

DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO PARA QUANTIFICAÇÃO DE DOXICICLINA EM PLASMA HUMANO

The development and validation of an analytical method for doxycycline quantification in human plasma

RESUMO

O objetivo deste estudo foi desenvolver e validar método simples, rápido e sensível para determinação de doxiciclina em plasma humano por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). A doxiciclina e oxitetraciclina (padrão interno), foram extraídas de 0,5 mL de plasma com acetato de etila. Utilizaram-se o sistema de CLAE com bomba isocrática, com temperatura controlada (30°C) e coluna cromatográfica Phenomenex® Luna C8 (15,0 cm x 4,6 mm; partícula 4 µm). A fase móvel, constituída por mistura de água, acetonitrila e tetrahidrofurano (80:15:5 v/v/v), teve pH ajustado para 2,5 sendo bombeada para o sistema cromatográfico em fluxo de 1,0 mL/min. Utilizou-se detector ultravioleta com comprimento de onda de 357 nm. Investigaram-se os seguintes parâmetros de validação: especificidade, linearidade ($r^2 = 0,9946$), precisão, exatidão, recuperação e estabilidade. O limite de quantificação encontrado foi de 0,25 µg/mL. Nas condições do ensaio, doxiciclina e oxitretaciclina apresentaram tempo de retenção de 7,5 e 2,4 minutos, respectivamente. Não foram observadas interferências com compostos endógenos ou com anticoagulante. Obteve-se recuperação média para doxiciclina de 84,57% e de 80,73% para o padrão interno na concentração de 20 µg/mL. O método mostrou-se preciso e exato tanto em análises realizadas no mesmo dia (intra-dia) quanto em dias diferentes (inter-dias). As amostras mantiveram-se estáveis no tempo e condições de análise, por pelo menos 120 dias, à temperatura de -20°C, durante a injeção no cromatógrafo (24 horas) e quando analisadas após três ciclos de congelamento e descongelamento. O método desenvolvido demonstrou-se adequado à quantificação de doxiciclina em amostras de plasma humano, apresentando sensibilidade, precisão e exatidão dentro dos limites estabelecidos para análises deste tipo.

Descritores: Doxiciclina; Cromatografia Líquida; Plasma; Estudos de Validação.

ABSTRACT

The aim of this study was to develop and validate a simple, quick and sensitive assay for determination of doxycycline concentration in human plasma by High Performance Liquid Chromatography (HPLC). Doxycycline and Oxytetracycline (internal standard) were extracted from 0,5 mL human plasma into ethyl acetate. The HPLC system was operated isocratically at controlled temperature (30°C) with reversed phase Phenomenex Luna C8 column (150 mm x 4.6mm i.d.; 4 µm particle size) and using a mobile phase consisting in water: acetonitrile: tetrahydrofuran (80:15:5 v/v/v) adjusted to pH 2.5, at a flow rate of 1.0 mL/min. Detection was achieved with a UV detector at 357 nm. Method validation investigated parameters such as the sensitivity, linearity ($r^2 = 0.9946$), precision, accuracy, recovery and stability. The limit of quantification was 0,25 µg/mL. Under the assay conditions, doxycycline and oxytetracycline had retention times of 7,5 and 2,4 minutes, respectively. No interferences with endogenous compounds or with anticoagulant were observed. The mean recovery of doxycycline was 84.57%, and 80.73% for the intern standard at working concentration (20µg/mL). The method showed to be precise and accurate both for analyses held in a same day (intra-day) as in different days (inter-days). A good stability of doxycycline and oxytetracycline was observed during extraction and analysis, when stored over a four-month period at -20°C, on the auto sample during 24 hours and to 3 freeze-thaw cycles. The present method is suitable for sensitive, precise and accurate determination of doxycycline concentrations in human plasma, within the limits established for this type of analyses.

Descriptors: Doxycycline; Chromatography; Liquid; Plasma; Validation Studies.

Descrição ou avaliação de métodos, técnicas, procedimentos e instrumentais

Geysa Aguiar Romeu⁽¹⁾

Eunice Kazue Kano⁽²⁾

Clarice Madalena Bueno Rolim⁽³⁾

Cristina Helena dos Reis Serra⁽⁴⁾

Humberto Gomes Ferraz⁽⁴⁾

Valentina Porta⁽⁴⁾

1) Farmacêutica, Professora Mestre, Departamento de Farmácia, Centro de Ciências da Saúde, Universidade de Fortaleza (UNIFOR)

2) Farmacêutica-Bioquímica, Doutoranda, Laboratório de Biofarmacotécnica (BIOFAR), Departamento de Farmácia, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo (USP)

3) Farmacêutica Industrial, Doutora, Departamento de Farmácia Industrial, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM)

4) Farmacêutica-Bioquímica, Doutora, BIOFAR, Departamento de Farmácia, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo (USP)

Recebido em: 30/01/2007

Revisado em: 09/05/2007

Aceito em: 26/06/2007

INTRODUÇÃO

A doxiciclina (α -6-deoxi-5-oxitetraciclina) é um antibiótico semi-sintético obtido de culturas de *Streptomyces* e age inibindo a síntese de proteínas bacterianas, ligando-se, principalmente às subunidades 30S dos ribossomos bacterianos, impedindo o acesso do aminoacetil – tRNA ao sítio receptor no complexo mRNA – ribossomo. Possui ampla faixa de atividade contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas e, além disto, é eficaz contra alguns microrganismos resistentes a agentes que exercem seus efeitos sobre a parede celular bacteriana, como *Rickettsia*, *Chlamydia*, *Mycoplasma* e *Ureoplasma*. É também indicada no tratamento e prevenção seletiva do cólera (*Vibrio cholerae*), possuindo pouca atividade contra fungos⁽¹⁾.

Encontram-se descritos na literatura vários métodos para a quantificação de doxiciclina em tecidos e fluidos biológicos, através de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)⁽²⁻¹⁰⁾. Entretanto, estes apresentam alguma desvantagem, seja em relação a procedimentos complexos e incompletos de extração do fármaco, com baixa porcentagem de recuperação, ao uso de padrão interno comercialmente inacessível ou que tenha baixa absorvância no espectro desejado ou ainda um tempo de retenção demasiadamente curto ou elevado, e também a realização em animais, dificultando sua aplicabilidade. Para quantificação de doxiciclina em amostras de plasma humano, no presente estudo, pretende-se desenvolver e validar método simples, rápido, preciso e exato, através de CLAE.

MÉTODOS

Para a realização deste trabalho, utilizou-se cromatógrafo líquido de alta eficiência Shimadzu®, composto por duas bombas LC-10ADVP; degaseificador DGU-14A, injetor automático de amostras SIL-10ADVP, detector UV-visível SPD-10AVVP, forno de coluna CTO-10AVP e unidade de controle SCL-10AVP.

Todas as substâncias químicas utilizadas possuíam grau analítico. O padrão de doxiciclina, fornecido por EMS Indústria Farmacêutica LTDA, tinha potência de 868,02 µg/mg e o padrão interno, oxitretaciclina, foi obtido da Sigma. Solventes e reagentes utilizados foram: acetato de etila, acetonitrila, metanol e tetrahidrofurano com grau HPLC Science; ácido fosfórico 85% p.a. Merck; ácido ascórbico do Laboratório Farmacêutico Roche e água ultrapura obtida em ultrapurificador Millipore®.

Para purificação da amostra, realizou-se extração líquido-líquido, adicionando-se 0,5 mL de plasma humano a tubos de ensaio âmbar contendo 25 µL de solução de padrão interno (oxitetraciclina - 20 µg/mL) e 50 µL de solução aquosa de ácido ascórbico 6%, homogeneizados através de

agitador de tubos. A seguir, extraiu-se o plasma com 5,0 mL de acetato de etila, durante 60 segundos, em agitador de tubos. Após centrifugação a 3.000 rpm por 10 minutos, imergiu-se o extrato orgânico em gelo seco para congelamento da fase aquosa, sendo o extrato orgânico, posteriormente, filtrado em unidade HV Millex com membrana Durapore de 13 mm de diâmetro e poro de 0,45 µm. Transferiu-se o filtrado para tubo cônico âmbar e evaporado em corrente de nitrogênio a 37°C, em banho-maria. Dissolveu-se o resíduo em 500 µL de fase móvel para injeção em CLAE.

Empregou-se, para separação das substâncias, coluna cromatográfica Phenomenex®, modelo Synergi RP-MAX (C8), de 15,0 cm de comprimento e 4,6 mm de diâmetro interno, contendo partículas de 4 µm e pré-coluna Shim-pack G-ODS, de 1 cm de comprimento e 4,6 mm de diâmetro interno contendo partículas de 5 µm. Utilizou-se, também, forno de coluna à temperatura de 30°C e detecção em ultravioleta-visível, com comprimento de onda de 357 nm.

A fase móvel, constituída por mistura de água ultrapura, acetonitrila e tetrahidrofurano na proporção de 80:15:5 (v/v/v), era bombeada para o sistema cromatográfico em fluxo de 1,0 mL/min. O pH da fase móvel final foi corrigido com solução de ácido fosfórico para 2,5. Filtrou-se a solução em membrana filtrante com diâmetro de 47 mm e poros de 0,2 µm levando, posteriormente, ao ultra-som para degaseificar.

Realizou-se a validação do método conforme critérios relatados por Bressolle *et al*⁽¹¹⁾, Causon⁽¹²⁾ e Resolução RE n°899 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária - Anvisa⁽¹³⁾, através da determinação dos parâmetros de recuperação, linearidade, limite de quantificação, precisão, exatidão, especificidade e estabilidade. Para tanto, utilizou-se plasma branco normal, plasma branco lipêmico, plasma branco hemolisado, amostras de plasma padrão e amostras de plasma de controle de qualidade.

O plasma é considerado branco quando padrão e padrão interno estão ausentes, apresentando apenas os interferentes endógenos. O plasma branco normal é obtido de voluntário sadio, após centrifugação de sangue coletado em tubos contendo anticoagulante. O plasma branco lipêmico é obtido da mesma maneira, porém, após refeição rica em gorduras, enquanto provoca-se hemólise para se obter o plasma branco hemolisado.

As amostras de plasma padrão são obtidas acrescentando-se concentrações conhecidas e crescentes do padrão ao plasma branco, sendo utilizadas para avaliar a linearidade do método. As amostras de plasma de controle de qualidade correspondem ao plasma branco acrescido de padrão em três diferentes concentrações conhecidas (uma baixa, uma média e uma alta), utilizadas para avaliar precisão e exatidão.

A especificidade é definida como a capacidade do método em distinguir a substância analisada de todas as outras presentes na amostra⁽¹²⁾. Investigou-se tal parâmetro pela análise de amostras de plasmas brancos normal, lipêmico e hemolisado para verificação da existência de interferência por parte de componentes endógenos, enquanto que a recuperação foi determinada comparando-se resultados de amostras de plasma acrescidas de padrão e submetidas ao processo de extração a resultados de análises de amostras padrão em metanol não submetidas a esse processo, em três diferentes concentrações e cinco repetições⁽¹³⁾.

A linearidade indica a relação entre concentração de analito e resposta do método, representada, neste estudo, pela área do pico cromatográfico⁽¹¹⁾. Na construção da curva de calibração, utilizaram-se amostras de plasma padrão em oito concentrações (0,25; 0,5; 0,8; 1,0; 1,5; 2,0; 3,0 e 4,0 µg/mL) e seis repetições. Estabeleceu-se correlação linear, considerando-se variável independente a concentração (x) e variável dependente a área do pico (y). Os parâmetros de correlação foram estimados através do método dos mínimos quadrados^(11,12).

O limite de quantificação (LQ) deve apresentar resposta igual a dez vezes o desvio padrão do ruído, e representa a menor concentração que pode ser determinada com exatidão e precisão aceitáveis⁽¹¹⁾. Determinou-se o limite de quantificação utilizando-se amostras de concentrações decrescentes conhecidas do fármaco até o menor nível determinável (em quintuplicata) com precisão e exatidão aceitáveis.

A precisão de métodos analíticos é uma medida de erro aleatório e é definida como concordância entre várias medidas da mesma amostra, sendo expressa como coeficiente de variação (CV%) dessas medidas. A precisão intra-dia refere-se ao coeficiente de variação obtido por repetição do método com o mesmo analista, utilizando o mesmo equipamento e os mesmos reagentes, em curto intervalo de tempo (por exemplo, no mesmo dia). A precisão inter-dia é obtida por meio de alteração de condições, como mudança de analista, reagentes ou equipamento, ou utilização do método durante várias semanas ou meses⁽¹²⁾.

A exatidão de métodos analíticos é uma medida de erro sistemático, sendo definida como concordância entre o valor determinado e o valor real⁽¹²⁾. Determinou-se o referido parâmetro pela análise de amostras de controle de qualidade em três diferentes concentrações e cinco repetições^(11,13).

Avaliou-se a estabilidade nas seguintes condições: (1) em três ciclos de congelamento e descongelamento; (2) no tempo e condições de análise; (3) de longa duração que deve exceder o intervalo de tempo compreendido entre a coleta da primeira amostra e a análise da última e (4) do padrão e padrão interno em extrato seco e extrato reconstituído em fase móvel e mantidos às temperaturas de geladeira (8°C) e congelador (-20°C), por um período de 24 horas, caso fosse

necessário injetar as amostras no sistema cromatográfico apenas no dia seguinte ao de sua extração⁽¹³⁾.

Realizou-se esse estudo, do tipo experimental, no Laboratório de Biofarmacotécnica (BIOFAR) da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, após aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade de São Paulo (USP-SP), sendo seguidos os preceitos éticos das Diretrizes e Normas Regulamentadoras de Pesquisa Envolvendo Seres Humanos.⁽¹⁴⁾

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As tetraciclina, em geral, sofrem quelação na presença de cátions bivalentes, tais como cálcio e magnésio, podendo interferir em sua análise⁽²⁾. Alguns autores sugerem a adição de EDTA à fase móvel, a fim de melhorar a resolução e eficiência cromatográfica^(6,15,16). No presente estudo, este problema foi contornado utilizando-se tubos contendo EDTA na coleta das amostras sanguíneas, prevenindo, desta maneira, qualquer interação de cátions bivalentes com a doxiciclina.

Asolução aquosa de ácido ascórbico (6%) foi utilizada no processo de extração das amostras para evitar a epimerização da doxiciclina a 4-epidoxiciclina e 6-epidoxiciclina^(2,10) e melhorar a extração do padrão interno⁽²⁾. A faixa de pH da fase móvel compreendido entre 2,0 e 2,5 afeta positivamente a sensibilidade do sistema e resulta em picos mais definidos e simétricos^(2,6,10). A adição de tetrahydrofurano (THF) à fase móvel reduz o fator assimetria da oxitetraclina⁽⁶⁾.

O método desenvolvido demonstrou-se específico para oxitetraclina e doxiciclina, obtendo-se boa separação destas entre si e dos componentes do plasma, com tempos de retenção de 2,4 e 7,5 minutos, respectivamente. Tempos de retenção muito curtos, como os encontrados por Axia *et al.*⁽²⁾ não são desejáveis, pois a detecção das substâncias de interesse pode ficar prejudicada pelos interferentes do plasma que, geralmente, apresentam-se no início do tempo de análise, mas também não devem ser demasiadamente longos, por aumentarem a quantidade de fase móvel necessária e o desgaste da coluna cromatográfica. Os interferentes podem ser componentes da matriz biológica, metabólitos, produtos de decomposição e medicamentos utilizados concomitantemente ao estudo.

A recuperação do procedimento de extração do fármaco das amostras de plasma (84,57% para doxiciclina e 80,73% para o padrão interno) foi superior ao encontrado por outros autores^(2,6,7), sendo esta uma das vantagens do método proposto. Recomenda-se que a linearidade seja determinada pela análise de, no mínimo, cinco concentrações diferentes, sendo o critério mínimo aceitável do coeficiente de correlação (r) de 0,99.⁽¹³⁾ Nesse estudo, obteve-se relação linear de oito concentrações entre os valores de 0,25 e 4,0 µg/mL com coeficiente de correlação de 0,9946 (Figura 1).

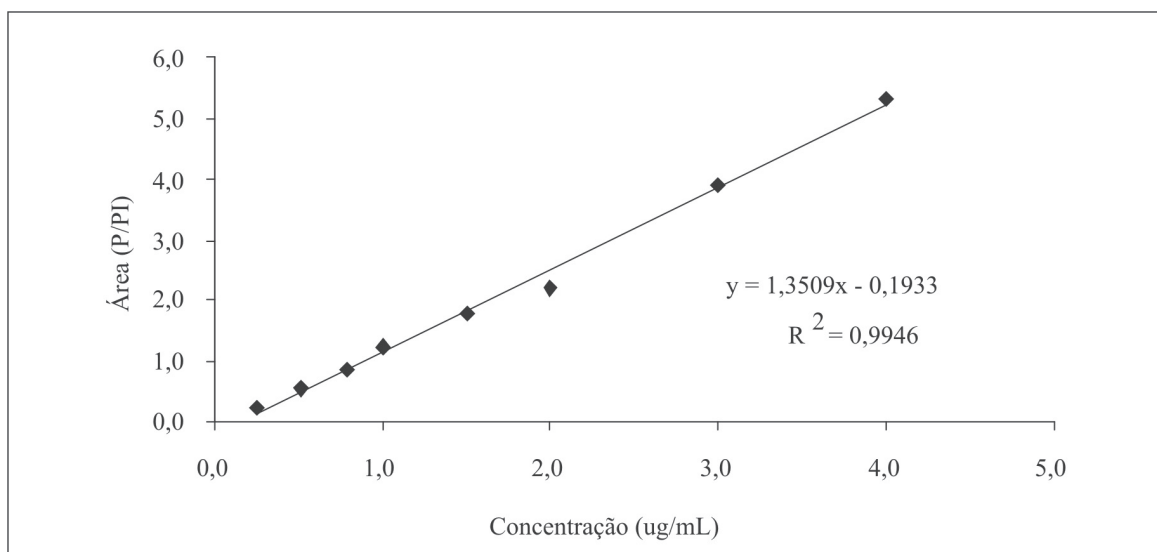


Figura 1: Curva de calibração referente a método analítico para quantificação de doxiciclina em plasma humano por CLAE. Cada ponto representa a média de seis determinações.

O limite de quantificação do método ($0,25 \mu\text{g/mL}$) foi superior ao encontrado em outros estudos,^(2,3,6,7) mas apresentou valores de precisão (1,88%) e exatidão (119,26%), dentro dos limites aceitáveis estabelecidos

pela Anvisa⁽¹³⁾. O método mostrou-se também preciso e exato tanto em análises realizadas no mesmo dia (intra-dia) quanto em dias diferentes (inter-dias), apresentando valores de precisão até 15% e exatidão entre 85 e 115% (Tabela I).

Tabela I: Precisão e exatidão intra-dia e inter-dias referentes ao método analítico para quantificação de doxiciclina em plasma por CLAE. Cada valor representa a média de seis determinações

Concentração ($\mu\text{g/mL}$)	Precisão (%)		Exatidão (%)	
	Intra-dia	Inter-dias	Intra-dia	Inter-dias
0,5	6,71	5,37	90,10	98,59
1,0	3,05	7,44	103,83	105,48
1,5	4,32	9,53	101,33	93,53

A estabilidade do fármaco em líquidos biológicos depende de suas propriedades químicas, da matriz biológica e do material de acondicionamento utilizado. A estabilidade determinada para um tipo de matriz e de material de acondicionamento específico não pode ser extrapolada para outros. As amostras mantiveram-se estáveis, quando analisadas após três ciclos de congelamento e descongelamento (Tabela II); no tempo e condições de

análise; por pelo menos 120 dias, protegidas da luz e à temperatura de -20°C e o extrato orgânico seco manteve-se estável por 24 horas, protegido da luz, às temperaturas de -20°C e 8°C , porém, o extrato orgânico reconstituído em fase móvel não se mostrou estável durante este período (Tabela III). As condições de realização dos ensaios de estabilidade reproduziram as reais condições de manuseio e análise das amostras.

Tabela II: Estabilidade da doxiciclina em amostras de plasma mantidas à temperatura de -20°C e submetidas a três ciclos de congelamento e descongelamento. Cada resultado representa a média de três determinações. Conc. = concentração.

Conc. (µg/mL)	Ciclo 1		Ciclo 2		Ciclo 3	
	Precisão (%)	Exatidão (%)	Precisão (%)	Exatidão (%)	Precisão (%)	Exatidão (%)
0,5	7,63	95,07	6,62	86,58	0,29	96,79
1,0	6,18	103,85	9,98	108,89	4,36	109,09
1,5	0,96	102,00	8,38	96,20	9,92	85,39

Tabela III: Estabilidade do extrato orgânico e extrato orgânico seco de doxiciclina mantidas protegidas da luz, às temperaturas de -20°C e 8°C por 24 horas. Cada resultado representa a média de três determinações.

Amostra	Concentração	Temperatura -20°C		Temperatura 8°C	
	(µg/mL)	Precisão (%)	Exatidão (%)	Precisão (%)	Exatidão (%)
Extrato Orgânico	0,5	57,11	35,61	12,93	50,11
	1,0	10,57	80,46	10,65	78,29
	1,5	7,34	111,20	2,34	96,16
Extrato Orgânico Seco	0,5	5,75	91,64	7,70	94,41
	1,0	2,78	109,70	1,03	112,53
	1,5	9,75	110,45	0,88	113,73

A validação deve garantir, por meio de estudos experimentais, que o método atenda às exigências das aplicações analíticas, assegurando a confiabilidade dos resultados. Para tanto, deve apresentar precisão, exatidão, linearidade, limite de detecção e limite de quantificação, especificidade, reprodutibilidade, estabilidade e recuperação adequadas à análise. Desse modo, é importante ressaltar que todos os equipamentos e materiais devem apresentar-se devidamente calibrados e os analistas devem ser qualificados e adequadamente treinados.

CONCLUSÃO

O método desenvolvido mostrou-se adequado à quantificação de doxiciclina em amostras de plasma humano, apresentando especificidade, recuperação, linearidade, limite de quantificação, precisão, exatidão e estabilidade dentro dos limites estabelecidos para análises deste tipo. Em comparação com outros descritos na literatura, o método aqui apresentado mostrou vantagens em relação à sensibilidade e à facilidade nos procedimentos de purificação das amostras. O padrão interno utilizado mostrou-se sensível e reprodutível nas concentrações exigidas para o ensaio, apresentando um tempo de retenção adequado para a análise.

REFERÊNCIAS

1. Chambers HF. Cloranfenicol, Tetraciclina, Macrolídeos, Clindamicina e Estreptograminas. In: Katzung BG. Farmacologia básica & clínica. 9ªed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2006. p. 8.
2. Axisa B, Naylor AR, Bell PRF, Thompsom MM. Simple and reliable method of doxycycline determination in human plasma and biological tissue. J Chromatogr B: Biomed Sci Appl 2000; 744: 359-65.
3. Farin D, Piva G, Gozlan I, Kitzes R. High performance liquid chromatography method for the determination of doxycycline in human plasma. Chromatographia 1988; 47(9/10): 547-9.
4. Oka H, Ikai Y, Ito Y, Hayakawa J, Harada K, Suzuki M, Odani H, Maeda K. Improvement of chemical analysis of antibiotics XXIII. Identification of residual tetracyclines in bovine tissues by eletrospray high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. J Chromatogr B: Biomed Sci Appl 1977; 693: 337-44.
5. Croubels SM, Vanoosthuyze KEI, Van Peteghem CH. Use of metal chelate affinity chromatography and membrane-based ion-exchange as clean-up procedure

- for trace residue analysis of tetracyclines in animal tissues and egg. *J Chromatogr B: Biomed Sci Appl* 1977; 690: 173-9.
6. Santos MDF, Vermeersch H, Remon JP, Schelkens M, De Backer P, Ducatelle R, Haesebrouck F. Validation of a high-performance liquid chromatographic method for the determination of doxycycline in turkey plasma. *J Chromatogr B: Biomed Sci Appl* 1996; 682: 301-8.
 7. Gastearena I, Dios-Viéitez MC, Segura E, Goñi MM, Renedo MJ, Fos D. Determination of doxycycline in small serum samples by liquid chromatography: application to pharmacokinetical studies on small laboratory animals. *Chromatographia*. 1984; 30(9/12): 76-80.
 8. Nieder M, Jaeger, H. Selective quantification of doxycycline in human plasma and urine optimized chromatography. *Chromatographia* 1988; 25(6): 526-30.
 9. Böcker R. Rapid analysis of doxycycline from biological samples by high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr* 1980; 187: 439-41.
 10. De Leenheer AP, Nelis HJCF. Doxycycline determination in human serum and urine by high-performance liquid chromatography. *J Pharm Sci* 1979; 68(8): 999-1002.
 11. Bressolle F, Bromet-Petit M, Audran, M. Validation of liquid chromatographic and gas chromatographic methods: applications to pharmacokinetics. *J Chromatogr B: Biomed Appl* 1996; 686(1): 3-10.
 12. Causon R. Validation of chromatographic methods in biomedical analysis: viewpoint and discussion. *J Chromatogr B: Biomed Sci Appl* 1997; 689(1): 175-80.
 13. Brasil. Resolução RE n° 899, de 29 de maio de 2003. A Agência Nacional de Vigilância Sanitária aprova guia para validação de métodos analíticos. *Diário Oficial da União*, Brasília, 2003. Disponível em: <http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?id=15132&word> [Acesso em: 30 jan. 2007].
 14. Conselho Nacional de Saúde Brasil Resolução n. 196. Dispõe sobre as diretrizes e normas regulamentares de pesquisa envolvendo seres humanos. Brasília, (1996 out, 10).
 15. Dihuidi K, Kucharski MJ, Roets E, Hoogmartens J, Vander-Haeghe H. Quantitative analysis of doxycycline and related substances by high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr* 1985; 325: 413-24.
 16. De Leenheer AP, Nelis HJCF. Reversed-phase high-performance liquid chromatography of doxycycline. *J Chromatogr* 1977; 140: 293-9.

Endereço para correspondência:

Geysa Aguiar Romeu
Universidade de Fortaleza
Av. Washington Soares, 1321 – Edson Queiroz- Bloco C – sala 04
CEP. 60811-905 - Fortaleza-CE.
E-mail: geysa@unifor.br