



UFG

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

IURY VALENTIM JORGE ZOGHAIB

**AVALIAÇÃO PRÉ-CLÍNICA DO PERFIL FARMACOCINÉTICO DO
PROTÓTIPO ANTITUMORAL LQFM030 EM RATOS POR LC-MS/MS**

**Goiânia
2013**

IURY VALENTIM JORGE ZOGHAIB

**AVALIAÇÃO PRÉ-CLÍNICA DO PERFIL FARMACOCINÉTICO DO
PROTÓTIPO ANTITUMORAL LQFM030 EM RATOS POR LC-MS/MS**

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

Orientador: Prof. Dr. Luiz Carlos da Cunha

**Goiânia
2013**

**Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas
da Universidade Federal de Goiás**

BANCA EXAMINADORA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Aluno: Iury Valentim Jorge Zoghaib

Orientador: Prof. Dr. Luiz Carlos da Cunha

Membros:

1. Prof. Dr. Luiz Carlos da Cunha

2. Prof. Dr. Sérgio Henrique Nascente Costa

3. Profa. Dra. Cristiane Efting

4. Profa. Dra. Vania Cristina Rodríguez Salazar

Data: 18/10/2013

Dedico este trabalho

*A toda a Humanidade, na esperança de que uma simples descoberta possa
agregar conhecimento na grande escalada intelectual!*

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela vida e por mais uma oportunidade de aprendizado, junto a irmãos que percorrem o mesmo caminho, principalmente à minha esposa Alarisse Arçari Fachetti Zoghaib e minha filha Leticia Fachetti Zoghaib, pela compreensão do nosso empreendimento intelectual e ao Prof. Dr. Luiz Carlos da Cunha, mais do que orientador, um grande amigo de elevada moral e intelecto exemplar.

Aos amigos do Núcleo de Estudos e Pesquisas Tóxico-Farmacológicas (NEPET), da Universidade Federal de Goiás (UFG), que comigo convivem, estudando, conversando, aprendendo, ensinando e trabalhando para o crescimento comum de uma equipe, em especial ao Jerônimo Raimundo de Oliveira Neto, à Luciana Vieira Queiróz Labre, Alarisse A. Fachetti Zoghaib, Tereza Cristina de Deus Honório, Wilsione José Carneiro, Sandro Antônio Gomes, Luciano dos Santos.

À equipe do Instituto de Ciências Farmacêuticas (ICF) pelo apoio no desenvolvimento prático do projeto.

Ao Biotério Central da UFG, pelos animais fornecidos não apenas à este projeto, mas à todos nos quais nossos pequenos irmãos sedem sua vida pelo nosso desenvolvimento científico.

Ao Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento (CNPq) pela bolsa de estudo e pelo apoio ao NEPET.

SUMÁRIO

QUADROS, TABELAS E FIGURAS.....	vii
SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIATURAS.....	viii
RESUMO.....	x
ABSTRACT.....	xi
1 INTRODUÇÃO.....	12
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	15
2.1 Câncer.....	15
2.2 Novos Fármacos: Pesquisa e Desenvolvimento.....	21
2.3 Proteínas p53 e MDM2.....	23
2.4 Nutlins.....	26
2.5 LQFM030.....	28
2.6 Farmacocinética pré-clínica: importância nos estudos clínicos..	31
3 OBJETIVOS.....	37
3.1 Objetivo geral.....	37
3.2 Objetivos específicos.....	37
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	38
4.1 Materiais.....	38
4.2 Instrumentação.....	39
4.2.1 Cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC).....	39

4.2.2 Equipamentos.....	40
4.2.3 Preparo de solução padrão e reagentes.....	40
4.2.4 Metodologia de extração do LQFM030 de amostras de plasma.....	41
4.3 Experimentação em Animais.....	42
5 PUBLICAÇÃO.....	45
Artigo – Avaliação Farmacocinética pré-clínica, em ratos, de um candidato a protótipo de fármaco antitumoral, por LC/MS-MS.....	46
Resumo.....	47
Abstract.....	48
Introdução.....	49
Materiais e Métodos.....	53
Resultados.....	58
Discussão.....	61
Agradecimentos.....	69
Referências.....	69
6 CONCLUSÕES.....	73
7 CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS.....	74
REFERÊNCIAS.....	76
Anexo 1 - Parecer Consubstanciado do Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Goiás.....	84
Anexo 2 - Normas para publicação de artigos no periódico Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada / <i>Journal of Basic and Applied Pharmaceutical Sciences</i>.....	85

QUADROS, TABELAS E FIGURAS

Quadro1.	Estimativas para o ano de 2012 das taxas brutas de incidência por 100 mil habitantes e de número de casos novos por câncer, segundo sexo e localização primária....	17
Quadro2.	Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2012 por sexo, exceto para câncer de pele não melanoma.....	19
Figura 1.	Alvos da p53, sua complexação com MDM2 e local de ação dos nutlins. (adaptação).....	24
Figura 2.	Estrutura molecular do nutlin 3.....	26
Figura 3.	Estrutura molecular do LQFM030: 1-(4-((1-(4-clorofenil)-1H-pirazol-4-il)metil)piperazin-1-il)etanone.....	29
Figura 4.	Esquema ilustrativo dos processos cinéticos sofridos pelos fármacos no organismo.....	33
 ARTIGO – Avaliação Farmacocinética pré-clínica, em ratos, de um candidato a protótipo de fármaco antitumoral, por LC/MS-MS.		
Tabela 1.	Parâmetros farmacocinéticos do LQFM030 em Ratos machos (n = 3), submetidos à dose p.o. de 0,1 mg/g de peso corporal do animal, obtidos utilizando o software Winnonlin5.0 Pharsight.....	59
Figura 1.	Estrutura molecular do nutlin 3.....	50
Figura 2.	Estrutura molecular do LQFM030: 1-(4-((1-(4-clorofenil)-1H-pirazol-4-il)metil)piperazin-1-il)etanone.....	51
Figura 3.	Curvas de decaimento de concentração <i>versus</i> tempo – LQFM030.....	60

SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIATURAS

ASC	Área sob a curva de concentração versus tempo
Cl _{T/F}	<i>Clearance</i> total com biodisponibilidade desconhecida
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa da UFG
C _{Ext}	Concentração do analito extraído
C _{Não ext}	Concentração do analito não extraído
Cl ₅₀	Concentração inibitória 50% (mediana)
C _{max}	Concentração plasmática máxima
C _{ss}	Concentração plasmática média no estado de equilíbrio
CNS	Conselho Nacional de Saúde
K _{el}	Constante da velocidade de eliminação
CQA	Controle de qualidade alto
CQB	Controle de qualidade baixo
CQM	Controle de qualidade médio
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência, <i>high performance liquid chromatography</i>
DP	Desvio padrão
PDA	Detector de arranjo de fotodiodos
ESI	Ionização por eletrospray
LC	Cromatografia Líquida
MS/MS	Espectrometria de massas em série
t _R	Tempo de retenção
MTBE	Éter metil-terc-butil, methyl-tert-butyl ether
FDA	Food and Drug Administration
GHS	<i>Globally Harmonized System</i>
ICF	Instituto de Ciências Farmacêuticas
LQFM	Laboratório de Química Farmacêutica e Medicinal

LIQ	Limite inferior de quantificação
t_{1/2}	Meia-vida de eliminação plasmática, <i>elimination half-life</i>
NEPET	Núcleo de Estudos e Pesquisas Tóxico-Farmacológicas da UFG
PI	Padrão interno
HPV	Papiloma vírus humano
T_{max}	Tempo para atingir a concentração plasmática máxima
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)2,5-difenil brometo de tetrazolium
TAE	Tumor ascítico de Ehrlich
UV	Ultravioleta
UV-Vis	Ultravioleta visível
UFG	Universidade Federal de Goiás
i.p.	Via intraperitoneal
p.o.	Via per oral
i.v.	Via intravenosa
Vd	Volume de distribuição

RESUMO

O LQFM030 foi obtido por simplificação molecular dos nutlins (inibidores da interação MDM2-p53) e, tendo demonstrado excelente atividade antineoplásica *in vitro* (citotoxicidade contra a linhagem celular K-562 com $IC_{50} = 23 \mu\text{M}$) e *in vivo* contra tumor ascítico de Ehrlich, com aumento de sobrevivência em animais tratados, desenvolveu-se o estudo do perfil farmacocinético, p.o., em ratos. Empregou-se método analítico em LC-MS/MS (Applied Biosystems MDS Sciex API 3200) previamente validado em colaboração. O LQFM030 foi administrado a 3 ratos (peso médio de 186g), em dose preestabelecida de 100 mg/kg, por gavagem. Após a administração, foram coletadas amostras de 1,0 mL de sangue, por canulação da veia jugular esquerda, com seringa heparinizada, nos intervalos de tempo de 0 a 8 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 cinéticos foram calculados no software Winnonlin 5.0 (Pharsight™). Resultados (média \pm DP): meia-vida ($t_{1/2}$) $3,61 \pm 0,68$ h; *clearance* total (CL_T) $36,49 \pm 2,23$ mL/min/kg; volume de distribuição (Vd) $11,40 \pm 1,58$ L/kg. O LQFM030 apresentou baixo valor de $t_{1/2}$, elevado Vd e elevado valor de CL_T . Estes valores permitem entender que o protótipo estudado demonstrou um bom perfil de distribuição tecidual e/ou foi extensivamente eliminado. Quando comparados com parâmetros cinéticos obtidos em outros estudos, observou-se diferença nos resultados, justificada pela elevada variabilidade interespecies, principalmente na taxa de metabolismo basal e peso corporal, uma vez que as vias de administração, oral e intraperitoneal, são cineticamente semelhantes.

Palavras-chave: LQFM030. LC-MS/MS. Farmacocinética pré-clínica.

ABSTRACT

PRE-CLINICAL EVALUATION OF PHARMACOKINETIC PROFILE OF ANTITUMORAL LQFM030 PROTOTYPE IN RATS BY LC-MS/MS.

The LQFM030 was obtained by molecular simplification of nutlins (inhibitors of p53-MDM2 interaction) and, having demonstrated excellent antineoplastic activity in vitro (cytotoxicity against K-562 cell line with $IC_{50} = 23 \mu\text{M}$) and in vivo against Ehrlich ascitic tumor with increased survival in treated animals developed the pharmacokinetic study of *p.o.* in rats. It was used for LC-MS/MS analytical method (Applied Biosystems MDS Sciex API 3200) previously validated together. O LQFM030 was administered to 3 rats (mean weight 186g) in predetermined dose of 100 mg/kg by gavage. After administration, samples were collected from 1.0 mL of blood by cannulation of the left jugular vein with heparinized syringe, the intervals 0-8 h. The blood samples were identified and centrifuged to obtain plasma which was frozen at -20°C until analysis. The kinetic parameters were calculated in the software WinNonlin 5.0 (Pharsight™). Results (mean \pm SD) half-life ($t_{1/2}$) 3.61 ± 0.68 h, total clearance (CL_T) 36.49 ± 2.23 mL/min/kg, volume of distribution (Vd) $11,40 \pm 1.58$ L/kg. The LQFM030 had low value of $t_{1/2}$, Vd high and high value of CL_T . These values allow us to understand that the prototype study demonstrated a good safety profile of tissue distribution and/or has been extensively eliminated. When compared with the kinetic parameters obtained in other studies, it was observed difference in results is justified by the high interspecies variability, mainly in basal metabolic rate and body weight, once the route of administration, orally and intraperitoneally, are kinetically similar.

Key words: LQFM030. LC-MS/MS. Preclinical pharmacokinetics.

1 INTRODUÇÃO

O câncer se refere a um conjunto que envolve aproximadamente 200 doenças distintas, com variedade de causas e história natural. A primeira descrição do câncer como uma doença de mau prognóstico foi feita por Hipócrates, em 500 a.C., na Grécia (NETTO; SANTOS, 2010).

O desenvolvimento de novos fármacos antitumorais se justifica pela necessidade de drogas mais seletivas para a quimioterapia antineoplásica, uma vez que tais tratamentos são agressivos aos pacientes e alguns tipos de câncer ainda não possuem terapia farmacológica adequada (BUSKÜHL, 2007).

Estudo de desenvolvimento de novos fármacos tem sido um dos grandes motivadores da regulamentação das atividades de pesquisa envolvendo seres humanos e animais (GOLDIM, 2007). Estes estudos podem ser classificados em duas etapas: pré-clínica e clínica, sendo a primeira realizada em modelos celulares e animais, enquanto a segunda é aplicada a seres humanos. No Brasil, de acordo com a Resolução nº 251 do Conselho Nacional de Saúde (CNS) (BRASIL, 1997), a pesquisa pré-clínica deve gerar informações que permitam justificar a realização de pesquisas em seres humanos (GOLDIM, 2007).

Testes pré-clínicos, em geral, avaliam parâmetros farmacocinéticos, farmacológicos e toxicológicos, visando estudar a segurança e a eficácia dos compostos candidatos a fármacos, por meio de ensaios *in vitro*, *in vivo*, *in silico* e *ex vivo* (DICKSON; GAGNON, 2004). Sendo assim, ensaios pré-clínicos tanto podem propiciar inovação quanto ocasionar abandono de pesquisa.

Estudos conduzidos na elucidação da farmacocinética de uma substância química devem obter informações adequadas sobre sua absorção, distribuição, biotransformação (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).

Recentemente, através de estudos que utilizam modelagem computacional, descobriu-se um grupo de moléculas, denominadas nutlins, que apresentam a capacidade de inibir o crescimento de tumores, podendo ser a mais nova estratégia de combate ao câncer (GOMES, 2011; VAN MAERKEN et al., 2006).

Os nutlins vêm sendo aplicados na inibição da interação entre duas proteínas envolvidas no câncer (especialmente em modelos de retinoblastoma, rabdomiossarcoma, neuroblastoma e leucemia) (Zhang et al, 2011): a molécula MDM2 (*murine double minute protein*) e a proteína p53 que tem atividade supressora tumoral. 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 (Pinotti et al, 2011).

Com o intuito de obter compostos com o mesmo mecanismo de ação dos nutlins, desenvolveu-se, no ano de 2011, uma linha de pesquisa no Laboratório de Química Farmacêutica e Medicinal (LQFM) da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Goiás (UFG), onde pela simplificação molecular, conseguiu-se elaborar o desenho, a síntese e a avaliação do perfil antineoplásico de um novo candidato a protótipo de fármaco, obtido a partir do protótipo nutlin-1, o LQFM030.

Esse candidato apresentou atividade citotóxica contra a linhagem celular 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 (0,023 mM), sendo considerado um promissor agente citotóxico (CARVALHO, 2011).

Considerando os resultados farmacológicos iniciais, que revelaram a ação benéfica do 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, entendeu-se que seria necessário continuar estes estudos cinéticos modificando alguns parâmetros como via de administração, forma de coleta sanguínea e espécie animal, rato, para se compreender melhor as ações deste candidato a fármaco, visando o estabelecimento de sua segurança, toxicidade e perfil cinético de forma mais precisa.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Câncer

É uma patologia caracterizada pela multiplicação e disseminação descontroladas de formas anômalas de células do próprio corpo, quando estas sofrem alterações nos mecanismos de controle que regulam sua capacidade de diferenciação e proliferação (SILVA et al., 2011).

No ano de 2008, mais de 1,4 milhão de novos casos de câncer foram diagnosticados no mundo, onde aproximadamente 77% foram observados em indivíduos com mais de 55 anos de idade. Atualmente, a cada quatro mortes uma é decorrente de câncer, sendo então considerada a segunda maior causa de morte no mundo, ficando atrás apenas de mortes decorrentes de problemas cardiovasculares (SANTOS, 2011).

A Organização Mundial da Saúde (OMS) estimou que, no ano 2030, podem-se esperar 27 milhões de casos incidentes de câncer, 17 milhões de mortes por câncer e 75 milhões de pessoas vivas, anualmente, com câncer (INCA - Disponível em <www.inca.gov.br/estimativa/2012/index.asp?ID=2>. Acesso em: 31/05/2013).

Foi estimado um total de 257.870 casos novos para o sexo masculino e 260.640 para o sexo feminino. Confirma-se a estimativa que o câncer da pele do tipo não melanoma (134 mil casos novos) será o mais incidente na população brasileira, seguido pelos tumores de próstata (60 mil), mama feminina (53 mil), cólon e reto (30 mil), pulmão (27 mil), estômago (20 mil) e colo do útero (18 mil) (Quadro 1) (INCA – Disponível em www.inca.gov.br/estimativa/2012/index.asp?ID=2. Acesso em: 31/05/2013).

Por outro lado, no Quadro 2, estimou-se a distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2012, por sexo, exceto pele não melanoma (INCA – Disponível em www.inca.gov.br/estimativa/2012/index.asp?ID=2). Acesso em: 31/05/2013).


Localização Primária Neoplasia Maligna	Estimativa dos Casos Novos							
	Homens				Mulheres			
	Estados		Capitais		Estados		Capitais	
	Casos	Taxa Bruta	Casos	Taxa Bruta	Casos	Taxa Bruta	Casos	Taxa Bruta
Próstata	60.180	62,54	15.660	75,26	-	-	-	-
Mama Feminina	-	-	-	-	52.680	52,50	18.160	78,02
Colo do Útero	-	-	-	-	17.540	17,49	5.050	21,72
Traquéia, Brônquio e Pulmão	17.210	17,90	4.520	21,85	10.110	10,08	3.060	13,31
Cólon e Reto	14.180	14,75	4.860	23,24	15.960	15,94	5.850	25,27
Estômago	12.670	13,20	3.200	15,34	7.420	7,42	2.170	9,47
Cavidade Oral	9.990	10,41	2.760	13,34	4.180	4,18	1.130	4,92
Laringe	6.110	6,31	1.540	7,56	-	-	-	-
Bexiga	6.210	6,49	1.900	9,28	2.690	2,71	880	3,72
Esôfago	7.770	8,10	1.500	7,26	2.650	2,67	520	2,27
Ovário	-	-	-	-	6.190	6,17	2.220	9,53
Linfoma não Hodgkin	5.190	5,40	1.560	7,66	4.450	4,44	1.560	6,85
Glândula Tireóide	-	-	-	-	10.590	10,59	3.490	14,97
Sistema Nervoso Central	4.820	5,02	1.190	5,82	4.450	4,46	1.200	5,23
Leucemias	4.570	4,76	1.180	5,81	3.940	3,94	1.180	5,02

Continua

Corpo do Útero	-	-	-	-	4.520	4,53	1.700	7,39
Pele Melanoma	3.170	3,29	810	4,05	3.060	3,09	790	3,46
Outras Localizações	43.120	44,80	11.100	53,33	38.720	38,61	10.320	44,50
Subtotal	195.190	202,85	51.780	248,60	189.150	188,58	59.280	254,86
Pele não Melanoma	62.680	65,17	14.620	70,39	71.490	71,30	15.900	68,36
Todas as Neoplasias	257.870	267,99	66.400	318,79	260.640	259,86	75.180	323,22

* Números arredondados para 10 ou múltiplos de 10

Quadro 1: Estimativas para o ano de 2012 das taxas brutas de incidência por 100 mil habitantes e de número de casos novos por câncer, segundo sexo e localização primária. **Fonte:** INCA – Disponível em <<http://www.inca.gov.br/estimativa/2012/tabelaestados.asp?UF=BR>>. Acesso em: 31/05/2013.

Localização primária	casos novos	percentual		Localização primária	casos novos	percentual
Próstata	60.180	30,8%	Homens 	Mama Feminina	52.680	27,9%
Traquéia, Brônquio e Pulmão	17.210	8,8%		Colo do Útero	17.540	9,3%
Cólon e Reto	14.180	7,3%		Cólon e Reto	15.960	8,4%
Estômago	12.670	6,5%		Glândula Tireóide	10.590	5,6%
Cavidade Oral	9.990	5,1%		Traquéia, Brônquio e Pulmão	10.110	5,3%
Esôfago	7.770	4,0%		Estômago	7.420	3,9%
Bexiga	6.210	3,2%		Ovário	6.190	3,3%
Laringe	6.110	3,1%		Corpo do Útero	4.520	2,4%
Linfoma não Hodgkin	5.190	2,7%		Sistema Nervoso Central	4.450	2,4%
Sistema Nervoso Central	4.820	2,5%		Linfoma não Hodgkin	4.450	2,4%

* Números arredondados para 10 ou múltiplos de 10

Quadro 2: Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2012 por sexo, exceto pele não melanoma. **Fonte:** INCA – Disponível em <<http://www.inca.gov.br/estimativa/2012/tabelaestados.asp?UF=BR>>.

Acesso em: 31/05/2013.

As causas do câncer ainda não estão definidas claramente, mas evidências levam a crer que fatores externos ambientais sejam as principais, lembrando que alterações genéticas podem ser herdadas. Entre os fatores ambientais, destacam-se os agentes químicos (nitrito, álcool), físicos (radiação ultravioleta – UV) e biológicos (*Helicobacter pylori*, papiloma vírus humano – HPV) (BRASIL, 2008). Também o estilo de vida (tabagismo, exposição excessiva à luz solar, estresse, sedentarismo) constitui outro fator que apresenta elevada influência no desenvolvimento do câncer (BRASIL, 2008; SANTOS, 2011).

Sabe-se, porém, 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. Na caracterização destes genes temos: oncogenes (k-ras, c-myc, fos, ABL, AKT, ERB-B2, n-ras, PDGFR, jum, P16, ret), genes promotores do crescimento, genes supressores tumorais (APC, TP53, RB, WT1, NF1, DCC, FAP, MCC, BRCA1 e 2, VHL, MLH1) e genes responsáveis pelos reparos em erros de replicação (BRCA1, BRCA2, MMR, MLH1, MSH2, PMSL1, PMSL2 e MSH6) (LOPES; OLIVEIRA; PRADO, 2002; PINTO, 2005; MARTINEZ, 2009).

Atualmente existem variadas abordagens para tratamento de câncer. 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 Novos Fármacos: Pesquisa e Desenvolvimento

A pesquisa e desenvolvimento de novos fármacos antitumorais têm sido bastante incentivados por órgãos fomentadores e pela indústria, pois ainda existem vários tipos de tumores sem tratamento específico ou resistentes aos fármacos existentes. A busca por novos produtos menos agressivos ao organismo é constante, mesmo no manejo de tumores já tratáveis pela quimioterapia e radioterapia, pois afetam principalmente o sistema imunológico do paciente (BUSKÜHL, 2007).

No ano de 2011, foi divulgada uma lista com 887 candidatos a protótipos de fármacos para tratamento de câncer, onde muitos contemplam alta tecnologia para combater a doença, enquanto outros envolvem pesquisas inovadoras no melhoramento de medicamentos existentes. Esses candidatos a protótipos encontram-se na fase de experimentos clínicos ou revisão pelo *Food and Drug Administration* (FDA), a agência norte-americana para proteção da saúde pública (CASTELLANI, 2011).

Um possível tratamento que estimule o sistema imunológico, ou que pelo menos não o deprima, incrementará as chances de recuperação do paciente, uma vez que muitos dos quimioterápicos em uso apresentam vários efeitos adversos, dentre eles a leucopenia, que aumenta a suscetibilidade dos pacientes às infecções. Existe, também, uma grande variedade de tumores que

não possuem tratamento satisfatório. Estas observações fazem com que a procura de novos fármacos com ação antitumoral e propriedades menos agressivas ao paciente sejam o enfoque mais freqüente de pesquisas (BUSKÜHL, 2007).

Segundo Erhardt (2009) existem três possibilidades de pontos de partida na descoberta de uma nova substância: química translacional, pesquisa translacional e medicina translacional. Na química translacional, a descoberta ocorre por observação associada à estrutura química da substância, podendo ser obtida pela observação de um produto natural. Na pesquisa translacional, a descoberta deriva da observação com enfoque em biologia molecular ou farmacologia. Já na medicina translacional, a observação relativa à biologia tem sua origem na clínica, onde se verificam possíveis substâncias, em níveis teórico e computacional, com potencial para iniciar um estudo.

Após determinar possíveis potenciais terapêuticos da substância em estudo, realizam-se testes bioquímicos e celulares com aquelas mais promissoras. Então as bibliotecas computacionais são alimentadas de dados, para que seja realizado o *high-throughput screening* (HTS), um método de experimentação científica muito importante principalmente nas áreas da biologia e química (GOMES, 2011).

Métodos HTS, na química medicinal, permitem milhões de análises de compostos existentes em grandes bibliotecas. Estes métodos realizam a triagem nos bancos de dados a partir de uma entrada pré-definida, testando de centenas a milhares de compostos à procura de informações relevantes. A

molécula eleita “líder” é, então, trabalhada estruturalmente e testada para verificar sua eficácia, toxicidade e farmacocinética, de forma exaustiva. Como esta substância “líder” ainda não é bem conhecida, os testes são realizados *in vitro* (GOMES, 2011).

2.3 Proteínas p53 e MDM2

O *Tp53* é um gene regulador pertencente a uma extensa rede responsável pelo controle da integridade do genoma frente a danos celulares, como ativação de oncogenes celulares, alterações cromossômicas, depleção de metabólitos, choque térmico, hipóxia e oncoproteínas virais (MENENDEZ et al., 2007; MAXIMOV & MAXIMOV, 2008; FERREIRA & ROCHA, 2010). Existe uma variedade de fatores, como o estresse e cofatores de transcrição que podem influenciar a interação direta entre p53 e o reparo ao DNA (VOGELSTEIN et al., 2000).

Estas atividades ocorrem no percurso do desenvolvimento do câncer e acarretam mudanças biológicas, como o desequilíbrio entre apoptose e sobrevivência celular (MENENDEZ et al., 2007; PETITJEAN et al., 2007).

O termo “guardião do genoma” é atribuído à proteína p53 decorrente de sua função como “policia molecular”, por monitorar a integridade do genoma. Atua como um sensor de danos no DNA, auxiliando o sistema de reparo, onde utiliza os momentos de *checkpoints* para paralisar o ciclo celular ou induzir a apoptose, que é um processo de morte celular programada, prevenindo, desta

forma, a proliferação de células com DNA mutado (LEVINE; MOMAND; FINALY, 1991).

A p53 apresenta várias formas de efetuar o reparo ou promover a apoptose, sendo guiada por diferentes fatores a gerar a resposta celular mais adequada (Figura 1) (ZÖRNIG et al., 2001; BROOKS & GU, 2003; MAXIMOV & MAXIMOV, 2008).

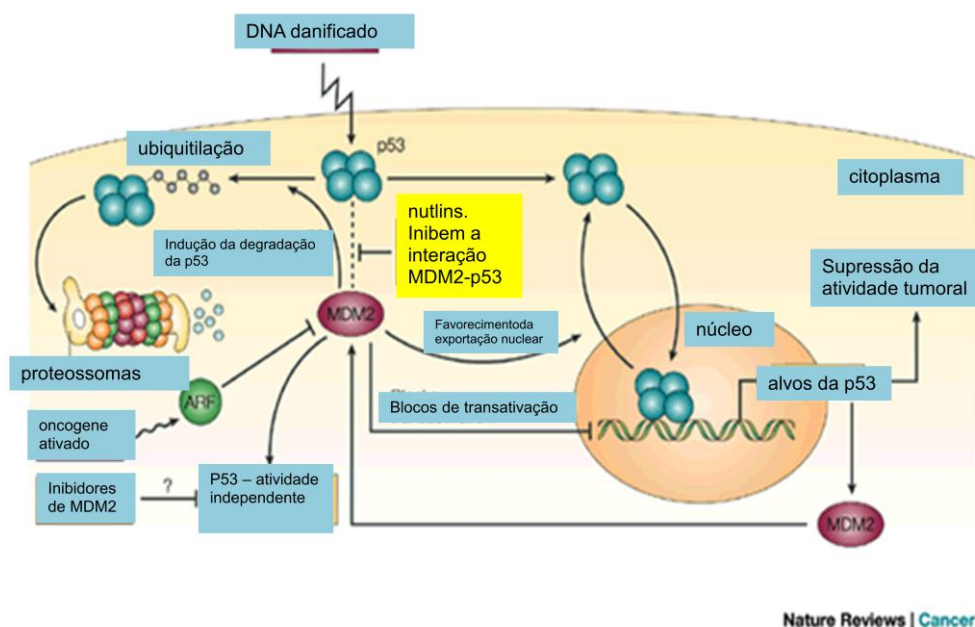


Figura 1. Alvos da p53, sua complexação com MDM2 e local de ação dos nutlins. (adaptação) **Fonte:** Disponível em: www.nature.com/nrc/journal/v3/n2/full/nrc991.html Acesso em: 05/09/1012

Alguns estudos demonstram que a p53 é regulada por acetilação e desacetilação, sendo que, em resposta ao estresse, os níveis de acetilação da p53 aumentam significativamente e na ausência deste, a proteína p53 é

mantida em níveis baixos, sem influenciar no destino da célula (LUO et al., 2000; OREN, 2003).

O bloqueio, das vias moduladas pela proteína p53, ocorre em muitos tipos de tumores tornando o ambiente permissivo para a proliferação de células anormais (PAMPALONA et al., 2012). Desta forma, a função supressora de tumor da proteína p53 é regulada negativamente, ou seja, inativada pelo gene MDM2 (*Murine double minute 2*) (Figura 1). Então, as alterações genéticas das células tumorais, como a super expressão de MDM2, alteram o estado funcional da p53 (DEB, 2002; BROOKS & GU, 2006; TANG et al., 2008).

Aproximadamente 50% dos tumores humanos têm a proteína p53 reprimida devido à superprodução de MDM2, favorecendo o aparecimento de câncer. Conforme ilustrado na Figura 1, o MDM2 reprime a expressão de p53 através de três mecanismos: primeiro, a MDM2 se liga a p53 em seu domínio de transativação bloqueando sua capacidade de ativar a transcrição; segundo, promove a exportação de p53 do núcleo para o citoplasma; e terceiro, MDM2 atua como uma ligase de ubiquitina promovendo a degradação de p53. Por outro lado, em células normais a produção e expressão de p53 estão normais, assim como a quantidade de MDM2, fazendo com que a utilização de inibidores da ligação MDM2-p53 não acarrete danos a estas células (VAN MAERKEN et al., 2006; MICHAEL & OREN, 2003).

Em situações normais, havendo mutação que envolva o gene p53, a estrutura quaternária de sua proteína é modificada, alterando as posições dos epítomos de MDM2, o que evita o processo de degradação, levando a um

acúmulo da proteína p53 no núcleo celular (LEHRBACH et al., 2009). A inibição do MDM2 é mecanismo potencial de desenvolvimento de fármacos antineoplásicos inovadores, como ocorre aos nutlins, recentemente desenvolvidos (VAN MAERKEN et al., 2006).

2.4 Nutlins

Os nutlins (Figura 2) são inibidores de uma interação fundamental entre duas proteínas envolvidas nas vias do câncer, apresentando-se como compostos centrados em um heterociclo contendo nitrogênio (DAVIS; JOHNSTON, 2011).

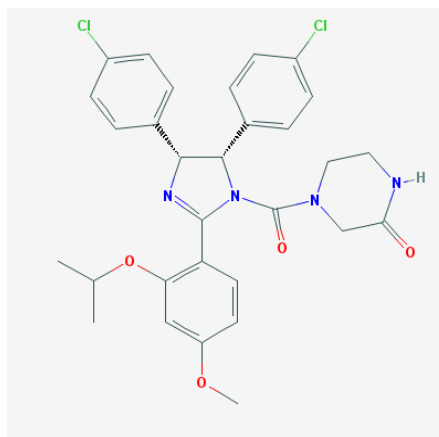


Figura 2. Estrutura molecular do nutlin-3 (fórmula molecular $C_{30}H_{30}Cl_2N_4O_4$).

Fonte: Nutlin 3 (2007-2011).

Nutlins são antagonistas, potentes e seletivos, de 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 (figura 1). Por outro lado, a resposta das células normais, que não possuem alta carga de apoptose, presente nas células tumorais, limita-se à interrupção reversível do ciclo celular, exceto em certos tipos de células da medula óssea. Portanto, os nutlins, por proporcionarem a restauração da função do gene p53, podem adquirir um excelente uso terapêutico 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).

Nutlins (1, 2 e 3) são análogos à cis-imidazolina com capacidade de deslocar a proteína p53 recombinante do seu complexo MDM2 com valores IC_{50} variando de 100 nM a 300 nM (SHANGARY; WANG, 2009; VASSILEV et al., 2004). Em teoria, eles se ligam ao domínio hidrofóbico do MDM2, deslocando a proteína p53. A visualização dessa ligação é possível através de análises cristalográficas tridimensionais, da estrutura. Os nutlins interagem com a fenda hidrofóbica do MDM2, por semelhança na região de ligação helicoidal da p53. Verificou-se que os nutlins bloqueiam a interação MDM2-p53, conduzindo à apoptose e inibindo o crescimento de xenotransplantes tumorais humanos em camundongos *nude* (SHANGARY; WANG, 2009; VASSILEV et al., 2004).

Nutlin 3 (figura 2), um composto desta família, se revelou eficaz contra uma variedade de tumores: neuroblastoma, linfoma, rabdomyosarcoma e leucemia linfoblástica aguda (GU et al., 2008; MIYACHI et al., 2009; TUBE et al., 2009; VAN MAERKEN et al., 2006). Estudos de alterações em sua estrutura

molecular tendem a obter novos compostos com diferentes características farmacocinéticas e farmacodinâmicas.

2.5 LQFM030

No ano de 2010 publicou-se uma lista de 34 novos fármacos que foram inseridos no mercado farmacêutico em 2009, entre eles apenas seis são antitumorais: everolimus da Novartis Pharmaceuticals, utilizado no tratamento de carcinoma renal avançado; ofatumumabe da Genmab, para tratamento de leucemia linfocítica crônica que apresenta recidiva aos tratamentos disponíveis; pralatrexato da Allos Therapeutics, para uso em linfoma de células-T periféricas resistentes a tratamento já praticado; romidepsina da Gloucester Pharmaceuticals, empregado em linfoma de células-T cutâneas; pazopanibe da GlaxoSmithKline, indicado para tratamento de carcinoma de células renais em grau avançado; vacina contra o papiloma vírus humano (HPV) patenteada pela GlaxoSmithKline, indicada para prevenção de câncer cervical (PhRMA, 2010).

Isto demonstra que esses novos fármacos antitumorais correspondem a 17,65% do total que foram incorporados ao mercado em 2009, o que ratifica a demanda por novos fármacos antitumorais principalmente mais efetivos, seguros e com menor índice de efeitos colaterais quando em comparação àqueles utilizados na prática clínica (HARDMAN; LIMBIRD, 2001).

Visando a obtenção de compostos com mecanismo de ação semelhante ao dos nutlins, o Laboratório de Química Farmacêutica e Medicinal (LQFM) da Faculdade de Farmácia da UFG investiu em estudos de simplificação molecular desta família atingindo resultados promissores, quanto ao novo desenho molecular, as reações de síntese e o mecanismo antineoplásico, originando um novo candidato a protótipo de fármaco, derivado do protótipo nutlin-1, o LQFM030 (Figura 3) (CARVALHO, 2011).

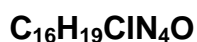
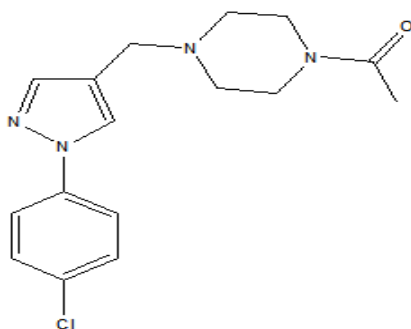


Figura 3. Estrutura molecular do LQFM030: 1-(4-((1-(4-clorofenil)-1H-pirazol-4-il)metil)piperazin-1-il)etanone. **Fonte:** Labre, L.Q.V. (2012).

A qualificação para produção em escala industrial, do LQFM030, foi alcançada devido a bons rendimentos químicos, empregando-se uma metodologia de síntese com poucas etapas, partindo-se de compostos disponíveis no mercado. Ademais, sua obtenção foi planejada por meio de sínteses convergentes, demonstradas em relatório de requerimento de patente (protocolo nº 0000221106814546 – INPI), obtendo-se um composto com Log P = 1,56 e PF = 95-97°C, (CARVALHO, 2011; MENEGATTI, 2011).

Em estudos anteriores, o LQFM030 apresentou excelente perfil citotóxico, aumento de sobrevivência e efeitos estatisticamente significativos identificados sobre o ciclo celular das células K-562, demonstrados em relatório de requerimento de patente (protocolo nº 0000221106814546 – INPI) (MENEGATTI, 2011).

Em estudo de toxicidade aguda por dose única, conforme padrão internacional (OECD, 2001), visando avaliar a segurança do composto LQFM030, após a administração por gavagem de 300 mg/kg, não foram observados sinais de toxicidade visíveis e as alterações comportamentais sistemáticas não alteraram a escala do *screening* hipocrático. Já na dose de 2.000 mg/kg, alterações no comportamento sistemático do animal foram visíveis, destacando-se piloereção na escala de 2 e catatonia na escala de 3. Não ocorreu nenhuma morte de animais durante todo o período do experimento, ficando o LQFM030 classificado na categoria 5 do *Global Harmonized System* (GHS). A análise macroscópica, realizada por necropsia, seguindo sugestão de normas internacionais (OECD, 2001), não demonstrou alteração estrutural ou visual de fígado, baço, coração, pulmão, rins e estômago (CARVALHO, 2011).

Embora tipos de compostos antitumorais, assim como o LQFM030 sejam alvos de grande interesse pela indústria, ainda não existem uma disponibilidade razoável de dados na literatura sobre os perfis farmacocinéticos destes agentes.

2.6 Farmacocinética pré-clínica e sua importância nos estudos clínicos

O descobrimento de novos fármacos é um processo complexo, onde coexistem trabalhos de diversos grupos de especialistas das mais variadas áreas do conhecimento, principalmente das Ciências da Saúde, Biológicas e Exatas. Trata-se, portanto, de atividade multidisciplinar onde a química medicinal funciona como eixo central do processo. Este processo é composto por etapas, entre elas: de pesquisa e desenvolvimento, que contemplam atividades de seleção do alvo molecular com desenvolvimento de ensaios farmacológicos específicos, para aferir a atividade sobre o alvo selecionado e a eficácia em modelos experimentais da patologia escolhida para estudo; desenho molecular racional de possíveis ligantes para o alvo escolhido, como estratégia de abordagem fisiológica; e descoberta de compostos protótipos e seus melhoramentos, etapa crítica desta fase (ROCCO et al., 2010).

Pesquisas com novos fármacos/medicamentos merecem especial atenção por utilizarem seres humanos como sujeitos, além da possível repercussão de seus resultados (GOLDIM, 2007). Tais projetos de pesquisa são agrupados em etapas e fases, regulamentadas por diferentes documentos e diretrizes, visando preservar a integridade e segurança dos participantes. No Brasil, as fases de Pesquisa Clínica são regidas pelas Resoluções nº 196 e nº 251 do Conselho Nacional de Saúde – CNS (BRASIL, 1996; BRASIL, 1997) e pela Resolução nº 129 do MERCOSUL (1996). Esses estudos podem ser

classificados em duas etapas: pré-clínica e clínica, sendo aquela realizada em modelos celulares e animais e esta em seres humanos. Em conformidade com a Resolução nº 251 (BRASIL, 1997), a pesquisa pré-clínica deve gerar informações que justifiquem a realização de pesquisas em seres humanos.

Resultados pré-clínicos devem demonstrar a relevância dos dados obtidos visando possíveis aplicações terapêuticas além de estimar alguns dos riscos com o seu uso. Esporadicamente, estudos pré-clínicos também são denominados “estudos de fase 0”, por antecederem as fases clínicas, onde seres humanos são incluídos (GOLDIM, 2007).

Estudos com animais, que tentam elucidar a farmacocinética de uma substância química, são conduzidos no sentido de obter informações sobre absorção, distribuição, biotransformação (metabolismo) e excreção, visando estabelecer uma relação entre concentração ou dose com a toxicidade observada e entendimento de seu mecanismo. Então, a partir daí, conhecemos os parâmetros farmacocinéticos básicos e o potencial de acumulação, em tecidos e órgãos, da substância testada, bem como seu perfil indutor ou inibidor metabólico. Estes dados farmacocinéticos podem contribuir em 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).

A farmacocinética (Figura 4) emprega, em seus estudos, modelos matemáticos na descrição das variações de concentração versus tempo, dos processos de administração, absorção, distribuição, biotransformação e eliminação dos fármacos. A variável básica, dos estudos de cinética, é a

concentração dos fármacos e de seus metabólitos nos diferentes líquidos e/ou compartimentos biológicos. A escolha do modelo farmacocinético a ser seguido, requer algumas considerações especiais, devendo-se atentar às características físico-químicas dos fármacos, bem como seu comportamento no sistema biológico. Deve-se, também, conhecer os problemas e limitações da análise farmacocinética, assim como suas relações com a farmacodinâmica (SILVA, 2010).

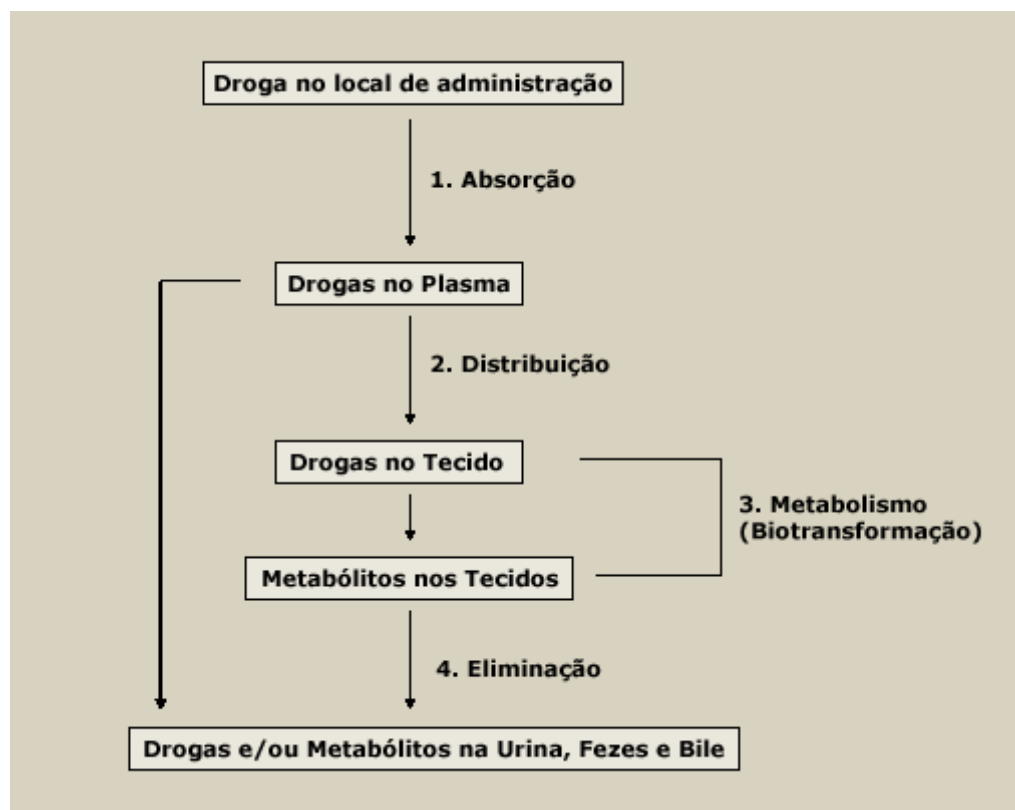


Figura 4. Etapas farmacocinéticas da administração oral de fármacos.

Fonte: Disponível em: http://www.sistemanervoso.com/images/farma/fac_00.gif

Acesso em: 05/09/2012

Parâmetros farmacocinéticos podem ser determinados usando-se sistemas de dose única ou de múltiplas doses do fármaco/medicamento. Estudos que utilizam dose única são realizados em pouco tempo e os pacientes ou animais ficam menos expostos aos fármacos. A dose, estabelecida no estudo, não deve ser tóxica, mas elevada o suficiente a ponto de facilitar a identificação do metabólito nas formas de excreção e no plasma, otimizando a obtenção de resultados (GOMES, 2011).

Preconiza-se o uso de doses múltiplas quando: o método analítico não apresenta sensibilidade suficiente que permita utilizar o método de dose única; em estudos idealizados para produtos de liberação controlada; quando o fármaco é muito tóxico; quando se suspeita de cinética dependente do tempo ou não linear. Em estudos de dose única determinam-se o volume de distribuição (V_d), o *clearance* e a meia-vida do fármaco (SILVA, 2010).

O conceito de 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).

O grau de distribuição de um fármaco no organismo pode ser interpretado pelo seu volume aparente de distribuição (V_d), que representa o volume no qual uma dose específica do fármaco deve ser solubilizada visando atingir a mesma concentração plasmática (SCHELLACK, 2006). Este parâmetro (V_d) pode sofrer alterações por influência de diferentes fatores, entre eles: sexo,

idade, peso, estado patológico e nutritivo, relacionados ao paciente, e polaridade, grau de ionização, lipossolubilidade e porcentagem de ligação às proteínas plasmáticas, relacionados ao fármaco (SILVA, 2010).

Quando queremos indicar o grau de depuração de determinada droga do sangue, utilizamos uma palavra de origem inglesa, *clearance*, que é expressa em unidade de volume de sangue depurado por uma unidade de tempo. Consiste em um parâmetro farmacocinético intimamente relacionado com a constante de eliminação (k_{el}), apresentando um índice direto de eliminação originária do sangue.

Métodos cromatográficos são muito utilizados na obtenção de concentrações das drogas, nos fluidos corporais, sendo entre eles a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) o mais utilizado, pela sua sensibilidade e ampla aplicabilidade a diversas substâncias de interesse nos vários campos da ciência (SKOOG; HOLLER; NIEMAN, 2002).

Entre os detectores, de diversos tipos e especificidades, podemos citar como mais utilizados os de espectro de massa - MS, ultravioleta visível – UV-Vis, índice de refração e UV com detector de arranjo de diodos – DAD (CASS; DEGANI, 2001).

Sabendo que estudos em animais são de grande utilidade e necessários, pois auxiliam a compreensão das ações de novos protótipos a candidatos a fármacos, permitindo estabelecer seu perfil farmacocinético e com ele sua segurança e toxicidade e considerando sua potencialidade terapêutica, o

candidato a protótipo de fármaco antitumoral LQFM030 continua sendo estudado gerando novas descobertas e perspectivas como antineoplásico.

A proposta deste trabalho é continuar o estudo do perfil farmacocinético do LQFM030, agora em outro roedor, rato, por outra via de administração, oral, utilizando nova forma de coleta, por canulação venosa jugular, e diferente método de cromatografia, LC/MS-MS, visando determinar seus parâmetros iniciais de caracterização cinética e compará-los com outros modelos descritos na literatura, além de discutir as possíveis diferenças observadas e suas prováveis causas.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Determinar e avaliar os parâmetros farmacocinéticos do candidato a protótipo de fármaco antitumoral LQFM030 em ratos.

3.2 Objetivos específicos

Estudar a farmacocinética do candidato a protótipo de fármaco antitumoral LQFM030, em ratos, por via oral;

Comparar os parâmetros farmacocinéticos do LQFM030 em ratos, com outros modelos descritos na literatura.

Discutir as possíveis diferenças observadas nos parâmetros cinéticos e prováveis causas.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Materiais

Neste estudo foram utilizados: 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 diariamente do sistema Milli-Q (Millipore) utilizando o ultrapurificador de água Direct-Q Milliore (São Paulo, SP, Brasil); LQFM030, sintetizado pelo Laboratório de Química Farmacêutica Medicinal da Universidade Federal de Goiás (UFG); domperidona CRS Farmacopéia Européia, utilizada com padrão interno (PI).

Como modelo animal, foram utilizados ratos machos saudáveis, com peso médio de 186 g, idade aproximada de oito (08) semanas, provenientes do Biotério Central da UFG, em Goiânia, GO. Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da UFG com protocolo nº 137/2009.

Os procedimentos envolvendo o manejo e cuidados dos animais foram realizados baseados no *Niehs Handbook for Investigators and Technicians*, do *National Institute of Environmental Health Sciences* (NIEHS) nos Estados Unidos da América, de setembro de 2007 e “Princípios Éticos de Experimentação Animal”, propostos pelo COBEA, visando minimizar o sofrimento dos animais através da realização correta de todos os procedimentos que envolvam os mesmos, segundo preceitos legais encontrados na “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.

4.2 Instrumentação

4.2.1 Cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)

As análises quantitativas de LQFM030 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).

As análises foram realizadas com coluna ACE[®] C18 (100 mm × 4,6mm, 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). Método desenvolvido e validado em conjunto com GOMES, S. A., segundo RDC-27 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA, publicada em 17 de maio de 2012.

4.2.2 Equipamentos

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[®]).

4.2.3 Preparo de solução padrão e reagentes

O LQFM030 (25 mg) foi pesado e posteriormente 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 10mL, completado o

volume com metanol 50% e homogeneizado, fornecendo a solução primária com 500 µg/mL.

A seguir, foram realizadas diluições seriadas, para obter as soluções de trabalho, até concentrações finais de 50 ng/mL, 150 ng/mL, 1250 ng/mL, 12500 ng/mL, 25000 ng/mL, 37500 ng/mL, 60000 ng/mL, 75000 ng/mL, 120000 ng/mL e 500000 ng/mL. Similarmente, foi preparada solução de domperidona (50 µg/mL) em metanol 50%, grau HPLC, para uso como PI. Todas as soluções de LQFM030 e PI foram estocadas a -20°C para uso posterior.

4.2.4 Metodologia de extração do LQFM030 de amostras de plasma

As amostras da curva de calibração (10 ng/mL, 30 ng/mL, 250 ng/mL, 2500 ng/mL, 5000 ng/mL, 7500 ng/mL, 12000 ng/mL, 15000 ng/mL) e os Limite Inferior de Quantificação (LIQ), Controles de Qualidade Baixo (CQB), médio (CQM), alto (CQA) e diluição (CQD), de 10 ng/mL, 30 ng/mL, 7500 ng/mL, 12000 ng/mL e 15000 ng/mL respectivamente, foram preparados em tubos falcon de 10 mL. Em frascos ependorff de 2 mL, foram colocados 25µL de cada uma das soluções de trabalho contendo LQFM030, 2 µL de solução de PI domperidona (50000 ng/mL), 25 µL de solução de hidróxido de sódio 0,01 M, 125 µL de plasma e acrescentados 1.000 µL de éter metil-terc-butil (MTBE). Agitou-se cada tubo por 1 min e, em seguida, centrifugou-os a 10.000 rpm por 5 min. Foram transferidos 500 µL da camada orgânica para tubo de ensaio limpo

e levado para evaporação até securo, sob fluxo de oxigênio a 10 lbf/pol, em temperatura de 50°C. A amostra seca foi ressuspensa com 500 µL de metanol 50%, agitada por 01 minuto em vórtex, transferida para um vial com insert limpo e injetada no cromatógrafo (3 µL).

Cada uma das curvas de calibração no plasma consistiu em branco, branco (com PI), 8 (oito) níveis de calibração em duplicata e 6 (seis) replicatas de cinco controles de qualidade: CQA, CQD, CQM, CQB e LIQ, com ponderação igual a $1/x^2$, devido à heterocedasticidade do método, analisadas por três dias para avaliação de linearidade, precisão e exatidão.

4.3 Experimentação em Animais

Os animais foram acondicionados na Sala de Experimentação Animal do Núcleo de Estudos e Pesquisas Tóxico-Farmacológicas (NEPET), da Faculdade de Farmácia da UFG, para aclimação, 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 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 utilizados 3 animais, ratos machos jovens, tendo sido o candidato a protótipo de fármaco antineoplásico LQFM030 administrado, em dose preestabelecida (100 mg/Kg), por gavagem,

no mesmo instante. Após o procedimento de gavagem, os animais foram anestesiados, por via intraperitoneal, com uretano (500 mg/Kg) e cloralose (50 mg/Kg), e colocados em decúbito dorsal sobre suporte firme, para procedimento de canulação da veia jugular esquerda, para posterior coleta sanguínea. Após a conclusão do procedimento de canulação venosa, iniciou-se os procedimentos de coleta sanguínea com seringas heparinizadas, sendo retirados volumes de 1 mL de sangue, por coleta e restabelecida a homeostase por igual volume de salina estéril, nos tempos de 0,5 h, 1 h, 2,5 h, 3,5 h, 4,5 h, 6 h, 7 h e 8 h.

Foi utilizada a heparina, 5 UI/mL, como anticoagulante, sendo colocada uma gota em cada tubo ependorf e feita a ambientação das seringas antes da coleta.

Após cada coleta, as amostras sanguíneas foram identificadas (animal e tempo da coleta) e centrifugadas para obtenção do plasma, onde, posteriormente, foram realizadas as dosagens do protótipo LQFM030, por LC-MS/MS, utilizando método analítico desenvolvido e validado em conjunto com Gomes, S.A., no Instituto de Ciências Farmacêuticas (ICF) para este estudo.

As concentrações plasmáticas, obtidas no experimento, foram utilizadas na confecção dos gráficos que demonstram as curvas de concentração plasmática *versus* tempo e na determinação dos parâmetros farmacocinéticos.

As análises foram realizadas observando os perfis individuais dos animais que constituíam o grupo experimental. Foram mensurados os parâmetros farmacocinéticos de biodisponibilidade absoluta, meia-vida,

clearance, volume aparente de distribuição concentração plasmática máxima (C_{max}).

A C_{max} foi o único parâmetro farmacocinético obtido diretamente dos dados experimentais, sendo os demais calculados utilizando-se os gráficos das curvas de concentração plasmática *versus* tempo. O parâmetro de meia-vida foi obtido 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 (ASC) de concentrações plasmáticas *versus* tempo ASC_{0-t} e $ASC_{0-\infty}$ foram obtidas utilizando-se para cálculos 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 V_d , onde $V_d = Cl/\beta$.

Os resultados alcançados no estudo de farmacocinética pré-clínica são demonstrados por intermédio de parâmetros apresentados pelo programa Winnonlin 5.0, fornecido pela empresa Pharsight (St. Louis, MO, Estados Unidos).

5 PUBLICAÇÃO

Revista: Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada / *Journal of Basic and Applied Pharmaceutical Sciences*.

Artigo: Avaliação Farmacocinética pré-clínica, em ratos, do LQFM030, um candidato a protótipo de fármaco antitumoral, por LC/MS-MS.

Autores: Iury Valentim Jorge Zoghaib, Alarisse Arçari Fachetti Zoghaib, Luciana Vieira Queiroz Labre, Sandro Antônio Gomes, Ricardo Menegatti, Luiz Carlos da Cunha.

AVALIAÇÃO FARMACOCINÉTICA PRÉ-CLÍNICA, EM RATOS, DO LQFM030, UM CANDIDATO A PROTÓTIPO DE FÁRMACO ANTITUMORAL, POR LC/MS-MS

Iury Valentim Jorge Zoghaib¹, Alarisse Arçari Fachetti Zoghaib¹, Luciana Vieira Queiroz Labre¹, Sandro Antônio Gomes^{1,2}, Ricardo Menegatti³, Luiz Carlos da Cunha¹

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

²Instituto de Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Goiás, Brasil

³Laboratório de Química Farmacêutica e Medicinal, Universidade Federal de Goiás, Brasil

Autor para correspondência: Luiz Carlos da Cunha - Núcleo de Estudos e Pesquisas Tóxico-Farmacológicas, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Goiás, Av. Universitária, esq. com 1ª Avenida, segundo andar, Setor Universitário, 74605-220, Goiânia, GO, Brasil

Tel: +55 62 3521-1821

Fax: +55 62 3209-6044

e-mail: lucacunha@gmail.com

Título Resumido: Avaliação farmacocinética pré-clínica, de um candidato a protótipo de fármaco antitumoral.

RESUMO

LQFM030 é um candidato a protótipo de fármaco antitumoral com ação antineoplásica demonstrada em estudos anteriores. O presente trabalho demonstrou resultados obtidos com experimentação em ratos, utilizando administração em dose única, p.o., coleta sanguínea através de canulação de veia jugular e técnica analítica validada em LC/MS-MS e os comparou com resultados de outros estudos realizados em condições diferentes. Os animais receberam dose de 100 mg/kg (p.o.) de LQFM030 e foram anestesiados para realização de coleta sanguínea seriada nos intervalos de 0,5 h, 1 h, 2,5 h, 3,5 h, 4,5 h, 6 h, 7 h e 8 h. Os parâmetros analíticos utilizados em LC-MS/MS foram: coluna ACE[®] C18 (100 mm×4,6 mm, tamanho de partícula 5 µm), 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 domperidona, extração líquido-líquido com éter metil-terc-butil (MTBE) e volume de injeção de 3,0 µL. As médias dos parâmetros farmacocinéticos foram: $t_{(1/2)} = 3,61 \pm 0,68$ h; $Cl_T/F = 36,49 \pm 2,23$ mL/min/kg; $Vd/F = 11,41 \pm 1,58$ L/kg. O LQFM030 apresentou baixo valor de $t_{1/2}$, elevado Vd e elevado valor de Cl_T , permitindo entender que o protótipo estudado apresentou bom perfil de distribuição tecidual e/ou foi extensivamente eliminado. Quando comparados com parâmetros cinéticos obtidos em outros estudos, observou-se diferença nos resultados, justificada pela elevada variabilidade interespecies, principalmente na taxa de metabolismo basal e peso corporal, uma vez que as vias de administração, oral e intraperitoneal, são cineticamente semelhantes.

Palavras-chave: *nutlins. LQFM030. Farmacocinética pré-clínica.*

ABSTRACT

Preclinical pharmacokinetic of LQFM030, a candidate antineoplastic prototype drug by LC/MS-MS.

LQFM030 is a candidate prototype antitumor drug with antineoplastic action demonstrated in previous studies. The present study showed results with rats using a single dose, orally, blood collection by jugular vein cannulation and analytical technique validated LC/MS-MS and compared with results from other studies conducted indifferent conditions. The animals received 100 mg/kg (*p.o.*) of LQFM030 and they were anesthetized for serial blood collection was performing in the following intervals of 0.5 h, 1 h, 2.5 h, 3.5 h, 4.5 h, 6 h, 7 h e 8 h. The analytical parameters were used for LC-MS/MS: ACE[®] C18 column (100mm x 4.6 mm, particle size 5 mM), 2 mM mobile phase buffer ammonium acetate with 0.025% formic acid and methanol (50%:50%, v/v), flow 1.2 mL/min, column temperature 40°C, internal standard domperidone, liquid-liquid extraction with methyl tert-butyl ether (MTBE) and injection volume 3.0 µL. The mean pharmacokinetic parameters were: $t_{1/2} = 3.61 \pm 0.68$ h; $Cl_T/F = 36.49 \pm 2.23$ mL/min/kg, $Vd/F = 11.41 \pm 1.58$ L/kg. The LQFM030 had low value of $t_{1/2}$, Vd high and high value of Cl_T , allowing us to understand that the prototype studied showed good tissue distribution profile and/or has been extensively cleared. When compared with the kinetic parameters obtained in other studies, it was observed difference in results is justified by the high interspecies variability, mainly in basal metabolic rate and body weight, once the route of administration, orally and intraperitoneally, are kinetically similar.

Keywords: *nutlins. LQFM030. Preclinical pharmacokinetics.*

INTRODUÇÃO

Testes pré-clínicos, em geral, visam estudar parâmetros farmacocinéticos, farmacodinâmicos e toxicológicos, no intuito de avaliar a segurança e a eficácia dos compostos candidatos a fármacos, utilizando estudos realizados *in vitro*, *in vivo*, *in silico* e *ex vivo* (DICKSON; GAGNON, 2004). Desta forma, ensaios pré-clínicos podem fomentar a inovação ou interromper uma pesquisa.

Ensaio de avaliação do perfil farmacocinético de uma substância química são conduzidos no sentido de obter informações sobre os processos de absorção, distribuição, biotransformação (metabolismo) e excreção, pretendendo auxiliar no estabelecimento das relações entre concentração plasmática, dose do fármaco e toxicidade observada, além de facilitar a elucidação do mecanismo deste último parâmetro (GOMES, 2011).

A regulamentação das atividades de pesquisa, envolvendo seres humanos e animais, encontrou nos estudos destinados a descobrir novos fármacos um dos seus grandes fatores motivadores (GOLDIM, 2007). Estes estudos são classificados em duas etapas: pré-clínica e clínica, sendo aquela realizada em modelos celulares e animais, enquanto esta é aplicada a seres humanos. No Brasil, conforme preconiza a Resolução nº 251 do Conselho Nacional de Saúde (CNS) (BRASIL, 1997), a pesquisa pré-clínica deve fornecer informações que justifiquem o prosseguimento dos estudos com a realização de pesquisas em seres humanos (GOLDIM, 2007).

Utilizando técnicas de modelagem computacional, através de estudos recentes descobriu-se um grupo de moléculas denominadas nutlins, que auxiliam o organismo no combate ao crescimento de tumores, podendo, por isto, se

caracterizarem como a mais nova estratégia de combate ao câncer (GOMES, 2011; VAN MAERKEN et al., 2006).

Os nutlins são compostos centrados em um heterociclo contendo nitrogênio (Figura 1). Apresentam como função principal, no combate ao câncer, a inibição da molécula MDM2, que modula, regulando de forma negativa, a atividade da proteína p53, supressora de tumor considerada “guardiã do genoma” (DAVIS; JOHNSTON, 2011; VAN MAERKEN et al., 2006). Os nutlins têm atraído grande interesse, por parte de pesquisadores e indústrias farmacêuticas.

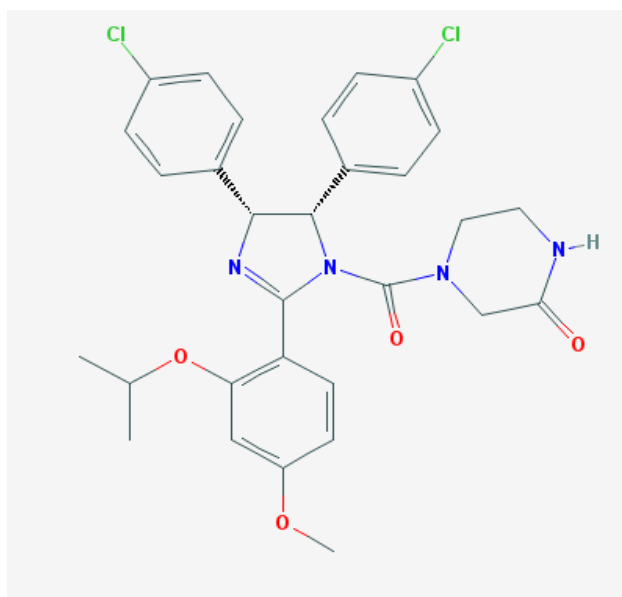


Figura 1. Estrutura molecular do nutlin-3. **Fonte:** Nutlin 3 (2007-2011).

Com a proposta de desenvolver compostos com o mesmo mecanismo de ação, o Laboratório de Química Farmacêutica e Medicinal (LQFM) da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Goiás (UFG), tendo como molde o protótipo nutlin-1, iniciou um estudo visando a simplificação molecular dos nutlins, obtendo resultados promissores, logrando êxito quanto ao desenho da molécula, a síntese e

avaliação do perfil antineoplásico de um novo candidato a protótipo de fármaco, nomeado LQFM030 (Figura 2) com Log P = 1,56 e PF = 95-97°C (CARVALHO, 2011; MENEGATTI, 2011).

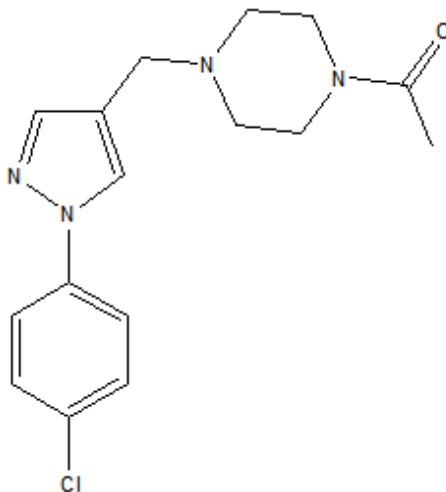


Figura 2. Estrutura molecular do LQFM030: 1-(4-((1-(4-clorofenil)-1H-pirazol-4-il)metil)piperazin-1-il)etanone. **Fonte:** Labre, L.V.Q. (2012)

Em estudos anteriores, o LQFM030 apresentou excelente perfil citotóxico, aumento de sobrevivência e efeitos estatisticamente significativos identificados sobre o ciclo celular das células K-562, demonstrados em relatório de requerimento de patente (protocolo nº 0000221106814546 – INPI) (MENEGATTI, 2011).

No intuito de avaliar a segurança do composto LQFM030, verificou-se em estudo de toxicidade aguda com administração por gavagem utilizando dose única de 300 mg/kg, realizado de acordo com padrão internacional (OECD, 2001), a não existência de sinais de toxicidade visíveis além das observações comportamentais sistemáticas ficarem na escala 0 do *screening* hipocrático. No mesmo estudo, agora utilizando a dose de 2.000 mg/kg, alterações no comportamento sistemático do

animal foram observadas, identificando piloereção na escala 2 e catatonía na escala 3. Não houve morte, ou letalidade, dos animais ao longo do período experimental, ficando o LQFM030 classificado na categoria 5 do *Global Harmonized System* (GHS), para toxicidade aguda pela via oral. Em análises macroscópicas de material de necropsia, sugeridas nas normas internacionais (OECD, 2001), não foram observadas alterações visuais ou estruturais do fígado, baço, coração, pulmão, rins e estômago (CARVALHO, 2011).

Considerando, então, os resultados farmacológicos iniciais nos quais a ação benéfica do LQFM030 para atividade antineoplásica foi identificada, iniciou-se este estudo no intuito de:

- Estudar a farmacocinética do candidato a protótipo de fármaco antitumoral LQFM030, em ratos, por via oral;
- Comparar os parâmetros farmacocinéticos do LQFM030 em ratos, com outros modelos descritos na literatura ;
- Discutir as possíveis diferenças observadas nos parâmetros cinéticos e prováveis causas.

Através dos resultados obtidos pelo presente trabalho, futuros estudos de biodisponibilidade, posologia e aplicabilidade terapêutica do LQFM030 terão um grande auxílio em suas análise e compreensão.

MATERIAIS E MÉTODOS

Reagentes

Foram utilizados neste estudo: 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 diariamente do sistema Milli-Q (Millipore) utilizando o ultrapurificador de água Direct-Q Milliore (São Paulo, SP, Brasil); LQFM030, sintetizado pelo Laboratório de Química Farmacêutica Medicinal da Universidade Federal de Goiás (UFG); domperidona CRS Farmacopéia Européia, utilizada com padrão interno (PI).

Aspectos Éticos

O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do Hospital das Clínicas (HC), da UFG, sob protocolo nº 137/2009. Os procedimentos envolvendo o manejo e cuidados dos animais foram realizados baseados no *Niehs Handbook for Investigators and Technicians, do National Institute of Environmental Health Sciences (NIEHS)* nos Estados Unidos da América, de setembro de 2007 e “Princípios Éticos de Experimentação Animal”, propostos pelo COBEA, visando minimizar o sofrimento dos animais através da realização correta de todos os

procedimentos que envolvam os mesmos, segundo preceitos legais encontrados na “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.

Experimento

Foram utilizados ratos machos saudáveis, com peso corpóreo médio de 186 ± 2 g, provenientes do Biotério Central da UFG, em Goiânia, GO. Durante todo o experimento e por um período de aclimação de sete dias antes do início do experimento, os animais foram acondicionados na Sala de Experimentação Animal do Núcleo de Estudos e Pesquisas Tóxico-Farmacológicas (NEPET), da Faculdade de Farmácia da UFG, à temperatura ambiente ($25 \pm 2^\circ\text{C}$) com umidade relativa do ar entre 50% e 70% e ciclo claro-escuro de 12/12 h. Receberam água filtrada e ração para roedores (Labina, Purina do Brasil Ltda., Paulínia, SP, Brasil) *ad libitum*.

Os animais receberam uma dose de LQFM030 de 100 mg/kg de peso corporal, em solução, por via oral (p.o.), com suspensão alimentar e de água 6 h antes do início do experimento.

Delineamento do estudo farmacocinético

Para o estudo farmacocinético, utilizaram-se três animais numerados 1, 2 e 3, empregando-se a preparação de LQFM 030 na dose de 100 mg/Kg, por via oral e coleta sanguínea por canulação de veia jugular.

A solução do protótipo LQFM030, preparada em etanol, propilenoglicol e água ultra pura, nas proporções de 3:47:50 (v/v/v), foi administrada p.o. na dose de 100 mg/kg de peso corporal a cada animal do experimento. Após o procedimento de gavagem, os animais foram anestesiados, por via intraperitoneal, com uretano (500 mg/Kg) e cloralose (50 mg/Kg), e colocados em decúbito dorsal sobre suporte firme, para procedimento de canulação da veia jugular esquerda, para posterior coleta sanguínea. Foi utilizada a heparina, 5 UI/mL, como anticoagulante, sendo colocada uma gota em cada tubo ependorf, onde seriam depositadas as amostras, e feita a ambientação das seringas antes da coleta.

Concluído o procedimento de canulação venosa, iniciaram-se as coletas sanguíneas com as seringas heparinizadas, sendo retirados volumes de 1 mL de sangue, por coleta e restabelecida a homeostase por igual volume de salina estéril, nos tempos de 0,5 h, 1 h, 2,5 h, 3,5 h, 4,5 h, 6 h, 7 h, 8 h.

Após cada coleta, as amostras sanguíneas foram identificadas (animal e tempo da coleta) e centrifugadas a 3000 rpm por 12 min para obtenção do plasma, que foi congelado a -20°C até a análise por LC/MS-MS.

O branco analítico, para os três animais pertencentes ao estudo foi representado por amostra de plasma de rato sem receber o LQFM030, apenas os diluentes e anestésicos.

Para a caracterização da molécula LQFM030, foi utilizado espectrômetro de massas *Applied Biosystems* MDS Sciex API 3200 Triplo Quadrupolo (MS/MS), coluna ACE[®] C18 (5 µm, 4,6 mm × 50 mm), à temperatura de 40°C. A fase móvel foi constituída por mistura de tampão 2 mM acetato de amônio com ácido fórmico 0,025% e metanol (50:50), com fluxo de 1.200 µL/min e volume de injeção de 3 µL.

Para o processo de extração do LQFM030, preparou-se uma alíquota de 200 µL das amostras de plasma em tubos falcon de 10 mL, conforme a seguinte metodologia: em frascos ependorff de 2 mL, foram colocados 25 µL de cada uma das soluções de trabalho contendo LQFM030, 25 µL de solução de PI domperidona (50000 ng/mL), 25 µL de solução de hidróxido de sódio 0,01 M, 125 µL de plasma e acrescentados 1.000 µL de éter metil-terc-butil (MTBE); agitou-se cada tubo por 1 min e, em seguida, centrifugou-os a 10.000 rpm por 5 min; foram transferidos 750 µL da camada orgânica para tubo de ensaio limpo e levados para evaporação até seca, sob fluxo de oxigênio a 10 lbf/pol, em temperatura de 50°C. A amostra seca foi ressuspendida com 250 µL de metanol 50%, agitada por 1 minuto em vórtex, transferida para um vial com insert limpo e injetada no cromatógrafo (3 µL).

Cada uma das curvas de calibração no plasma consistiu em branco, branco com PI, 8 (oito) níveis de calibração em duplicata e 6 (seis) replicatas de cinco controles de qualidade: CQA, CQD, CQM, CQB e LIQ, com ponderação igual a $1/x^2$, analisadas por três dias para avaliação de linearidade, precisão e exatidão.

O método analítico foi previamente validado, em conjunto com Gomes, S.A., no Instituto de Ciências Farmacêuticas (ICF), utilizando como parâmetros os testes recomendados na RDC nº 27/2012 - ANVISA, tendo apresentado linearidade de 10 a 15000 ng/mL e limite inferior e superior, de detecção e quantificação, de 10 ng/mL e 15000 ng/mL, respectivamente. A precisão foi avaliada em termos de repetibilidade

(intracorrída), resultando de 0,6% a 5,5%, e precisão intermediária (intercorrída), resultando 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 obtidos foram t_R (LQFM030) = 2,48' e t_R (domperidona) = 3,01'

Após obtenção das concentrações do LQFM 030 nos respectivos tempos de coleta de amostra, os valores foram plotados em *software* Winnonlin 5.0 Pharsight (St. Louis, MO, Estados Unidos), resultando em quatro curvas de concentração *versus* tempo, sendo uma para cada rato participante do experimento e uma para a média, permitindo a avaliação do perfil de decaimento plasmático, obtendo-se os seguintes parâmetros farmacocinéticos, em modelo monocompartimental aberto: constante de velocidade de eliminação (k_{el}), meia-vida de eliminação plasmática ($t_{1/2}$), concentração máxima (C_{max}), área sob a curva de concentração *versus* tempo de 0 a t h (ASC_{0-t}), extrapolação da área sob a curva de concentração *versus* tempo para o infinito ($ASC_{t-\infty}$), área sob a curva de concentração *versus* tempo total (ASC_T), volume de distribuição (Vd/F) e *clearance* total (Cl_T/F).

RESULTADOS

As médias dos parâmetros farmacocinéticos, calculadas após obtenção das concentrações do LQFM030 nos respectivos tempos de coleta de amostra, sendo os valores plotados em *software* Winnonlin 5.0 Pharsight, foram (Tabela 1):

- × $t_{(1/2)} = 3,61 \pm 0,68$ h;
- × $Cl_T/F = 36,49 \pm 2,23$ mL/min/kg;
- × $Vd/F = 11,41 \pm 1,58$ L/kg.

Os gráficos das curvas de decaimento de concentração *versus* tempo, dos três animais estudados (Ratos 1, 2 e 3) e da média (Figura 1), foram determinados pelo modelo monocompartimental e obtidos pelo *software* Winnonlin 5.0 Pharsight. Este modelo foi o que mais se adaptou aos dados experimentais, demonstrando, claramente, uma distribuição instantânea com queda rápida da concentração e apontando uma fase de eliminação significativa.

Tabela 1. Parâmetros farmacocinéticos do LQFM030 em Ratos machos (n = 3), submetidos à dose p.o. de 100 mg/kg de peso corporal do animal, obtidos utilizando o software Winnonlin 5.0 Pharsight.

Animal	K_{el} (h⁻¹)	t_{1/2} (h)	C_{max} (µg/mL)	ASC_{0-t} (h*µg/mL)	ASC_T (h*µg/mL)	Vd/F (L/kg)	Cl_T/F (mL/min/kg)
1	0,17	3,99	7,55	33,66	45,55	12,66	36,59
2	0,23	2,97	7,64	35,65	43,62	9,85	38,20
3	0,16	4,27	7,77	36,31	49,32	12,50	33,79
Média ± DP	0,19 ± 0,04	3,61 ± 0,68	7,65 ± 0,11	35,20 ± 1,38	45,67 ± 2,90	11,41 ± 1,58	36,49 ± 2,24

ASC_{0-t} = Área sob a curva de concentração *versus* tempo até o tempo de coleta de sangue; ASC_T = Área sob a curva de concentração *versus* tempo 0 a infinito (total); C_{max} = concentração máxima; t_{1/2} = meia-vida de eliminação; K_{el} = constante de eliminação; Vd/F = volume de distribuição; Cl_T/F = *clearance* total.

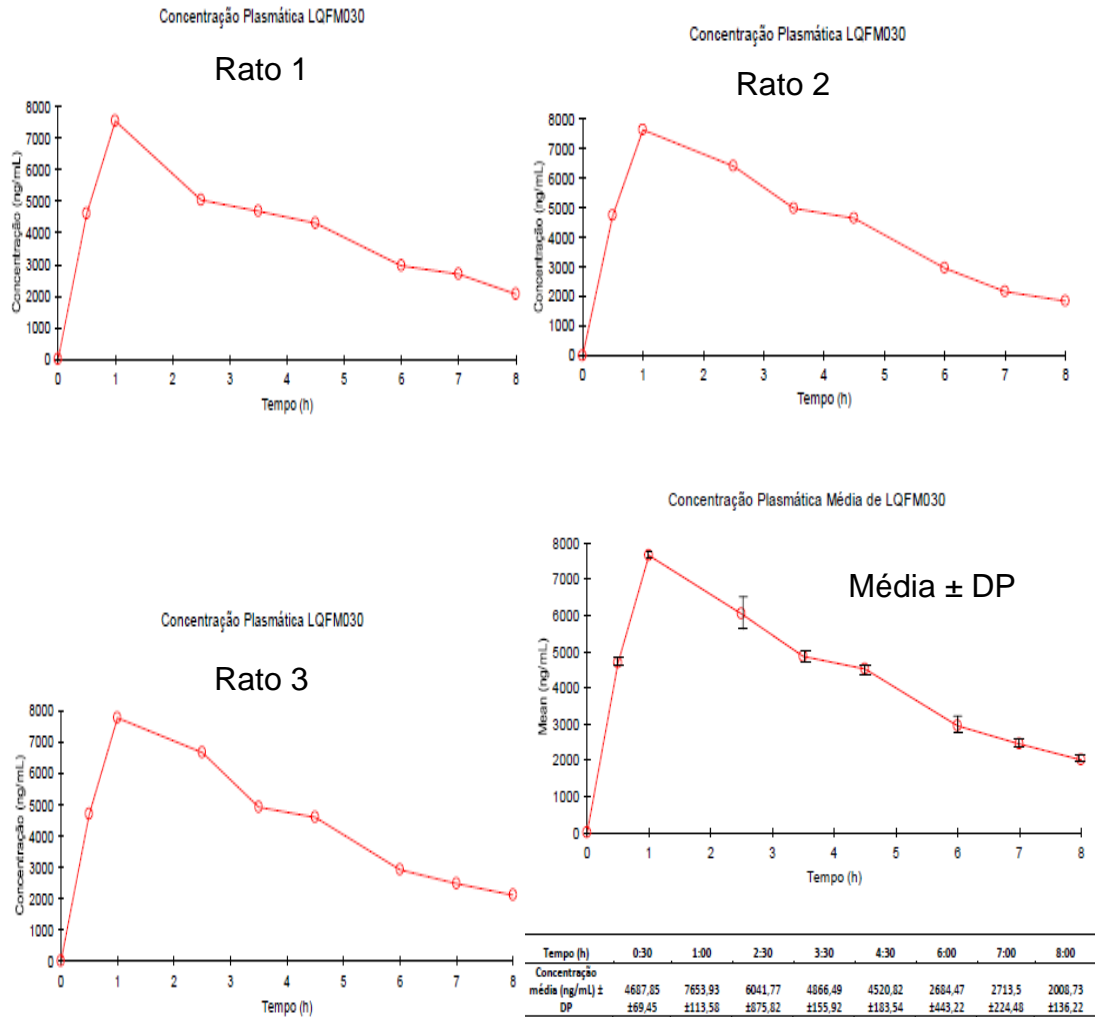


Figura 3. Curva de decaimento de concentração *versus* tempo – LQFM030 (animais 1, 2 e 3; média ± DP).

DISCUSSÃO

Características fundamentais observadas nos animais, tais como forma do corpo, gasto energético das funções fisiológicas básicas, hábitos alimentares, de reprodução e de locomoção variam segundo o tamanho e massa corporal. Desta forma, tamanho e massa corporal compõem os atributos mais relevantes de um organismo, ao influenciar diretamente uma grande parte de processos vitais. As relações entre aquelas características e a massa corporal variam em proporção quantitativa, demonstrando que parâmetros de determinado caráter orgânico são influenciados pela massa do animal. Tais relações influenciadas pela massa corporal são denominadas alométricas (alo = diferente, metria = medida) e identificadas como função exponencial da massa corporal, pois a relação entre um caráter orgânico e o tamanho corporal não é linear (SCHIMIDT-NIELSEN, 1984).

Após sua administração, um fármaco começa a ser prontamente absorvido, distribuído, metabolizado e excretado de forma simultânea, determinando o formato do seu perfil de concentração pelo tempo e permitindo-se, descrever a cronologia de variação da concentração, bem como deduzir algumas informações farmacocinéticas (SILVA, 2010).

Através das análises gráficas, verificou-se que a molécula apresentou característica monocompartimental, demonstrada por uma distribuição instantânea com queda rápida da concentração, apontando também uma fase

de eliminação significativa, principalmente pela suposta participação hepática neste processo.

A área total sob a curva de concentração vs tempo (ASC_T), é um indicador de exposição total de uma pessoa a um fármaco e reflete não só a biodisponibilidade, mas também a taxa de eliminação e o volume aparente de distribuição da substância (TRACY, 2005).

Analisando os valores de $ASC_T = 45,67 \pm 2,90$ para o LQFM030, obtidos pelo presente estudo, em ratos, p.o., e confrontando-os com os obtidos no estudo coordenado por Labre (2012), em camundongos, i.p., quando se obteve $ASC_T = 189,17 \pm 61,26$, observou-se variação em torno deste parâmetro de biodisponibilidade, o que pode ser justificado por uma possível maior metabolização hepática ou degradação gástrica sofrida pelo LQFM030, em ratos, uma vez que foi administrado pela via oral.

O V_d de um fármaco demonstra o volume no qual seria necessário solubilizar este fármaco no intuito de se atingir uma concentração uniforme equivalente à do plasma, quando no estado de equilíbrio dinâmico. Portanto, quando o V_d é baixo, significa que o fármaco está retido no compartimento vascular e, quando elevado, demonstra uma ampla distribuição nos tecidos, órgãos e fluidos extra vasculares. Ou, ainda, demonstra elevada taxa de eliminação (*clearance*) ou ambas as situações. Os dados de V_d são extrapolados, calculados com base na concentração de determinado fármaco no plasma, não demonstrando então um volume físico real. Quando se utiliza fármacos com melhor distribuição para os tecidos corporais (ou elevada taxa de

eliminação), torna-se freqüentemente necessária a administração de uma dose inicial maior, para obter a concentração plasmática terapêutica; isto quando comparados a fármacos com uma menor capacidade de distribuição (LAMATTINA; GOLAN, 2009).

Substâncias lipossolúveis penetram melhor nos compartimentos periféricos podendo acumular-se nos tecidos, principalmente o adiposo, o que, normalmente, eleva o Vd muito além do volume corporal total. Desta forma, substâncias que apresentam elevado Vd, como morfina, antidepressivos tricíclicos e haloperidol são caracterizadas por difícil remoção do organismo, tornando extremamente perigoso e não recomendado o tratamento com superdose destes fármacos (RANG et al., 2003).

No presente estudo, o Vd/F para o LQFM030 ficou em torno de 12 L/kg, sugerindo acúmulo extra vascular deste protótipo. Quando normalizado para um humano adulto de aproximadamente 70 kg, isto corresponde a um Vd muito elevado, de 840 L. Em contrapartida, Labre (2012) em seu estudo com camundongos, também utilizando LQFM030, i.p., obteve Vd de 30 L/kg que, quando normalizado para um humano adulto de 70 kg, obtém-se um Vd de 2044,70 L. Ambos os experimentos, mesmo em espécies diferentes e com vias de administração distintas, demonstraram Vd elevado, o que direciona a uma potencial utilidade no tratamento de tumores profundos, inclusive de medula óssea, como ocorre para o nutlin-3a (ZHANG et al., 2011).

A meia-vida de eliminação do LQFM030, neste estudo, foi de quase 4h, ao passo que no estudo em camundongos, coordenado por Labre (2012) este

parâmetro foi de aproximadamente 40 h. Tal diferença pode ser interpretada em função dos parâmetros alométricos das espécies envolvidas, quando se observa que um maior peso corporal, nos ratos, influencia diretamente, para uma maior taxa de metabolismo basal nesta espécie, quando comparados com camundongos (SHARMA & McNEIL, 2009).

Segundo Pachaly & Brito(2000), é evidente que eventos fisiológicos relacionados à absorção, distribuição, ação e eliminação de drogas, no organismo de animais menores, sejam diferentes daqueles observados nos animais maiores.

Esse parâmetro de meia vida farmacocinética ajuda no estudo da posologia, prevendo várias informações valiosas como o grau de flutuação da concentração plasmática durante o intervalo de dose, o tempo necessário para atingir o estado de equilíbrio, o tempo necessário para que determinada concentração decaia até outra específica (sem administração de nova dose) ou ainda na determinação do tempo gasto por um fármaco para que seja totalmente eliminado do organismo. A meia-vida também demonstra a taxa de eliminação total de um fármaco na fase terminal da curva de concentração *versus* tempo. Com isto, é possível inferir que ela envolve o *clearance* e o *Vd* (PINTO, 2010).

Para que um fármaco seja eliminado, depurado, é necessário atingir os órgãos responsáveis por estes processos, os quais encontram-se estritamente relacionados com a circulação sistêmica. Este fato, observado durante a fase terminal da curva de concentração plasmática *versus* tempo, explica o impacto

do V_d sobre a meia-vida dos fármacos, quando o fármaco, ficando retido nos compartimentos periféricos, o processo de *clearance* é dificultado tornando mais longa a meia-vida (PINTO, 2010).

Os principais órgãos responsáveis pela eliminação de um fármaco, através dos processos de metabolização e eliminação são, respectivamente, fígado e rins (SILVA, 2010).

O processo de *clearance* ou depuração representa a remoção completa de determinada substância de um volume específico de sangue por unidade de tempo (SILVA, 2010). Por este motivo, o *clearance*, que compreende todos os processos que resultem na eliminação do fármaco do organismo é expresso em volume por unidade de tempo (mL/min ou L/h) (PINTO, 2010). Ele é inversamente proporcional à meia-vida de eliminação e diretamente proporcional ao V_d , de tal forma que, quanto maior o volume de distribuição, mais na horizontal estará a curva da concentração na fase de eliminação e mais lentamente ocorrerá a diminuição da concentração plasmática. Então, para qualquer valor de V_d , quanto maior for o *clearance* do fármaco, maior será sua eliminação (RANG et al., 2003).

O valor de *clearance* obtido, no presente experimento, para o LQFM030 (36,49 mL/min/kg) quando normalizado para um indivíduo normal de 70 kg, resulta em 2.554,3 mL/min, em torno de vinte vezes mais elevado do que o *clearance* de creatinina (120 mL/min), supondo-se uma maior participação de mecanismos hepáticos de eliminação, o que pode ser explicado por sua lipossolubilidade, necessitando de biotransformação para que a eliminação

ocorra. Labre (2012) em seu estudo cinético do LQFM030, i.p., utilizando camundongos, observou um *clearance* de 9,4 mL/min/kg, que quando normalizado para um indivíduo de 70 kg, resulta em 658 mL/min, seis vezes mais elevado do que o *clearance* da creatinina, denotando, também, uma possível e maior participação de mecanismos de eliminação hepática e/ou secreção tubular ativa urinária.

Zhang e outros (2011) demonstraram em estudos que o nutlin-3a apresenta uma rápida absorção com concentração plasmática máxima sendo alcançada em aproximadamente 2 h. Sua eliminação bifásica enseja um processo de depuração saturável. Suas concentrações plasmática e tecidual foram medidas de 0 a 48 h, em ratos, após dose única, intravenosa, de 10 ou 20 mg/kg ou dose única, oral, de 50, 100 ou 200 mg/kg. Foi demonstrado que após a administração pela via oral, as concentrações teciduais do nutlin-3a elevaram-se rapidamente, atingindo valor máximo em aproximadamente 2 h. Em concentrações elevadas do nutlin-3a, o processo de eliminação se mostrou mais lento, indicando saturação. A concepção deste estudo contemplou administrações por via oral e intravenosa com dosagens de níveis variados, sendo possível caracterizar a eliminação não linear, em concentrações plasmáticas mais elevadas.

Bai et al.,2009, desenvolveram e validaram um método em LC/MS visando identificar a concentração de nutlin-3 em plasma de camundongo, tendo sido administrado por via oral, utilizando quatro camundongos e dose de 100 mg/kg, quando demonstraram elevada taxa de absorção com forte

distribuição, apresentando pico entre 3 h e 8 h e um lento processo de eliminação com curva de decaimento indicando modelo bicompartimental.

Todavia, ressaltamos a necessidade de se determinarem a taxa de ligação às proteínas plasmáticas (%B), a presença ou não de cinética não linear, os metabólitos formados e a percentagem de excreção renal do LQFM030, visando elucidar a exata participação, do metabolismo e da excreção renal (com os processos de filtração glomerular, secreção e reabsorção tubular ativa), nos mecanismos de eliminação.

Após análise dos dados obtidos em todas as etapas do presente experimento, levando em consideração estudos anteriores desenvolvidos tanto para os nutlins quanto para o LQFM030, e observando o perfil farmacocinético deste candidato a protótipo de fármaco antineoplásico, deparou-se com diferentes valores de $t_{1/2}$, V_d e Cl , obtidos em ratos e camundongos, demonstrando uma grande variabilidade interespecies. Conforme MAHMOOD (2007), a determinação de parâmetros farmacocinéticos entre animais é mais complicada que a de humanos devido à grande variedade de espécies com diferenças anatômicas e fisiológicas. Um dos mais importantes fatores na extrapolação de doses entre espécies é a biotransformação de fármacos. Espécies diferentes apresentam características únicas que as destacam na habilidade de metabolização (VAN MIERT, 1989; RIVIERE et al., 1997).

Mesmo demonstrando que o LQFM030 apresentou variações nos valores dos parâmetros cinéticos básicos, destaca-se que o mesmo manteve suas características de alta distribuição e penetração teciduais, podendo torná-lo

indicado no tratamento de tumores profundos, como já ressaltado para os nutlins, em tumores de medula óssea (MENEGATTI, 2011).

Estes resultados obtidos nos estudos pré-clínicos conduzidos com o LQFM030, até o momento, sugerem uma continuidade no aprimoramento dos testes experimentais, visando o cumprimento das exigências regulatórias que antecedem a etapa, eventual, de estudos clínicos de fase 1. No entanto, a extrapolação para humanos, de tais resultados, deve ser bastante cuidadosa e apenas preliminar, uma vez que os processos de disposição de fármacos em roedores são diferentes. Conforme elucidado anteriormente, se a dose do fármaco escolhido não é conhecida, em determinada espécie, pode-se estimá-la baseando-se em informações obtidas de outras espécies. Essa extrapolação de doses deve resultar em uma adequada exposição ao fármaco que assegure a eficácia e segurança do mesmo, levando em conta as diferenças entre as espécies, como tamanho, taxa metabólica, farmacocinética e farmacodinâmica (SHARMA & McNEIL, 2009).

Por outro lado, precisa-se 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).

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Fundação de Amparo à Pesquisa de Goiás (FAPEG), pelo apoio financeiro, ao Instituto de Ciências Farmacêuticas (ICF), pela valiosa contribuição ao trabalho na parte técnica, e ao Prof. Dr. Ricardo Menegatti (UFG), pela inestimável contribuição ao trabalho e doação do LQFM030.

REFERÊNCIAS

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*, Amsterdam, v. 51, no. 4, p. 915–920, 2010.

BRASIL. Ministério da Saúde. Conselho Nacional de Saúde. Resolução CNS nº 251, de 7 de agosto de 1997. Contempla a norma complementar para a área temática especial de novos fármacos, vacinas e testes diagnósticos e delega aos CEPs a análise final dos projetos nessa área, que deixa de ser especial. *Diário Oficial da União*, Brasília, DF, 23 set. 1997. Disponível em: <http://conselho.saude.gov.br/web_comissoes/conep/aquivos/resolucoes/resolucoes.htm>. Acesso em: 21 mar. 2013.

CARVALHO F.S.. Avaliação farmacológica e toxicológica de novos candidatos a protótipos de fármacos antitumorais. [dissertação]. Goiânia: Universidade Federal de Goiás; 2011. 95 p.

DAVIS, T. A.; JOHNSTON, J. N. Catalytic, enantioselective synthesis of stilbenecis-diamines: A concise preparation of (-)-Nutlin-3, a potent p53/MDM2 inhibitor. *Chemical Science*, Cambridge, v. 2, no. 6, p. 1076–1079, 2011.

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

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, 29/07/2012.

LAMATTINA, J. C.; GOLAN, D. E. Farmacocinética. In: GOLAN, D. E.; TASHJIAN JR., A. H.; ARMSTRONG, E. J.; ARMSTRONG, A. W. (Ed.). *Princípios de farmacologia: a base fisiopatológica da farmacoterapia*. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2009. p. 28–45.

MAHMOOD, I. et al. Interspecies allometric scaling. Part I: prediction of clearance in large animals. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, v.29, n,5, p,415-423, oct,2006. Disponível em: <[http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10,1111/j,1365-2885.2006,00786,x/full](http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1365-2885.2006.00786.x/full)>, Acesso em: 16 out, 2012.

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.

NUTLIN 3. [S.l.]: Chemical Compounds Database, [2007-2011]. Disponível em: <http://www.chembase.com/cbid_216345.htm>. Acesso em: 13 mar. 2013.

OECD. Organisation for Economic Co-operation and Development. *OECD guideline for testing of chemicals*, 423. Paris, 2001. Disponível em: <http://iccvam.niehs.nih.gov/SuppDocs/FedDocs/OECD/OECD_GL423.pdf>.

Acesso em: 8 nov. 2012.

PINTO, L. S. R. *Síntese, atividade antibacteriana e farmacocinética pré-clínica de pró-fármaco 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.

RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M.; MOORE, P. K. *Farmacologia*. Tradução Patrícia Lydie Voeux e Antônio José Magalhães da Silva Moreira. 5. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2003.

RIVIERE, J.E. et al. 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, dec.1997. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1046/j.1365-2885.1997.00095.x/abstract>>. Acesso em 07 set. 2013.

SCHMIDT-NIELSEN, K. *Scaling: why is animal size so important?* Cambridge: Cambridge University, 1984. 241 p.

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*. 8. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 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*, Baltimore, v. 66, no. 19, p. 9646–9655, 2006.

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

ZHANG, F.; TAGEN, M.; THROM, S.; MALLARI, J.; MILLER, L.; GUY, R. K.; DYER, M. A.; WILLIAMS, R. T.; ROUSSEL, M. F.; NEMETH, K.; ZHU, F.; ZHANG, J.; LU, M.; PANETTA, J. C.; BOULOS, N.; STEWART, C. F. Whole-body physiologically based pharmacokinetic model for nutlin-3a in mice after intravenous and oral administration. *Drug Metabolism and Disposition*, Baltimore, v. 39, no. 1, p. 15–21, 2011.

6 CONCLUSÕES

O referido estudo pré-clínico apresentou diferentes valores de $t_{1/2}$, Vd e Cl, obtidos em ratos e camundongos, demonstrando uma grande variabilidade interespecies.

Conforme MAHMOOD (2007), a determinação de parâmetros farmacocinéticos entre animais é mais complicada que a de humanos devido à grande variedade de espécies com diferenças anatômicas e fisiológicas. E segundo estudos, espécies diferentes apresentam características únicas que as destacam na habilidade de metabolização (VAN MIERT, 1989; RIVIERE et al., 1997).

O perfil farmacocinético do LQFM030, obtido em plasma de ratos, apresentou baixo valor de meia-vida de eliminação, elevado Vd e alto valor de *clearance* plasmático, permitindo entender que o protótipo estudado apresentou um bom perfil de distribuição tecidual e/ou foi extensivamente eliminado.

Apesar de apresentar variações nos valores dos parâmetros cinéticos básicos, observamos que o LQFM030 manteve, mesmo em espécies diferentes, suas características de alta distribuição e penetração teciduais, podendo torná-lo indicado no tratamento de tumores profundos, como já ressaltado para os nutlins, em tumores de medula óssea (MENEGATTI, 2011).

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS

Para a execução deste trabalho, propôs-se a continuidade dos estudos de determinação de parâmetros farmacocinéticos pré-clínicos deste candidato a protótipo a fármaco.

Por outro lado, ainda é necessário determinar a taxa de ligação às proteínas plasmáticas, a pesquisa de cinética não-linear, 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).

Por ser tratar de uma molécula nova sem relatos descritos na literatura, a compreensão dos parâmetros e comparação dos dados obtidos se tornaram difíceis. Este trabalho é uma segunda tentativa para determinar os dados farmacocinéticos pré-clínicos do LQFM030 em nosso centro de estudo.

Os estudos pré-clínicos conduzidos com LQFM030, até o momento, indicam a continuidade dos estudos pré-clínicos deste protótipo de estrutura simples, visando o cumprimento das exigências regulatórias, as quais antecedem a etapa eventual de estudos clínicos de fase 1. No entanto, lembramos que não podem, estes resultados, ser extrapolados para humanos,

a não ser que alguma equação alométrica tenha sido determinada, pois os processos de disposição de fármacos em roedores são muito mais rápidos.

A necessidade de novos dados conduz à continuidade de pesquisa e desenvolvimento do LQFM030 como promissor agente antineoplásico.

REFERÊNCIAS

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

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://bvsmms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2012/rdc0027_17_05_2012.pdf>. Acesso em: 13 nov. 2012.

BRASIL. Ministério da Saúde. Conselho Nacional de Saúde. Resolução CNS nº 196, de 10 de outubro de 1996. Aprova as diretrizes e normas regulamentadoras de pesquisas envolvendo seres humanos. *Diário Oficial da União*, Brasília, DF, 16 out. 1996. Disponível em: <http://conselho.saude.gov.br/web_comissoes/conep/aquivos/resolucoes/resolucoes.htm>. Acesso em: 31 mai. 2013.

BRASIL. Ministério da Saúde. Conselho Nacional de Saúde. Resolução CNS nº 251, de 7 de agosto de 1997. Contempla a norma complementar para a área temática especial de novos fármacos, vacinas e testes diagnósticos e delega aos CEPs a análise final dos projetos nessa área, que deixa de ser especial. *Diário Oficial da União*, Brasília, DF, 23 set. 1997. Disponível em: <http://conselho.saude.gov.br/web_comissoes/conep/aquivos/resolucoes/resolucoes.htm>. Acesso em: 31 mai. 2013.

BRASIL. Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. Coordenação Geral de Ações Estratégicas. Coordenação de Prevenção e Vigilância. *Estimativa 2012: incidência de câncer no Brasil*. Rio de Janeiro: INCA, 2011. Disponível em:

<<http://www.inca.gov.br/estimativa/2012/estimativa20122111.pdf>>. Acesso em: 31 mai. 2013.

BRASIL. Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer. *Ações de enfermagem para o controle do câncer: uma proposta de integração ensino-serviço*. 3. ed. atual. amp. Rio de Janeiro: INCA, 2008. Disponível em: <http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/acoes_enfermagem_controle_cancer.pdf>. Acesso em: 31 mai. 2013.

BROOKS, C. L.; GU, W. p53 ubiquitination: Mdm2 and beyond. *Molecular Cell*, Cambridge, v. 21, n. 3, p. 307-315, 2006.

BROOKS, C. L.; GU, W. Ubiquitination, phosphorylation and acetylation: the molecular basis for p53 regulation. *Current Opinion in Cell Biology*, Philadelphia, v. 15, n. 2, p. 164-171, 2003.

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, 2001. (Série Apontamentos).

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 ma1. 2013.

DAVIS, T. A.; JOHNSTON, J. N. Catalytic, enantioselective synthesis of stilbene cis-diamines: A concise preparation of (-)-Nutlin-3, a potent p53/MDM2 inhibitor. *Chemical Science*, Cambridge, v. 2, no. 6, p. 1076–1079, 2011.

DEB, S. P. Function and dysfunction of the human oncoprotein MDM2. *Frontiers in Bioscience*, Tampa, v. 7, n. p. d235-243, 2002.

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

ERHARDT, P. Drug discovery. In: HACKER, M.; BACHMANN, K.; MESSER, W. *Pharmacology: principles and practice*. Oxford: Elsevier, 2009. p. 475–560.

FERREIRA, C.; ROCHA, J. *Oncologia Molecular*. 2010. f. - Editora Atheneu, São Paulo.

GOLDIM, J. R. A avaliação ética da investigação científica de novas drogas: a importância da caracterização adequada das fases da pesquisa. *Revista HCPA*, Porto Alegre, v. 27, n. 1, p. 66–73, 2007. Disponível em: <<http://seer.ufrgs.br/hcpa/article/view/2073/826>>. Acesso em: 31 mai. 2013.

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*, London, v. 22, no. 4, p. 730–739, 2008.

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, 29/07/2012.

LEHRBACH, D. M.; CECCONELLO, I.; RIBEIRO JR, U.; CAPELOZZI, V. L.; AB'SABER, A. M.; ALVES, V. A. Adenocarcinoma of the esophagogastric junction: relationship between clinicopathological data and p53, cyclin D1 and Bcl-2 immunoexpressions. *Arquivos de Gastroenterologia*, São Paulo, v. 46, n. 4, p. 315-320, 2009.

LEVINE, A. J.; MOMAND, J.; FINLAY, C. A. The p53 tumour supressor gene. *Nature*, v. 351, p. 453-456, 1991.

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.

LUO, J.; SU, F.; CHEN, D.; SHILOH, A.; GU, W. Deacetylation of p53 modulates its effect on cell growth and apoptosis. *Nature*, London, v. 408, n. 6810, p. 377-381, 2000.

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. Colorr et al, *Revista Brasileira de Coloproctologia*, v. 29, n. 3, p. 303, 2009.

MAXIMOV, G.; MAXIMOV, K. The role of p53 tumor-suppressor protein in apoptosis and cancerogenesis. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, Sófia, v. 22, n. p. 664-668, 2008.

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.

MENENDEZ, D.; INGA, A.; JORDAN, J. J.; RESNICK, M. A. Changing the p53 master regulatory network: Elementary, my dear Mr Watson. *Oncogene*, New York, v. 26, n. 15, p. 2191-2201, 2007.

MENENDEZ, D.; INGA, A.; RESNICK, M. A. The expanding universe of p53 targets. *Nature Reviews Cancer*, London, v. 9, n. 10, p. 724-737, 2009.

MERCOSUL. Grupo Mercado Comum. Boas Práticas Clínicas. Resolução nº 129. [S.l.]: [s.n.], 1996. Disponível em: <http://www.fiocruz.br/ipecc_novo/media/13BoasPraticasClinicas.pdf>. Acesso em: 25 mai. 2012.

MICHAEL, D.; OREN, M. The p53-Mdm2 module and the ubiquitin system. *Seminars in Cancer Biology*, Philadelphia, v. 13, n. 1, p. 49-58, 2003.

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*, Philadelphia, v. 15, no. 12, p. 4077–4084, 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, Uruguaiana, 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.

NUTLIN 3. [S.l.]: Chemical Compounds Database, [2007-2011]. Disponível em:

<http://www.chembase.com/cbid_216345.htm>. Acesso em: 3 mar. 2013.

OECD. Organisation for Economic Co-operation and Development. *OECD guideline for testing of chemicals, 423*. Paris, 2001. Disponível em:

<http://iccvam.niehs.nih.gov/SuppDocs/FedDocs/OECD/OECD_GL423.pdf>.

Acesso em: 8 nov. 2012.

OREN, M. Decision making by p53: life, death and cancer. *Cell Death and Differentiation*, Oxford, v. 10, n. 4, p. 431-442, 2003.

PAMPALONA, J.; FRÍAS, C.; GENESCÀ, A.; TUSELL, L. Progressive telomere dysfunction causes cytokinesis failure and leads to the accumulation of polyploid cells. *PLoS Genetics*, San Francisco, v. 8, n. 4, p. e1002679, 2012.

PETITJEAN, A.; MATHE, E.; KATO, S.; ISHIOKA, C.; TAVTIGIAN, S. V.; HAINAUT, P.; OLIVIER, M. Impact of mutant p53 functional properties on TP53 mutation patterns and tumor phenotype: lessons from recent developments in the IARC TP53 database. *Human Mutation*, New York, v. 28, n. 6, p. 622-629, 2007.

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

ROCCO, P. R. M.; XISTO, D. G.; SILVA, J. D.; DINIZ, M. F. F. M.; ALMEIDA, R. N.; LUCIANO, M. N.; MEDEIROS, I. A.; CAVALCANTI, B. C.; FERREIRA, J. R. O.; MORAES, M. O.; COSTA-LOTUFO, L. V.; PESSOA, C. Ó; DALLA-COSTA, T.; CATTANI, V. B.; BARREIRO, E. J.; LIMA, L. M. LASSBio-596: da descoberta aos ensaios pré-clínicos. *Revista Virtual de Química*, Rio de Janeiro, v. 2, n. 1, p. 10–27, 2010. Disponível em:

<<http://www.uff.br/RVQ/index.php/rvq/article/viewFile/74/118>>. Acesso em: 21 fev. 2013.

SANTOS, S. V. Neoplasias. In: ROCHA, A. *Patologia*. São Paulo: Rideel, 2011. p. 235–278.

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

SHANGARY, S.; WANG, S. Small-molecule inhibitors of the MDM2-p53 protein-protein interaction to reactivate p53 function: a novel approach for cancer therapy. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, Palo Alto, v. 49, p. 223–241, 2009.

SILVA, A. E. R.; FIORI, A. T. M.; MATSUMOTO, C.; CRUZ, A.; SILVA, N. M. O.; BERNADES, A. C. A.; CARVALHO, R. P.; MAZZOLA, P. G. Levantamento bibliográfico de antineoplásicos padronizados no Hospital da Mulher – Prof. Dr. José Aristodemo Pinotti (CAISM) UNICAMP. In: CONGRESSO DOS PROFISSIONAIS DAS UNIVERSIDADES ESTADUAIS DE SÃO PAULO, 1., 2011, São Paulo. São Paulo: USP, Unicamp e Unesp, 2011.

SILVA, P. *Farmacologia*. 8. 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.

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. *Clinical Cancer Research*, Philadelphia, v. 15, no. 3, p. 933–942, 2009.

TANG, Y.; ZHAO, W.; CHEN, Y.; ZHAO, Y.; GU, W. Acetylation is indispensable for p53 activation. *Cell*, Maryland Heights, v. 133, n. 4, p. 612-626, 2008.

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*, Baltimore, v. 66, no. 19, p. 9646–9655, 2006.

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, no. 5659, p. 844-848, 2004.

VOGELSTEIN, B.; LANE, D.; LEVINE, A. J. Surfing the p53 network. *Nature*, London, v. 408, n. 6810, p. 307-310, 2000.

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

ZÖRNIG, M.; HUEBER, A.; BAUM, W.; EVAN, G. Apoptosis regulators and their role in tumorigenesis. *Biochimica et Biophysica Acta*, Amsterdam, v. 1551, n. 2, p. F1-37, 2001.

ANEXOS

Anexo 1 – Parecer Consubstanciado do Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Goiás



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA



PROTOCOLO
137/2009

Goiânia, 10 de fevereiro de 2010

PARECER CONSUBSTANCIADO

I. IDENTIFICAÇÃO:

Título do projeto: “Investigação do potencial antitumoral in vivo e in vitro de ativos de origem natural e sintética”

Pesquisador Responsável: Prof^a. Marize Campos Valadares Bozinis

Pesquisadores Participantes: Prof^a. Eliana Martins Lima, Alexandre Pereira dos Santos, Marcelo de Souza Vieira, Erika Crispim Resende, Wanessa Machado Andrade, Fabiana Bettanin Costa.

Local de realização: Laboratório de Farmacologia e Toxicologia Celular (LFTC)
Faculdade de Farmácia (UFG)
Núcleo de Estudo e Pesquisas Tóxicas- Farmacológicas (NEPET)

Informamos que o Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Goiás, após análise das adequações solicitadas, **Aprovou**, o projeto acima referido, e o mesmo foi considerado em acordo com os princípios éticos vigentes.

O pesquisador responsável deverá encaminhar ao CEP/UFG, relatórios da pesquisa, encerramento, conclusão (ões) e publicação (ões) de acordo com as recomendações da Resolução 196/96.


Prof^a Dra Rita Goreti Amaral
Coordenadora do CEP/UFG

Anexo 2 – Normas para publicação de artigos no periódico Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada/Journal of Basic and Applied Pharmaceutical Sciences.

Instruções aos autores

ESCOPO E POLÍTICA

A Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada/Journal of Basic and Applied Pharmaceutical Sciences é um periódico especializado de conteúdo multidisciplinar, aberto à comunidade científica nacional e internacional, arbitrada e distribuída aos leitores do Brasil e de vários outros países.

Esta Revista é editada pela Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual Paulista - UNESP. Publica pesquisas originais nos diferentes campos das Ciências Farmacêuticas, sobre temas relevantes envolvendo pesquisas básicas e aplicadas, na forma de artigos originais, comunicações breves e trabalhos de revisão. Os manuscritos poderão ser encaminhados em português, inglês ou espanhol. Publica um volume por ano, constituído por três fascículos ou números.

A Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada/Journal of Basic and Applied Pharmaceutical Sciences segue as regras dos "Requisitos Uniformes para Manuscritos Apresentados a Periódicos Biomédicos" (Norma de Vancouver - <http://www.icmje.org>). O estilo e formato das referências são baseados em grande parte ao do Instituto Nacional Americano de Normas e Estilo adaptado pela National Library of Medicine NLM, para seus bancos de dados. Os autores devem consultar: Patris K. Citing medicine: the NLM style guide for authors, editors, and publishers [Internet]. 2nd ed. Wendling DL, technical editor. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US); 2007 [updated 2009 Jan 14]. <http://www.nlm.nih.gov/citingmedicine> sobre seus formatos recomendados para uma variedade de tipos de referências.

É vedada a submissão integral ou parcial do manuscrito a qualquer outro periódico. A responsabilidade do conteúdo dos artigos é exclusiva dos autores.

SUBMISSÃO DE TRABALHO

Os manuscritos deverão ser submetidos de preferência no formato eletrônico da revista no seguinte endereço: http://serv-bib.fcfa.unesp.br/seer/index.php/cien_farm/about/submissions#onlinesubmissions

Cada manuscrito deve ser acompanhado de carta de submissão assinada pelo autor correspondente.

Preparação de artigo original

Os manuscritos devem ser digitados no editor de texto MS Word versão 6.0 ou superior, em uma só face, fonte Times New Roman 12, em folha de papel branco, formato A4 (210x297mm), mantendo margens laterais de 3 cm e espaço duplo em todo o texto. Todas as páginas devem ser numeradas a partir da página de identificação.

O manuscrito deve ser organizado de acordo com a seguinte ordem: página de identificação, resumo, palavras-chave, introdução, material e métodos, resultados, discussão, agradecimentos, referências, figuras, legendas de figuras e tabelas.

Página de identificação:

- Título do artigo: deve ser conciso, informativo e completo, evitando palavras supérfluas. Os autores devem apresentar versão para o inglês, quando o idioma do texto for português ou espanhol e para o português, quando redigido em inglês ou espanhol.
- Autores: nome e sobrenome de cada autor por extenso.
- Afiliação: indicar a afiliação institucional de cada um dos autores.
- Autor correspondente: indicar o autor para o qual a correspondência deve ser enviada, com endereço completo, incluindo e-mail, telefone e fax.
- Título resumido: o título resumido será usado como cabeçalho em todas as páginas impressas, não deve exceder 40 caracteres.

Resumo e Abstract:

Os artigos deverão vir acompanhados do resumo em português e do abstract em inglês. Devem apresentar os objetivos do estudo, abordagens metodológicas, resultados e as conclusões e conter no máximo 250 palavras.

Palavras-chave e Keywords:

Deve ser apresentada uma lista de 3 a 6 termos indexadores em português e inglês, utilizando Tesouro Medline, ou descritores da área da Saúde DeCS Bireme <<http://decs.bvs.br>>.

Introdução:

Deve determinar o propósito do estudo e oferecer uma breve revisão da literatura, justificando a realização do estudo e destacando os avanços alcançados através da pesquisa.

Material e Métodos:

Devem oferecer, de forma breve e clara, informações suficientes para permitir que o estudo possa ser repetido por outros pesquisadores. Técnicas padronizadas podem ser apenas referenciadas.

Resultados:

Devem oferecer uma descrição clara e concisa dos resultados encontrados, evitando-se comentários e comparações. Não repetir no texto todos os dados contidos nas figuras e tabelas.

Discussão:

Deve explorar o máximo possível os resultados obtidos, relacionados com os dados já registrados na literatura. Somente as citações indispensáveis devem ser incluídas.

Agradecimentos:

Devem se restringir ao necessário. O suporte financeiro deve ser incluído nesse item.

Referências bibliográficas:

Devem ser citadas apenas aquelas essenciais ao conteúdo do artigo. Devem ser ordenadas alfabeticamente de acordo com o estilo de Vancouver. Nas publicações com até dez autores, citam-se todos; acima, o primeiro seguido da expressão et alii (abreviada et al.). Os títulos de revistas devem ser abreviados de acordo com o estilo usado no Index Medicus. Consultar a lista de periódicos indexados no Index Medicus publicada no seguinte endereço eletrônico: <http://www.nlm.nih.gov/tsd/serials/lisou.html>.

- Artigos de periódicos

Docherty JR. Subtypes of functional α_1 and α_2 adrenoceptors. *Eur J Pharmacol*. 1998; 361(1):1-15.

Martins MBG, Martins AR, Cavalheiro AJ, Telascrêa M. Caracterização biométrica e química da folha de *Mentha pulegium* x *spicata* (Lamiaceae). *Rev Ciênc Farm*, Araraquara, 2004;25(1):17-23.

Araujo N, Kohn A, Katz N. Activity of the artemether in experimental Schistosomiasis mansoni. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1991; 86(Suppl 2):185-8.

Yue WJ, You JQ, Mei JY. Effects of artemether on Schistosoma japonicum adult worms and ova. *Acta Pharmacol Sin*. 1984;5 (2 Pt 1):60-3.

- Artigo sem volume e número

Combes A. Etude d'excipients utilises dans l'industrie pharmaceutique. *STP Pharma* 1989:766-90.

- Artigo sem autor

Coffee drinking and cancer of the pancreas [editorial]. *Br Med J Clin Res*. 1981 Sep 5;283(6292):628.

- Artigo de periódico no formato eletrônico

Rocha JSY, Simões BJB, Guedes GLM. Assistência hospitalar como indicador da desigualdade social. *Rev Saúde Pública* [Internet] 1997 [citado 1998 mar 23];31(5):479-87. Disponível em: <http://www.fsp.usp.br/~rsp>.

Guan M, Chen Y. Aberrant expression of DeltaNp73 in benign and malignant tumours of the prostate: correlation with Gleason score. *J Clin Pathol* [Internet]. 2005 Nov [cited 2007 Jan 9];58(11):1175-9. Available from: <http://jcp.bmj.com/cgi/content/full/58/11/1175>.

Bernhardt JM, Felter EM. Online pediatric information seeking among mothers of young children: results from a qualitative study using focus groups. *J Med Internet Res* [Internet]. 2004 Mar 1 [updated 2006 Dec 10; cited 2007 Jan 5];6(1):e7 [about 13 p.]. Available from: <http://www.jmir.org/2004/1/e7/>.

Prevention strategies for asthma-secondary prevention. *CMAJ* [Internet]. 2005 Sep 13 [cited 2007 Jan 5];173(6 Suppl):S25-7. Available from: http://www.cmaj.ca/cgi/content/full/173/6_suppl/S25.

- Artigos com Identificador de Objeto Digital - DOI

Harrison JJ, Ceri H, Yerly J, Stremuck CA, Hu Y, Martinuzzi R, Turner RJ. The use of microscopy and three-dimensional visualization to evaluate the structure of microbial biofilms cultivated in the Calgary Biofilm Device. *Biol Proc Online* [Internet]. 2006 [cited 2007 Jan 8];8(1):194-215. Available from: <http://www.biologicalprocedures.com/bpo/arts/1/127/m127.pdf>. DOI: 10.1251/bpo127

Bhutta ZA, Darmstadt GL, Hasan BS, Haws RA. Community-based interventions for improving perinatal and neonatal health outcomes in developing countries: a review of the evidence. *Pediatrics*. 2005 Feb;115(2 Suppl):519-617. DOI:10.1542/peds.2004-1441.

- Instituição como autor

Diabetes Prevention Program Research Group. Hypertension, insulin, and proinsulin in participants with impaired glucose tolerance. *Hypertension* 2002;40(5):679-86.

- Instituição como autor e editor
- Brasil. Ministério da Saúde. Manual de controle das doenças sexualmente transmissíveis. 3ª ed. Brasília (DF); 1999.
- Ministerio de Salud de Nicaragua. Política nacional de salud 1997-2002: descentralización y autonomía. Managua: Ministerio de Salud; 2002. p.42-9.
- Trabalho apresentado em congresso
- Alencar LCE, Seidl EMF. Levantamento bibliográfico de estudos sobre doadoras de leite humano produzidos no Brasil. In: 2. *Congresso Internacional de Bancos de Leite Humano*; 2005; Brasília: Ministério da Saúde; 2005.
- Harley NH. Comparing radon daughter dosimetric and risk models. In: Gammage RB, Kay SV, editors. *Indoor air and human Health. Proceedings of the Seventh Life Sciences Symposium*; 1984 Oct 29-31; Knoxville, TN. Chelsea, MI: Lewis, 1985:69-78.
- Livros
- Goodman LS. *The pharmacological basis of therapeutics*. 2nd. ed. New York: Macmillan; 1955.
- Brunton LL, Lazo JS, Parker KL, editors. *Goodman & Gilman's the pharmacological basis of therapeutics*. 11th. ed. Chicago: McGraw-Hill; 2006.
- Capítulos de livros
- Laurenti R. Amedida das doenças. In: Forattini OP. *Ecologia, epidemiologia e sociedade*. São Paulo: Artes Médicas; 1992. p.369-98.
- Fisberg RM, Marchioni D, Slater B. Avaliação da dieta em grupos populacionais [on-line]. In: Usos e aplicações das Dietary Reference Intakes – DRIs ILSI/SBAN; 2001. [citado 2004 fev] Disponível em: <http://www.sban.com.br/educ/pesq/LIVRO-DRI-ILSI.pdf>.
- Editores, Compiladores
- Diener HC, Wilkinson M, editors. *Drug induced headache*. New York: Spring-Verlag; 1988.
- Livro em CD-ROM
- Martindale: the complete drug reference [CD-ROM]. Englewood, CO: Micromedex; 1999. Based on: Parfitt K, editor. *Martindale: the complete drug reference*. London: Pharmaceutical Press; 1999. International Healthcare Series.
- Dissertação e Tese
- Moraes EP. *Envelhecimento no meio rural*: condições de vida, saúde e apoio dos idosos mais velhos de Encruzilhada do Sul, RS. [Tese]. Ribeirão Preto: Escola de Enfermagem, Universidade de São Paulo; 2007.
- Chorilli M. *Desenvolvimento e caracterização de lipossomas contendo cafeína veiculados em géis hidrofílicos*: estudos de estabilidade e liberação in vitro [Dissertação]. Araraquara: Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP; 2004.
- Documentos legais
- Leis publicadas*
- Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 27, de 30 de março de 2007. Dispõe sobre o Sistema Nacional de Gerenciamento de Produtos Controlados - SNGPC estabelece a implantação do módulo para drogarias e farmácias e dá outras providências. *Diário Oficial da União*, nº 63, 2 de abril de 2007. Seção 1. p. 62-4.
- São Paulo (Estado). Decreto no 42.822, de 20 de janeiro de 1998. Lex: coletânea de legislação e jurisprudência, São Paulo, 1998; 62(3): 217-220.
- Prefeitura Municipal de São Paulo. Lei Municipal no. 12.623, de 6 de maio de 1998. Proíbe a comercialização de água mineral com teor de flúor acima de 0,8 mg/l no município e dá outras providências. *Diário Oficial do Município*. 13 maio 1998.
- Projetos de lei*
- Medical Records Confidentiality Act of 1995, S. 1360, 104th Cong., 1st Sect. (1995).
- Código de regulamentações federais*
- Informed Consent, 42 C.F.R. Sect. 441.257 (1995).
- Patente
- Harred JF, Knight AR, McIntyre JS, inventors. Dow Chemical Company, assignee. Oxidation process. US patent 3,654,317. 1972 Apr 4.
- Software
- HINTZE JL. NCSS: statistical system for Windows. Version 2001. Kaysville, UT: Number Cruncher Statistical Systems; 2002.
- Epi Info [computer program]. Version 6. Atlanta, GA: Centers for Disease Control and Prevention; 1994.
- EPI Info: a database and statistics program for public health professionals Version 3.2.2. Atlanta, GA: Centers for Disease Control and Prevention (CDC); 2005. [cited 2006 May 30]. Available from: <http://www.cdc.gov/epinfo/biblio.htm>.
- website
- Health on the net foundation. Health on the net foundation code of conduct (HONcode) for medical and health web sites. [cited 1998 June 30]. Available from: <http://www.hon.ch/Conduct.html>.
- Hoffman DL. St John's Wort. 1995; [4 screens]. [cited 1998 July 16]. Available from: <http://www.healthy.net/library/books/hoffman/materiamedica/stjohns.htm>.
- Preparação de Artigo de Revisão**
- Deve conter uma revisão crítica de assunto atual e relevante baseando-se em artigos publicados e em resultados do autor. O Artigo de Revisão não deve ultrapassar oito páginas impressas (aproximadamente 24 páginas impressas no manuscrito). Deve apresentar resumo na língua em que estiver redigido e um *Abstract* quando redigido em português ou espanhol.
- Preparação de Comunicação Breve**
- Deve ser breve e direta sendo seu objetivo comunicar resultados ou técnicas particulares. No entanto recebe a mesma revisão e não é publicada mais rapidamente que um artigo original. Deve ser redigida de acordo com as instruções dadas para Artigo Original mas sem subdivisão em capítulos. As referências devem ser citadas no final do texto, usando o mesmo formato utilizado para Artigo Original. Um resumo breve e três palavras-chave devem ser apresentadas. O autor deve informar que o manuscrito é uma Comunicação Breve de modo a ser avaliado adequadamente durante o processo de revisão.
- INFORMAÇÕES ADICIONAIS**
- Citações bibliográficas no texto:** Devem ser apresentadas no texto pelo(s) sobrenome(s) dos autores seguida do ano da publicação, conforme os exemplos:
- Um autor:
Croft (1999) ou (Croft, 1999)
 - Dois autores:
Sogin & Bacci (1998) ou (Sogin & Bacci, 1998)
 - Mais que dois autores:
Kreiger et al. (1990) ou (Kreiger et al., 1990).
- Ilustrações**
- Figuras:* Fotografias, gráficos, mapas ou ilustrações devem ser apresentadas em folhas separadas, numeradas consecutivamente em algarismos arábicos segundo a ordem que aparecem no texto. As legendas correspondentes deverão ser claras e concisas, e devem ser enviadas também em folha separada. Os locais aproximados das figuras deverão ser indicados no texto. Deve-se indicar no verso de cada figura o seu número, o nome do autor e uma seta apontando a orientação correta. A elaboração dos gráficos, mapas e ilustrações deverá ser feita em preto e branco ou em tons de cinza. As fotografias deverão ser encaminhadas em original preto e branco ou com cópia digitalizada em formato .tif ou .jpg com no mínimo 300dpi. Essas fotos deverão estar em arquivos separados e não inseridas no texto do Word.
- Tabelas:* Devem complementar e não duplicar o texto. Elas devem ser numeradas em algarismos arábicos. Um título breve e descritivo deve constar no alto de cada tabela. Se necessário, utilizar notas de rodapé identificadas.
- Ética:** Os pesquisadores que utilizam em seus trabalhos experimentos com seres humanos, ou material biológico humano, devem observar as normas vigentes editadas pelos órgãos oficiais. Os trabalhos que envolvem experimentos que necessitam de avaliação do Comitê de Ética deverão ser acompanhados de cópia do parecer favorável.
- Os manuscritos que não estiverem de acordo com as Instruções aos autores não serão analisados.**
- Endereço:
Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada
Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação
Rodovia Araraquara-Jaú, km 01 - Caixa Postal 502
14801-902 - Araraquara, SP- Brasil.
Fone: 55-16-33016887
E-mail: rcfba@fcfar.unesp.br