentos para o uso científico de animais. **Serão utilizados 18 ratos e 15 camundongos.**"

Descrição do método alternativo: "O "Modelo microbiano do metabolismo animal", introduzido nos anos 70 por Smith e Rosazza, pode representar uma alternativa ao uso de animais nos estudos de metabolismo em mamíferos. O modelo se baseia na utilização de microrganismos para mimetizar o metabolismo em mamíferos, devido à similaridade do sistema enzimático microbiano e o sistema citocromo P450 de animais, apresentando as vantagens do baixo custo, redução da utilização de animais de experimentação e maior quantidade e variedade de metabólitos produzidos."

Na página 26 do projeto em questão se faz referência à "Validação do modelo microbiano do metabolismo animal proposto por Smith e Rossaza (1974)" onde se descreve o número de animais por grupo para ser utilizado no teste, mas parece que este grupo de animais não foi contabilizado no total de animais solicitado para o biotério, já que o total de animais apenas para este teste é de 20 camudongos.

"O teste será conduzido utilizando-se camundongos (*Mus musculus*) fêmeas da linhagem Swiss Webster, obtidos do Biotério Central da UFG. O experimento será desenvolvido no Laboratório de Farmacologia e Toxicologia Celular (LFTC) e no Laboratório de Bioconversão (Labiocon). 4 grupos de animais serão utilizados; grupo controle branco, grupo controle veículo, grupo teste 1 e grupo teste 2. Para cada grupo serão utilizados 5 animais, sendo essa quantidade a mínima necessária para a realização da metodologia aplicada. Contudo, devido às variações anatômicas da linhagem utilizada é necessário considerar a possibilidade do aumento do número de animais em até três vezes para garantir quantidade suficiente de material para o teste." (Página 26 do projeto)

Parecer: A definição do número de animais não é clara na metodologia descrita. São descritos estudos para 3 diferentes vias de administração utilizando 3 doses (50, 100 e 200 mg/Kg de peso corporal), além dos animais controles, onde não há descrição dos procedimentos.

Nos ratos são descritas as formas de administração intravascular e intraperitoneal e nos camundongos via oral. Não há referência ao número de animais para cada uma das doses

Comissão de Ética no Uso de Animais/CEUA
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação/PRPPG-UFG, Caixa Postal: 131, Prédio da Reitoria, Piso 1, Campus
Samambaia (Campus II) - CEP:74001-970, Goiânia - Goiás, Fone: (55-62) 3521-1215.
E-mail: ceua.ufg@gmail.com



nos respectivos grupos de administração. O projeto também faz referência a outro teste a ser realizado em dose única, teste de toxicidade aguda onde serão utilizados 6 camundongos conforme descrito na página 22 do referido projeto. “A base da técnica consiste em se administrar a grupos de seis animais doses sequenciais menores a partir da máxima caso se observe a morte de mais de 1 animal. Isto possibilita a estimativa de uma DL50 conforme os padrões do *Globally Harmonised System (GHS)*.”

A bibliografia é adequada e justifica a necessidade do uso de animais.

9. Descrição das instalações e manejo dos animais (alojamento e ambiência/alimentação e hidratação)

Resumo: “Os animais serão acondicionados na Sala de Experimentação Animal da Faculdade de Farmácia da UFG, à temperatura ambiente ($25 \pm 2^\circ\text{C}$) com umidade relativa do ar entre 50 a 70% e monitoramento do ciclo claro-escuro a cada 12 h. Receberão água filtrada e ração Purina® Labina® à vontade, exceto nas horas de jejum (somente água *ad libitum*) que antecedem o experimento de toxicidade aguda (2h).”

Parecer : A manipulação dos animais se encontra dentro dos princípios éticos vigentes.

10. Análise crítica dos riscos e benefícios da pesquisa

“Os eventuais riscos existentes nos experimentos como riscos ergonômicos, riscos biológicos, psicológicos e riscos químicos podem ser diminuídos consideravelmente levando-se em consideração as Boas Práticas de Laboratório adotadas no Núcleo de Pesquisas Toxicológicas e os principais procedimentos operacionais de manuseio de produtos químicos (em especial formaldeído). O trabalho é extremamente relevante para a comunidade científica e a pesquisa justifica-se pelo fato da molécula do LQFM18 ser uma simplificação estrutural do nutlin-3a sendo, porém, uma molécula menor e sem centros quirais, o que pode favorecer o aumento da permeabilidade celular. O custo-benefício se baseia no excelente potencial antineoplásico do composto em questão e em seus resultados promissores em testes de toxicidade (CARVALHO, 2011).”



Parecer : A pesquisa se encontra dentro dos princípios éticos vigentes e são claros os benefícios advindos da pesquisa em questão apesar dos riscos inerentes à pesquisa e que foram bem descritos.

11. Cronograma (Período estabelecido para coleta de dados ou duração do experimento e/ou aulas práticas) INÍCIO DO PROJETO: 1º semestres de 2013/ **CONCLUSÃO DO PROJETO:** 2º semestre/2015. São solicitados três (3) anos e o início da atividade com os animais no 1º semestre de 2014, dado a necessidade de se fazerem padronizações.

Parecer : O período de vigência está de acordo com os princípios éticos vigentes.

12. Métodos utilizados para minimizar o sofrimento e aumentar o bem-estar dos animais durante a experimentação. Pontos finais humanitários.

“Os experimentos dos estudos a serem realizados estão fundamentados de acordo com os protocolos padrões da *Organization for Economic Cooperation and Development (OECD)*, além de basear-se em metodologias desenvolvidas e amplamente utilizadas na literatura científica. Esses guias preconizam o uso correto dos animais de laboratório, deixando clara existência de equivalência entre os efeitos encontrados nesses animais e os encontrados nos seres humanos.

Acrescenta-se, ainda, que os protocolos da OECD, ora utilizados neste estudo, já são alternativas, porquanto que propõem a obtenção de grande quantidade de informação com um número restrito de animais. Os pesquisadores se encontram devidamente preparados e treinados e o local para realização dos experimentos está adequado para o manuseio dos animais a serem utilizados, sendo os mesmos de origem fidedigna e viáveis na realização deste projeto. “

Parecer: A pesquisa se encontra dentro dos princípios éticos vigentes e são claros os benefícios advindos da pesquisa em questão. No entanto, não são abordados desconfortos advindos do tratamento ou métodos para atenuar o sofrimento dos animais provocados pelos tratamentos.

13. Descrição e justificativa do método de eutanásia e destino dos animais após a experimentação



“Os resíduos dos animais serão descartados no exterior do biotério, dentro de sacolas plásticas e lixeiras com tampa. Os animais mortos serão armazenados em congelador e posteriormente encaminhados para a Escola de Veterinária da Universidade Federal de Goiás para posterior incineração, conforme convênio já estabelecido. Ao final dos experimentos, todos os animais serão anestesiados com solução de xilazina-cetamina 0,2 mL/100g (8,75 mL de cetamina (100 mg/mL) e 1,25 mL de xilazina (100 mg/mL), conforme protocolo da *Cornell University/Cornell Center for Animal Resources and Education* (Flecknell, 1996; Kohn, et al., 1997) e sacrificados por deslocamento cervical. Todos os animais passarão por eutanásia realizada por profissional capacitado, médico veterinário, de acordo com “os princípios éticos de experimentação animal”, proposta pelo SBCAL. A eutanásia é necessária consequentemente à extração dos tecidos para análise dos cortes histológicos.”

Parecer: Método de eutanásia adequado para camundongos mas deve ser revisto para os ratos, apesar deles estarem anestesiados o deslocamento não é adequado pelo tamanho dos animais.

14. Riscos aos pesquisadores/alunos (físicos, biológicos, psicológicos, sociais)

“Os eventuais riscos existentes nos experimentos podem assim ser considerados: Riscos Ergonômicos – em função da contínua repetição de movimentos e postura no manuseio das gaiolas semi-metabólicas ou com permanência de longos períodos em pé na sala de observação animal. No entanto, considerando que os procedimentos são de curta duração não significará grande desgaste aos profissionais; Riscos biológicos - Contaminação com excrementos (fezes e urinas) e pelos (principalmente para indivíduos alérgicos) de animais. No entanto, destaca-se que os mesmos são de procedência fidedigna quanto ao aspecto sanitário, e será indispensável à realização dos procedimentos de forma paramentada (luvas, jaleco e máscaras) reduzindo-se assim a exposição individual. Riscos Químicos: Levando-se em consideração às Boas Práticas de Laboratório adotadas no Núcleo de Pesquisas Toxicológicas, os principais procedimentos operacionais de manuseio de produtos químicos (em especial formaldeído) serão devidamente observados. Riscos Psicológicos e Sociais: O bom relacionamento entre bolsistas, pesquisadores e técnicos do laboratório de pesquisa minimizará a ocorrência de sobrecarga de funções e atividades no desenvolvimento da pesquisa, em especial pela elaboração de um adequado

Anexo 2 – Normas para publicação de artigos no periódico Revista *Molecules*

Molecules 2015, 20, 1-x manuscripts; doi:10.3390/molecules200x0000x

OPEN ACCESS

molecules

ISSN 1420-3049

www.mdpi.com/journal/molecules

Type of the Paper (Article, Review, Communication, etc.)

Title of the Paper (M_Title)

Firstname Lastname ^{1,*}, Firstname Lastname ^{2,†}, Firstname Lastname ^{3,†} and
Firstname Lastname ⁴

¹ Full Affiliation, Address; E-Mail: author2@email

² Full Affiliation, Address; E-Mails: author3@email (F.L.); author4@email (F.L.);

[†] These authors contributed equally to this work.

* Author to whom correspondence should be addressed; E-Mail: author1@email;
Tel.: +1-111-111-111 (ext. 123); Fax: +1-111-111-112.

Academic Editor:

Received: / Accepted: / Published:

Abstract: This is the abstract section. One paragraph only (Maximum 200 words).

Keywords: keyword; keyword; keyword (3-10 keywords separated by semi colons)

1. Introduction

Main text paragraph

Main text paragraph

2. Results and Discussion

Main text paragraph

Main text paragraph

[add an equation here; use MS Word or MathType equation function] (1)

(Note: all equations should be completed within a two column table with one line, centered, no borders, as example see above).

Main text paragraph

Main text paragraph

2.1. This Is Subsection Heading

Main text paragraph

Main text paragraph

2.1.1. This Is Subsection Heading

Main text paragraph

Main text paragraph

Table 1. Add a descriptive label of the table here.

[add the table here; use MS Word's table function]

[add the figure here]

Figure 1. (a) Add a descriptive label of the figure here. (b) Add a descriptive label of the figure here. (c) Add a descriptive label of the figure here.

3. Experimental Section

Main text paragraph

Main text paragraph

4. Conclusions

Main text paragraph

Main text paragraph

Acknowledgments

Main text paragraph

Author Contributions

Main text paragraph

Conflicts of Interest

State any potential conflicts of interest here or “The authors declare no conflict of interest”.

References and Notes

39. Author 1, A.B.; Author 2, C.D. Title of the cited article. *Journal Abbreviation* **2007**, *6*, 100–110.
40. Author 1, A.; Author 2, B. Title of the chapter. In *Book Title*, 2nd ed.; Editor 1, Editor 2, Eds.; Publisher: Publisher Location, Country, 2007; Volume 3, pp. 154–196.
41. Author 1, A.; Author 2, B. *Book Title*, 3rd ed.; Publisher: Publisher Location, Country, 2008; pp. 154–196.
42. Author 1, A.B.; Author 2, C. Title of Unpublished Work. *Journal Abbreviation*, phrase indicating stage of publication (submitted or in press).

43. Author 1, A.B.; Author 2, C.D.; Author 3, E.F. Title of Presentation. In *Title of the Collected Work* (if available), Proceedings of the Name of the Conference, Location of Conference, Country, Date of Conference; Editor 1, Editor 2, Eds.(if available); Publisher: City, Country, Year (if available); Abstract Number (optional), Pagination (optional).
44. Author 1, A.B. Title of Thesis. Level of Thesis, Degree-Granting University, Location of University, Date of Completion.
45. Author 1, A.B.; Author 2, C.D. Title of the article. *Abbreviated Journal Name*, Year, Volume, (Page range), DOI or other identification number. Available online: URL (accessed on Day Month Year).
46. Author if any. Title of Site. Available online: URL (accessed on Day Month Year).

Reference list: We recommend the use of reference management software to prepare the references list (e.g. Endnote, <http://www.mdpi.com/files/word-templates/MDPI.ens>).

Sample Availability: Samples of the compounds are available from the authors.

© 2015 by the authors; licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

ANEXO 3 – Justificativa para não submissão de artigo



Ao

Prof. Dr. Ricardo Neves Marreto

DD. Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas – UFG

Assunto: Declaração de não-submissão de artigo

Caro Prof. Ricardo,

Vimos esclarecer sobre a impossibilidade momentânea de submissão do manuscrito *“Estudo do Perfil Cinético do Protótipo de Fármaco Antineoplásico LQFM018 em Modelos Experimentais por LC-MS/MS”* (Andryne Rego Rodrigues, Caroline Rego Rodrigues, Sandro Antônio Gomes, Alarisse Fachetti Zoghaib, Iury Valentim Zoghaib, Flávia Meira de Oliveira e Luiz Carlos da Cunha).

O motivo da não submissão do manuscrito no presente momento é que o trabalho estudou a farmacocinética de um composto que ainda não apresenta dados na literatura, ou seja, não possui bases científicas acerca de seu desenvolvimento e síntese que sustentem a publicação do referido manuscrito.

Alguns dados obtidos acerca do protótipo já foram enviados para publicação no *European Journal of Pharmacology*, com parecer favorável. Entretanto, até o presente momento, há apenas dissertações e teses, sendo que a citação dessas informações, em português, teria valor diminuído.

Ressalta-se ainda que o presente trabalho já se encontra escrito sob as normas do periódico *Molecules*, escolhido para sua submissão, e que, assim que confirmarmos o aceite do artigo sobre a síntese química, será submetido.

Goiânia, 18 de março de 2015.

Cordialmente,

Andryne Rego Rodrigues
Pós-Graduanda

Prof. Dr. Luiz Carlos da Cunha
Orientador
Coordenador do NEPET-UFG