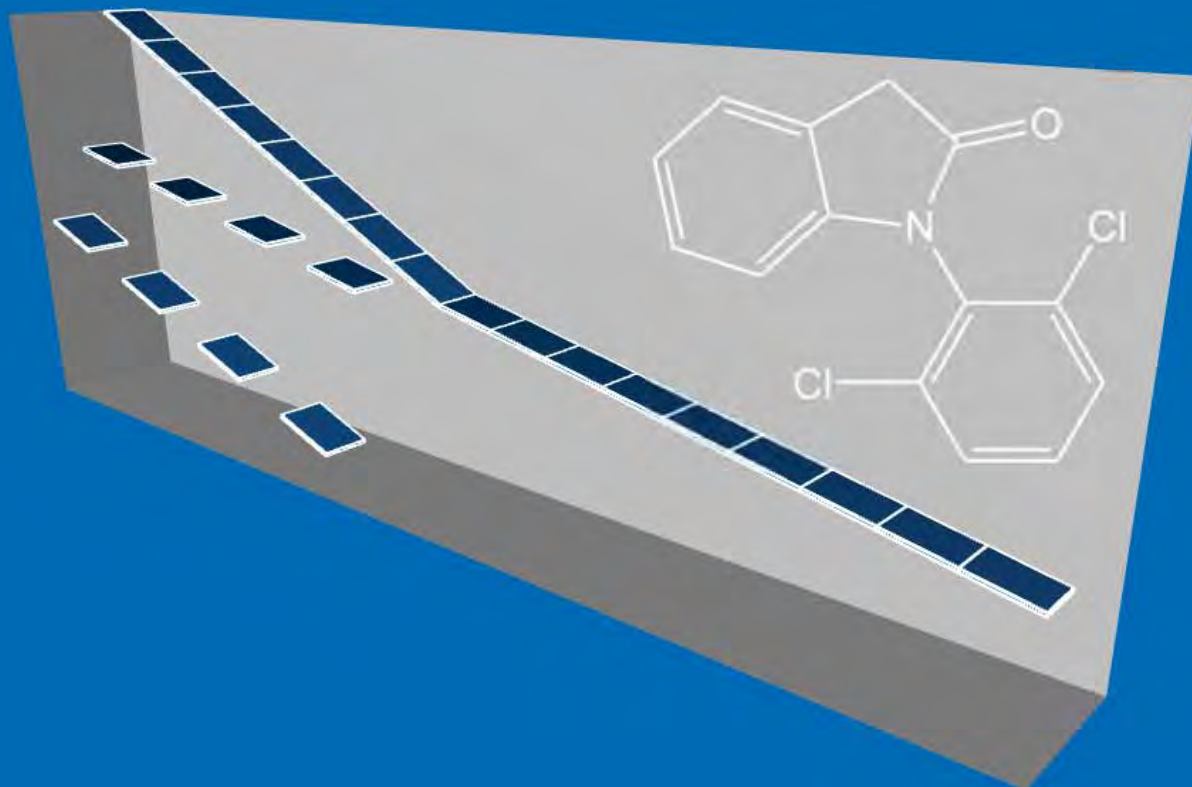


UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"

# Faculdade de Ciências Farmacêuticas



*Farmacocinética pré-clínica do composto  
1-(2,6-diclorofenil)indolín-2-ona (DICCIC),  
pró-fármaco de diclofenaco*



*Michel L. de Campos*

Araraquara-SP  
2012

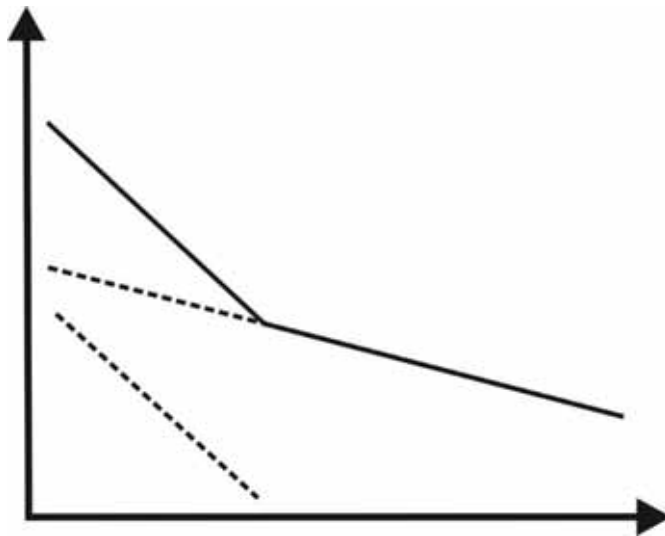
# Universidade Estadual Paulista

Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Campus Araraquara

Farmacocinética pré-clínica do composto 1-(2,6-diclorofenil)indolin-2-ona (DICCIC), pró-fármaco de diclofenaco

Michel Leandro de Campos



Araraquara-SP

2012

# **Universidade Estadual Paulista**

## **Faculdade de Ciências Farmacêuticas**

**Campus Araraquara**

### **Farmacocinética pré-clínica do composto 1-(2,6-diclorofenil)indolin-2-ona (DICCIC), pró-fármaco de diclofenaco**

**Michel Leandro de Campos**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de Pesquisa e Desenvolvimento de Fármacos e Medicamentos, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas UNESP, para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

**Orientadora: Profa. Dra. Rosângela Gonçalves Peccinini**

**Co-orientador: Prof. Dr. Jean Leandro dos Santos**

**Araraquara-SP**

**2012**

### **Ficha Catalográfica**

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

C198f Campos, Michel Leandro de  
Farmacocinética pré-clínica do composto 1-(2,6-diclorofenil)indolin-2-ona (DICCIC), pró-fármaco de diclofenaco / Michel Leandro de Campos. – Araraquara, 2012  
106 f.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista. “Júlio de Mesquita Filho”. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas

Orientador: Rosângela Gonçalves Peccinini

Co-orientador: Jean Leandro dos Santos

1. Farmacocinética pré-clínica. 2. Pró-fármaco. 3. Diclofenaco. I. Peccinini, Rosângela Gonçalves, orient. II. Santos, Jean Leandro dos, co-orient. III. Título.

**CAPES: 40300005**

**Candidato: Michel Leandro de Campos**

**Farmacocinética pré-clínica do composto 1-(2,6-diclorofenil)indolin-2-ona  
(DICCIC), pró-fármaco de diclofenaco.**

---

---

A comissão julgadora dos trabalhos de defesa de Dissertação de Mestrado, em sessão pública realizada em 23 de fevereiro de 2012, considera o candidato:

APROVADO

REPROVADO

**COMISSÃO EXAMINADORA**

---

Profa. Dra. Regina Helena Costa Queiroz

---

Profa. Dra. Chung Man Chin

---

Profa. Dra. Rosângela Gonçalves Peccinini

## Dedicatória

---

Dedicado às famílias Ferreira de Souza e Alves de Campos, pois me ensinaram a lutar, perseverar e jamais desistir.

# Agradecimentos

---

## Agradeço

A **DEUS** e a todas as forças boas visíveis e invisíveis do universo por cada acontecimento grande ou pequeno, cujas combinações infinitas e indescritíveis me permitiram o privilégio de começar e terminar esse trabalho;

“Meu DEUS hoje vou ter provas, eu estudei bastante, mas posso perder a calma e esquecer tudo. Que o Espírito Santo me ajude, e ajude também meus colegas e minhas colegas.”

A **Maria Ferreira de Souza e Jaime Alves de Campos** por serem meus pais, por acreditarem em mim, por me apoiarem e por serem tudo que precisei e sempre que precisei incondicionalmente. **Pai**, eu te agradeço por ter me desafiado, por ter me elogiado, por ter me protegido e por ter aceitado que eu trilhasse o meu caminho, desculpe tê-lo deixado. **Mãe**, eu te agradeço por destruir a distância que sempre nos separou com seu amor, um dia vi a minha frente o caminho que me levava a meus sonhos e como sempre na minha vida você garantiu que eu pudesse tocar o que achei que só poderia olhar;

A toda **minha família**, pelo apoio que sempre me foi direcionado, apesar da distância que coloquei entre nós para realização desse trabalho;

A minha orientadora **Profa. Dra. Rosangela Gonçalves Peccinini** e a minha amiga **Rô**. Sua existência na minha vida criou um caminho que antes de você não existia. Esse caminho me trouxe até a conclusão desse trabalho e a tudo que aprendi com ele, você é a resposta ao como e ao por que estou na farmacocinética. Obrigado pela paciência com a minha impaciência e pelos ensinamentos, para tudo que aprendi bem é porque me foi ensinado ainda melhor;

Ao **Prof. Dr. Jean Leandro dos Santos** pelo suporte responsável e comprometido e por não deixar pergunta sem resposta. Não sou um químico farmacêutico, mas com certeza conheço um dos melhores;

A **Mayra Aparecida Lovezutte** pela compreensão por cada momento que a negligenciei em função da realização desse trabalho e pelo incentivo diário e constante que me proporcionou;

## Agradecimentos

---

A **Sandra de Lorenzo, Helen Mariana Baldan e Marcelo Gomes Davanço** pelos primeiros ensinamentos na CLAE, processos extrativos e solução de problemas, e ainda pela amizade e prontidão quando precisei;

A **Profa. Dra. Patrícia M. De Paula** e sua aluna **Mariana** por me ensinarem a técnica de canulação;

Aos Professores **Dra. Cleopatra da Silva Planeta, Dr. Anselmo Gomes de Oliveira, Dra. Regina Helena Costa Queiroz e Dra. Chung Man Chin**, pois foram fundamentais na finalização dessa dissertação.

A equipe do Laboratório de Bioequivalência, **Marcos, Kelly, Simone e Andréia**, pois desconhecem a resposta “não” quando sua ajuda é necessária;

A equipe de Pesquisa em Farmacocinética e Toxicologia de novos Fármacos e Medicamentos – UNESP ainda não citados, **Elias, Caroline, Juliana, Marco, Diego e Carla**. Pois sempre responderam prontamente ao chamado de um amigo precisando de ajuda desde o simples ato de conter um animal ao grandioso toma conta aí pra mim que eu já volto.

A **Lucas, Flavia, Cris, Fernanda e Lucélia** pela companhia e auxílio no meu primeiro congresso e apresentação de trabalho;

A meu amigo **Denis Alarcão** pela conversa e divisão de moradia nos anos mais importantes da realização desse trabalho.

As técnicas da Toxicologia, **Maria e Valéria**, pois cada vez que não encontrei o que queria me foi mostrado onde estava;

Aos funcionários da biblioteca pelo valioso auxílio na confecção dessa dissertação, correção das citações e das referências;

Aos funcionários da seção técnica de pós-graduação pelo atendimento de cada solicitação e pelo importante trabalho que realizam;

A **CAPES, FAPESP e INCT-if** pelo apoio por meio de bolsa e auxílio financeiro com materiais indispensáveis ao término desse estudo.

A **Fundação Educacional de Fernandópolis** sem a qual eu não estaria apto a aceitar esse projeto e a **Faculdade de Ciências Farmacêuticas – UNESP** por ser o continente de sua realização.

A todos que contribuíram com a realização de trabalho, seja direta ou indiretamente.



“Nas grandes batalhas da vida, o primeiro passo para a vitória é o desejo de vencer.”  
Mahatma Gandhi

“Escolhe um trabalho que gostes, e não terás que trabalhar nem um dia na tua vida.”  
Confúcio

“Ensinar é mostrar que é possível.  
Aprender é tornar possível a si mesmo.”  
O Diário de um Mago - Paulo Coelho

“Com grandes poderes vem grandes responsabilidades.”  
Homem-Aranha – Stan Lee

### RESUMO

O pró-fármaco de diclofenaco, 1-(2,6-diclorofenil)indolin-2-ona (DICCIC), apresenta atividade anti-inflamatória comparável ao diclofenaco sem efeitos gastroulcerativos. Essa vantagem torna-o uma possível alternativa terapêutica em quadros de inflamação onde há a indicação de anti-inflamatórios não esteroidais. Assim neste trabalho, foi investigado o perfil farmacocinético do DICCIC e seu potencial para conversão no diclofenaco. O DICCIC e o diclofenaco foram administrados em dose única a ratos Wistar (n=20) intravenosamente. Foram colhidas amostras seriadas de sangue. As amostras de plasma foram processadas e o extrato final do processamento foi analisado por CLAE. O sistema cromatográfico consistiu de uma bomba 600E Waters®, com detector UV-vis operando a 276 e 250 nm. A separação foi feita em coluna Symmetry C18 (4,6 x 250 mm, 5µm) sob eluição da fase móvel metanol:acetonitrila: ácido metanoico 0,1%, na proporção de 5:55:40, em modo isocrático e fluxo de 1 mL/min. O método bioanalítico foi validado e seus limites de confiança foram apropriados para sua aplicação. As médias dos parâmetros farmacocinéticos foram calculadas pelas curvas de concentração plasmática *versus* tempo e comparadas pelo teste de Mann-Whitney ( $p < 0,05$ ). A meia-vida do diclofenaco a partir de DICCIC ( $49,7 \pm 10,9$  min) foi significativamente menor que a meia-vida do diclofenaco após administração de diclofenaco ( $188,3 \pm 78$  min). O mesmo foi observado para a área sob a curva, cujo resultado para diclofenaco de DICCIC ( $48,8 \pm 4,2$  µg.min/mL) foi mais de dez vezes menor que a do diclofenaco após administração de diclofenaco ( $698,7 \pm 76,7$  µg.min/mL). Os parâmetros permitiram sugerir que a baixa disponibilidade de diclofenaco a partir de DICCIC está relacionada a um alto *clearance* extra-hepático do DICCIC e ao metabolismo hepático sequencial do diclofenaco quando formado a partir de DICCIC.

### **Abstract**

The diclofenac prodrug, 1-(2,6-dichlorophenyl)indolin-2-one (DICCIC), has anti-inflammatory effects comparable to diclofenac, but without gastroulcerative effect. This advantage makes it a potential therapeutic approach in inflammation frames where there is an indication of nonsteroidal anti-inflammatory drugs. Thus, in this study, we investigated the pharmacokinetic profile of DICCIC and its potential for conversion to diclofenac. The DICCIC and diclofenac were administered in single dose to Wistar rats (n = 20) intravenously. Blood samples were collected serially. The plasma samples were processed and thereafter analyzed by HPLC. The HPLC system consisted of a Waters® 600E pump with a UV-Vis detector (Waters® 2487), and a reverse phase C18 column (5µm, 250mm x 4.6 mm I.D, Symmetry®, Waters). The mobile phase was 0.1% methanoic acid:methanol:acetonitrile (40:5:55) at a flow rate 1 mL/min. The UV-Vis detector was set to 276 nm for detection of diclofenac and naproxen (Internal Standard), and 250 nm for DICCIC. The HPLC method for simultaneous determination of diclofenac and DICCIC was validated to perform the profile evaluation. The confidence limits were appropriate for its application. The mean pharmacokinetic parameters were then calculated (using) the curves of plasma concentration versus time and compared using the Mann-Whitney test ( $p < 0.05$ ). The half-life of diclofenac from DICCIC ( $49.7 \pm 10.9$  min) was significantly lower than the half-life of diclofenac after administration of diclofenac ( $188.3 \pm 78$  min). The area under the curve for diclofenac from DICCIC ( $48.8 \pm 4.2$  µg.min/mL) was more than ten-fold lower than that of diclofenac originated from diclofenac ( $698.7 \pm 76.7$  µg.min/mL). The parameters suggested that the low availability of diclofenac from DICCIC is related to a high nonhepatic elimination of DICCIC and a high sequential hepatic metabolism of diclofenac after formed from DICCIC.

## LISTA DE ABREVIATURAS

- 12-HETE: 12-hidroxiieicosatetraenóico
- 8-OH: 8-OH mirtazapina
- AA: ácido araquidônico
- AINEs: anti-inflamatórios não esteróides
- AMPc: adenosina monofosfato cíclico
- ANVISA: Agência Nacional de Vigilância Sanitária
- AR: artrite reumatoide
- $ASC_{0-\infty}$ : área sob a curva de 0 ao infinito
- $ASC_{0-t}$ : área sob curva de 0 a um tempo definido t
- $ASMC_{0-\infty}$ : área sob o momento da curva de 0 ao infinito
- $C_0$ : concentração plasmática no tempo 0
- CCD: cromatografia em camada delgada
- Cl: *Clearance*
- CLAE: cromatografia líquida de alta eficiência
- $Cl_f$ : *Clearance* de formação de diclofenaco a partir de DICCCIC
- $Cl_{nr}$ : *Clearance* não renal
- $Cl_r$ : *Clearance* renal
- $C_{max}$ : concentração máxima
- COX: cicloxigenase
- COXIBE: AINEs inibidores seletivos para COX-2
- cPGES: Prostaglandina E sintase citossólica
- CQ: amostra de controle de qualidade
- CQA: amostra de controle de qualidade de alta concentração
- CQB: amostra de controle de qualidade de baixa concentração
- CQ-LIQ: amostra de controle de qualidade do limite inferior de quantificação
- CQM: amostra de controle de qualidade de média concentração
- DICCCIC: 1-(2,6-diclorofenil)indolin-2-ona
- dic-DC: diclofenaco a partir de DICCCIC
- dic-dic: diclofenaco a partir da administração de diclofenaco
- DMR: dimetilmirtazapina
- DMSO: dimetilsulfóxido

## Lista de Abreviaturas

---

DPR: desvio padrão relativo

EDC: etil dimetilaminopropil carbodiimida

F: biodisponibilidade

FDA: Food and Drug Administration

$F_{H(m)}$ : fração de fm que ficou disponível sistemicamente como diclofenaco

fm: fração de fármaco eliminada no fígado

GI: gastrointestinal

HTS: triagem de alto rendimento (high-throughput screening)

IC50: concentração inibitória de 50%

IC80: concentração inibitória de 80%

IL: interleucina

Ind-NC: pró-fármaco etil éster de indometacina em nanocápsulas

IV: intravenoso

$k_{10}$ : constante de transferência do compartimento central para eliminação

$k_{12}$ : constante de transferência do compartimento central para periférico

$k_{21}$ : constante de transferência do compartimento periférico para central

$k_{el}$  ou  $\beta$ : constante de eliminação

$k_{el(m)}$ : constante de eliminação de um metabólito

$k_f$ : constante de formação de um metabólito

$k_{inalterado}$ : constante de eliminação inalterado

$k_\alpha$  ou  $\alpha$ : constante de distribuição

LD: limite de detecção

LIQ: limite inferior de quantificação

LT: leucotrienos

MDCK: células de rins de cães (Madin-Darby canine kidney)

mPGES: Prostaglandina E sintase associada à membrana

MRT: tempo de residência média (mean residence time)

NO-GMPc : óxido nítrico- guanosina monofosfato cíclico

OA: osteoartrite

PC: padrão de calibração

PG: prostaglandinas

PGI<sub>2</sub>: prostaciclina

PI: padrão interno

## Lista de Abreviaturas

---

pKa: logaritmo da constante ácida

QSAR: relação estrutura-atividade quantitativa (quantitative structure-activity relationship)

RBA: biodisponibilidade relativa (relative bioavailability)

SNC: sistema nervoso central

$t_{1/2}$  ou  $t_{1/2\beta}$ : meia-vida de eliminação

$t_{1/2\alpha}$ : meia-vida de distribuição

TCA: ácido tricloroacético

TIE: pró-fármaco éster trietilenoglicol de indometacina

t<sub>max</sub>: tempo para concentração máxima

TNF: fator de necrose tumoral

t<sub>ss</sub>: tempo para o estado de equilíbrio

TX: tromboxanos

V<sub>d</sub>: volume de distribuição

V<sub>d<sub>área</sub></sub>: volume de distribuição calculado pela área

V<sub>d<sub>c</sub></sub>: volume de distribuição do compartimento central

V<sub>d<sub>ss</sub></sub>: volume de distribuição no estado de equilíbrio

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Dos fosfolipídios de membrana a PGH <sub>2</sub> .....	21
Figura 2 Retroalimentação positiva da mPGES-1.....	23
Figura 3 Local de inibição de AINEs seletivos e não-seletivos.....	24
Figura 4 Relação entre a concentração de alguns fármacos, necessária para inibição de 50% (IC <sub>50</sub> ) de COX-1 e COX-2. ....	26
Figura 5 Ulcerogênese por AINEs.....	28
Figura 6 O DICCIC é convertido a diclofenaco <i>in vivo</i> . ....	36
Figura 7 Ulcerogenicidade das substâncias em ratos.....	37
Figura 8 Pictograma representativo de um modelo bicompartimental.....	39
Figura 9 A terminologia para se referir a uma estrutura de acordo com as suas transformações. ....	42
Figura 10 Caminho de biotransformação e eliminação de um composto.....	44
Figura 11 Eliminação de fármaco e de metabólito. ....	45
Figura 12 Estruturas de diclofenaco e DICCIC.....	56
Figura 13 Representação gráfica do método dos resíduos.....	65
Figura 14 Ilustração digitalmente realçada de CCD. ....	68
Figura 15 Cromatograma de avaliação da qualidade da reação para obtenção de DICCIC.....	68
Figura 16 Curva analítica do DICCIC. ....	70
Figura 17 Curva analítica do diclofenaco. ....	70
Figura 18 Cromatograma de amostra zero.....	72
Figura 19 Cromatograma de amostra Diclofenaco.....	73
Figura 20 Cromatograma de amostra DICCIC. ....	73
Figura 21 Curva da concentração plasmática versus tempo para o diclofenaco.....	76
Figura 22 Curva da concentração plasmática versus tempo para o DICCIC e para o diclofenaco a partir da administração de DICCIC. ....	77
Figura 23 Pictograma da disponibilidade do diclofenaco de DICCIC.....	81

**LISTA DE TABELAS**

Tabela 1. PGs e as células preferenciais de sua formação a partir de PGH <sub>2</sub> . ....	25
Tabela 2. Concentrações das soluções estoque, de trabalho, padrões de calibração e controles de qualidades, para o diclofenaco. ....	69
Tabela 3. Concentrações das soluções estoque, de trabalho, padrões de calibração e controles de qualidades, para o DICCIC.....	69
Tabela 4. Médias das concentrações experimentais que geraram a curva de calibração para diclofenaco.....	70
Tabela 5. Médias das concentrações experimentais que geraram a curva de calibração para DICCIC. ....	70
Tabela 6. Precisão e Exatidão.....	72
Tabela 7. Recuperação de diclofenaco e de DICCIC.....	74
Tabela 8. Estabilidade do diclofenaco.....	74
Tabela 9. Estabilidade do DICCIC.....	75
Tabela 10. Parâmetros farmacocinéticos. ....	78
Tabela 11. Disponibilidade do diclofenaco de DICCIC.....	80



## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO .....	17
2. REVISÃO DE LITERATURA .....	21
2.1 Inflamação e ação dos AINEs .....	21
2.2 Toxicidade .....	27
2.3 Latenciação e Pró-fármacos.....	31
2.4 Diclofenaco.....	33
2.5 DICCCIC .....	35
2.6 Farmacocinética .....	38
2.7 Desenvolvimento de novos Fármacos e a Farmacocinética .....	40
2.8 Farmacocinética e os Metabólitos .....	41
3. JUSTIFICATIVA .....	53
4. OBJETIVOS .....	54
5. MATERIAIS E MÉTODOS.....	55
5.1 Material.....	55
5.1.1 Matérias primas, reagentes e solventes .....	55
5.1.2 Equipamentos .....	55
5.1.3 Correlatos .....	55
5.2 Preparação de DICCCIC.....	56
5.2.1 Procedimento de Síntese .....	56
5.2.2 Identificação de diclofenaco e DICCCIC por CCD .....	56
5.2.3 Avaliação do DICCCIC por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência.....	57
5.3 Pré-formulação .....	57
5.3.1 Solubilização dos Fármacos.....	57
5.3.2 Estabilidade da pré-formulação.....	58
5.4 Método Bioanalítico .....	58
5.4.1 Condições cromatográficas .....	58
5.4.2 Processamento da amostra biológica .....	58
5.4.3 Validação.....	59
5.4.3.1 Linearidade.....	59
5.4.3.2 Limite Inferior de Quantificação (LIQ).....	59
5.4.3.3 Precisão e Exatidão.....	59
5.4.3.4 Limite de Detecção (LD).....	60
5.4.3.5 Seletividade.....	60
5.4.3.6 Recuperação .....	60
5.4.3.7 Estabilidade.....	60

## Sumário

---

5.4.4	Análise de resultados da validação .....	61
5.5	Perfil Farmacocinético .....	61
5.5.1	Protocolo experimental.....	61
5.5.2	Animais.....	61
5.5.3	Procedimento Cirúrgico .....	62
5.5.4	Grupo Farmacocinética I .....	62
5.5.5	Grupo Farmacocinética II .....	63
5.5.6	Análise Farmacocinética .....	63
5.5.7	Análise Estatística .....	67
6.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	68
6.1	Identificação .....	68
6.1.1	Por CCD .....	68
6.1.2	Por CLAE .....	68
6.2	Validação do método bioanalítico.....	69
6.2.1	Curva analítica e Linearidade .....	69
6.2.2	Precisão e Exatidão .....	71
6.2.3	Limite de detecção .....	71
6.2.4	Seletividade .....	71
6.2.5	Recuperação .....	73
6.2.6	Estabilidade.....	74
6.3.	Análise Farmacocinética .....	76
7.	CONCLUSÕES .....	84
8.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	85
9.	ANEXOS .....	97

## 1. INTRODUÇÃO

O uso de agentes com propriedades anti-inflamatórias tem mais de 3500 anos (EAD, 2008). Entre estes agentes, os fármacos anti-inflamatórios não esteróides (AINEs) são os de maior utilização (MCGEER; MCGEER, 2007) e provavelmente representam os produtos mais comuns na história humana (FIRUZI; PRATICO, 2006).

Os AINEs são a base do tratamento de doenças inflamatórias agudas e crônicas. As doenças crônicas podem ser representadas pela artrite reumatoide (AR) e pela osteoartrite (OA) (BROOKS; KUBLER, 2006; MOODLEY, 2008).

Como toda farmacoterapia, a indicação dos AINEs requer a avaliação do risco benefício. Entre os principais efeitos adversos destes fármacos estão a gastroulceração (FENDRICK; GREENBERG, 2009), problemas renais (NG et al., 2008; TAKEMOTO et al., 2008) e eventos cardiovasculares (VONKEMAN; LAAR, 2010). Estes efeitos adversos apresentam relação com a inibição das ciclooxigenases (COX); com a qual também se relacionam os seus efeitos terapêuticos (DAJANI; ISLAM, 2007). Ainda, tem sido proposto que a natureza ácida desses fármacos pode contribuir para a irritação local e, então, para os problemas relacionados à gastroulceração na administração oral crônica (CHEN, 2009).

Os eventos cardiovasculares são observados na utilização de inibidores COX-2 seletivos e caracterizados pelo aumento no risco de trombose (FENDRICK; GREENBERG, 2009).

O desenvolvimento de efeitos danosos sobre o trato gastrintestinal (GI) ocorre significativamente com a ingestão prolongada destes fármacos (WALLACE, 2008), que é usualmente requerida no tratamento dos pacientes portadores de inflamação crônica, AR e OA (TUGWELL et al., 2004; BROOKS; KUBLER, 2006).

Segundo Pavelka (2011), o diclofenaco pode ser considerado como fármaco referência entre os AINEs indicados para o tratamento dos processos inflamatórios crônicos.

Na OA o tratamento farmacológico envolve a administração de analgésicos e anti-inflamatórios, opióides ou capsaicina; além da cloroquina para modificação do curso da doença. Este uso é prolongado para os fármacos de tratamento sintomático e por tempo indefinido para a cloroquina (COIMBRA et al., 2002).

---

Na AR, o controle da dor e do processo inflamatório articular é feito pelo uso de AINES e, em algumas situações, associados a glicocorticóides. A suplementação de cálcio e vitamina D é indicada quando há uso prolongado de glicocorticóides. São utilizados ainda, fármacos modificadores do curso da doença, como cloroquina, sulfassalazina, metotrexato, ciclosporina, entre outros. O uso de AINES deve ser mantido enquanto houver processo inflamatório e/ou dores articulares. O uso de modificadores do curso da doença deve ser mantido indefinidamente (SOCIEDADE BRASILEIRA DE REUMATOLOGIA, 2002).

Não há estudos que mostrem diferenças na eficácia entre os diversos AINES disponíveis para o tratamento sintomático das inflamações crônicas. Os inibidores seletivos da COX-2 apresentam a vantagem de efeitos adversos sobre o trato digestório menos pronunciados, no entanto levam ao risco de eventos cardiovasculares (SOCIEDADE BRASILEIRA DE REUMATOLOGIA, 2002; TUGWELL et al, 2004). Por outro lado, o uso de inibidores não seletivos, que em geral levam a efeitos adversos sobre o trato digestório, requer a utilização concomitante de fármacos gastroprotetores, como inibidores da bomba de prótons (PENISTON et al., 2011).

Assim, na terapêutica da OA e da AR há associação medicamentosa por um longo período, o que aumenta a preocupação com relação aos efeitos adversos dos fármacos empregados. Ainda, a gastrotoxicidade dos AINEs é, em determinadas situações, o efeito adverso limitante do uso desses fármacos por pacientes com sensibilidade a esses agentes (CHEN, 2009).

Pesquisas na área farmacêutica têm sido realizadas com a finalidade de desenvolvimento de novos fármacos e/ou terapias aplicáveis ao tratamento das inflamações crônicas, que possuam maior eficácia com supressão dos sintomas causados pela doença e menor incidência e gravidade de efeitos colaterais (BERENBAUM, 2008; SABBAGH, 2009; QUAN et al., 2008).

A utilização da latenciação como estratégia de modificação molecular tem permitido a obtenção de pró-fármacos com propriedades biofarmacêuticas e farmacocinéticas melhoradas. Além disso, essa estratégia tem permitido a obtenção de substâncias mais seguras com reduzido efeito adverso (TESTA, 2009).

Nesse sentido, Chung e colaboradores (2009), mediante o emprego de latenciação, sintetizaram o derivado de diclofenaco planejado como candidato a pró-

fármaco - 1-(2,6-diclorofenil)indolin-2-ona (DICCIC) - que demonstrou atividade anti-inflamatória, avaliada por teste em edema de pata de rato induzido por carragenina, comparável ao do diclofenaco, porém sem promover gastroulceração significativa.

Testes *in vitro* realizados pelo grupo não demonstraram hidrólise química do composto (pH 1,2 e 7,4) no período de 24 horas. No ensaio *ex vivo* (em plasma humano), 10 µg/mL, foi observado o mesmo comportamento, sugerindo que o pró-fármaco não é susceptível á hidrólise mediada por enzimas plasmáticas (CHUNG et al., 2009).

Os estudos por sistemas *in vitro* podem fornecer informações preliminares para o planejamento dos estudos *in vivo*, porém deve-se considerar que estes ensaios são conduzidos em ambiente não-fisiológico e, portanto, não possuem as características necessárias para a elucidação dos processos de interação do produto com o sistema biológico. Por exemplo, nos estágios iniciais do processo de desenvolvimento de fármacos são inexistentes as informações sobre os mecanismos de biotransformação do composto e sua importância em relação a outros mecanismos de *clearance*. Assim, somente através dos estudos *in vivo* os aspectos das interações fármaco-organismo podem ser satisfatoriamente observados (MASIMIREMBWA et al., 2003; SINGH, 2006).

Além dos estudos *in vitro*, o desenvolvimento de pró-fármacos requer o conhecimento do perfil farmacocinético e, nesta fase, os dados obtidos em estudos com animais possibilitam a obtenção de informações com relação a sua capacidade de conversão no fármaco matriz no sistema biológico e orientar quanto às doses que deverão ser utilizadas em futuros testes clínicos. Segundo Singh (2006): “a farmacocinética é um importante fator no destino de um fármaco na clinica. Assim os compostos devem ser submetidos a tantas verificações *in vivo* quanto possível”.

Os estudos em farmacocinética pré-clínica podem ser conduzidos simultaneamente aos estudos de atividade ou somente após resultados satisfatórios nestes últimos (MAULEÓN et al., 1996; TORRES-LÓPEZ et al., 1997; HIRABAYASHI et al., 2002; MAMIDI et al., 2002; NG et al., 2003; NAVARRETE et al., 2005; GRIGOLEIT; GRIGOLEIT, 2005; KALGUTKAR et al., 2006; REYES-GORDILLO et al., 2007; LEÓN-REYES et al., 2008; QUEVEDO; BRIÑÓN, 2009).

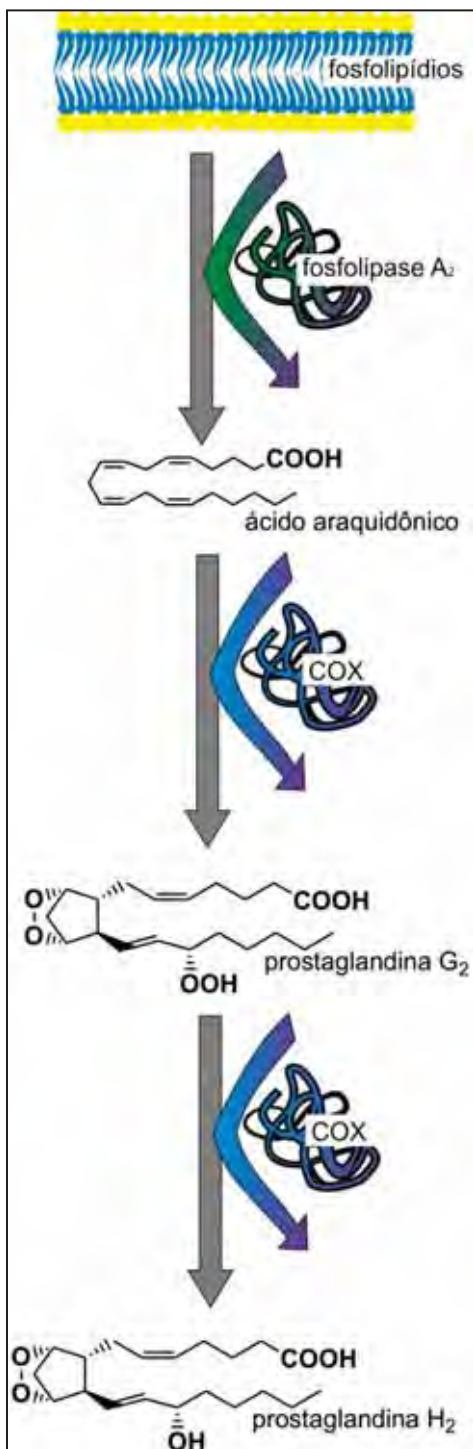
No entanto, segundo Waterbeemd & Gifford (2003), os problemas farmacocinéticos e de toxicidade são responsáveis por cerca de 50% das

interrupções de projetos de desenvolvimento de fármacos. Assim, a realização precoce dos estudos em farmacocinética pré-clínica tem sido recomendada (WATERBEEMD; GIFFORD, 2003).

Este trabalho consiste na avaliação do perfil farmacocinético intravenoso em ratos do DICCIC e de seu metabólito ativo, o diclofenaco. O diclofenaco será avaliado a partir de sua administração intravenosa e a partir da bioconversão do DICCIC administrado intravenosamente. A avaliação da farmacocinética intravenosa permite conhecer o perfil de conversão do metabólito sem que seja confundido com a perda na absorção ou o efeito de primeira passagem. Além disso é uma via sempre necessária ao cálculo da biodisponibilidade oral em estudos posteriores.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Inflamação e ação dos AINEs



**Figura 1** Dos fosfolípidios de membrana a PGH<sub>2</sub>.

Os fosfolípidios de membrana são convertidos a ácido araquidônico (AA) por ação da enzima fosfolipase A<sub>2</sub>, cuja ativação depende de estímulos como hormônios, fatores de crescimento, imunoglobulinas, fagocitose, lecitinas, trombina e a lesão celular geral (BERTOLINI et al., 2001; RANG et al., 2007).

O AA formado pode se tornar ácidos epoxieicosatrienóicos por ação de citocromo P-450 epoxigenases, lipoxinas por ação de 15-lipoxigenase, ácido 12-hidroxeicosatetraenóico (12-HETE) por ação de 12-lipoxigenases, leucotrienos (LT) por ação de 5-lipoxigenase e prostaglandinas (PG) G<sub>2</sub> pelas COX em uma reação endoperóxido sintetase (BERTOLINI et al., 2001; RANG et al., 2003; SIMMONS et al., 2004).

Na sequência a COX, por uma ação peroxidase, converte a PGG<sub>2</sub> em PGH<sub>2</sub> (**Figura 1**). Essa, por sua vez, é convertida a tromboxanos (TX) A<sub>2</sub>, a prostaciclina (PGI<sub>2</sub>), a PGE<sub>2</sub>, a PGF<sub>2α</sub> e a PGD<sub>2</sub>, por sintetases e isomerases específicas. Essas prostaglandinas agem em receptores próprios que são denominados por uma letra "P" precedida da letra referente a prostaglandina cuja ligação é preferencial (SIMMONS et al., 2004; SMYTH et al., 2006).

Tanto PGE<sub>2</sub> quanto PGI<sub>2</sub> são encontradas em lesões inflamatórias e provavelmente, ambas contribuem para o eritema inflamatório (receptor EP2) e dor (receptores IP e EP1). A PGE<sub>2</sub> age por diminuir o limiar de ativação de canais de sódio resistentes a tetrodotoxina nos nociceptores, já a PGI<sub>2</sub> leva a um alongamento da resposta (SIMMONS et al., 2004).

PGE<sub>2</sub> liberada no tecido inflamado sensibiliza fibras nervosas aferentes agindo tanto em nociceptores periféricos quanto em locais centrais – medula espinal e encéfalo - para levar a hiperalgesia. Quando a concentração de PGE<sub>2</sub> está aumentada na corrente sanguínea ela pode agir no SNC. Como sua inativação só ocorre periféricamente, a ação se mantém até que o gradiente permita sua saída do SNC (LEE et al., 2005).

As PGs E<sub>2</sub> e I<sub>2</sub> também têm sido encontradas no líquido sinovial de pacientes artríticos. Elas têm um papel significativo na fisiologia das articulações, na patogenia das desordens articulares e é provável que estejam envolvidas em algumas ações da interleucina (IL) 1 $\beta$  - cuja secreção é estimulada por endotoxinas e peptídeos liberados de neutrófilos ativados e células epiteliais - e do fator de necrose tumoral (TNF)  $\alpha$  – produzido por células da linhagem monocítica - nesses tecidos (LAUFER, 2003; SIMMONS et al., 2004; AKAOGI et al., 2006; JOOSTEN et al., 2010; PARAMESWARAN; PATIAL, 2010).

As células sinoviais e condrócitos – células comuns às articulações – podem ser ativadas, por citocinas inflamatórias nas articulações problemáticas, o que as leva a liberar IL-17, que age sinergicamente com IL-1 e TNF- $\alpha$ . Estas, por sua vez, estimulam a secreção de PGE<sub>2</sub>. A produção da PGE<sub>2</sub> necessita, além da COX, da Prostaglandina E sintase associada à membrana (mPGES), enzima relacionada ao desenvolvimento de inflamação crônica em pacientes com AR ou OA. Sua função é converter PGH<sub>2</sub> em PGE<sub>2</sub> (SIMMONS et al., 2004; KOJIMA et al., 2005; PARADOWSKA et al., 2007).

Tanto em pacientes portadores de OA, quanto em portadores de AR, a expressão de mPGES-1 nos fibroblastos sinoviais está aumentada devido a estímulos de citocinas pró-inflamatórias como a IL-1 $\beta$  e o TNF- $\alpha$ . A superexpressão de mPGES-1 em tecidos articulares, tais como sinovial e cartilaginoso, pode estar altamente relacionado ao desenvolvimento da inflamação crônica relacionada a artrites (KOJIMA et al., 2005).



A expressão da enzima mPGES-1 possui uma autorregulação pela  $PGE_2$ , que pode desempenhar importante papel na inflamação associada com a artrite. Neste mecanismo está envolvida a COX-2, cuja expressão é aumentada por ação de  $IL-1\beta$ . O aumento da COX-2 juntamente com a expressão de mPGES-1 – também estimulada por ação da  $IL-1\beta$  – leva a formação elevada de  $PGE_2$ , que sai da célula e se liga a receptores EP2 e EP4. Esses receptores estão relacionados à ativação de adenosina monofosfato cíclico (AMPc), o qual também estimula a expressão de mPGES (Figura 2) (KOJIMA et al., 2005).

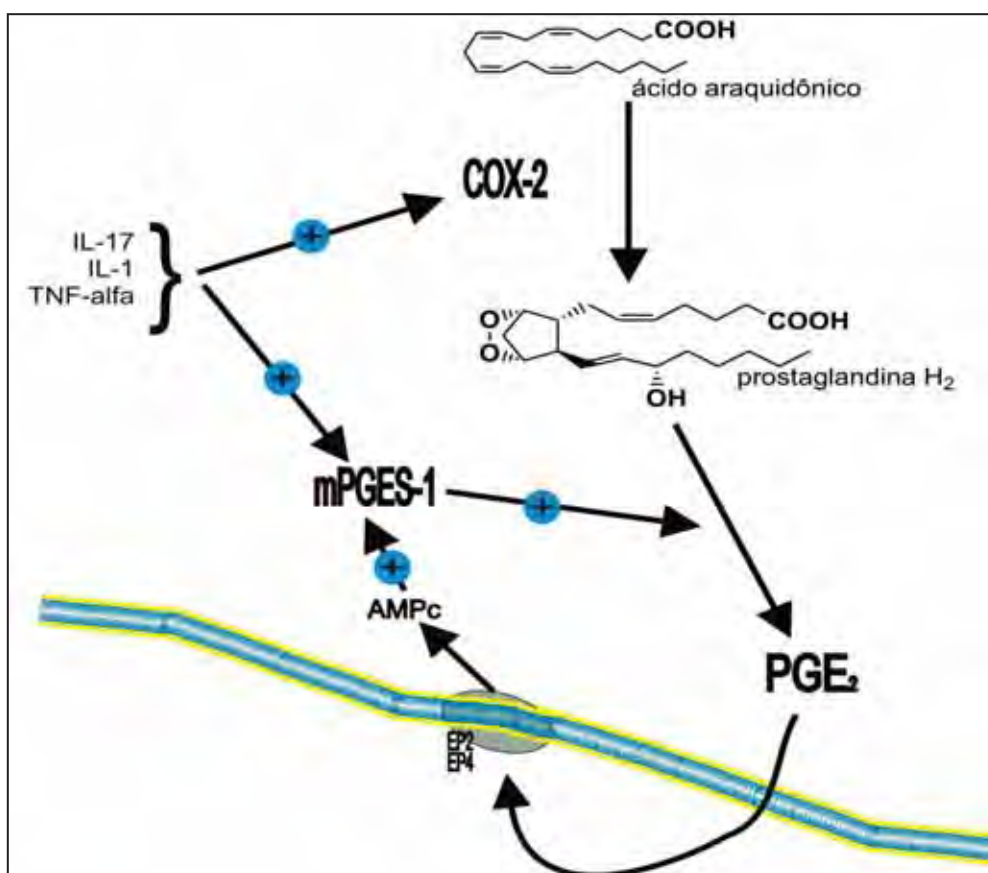


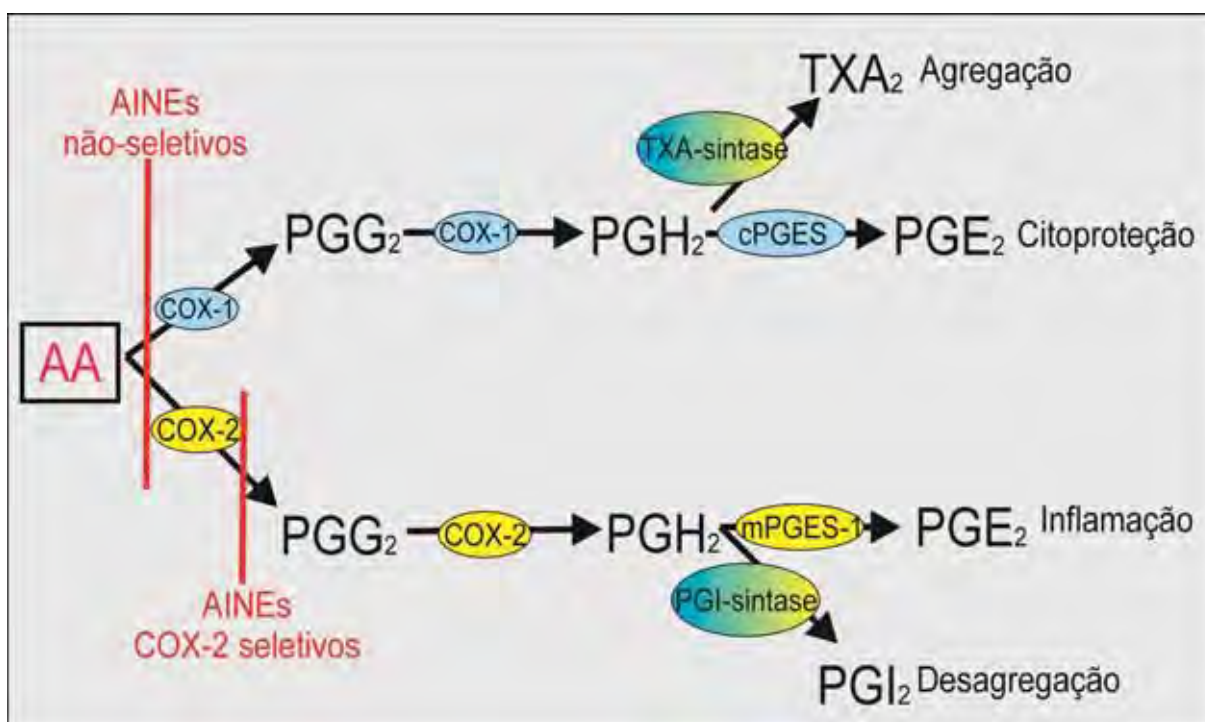
Figura 2 Retroalimentação positiva da mPGES-1.

Além da COX-2, expressada mais intensamente quando induzida por inflamação, há ainda a COX-1, que a literatura enfatiza ser uma enzima constitutiva altamente expressa nos tecidos e células dos mamíferos (CHANDRASEKHARAN; SIMMONS, 2004; MCGEER; MCGEER, 2007).

Essas enzimas são o alvo de inibição da maioria dos AINEs (Figura 3). A COX possui pelo menos três isoformas que diferem na expressão tecidual e localização intracelular (GALANAKIS et al., 2004; FIRUZI; PRATICO, 2006). As

isoformas COX-1 e COX-2, já citadas, convertem metabolicamente o AA em  $\text{PGH}_2$  (WALLACE; VONG, 2008). As funções da isoforma COX-3 — variante da COX-1 — têm sido amplamente estudadas, e tem sido relatada uma sensibilidade inibitória desta enzima ao paracetamol e a dipirona, sugerindo que esta seja o alvo central de fármacos analgésicos e antipiréticos (CHANDRASEKHARAN et al., 2002; BOTTING; AYOUB, 2005).

Além da mPGES-1, existe ainda a PGE sintase citossólica (cPGES), que diferente da primeira tem ações relacionadas a manutenção da homeostasia. A cPGES é funcionalmente acoplada a COX-1 para produzir  $\text{PGE}_2$  em níveis basais (LEE et al., 2005).



**Figura 3** Local de inibição de AINEs seletivos e não-seletivos.

Para o entendimento das ações terapêuticas e tóxicas que serão citadas adiante, é necessário esclarecer que nenhuma COX é exclusivamente constitutiva ou indutível. Entretanto pode-se dizer que a COX-1 é mais constitutiva do que indutível e a COX-2 é mais indutível que constitutiva. A atuação constitutiva ou indutível depende de sua localização tecidual ou celular. Desta localização depende também o que será feito da  $\text{PGH}_2$  formada pelas COXs, alguns exemplos podem ser vistos na **Tabela 1** (CHANDRASEKHARAN; SIMMONS, 2004; LEE et al., 2005).

**Tabela 1.** PGs e as células preferenciais de sua formação a partir de PGH<sub>2</sub>.

células	enzima mediadora	PG*
endometriais	PGF-sintase	PGF <sub>2α</sub>
cerebrais	PGD-sintase	PGD <sub>2</sub>
endoteliais, musculares lisas	PGI-sintase	PGI <sub>2</sub>
megacariócito (plaquetas)	TX**-sintase	TXA <sub>2</sub>
neurônios, endoteliais, neutrófilos	PGE-sintase	PGE <sub>2</sub>

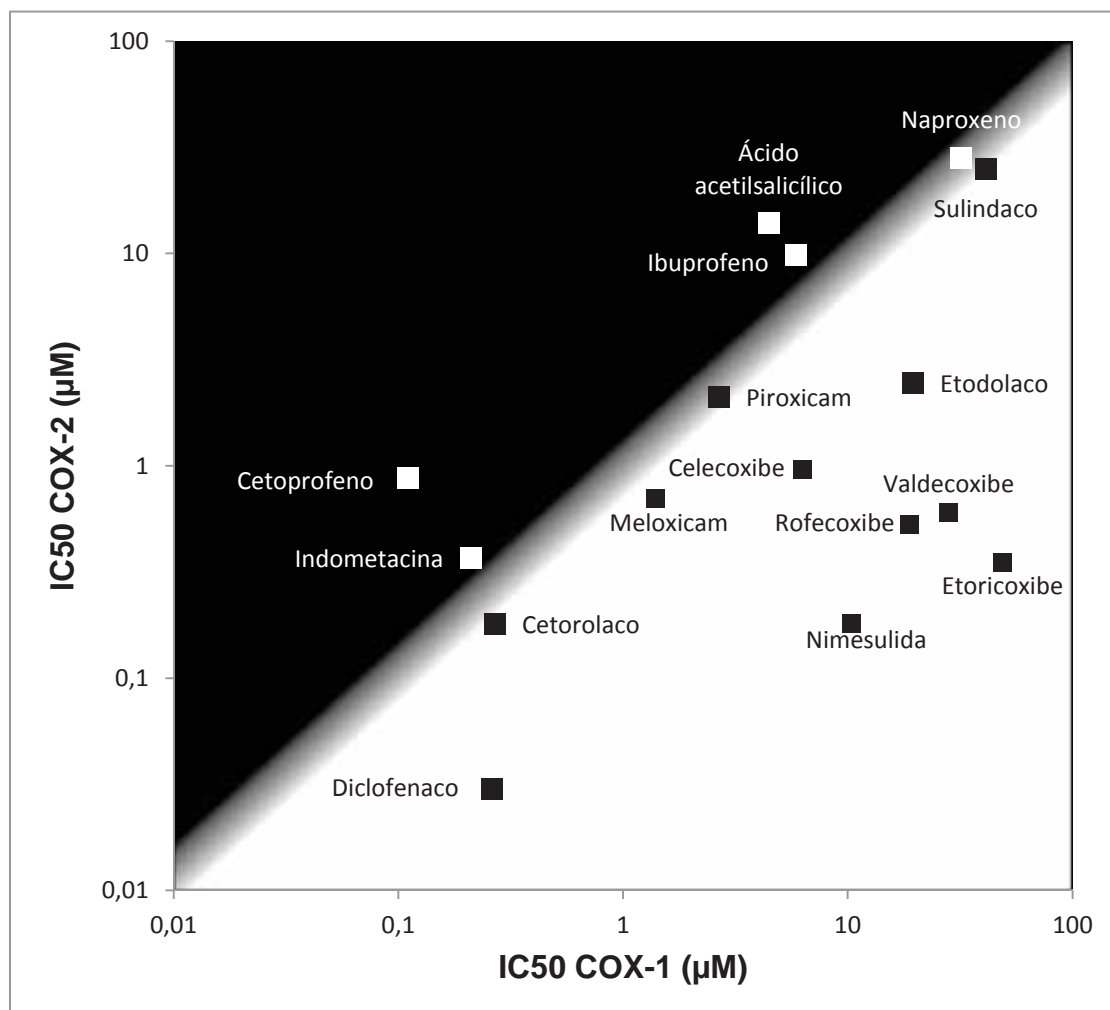
\* PG, Prostaglandina; TX\*\*, Tromboxano.

Na inflamação crônica, como AR e OA, agentes como os AINEs, que reduzem a expressão de PGE<sub>2</sub> pela inibição da COX, são uma boa estratégia para o tratamento (BROOKS; KUBLER, 2006). No entanto o uso crônico (WALLACE, 2008; HALEN et al., 2009) ou em altas doses desses agentes (VONKEMAN; LAAR, 2010), acarretam efeitos tóxicos, principalmente sobre o trato GI, mesmo para AINEs inibidores seletivos de COX-2 (COXIBEs). Em alguns estudos os COXIBEs não mostraram benefícios significativos comparados com AINEs não seletivos (WALLACE, 2008).

Os AINEs, de acordo com sua estrutura química, são classificados em (ZARAGOZA et al., 1995; DOOLEY et al., 2001; ARGOFF, 2002; AHMED et al., 2005):

- Salicilatos, que incluem o ácido acetilsalicílico e o diflunisal;
- Indolacetatos, como a indometacina, o sulindaco e o etodolaco;
- Fenilacetatos, por exemplo o diclofenaco e o aceclofenaco;
- Pirrolacetatos, onde se enquadra o cetorolaco;
- Propionatos, como ibuprofeno, naproxeno e cetoprofeno; e
- Enolatos, piroxicam e meloxicam.

Em um ensaio onde foi medido quanto de COX-1 era inibido pela dose que produziu inibição de 80% da COX-2, o meloxicam e etodolaco, assim como a nimesulida e o celecoxibe, mostraram uma seletividade de 5 a 50 vezes para a COX-2, já o rofecoxibe mostrou uma seletividade acima de 50 vezes. (RANG et al., 2003).



**Figura 4** Relação entre a concentração de alguns fármacos, necessária para inibição de 50% (IC<sub>50</sub>) de COX-1 e COX-2, ensaio em sangue total, onde é medida a síntese de TXB<sub>2</sub> para atividade COX-1 e PGE<sub>2</sub> para atividade de COX-2 (CRYER; FELDMAN, 1998; CHAN et al, 1999; USHIYAMA et al., 2008).

Os COXIBEs foram desenvolvidos com base na hipótese de que os efeitos adversos dos AINEs não seletivos estavam relacionados exclusivamente com a inibição da COX-1. Assim, houve grande expectativa de que fármacos inibidores seletivos da COX-2 possuissem potente efeito anti-inflamatório (FIRUZI; PRATICO, 2006) com redução dos efeitos adversos. No entanto essa inibição seletiva possui também seus efeitos deletérios (PRASIT et al., 1999; WALLACE; VONG, 2008).

Não há um nível específico de definição da seletividade à COX-2 (**Figura 4**), já que a avaliação de seletividade, realizada pelas companhias farmacêuticas, é feita *in vitro*, por tratarem-se de ensaios rápidos e simples. Porém esses ensaios não

necessariamente refletem a complexidade da interação fármaco-enzima *in vivo* (FITZGERALD; PATRONO, 2001).

O celecoxibe é um inibidor seletivo da COX-2 que, em variados ensaios *in vitro*, mostrou ter de 155 a 3200 vezes maior seletividade pela COX-2 que pela COX-1. A estrutura do celecoxibe possui um grupo sulfonamida, o qual se liga a uma “bolsa” lateral da COX-2 que não está presente na COX-1, conferindo-lhe sua seletividade. Já o rofecoxibe tem uma seletividade por COX-2 em relação a COX-1 acima de 800 vezes, mas foi retirado do mercado. Outros COXIBEs lançados após os dois supracitados incluem valdecoxibe, etoricoxibe, parecoxibe (cujo metabólito ativo é o valdecoxibe), deracoxibe e o lumiracoxibe (HILÁRIO et al., 2006; FUNK; FITZGERALD, 2007; RAMALHO et al., 2009).

## 2.2 Toxicidade

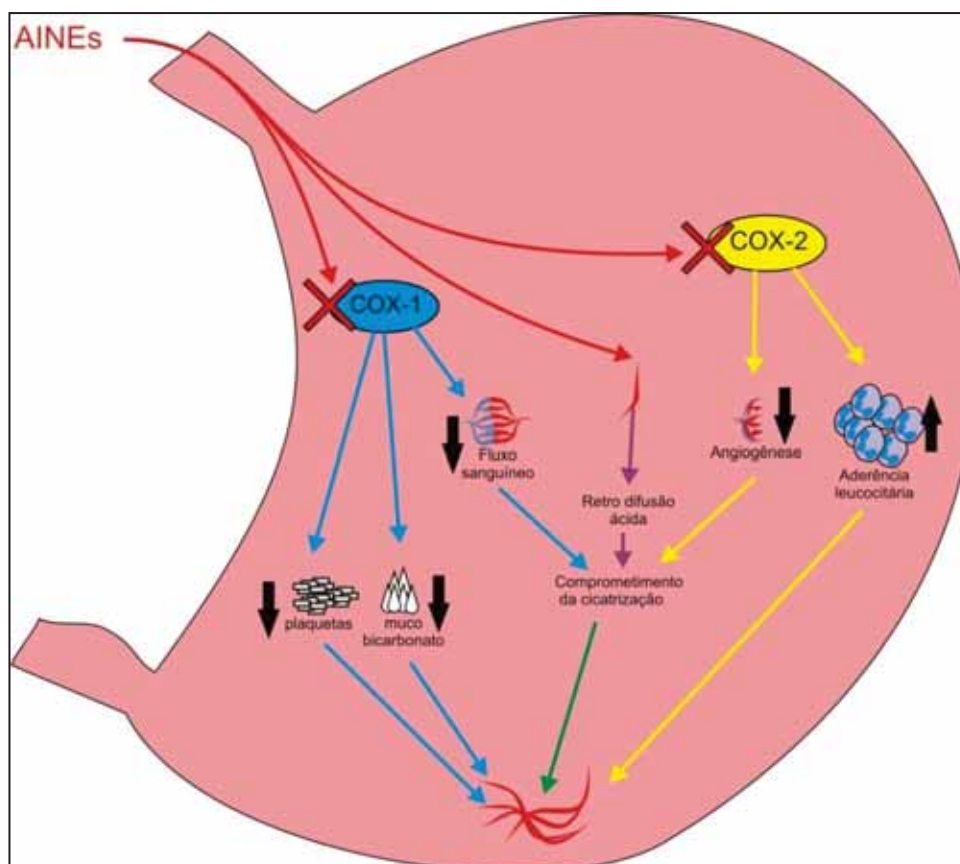
A toxicidade dos AINEs, assim como sua eficácia, é devida a inibição das enzimas COX (DAJANI; ISLAM, 2008). À inibição da COX-2 têm-se atribuído os efeitos analgésicos e anti-inflamatórios de AINEs, enquanto à inibição da COX-1 provavelmente estão relacionados os efeitos colaterais sobre o trato gastrointestinal (FENDRICK; GREENBERG, 2009). Os AINEs são a segunda causa mais comum de úlceras pépticas, com 15 a 35 % dos casos; a primeira é a infecção por *Helicobacter pylori* (GALANAKIS et al., 2004; TSUMURA et al., 2007).

Tugwell e colaboradores (2004) realizaram um estudo com 311 pacientes com evidência radiológica de osteoartrite de joelho tratados com diclofenaco sódico (50 mg) por via oral durante 12 semanas e constataram que em 48% destes pacientes houve manifestação de efeitos adversos sobre o trato digestório, tais como dor abdominal (22%), dispepsia (26%), diarreia e flatulência (17%), náuseas (11%), constipação (10%), melena e vômitos (2%).

Há mecanismos que justificam a toxicidade dos AINEs sobre a mucosa gástrica, um deles é o contato direto em consequência da natureza ácida dos fármacos. Além deste, é proposto que a presença de altas concentrações plasmáticas de AINEs inibe a atividade da COX-1, com consequente diminuição da produção de PGs (WALLACE; CIRINO, 1994; CHEN et al., 2009).

As  $PGE_2$  e  $PGI_2$ , derivadas principalmente da COX-1, podem inibir a secreção ácida e estimular a secreção de muco e bicarbonato no estômago e no trato GI como um todo. Essas PGs podem também reduzir a permeabilidade epitelial, reduzindo a retro difusão ácida e melhoram o fluxo sanguíneo que facilita a restituição epitelial (WALLACE, 2001; WALLACE, 2008; CHEN et al., 2009).

Contudo, em circunstâncias em que a integridade da mucosa está alterada, a COX-2 contribui significativamente para a defesa e reparo. Nessa situação sua supressão induz a diminuição da angiogênese, importante no reparo epitelial, e aumento da aderência neutrofílica ao endotélio vascular da microcirculação GI, que resulta em obstrução física do fluxo sanguíneo e em liberação de proteases e radicais livres derivados de oxigênio, levando a gastropatia dos AINEs. Portanto uma inibição seletiva da COX-2, enquanto poupa grande parte da PG benéfica à mucosa (derivada da COX-1), também aciona um evento chave na patogênese da gastropatia causada por AINEs (WALLACE et al., 1990; WALLACE, 2008; WALLACE; VONG, 2008).



**Figura 5** Ulcerogênese por AINEs, por ação direta devido a natureza ácida do fármaco e sistêmica por inibição da COX.

Nem sempre que a síntese de prostaglandinas é suprimida há subsequente ulceração, no entanto essa supressão deixa a mucosa mais suscetível a efeitos danosos de agentes luminiais como a pepsina, ácidos, etanol e até mesmo os próprios AINEs, facilitando o mecanismo de ação tóxica direta na mucosa ou efeito local (WALLACE, 2008).

Efeitos cardiovasculares têm sido citados como efeito adverso dos COXIBES, pois a inibição específica da COX-2 resulta em produção reduzida de PGI<sub>2</sub> pelo endotélio cardiovascular, que pode contribuir para um aumento no risco de trombose (FENDRICK; GREENBERG, 2009), já que essa produção é mediada pela COX-2. PGI<sub>2</sub> é um inibidor da agregação plaquetária e vasodilatador, que tem função moduladora da interação entre plaquetas ativadas e a parede endovascular (VONKEMAN; LAAR, 2010).

O mecanismo mais frequentemente mencionado para essa toxicidade cardiovascular dos AINEs, inclusive COXIBEs, fica evidenciado relacionando a redução da PGI<sub>2</sub> com a não redução nos TXA<sub>2</sub>, cuja produção é dependente da COX-1. Os TXA<sub>2</sub> contribuem para a agregação plaquetária e vasoconstrição, efeitos explicitamente contrários aos da PGI<sub>2</sub> (DAJANI; ISLAM, 2008).

Os efeitos são temporários e reversíveis, conseqüentemente, somente a administração contínua de altas doses de AINEs não seletivos inibe a COX-1 e a COX-2 consideravelmente. Contudo, em síndromes clínicas associadas à ativação plaquetária, há um aumento na expressão de COX-2 por células endoteliais em uma tentativa de manter a homeostasia. Nesta situação, a inibição da COX por qualquer AINE, mas especialmente por COXIBEs, pode levar a um aumento no risco para eventos cardiovasculares (WALLACE; VONG, 2008; VONKEMAN; LAAR, 2010).

Quanto à nefrotoxicidade, especialmente no uso crônico (CURRY et al., 2005), ocorre potencialmente tanto em AINEs não seletivos quanto COXIBEs. Pois aparentemente a COX-1 e COX-2 estão presentes constitutivamente nos rins, onde sua inibição reduz especialmente PGE<sub>2</sub>, que promove diminuição na reabsorção de sódio na alça de Henle, e PGI<sub>2</sub>, que estimula a liberação de renina, para reabsorção de sódio e secreção de potássio no néfron distal. Os efeitos adversos poderão se manifestar com aumento de peso do paciente, hipertensão ou edema periférico, pela retenção de sódio causada por inibição de PGE<sub>2</sub>. Já a inibição da PGI<sub>2</sub> pode resultar

em hipercalemia e falha renal aguda (PERAZELLA; ERAS, 2000; SÜLEYMAN et al., 2007; TAKEMOTO et al., 2008).

A hepatotoxicidade, por sua vez, é rara e mesmo para o AINE mais hepatotóxico, o bromofenaco, a frequência de lesão hepática clinicamente significativa é muito baixa e impossível de avaliar dentro de ensaios clínicos. Embora a hepatotoxicidade seja rara, o extenso uso dos AINEs contribui consideravelmente para o aparecimento de lesões hepáticas causadas por medicamentos. A lesão hepática associada à AINEs é seis a nove vezes mais frequente em pacientes em tratamento simultâneo com outros fármacos potencialmente tóxicos ao fígado (TEOH; FARRELL, 2003; AITHAL; DAY, 2007).

O Sulindaco é o AINE mais associado à hepatotoxicidade com dano colestático – inibição ou interrupção do fluxo biliar - que provavelmente ocorre por inibição competitiva da bomba canalicular de transporte dos sais biliares. A nimesulida é outro AINE altamente associado a problemas hepáticos, o mecanismo é desconhecido, mas tem sido evidenciada necrose centrolobular. As lesões do ibuprofeno são hepatocelulares e colestáticas, contudo os relatos são raros (AITHAL; DAY, 2007).

Para o amplamente utilizado diclofenaco – paradigma da hepatotoxicidade idiossincrática - as reações adversas são relativamente raras e de baixo risco, mas potencialmente sérias. Os danos podem ocorrer por um metabólito reativo e por formação de um aduto – a partir do metabólito – com toxicidade direta e/ou mediada por reação imune ou inflamatória; pode ainda ocorrer interação dos metabólitos com oxigênio e subsequente dano mitocondrial mediado por espécies reativas de oxigênio e com proteínas – transportadoras, enzimas e receptores – levando a citotoxicidade e colestase (AITHAL; DAY, 2007; STIRNIMANN et al., 2010; GÓMEZ-LÉCHON et al., 2010).

Os danos hepáticos não são exclusividade dos AINEs não seletivos, ocorrendo também com os COXIBEs, como o rofecoxibe e o mais difundido, celecoxibe (CARRILLO-JIMENEZ; NUMBERGER, 2000; GALAN et al., 2001; HUSTER et al, 2002; HARSCH et al, 2003; CHAMOULARD et al., 2005).



### 2.3 Latenciação e Pró-fármacos

Como definição geral os pró-fármacos são agentes terapêuticos inativos *per se*, que dentro do organismo são transformados em um ou mais metabólitos ativos (ETTMAYER et al., 2004) ou derivados latenciados biorreversíveis de fármacos que sofrem uma transformação enzimática ou química *in vivo* para converter-se no fármaco matriz ativo e exercer a atividade farmacológica (RAUTIO et al., 2009). A importância dessas duas definições dar-se-á pela necessidade de englobar moléculas que se transformam *in vivo* em estruturas que jamais foram, para ter atividade, e moléculas de ação conhecida que são inativadas propositalmente para, apenas *in vivo*, voltarem a ser ativas.

Essa abordagem permite vencer barreiras da terapêutica como a baixa hidrossolubilidade, instabilidade química, absorção oral insuficiente, alto metabolismo de primeira passagem, acesso insuficiente ao SNC, toxicidade, irritação local e atividade inespecífica. A melhoria de propriedades dos fármacos através da latenciação confere direitos de exploração comercial da nova estrutura química por mais um período determinado pela respectiva patente (RAUTIO et al, 2008; HSIEH et al, 2009; TESTA, 2009).

Os pró-fármacos tem aplicabilidade no desenvolvimento de AINEs com menor dano ao trato GI por meio do mascaramento do grupo ácido como meio para reduzir ou eliminar a gastrotoxicidade que ocorre por ação local (IMAI et al., 1993; MISHRA et al., 2008). A principal estratégia compreende uma derivatização do grupo ácido carboxílico, levando a formação de ésteres e amidas (HALEN et al., 2009).

Em um estudo de 1980, Cioli e colaboradores obtiveram resultados mostrando que o AF 2259 – um pró-fármaco éster de guaiacol e ibuprofeno – foi capaz de reduzir a toxicidade gastrointestinal do ibuprofeno; equimolarmente, a dose ulcerogênica de AF 2259 foi duas vezes maior que a de ibuprofeno, enquanto a dose efetiva em edema e febre foi a mesma.

Derivados glicerídicos de aspirina mostraram manutenção da atividade sistêmica da aspirina sem causar lesões, já os mesmos derivados de indometacina aumentaram o índice terapêutico da indometacina em 2,5 a 3 vezes (PARIS et al., 1979; PARIS et al., 1980).

Ésteres 2-formilfenil de indometacina, cetoprofeno e ibuprofeno foram mais potentes como agentes anti-inflamatórios que os fármacos matriz no ensaio de edema de pata de rato induzido por carragenina. Em teste de hidrólise química neutra e alcalina os ésteres liberaram o AINE e o acilfenol (ABORDO et al., 1998).

Ainda com a indometacina, n-butil ésteres e n-octil ésteres não apresentaram toxicidade gastrointestinal e nem dano hepático, ao contrário do que ocorreu na administração de indometacina isolada (OGISO et al., 1996). Já ésteres 1-etilazacicloalcan-2-ona mostraram atividade analgésica e anti-inflamatória com diminuída irritação gástrica quando comparados a indometacina (BONINA et al., 1997).

Por uma rota sintética simples, Jung e colaboradores (2000) prepararam um conjugado de ácido 5-aminosalicílico e glicina cólon específico. Após a administração oral desse pró-fármaco, a molécula matriz e o metabólito ativo ácido n-acetil-5-aminosalicílico tiveram recuperação fecal maior que a da sulfassalazina, que é o mais comumente prescrito pró-fármaco de ácido 5-aminosalicílico.

Pró-fármacos ésteres glicolamídicos de ácido 6metoxi-2-naftilacético (6-MNA) foram rapidamente convertidos a 6-MNA em plasma humano a 37°C e pH 7,4. Ésteres glicolamídicos N,N-dissubstituídos, que foram quimicamente mais estáveis, se mostraram menos estáveis a enzimas plasmáticas que os monosubstituídos ésteres glicolamídicos (WADHWA;SHARMA, 1994).

Mahfouz e colaboradores (1999) sintetizaram pró-fármacos ésteres de aspirina, ibuprofeno, naproxeno e indometacina, usando N-hidroximetilsuccinimida e N-hidroximetilisatina como carreadores, que reduziram a toxicidade gastrointestinal dos fármacos matriz. Contudo ésteres glicolamídicos de ibuprofeno, que mantiveram atividade analgésica e anti-inflamatória comparável ao ibuprofeno, não exibiram redução na ulcerogenicidade (BANSAL et al., 2001).

Foram sintetizados de diclofenaco, pró-fármacos poliméricos cujos resultados mostraram diminuição estatisticamente significativa no número de úlceras (CHANDRASEKAR et al., 2001).

Mishra e colaboradores (2008) sintetizaram dez pró-fármacos de cetorolaco por amidação com ésteres etílicos de aminoácidos. Todos os derivados apresentaram redução no índice de úlceras com atividades anti-inflamatória e analgésica comparáveis ao cetorolaco.

Têm sido sintetizados também pró-fármacos mútuos. Nesse tipo de pró-fármaco, duas moléculas com atividade farmacológica são ligadas covalentemente, de modo que uma age como carreadora da outra (HALEN et al., 2009). Imai e colaboradores (1993) conjugaram um antagonista de receptores H<sub>2</sub> da histamina com o flurbiprofeno e obtiveram redução no dano gástrico. Kourounakis e colaboradores (2000), embasados na observação de que a melatonina, um antioxidante, mostrou efeito protetor da mucosa gástrica sob ação de indometacina, usaram essa abordagem para sintetizar derivados amídicos de diclofenaco, ibuprofeno e indometacina, ligados a um antioxidante. Estes compostos apresentaram boa atividade anti-inflamatória e antioxidante com diminuída ulcerogenicidade.

Como visto, são várias as estratégias e os objetivos do uso da obtenção de um pró-fármaco a partir de um fármaco conhecido, e os resultados são sempre bastante positivos ou pelo menos permitem boas conclusões para novos estudos.

## 2.4 Diclofenaco

O diclofenaco é um AINE planejado com base na avaliação das características estruturais e físico-químicas de AINEs como a fenilbutazona, ácido mefenâmico, ibuprofeno e a indometacina. Entre estas características foram considerados o transporte através das membranas biológicas, estrutura espacial e atômica da molécula, que governa sua adequação ao receptor, e a estrutura eletrônica, a qual controla a interação específica entre fármaco e receptor (SALLMANN, 1985).

Na época de seu planejamento, foi postulado que um agente antirreumático devia satisfazer alguns critérios, como pKa de 4 a 5, um coeficiente de partição de aproximadamente 10 e dois anéis aromáticos, um girado em relação ao outro. Esses objetivos foram alcançados com elementos estruturais que incluem um grupo ácido fenilacético e uma fenila com dois cloros nas posições orto, o que leva a um giro máximo desse anel (SALLMANN, 1985).

O diclofenaco é mundialmente o mais prescrito dos AINEs. Sua ação consiste de uma inibição não seletiva da COX, com um grau moderado de seletividade para a COX-2, em torno de 4 vezes mais no ensaio de concentração inibitória de 80%

(IC80), o que pode contribuir para sua notada tolerabilidade gastrointestinal. Possui ainda menor toxicidade cardiovascular frente aos COXIBES e mínimo efeito na atividade renal e hepática, o que pode lhe dar vantagens sobre outros AINEs (GAN, 2010; PATRONO; ROCCA, 2009; WARNER et al., 1999).

Além do mecanismo de ação por inibição da síntese de PGs, já bem estabelecido, há indícios de outros mecanismos envolvidos na efetividade dos AINEs. Diferenças na potência, eficácia e perfis de segurança viabilizam a possibilidade de outros mecanismos. Para o diclofenaco são sugeridos o antagonismo de receptores prostanoídes de tromboxanos, diminuição da liberação de ácido araquidônico, aumento de sua captação por triglicerídios, inibição de lipoxigenase e ativação da via antinociceptiva de óxido nítrico- guanosina monofosfato cíclico (NO-GMPc). Podem ainda ser incluídos, a redução dos níveis plasmáticos e sinoviais da substância P, antagonismo de  $\gamma$ -receptor ativado por proliferador de peroxissomo, bloqueio de canais iônicos sensíveis a ácido, diminuição da produção de IL-6, antagonismo do receptor de hiperalgesia N-metil-D-aspartato (GAN, 2010).

O diclofenaco está disponível no mercado brasileiro através de pelo menos 25 apresentações farmacêuticas de uso enteral, que incluem soluções e suspensões orais, comprimidos revestidos, cápsulas, comprimidos dispersíveis e supositórios, e ainda de uso injetável e de uso tópico. O diclofenaco sódico, potássico ou colestiramina é utilizado nas formas de uso oral, e o diclofenaco sódico na forma de uso enteral transmucosa. Nas formas de uso tópico, o diclofenaco dietilamônio apresenta-se na forma de gel ou solução (retirado de [http://www4.anvisa.gov.br/BularioEletronico/default.asp?txtPrincipioAtivo=DICLOFENACO&txtMedicamento=&txtEmpresa=&HidLetra=&HidTipo=normal&vOrdem=&tp\\_bul a=&vclass=&pagina=1](http://www4.anvisa.gov.br/BularioEletronico/default.asp?txtPrincipioAtivo=DICLOFENACO&txtMedicamento=&txtEmpresa=&HidLetra=&HidTipo=normal&vOrdem=&tp_bul a=&vclass=&pagina=1) acessado em 28 de fevereiro 2012).

O diclofenaco, tanto em seu sal sódico quanto potássico, é indicado para dor aguda e crônica e para os sintomas da artrite reumatoide e da osteoartrite. A área sob a curva em humanos é de 1429 e 1309 ng.h/mL para diclofenaco sódico e potássico, respectivamente. A concentração máxima também não é muito discrepante, com 1417 ng.h/mL para o diclofenaco sódico e 1312 ng.h/mL para o diclofenaco potássico. A principal diferença entre esses dois sais é o tempo em que ocorrem as concentrações máximas, 2,22 h e 1,00 h para diclofenaco sódico e

potássico respectivamente (GAN, 2010). A meia-vida se mantém em um curto alcance, com média de 0,8 h para o diclofenaco potássico (HINZ et al., 2004) e média de 1,4 h para o diclofenaco sódico (LILL et al., 2000).

A absorção do diclofenaco é rápida, mas pode ser retardada pela administração com alimentos, contudo a extensão da absorção não é afetada. A faixa concentração máxima após um único comprimido de revestimento entérico de 50mg é de 1,4 a 3,0 µg/mL. A biodisponibilidade é de cerca de 50% e a ligação a proteínas plasmáticas de 99%. Após administração oral ocorre acúmulo no líquido sinovial, o que está diretamente relacionado com o efeito terapêutico. O metabolismo é mediado por CYP 2C9 e 3A4, sendo responsável por praticamente 100% da eliminação do fármaco. Os metabólitos são 65% excretados na urina e 35% na bile (TANG, 2003; BRUNTON et al., 2006, p. 1794; BURKE et al., 2006).

O *clearance* em humanos é de 4,2 mL/min.kg (BRUNTON et al., 2006, p. 1794), sendo o débito cardíaco em humanos de aproximadamente 80,3 mL/min.kg, a taxa de extração do diclofenaco é de 0,05. Essa taxa de extração corporal permite considerar o *clearance* do diclofenaco como baixo (TOUTAIN; BOUSQUET-MÉLOU, 2004a). Em ratos, Kim e colaboradores (2009) publicam um *clearance* de 13,6 mL/min.kg, cuja taxa de extração é 0,06, portanto próximo dos valores em humanos.

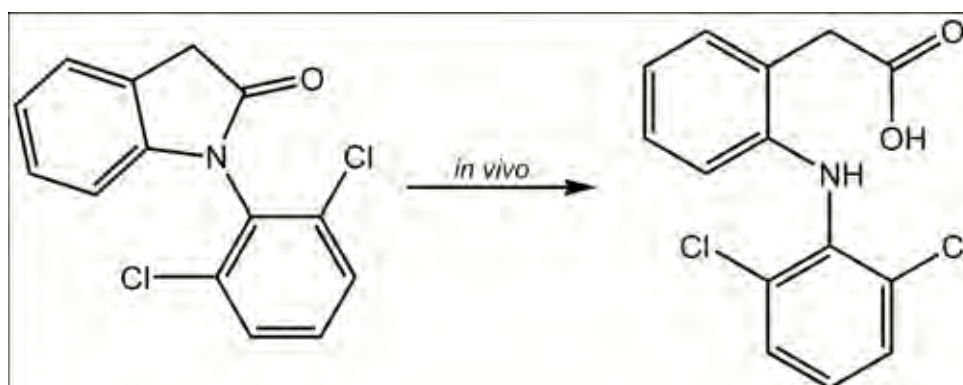
O perfil farmacocinético favorável, associado a sua efetividade tem mantido o uso terapêutico do composto, a despeito da toxicidade gastrointestinal e da introdução de novos AINEs no mercado. O desenvolvimento de um pró-fármaco para diminuir esta toxicidade gastrointestinal (KOUROUNAKIS et al., 2000; CHANDRASEKAR et al., 2001; JIAO et al., 2007; RIBEIRO et al., 2007; NEMMANI et al., 2009;) ou, ainda, para uma liberação sustentada (HUSSAIN et al., 2011) pode trazer vantagens adicionais à aplicação do composto na terapêutica.

## 2.5 DICCIC

O composto DICCIC foi sintetizado de acordo com procedimento previamente descrito por Chung e colaboradores (2009).

No planejamento estrutural do DICCIC se utilizou da estratégia da latenciação de fármacos, visando reduzir os efeitos gastroulcerativos do diclofenaco. A função química ácido carboxílico presente no diclofenaco foi transformada em uma lactama.

Esta última, mediante reação química ou enzimática poderia novamente liberar a função ácido carboxílico, e sofrendo biotransformação no fármaco ativo (**Figura 6**).



**Figura 6** O DICCCIC é convertido a diclofenaco *in vivo*, regenerando a função ácido carboxílico.

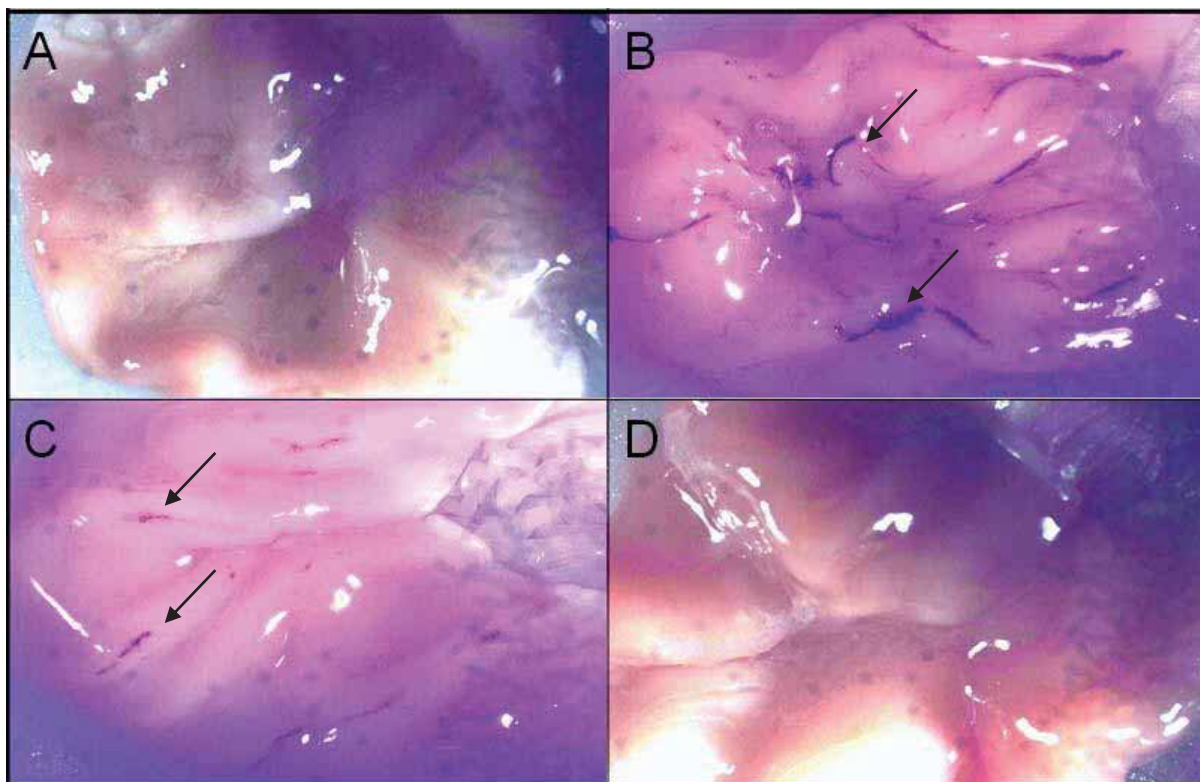
O DICCCIC se mostrou estável frente à hidrólise química (pH 1,2 e 7,4) e frente à hidrólise enzimática em plasma humano (10 µg/mL), ambos observados por um período de 24 horas (CHUNG et al., 2009).

Entre as avaliações farmacológicas, foram realizados ensaios de inibição de edema de pata de rato induzido por carragenina para avaliar a atividade anti-inflamatória, inibição de contorções induzidas por ácido acético em camundongos e ensaio de ulcerogenicidade em ratos (CHUNG et al., 2009).

No ensaio para avaliação da atividade anti-inflamatória, o DICCCIC apresenta atividade estatisticamente significativa em relação ao grupo que não recebeu anti-inflamatório (apenas carragenina) na terceira hora. A partir da quarta hora, tanto o DICCCIC quanto o diclofenaco mostram atividade estatisticamente significativa até final do experimento. Observa-se que as atividades anti-inflamatórias de DICCCIC e de diclofenaco não são estatisticamente significativas sendo comparáveis (CHUNG et al., 2009).

A atividade antinociceptiva usando modelo de contorção abdominal induzida por ácido acético foi avaliada e o resultado foi expresso como porcentagem de inibição, ou seja, considerando que o grupo controle recebeu apenas veículo exibiu 100% de contorções. Assim as atividades do DICCCIC e do diclofenaco foram determinadas como percentual de proteção. O DICCCIC e o diclofenaco apresentaram 48,1% e 65,2% de proteção, resultados que foram significativamente diferentes do controle. Entretanto a atividade antinociceptiva do diclofenaco foi estatisticamente significativa em relação ao DICCCIC (CHUNG et al., 2009).

Na avaliação do efeito ulcerogênico induzido pelas substâncias diclofenaco, celecoxibe e DICCIC encontrou-se que diclofenaco induziu a formação de uma média de 69 úlceras, enquanto o celecoxibe induziu 6 úlceras e o DICCIC não demonstrou neste experimento capacidade em induzir úlceras estomacais. Os resultados de DICCIC e celecoxibe foram estatisticamente significativos comparados com o grupo que recebeu diclofenaco. Na **Figura 7** podem ser observadas imagens das mucosas estomacais. Como pode ser visto apenas os grupos controle negativo (carboximetilcelulose sódica, 0,5% m/v<sup>1</sup>) e DICCIC não apresentam lesões da mucosa gástrica (CHUNG et al., 2009).



**Figura 7** Ulcerogenicidade das substâncias em ratos. A) controle carboximetilcelulose sódica (0,5% m/v)<sup>1</sup>; B) diclofenac; C) celecoxibe; e D) DICCIC (CHUNG et al., 2009).

Portanto o DICCIC apresenta várias vantagens, como um procedimento de síntese fácil, estabilidade química e em plasma, atividade antinociceptiva, atividade anti-inflamatória comparável ao diclofenaco e não causa gastroulceração. Isso o torna uma possível alternativa terapêutica nas situações em que são utilizados AINEs.

<sup>1</sup> Errata: o veículo controle é carboximetilcelulose sódico 0,5% m/v.

## 2.6 Farmacocinética

O efeito biológico de um fármaco em uma proteína alvo, não é o único quesito *sine qua non* no objetivo de alcançar o benefício terapêutico de um fármaco. Pois antes de alcançar essa proteína *in vivo*, há uma cadeia de eventos, um ciclo vital, dentro do organismo. Esse ciclo compreende fenômenos como a absorção para a corrente sanguínea, a distribuição para o tecido e sua degradação por metabolismo ou excreção através de fígado e rins (HUISINGA et al., 2006). A farmacocinética é o estudo da relação entre o tempo e a concentração do fármaco, e seus metabólitos ativos, no corpo. Esse estudo envolve princípios fundamentais de cinética química, fisiologia e bioquímica (TOZER, 1981).

Clinicamente, os mais importantes parâmetros farmacocinéticos de um fármaco são a meia-vida ( $t_{1/2}$ ), volume de distribuição (Vd), o *Clearance* (Cl) e, ainda, biodisponibilidade (F). A  $t_{1/2}$ , como um híbrido de Cl e Vd, é clinicamente a base da frequência da dose, já a biodisponibilidade, que sofre interferência da absorção e do Cl, é o guia da quantidade da dose (PELKONEN et al., 2011).

O Cl, volume de sangue livre de fármaco por unidade de tempo, não é o mais relatado dos parâmetros farmacocinéticos nas publicações científicas, mas é o mais importante de todos eles, devido a sua influência tanto na quantidade a ser administrada quanto na frequência (TOUTAIN; BOUSQUET-MÉLOU, 2004a).

A  $t_{1/2}$ , tempo necessário para que a concentração plasmática diminua pela metade, é o parâmetro do perfil farmacocinético mais frequentemente publicado, devido à relativa facilidade na sua determinação e a dificuldade de se determinar outros parâmetros em algumas situações, como na cinética de metabólitos. Esse parâmetro é dependente da constante de eliminação ( $k_{el}$  ou  $\beta$ ), inclinação do decaimento das concentrações plasmáticas na fase terminal (TOUTAIN; BOUSQUET-MÉLOU, 2004b).

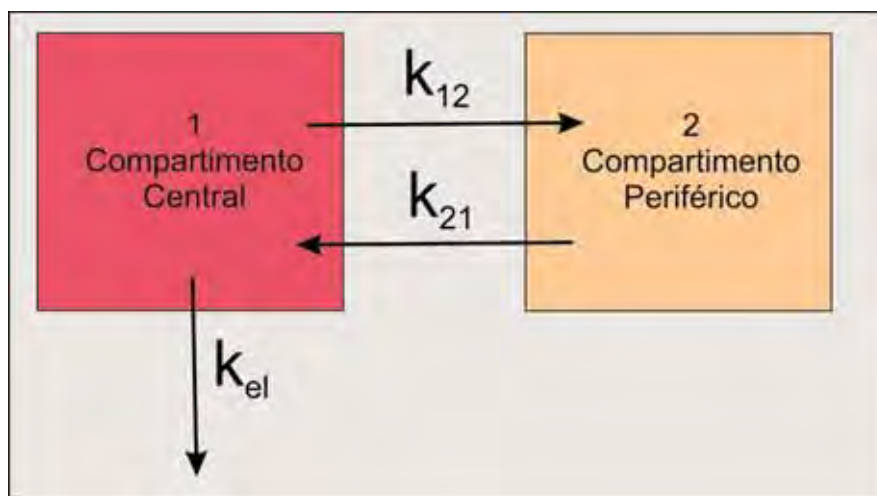
Dentre esses parâmetros de maior importância, o Vd, volume extravascular que conteria o fármaco na mesma concentração observada no plasma, é facilmente compreendido. Contudo, pela possibilidade de haver até três - volume do compartimento central ( $Vd_c$ ), volume calculado pelo método da área ( $Vd_{\text{área}}$ ) e o



volume no estado de equilíbrio ( $Vd_{ss}$ ) – pode parecer difícil a diferenciação entre eles (TOUTAIN; BOUSQUET-MÉLOU, 2004c).

A biodisponibilidade (F) é a fração da dose administrada de fármaco que fica sistemicamente disponível. O F mais comumente publicado é referente a via oral, ou seja, a fração de uma dose administrada pela via oral que fica sistemicamente disponível, considerando uma administração intravenosa como a unidade. Para cada via de administração pode haver uma biodisponibilidade. (PELKONEN et al., 2011)

Em função dos resultados experimentais de disposição do fármaco no organismo um modelo monocompartimental, bicompartimental ou tricompartmental é adaptado a esses resultados. Essa decisão leva em consideração as velocidades de decaimento presentes na curva de concentração por tempo. Por exemplo, se a curva possui duas velocidades de decaimento, têm-se um modelo bicompartimental (**Figura 8**). Então outros parâmetros podem ser calculados, como a constante de distribuição ( $k_a$  ou  $\alpha$ ) e as microconstantes de transferência do fármaco entre o compartimento central e o periférico ( $k_{12}$ ,  $k_{21}$ ) (TANG et al, 2011).



**Figura 8** Pictograma representativo de um modelo bicompartimental.

As principais razões que impedem fármacos de chegar ao mercado são as dificuldades farmacocinéticas e de toxicidade (50%) e a falta de eficácia (29%). A taxa de falha devido a problemas farmacocinéticos e de toxicidade podem ser maiores que as relatadas, pois propriedades farmacocinéticas inapropriadas, tais como, baixa absorção oral, distribuição desfavorável, excreção e metabolismo rápidos ou toxicidade induzida pelo fármaco, podem ser clinicamente manifestadas como uma baixa eficácia (GRASS; SINKO, 2002).

## 2.7 Desenvolvimento de novos Fármacos e a Farmacocinética

A pesquisa de novos fármacos pode ser dividida em duas fases: descoberta e desenvolvimento. A descoberta compreende, resumidamente, a síntese e a caracterização biofarmacêutica e físico-química, enquanto o desenvolvimento possui duas subdivisões principais, os desenvolvimentos pré-clínico e o clínico do fármaco. A Farmacocinética em modelos animais se insere no desenvolvimento pré-clínico (PANCHAGNULA; THOMAS, 2000).

Os modelos *in vitro* são utilizados para prever os fenômenos farmacocinéticos em humanos, dos quais podem ser citadas: as linhagens celulares caco-2 e MDCK (Madin-Darby canine kidney), cromatografia de membrana artificial imobilizada e o ensaio de permeação em membrana artificial paralela, como modelos de absorção oral; e os sistemas microssomais hepáticos, fatias de fígado, enzimas expressadas por DNA complementar ou hepatócitos, como modelos de metabolismo. Entretanto, há casos em que a predição da farmacocinética em humanos a partir de modelos *in vitro* parece ser difícil devido a lacunas na correlação *in vitro/in vivo* (SMITH; WATERBEEMD, 1999; WHITE, 2000; RUIZ-GARCIA et al., 2008).

A natureza não fisiológica dos sistemas *in vitro* e a complexidade da farmacocinética *in vivo* limita as predições quantitativas e qualitativas frente ao metabolismo em humanos a partir desses sistemas *in vitro*. A farmacocinética, como fator de importância na decisão da continuidade ou não de um fármaco no desenvolvimento, é determinante para a probabilidade de sucesso na pesquisa farmacêutica e deve ser avaliada tanto quanto possível (MASIMIREMBWA et al., 2003; SINGH, 2006; TANG; LU, 2009).

A triagem para absorção e metabolismo *in vitro* é geralmente feita durante a fase de identificação de substâncias com potencial evidenciado, seguida por estudos de farmacocinética em roedores, preferencialmente no modelo animal no qual se observou o efeito farmacológico. Notada a eficácia *in vivo*, serão necessários mais recursos para examinar a potencialidade dos compostos como candidato a fármaco e investigar o metabolismo mais detalhadamente em microssomas hepáticos, hepatócitos ou enzimas P450 recombinantes, que são sistemas derivados de

humanos. Tem validade, ainda, a avaliação do perfil farmacocinético em modelos animais não roedores. O ideal é que esses estudos sejam realizados em paralelo. Entretanto, a limitação nos recursos leva ao desenvolvimento de um paradigma de triagem de acordo com o projeto de descoberta (JANG et al., 2001).

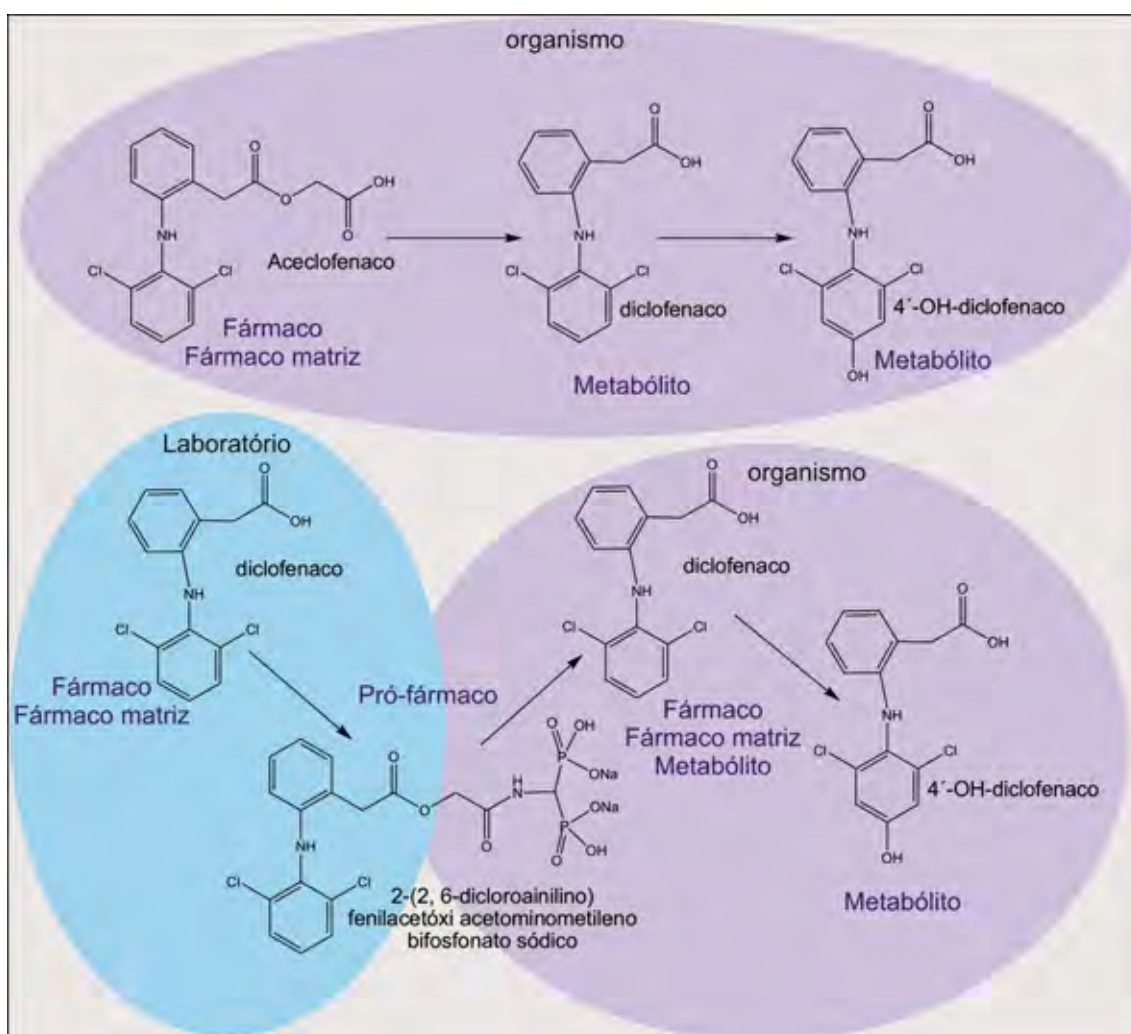
Chiu e colaboradores (1995) apresentam uma explanação não só interessante, mas muito explicativa, da importância da farmacocinética pré-clínica na seleção de compostos de maior potencial na terapêutica. Três compostos, selecionados por sua maior potência e seletividade, antagonistas de receptor da oxitocina, foram avaliados em vários modelos animais. A farmacocinética em ratos, cães e macacos foi desfavorável e observou-se um extenso metabolismo para os compostos II e III no ensaio de incubação em microsomas hepáticos de ratos, cães e macacos Rhesus. Enquanto o composto I mostrou-se mais estável e, assim, este composto (L-368,899) prosseguiu como candidato. A biodisponibilidade oral do composto L-368,899, avaliada em macacos Rhesus, resultou em valores inferiores a 1%. No entanto, em chimpanzés, a biodisponibilidade oral foi entre 13 e 20%, indicando que a baixa biodisponibilidade nos macacos Rhesus não é representativa dos primatas. Assim, o L-368,899 foi selecionado para ensaio clínico de fase I.

Toda estrutura líder que chega a fase pré-clínica tem potencial para chegar a fase clínica. A farmacocinética pré-clínica pode auxiliar na decisão de continuidade ou retrocesso do candidato, os estudos *in vitro* devem ser feitos sempre que possível e os estudos com animais devem ser avaliados com cuidado. Diferenças entre as espécies podem levar ao abandono de uma estrutura que seria boa ou a continuidade de uma estrutura que não é segura.

## **2.8 Farmacocinética e os Metabólitos**

O metabolismo de um fármaco pode gerar produtos farmacologicamente inativos, ativos e/ou produtos de toxicidade relevante ao organismo. Em alguns casos, o metabolismo por alguma rota específica é a chave fundamental para o principal efeito farmacológico ou tóxico de um produto (HOUSTON, 1982), o que se aplica na administração de pró-fármacos (PANG, 1985).

A farmacocinética de metabólitos começa pelo esclarecimento das terminologias usuais neste assunto, isso é necessário devido a existência de denominações relativas e denominações absolutas. O termo metabólito sempre irá se referir a uma estrutura – ativa ou não – resultante de metabolismo. Já o fármaco matriz pode ser tanto um fármaco que foi latenciado a pró-fármaco, quanto um fármaco que foi convertido a metabólito. O pró-fármaco sempre irá se referir a uma estrutura inativa, derivada de um fármaco ativo por síntese em laboratório. A **Figura 9** apresenta um resumo dessas nomenclaturas de acordo com o contexto (HIRABAYASHI et al., 2002; HINZ et al., 2003).



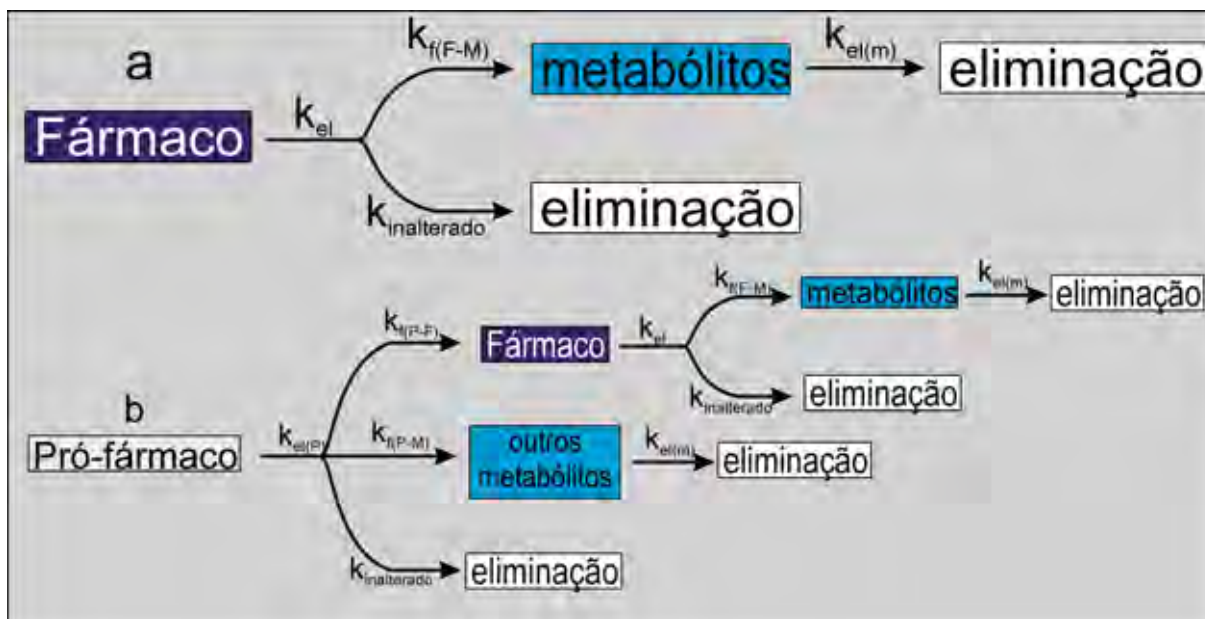
**Figura 9** A terminologia utilizada para se referir a uma estrutura pode variar, de acordo com as suas transformações.

Alguns trabalhos vêm tentando explicar ao máximo a cinética de metabólitos, o que não significa simplificar. A situação mais complicada ocorre com metabólitos tóxicos, de estruturas complexas ou desconhecidas. Nestes casos, a administração intravenosa (IV) no homem, ou modelo animal, não é possível (por exemplo, por impossibilidade sintética) ou não é permitida (por exemplo, por agências regulatórias e comitês de ética). Assim alguns parâmetros farmacocinéticos desses metabólitos não podem ser calculados, como o *clearance* e volume de distribuição, pois necessitam da quantidade administrada (HOUSTON, 1982; ROWLAND; TOZER, 1995; JACKSON et al., 2004).

No desenvolvimento e descoberta de fármacos o estudo dos metabólitos desempenha papel importante, principalmente quando possuem alguma atividade, ajudando a definir, o curso temporal do fármaco no corpo e sua atividade, ou toxicidade geral. No âmbito dos pró-fármacos é essencial a realização de estudos com o metabólito ativo, já que a biotransformação pode alterar a disposição do metabólito (JACKSON et al., 2004; MA et al., 2006; PRAKASH et al., 2007).

A cinética de metabólito pode ser representada por um esquema simples, onde após uma administração IV, um dado fármaco é convertido ao seu metabólito regido por uma constante ( $k$ ) e o metabólito é, em seguida, eliminado sob outra constante ( $k_{(m)}$ ). Algumas vezes pode haver a formação de mais de um metabólito e, neste caso, portanto a constante de eliminação do fármaco será a soma das constantes de conversão para os metabólitos. Ou, ainda, uma fração do fármaco pode ser eliminada inalterada, aumentando mais uma constante ao processo (**Figura 10a**). No caso de um pró-fármaco, seu planejamento é feito para que todo o pró-fármaco seja convertido ao fármaco matriz, entretanto isso pode não ocorrer (**Figura 10b**) (HOUSTON, 1982; ROWLAND; TOZER, 1995; JACKSON et al., 2004).

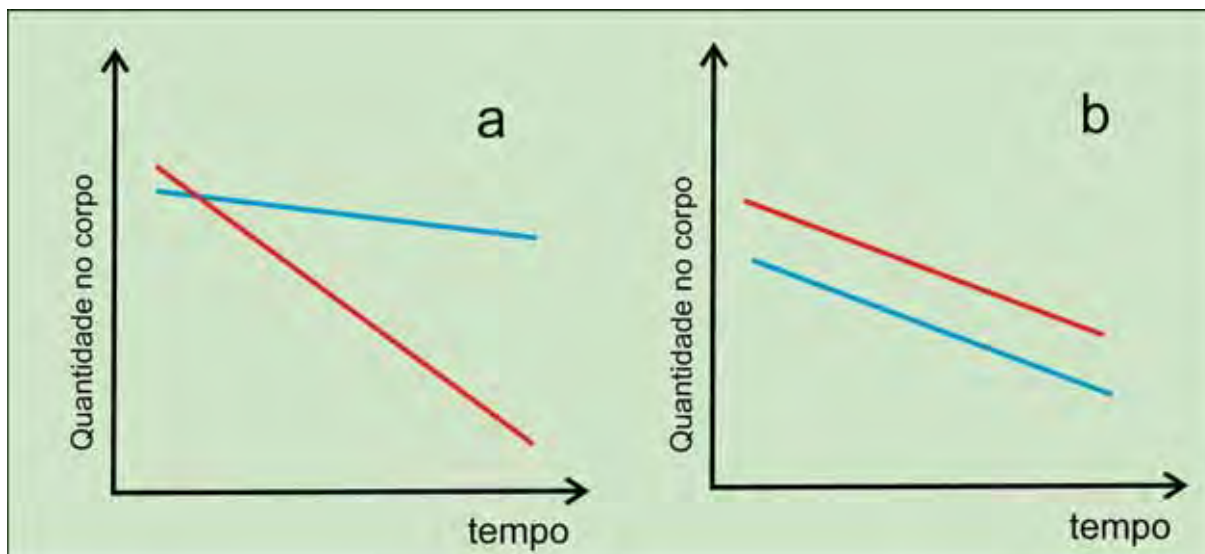
A constante de eliminação do fármaco  $k_{el}$  é a soma das constantes de formação  $k_f$  de metabólito e de eliminação inalterado  $k_{inalterado}$ , já o metabólito possui sua própria constante de eliminação  $k_{el(m)}$ . Um pró-fármaco, por sua vez, deve ser biotransformado a um fármaco ativo sob a constante de formação ( $k_f$ ), este será eliminado sob a constante de eliminação  $k_{el(m)}$ . (HOUSTON, 1982; ROWLAND; TOZER, 1995; JACKSON et al., 2004).



**Figura 10** Caminho de biotransformação e eliminação de um composto. (a) fármaco ativo administrado:  $k_{el}$  é a constante de eliminação do fármaco, que é a soma da constante de formação do metabólito ( $k_{f(F-M)}$ ) e da constante de eliminação do fármaco inalterado ( $k_{inalterado}$ ).  $k_{el(m)}$  é a constante de eliminação dos metabólitos. (b) Pró-fármaco administrado:  $k_{el(P)}$  é a constante de eliminação do pró-fármaco que pode ser igual a constante de formação fármaco ( $k_{f(P-F)}$ ) ou pode ser a soma deste com a constante de formação de outros metabólitos ( $k_{f(P-M)}$ ) e com a constante de eliminação do pró-fármaco inalterado ( $k_{inalterado}$ ). Fármaco e outros metabólitos seguem o mesmo que em (a).

A eliminação de um metabólito pode seguir duas cinéticas distintas, dependendo de sua relação com a eliminação do fármaco matriz (HOUSTON, 1982; ROWLAND; TOZER, 1995; JACKSON et al., 2004):

- Quando  $k_{el}$  é maior que  $k_{el(m)}$ , a concentração do fármaco diminuirá rapidamente e as concentrações do metabólito tendem a se manter elevadas por um período mais prolongado (**Figura 11a**). Nesta situação a  $k_{el(m)}$  expressa graficamente é a constante de eliminação real do metabólito;
- Quando  $k_{el}$  é menor que  $k_{el(m)}$ , a  $t_{1/2}$  de eliminação do fármaco é maior que a do metabólito, e a eliminação do metabólito é limitada pela eliminação do fármaco, ou seja, pela sua formação (**Figura 11b**). Por isso a  $k_{el(m)}$  expressa graficamente é igual a  $k_{el}$ .



**Figura 11** Eliminação de fármaco (linha vermelha) e de metabólito (linha azul), limitada por sua própria eliminação (a) e limitada pela sua formação (b).

Duas outras pressuposições importantes na cinética de metabólitos podem ser de grande importância na avaliação de melhoras no tipo de ligação, carreador ou estrutura do pró-fármaco. São elas (HOUSTON, 1982; ROWLAND; TOZER, 1995; JACKSON et al., 2004):

- que nem todo o fármaco administrado é metabolizado, mas sim uma fração deste ( $f_m$ ), pois uma parte pode ser eliminada pré-sistemicamente e/ou pode ser eliminada inalterada;
- que desta fração ( $f_m$ ) apenas uma parte ficará sistemicamente disponível ( $F_{H(m)}$ ), pois no local de conversão, pode ocorrer uma eliminação do metabólito subsequente a sua formação, ou seja, uma parte jamais atinge a circulação sistêmica.

Os parâmetros farmacocinéticos expressos, ou a avaliação que é feita desse perfil, depende do objetivo de cada trabalho. Assim, uma ampla revisão foi feita com o intuito de determinar que parâmetros deveriam ser calculados para o diclofenaco formado a partir de DICCIC na administração intravenosa.

Hinz e colaboradores (2003) e Kang e colaboradores (2008) estudaram a farmacocinética do aceclofenaco e de três de seus metabólitos, 4-OH aceclofenaco, 4-OH diclofenaco e diclofenaco, em humanos após dose única oral de aceclofenaco. Neste trabalho foram apresentados os parâmetros tempo para a concentração máxima ( $t_{max}$ ), concentração máxima ( $C_{max}$ ), área sob a curva de 0 ao último

ponto de coleta ( $ASC_{0-t}$ ) e  $t_{1/2}$ . Contudo, os dois estudos, foram apenas para demonstrar a aplicabilidade de um método na determinação simultânea dos compostos.

Os mesmos parâmetros foram calculados na avaliação do perfil farmacocinético de CC05 (um análogo de celecoxibe) a partir da administração de seu pró-fármaco, o CC06. O pró-fármaco foi administrado oralmente em ratos Sprague-Dawley. O perfil de concentração plasmática *versus* tempo de CC05 a partir da administração de CC06 permitiu concluir que o CC06 foi convertido a CC05, característica essencial para um pró-fármaco (YIN et al., 2009).

Na determinação do pró-fármaco ZLR-8 e de seu metabólito ativo diclofenaco, foi apresentada a curva de concentração plasmática *versus* tempo (JIAO et al., 2007). Ainda tendo o diclofenaco como metabólito, Ribeiro e colaboradores (2007) publicaram  $C_{max}$  e  $ASC$  desse metabólito a partir da administração do próprio e a partir da administração de 3 pró-fármacos ésteres aminocarboximéticos, em ratos. Dois dos pró-fármacos alcançaram mais de 60% de biodisponibilidade comparada ao diclofenaco em doses equimolares.

Nemmani e colaboradores (2009) realizaram um estudo para avaliar a segurança gástrica de pró-fármacos de AINEs liberadores de óxido nítrico. No âmbito da farmacocinética calcularam a biodisponibilidade relativa de diclofenaco e aspirina, administrados nessa forma de latenciação. Os resultados para o pró-fármaco de diclofenaco foram comparáveis aos do diclofenaco administrado. Para a aspirina, dois pró-fármacos tiveram biodisponibilidade aproximadamente 4 vezes menor e um teve zero de biodisponibilidade comparado a aspirina administrada.

Com o mesmo objetivo pró-fármacos morfolinoalquil ésteres dos AINEs naproxeno e indometacina foram sintetizados e administrados oralmente a ratos Sprague-Dawley. A avaliação farmacocinética compreendeu  $t_{max}$ ,  $C_{max}$  e a biodisponibilidade relativa dos fármacos matriz mediante administração dos pró-fármacos. O naproxeno do éster hidroxibutilmorfolina foi 34% mais biodisponível, com  $C_{max}$  duas vezes maior e  $t_{max}$  inalterado em relação a administração do fármaco matriz. A indometacina do éster hidroxibutilmorfolina teve também 34% de aumento na biodisponibilidade, com  $t_{max}$  significativamente mais tardio e  $C_{max}$  duas a três vezes maior que a indometacina administrada. Ambos apresentaram menor capacidade de induzir dano gastrintestinal (TAMMARA et al., 1993).



A área sob a curva (ASC) foi o único parâmetro calculado para dois metabólitos de mirodenafil em ratos. Esse parâmetro foi usado para determinar a relação de metabólito/mirodenafil que foi menor nos animais SHR (ratos espontaneamente hipertensivos) que nos animais controle. Esse resultado, por sua vez, apoiou o menor  $Cl_{nr}$  (*Clearance* não renal) e a maior ASC do mirodenafil nos ratos SHR, quando comparados com controle (LEE et al., 2011).

Uma avaliação do efeito da lovastatina na farmacocinética de verapamil e de seu metabólito ativo, norverapamil foi feita em ratos Sprague-Dawley. Os animais receberam uma dose oral de verapamil. Foram calculados  $t_{max}$ ,  $C_{max}$ ,  $t_{1/2}$  e  $ASC_{0-\infty}$ , ao invés de  $ASC_{0-t}$ . Outro dado apresentado foi a relação de  $ASC_{metabólito}/ASC_{fármaco\ matriz}$ , que resultou em valor acima da unidade, tanto na ausência quanto na presença da lovastatina. O estudo concluiu ainda que a presença de lovastatina aumentou a biodisponibilidade do verapamil (HONG et al., 2009).

Os dois estudos anteriores utilizam as ASC para calcular uma razão entre fármaco e metabólito. Esse parâmetro só pode ser aplicado se houver uma comparação entre dois grupos que contenham fármaco e metabólito nos dois grupos, sendo que o modificador entre os grupos seja outro tratamento ou uma característica diferente entre os animais.

A farmacocinética da indometacina a partir de uma administração de indometacina e a partir da administração de seu pró-fármaco éster trietilenoglicol (TIE) foi avaliada em ratos Wistar por gavagem. Além de  $t_{max}$ ,  $C_{max}$  e  $ASC_{0-t}$  foram calculados ainda o tempo de residência média (MRT), que é um parâmetro descritor da permanência temporária do fármaco no corpo (ROWLAND; TOZER, 1995), e a biodisponibilidade relativa, que relacionou a  $ASC_{0-t}$  do metabólito com a  $ASC_{0-t}$  do fármaco corrigidas pelas doses em molaridade. O perfil farmacocinético a partir de TIE proporcionou níveis plasmáticos menores e sustentados, quando comparado com a farmacocinética da indometacina e uma biodisponibilidade relativa de apenas 27,5 % (BONINA et al., 1996).

Outros estudos acrescentam o  $Cl$  e o  $V_d$ , mas em função da impossibilidade de serem calculados esses parâmetros absolutos, determinam para os metabólitos o parâmetro  $Cl/F$  e  $V_d/F$ . Esse parâmetro aparece comumente em perfis farmacocinéticos por rotas extravasculares, quando não há o perfil intravenoso para determinação da biodisponibilidade da via. Em publicações com cálculos cinéticos

de metabólitos esses parâmetros também são vistos, entretanto é necessário entender o contexto do estudo realizado para saber se o F é apenas a biodisponibilidade ou se inclui as frações relacionadas à formação do metabólito.

No trabalho de Fu e colaboradores (2008), o perfil farmacocinético da enrofloxacin e da ciprofloxacina a partir da enrofloxacin foi avaliado em vacas após administração intramuscular. Nesse ensaio a relação de ASC mostrou que 55,5 % da enrofloxacin foram convertidos a ciprofloxacina. Devido a administração extravascular Cl e Vd foram calculados em forma de Cl/F e Vd/F. Entretanto, para ciprofloxacina, o parâmetro F não representa apenas a biodisponibilidade, relativa a rota extravascular, mas também inclui a taxa de transformação de enrofloxacin em ciprofloxacina.

A farmacocinética oral da mirtazapina e de seus principais metabólitos, 8-OH mirtazapina (8-OH) e dimetilmirtazapina (DMR), em cães, publicada por Giorgi e Yun (2011) não apresentou resultados de Cl/F e Vd/F para 8-OH e DMR, apenas para mirtazapina. Portanto o F representa a biodisponibilidade oral da mirtazapina. Os parâmetros calculados ou observados para os três compostos foram  $k_{el}$ ,  $t_{max}$ ,  $C_{max}$ ,  $ASC_{0-\infty}$ , MRT e a área sob o momento da curva de 0 ao infinito ( $ASMC_{0-\infty}$ ), que é uma abordagem de momentos estatísticos, onde há a valorização do momento em que ocorre cada concentração da curva. O estudo concluiu que a mirtazapina possui um perfil farmacocinético em cães, diferente daqueles obtidos em gatos e humanos. Portanto é necessário cuidado na extrapolação de dose de outras espécies. A observação das concentrações do metabólito DMR similares as da mirtazapina, permitiu concluir que ele pode desempenhar papel importante na efetividade da mirtazapina nesse modelo animal, devido ao DMR ter de 5 a 10 % da atividade do tratamento com mirtazapina.

Os dois últimos estudos citados exemplificam duas situações semelhantes, que foram representadas diferentemente. Giorgi e Yun (2011) poderiam ter calculado para os metabólitos o Cl/F e o Vd/F, usando como dose, a massa equimolar do fármaco administrado. Contudo, o parâmetro F se tornaria a variável referente não só a biodisponibilidade oral, mas também a fração de metabólito formado *in vivo*. Já para Fu e colaboradores (2008), ocultar o cálculo de Cl/F e Vd/F, para a ciprofloxacina, evitaria que F significasse biodisponibilidade da rota

intramuscular, para a administração de enrofloxacin e biodisponibilidade da rota mais a fração de metabólito formado sistemicamente para a ciprofloxacina.

Em um estudo para farmacocinética oral da tonapofilina e de seu metabólito acilglucoronídico (tonapofilina-AG) em humanos saudáveis e humanos com dano hepático, foi usada a mesma estratégia de Giorgi e Yun (2011). Ou seja, entre os parâmetros calculados para a tonapofilina estavam o  $Cl/F$  e o  $Vd/F$  que foram negligenciados para a tonapofilina-AG, portanto  $F$  representa apenas a biodisponibilidade oral. Apesar disso, o perfil do metabólito levou a conclusão de que os danos hepáticos tem efeito profundo na disposição de tonapofilina-AG, que possui atividade equipotente ao fármaco matriz (LI et al., 2011).

Com a farmacocinética de fármacos a partir de pró-fármacos, essa denotação também pode ocorrer. Na revisão de Perrottet e colaboradores (2009) vários dados farmacocinéticos sobre o ganciclovir a partir de valganciclovir estão pautados, onde  $Cl$  e  $Vd$  são demonstrados como  $Cl/F$  e  $Vd/F$ . Como a administração foi oral, o  $F$  representa tanto a biodisponibilidade desta via quanto a fração de fármaco formado, frente a quantidade absorvida do pró-fármaco. A mesma publicação lista dados farmacocinéticos do ganciclovir administrado IV, onde são calculados  $Cl$  e  $Vd$ , que geralmente são valores maiores que  $Cl/F$  e  $Vd/F$ .

He e colaboradores (1999) apresentam o perfil farmacocinético de Ro 64-0802, um metabólito de oseltamivir em pacientes saudáveis. Provavelmente a eliminação de Ro 64-0802 é limitada por sua constante de formação e não por sua constante de eliminação, pois na administração IV a inclinação da reta de Ro 64-0802 ( $0,387\text{ h}^{-1}$ ) é notavelmente maior que a inclinação após administração oral de oseltamivir. Entretanto a inclinação da reta de oseltamivir também é maior que a de Ro 64-0802 ( $0,102\text{ h}^{-1}$ , irreal, provavelmente limitado por  $k_f$ ) a partir de oseltamivir oral, sugerindo que a  $k_{el}$  de oseltamivir ( $0,4\text{ h}^{-1}$ ) é  $k_f$  de Ro 64-0802 somada a outras constantes de eliminação.  $K_{el}$  de oseltamivir é 0,4 enquanto o  $K_{el}$  de Ro 64-0802 é 0,387 na administração por infusão do próprio e 0,102 na administração oral de oseltamivir. Os resultados farmacocinéticos a partir de uma administração oral de 150 mg de oseltamivir e 150 mg de Ro 64-0802 em infusão de 3 horas, são calculados para o Ro 64-0802. Neste ensaio, os dados levam a crer que o  $Cl$  foi calculado para a administração em infusão de 3 horas de Ro 64-0802 a partir de

uma dose equimolar a 150 mg de oseltamivir e na administração de oseltamivir, foi determinado o Cl/F.

Um parâmetro que pode auxiliar na avaliação de um metabólito é o *clearance* renal ( $Cl_r$ ) como no perfil farmacocinético de ipriflavona e dois de seus metabólitos (M1 e M2) feito por Lee e colaboradores (2009) em ratos Sprague-Dawley. Para o fármaco o  $Cl_r$  foi menor que 0,1 mL/min/Kg, enquanto para os metabólitos foi 1,2 e 6,6 para M1 e M2, respectivamente. Esse aumento no  $Cl_r$  exemplifica bem a característica predominante, mas não exclusiva (Ex. procainamida e seus menos polares acetil conjugados), do organismo de metabolizar os xenobióticos a compostos mais hidrossolúveis, ou seja, mais suscetíveis a eliminação. Outros parâmetros observados para os metabólitos foram o  $t_{max}$ , que comprovou a rápida formação de M1 (5 min) e o  $C_{max}$  que foi duas vezes maior para M2. A relação entre a ASC dos metabólitos e da ipriflavona na administração IV, resultou em um percentual de 7,15 e 36,6 % para M1 e M2, respectivamente. Ou seja, cerca de 44 % da ipriflavona biodisponível é convertida a esses metabólitos. O parâmetro  $k_{el}$  de ipriflavona na administração IV é aproximadamente 0,0031 ( $\text{min}^{-1}$ ), menor que as constantes aproximadas de M1 e M2 que são 0,0175 e 0,01. De acordo com a teoria da eliminação de metabólito limitada pela eliminação do fármaco, isso seria impossível se a curva da ipriflavona tivesse um decaimento com apenas uma velocidade. Como podem ser notadas duas velocidades, tudo indica que a maior formação dos metabólitos é na fase de distribuição, antes do decaimento terminal da curva.

Disposições biexponenciais, como no parágrafo anterior, podem complicar ainda mais a avaliação do perfil de um metabólito. Nesses casos é comum retirar o máximo de dados relativos ao movimento do fármaco, o que não garante uma avaliação correta dos parâmetros.

Cattani e colaboradores (2008) apresentam a farmacocinética da indometacina a partir de administração de indometacina e a partir da administração do pró-fármaco etil éster de indometacina em nanocapsulas (Ind-NC) em ratos Wistar. A avaliação foi feita após administração IV e oral de indometacina 10 mg/kg e Ind-NC 10 mg/kg oral ou 5 mg/kg IV. Os parâmetros IV calculados pelo modelo bicompartimental, tanto para indometacina diretamente administrada quanto a partir de Ind-NC, incluem A, B,  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $k_{21}$ ,  $k_{10}$ ,  $k_{12}$ ,  $ASC_{0-\infty}$ , Vd, Cl,  $t_{1/2\alpha}$  e  $t_{1/2\beta}$ . O Cl da

indometacina a partir de Ind-NC foi calculado assumindo que toda dose administrada se tornou efetivamente 5 mg/kg de indometacina, mesmo que a ASC não demonstre isso, pois é 68% menor na administração de Ind-NC que na administração de indometacina, já corrigida a diferença na dose. Quanto ao aumento no CI, o autor sugere que seja devido à captação das nanopartículas pelo sistema mononuclear fagocitário ou pelo SNC. Além disso a inalteração da  $t_{1/2\beta}$  deve ser decorrente do aumentado CI e Vd, por efeito de compensação.

Em outro estudo, onde ocorreu uma disposição cinética biexponencial e uma monoexponencial para o mesmo metabólito, mas originados de pró-fármacos diferentes, foi avaliada a farmacocinética de pró-fármacos ésteres de indometacina (IM-OE e IM-BE), em administração IV (7,6 ou 5 mg/kg equivalentes a indometacina) e oral (7,6 mg/kg equivalente a indometacina) em ratos. Os parâmetros IV calculados para a indometacina de IM-OE foram  $t_{1/2}$ ,  $k_{10}$ , ASC, ASMC e MRT em modelo monoexponencial. Para a indometacina a partir de IM-BE foram calculados A,  $\alpha$ , B,  $\beta$ ,  $t_{1/2\beta}$ , ASC, ASMC e MRT em modelo biexponencial. Já os parâmetros orais calculados, tanto para indometacina de IM-OE quanto para indometacina de IM-BE, foram F, ASC, ASMC e MRT. Os parâmetros citados para a indometacina a partir de IM-BE foram também calculados acrescidos de  $k_{21}$ ,  $k_{10}$ ,  $k_{12}$ , CI e Vd. Em conclusão houve grande alteração no comportamento farmacocinético da indometacina a partir dos pró-fármacos, com concentrações menores frente as da indometacina sozinha (OGISO et al., 1996).

Mamidi e colaboradores (2002) avaliaram a farmacocinética de celecoxibe (CBX) a partir da administração, IV e oral, de celecoxibe e a partir da administração oral de alguns pró-fármacos. Ratos Wistar receberam oralmente celecoxibe ou seus pró-fármacos CBX-AC, CBX-PR e CBX-BU na dose de 100 mg/kg equivalentes a CBX. Os parâmetros calculados para o CBX, a partir de oral CBX ou pró-fármacos, foram  $ASC_{0-t}$ ,  $ASC_{0-\infty}$ ,  $C_{max}$ ,  $t_{max}$ ,  $k_{el}$ ,  $t_{1/2\beta}$ ,  $ASMC_{0-t}$ ,  $ASMC_{0-\infty}$ , MRT e F. Em administração IV de CBX, os parâmetros de CBX calculados foram  $ASC_{0-t}$ ,  $ASC_{0-\infty}$ ,  $C_0$ ,  $K_{el}$ ,  $t_{1/2\beta}$ , CI, Vd, entretanto  $k_{el}$  está incoerente com os resultados obtidos ( os autores relatam  $k_{el}$  de  $2h^{-1}$ ). Recalculando o valor, a partir da equação que relaciona meia vida e  $k_{el}$  encontramos o resultado de  $0,2 h^{-1}$ .

Toutain e colaboradores (1986) publicaram os parâmetros farmacocinéticos mais recorrentes e a aplicação dos cálculos de  $f_m$  e  $F_{H(m)}$ , entre outros para

interpretar o perfil de eliminação do metabólito. A abordagem permite avaliar a influencia do fármaco matriz na eliminação do metabólito e do metabolismo hepático na eliminação sequencial do fármaco matriz. Para a aplicação de sua abordagem é necessário que o metabólito seja metabolizado apenas por fígado, que o fármaco matriz não tenha significativa hidrólise no plasma e tenha metabolismo hepático. É tratamento interessante dos dados, que leva a resultados que permitem avaliar o metabolismo hepático do fármaco precursor, seu *clearance* hepático efetivo, o metabolismo extra-hepático, a fração do fármaco precursor que foi metabolizada pelo fígado e quanto dessa fração conseguiu ficar sistemicamente biodisponível.

Essa revisão demonstra a variedade de parâmetros que podem ser calculados em um estudo de perfil farmacocinético. Desde apenas a área sob a curva até abordagens teóricas para o calculo das frações. Análises da urina, fezes e tecidos podem traçar um perfil quase completo de um fármaco e de seus metabólitos. Entretanto isso nem sempre é possível pela necessidade de validação de vários métodos analíticos — para cada tipo de matriz biológica —ou pela necessidade de métodos com sensibilidade que só pode ser alcançada com equipamentos de difícil acesso.

Para fármacos cujas doses efetivas já são conhecidas, dar a exposição que será proporcionada pela abordagem de latenciação é suficiente para o cálculo de uma dose do pró-fármaco que leve a mesma exposição. Ou seja, é possível utilizar  $F$  para expressar o que é biodisponível, sem considerar se este valor representa apenas perda na rota de administração, fração convertida a metabólito ou fração que consegue deixar o fígado e alcançar a circulação.

Por outro lado, no estágio de desenvolvimento de novos fármacos, toda informação é relevante para otimização de uma estrutura com resultados favoráveis. Além dos parâmetros mais comuns, discutir cada uma das frações pode ser mais interessante, pois permite a equipe de síntese propor alterações estruturais que melhorem o perfil farmacocinético do pró-fármaco e do metabólito, considerando principalmente a exposição e a eliminação.

### 3. JUSTIFICATIVA

O DICCIC demonstrou ser uma solução interessante para o problema da toxicidade gástrica dos AINEs, com ação anti-inflamatória comparável a do seu fármaco matriz, o diclofenaco e sem causar gastroulceração. Esses resultados promissores nos ensaios realizados por Chung e colaboradores (2009) foram o alicerce deste trabalho, pois a evolução da terapêutica depende basicamente da manutenção dos efeitos terapêuticos com redução dos efeitos adversos.

Com os resultados de atividade promissores na fase de descoberta de fármacos torna-se necessário, ao avanço do fármaco na fase de desenvolvimento pré-clínico, iniciar outra etapa fundamental, que é a avaliação da farmacocinética pré-clínica. Esta, por sua vez, pode determinar a continuidade do estudo deste novo fármaco na fase de desenvolvimento ou apontar a necessidade de alterações estruturais e, mais importante, a farmacocinética é a base para construção de futuros regimes posológicos.

O entendimento mínimo da ação dos AINEs e do fármaco em questão, diclofenaco, é importante para decisão de realizar um projeto que o tem como objeto. Os numerosos estudos em latenciação de AINEs apoiam a continuidade de desenvolvimento de um pró-fármaco de diclofenaco com resultados de atividade favoráveis. Enquanto a farmacocinética de novos fármacos e de metabólitos é imprescindível para discutir os resultados e transformá-los em conclusões.

Assim, o presente trabalho se justifica na necessidade da contínua pesquisa para evolução da terapêutica e na importância da farmacocinética pré-clínica nessa evolução.

#### 4. OBJETIVOS

- Obtenção do candidato a pró-fármaco de diclofenaco, DICCIC;
- Desenvolvimento e validação de método bioanalítico para a determinação de diclofenaco e DICCIC em plasma por CLAE;
- Avaliação do perfil farmacocinético do diclofenaco administrado em dose única intravenosa, em ratos Wistar;
- Avaliação do perfil farmacocinético do DICCIC e do Diclofenaco, após administração de DICCIC em dose única intravenosa, em ratos Wistar;
- Avaliação dos parâmetros farmacocinéticos do DICCIC e comparação dos perfis farmacocinéticos do diclofenaco, através de análise estatística.



---

## 5. MATERIAIS E MÉTODOS

### 5.1 Material

#### 5.1.1 Matérias primas, reagentes e solventes

- Diclofenaco, DEG;
- Etil dimetilaminopropil carbodiimida (EDC), Sigma;
- Diclorometano, Quemis;
- Hexano, Quemis;
- Acetato de etila, Quemis;
- Metanol, J. T. Backer;
- Acetonitrila, J. T. Backer;
- Ácido Metanóico, Scharlau;
- Propilenoglicol, Synth;
- Ácido tricloro acético, Synth;
- Naproxeno, DEG;
- Xilazina, Agener União;
- Quetamina, Agener União;
- Heparina sódica, Blausiegel;

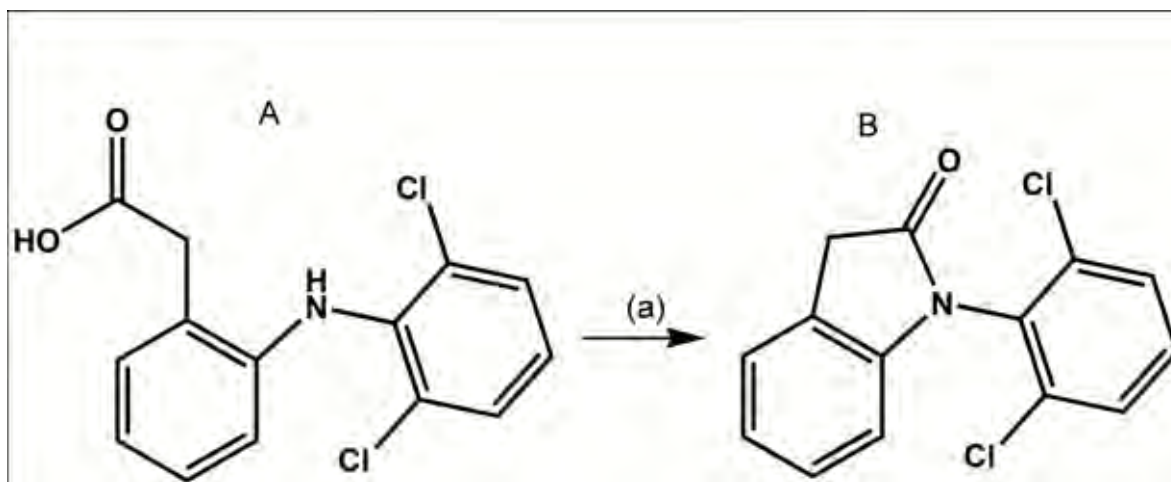
#### 5.1.2 Equipamentos

- Equipamento de Luz UV, Boitton;
- Banho ultrassônico, ALT Plus 3LDA;
- CLAE Waters 600E com detector UV-Vis Waters 2487;
- Ultracentrífuga, Sorval Biofuge;
- Agitador vórtex, Tecnal.
- Balança Shimadzu, ;

#### 5.1.3 Correlatos

- Placas de silicagel 60 F<sub>250</sub>, Merck;
- Coluna Symmetry C18 (4,6 x 250 mm, 5 $\mu$ m), Waters;
- Pré-coluna Symmetry C18 (3,9 x 20 mm, 5 $\mu$ m), Waters;
- Software Empower®;

## 5.2 Preparação de DICCIC (CHUNG et al., 2009)



**Figura 12** Estruturas de diclofenaco (A) e DICCIC (B). (a) diclorometano e EDC em temperatura ambiente por 30 min.

### 5.2.1 Procedimento de Síntese

Adicionou-se 315 mg (1,1 mmol) de diclofenaco molecular e 226 mg (1,2 mmol) de etil dimetilaminopropil carbodiimida (EDC) a 20 mL de diclorometano. A mistura foi agitada por 30 minutos a temperatura ambiente e em seguida foi diluída com mais 50 mL de diclorometano. A mistura diluída foi lavada 3 vezes em funil de separação com bicarbonato de sódio e mais 3 vezes com água destilada. Foi adicionado sulfato de sódio como agente secante. Posteriormente foi realizada uma filtração simples e o filtrado foi evaporado a pressão reduzida para fornecer 278 mg de DICCIC como um sólido de coloração avermelhada (CHUNG et al., 2009).

### 5.2.2 Identificação de diclofenaco e DICCIC por Cromatografia em camada delgada (CCD)

A CCD foi utilizada para confirmar a obtenção de DICCIC e ausência do fármaco matriz diclofenaco. Foram utilizadas placas de sílicagel 60 F<sub>250</sub>, sistema solvente constituído de hexano-acetato de etila (60:40) em 4,1 cm de corrida analítica. A revelação da cromatografia foi realizada pela aplicação de luz ultravioleta.

O  $R_f$  foi determinado pela equação 1 abaixo.

Equação 1. 
$$R_f = \frac{da}{dt}$$

Onde,  $R_f$  é o fator de retenção,  $da$  é a distância percorrida pela amostra e  $dt$  é a distância percorrida pela fase móvel (DEGANI et al., 1998).

### 5.2.3 Avaliação do DICCIC por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

O composto foi dissolvido em metanol (200 µg/mL) e diluído em água com subsequente injeção no sistema cromatográfico. Este, por sua vez, consistiu de CLAE Waters 600E equipado com um detector UV-vis Waters 2487, operando a 276 nm para detecção de diclofenaco e a 250 nm para detecção de DICCIC. A separação foi feita por uma coluna Symmetry C18 (4,6 x 250 mm, 5µm), protegida por uma pré-coluna Symmetry C18 (3,9 x 20 mm, 5µm). A fase móvel foi constituída de metanol, acetonitrila e ácido metanóico 0,1%, na proporção de 5, 55 e 40% respectivamente, em modo isocrático e um fluxo de 1 mL/min.

## 5.3 Pré-formulação

### 5.3.1 Solubilização dos Fármacos

Para administração IV foi necessário dissolver os compostos teste em veículo apropriado. O diclofenaco sódico foi administrado após solubilização em água na concentração de 8,7 mg/mL (equimolar a 8,1 mg/mL de diclofenaco) , portanto foi administrado um volume de 1 mL/Kg.

Para o DICCIC, foram testados veículos como: água, soro fisiológico, propilenoglicol e misturas propilenoglicol/água (NEERVANNAN, 2006; BUGGINS et al., 2007). Todos os veículos foram avaliados com relação a sua capacidade de solubilizar o DICCIC com auxílio de banho ultrassônico e aquecimento. O DICCIC mostrou maior solubilidade em propilenoglicol (LISCIOTTO; DEBOLD, 1991). Assim, o DICCIC foi solubilizado em propilenoglicol na concentração de 15,2 mg/mL (equimolar a 16,2 mg/mL de diclofenaco), portanto foi administrado um volume de 0,5 mL/Kg. A pré-formulação de DICCIC foi mais concentrada que a de diclofenaco

com o objetivo de minimizar efeito deletérios do propilenoglicol observando o volume máximo aceitável para administração (NEERVANNAN, 2006).

Apesar do seu amplo uso em ensaios pré-clínicos, o dimetilsulfóxido (DMSO) foi evitado devido a sua capacidade de inibir as enzimas CYP2C9, 2C8 e 2C19 (BUGGINS et al., 2007), que estão envolvidas no metabolismo do diclofenaco (TANG, 2003; ZI et al., 2010).

### **5.3.2 Estabilidade da pré-formulação**

Para avaliar a estabilidade do DICCIC dissolvido no veículo, uma alíquota de 10 µL foi diluída em 990 µL de metanol, que por sua vez, foi diluída em 10 vezes em água. 50 µL da solução em água foram injetados no sistema CLAE, nas condições citadas em 5.2.3. Esse procedimento foi repetido sete dias depois com o mesmo produto, que ficou armazenado em geladeira. Não houve redução na área do pico de DICCIC, o que permitiu considera-lo estável após os sete dias de armazenamento.

## **5.4 Método Bioanalítico**

### **5.4.1 Condições cromatográficas**

O método desenvolvido utilizou um sistema CLAE Waters 600E semi-automático equipado com um detector UV-vis Waters 2487, operando a 276 nm para detecção de diclofenaco e de naproxeno (padrão interno) e a 250 nm para detecção de DICCIC. A separação dos compostos foi feita por um sistema de fase reversa com uma coluna Symmetry C18 (4,6 x 250 mm, 5µm), protegida por uma pré-coluna Symmetry C18 (3,9 x 20 mm, 5µm). A fase móvel, por sua vez, foi constituída de metanol, acetonitrila e ácido metanóico 0,1%, na proporção de 5, 55 e 40% respectivamente, em modo isocrático e um fluxo de 1 mL/min. O tempo de corrida foi de 15 min e o volume de injeção de 50 µL.

### **5.4.2 Processamento da amostra biológica**

Em um microtubo plástico de 1,5 mL contendo 200 µL de plasma, foram adicionados 20 µL de ácido tricloroacético (TCA) 10% e 180 µL de PI (naproxeno 5 µg/mL diluído em acetonitrila pura) e em seguida a mistura foi agitada em vortex por

10 segundos. A mistura foi, então, centrifugada por 15 minutos a 13 000 x g e 50 µL do sobrenadante foi injetado no sistema CLAE.

### **5.4.3 Validação**

A validação compreende a avaliação sistemática dos procedimentos utilizados no método analítico desenvolvido com a finalidade de estabelecer os seus limites de confiança. Esta avaliação foi fundamentada nas normas do Guia para Validação de Métodos Analíticos e Bioanalíticos da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) de acordo com a resolução RE- nº899, de 29 de maio de 2003 e da Food and Drug Administration (FDA) de acordo com o Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation, de maio de 2001, respectivamente. Os parâmetros fundamentais determinados foram: linearidade, precisão e exatidão, limite inferior de quantificação (LIQ), limite de detecção (LD), seletividade, recuperação e estabilidade.

#### **5.4.3.1 Linearidade**

A curva analítica foi construída para o diclofenaco e para o DICCIC plotando-se a razão da área dos picos de cada composto e do PI (área do composto/área do PI) contra a concentração nominal do composto (DICCIC ou diclofenaco). Os critérios de aceitação da linearidade incluem um coeficiente de correlação acima de 0,98 e uma exatidão de 85% a 115%, exceto para o LIQ, para o qual a exatidão deve estar entre 80% e 120%.

#### **5.4.3.2 Limite Inferior de Quantificação (LIQ)**

O LIQ é expresso como a menor concentração do analito que pode ser quantificada com exatidão de 80-120% e precisão de 0-20%.

#### **5.4.3.3 Precisão e Exatidão**

A precisão e a exatidão do método foram avaliadas intra-corridas e inter-corridas para cada um dos compostos. Os resultados intra-corridas foram determinados por 5 análises dos controles de qualidade alto (CQA), médio (CQM), baixo (CQB) e do LIQ (CQ-LIQ) em um mesmo dia, já para os resultados de precisão e exatidão inter-corridas as determinações foram feitas em três dias consecutivos.

Os critérios de aceitação foram precisão de 0-15% e exatidão de 85-115%, exceto para o LIQ, cujos valores foram 0-20% e 80-120%, para precisão e exatidão, respectivamente.

#### **5.4.3.4 Limite de Detecção (LD)**

Foi determinado pela relação de 3 vezes o ruído da linha de base.

#### **5.4.3.5 Seletividade**

Para componentes exógenos, a seletividade foi avaliada em relação as substâncias utilizadas como anestésico na cirurgia que foi feita nos animais antes das administrações e coletas, sendo portanto de suma importância que estas não interferissem na análise das concentrações plasmáticas dos analitos. As substâncias analisadas foram xilazina e a quetamina, adicionadas em plasma branco e processadas conforme descrito no item 5.4.2.

#### **5.4.3.6 Recuperação**

A recuperação expressa a eficiência do procedimento de extração da amostra em relação a soluções padrão não extraídas. As soluções não extraídas foram feitas por adição ao extrato final do processamento da amostra com concentrações conhecidas dos compostos, inclusive o PI. A recuperação foi calculada pelo percentual da área da amostra extraída de CQA, CQM e CQB em relação a amostra não extraída das mesmas concentrações.

#### **5.4.3.7 Estabilidade**

A estabilidade foi avaliada em função da necessidade de armazenamento das amostras após cada coleta ou após o processamento. Até a análise das amostras, estas não deverão ser mantidas armazenadas por tempo superior ao determinado nos ensaios de estabilidade.

Os ensaios de estabilidade realizados foram aqueles nos quais era previsto que as amostras precisassem ser armazenadas. Curta duração, que consiste de deixar o CQ à temperatura ambiente, foi feito com tempo de 6 e 24 horas. Estabilidade pós-processamento, que avalia se o fármaco resiste no extrato final do

processamento, foi feito com tempo 6 horas a 4°C e 24 horas a -80°C. Estabilidade de ciclos de congelamento e descongelamento, onde o CQ foi congelado por 24 horas a -20°C e descongelado a temperatura ambiente, por três vezes. Estabilidade de longa duração, na qual o CQ foi congelado a -20°C e mantido por 9 e 120 dias.

Os compostos foram considerados estáveis quando não se observa desvio maior que 15% do valor obtido nas amostras recém preparadas.

#### 5.4.4 Análise de resultados da validação

Os cálculos de regressão linear, desvio padrão relativo (DPR) e acurácia foram realizados utilizando-se o programa Origin®.

### 5.5 Perfil Farmacocinético

#### 5.5.1 Protocolo experimental

O protocolo abaixo descrito foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP/Araraquara, sob número 27/2009 (anexo 1).

#### 5.5.2 Animais

Foram utilizados ratos Wistar, com peso aproximado de 250-300 g, provenientes do biotério central da Universidade Estadual Paulista-Unesp. Os animais foram transferidos para o biotério do Departamento de Princípios Ativos Naturais e Toxicologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP de Araraquara, onde foram mantidos em condições controladas de temperatura ( $23 \pm 1^\circ$  C), umidade ( $55 \pm 5\%$ ) e luz (ciclo 12/12h, luzes acesas as 07h) e com ração balanceada e água *ad libitum*. Os experimentos foram realizados na fase de claro.

Foram utilizados 20 animais, distribuídos nos seguintes grupos:

Grupo Farmacocinética I, tratados com diclofenaco sódico, dose única, IV *bolus* (n=10, 8,7 mg/kg);

Grupo Farmacocinética II, tratados com DICCCIC, dose única, IV *bolus* (n=10, 7,6 mg/kg);

A dose para uso nos animais foi calculada por extrapolação alométrica e relação estequiométrica entre os compostos, considerando que a dose diária usual de diclofenaco em humanos é de 2,14 mg/kg.

### 5.5.3 Procedimento Cirúrgico

A canulação da artéria femoral do animal destinou-se a coleta de sangue para a determinação das concentrações dos fármacos por CLAE, enquanto a cânula da veia, à administração destes fármacos.

Para a realização deste procedimento, o animal foi anestesiado através da administração intraperitoneal de xilazina (5,5 mg/kg) e quetamina (73mg/kg), em seguida foi feita a tricotomia da face ventral da parte superior da pata traseira e da região dorsal próxima à nuca, onde a cânula é externada. Uma incisão foi feita na face ventral superior da pata traseira, onde por tato encontrou-se a pulsação da artéria femoral, e em seguida o feixe vaso-nervoso foi exposto. No feixe o vaso a ser canulado foi isolado e através de pequena secção fez-se a inserção do tubo de polietileno P-10 fundido a um tubo polietileno P-50 e preenchido com heparina 2% para evitar coagulação. Com auxílio de um trocater externou-se a cânula na região cervical do animal entrelaçando-a pela sutura do local. O animal foi mantido em recuperação por um período de 24 horas e foi utilizado no máximo 72 horas depois de finalizado o período de recuperação (MACTUTUS et al., 1994; DE PAULA et al., 1999; TONG et al., 2006; ROUPE et al., 2006; BRAGA et al., 2007; LOEFFELBEIN et al., 2009).

### 5.5.4 Grupo Farmacocinética I

Nestes animais foi administrado o diclofenaco *IV bolus*, através de cânula na veia femoral do animal. As coletas foram realizadas pela cânula na artéria femoral nos tempos de 5, 10, 20, 30, 45, 60, 90, 120, 180, 240, 300 e 360 minutos após a administração. Para cada animal foram realizadas 6 coletas de 0,4 – 0,5 mL cada (JOSLIN, 2009; THRALL, 2004), utilizando-se um total de 10 animais.

Deste grupo resultaram os parâmetros farmacocinéticos do diclofenaco após administração *IV bolus*.



### 5.5.5 Grupo Farmacocinética II

Nestes animais foi administrado o DICCCIC *IV bolus*, através de cânula na veia femoral do animal. As coletas foram realizadas pela cânula na artéria femoral nos tempos de 1, 3, 5, 10, 20, 30, 45, 60, 90, 120, 160 minutos após a administração. Para cada animal foram realizadas 6 coletas de 0,4 – 0,5 mL cada (JOSLIN, 2009; THRALL, 2004), utilizando-se um total de 10 animais.

Deste grupo obteve-se os parâmetros farmacocinéticos do DICCCIC e diclofenaco a partir de DICCCIC após administração *IV bolus*.

### 5.5.6 Análise Farmacocinética

A disposição cinética do DICCCIC e do diclofenaco foi avaliada após a administração de dose única *IV bolus* 7,6 mg/kg e 8,1 mg/kg, respectivamente. Os parâmetros farmacocinéticos foram calculados através das curvas de concentração plasmática *versus* tempo. As meias vidas e as constantes de velocidade foram determinadas através do modelo bicompartimental, escolhido após inspeção visual e avaliação do coeficiente de correlação (CATTANI et al., 2008).

A  $ASC_{0-t}$  foi calculada pelo método dos trapezoides, onde a média das concentrações plasmáticas de cada intervalo de tempo é multiplicado por este intervalo de tempo, com subsequente soma de todos (Equação 2).

Equação 2. 
$$ASC_{0-tn} = \sum_{i=1}^n \frac{Cp_i + Cp_{i+1}}{2} \times \Delta t$$

Onde,  $Cp$  é a concentração plasmática e  $t$  é o tempo.

Para  $ASC_{0-\infty}$  foi aplicada a equação 3.

Equação 3. 
$$ASC_{0-\infty} = ASC_{0-tn} + \left( \frac{Cp_n}{k_{el}} \right)$$

Onde,  $C_{p_n}$  é a última concentração da curva de concentração plasmática *versus* tempo e  $k_{el}$  ou  $\beta$  é a inclinação da reta de regressão linear do logaritmo das concentrações plasmáticas pelo tempo, na fase de eliminação. A reta de regressão apresenta ainda o parâmetro B, que é a intersecção da reta de regressão linear do logaritmo das concentrações plasmáticas pelo tempo, na fase de eliminação. A fase de eliminação é sempre a última das inclinações dos dados experimentais.

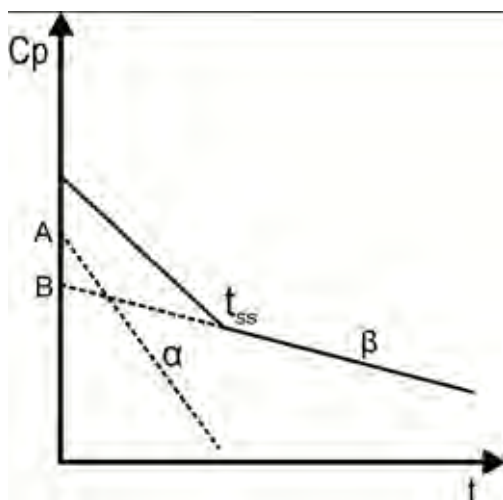
No modelo bicompartimental além da constante de eliminação é determinada, ainda, a constante de distribuição ( $k_\alpha$  ou  $\alpha$ ) que rege o primeiro decaimento da curva de concentração plasmática pelo tempo. Entretanto a primeira inclinação observada nos dados absolutos é uma soma da eliminação e da distribuição, portanto é necessário isolar a reta de distribuição pelo método dos resíduos (**Figura 13**). Para isso é necessário calcular os valores teóricos de concentrações plasmáticas através da equação exponencial da fase eliminação pela equação 4.

**Equação 4.** 
$$C_{p_{teórica}} = B \times e^{-\beta t}$$

Onde B e  $\beta$  são respectivamente a intersecção e a inclinação da reta de regressão linear do logaritmo das concentrações plasmáticas pelo tempo, na fase de eliminação e t é o tempo, que deve ser o mesmo das concentrações experimentais.

O logaritmo do resíduo entre a concentração plasmática teórica e a concentração plasmática experimental permitirá a criação da reta residual, cuja inclinação e intersecção são  $k_\alpha$  e A, respectivamente. Esses parâmetros permitem a criação da equação biexponencial (equação 5) que rege o modelo bicompartimental. Onde  $C_{p_t}$  é uma concentração plasmática em um determinado tempo t.

**Equação 5.** 
$$C_{p_t} = A \times e^{-\alpha t} + B \times e^{-\beta t}$$



**Figura 13** Representação gráfica do método dos resíduos.  $C_p$  concentração plasmática,  $t$  tempo,  $t_{ss}$  tempo em que ocorre o equilíbrio entre compartimento periférico e central,  $B$  e  $\beta$  são, respectivamente, a intersecção e a inclinação da reta na fase terminal e  $A$  e  $\alpha$  são, respectivamente, a inclinação e a intersecção da reta.

As constantes (como  $k_{el}$ ) foram utilizadas para o cálculo de  $t_{1/2}$  do processo a que pertencem pela equação 6 (LI et al, 2005).

**Equação 6.**

$$t_{1/2} = \frac{\ln 2}{k}$$

O  $Cl$  foi calculado pela equação 7, modelo independente.

**Equação 7.**

$$Cl = \frac{DOSE}{ASC_{0-\infty}}$$

E o  $Vd_{\text{área}}$  pela equação 8. Esses dois parâmetros não foram calculados para as concentrações plasmáticas de diclofenaco a partir da administração de DICCIC, devido à indisponibilidade da DOSE.

**Equação 8.**

$$Vd_{\text{área}} = \frac{Cl}{k_{el}}$$

O tempo necessário para alcançar o estado de equilíbrio ( $t_{ss}$ ), que é o tempo teórico em que a velocidade de decaimento das concentrações plasmáticas muda foi calculado pela equação 9. No contexto fisiológico, o  $t_{ss}$  é o tempo em que ocorre o equilíbrio das concentrações entre o compartimento periférico e o central.

**Equação 9.**

$$t_{ss} = \frac{\ln \times \frac{k_{\alpha}}{k_{el}}}{k_{\alpha} - k_{el}}$$

Exclusivamente para o diclofenaco a partir da administração do DICCIC foram calculados os parâmetros biodisponibilidade relativa (RBA), fração de DICCIC metabolizada no fígado (fm), fração de fm que ficou disponível sistemicamente como diclofenaco ( $F_{H(m)}$ ) e o *Clearance* de formação de metabólitos a partir de DICCIC ( $Cl_f$ ) pelas equações 10, 11, 12, e 13, respectivamente (HOUSTON, 1982; TOUTAIN et al., 1986).

**Equação 10.**

$$RBA = \frac{ASC_{(dic-DC)}}{ASC_{(dic-dic)}}$$

Onde  $ASC_{(dic-DC)}$  e  $ASC_{(dic-dic)}$  são a área sob a curva do diclofenaco a partir da administração de DICCIC e a área sob a curva do diclofenaco a partir da administração de diclofenaco, respectivamente.

**Equação 11.**

$$fm = \frac{RBA \times Cl_{(DC)} + Cl_{(dic)}}{Cl_{(DC)}}$$

Onde  $Cl_{(DC)}$  é o *clearance* plasmático do DICCIC e o  $Cl_{(dic)}$  é o *clearance* plasmático do diclofenaco.

**Equação 12.**

$$F_{H(m)} = 1 - \frac{Cl_{(dic)}}{fm \times Cl_{(DC)}}$$

Equação 13.

$$Cl_f = fm \times Cl_{(DC)}$$

### 5.5.7 Análise Estatística

Os parâmetros farmacocinéticos de cada grupo estão apresentados através das medianas e médias (IC 95). Foram feitas duas comparações estatísticas, diclofenaco de DICCIC contra diclofenaco de diclofenaco e contra DICCIC. O objetivo da primeira comparação (diclofenaco contra diclofenaco de DICCIC) é observar alterações no perfil do diclofenaco quando administrado latenciado. Já a comparação entre DICCIC e diclofenaco de DICCIC alveja determinar possíveis interdependências entre o perfil do pró-fármaco e o perfil do metabólito. Foi utilizado o programa GraphPad Prism 5<sup>®</sup>, com uso do teste de Mann-Whitney ( $\alpha=0,05$ ).

## 6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 6.1 Identificação

#### 6.1.1 Por CCD

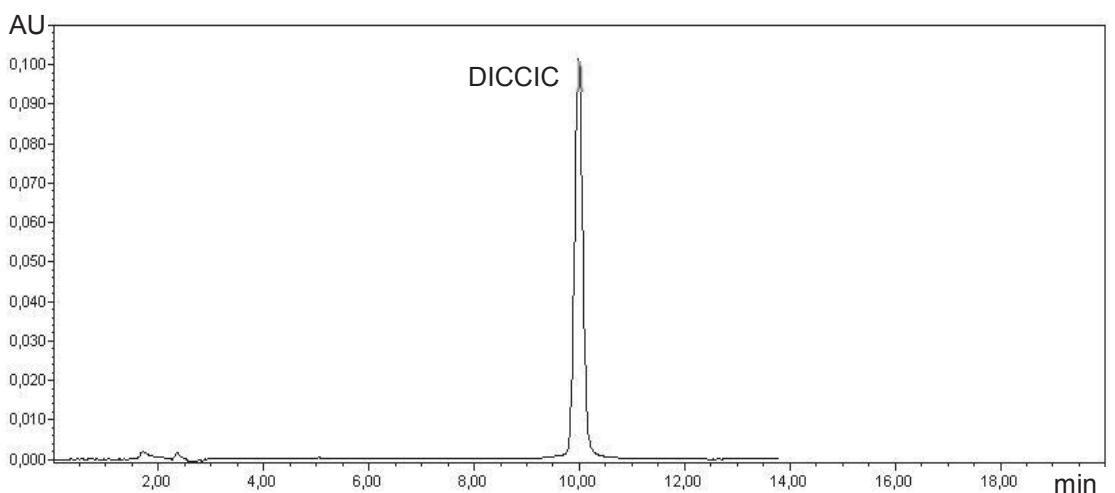
Em observação sob Luz ultravioleta os compostos foram identificados (**Figura 14**), sendo que a distância percorrida pelo diclofenaco ( $da_1$ ) foi de 2,8 cm, diferente da distância percorrida pelo DICCIC ( $da_2$ ) de 3,2 cm em uma distância total percorrida pela fase móvel ( $dt$ ) de 4,1 cm. Os fatores de retenção do diclofenaco e do DICCIC foram de 0,68 e 0,78, respectivamente.



**Figura 14** Ilustração digitalmente realçada de placa cromatográfica usada para determinação do fim da obtenção. Diclofenaco a direita e DICCIC a esquerda, nota-se a ausência de mancha do diclofenaco na amostra de DICCIC.

#### 6.1.2 Por CLAE

Determinado o fim da reação por CCD, o composto obtido foi submetido a análise por CLAE e identificado como DICCIC após comparação com padrão que passou pela caracterização química completa. A **Figura 15** apresenta DICCIC que foi utilizado para os ensaios.



**Figura 15** Cromatograma de avaliação da qualidade da reação para obtenção de DICCIC. Diccic 10 ug/mL sem qualquer resíduo de diclofenaco.

## 6.2 Validação do método bioanalítico

Para validação do método bioanalítico, amostras de plasma isentas de substâncias exógenas foram adicionadas de diclofenaco e DICCCIC em concentrações conhecidas. As amostras adicionadas padrões de calibração (PC), utilizadas para curva analítica, e controles de qualidade (CQ) para os ensaios de precisão e exatidão e para o monitoramento do método, foram preparadas adicionando-se o plasma com 10 % das soluções de trabalho preparadas em acetonitrila, que por sua vez foram preparadas a partir de soluções estoque em metanol (Tabelas 2 e 3).

**Tabela 2.** Concentrações das soluções estoque, de trabalho, padrões de calibração e controles de qualidades, para o diclofenaco. Valores em ng/mL.

Diclofenaco								
Solução Estoque	200 000							
Soluções de Trabalho	100 000	75 000	25 000	12 500	7 500	3 500	2 000	1 000
PC	10 000	7 500	2 500	1 250	750	350	200	100
CQ		7 500		1 250			200	100

PC padrões de calibração, CQ controles de qualidade.

**Tabela 3.** Concentrações das soluções estoque, de trabalho, padrões de calibração e controles de qualidades, para o DICCCIC. Valores em ng/mL.

DICCCIC								
Solução Estoque	120 000							
Soluções de Trabalho	60 000	45 000	15 000	7 500	4 500	2 100	1 200	600
PC	6 000	4 500	1 500	750	450	210	120	60
CQ		4 500		750			120	60

PC padrões de calibração, CQ controles de qualidade.

### 6.2.1 Curva analítica e Linearidade

A curva analítica foi construída para o diclofenaco e para o DICCCIC plotando-se a razão da área dos picos de cada composto e do PI (área do composto/área do PI) contra a concentração nominal do composto (DICCCIC ou diclofenaco) com 8 níveis de concentração em quintuplicata de 60 - 6 000 ng/mL para DICCCIC e de 100 - 10 000 ng/mL para diclofenaco. Nas tabelas 4 e 5 estão apresentados os resultados de linearidade.

**Tabela 4.** Médias das concentrações experimentais que geraram a curva de calibração. Precisão, expressa pelo desvio padrão relativo (DPR), e exatidão da curva (n=5).

Diclofenaco								
Nominal (ng/mL)	100	200	350	750	1250	2500	7500	10000
Experimental (ng/mL)	92,9	209,1	372,9	678,3	1366,4	2377,1	7630,5	9922,7
DPR (%)	9,6	9,6	6,2	12,1	2,4	6,4	6,0	1,7
Exatidão (%)	92,9	104,6	106,5	90,4	109,3	95,1	101,7	99,2

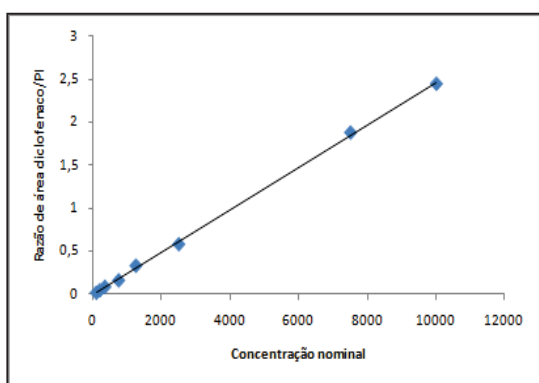
DPR desvio padrão relativo.

**Tabela 5.** Médias das concentrações experimentais que geraram a curva de calibração. Precisão, expressa pelo desvio padrão relativo (DPR), e exatidão da curva (n=5).

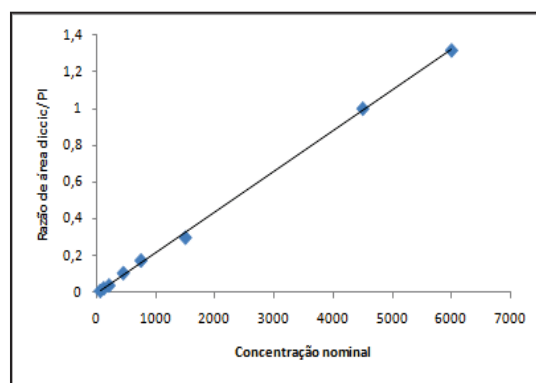
DICCIC								
Nominal (ng/mL)	60	120	210	450	750	1500	4500	6000
Experimental (ng/mL)	58,4	123,6	195,3	498,0	808,8	1371,9	4549,7	5984,2
DPR (%)	7,6	10,0	9,6	1,4	1,2	3,9	6,2	2,2
Exatidão (%)	97,3	103,0	93,0	110,7	107,8	91,5	101,1	99,7

DPR desvio padrão relativo.

A curva foi analisada pelo método de regressão dos mínimos quadrados para verificar sua linearidade e o coeficiente de correlação (r) foi de 0,9997, tanto para o diclofenaco quanto para o DICCIC, acima de 0,98 e exatidão entre 85-115%, exceto para o LIQ, para o qual a exatidão deve estar entre 80-120%. As equações de linearidade e valores de p foram  $y=0,000221x-0,00189$  e  $p= 1,04 \times 10^{-10}$  para DICCIC e  $y=0,000247x-0,00644$  e  $p= 5,81 \times 10^{-11}$  para diclofenaco (**figuras 16 e 17**).



**Figura 17** Curva analítica do diclofenaco.



**Figura 16** Curva analítica do DICCIC.



O LIQ foi de 100 ng/mL ( $92,9 \pm 9,6$ , tabela 3) para o diclofenaco e 60 ng/mL ( $58,4 \pm 7,4$  Tabela 4) para o Diccic.

### 6.2.2 Precisão e Exatidão

A precisão e a exatidão do método foram avaliadas intra-corridas e inter-corridas para cada um dos compostos. Os resultados intra-corridas foram determinados por 5 análises dos controles de qualidade alto (CQA), médio (CQM), baixo (CQB) e do LIQ (CQ-LIQ) em um mesmo dia, já para os resultados de precisão e exatidão inter-corridas as determinações foram feitas em três dias consecutivos.

Os valores de precisão e exatidão intra-corrida do diclofenaco foram de 0,4-9,6% e 86,2-113,7%, respectivamente. Para o ensaio inter-corridas os resultados foram 5,8-13,3% de precisão e 99,9-104,1% de exatidão (Tabela 6).

Para o Diccic a precisão e a exatidão intra-corrida foram 2,1-13,2% e 91,1-106,6%, consecutivamente. Já para os ensaios inter-corridas, os valores encontrados foram 6,4-9,5% para precisão e 95,5-103,4% para exatidão (Tabela 6).

### 6.2.3 Limite de detecção

Foi determinado pela relação de 3 vezes o ruído da linha de base. Para o diclofenaco, o limite de detecção foi de 10 ng/mL e para o DICCIC 20 ng/mL.

### 6.2.4 Seletividade

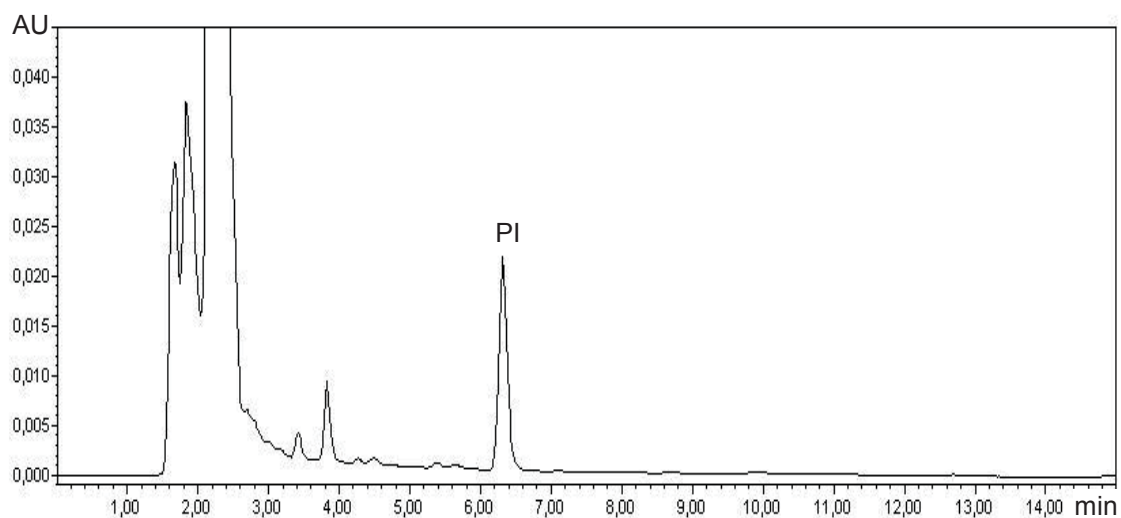
O método mostrou-se específico entre as substâncias de interesse, diclofenaco, DICCIC e PI. Não houve interferência significativa de componentes endógenos com o tempo de retenção dos analitos (**Figuras 18, 19 e 20**).

Para componentes exógenos, a seletividade foi avaliada em relação as substâncias utilizadas como anestésico na cirurgia feita nos animais antes das administrações e coletas, sendo portanto de suma importância que estas não interfiram na análise das concentrações plasmáticas dos analitos. As substâncias avaliadas foram a xilazina e a quetamina, utilizadas para contaminar plasma branco. Portanto o método apresentou seletividade adequada, dentro dos parâmetros avaliados.

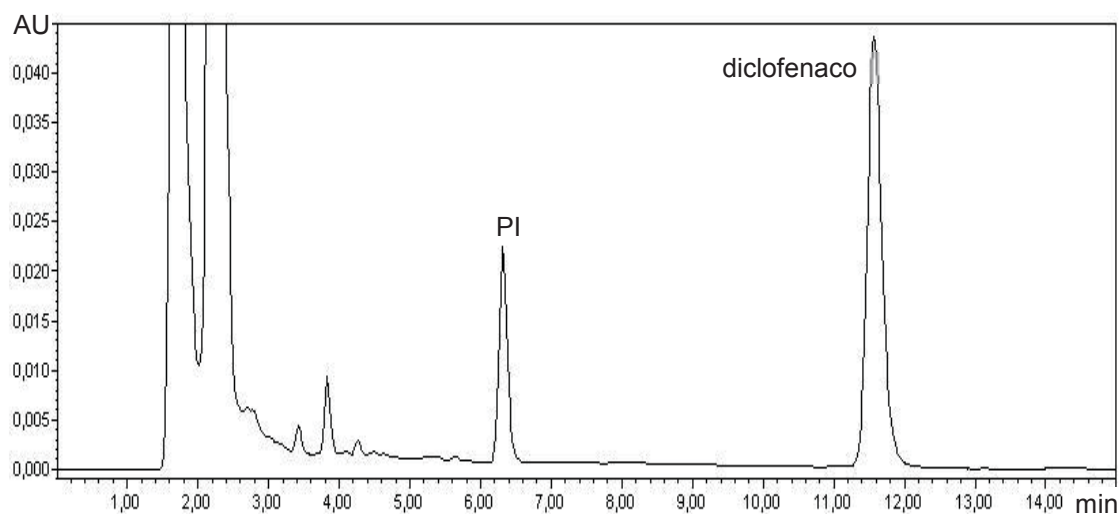
**Tabela 6.** Precisão e Exatidão intra e inter-corridas do diclofenaco e do DICCIC.

Grupo	Estatística	Concentração Teórica (ng/mL)							
		Diclofenaco				DICCIC			
		100	200	1250	7500	60	120	750	4500
1	n	5	5	5	5	5	5	5	5
	Média intra-corrída	108,7	227,4	1366,4	8152,5	58,4	123,6	683,3	4549,7
	DPR (%)	8,5	9,6	8,4	6,0	7,6	10,0	10,2	6,2
	Exatidão (%)	92,1	104,6	108,6	101,7	97,3	103,0	91,1	101,1
2	n	5	5	5	5	5	5	5	5
	Média intra-corrída	98,9	172,4	1178,8	7645,1	61,1	128,0	709,3	4371,6
	DPR (%)	0,4	5,6	7,6	5,1	13,2	8,3	2,9	8,4
	Exatidão (%)	98,9	86,2	94,3	101,9	101,8	106,6	94,6	97,1
3	n	5	5	5	5	5	5	5	5
	Média intra-corrída	108,7	227,4	1366,4	8152,5	55,2	120,7	755,5	4658,3
	DPR (%)	4,4	4,0	2,4	4,5	2,1	7,8	9,7	3,5
	Exatidão (%)	108,7	113,7	109,3	108,7	92,0	100,6	100,7	103,5
Total	n	15	15	15	15	15	15	15	15
	Média inter-corrída	99,9	203,0	1300,9	7809,4	58,2	124,1	716,0	4526,6
	DPR (%)	8,6	13,3	9,2	5,8	9,5	8,5	8,8	6,4
	Exatidão (%)	99,9	101,5	104,1	104,1	97,0	103,4	95,5	100,6

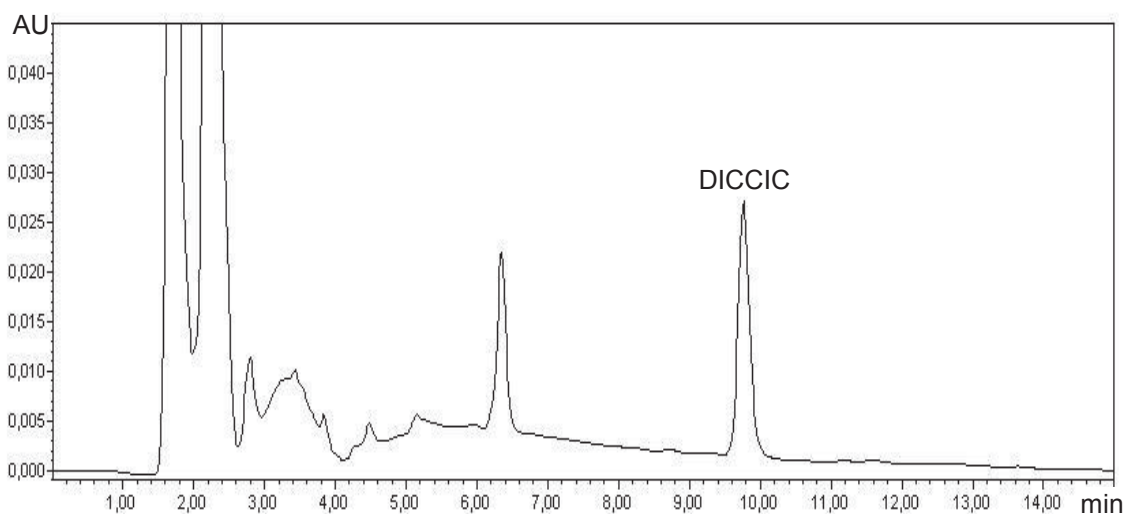
DPR desvio padrão relativo.



**Figura 18** Cromatograma de amostra zero, tempo de retenção do padrão interno 6,3 minutos; comprimento de onda da leitura 276nm.



**Figura 19** Cromatograma de amostra Diclofenaco 10  $\mu\text{g/mL}$ , tempo de retenção 11,6 minutos; comprimento de onda da leitura 276nm.



**Figura 20** Cromatograma de amostra DICCIC 6  $\mu\text{g/mL}$ , tempo de retenção 9,8 minutos; comprimento de onda da leitura 250nm.

### 6.2.5 Recuperação

A recuperação expressa a eficiência do procedimento de extração da amostra em relação a soluções padrão não extraídas. A recuperação para o diclofenaco foi em média de 94,2% e para o DICCIC foi em média de 94,1% (Tabela 7). O PI, por sua vez, teve uma recuperação de 110,5% com DPR de 1,1% para as amostras extraídas e 0,9% para as amostras não extraídas.

**Tabela 7.** Recuperação de diclofenaco e de DICCCIC.

CQs	Estatística	Diclofenaco	DICCCIC
CQB	DPR (%)	5,75/2,09	1,22/0,68
	Recuperação (%)	98,79	104,58
CQM	DPR (%)	4,25/0,98	1,74/1,95
	Recuperação (%)	93,67	90,61
CQA	DPR (%)	4,52/0,43	10,35/7,67
	Recuperação (%)	90,13	87,14
Total	DPR (%)	4,4	9,2
	Recuperação (%)	94,19	94,11

DPR: DPR de cinco replicatas de CQ extraído/DPR de três replicatas não extraídas, CQB controle de qualidade baixo, CQM controle de qualidade médio e CQA controle de qualidade alto.

A recuperação não possui critérios de aceitação, no entanto recuperações próximas de 100% são desejáveis.

### 6.2.6 Estabilidade

As estabilidades de DICCCIC e de diclofenaco podem ser observadas nas Tabelas 8 e 9.

**Tabela 8.** Estabilidade do diclofenaco.

CQs	Estatística	CD 6h	CD 24h	PP 6h 4°C	PP 24h -80°C	CCD -20°C	LD 9 dias -20°C	LD 120 dias -20°C
	n	4	4	3	4	4	3	4
CQB	DPR (%)	5,6	0,7	2,4	5,2	6,2	8,1	4,9
	Exatidão (%)	102,0	93,5	102,5	97,0	98,6	109,5	96,6
	n	4	4	4	4	4	4	4
CQA	DPR (%)	2,0	6,0	2,9	4,9	1,8	3,3	2,1
	Exatidão (%)	92,1	97,3	98,1	97,7	95,3	99,8	101,4

DPR desvio padrão relativo, CQB controle de qualidade baixo, CQA controle de qualidade alto, CD curta duração a temperatura da sala de processamento, PP pós-processamento, CCD após 3 ciclos de congelamento e descongelamento e LD longa duração.

**Tabela 9.** Estabilidade do DICCIC. CD= curta duração a temperatura da sala de processamento; PP= pós-processamento; CCD= após 3 ciclos de congelamento e descongelamento; e LD= longa duração. FC= falhou no critério de aceitação.

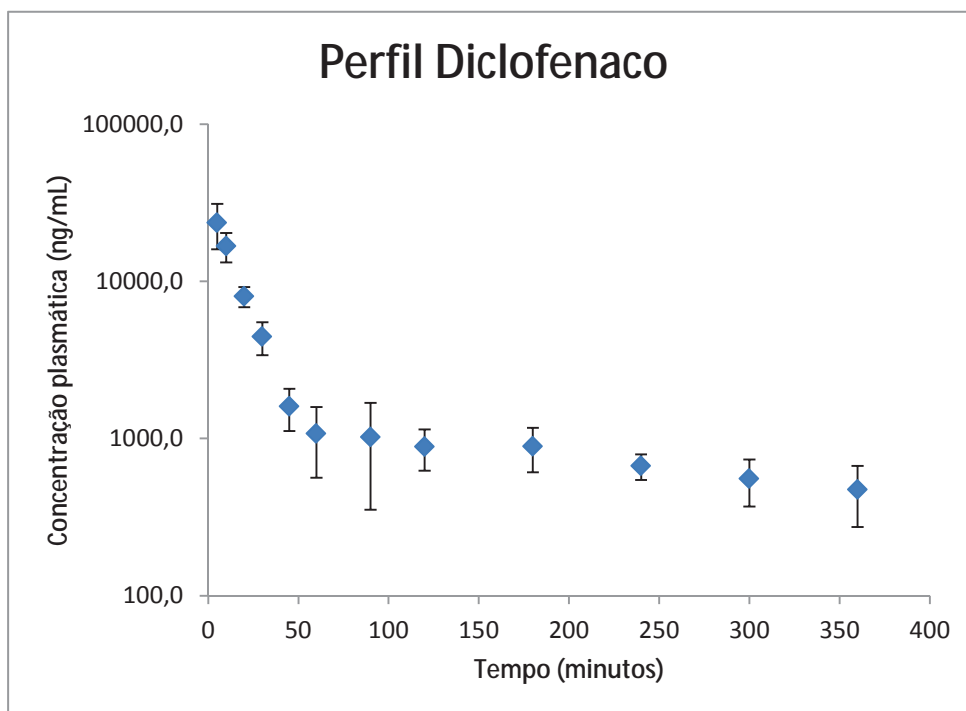
CQs	Estatística	CD 6h	CD 24h	PP 6h 4°C	PP 24h -80°C	CCD -20°C	LD 9 dias -20°C	LD 120 dias -20°C
	n	3	4	3	4	4	3	4
CQB	DPR (%)	8,5	5,4	5,6	4,7	1,8	9,3	6,2
	Exatidão (%)	91,6	FC	112,3	88,4	97,3	88,5	97,6
	n	4	4	4	4	4	4	4
CQA	DPR (%)	1,5	2,8	3,6	2,2	5,3	3,4	0,7
	Exatidão (%)	88,6	FC	102,3	96,4	90,5	88,1	86,4

DPR desvio padrão relativo, CQB controle de qualidade baixo, CQA controle de qualidade alto, CD curta duração a temperatura da sala de processamento, PP pós-processamento, CCD após 3 ciclos de congelamento e descongelamento e LD longa duração.

Os compostos são considerados estáveis quando não se observa desvio maior que 15% do valor obtido nas amostras recém preparadas. O diclofenaco foi estável em todas as condições avaliadas, já o DICCIC não se manteve estável apenas após o armazenamento por 24h na temperatura da sala de processamento.

### 6.3. Análise Farmacocinética

Na **Figura 21** pode ser observada a curva média de concentração plasmática *versus* tempo, construída após a administração intravenosa de diclofenaco sódico (8,1 mg/kg equivalente a diclofenaco).

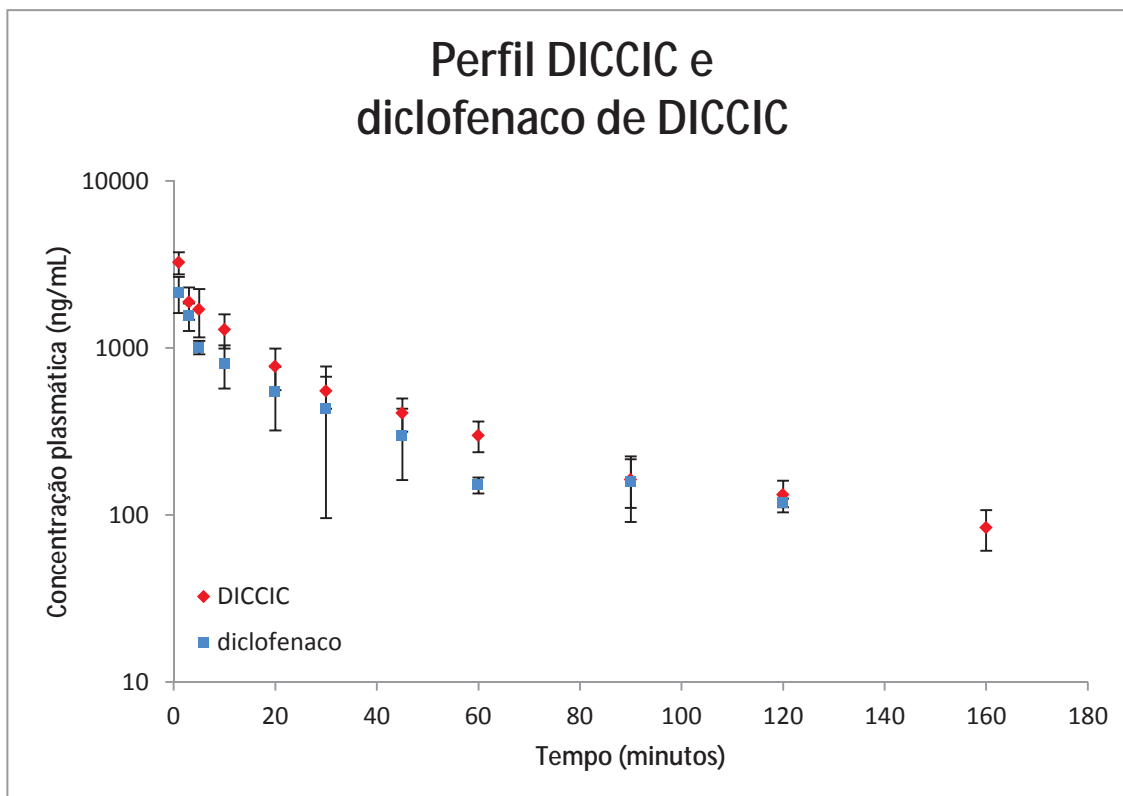


**Figura 21** Curva da concentração plasmática versus tempo para o diclofenaco (n=5, média  $\pm$  IC95).

A inspeção da curva permitiu observar um decaimento das concentrações plasmáticas em pelo menos duas velocidades, o que levou a aplicação de um modelo bicompartimental. Nesse modelo, o intervalo de tempo da primeira velocidade de decaimento da curva representa a influência da distribuição somada à eliminação para levar a queda das concentrações plasmáticas. A segunda velocidade de decaimento ocorre após o equilíbrio da distribuição, nesse intervalo a diminuição nas concentrações é apenas dependente da eliminação.

O mesmo modelo foi selecionado para a interpretação dos dados de concentração plasmática pelo tempo do grupo DICCIC (**Figura 22**), que recebeu 7,6 mg/kg de DICCIC (equimolar a 8,1mg/kg de diclofenaco), neste grupo foram

quantificadas concentrações plasmáticas tanto do pró-fármaco DICCIC quanto de diclofenaco que se formou por hidrólise do pró-fármaco.



**Figura 22** Curva da concentração plasmática versus tempo para o DICCIC e para o diclofenaco a partir da administração de DICCIC (n=5, média  $\pm$  IC95).

Esses dados permitiram o cálculo dos parâmetros farmacocinéticos relacionados na **Tabela 10**. Os parâmetros Vd e Cl não foram calculados para o diclofenaco a partir de DICCIC devido a não haver a dose, já que a quantidade conhecida administrada foi de DICCIC e não é possível considerar que 100% do DICCIC foi hidrolisado a diclofenaco.

A constante de eliminação é um parâmetro que pode expressar a eficiência da eliminação, quando considerado o seu valor numérico em percentual, já que como constante é um fator difícil de visualizar. Para o diclofenaco a constante de eliminação foi de  $0,00414 \text{ min}^{-1}$ , o que significa que na fase de eliminação, quando a distribuição já está em equilíbrio (ou como alguns autores preferem, pseudo-equilíbrio), 0,414 % do diclofenaco é eliminado por minuto (TOUTAIN; BOUSQUET-MÉLOU, 2004b).

A  $t_{1/2}$  (parâmetro diretamente relacionado à constante de eliminação) do diclofenaco a partir de diclofenaco (188,3 minutos) foi intermediária aos valores publicados por Garcia-Lopez e colaboradores (1999), Kim e colaboradores (2006) e por León-Reyes e colaboradores (2008). O primeiro apresentou um resultado abaixo da média deste estudo (2,24 h) o segundo, um valor bem próximo (175 min) e o último um pouco acima (3,28 h).

**Tabela 10.** Parâmetros farmacocinéticos de diclofenaco, de DICCIC e de diclofenaco a partir da administração de DICCIC (n=5, mediana e média  $\pm$  IC95).

Parâmetros	Diclofenaco de DICCIC	DICCIC	Diclofenaco
$\beta$ ( $\text{min}^{-1}$ )	0,01537	0,01437	0,00414*
	0,01424 $\pm$ 0,00264	0,01445 $\pm$ 0,00336	0,00398 $\pm$ 0,00143
$t_{1/2\beta}$ (min)	45,1	48,2	167,4*
	49,7 $\pm$ 10,9	49,4 $\pm$ 12,1	188,3 $\pm$ 78
ASC <sub>0-inf</sub> (ug/mL.min)	49,1	72,6*	699,3*
	48,8 $\pm$ 4,2	67,5 $\pm$ 11,4	698,7 $\pm$ 76,7
Cl (mL/min.Kg)	—	104,8	11,6
	—	114,4 $\pm$ 21,1	11,7 $\pm$ 1,3
Vd (L/Kg)	—	8,5	2,8
	—	8,1 $\pm$ 1,9	3,1 $\pm$ 1,1
tss (min)	14,0	20,9*	31,6*
	15,6 $\pm$ 4,4	21,6 $\pm$ 4,0	33,6 $\pm$ 6,6
$\alpha$ ( $\text{min}^{-1}$ )	0,198	0,120	0,099
	0,190 $\pm$ 0,087	0,112 $\pm$ 0,039	0,105 $\pm$ 0,03
$t_{1/2\alpha}$ (min)	3,5	5,8	7,0
	4,0 $\pm$ 1,7	6,6 $\pm$ 2,4	7,0 $\pm$ 2,5

\* diferença significativa comparada ao diclofenaco a partir da administração de DICCIC ( $p < 0,05$ , teste Mann Whitney).

A ASC<sub>0-∞</sub> do diclofenaco também foi proporcionalmente semelhante ao valor de Kim e colaboradores (2006), cuja dose administrada naquele trabalho foi de 5 mg/kg IV, levando a uma ASC<sub>0-∞</sub> de 367  $\mu\text{g}\cdot\text{min}/\text{mL}$ .

Ainda considerando a publicação de Kim e colaboradores (2009), não há grande discrepância entre o Cl<sub>nr</sub> desta publicação (13,6 ml/min/Kg) e o Cl total de



diclofenaco descrito na **Tabela 10**. Kim e colaboradores também apresentam o  $Cl_r$  do diclofenaco de 0,0261 ml/Kg, um valor ínfimo em comparação ao  $Cl_{nr}$ , o que reforça o baixo  $Cl_r$  do diclofenaco (<1%), mesmo em humanos (BRUNTON et al., 2006, p. 1794).

Para uma avaliação isolada do CI deve ser salientado que existe uma razão para que o CI seja dado em uma unidade de fluxo, apesar de ser um parâmetro de eliminação do fármaco, que é uma massa. Cada célula depuradora tem a capacidade de metabolizar uma determinada quantidade de fármaco em função do tempo (massa/tempo), entretanto o acesso da célula a essa quantidade é dividido pela concentração disponível (massa/volume), resultando em um fluxo (volume/tempo). O fluxo máximo que pode ser depurado é o fluxo máximo do órgão depurador (Q). Desse fluxo, apenas uma parte é depurada, que pode ser nada (0) ou tudo (1), esse valor entre 0 e 1 é a taxa de extração, que pode ser considerada como o percentual do fármaco que é eliminado durante uma única passagem pelo órgão eliminador (TOUTAIN; BOUSQUET-MÉLOU, 2004a).

Fígado e rins (principais órgãos depuradores) representam metade do fluxo máximo do corpo, que é o débito cardíaco (DC), portanto o CI máximo de um fármaco é a metade do DC do modelo animal avaliado, qualquer valor acima disso, indica eliminação por outros órgãos. O mesmo deve ser considerado para a taxa de extração (E), como apenas metade do débito cardíaco é representado por fígado e rins a taxa de extração máxima de uma fármaco para esses órgãos é de 0,5 (TOUTAIN; BOUSQUET-MÉLOU, 2004a).

Pelo CI de diclofenaco a partir de diclofenaco da **Tabela 10**, o diclofenaco pode ser considerado de baixa extração pela relação abaixo:

**Equação 14.**

$$E = \frac{Cl}{DC}$$

Onde E é a extração corporal do fármaco e DC é o débito cardíaco do organismo, a ser calculado pela **equação 15**, onde m é a massa corporal do organismo, independente da espécie.

**Equação 15.**

$$DC (ml/min/Kg) = 180 \times m(Kg)^{-0,19}$$

Considerando a massa dos ratos de 0,275 Kg, a taxa de extração do diclofenaco é (0,05), portanto seu valor de Cl (11,7 ml/min/kg) pode ser considerado um baixo Cl para esse modelo animal. O DICCIC, por sua vez, possui uma taxa de extração de 0,5 o que permite concluir que seu Cl é muito alto, já que um Cl alto seria aquele, cuja taxa de extração fosse em torno de 0,35 (TOUTAIN; BOUSQUET-MÉLOU, 2004a).

O Vd calculado por Kim e colaboradores (2006) foi o  $Vd_{ss}$  que é naturalmente diferente do Vd da **Tabela 10**,  $Vd_{\text{área}}$ . Entretanto pelos dados publicados por Kim, pode-se supor o  $Vd_{\text{área}}$  de seu estudo em torno de 3,4 L/Kg, não muito distante dos 3,1 L/Kg da **Tabela 10**.

Os parâmetros discutidos anteriormente são os mais constantemente publicados, o que não ocorre com o  $t_{ss}$ , o  $k_{\alpha}$  e a  $t_{1/2\alpha}$ .

As comparações de dic-DC e dic-dic mostraram diferença significativa em  $\beta$ , na  $t_{1/2\beta}$ , na ASC e no  $t_{ss}$ . A diferença entre esses parâmetros indica uma mudança no perfil de eliminação de diclofenaco, quando administrado como DICCIC. Até o tss, pode ter essa influencia, já que uma diminuição na meia-vida de eliminação permite o adiantamento de tss, mesmo que não haja diferença na  $t_{1/2\alpha}$ . A ASC, por sua vez, pode refletir tanto esse aumento na eliminação do dic-DC, quanto uma fraca conversão de DICCIC em diclofenaco.

**Tabela 11.** Disponibilidade do diclofenaco de DICCIC (n=5).

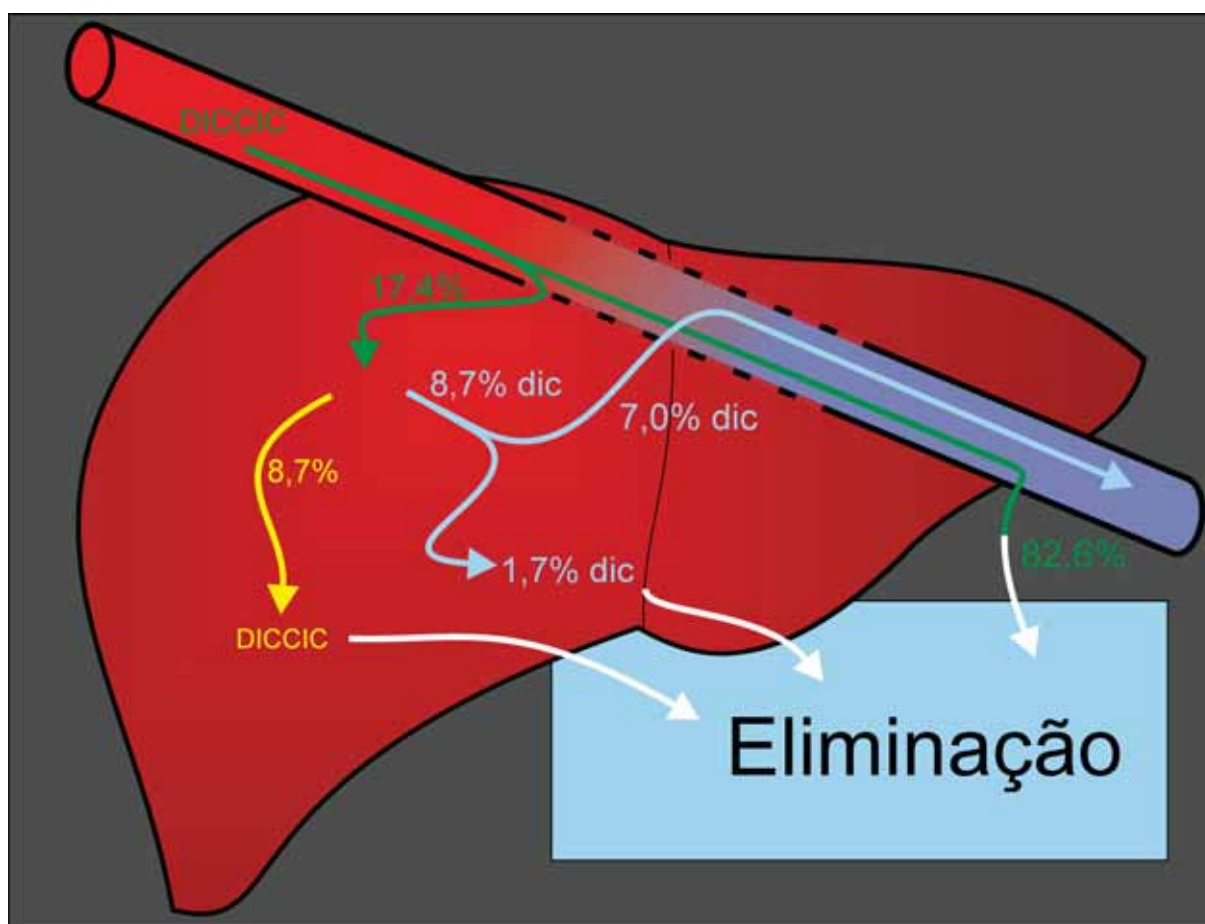
Parâmetro	Mediana	Média	$\pm$ IC 95
fm	0,1809	0,174487	0,0287
1-fm	0,8191	0,825513	0,0287
$F_H(m)$	0,388132	0,406475	0,0626
RBA	0,070213	0,070015	0,0033
$Cl_f$ mL/min/Kg	19,56652	19,6532	0,8349

A **Tabela 11** permite algumas considerações sobre a disponibilidade de dic-DC, mediante a pressuposição de alto metabolismo hepático do diclofenaco. O parâmetro fm (17 %) é referente a fração de DICCIC que foi hidrolisada no fígado, e desta fração apenas  $F_H(m)$  (41%) chegou ao sangue na forma de diclofenaco. Do total da dose esse valor é o indicado por RBA (7%), portanto têm-se a relação abaixo.

Equação 16.

$$RBA = F_H(m) \times fm$$

Pode ser assumido então que a baixa disponibilidade de dic-DC é devida a uma alta eliminação extra-hepática (83%) de DICCIC. Essa consideração é plausível considerando que o CI corporal de DICCIC (114,4 ml/min/Kg) está acima do valor considerado alto (80,5 no rato), e bem próximo do CI máximo para fígado e Rins juntos (115 ml/min/Kg). Outro agravante é o metabolismo sequencial que pode ser alcançado pela relação entre os CI de dic-dic sobre CI de DICCIC, cujo valor foi 10,4% (IC95 de  $\pm 3$ ) do fm, ou seja, hidrólise de DICCIC seguida por eliminação direta de diclofenaco (TOUTAIN et al., 1986).



**Figura 23** Pictograma da disponibilidade do diclofenaco (dic) de DICCIC. Da dose total DICCIC administrada IV apenas 17,4 % é hidrolisada no fígado, destes, 7,0% retornaram a circulação sistêmica como diclofenaco, 1,7% se torna diclofenaco e é eliminado sem voltar a corrente sanguínea e 8,7% é eliminado hepaticamente, mas sem se tornar diclofenaco. 17,4 % = fm; 7,0 % = RBA =  $F_{H(m)} \times fm$ ; 1,7 % = fm  $\times$  metabolismo sequencial; e 82,6 % = 1 - fm.

O  $Cl_f$  oferece uma visão em fluxo desses fenômenos. Apesar de o corpo depurar 114,4 mL/min/Kg de DICCCIC, o fígado conseguiu depurar apenas 19,7 ml/min/Kg por meio da formação de metabólitos de DICCCIC, é o chamado fluxo hepático efetivo.

As considerações quanto à comparação de dic-DC com DC, têm o objetivo de determinar as características de interdependência do metabólito em relação ao fármaco. Como a constante de eliminação do dic-dic é menor que a constante de eliminação de DICCCIC era esperado que houvesse uma persistência de dic-DC, com aumento da meia-vida e concentrações maiores de dic-DC em relação a DC. Isso caracterizaria uma eliminação independente da constante de formação e da constante de eliminação do pró-fármaco e somente dependente das características próprias de eliminação do metabólito (**figura 11a**). Entretanto a comparação estatística não mostrou diferença significativa entre as constantes de eliminação de dic-DC e DC, o que caracteriza uma eliminação formação limitada (**figura 11b**).

O perfil de DICCCIC apresentou uma reduzida  $t_{1/2}$ , pois se fizermos um paralelo simplificado com a  $t_{1/2}$  da **Tabela 10** e o intervalo de dose do diclofenaco em humanos, o intervalo de uma dose de DICCCIC equimolar a dose de diclofenaco tomada a cada 8 horas, seria em torno de pouco mais de 2 horas, o que não é um regime posológico interessante.

A análise do  $V_d$  depende de entender a relação entre o volume de distribuição e a distribuição. O volume plasmático de um rato é de aproximadamente 28 mL/kg, portanto um valor de  $V_d$  de até 0,028 L/kg indicaria que não há distribuição extravascular. Se o  $V_d$  estiver entre 0,028 L/kg e 1 L/kg, significa que o fármaco se distribui, mas não se liga aos tecidos. Já um  $V_d$  acima de 1 L/kg significa que o fármaco não só se distribui para compartimentos periféricos, como se liga a proteínas teciduais nesse compartimento.

O  $V_d$  do DICCCIC de 8,1 L/kg, pelo modelo fisiológico de Toutain e Bousquet-Mélou (2004c), pode ser considerado alto, esse valor sugere ainda uma alta ligação extravascular. Essa avaliação pode correlacionar a alta eliminação extra-hepática (83%) com a  $t_{1/2}$  e a ASC reduzida. Seria errôneo assumir o alto  $V_d$  como causa da baixa ASC, pois é o  $Cl$  que controla a ASC e não  $V_d$  (TOUTAIN; BOUSQUET-MÉLOU, 2004c). Assim sendo, o  $Cl$  (extra-hepático) pode estar facilitado pela grande disposição do produto em outros tecidos.

Há ainda a possibilidade de um CI renal do DICCIC, que só pode ser apurado por uma análise das concentrações urinárias do fármaco. Ainda assim o CI renal máximo para um rato é de 46 mL/min/kg, somado ao CI teórico calculado (19,7 ml/min/kg) resultando em 65,7 ml/min/kg. Portanto os 48,7 ml/min/kg restantes (114,4 ml/min/kg – 65,7 ml/min/kg) ainda podem estar relacionados com uma eliminação em tecidos fora do compartimento central.

## 7. CONCLUSÕES

O DICCIC obtido com sucesso, confirmado por comparação cromatográfica com lote estruturalmente caracterizado, mostrou a qualidade adequada para realização dos ensaios de validação e farmacocinética.

O método bioanalítico validado demonstrou limites de confiança adequados a sua aplicação e permitiu a determinação tanto do DICCIC, quanto do diclofenaco simultaneamente, o que reduziu tempo e permitiu o uso de menos animais, já que uma mesma amostra foi utilizada para a determinação dos dois compostos.

O perfil farmacocinético do diclofenaco a partir da administração de diclofenaco foi condizente com parâmetros publicados na literatura.

O perfil farmacocinético de diclofenaco a partir de DICCIC se mostrou significativamente diferente do perfil após administração de diclofenaco. As concentrações plasmáticas foram significativamente menores e a depuração significativamente maior na administração do pró-fármaco.

Em estudos anteriores, observou-se efeito anti-inflamatório do produto, comparável à administração da mesma dose equimolar do fármaco matriz. Neste caso, podem ser levantadas inúmeras hipóteses : que o efeito máximo é atingido em baixas concentrações do fármaco matriz, que o pró-fármaco possui atividade anti-inflamatória per se, ou que o efeito observado seja resultante da interação do pró-fármaco com seu fármaco matriz. A realização de ensaios de ação anti-inflamatória *in vitro* do DICCIC pode auxiliar na elucidação destas hipóteses.

Os próximos estudos de farmacocinética pré-clínica podem incluir ensaios pela via oral para avaliar a biodisponibilidade oral do DICCIC e a biodisponibilidade relativa oral do diclofenaco a partir de DICCIC. O entendimento experimental das vias de eliminação sugere a necessidade de recolhimento e análise de fezes e urina. Enquanto uma análise de alguns tecidos pode avaliar a alta distribuição do DICCIC e se há formação de diclofenaco nesses tecidos.

**8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS<sup>2</sup>**

Abordo EA, Bowden K, Huntington AP, et al. Prodrugs. Part 3. 2-Formylphenyl esters of indomethacin, ketoprofen and ibuprofen and 6-substituted 2-formyl and 2-acylphenyl esters of aspirin. *Farmaco*. 1998 Fev;53(2):95-101.

Agência Nacional de Vigilância Sanitária [http://portal.anvisa.gov.br]. Bulário eletrônico [acesso em 28 fev 2012]. Disponível em: [http://www4.anvisa.gov.br/BularioEletronico/default.asp?txtPrincipioAtivo=DICLOFENACO&txtMedicamento=&txtEmpresa=&HidLetra=&HidTipo=normal&vOrdem=&tp\\_bul a=&vclass=&pagina=1](http://www4.anvisa.gov.br/BularioEletronico/default.asp?txtPrincipioAtivo=DICLOFENACO&txtMedicamento=&txtEmpresa=&HidLetra=&HidTipo=normal&vOrdem=&tp_bul a=&vclass=&pagina=1)

Ahmed M, Khanna D, Furst DE. Meloxicam in rheumatoid arthritis [resumo]. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*. 2005 Dez;1(4):739-51.

Aithal GP, Day CP. Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drug-Induced Hepatotoxicity. *Clin Liver Dis*. 2007 Ago;11(3):563-75.

Akaogi J, Nozaki T, Satoh M, et al. Role of PGE2 and EP Receptors in the Pathogenesis of Rheumatoid Arthritis and as a Novel Therapeutic Strategy. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets*. 2006 Dez;6(4):383-94.

Argoff CE. Pharmacologic management of chronic pain. *J Am Osteopath Assoc*. 2002 Set;102(9 Suppl 3):S21-7.

Bansal AK, Khar RK, Dubey R, et al. Activity Profile of Glycolamide Ester Prodrugs of Ibuprofen. *Drug Dev Ind Pharm*. 2001 Jan;27(1):63-70.

Berenbaum F. New horizons and perspectives in the treatment of osteoarthritis. *Arthritis Res Ther*. 2008;10 Suppl 2:S1.

Bertolini A, Ottani A, Sandrini M. Dual Acting Anti-inflammatory Drugs: A Reappraisal. *Pharmacol Res*. 2001 Dez;44(6):437-50.

Bonina F, Trombetta D, Borzi A, et al. 1-ethylazacycloalkan-2-one indomethacin esters as new oral prodrugs: chemical stability, enzymatic hydrolysis, anti-inflammatory activity and gastrointestinal toxicity. *Int J Pharm*. 1997 Out;156(2):245-50.

Bonina FP, Montenegro L, Caprariis P, et al. Pharmacokinetic and pharmacodynamics profile of triethylene glycol indomethacin ester as a new oral prodrug. *J Control Release*. 1996 Set;41(3):187-93.

Botting R, Ayoub SS. COX-3 and the mechanism of action of paracetamol/acetaminophen. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*. 2005 Fev;72(2):85-7.

Braga VA, Soriano RN, Braccialli AL, de Paula PM, et al. Involvement of L-glutamate and ATP in the neurotransmission of the sympathoexcitatory component of the

---

<sup>2</sup> Referências bibliográficas, segundo o estilo de Vancouver.

chemoreflex in the commissural nucleus tractus solitarii of awake rats and in the working heart-brainstem preparation. *J Physiol*. 2007 Jun;581(3):1129-45.

Brooks P, Kubler P. Etoricoxib for arthritis and pain management. *Ther Clin Risk Manag*. 2006 Mar;2(1):45-57.

Brunton LL, Lazo JS, Parker KL, editores. Goodman and Gilman's. The pharmacological basis of therapeutics. 11<sup>a</sup> ed. New York: The McGraw-Hill Companies, 2006. Table A.II.I, Pharmacokinetic Data; p. 1794.

Buggins TR, Dickinson PA, Taylor G. The effects of pharmaceutical excipients on the drug disposition. *Adv Drug Deliv Rev*. 2007 Dez;59(15):1482-503.

Burke A, Smyth EM, Fitzgerald G.A. Capítulo 26. Analgesic-Antipyretic Agents: Pharmacotherapy of gout. In: Brunton LL, Lazo JS, Parker KL, editores. Goodman and Gilman's. The pharmacological basis of therapeutics. 11<sup>a</sup> ed. New York: The McGraw-Hill Companies; 2006. p. 671-716.

Carrillo-Jimenez R, Nurnberger M. Celecoxib-induced acute pancreatitis and hepatitis: a case report. *Arch Intern Med*. 2000 Fev;160(4):553-4.

Cattani VB, Pohlmann AR, Dalla Costa T. Pharmacokinetic evaluation of indomethacin ethyl ester-loaded nanoencapsules. *Int J Pharm*. 2008 Nov;363(1-2):214-6.

Chamouard P, Walter P, Baumann R, et al. Prolonged cholestasis associated with short-term use of celecoxib. *Gastroenterol Clin Biol*. 2005 Dez;29(12):1286-8.

Chan C, Boyce S, Brideau C, et al. Rofecoxib [Vioxx, MK-0966; 4-(4'-methylsulfonylphenyl)-3-phenyl-2-(5H)-furanone]: a potent and orally active cyclooxygenase-2 inhibitor. Pharmacological and biochemical profiles. *J Pharmacol Exp Ther*. 1999 Aug;290(2):551-60.

Chandrasekar MJN, Ravichandran M, Nanjan MJ, et al. Synthesis and Evaluation of a Nonsteroidal Anti-inflammatory Polymeric Prodrug for Sustained and Site-Specific Delivery. *Drug Dev Ind Pharm*. 2001 Out;27(9):959-64.

Chandrasekharan NV, Dai H, Roos KLT, et al. COX-3, a cyclooxygenase-1 variant inhibited by acetaminophen and other analgesic/antipyretic drugs: Cloning, structure, and expression. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002 Out 15;99(21):13926-31.

Chandrasekharan NV, Simmons DL. The cyclooxygenases. *Genome Biol*. 2004;5(9):241.

Chen Z, Scudiere JR, Montgomery E. Medication-induced upper gastrointestinal tract injury. *J Clin Pathol*. 2009 Fev;62(2):113-9.

Chiu SHL, Thompson KA, Vincent SH, et al. The Role of Drug Metabolism in Drug Discovery: A Case Study in the Selection of an Oxytocin Receptor Antagonist for Development. *Toxicol Pathol*. 1995 Mar;23(2):124-30.



Chung MC, Santos JL, Oliveira EV, et al. Synthesis, ex Vivo and x Vivo Hydrolysis Study of an Indoline Derivative Designed as an Anti-Inflammatory with Reduced Gastric Ulceration Properties. *Molecules*. 2009 Ago 26;14(9):3187-97.

Cioli V, Putzolu S, Rossi V, et al. A Toxicological and Pharmacological Study of Ibuprofen Guaiacol Ester (AF 2259) in the Rat. *Toxicol Appl Pharmacol*. 1980 Jun 30;54(2):332-9.

Coimbra IB, Pastor EH, Greve JMA. Consenso brasileiro para o tratamento da osteoartrite. *Ver Bras Reumatol*. 2002 Nov;42(6):371-4.

Curry SL, Cogar SM, Cook JL. Nonsteroidal Antiinflammatory Drugs: A Review. *J Am Anim Hosp Assoc*. 2005 Set;41(5):298-309.

Dajani EZ, Islam K. Cardiovascular and Gastrointestinal Toxicity of Selective Cyclooxygenase-2 Inhibitors in Man. *J Physiol Pharmacol*. 2008 Aug;59 Suppl 2:117-33.

De Paula PM, Castania JA, Bonagamba LGH, et al. Hemodynamic responses to electrical stimulation of the aortic depressor nerve in awake rats. *Am J Physiol*. 1999 Jul;277:31-8.

Dooley M, Spencer M, Dunn CJ. Aceclofenac. A Reappraisal of its Use in the Management of Pain and Rheumatic Disease. *Drugs*. 2001;61(9):1351-78.

Ead HM. Selective and Nonselective Nonsteroidal Anti-inflammatory Drugs in Perianesthesia Pain Management. *J Perianesth Nurs* 2008 Out;23(5):335-41.

Ettmayer P, Amidon GL, Clement B, et al. Lessons Learned from Marketed and Investigational Prodrugs. *J Med Chem*. 2004 Mai;47(10):2393-404.

Fendrick AM, Greenberg BP. A review of the benefits and risks of nonsteroidal anti-inflammatory drugs in the management of mild-to-moderate osteoarthritis. *Osteopath Med Prim Care*. 2009 Jan;3:1-7.

Firuzi O, Praticò D. Coxibs and Alzheimer's Disease: Should They Stay or Should They Go? *Ann Neurol*. 2006 Fev;59(2):219-28.

Fitzgerald GA, Patrono C. The Coxibs, Selective Inhibitors of Cyclooxygenase-2. *N Engl J Med*. 2001 Ago 9;345(6):433-42.

Fu LX, Jiang ZG, Ding HZ, et al. Population pharmacokinetics of enrofloxacin and its active metabolite ciprofloxacin in ill cows. *J Vet Pharmacol Ther*. 2008 Jun;31(3):240-5.

Funk CD, Fitzgerald GA. COX-2 Inhibitors and Cardiovascular Risk. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2007 Nov;50(5):470-9.

Galan MV, Gordon SC, Silverman AL. Celecoxib-induced cholestatic hepatitis. *Ann Intern Med*. 2001 Fev;134(3):254.

Galanakis D, Kourounakis AP, Tsiakitzis KC, et al. Synthesis and pharmacological evaluation of amide conjugates of NSAIDs with L-cysteine ethyl ester, combining potent anti-inflammatory and antioxidant properties with significantly reduced gastrointestinal toxicity. *Bioorg Med Chem Lett*. 2004 Jul 16;14(14):3639-43.

Gan TJ. Diclofenac: an update on its mechanism of action and safety profile. *Curr Med Res Opin*. 2010 Jul;26(7):1715-31.

García-López P, Salas R. Bioavailability of diclofenac after intramuscular administration to rats with experimental spinal cord injury. *J Pharmacol Toxicol Methods*. 1999 Oct;42(2):99-101.

Giorgi M, Yun H. Pharmacokinetics of mirtazapine and its main metabolites in Beagle dogs: A pilot study. *Vet J*. 2011 Jun: [3 p.]

Gómez-Léchon MJ, Lahoz A, Gombau L, et al. In Vitro Evaluation of Potential Hepatotoxicity Induced by Drugs. *Curr Pharm Des*. 2010 Jun;16(17):1963-77.

Grass GM, Sinko PJ. Physiologically-based pharmacokinetic simulation modeling. *Adv Drug Deliv Rev*. 2002 Mar;54(3):433-51.

Grigoleit HG, Grigoleit P. Pharmacology and preclinical pharmacokinetics of peppermint oil. *Phytomedicine*. 2005 Ago;12(8):612-6.

Guia para Validação de Métodos Analíticos e Bioanalíticos. Brasília: Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA, Brasil); 2003 Fev.17 p. Resolução N°: 899.

Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation. Rockville: U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration (FDA), Center for Drug Evaluation and Research (CDER), Center for Veterinary Medicine (CVM); 2001 Mai. 25 p.

Halen PK, Murumkar PR, Giridhar R, et al. Prodrug Designing of NSAIDs. *Mini Rev Med Chem*. 2009 Jan;9(1):124-39.

Harsch IA, Michaeli P, Hahn EG, et al. A rare case of rofecoxib-induced cholestatic. *Dig Liver Dis*. 2003 Dez;35(12):911-2.

He G, Massarella J, Ward P. Clinical Pharmacokinetics of the Prodrug Oseltamivir and its Active Metabolite Ro 64-0802. *Clin Pharmacokinet*. 1999 Dez;37(6):471-84.

Hilário MOE, Terreri MT, Len CA. Anttinflamatórios não-hormonais: inibidores da ciclooxigenase 2. *J Pediatr*. 2006 Nov;82 Suppl 5:S206-12.

Hinz B, Auge D, Rau T, et al. Simultaneous determination of aceclofenac and three of its metabolites in human plasma by high-performance liquid chromatography. *Biomed Chromatogr*. 2003 Jun;17(4):268-75.

Hinz B, Chevts J, Renner B, et al. Bioavailability of diclofenac potassium at low doses. *Br J Clin Pharmacol*. 2005 Jan;59(1):80-4.

Hirabayashi H, Sawamoto T, Fujisaki J, et al. Dose-Dependent Pharmacokinetics and Disposition of Bisphosphonic Prodrug of Diclofenac Based on Osteotropic Drug Delivery System (ODDS). *Biopharm Drug Dispos.* 2002 Nov;23(8):307-15.

Hong SP, Chang KS, Koh YY, et al. Effects of Lovastatin on the Pharmacokinetics of Verapamil and its Active Metabolite, Norverapamil in Rats: Possible Role of P-glycoprotein Inhibition by Lovastatin. *Arch Pharm Res.* 2009 Oct;32(10):1447-52.

Houston JB. Drug Metabolite Kinetics. *Pharmacol Ther.* 1982;15(3):521-52.

Hsieh PW, Hung CF, Fang JY. Current Prodrug Design for Drug Discovery. *Curr Pharm Des.* 2009;15(19):2236-50.

Huisinga W, Telgmann R, Wulkow M. The virtual laboratory approach to pharmacokinetics: design principles and concepts. *Drug Discov Today.* 2006 Set;11(17-18):800-5.

Hussain MA, Hassan Z, Haseeb MT, et al. Fabrication of potential macromolecular prodrugs of aspirin and diclofenac with dextran. *Pak J Pharm Sci.* 2011 Oct;24(4):575-81.

Huster D, Schubert C, Berr F, et al. Rofecoxib-induced cholestatic hepatitis: treatment with molecular adsorbent recycling system (MARS). *J Hepatol.* 2002 Set;37(3):413-4.

Imai T, Fukuhara A, Ueda I, et al. An Evaluation of a Anti-Inflammatory-Histamine H<sub>2</sub> Antagonist Drug Complex on Gastric Erosions in the Rat. *J Pharmacol Exp Ther.* 1993 Abr;265(1):328-33.

Jackson AJ, Robbie G, Marroum P. Metabolites and Bioequivalence: Past and Present. *Clin Pharmacokinet.* 2004;43(10):655-72.

Jang GR, Harris RZ, Lau DT. Pharmacokinetics and Its Role in Small Molecule Drug Discovery Research. *Med Res Rev.* 2001 Set;21(5):382-96.

Jiao H, Xu F, Zhang Z, et al. Simultaneous determination of ZLR-8 its active metabolite diclofenac in dog plasma by high-performance liquid chromatography. *Biomed Chromatogr.* 2007 Abr;21(4):382-8.

Joosten LA, Ea HK, Netea MG, et al. Interleukin-1 $\beta$  activation during acute joint inflammation: A limited role for the NLRP3 inflammasome in vivo. *Joint Bone Spine.* 2011 Mar;78(2):107-10.

Joslin JO. Blood Collection Techniques in Exotic Small Mammals. *J Ex Pet Med.* 2009 Abr;18(2):117-39.

Jung YJ, Lee JS, Kim YM. Synthesis and In Vitro/In Vivo Evaluation of 5-Aminosalicyl-Glycine as a Colon-Specific Prodrug of 5-Aminosalicylic Acid. *J Pharm Sci.* 2000 Mai;89(5):594-602.

- Kalgutkar AS, Hatch HL, Kosea F, et al. Preclinical Pharmacokinetics and Metabolism of 6-(4-(2,5-Difluorophenyl)oxazol-5-yl)-3-isopropyl-[1,2,4]-triazolo[4,3-a]pyridine, a Novel and Selective p38 $\alpha$  Inhibitor: Identification of an Active Metabolite in Preclinical Species and Human Liver Microsomes. *Biopharm Drug Dispos.* 2006 Nov;27(8):371-86.
- Kang W, Kim EY. Simultaneous determination of aceclofenac and its three metabolites in plasma using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Pharm Biomed Anal.* 2008 Feb;46(3):587-91.
- Kim YC, Oh EY, Kim SH, et al. Pharmacokinetics of Diclofenac in Rat Model of Diabetes Mellitus Induced by Alloxan or Streptozotocin. *Biopharm Drug Dispos.* 2006 Mar;27(2):85-92.
- Kojima F, Kato S, Kawai S. Prostaglandin E synthase in the pathophysiology of arthritis. *Fundam Clin Pharmacol.* 2005 Jun;19(3):255-61.
- Kourounakis PN, Tsiakitzis K, Kourounakis AP, et al. Reduction of gastrointestinal toxicity of NSAIDs via molecular modifications leading to antioxidant anti-inflammatory drugs. *Toxicology.* 2000 Apr 3;144(1-3):205-10.
- Laufer S. Role of Eicosanoids in structural degradation in osteoarthritis. *Curr Opin Rheumatol.* 2003 Set;15(5):623-7.
- Lee DY, Chung HJ, Choi YH, et al. Pharmacokinetics of ipriflavone and its two metabolites, M1 and M5, after the intravenous and oral administration of ipriflavone to rat model of diabetes mellitus induced by streptozotocin. *Eur J Pharm Sci.* 2009 Dez;38(5):465-71.
- Lee Y, Rodriguez C, Dionne RA. The Role of COX-2 in Acute Pain and the Use of selective COX-2 Inhibitors for Acute Pain Relief. *Curr Pharm Des.* 2005;11(14):1737-55.
- Lee YS, Choi YH, Yoon IS, et al. Pharmacokinetics of Mirodenafil and Its Two Metabolites, SK3541 and SK3544, in Spontaneously or DOCA-Salt-Induced Hypertensive Rats. *Biopharm Drug Dispos.* 2011 Jan;32(1):38-49.
- León-Reyes MR, Castañeda-Hernández G, Ortiz MI. Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Diclofenac in the Presence and Absence of Glibenclamida in the Rat. *J Pharm Pharm Sci.* 2008;11(3):68-76.
- Li X, Wang G, Wang S, et al. Pharmacokinetics of Guanfu Base I, an Active Metabolite of Guanfu Base A, in Rats. *Biol Pharm Bull.* 2005 Ago;28(8):1363-5.
- Li Z, Gan LS, Marbury T, et al. Pharmacokinetics of Oral Tonapofylline and Its Acyl-Glucuronide Metabolite in Patients With Mild and Moderate Hepatic Impairment. *J Clin Pharmacol.* 2011 Mai: [10 p.]
- Lill JS, O'Sullivan T, Bauer LA, et al. Pharmacokinetics of diclofenac sodium in chronic active hepatitis and alcoholic cirrhosis. *J Clin Pharmacol.* 2000 Mar;40(3):250-7.

Lisciotta CA, DeBold JF. Intravenous Administration of Progesterone and the Onset of Receptivity in Female Hamsters. *Physiol Behav.* 1991 Abr;49(4):679-83.

Loeffelbein DJ, Nieberler M, Steinsstraesser L, et al. Effects of ciclosporin therapy on xylazine/ketamine anaesthesia in a rat model. *J Vet Pharmacol Ther.* 2009 Fev;33(1):100-2.

Ma S, Chowdhury SK, Alton KB. Application of Mass Spectrometry for Metabolite Identification. *Curr Drug Metab.* 2006 Jun;7(5):503-23.

Mactutus CF, Herman AS, Booze RM. Chronic Intravenous Model for Studies of Drug (Ab)use in the Pregnant and/or Group-Housed Rat: An Initial Study With Cocaine. *Neurotoxicol Teratol.* 1994 Mar;16(2):183-91.

Mahfouz NM, Omar FA, Aboul-Fadl T. Cyclic amide derivatives as potential prodrugs II: N-hydroxymethylsuccinimide- / isatin esters of some NSAIDs as prodrugs with na improved therapeutic index. *Eur J Med Chem.* 1999 Jul-Ago;34(7-8):551-62.

Mamidi RNVS, Mullangi R, Kota J, et al. Pharmacological and Pharmacokinetic Evaluation of Celecoxib Prodrugs in Rats. *Biopharm Drug Dispos.* 2002 Out;23(7):273-82.

Masimirembwa CM, Bredberg U, Andersson TB. Metabolic Stability for Drug Discovery and Development. *Pharmacokinetic and Biochemical Challenges. Clin Pharmacokinet.* 2003;42(6):515-28.

Mauleón D, Artigas R, García ML, et al. Preclinical and clinical development of dexketoprofen [resumo]. *Drugs.* 1996;52 (Suppl 5):24-45.

Mcgeer PL, Mcgeer EG. NSAIDs and Alzheimer disease: Epidemiological, animal model and clinical studies. *Neurobiol Aging.* 2007 Mai;28(5):639-47.

Mishra A, Veerasamy R, Jain PK, et al. Synthesis, characterization and pharmacological evaluation of amide prodrugs of ketorolac. *Eur J Med Chem.* 2008 Nov;43(11):2464-72.

Moodley I. Review of the cardiovascular safety of COXIBs compared to NSAIDs. *Cardiovasc J Afr.* 2008 Mar-Abr;19(2):102-7.

Navarrete A, Oliva I, Sánchez-Mendoza ME, et al. Gastroprotection and effect of the simultaneous administration of Cuachalalate (*Amphipterygium adstringens*) on the pharmacokinetics and anti-inflammatory activity of diclofenac in rats. *J Pharm Pharmacol.* 2005 Dez;57(12):1629-36.

Neervannan S. Preclinical formulations for Discovery and toxicology: physicochemical challenges. *Expert Opin Drug Metab Toxicol.* 2006 Out;2(5):715-31.

Nemmani KVS, Mali SV, Borhade N, et al. NO-NSAIDs: Gastric-sparing nitric oxide-releasable prodrugs of non-steroidal anti-inflammatory drugs. *Bioorg Med Chem Lett.* 2009 Set 15;19(18):5297-301.

Ng LE, Halliwell B, Wong KP. Nephrotoxic cell death by diclofenac and meloxicam. *Biochem Biophys Res Commun*. 2008 Mai 9;369(3):873-7

Ogiso T, Iwaki M, Tanino T, et al. Pharmacokinetics of Indomethacin Ester Prodrugs: Gastrointestinal and Hepatic Toxicity and the Hydrolytic Capacity of Various Tissues in Rats. *Biol Pharm Bull*. 1996 Set;19(9):1178-83.

Panchagnula R, Thomas NS. Biopharmaceutics and pharmacokinetics in drug research. *Int J Pharm*. 2000 Mai;201(2):131-50.

Pang KS. A Review Metabolite Kinetics. *J Pharmacokinet Biopharm*. 1985 Dec;13(6):633-62.

Paradowska A, Maslinski W, Grzybowska-Kowalczyk A, et al. The function of interleukin 17 in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*. 2007 Set;55(5):329-34.

Parameswaran N, Patial S. Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  Signaling in Macrophages. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr*. 2010;20(2):87-103.

Paris GY, Garmaise DL, Cimon DG, et al. Glycerides as Prodrugs. 1. Synthesis and Antiinflammatory Activity of 1,3-Bis(alkanoyl)-2-(O-acetylsalicyloyl)glycerides (Aspirine Triglycerides). *J Med Chem*. 1979 Jun;22(6):683-7.

Paris GY, Garmaise DL, Cimon DG, et al. Glycerides as Prodrugs. 3. Synthesis and Antiinflammatory Activity of [1-(p-Chlorobenzoyl)-5-methoxy-2-methylindole-3-acetyl]glycerides (Indomethacin Glycerides). *J Med Chem*. 1980 Jan;23(1):9-13.

Patrono C, Rocca B. Nonsteroidal antiinflammatory drugs: Past, present and future. *Pharmacol Res*. 2009 Mai;59(5):285-9.

Pavelka K. A comparison of the therapeutic efficacy of diclofenac in osteoarthritis: a systematic review of randomised controlled trials [resumo]. *Curr Med Res Opin*. 2011 Dez.

Pelkonen O, Turpeinen M, Raunio H. In Vivo-In Vitro-In Silico Pharmacokinetic Modelling in Drug Development. *Clin Pharmacokinet*. 2011 Ago;50(8):483-91.

Peniston JH, Gold MS, Alwine LK. An Open-Label, Long-Term Safety and Tolerability Trial of Diclofenac Sodium 1% Gel in Patients with Knee Osteoarthritis. *Phys Sportsmed*. 2011 Set;39(3):31-8.

Perazella MA, Eras J. Are Selective COX-2 Inhibitors Nephrotoxic? *Am J Kidney Dis*. 2000 Mai;35(5):937-40.

Perrottet N, Decosterd LA, Meylan P, et al. Valganciclovir in Adult Solid Organ Transplant Recipients: pharmacokinetic and pharmacodynamic characteristics and clinical interpretation of plasma concentration measurements. *Clin Pharmacokinet*. 2009;48(6):399-418.

Prakash C, Shaffer CL, Nedderman A. Analytical Strategies for Identifying Drug Metabolites. *Mass Spectrom Rev.* 2007 Mai;26(3):340-69.

Prasit P, Wang Z, Brideau C, et al. The Discovery of Rofecoxib, [MK 966, Vioxx®, 4-(4'-methylsulfonylphenyl)-3-phenyl-2(5H)-furanone], an Orally Active Cyclooxygenase-2 Inhibitor. *Bioorg Med Chem Lett.* 1999 Jul 5;9(13):1773-8.

Quan I, Thiele GM, Tian J. et al. The Development of Novel Therapies for Rheumatoid Arthritis. *Expert Opin Ther Pat.* 2008 Jul;18(7):723-738.

Quevedo MA, Briñón MC. In vitro and in vivo pharmacokinetic characterization of two novel prodrugs of zidovudine. *Antiviral Res.* 2009 Aug;83(2):103-11.

Ramalho TC, Rocha MVJ, Cunha EFF, et al. The research for new COX-2 inhibitors: a review of 2002-2008 patents. *Expert Opin Ther Pat.* 2009 Set;19(9):1193-228.

Rang HP, Dale MM, Ritter JM, Flower RJ. Rang & Dale Farmacologia. 6ª ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2007. Capítulo 13, Hormônios Locais, Inflamação e Reações Imunológicas; p. 202-25.

Rang HP, Dale MM, Ritter JM, Moore PK. Farmacologia. 5ª ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2003. Capítulo 16, Fármacos antiinflamatórios e imunossupressores; p. 277-99.

Rautio J, Kumpulainen H, Heimbach T, et al. Prodrugs: design and clinical applications. *Nat Rev Drug Discov.* 2008 Mar;7(3):255-70.

Reyes-Gordillo K, Muriel P, Castañeda-Hernández G, et al. Pharmacokinetics of Diclofenac in Rats Intoxicated with CCL4, and in the Regenerating Liver. *Biopharm Drug Dispos.* 2007 Nov;28(8):415-22.

Ribeiro L, Silva N, Iley J, et al. Aminocarbonyloxymethyl Ester Prodrugs of Flufenamic Acid and Diclofenac: Suppressing the Rearrangement Pathway in Aqueous Media. *Arch Pharm (Weinheim).* 2007 Jan;340(1):32-40.

Roupe KA, Yáñez JA, Teng XW, et al. Pharmacokinetics of selected stilbenes: rhapontigenin, piceatannol and pinosylvin in rats. *J Pharm Pharmacol.* 2006 Nov;58(11):1443-50.

Rowland M, Tozer TN. Clinical Pharmacokinetics: Concepts and Applications. 3ª ed. Filadélfia: Lippincott Williams & Wilkins; 1995. 601 p.

Ruiz-Garcia A, Bermejo M, Moss A, Casabo VG. Pharmacokinetics in Drug Discovery. *J Pharm Sci.* 2008 Fev;97(2):654-90.

Sabbagh MN. Drug Development for Alzheimer's Disease: Where Are We Now and Where Are We Headed? *Am J Geriatr Pharmacother.* 2009 Jun;7(3):167-85.

Sallmann AR. The History of Diclofenac. *Semin Arthritis Rheum.* 1985 Nov;15(Suppl 1):57-60.

Simmons DL, Botting RM, HLA T. Cyclooxygenase Isozymes: The Biology of Prostaglandin Synthesis and Inhibition. *Pharmacol Rev.* 2004 Set;56(3):387-437.

Singh SS. Preclinical Pharmacokinetics: An Approach Towards Safer and Efficacious Drugs. *Curr Drug Metab.* 2006 Fev;7(2):165-82.

Smith DA, van de Waterbeemd H. Pharmacokinetics and metabolism in early drug discovery. *Curr Opin Chem Biol.* 1999 Ago;3(4):373-8.

Smyth EM, Burke A, Fitzgerald G.A. Capítulo 25. Lipidi-derived autacóides: Eicosanoids and platelet-activating fator. In: Brunton LL, Lazo JS, Parker KL, editores. Goodman and Gilman's. The pharmacological basis of therapeutics. 11ª ed. New York: The McGraw-Hill Companies; 2006. p. 653-70.

Sociedade Brasileira de Reumatologia. Artrite Reumatóide: Diagnóstico e Tratamento. Projeto Diretrizes. 2002 Ago. 15 p.

Stirnemann G, Kessebohm K, Lauterburg B. Liver injury caused by drugs: an update. *Swiss Med Wkly.* 2010 Set;140:w13080.

Süleyman H, Demircan B, Karagoz Y. Anti-inflammatory and side effects of cyclooxygenase inhibitors. *Pharmacol Rep.* 2007 Mai;59(3):247-58.

Takemoto JK, Reynolds JK, Remsberg CM, et al. Clinical Pharmacokinetic and Pharmacodynamic Profile of Etoricoxib. *Clin Pharmacokinet.* 2008;47(11):703-20.

Tammara VK, Narurkar MM, Crider AM, et al. Synthesis and Evaluation of Morpholinoalkyl Ester Prodrugs of Indometacin and Naproxen. *Pharm Res.* 1993 Ago;10(8):1191-9.

Tang J, Wu G, Peng L. Pharmacokinetics of propofol in patients undergoing total hip replacement: Effect of acute hypervolemic hemodilution. *Anaesthesist.* 2011 Jun: [6 p.]

Tang W, Lu AYH. Drug Metabolism and Pharmacokinetics in Support of Drug Design. *Curr Pharm Des.* 2009;15(19):2170-83.

Tang W. The Metabolismo f Diclofenac – Enzymology and Toxicology Perspectives. *Curr Drug Metab.* 2003 Ago;4(4):319-29.

Teoh NC, Farrel GC. Hepatotoxicity associated with non-steroidal anti-inflammatory drugs. *Clin Liver Dis.* 2003 Mai;7(2):401-13.

Testa B. Prodrugs: bridging pharmacodynamics/pharmacokinetic gaps. *Curr Opin Chem Biol.* 2009 Jun;13(3):338-44.

Thrall MA. Veterinary Hematology and Clinical Chemistry. 1ª ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2004. Capítulo 16, Mammalian Hematology: Laboratory Animals and Miscellaneous Species; p. 211-23.



Tong X, Ratnaraj N, Patsalos PN. The pharmacokinetics of vigabatrin in rat blood and cerebrospinal fluid. *Seizure*. 2007 Jan;16(1):43-9.

Torres-López JE, López-Muñoz FJ, Castañeda-Hernández G, et al. Pharmacokinetic-Pharmacodynamic Modeling of the Antinociceptive Effect of Diclofenac in the Rat. *J Pharmacol Exp Ther*. 1997 Aug;282(2):685-90.

Toutain PL, Bousquet-Mélou A. Plasma Clearance. *J Vet Pharmacol Ther*. 2004a Dez;27(6):415-25.

Toutain PL, Bousquet-Mélou A. Plasma terminal half-life. *J Vet Pharmacol Ther*. 2004b Dez;27(6):427-39.

Toutain PL, Bousquet-Mélou A. Volumes of distribution. *J Vet Pharmacol Ther*. 2004c Dez;27(6):441-53.

Toutain PL, Koritz GD, Fayolle, et al. Pharmacokinetics of Methylprednisolone, Methylprednisolone Sodium Succinate, and Methylprednisolone Acetate in Dogs. *J Pharm Sci*. 1986 Mar;75(3):251-5.

Tozer TN. Concepts Basic to Pharmacokinetics. *Pharmacol Ther*. 1981;12(1):109-31.

Tsumura H, Tamura I, Tanaka H, et al. Prescription of Nonsteroidal Anti-inflammatory Drugs and Co-prescribed Drugs for Mucosal Protection: Analysis of the Present Status Based on Questionnaires Obtained from Orthopedists in Japan. *Intern Med*. 2007;46(13):927-31.

Tugwell PS, Wells GA, Shainhouse JZ. Equivalence study of a topical diclofenac solution (pennsaid) compared with oral diclofenac in symptomatic treatment of osteoarthritis of the knee: a randomized controlled trial. *J Rheumatol*. 2004 Out;31(10):2002-12.

Vonkeman HE, van de Laar MAFJ. Nonsteroidal Anti-inflammatory Drugs: Adverse Effects and Their Prevention. *Semin Arthritis Rheum*. 2010 Feb;39(4):294-312

Wadhwa LK, Sharma PD. Glycolamide esters of 6-methoxy-2-naphthylacetic acid as potential prodrugs – physicochemical properties, chemical stability and enzymatic hydrolysis. *Int J Pharm*. 1995 Mai;118(1):31-9.

Wallace JL, Cirino G. The development of gastrointestinal-sparing nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Trends Pharmacol Sci*. 1994 Nov;15(11):405-6.

Wallace JL, Keenan CM, Granger DN. Gastric ulceration induced by nonsteroidal anti-inflammatory drugs is a neutrophil-dependent process. *Am J Physiol*. 1990 Set;259:G462-7.

Wallace JL, Vong L. NSAID-induced gastrointestinal damage and the design of GI-sparing NSAIDs. *Curr Opin Investig Drugs*. 2008 Nov;9(11):1151-6.

Wallace JL. Mechanism of Protection and Healing: Current Knowledge Future Research. *Am J Med*. 2001 Jan 8;110(1A):19S-23S.

---

Wallace JL. Prostaglandins, NSAIDs, and Gastric Mucosal Protection: Why Doesn't the Stomach Digest Itself? *Physiol Rev.* 2008 Oct;88(4):1547-65.

Warner TD, Giuliano F, Vojnovic I, et al. Nonsteroidal drug selectivities for cyclooxygenase-1 rather than cyclooxygenase-2 are associated with human gastrointestinal toxicity: A full in vitro analysis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999 Jun;96(13):7563-8.

Waterbeemd H, Gifford E. ADMET in silico modeling: towards prediction paradise? *Nat Rev Drug Discov.* 2003 Mar;2(3):192-204.

White RE. High-Throughput Screening in Drug Metabolism and Pharmacokinetic Support of Drug Discovery. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2000;40:133-57.

Yin LL, Li MH, Wang X, et al. A Novel 1,5-Diarylpyrazole Derivative Exerts Its Anti-inflammatory Effect by Inhibition of Cyclooxygenase-2 Activity as a Prodrug. *Biol Pharm Bull.* 2009 Jun;32(6):1032-6.

Zaragoza MA, Alfonso MV, Roig CE. NSAID-induced hepatotoxicity: aceclofenac and diclofenac [resumo]. *Rev Esp Enferm Dig.* 1995 Jun;87(6):472-5.

Zi J, Liu D, Ma P, et al. Effects of CYP2C9\*3 and CYP2C9\*13 on Diclofenac Metabolism and Inhibition-based Drug-Drug Interactions. *Drug Metab Pharmacokinet.* 2010;25(4):343-50.

## **9. ANEXOS**

## Anexo 1- Aprovação do Comitê de Ética



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



Protocolo CEP/FCF/CAR nº 27/2009


Interessado: MICHEL LEANDRO DE CAMPOS  
Orientador: Profa. Dra. Rosângela Gonçalves Peccinini  
Projeto: Farmacocinética pré-clínica do composto 1-(2,6-diclorofenil)indolin-2-ona (DICCIC), candidato à pró-fármaco, com propriedades anti-inflamatórias

### **Parecer nº 56/2009 – Comitê de Ética em Pesquisa**

O Comitê de Ética em Pesquisa desta Faculdade, considerou o protocolo para uso de animais na pesquisa "Farmacocinética pré-clínica do composto 1-(2,6-diclorofenil)indolin-2-ona (DICCIC), candidato à pró-fármaco, com propriedades anti-inflamatórias", apresentado pelo pós-graduando Michel Leandro de Campos, estruturado dentro dos princípios éticos na experimentação animal do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal – COBEA, manifestando-se FAVORÁVEL à sua execução.

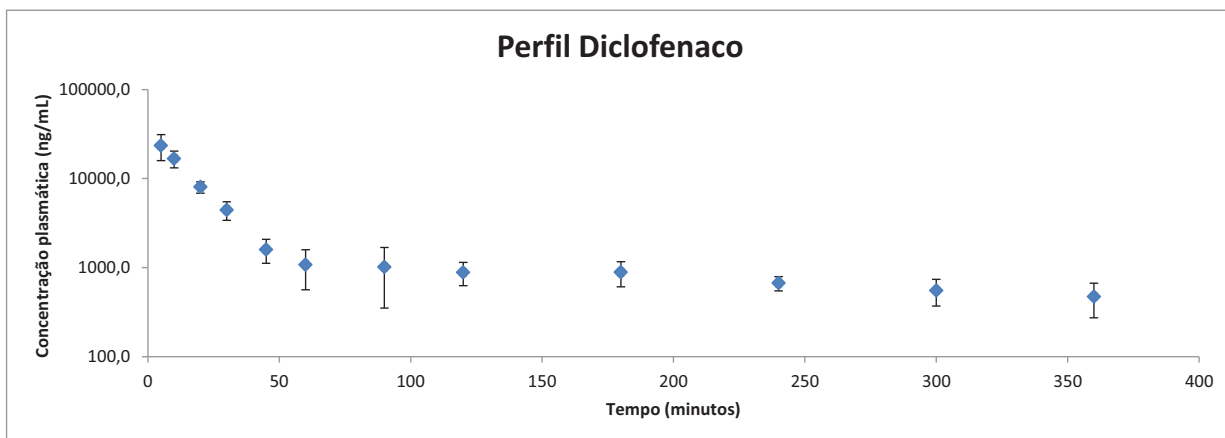
O relatório final do protocolo de pesquisa, com no máximo três folhas (espaço 1,5 e letra 12) deverá ser entregue em janeiro de 2012.

Araraquara, 03 de dezembro de 2009.

  
Prof. Dr. AURELUCE DEMONTE  
Coordenadora do CEP

Anexo 2 - Concentrações plasmáticas do diclofenaco a partir da administração de diclofenaco

DICLOFENACO: Concentrações plasmáticas (ng/mL) em administração IV em ratos													
T (min)	R1	R2	R3	R4	R5	mediana	média	DP	n	IC+	IC-	IC	CV
5	18834,0	18666,9	19981,5	31746,6	28320,6	19981,5	23509,9	6098,3	5	31081,9	15937,9	7572,0	25,9
10	14285,1	14174,0	15914,4	18639,2	20684,2	15914,4	16739,4	2848,5	5	20276,3	13202,5	3536,9	17,0
20	7631,2	8743,7	6866,8	7660,4	9196,6	7660,4	8019,8	937,9	5	9184,3	6855,3	1164,5	11,7
30	3406,2	5223,5	4309,1	3878,3	5360,0	4309,1	4435,4	845,8	5	5485,6	3385,2	1050,2	19,1
45	1493,1	1445,0	1692,6	1147,8	2188,4	1493,1	1593,4	385,5	5	2072,1	1114,7	478,7	24,2
60	1143,0	799,5	1070,4	640,3	1713,7	1070,4	1073,4	411,5	5	1584,3	562,4	511,0	38,3
90	635,2	1960,4	813,1	867,1	804,5	813,1	1016,0	535,0	5	1680,3	351,7	664,3	52,7
120	1026,2	1115,9	769,1	918,0	590,1	918,0	883,9	209,0	5	1143,4	624,3	259,5	23,7
180	839,5	1175,3	740,0	630,1	1055,1	839,5	888,0	224,3	5	1166,5	609,5	278,5	25,3
240	639,5	736,2	520,6	668,8	778,2	668,8	668,7	99,2	5	791,8	545,5	123,1	14,8
300	456,0	545,4	562,8	789,9	406,3	545,4	552,1	147,7	5	735,5	368,7	183,4	26,7
360	724,4	448,3	327,9	506,6	348,2	448,3	471,1	159,3	5	668,9	273,2	197,8	33,8



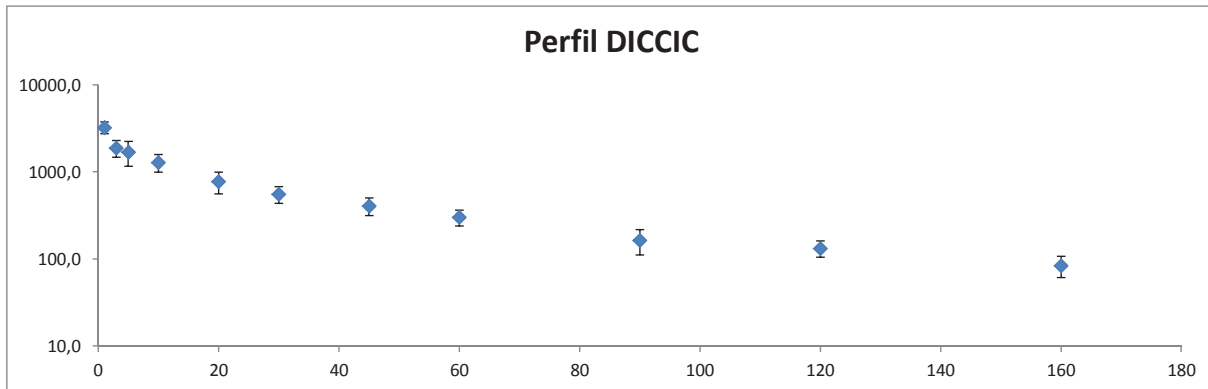
Anexo 3- Parâmetros farmacocinético do diclofenaco a partir da administração de diclofenaco

Parâmetros Farmacocinéticos IV de diclofenaco em ratos

Parâmetros	mediana	média	DP	IC+	IC-	CV
dose (mg/Kg)		8,1				
B (ng/mL)	1666,3	1759,06	620,97	2530,09	988,03	35,3
Kel $\beta$ (min <sup>-1</sup> )	0,00414	0,003982	0,001151	0,005412	0,002552	28,9
t1/2 $\beta$ (min)	167,391	188,3	62,8	266,2	110,3	33,3
ASC 0-t (ug/mL.min)	583,718	570,2	45,6	626,9	513,5	8,0
ASC 0-inf(ug/mL.min)	699,265	698,7	61,8	775,4	622,0	8,8
Relação das ASC (%)	83,6536	81,9	7,3	90,9	72,9	8,9
Cl (mL/min.Kg)	11,5836	11,7	1,0	12,9	10,4	8,7
Vd (mL/Kg)	2797,97	3137,2	922,9	4283,1	1991,3	29,4
A	47573	47946,20	20119,29	72927,60	22964,80	42,0
K $\alpha$ (min <sup>-1</sup> )	0,099	0,1046	0,0264	0,1374	0,0718	25,2
t1/2 $\alpha$ (min)	7	7,0	2,0	9,6	4,5	29,0

Anexo 4- Concentrações plasmáticas do DICCCIC

DICCCIC: Concentrações plasmáticas em administração IV em ratos (ng/mL)														
T (min)	R1	R2	R3	R4	R5	mediana	média	DP	n	IC+	IC-	IC	CV	
1	3263,0	2715,5	3042,5	3742,0	3494,5	3263,0	3251,5	397,1	5	3744,6	2758,4	493,1	12,2	
3	2166,4	1404,9	1737,2	2219,4	1892,8	1892,8	1884,1	332,9	5	2297,5	1470,8	413,4	17,7	
5	2266,2	1105,6	1480,2	1915,0	1743,5	1743,5	1702,1	438,8	5	2247,0	1157,2	544,9	25,8	
10	1489,8	908,1	1197,2	1459,1	1387,7	1387,7	1288,4	241,1	5	1587,8	989,0	299,4	18,7	
20	666,8	700,5	710,2	711,8	1085,9	710,2	775,0	174,7	5	992,0	558,1	216,9	22,5	
30	471,6	483,1	514,8	588,3	705,7	514,8	552,7	96,9	5	673,0	432,4	120,3	17,5	
45	383,0	325,2	372,6	434,5	520,1	383,0	407,1	74,2	5	499,1	315,0	92,1	18,2	
60	261,9	284,4	309,8	260,7	382,6	284,4	299,9	50,4	5	362,4	237,3	62,6	16,8	
90	199,0	125,1	125,3	216,8	149,6	149,6	163,2	42,5	5	216,0	110,4	52,8	26,1	
120	157,2	114,2	125,0	155,7	109,1	125,0	132,2	22,8	5	160,6	103,9	28,4	17,3	
160	113,9	66,0	81,1	85,9	72,8	81,1	84,0	18,4	5	106,8	61,1	22,9	21,9	



Anexo 5- Parâmetros farmacocinéticos do DICCIC

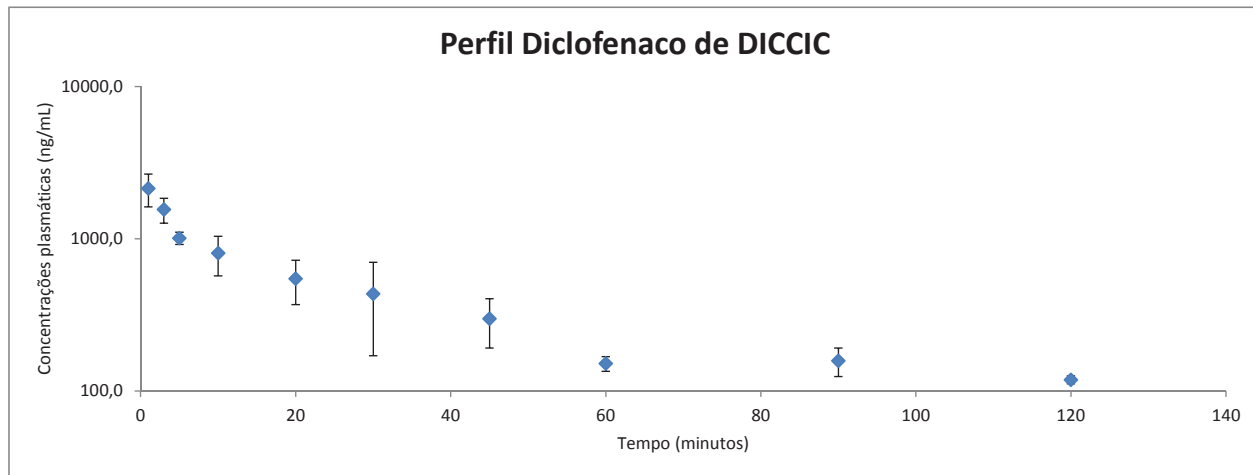
Parâmetros Farmacocinéticos IV de DICCIC em ratos

Parâmetros	mediana	média	DP	IC+	IC-	CV
dose (mg/Kg)			7,6			
B	688,92	758,34	198,70	1005,05	511,63	26,20
Kel $\beta$ (min <sup>-1</sup> )	0,014370	0,014446	0,002706	0,017806	0,011086	18,73
t <sub>1/2</sub> $\beta$ (min)	48,23	49,40	9,73	61,48	37,32	19,69
ASC 0-t (ug/mL.min)	64,65	61,35	8,16	71,48	51,23	13,30
ASC 0-inf (ug/mL.min)	72,55	67,53	9,15	78,89	56,17	13,55
Relação das ASC (%)	91,46	90,94	3,17	94,87	87,01	3,48
Cl (mL/min.Kg)	104,75	114,38	17,00	135,50	93,27	14,86
Vd (mL/Kg)	8506,22	8102,14	1566,64	10047,38	6156,89	19,34
t <sub>ss</sub> (min)	20,93	21,63	3,24	25,66	17,61	14,98
A	1946,50	1876,88	945,71	3051,13	702,63	50,39
K $\alpha$ (min <sup>-1</sup> )	0,1200	0,1120	0,0311	0,1507	0,0733	27,81
t <sub>1/2</sub> $\alpha$ (min)	5,775	6,61	1,92	8,99	4,23	29,02



Anexo 6- Concentrações plasmáticas de diclofenaco a partir da administração de DICCIC

DICLOFENACO: Concentrações plasmáticas em administração de DICCIC IV em ratos (ng/mL)													
T (min)	R1	R2	R3	R4	R5	mediana	média	DP	n	IC+	IC-	IC	CV
1	2409,5	1839,0	2746,7	1834,5	1861,6	1861,6	2138,3	419,0	5	2658,5	1618,0	520,2	19,59369
3	1507,2	1375,4	1959,7	1507,3	1419,1	1507,2	1553,7	234,0	5	1844,3	1263,1	290,6	15,06358
5	925,3	956,2	995,5	1111,3	1053,3	995,5	1008,3	74,8	5	1101,3	915,4	92,9	7,422181
10	819,9	729,7	540,0	1049,0	876,7	819,9	803,1	187,6	5	1036,0	570,1	232,9	23,36021
20	769,8	501,5	378,8	543,0	532,8	532,8	545,2	141,6	5	721,0	369,4	175,8	25,97227
30	572,8	716,8	294,8	401,9	186,1	401,9	434,5	212,8	5	698,6	170,3	264,2	48,97227
45	290,4	380,1	185,8	383,2	248,2	290,4	297,5	85,3	5	403,5	191,6	106,0	28,68099
60	159,9	150,7	168,7	138,2	138,4	150,7	151,2	13,4	5	167,8	134,6	16,6	8,8329
90	134,4	135,6	156,0	200,8	161,4	156,0	157,6	26,9	5	191,1	124,2	33,5	17,09331
120	123,4	109,6	123,4	117,6	117,7	117,7	118,3	5,7	5	125,4	111,3	7,0	4,778871



Anexo 7- Parâmetros farmacocinéticos do diclofenaco a partir da administração de DICCIC

Parâmetros Farmacocinéticos de diclofenaco convertido de DICCIC IV

Parâmetros	mediana	média	DP	IC+	IC-	CV
B (ng/mL)	611,32	552,53	96,07	671,82	433,25	17,4
Kel $\beta$ (min <sup>-1</sup> )	0,01537	0,014236	0,002125	0,016875	0,011597	14,9
t <sub>1/2</sub> $\beta$ (min)	45,1	49,7	8,8	60,6	38,8	17,6
ASC 0-t (ug/mL.min)	42,2	40,3	4,6	46,0	34,6	11,4
ASC 0-inf(ug/mL.min)	49,1	48,8	3,4	53,0	44,6	6,9
Relação das ASC (%)	84,5	82,4	4,5	88,0	76,8	5,5
tss (min)	14,0	15,6	3,5	19,9	11,2	22,5
A	1363	1789,62	815,43	2802,11	777,13	45,6
K $\alpha$ (min <sup>-1</sup> )	0,198	0,1898	0,0695	0,2761	0,1035	36,6
t <sub>1/2</sub> $\alpha$ (min)	3,5	4,0	1,4	5,7	2,3	33,7

## Anexo 8- Frações do diclofenaco a partir da administração de DICCCIC

Frações dic de DICCCIC									
Parâmetro	Rato 1	Rato 2	Rato 3	Rato 4	Rato 5	Mediana	Média	CV	IC
fm	0,1390	0,1672	0,1809	0,1847	0,2006	0,1809	0,1745	13,3	0,0287
1-fm	0,8610	0,8328	0,8191	0,8153	0,7994	0,8191	0,8255	2,8	0,0287
F <sub>H(m)</sub>	0,4787	0,4373	0,3881	0,3704	0,3579	0,3881	0,4065	12,4	0,0626
FR	0,0665	0,0731	0,0702	0,0684	0,0718	0,0702	0,0700	3,8	0,0033
Cl <sub>f</sub>	19,5665	20,4368	18,9583	19,0589	20,2454	19,5665	19,6532	3,4	0,8349