

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE ARARAQUARA**

Farmacocinética pré-clínica e avaliação toxicológica preliminar da nova tiazolidinadiona desenvolvida para o tratamento do diabetes mellitus tipo 2: 5-(4-cloro-benzilideno)-3-(4-metil-benzil)-tiazolidina-2,4-diona (GQ-2).

CARLA MONALIZI VIEIRA

**Araraquara
2013**

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE ARARAQUARA

Farmacocinética pré-clínica e avaliação toxicológica preliminar da nova tiazolidinadiona desenvolvida para o tratamento do diabetes mellitus tipo 2: 5-(4-cloro-benzilideno)-3-(4-metil-benzil)-tiazolidina-2,4-diona (GQ-2).

CARLA MONALIZI VIEIRA

Defesa de 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 a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Profa. Dra. Rosângela Gonçalves Peccinini

Araraquara

2013

Ficha Catalográfica

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

Vieira, Carla Monalizi

V657f Farmacocinética pré-clínica e avaliação toxicológica preliminar da nova tiazolidinadiona desenvolvida para o tratamento do diabetes mellitus tipo 2: 5-(4-cloro-benzilideno)-3-(4-metil-benzil)-tiazolidina-2,4-diona (GQ-2) / Carla Monalizi Vieira. – Araraquara, 2013
114 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

1. Avaliação toxicológica. 2. Diabetes. 3. Tiazolidinadiona. 4. Farmacocinética pré-clínica. 5. 5-(4-cloro-benzilideno)-3-(4-metil-benzil)-tiazolidina-2,4-diona (GQ-2). I. Peccinini, Rosângela Gonçalves, orient. II. Título.

CAPES: 40300005

DEDICATÓRIA

Dedico aos meus pais Carlos Alberto Vieira e Maria de Lourdes Ganzella Vieira pelo suporte dado para a realização desse sonho.

A jornada pareceu árdua e difícil...

O desânimo tentou se apossar por vezes.

Entretanto, o lembrar de suas faces preocupadas e tanto envelhecidas no decorrer destes anos, de seus trabalhos, de suas orações, do apoio incondicional para nos dar o melhor, me impulsionou deveras para a luta.

Obrigada, muito obrigada pelo silêncio quando eu reclamava e obrigada também pelas suas palavras de estímulo quando eu me calava.

Nessa minha grande batalha, creiam a vitória também é de vocês.

Continuaremos até o dia em que, possamos juntos, de mãos dadas, sermos ao mesmo tempo pais e filhos dos nossos sonhos, das nossas realizações, enfim, do que sentimos.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a **Deus** por sempre ter me guiado e me dado forças nas horas mais difíceis em que, muitas vezes, pensei em desistir. Obrigada por me iluminar e permitir a conclusão desse trabalho.

A **Carlos Alberto Vieira** e a **Maria de Lourdes Ganzella Vieira** pelo esforço e dedicação para que eu pudesse concluir mais essa etapa na minha vida. Obrigada por tornarem possível essa realização, palavras não seriam o suficiente para agradecer. Obrigada pelo amor infinito, pelas lições de vida, pelos conselhos e pelas broncas na hora certa, enfim, obrigada por serem meus pais.

A minha orientadora **Profa. Dra. Rosângela Gonçalves Peccinini** por me conceder essa oportunidade única, por abrir as portas para um mundo de conhecimentos e aprendizagens, os quais levarei comigo por toda a vida.

Aos meus colegas de laboratório **Michel Leandro de Campos** e **Elias Carvalho Padilha** pelo auxílio prestado nas inúmeras vezes em que precisei. Obrigada não só pelo conhecimento transmitido e pelo apoio para que eu pudesse concluir esse trabalho, mas também pela ajuda e atenção nos momentos em que precisei.

As minhas amigas **Caroline Damico Candido** e **Helen Mariana Baldan Cimatti** que se tornaram mais que companheiras de um grupo de pesquisa, se tornaram amigas. Obrigada por todos os momentos compartilhados tanto nas horas boas como nas horas ruins, pelos risos e choros, alegrias e tristezas, conselhos e conversas jogadas fora. Espero que a nossa amizade perdure para sempre.

Aos demais colegas do grupo de Pesquisa em Farmacocinética e Toxicologia de Novos Fármacos e Medicamentos – UNESP – **Juliana, Martina, Marco Antônio** e **Marcelo** que sempre se mostraram dispostos a me ajudar nos momentos em que precisei.

A equipe do laboratório de Bioequivalência **Kelly, Marcos** e **Andréia** pela disposição em ajudar e por nunca ter recebido um “não” como resposta.

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

Enfim, meus agradecimentos a todos que contribuíram direta ou indiretamente para a conclusão desse trabalho.

EPÍGRAFE

“Veni, vidi, vici”

(Cheguei, vi, venci)

Júlio César – 47 a.c.

“Aut viam inveniam aut faciam”

(Ou encontro o caminho ou eu mesmo abrirei)

Anibal de Cartago

*“A felicidade não está no fim da jornada,
e sim em cada curva do caminho que percorremos
para encontrá-la.”*

“Aqui, no entanto, nós não olhamos para trás por muito tempo.

*Nós continuamos seguindo em frente, abrindo novas portas e fazendo coisas novas,
porque somos curiosos... e a curiosidade continua nos conduzindo por novos caminhos.*

Siga em frente.”

Walt Disney

RESUMO

O composto 5-(4-cloro-benzilideno)-3-(4-metil-benzil)-tiazolidina-2,4-diona (GQ-2), novo fármaco da classe das tiazolidinadionas, apresenta atividade hipoglicemiante e reduz os níveis basais de insulina, glicose e leptina, associados com o aumento da sensibilidade à insulina. Além disso, reduz o ganho de peso corporal devido à menor retenção de líquidos. Esses resultados torna o GQ-2 uma possível alternativa terapêutica para o tratamento do Diabetes Mellitus tipo 2. Nesse trabalho foi investigado o perfil farmacocinético e a toxicidade preliminar hepática e renal do composto GQ-2. Esse composto foi administrado em dose única pela via oral (12mg/Kg) e pela via intraperitoneal (12mg/Kg), e pela via intravenosa (3mg/Kg) em ratos wistar (n=25). Após a administração foram realizadas coletas seriadas de sangue pela artéria femoral. As amostras foram processadas e analisadas por método bioanalítico validado, utilizando um sistema UPLC. O sistema consistiu de um UPLC Acquity[®] equipado com um detector UV-Visível operando a λ 330 nm. A separação foi realizada com coluna BEH (2,1 x 50 mm, 1,7 μ m) sob eluição da fase móvel constituída de acetonitrila: água (80:20), em modo isocrático e fluxo de 0,4 mL/min. As médias dos parâmetros farmacocinéticos foram calculadas pelas curvas de concentração plasmática *versus* tempo e expressos através da média, mediana e IC (95). A administração do GQ-2 em dose única (3mg/Kg) pela via intravenosa possibilitou a construção da curva de concentração plasmática *versus* tempo. Os parâmetros farmacocinéticos obtidos foram: C_{max} (ng/mL): 786,2 (534,62-1037,76), t_{max} (h) 0,08, ASC_{0-t} (ng/mL/h) 390,84 (282,28-499,41), ASC_{0-inf} (ng/mL/h) 411,60 (296,41-526,79), Cl (L/h/Kg) 8,0 (5,45-10,55), V_d (L/Kg) 45,6 (23,9-67,3), r áreas (%) 0,95 (0,94-0,95), k _{α} ou α (min⁻¹) 5,51 (4,7-6,3), t_{1/2 α} (min) 0,13 (0,11-0,14), k _{β} ou β (min⁻¹) 0,24 (0,08-0,39) t_{1/2 β} (min) 4,44 (2,14-6,74). Para a administração do GQ-2 em dose única pela via oral e pela via intraperitoneal (12mg/Kg) não foi possível a construção do perfil farmacocinético, pois não foram detectados níveis plasmáticos pelo método bioanalítico desenvolvido.

Palavras-chave: Avaliação toxicológica, Diabetes, Tiazolidinadiona, Farmacocinética pré-clínica, 5-(4-cloro-benzilideno)-3-(4-metil-benzil)-tiazolidina-2,4-diona (GQ-2).

ABSTRACT

The compound 5-(4-chloro-benzylidene)-3-(4-methyl-benzyl)-thiazolidine-2,4-dione (GQ-2), new thiazolidinedione drug, presents hypoglycemic activity by lowering the basal levels of insulin, glucose and leptin, associated with the increased insulin sensitivity. In addition, reduces body weight gain due to minor liquid retention. These results ratify GQ-2 as possible therapeutic alternative for the treatment of type 2 diabetes. In this work we investigated the pharmacokinetic profile and primary hepatic and renal toxicity of the compound GQ-2. This compound was administered in a single dose orally (12 mg/Kg) and intraperitoneally (12 mg/Kg) and intravenously (3 mg/Kg) in Wistar rats (n=25). After administration serial blood collections were taken through the femoral artery. The samples were processed and analyzed by a validated bioanalytical method, using UPLC system. The system consisted of an Acquity UPLC[®] equipped with a UV-visible detector operating at λ 330 nm. The separation was performed with BEH column (2.1 x 50 mm, 1,7 μ m) as the eluting mobile phase consisted of a acetonitrile:water (80:20) in isocratic mode and flow of 0,4 mL/min. The mean pharmacokinetic parameters were calculated by the curves of plasma concentration *versus* time and expressed through the mean, median and IC (95). The administration of the GQ-2 single dose (3 mg/Kg) intravenously enables the construction of the plasma concentration *versus* time curve. The pharmacokinetic parameters were obtained: C_{max} (ng/mL) 786,2 (534,62-1037,76), t_{max} (h) 0,08, AUC_{0-t} (ng/mL/h) 390, 84 (282,28-499,41), AUC_{0-inf} (ng/mL/h) 411,60 (296,41-526,79), Cl (L/h/Kg) 8,0 (5,45-10,55), V_d (L/Kg) 45,6 (23,9-67,3), r areas (%) 0,95 (0,94-0,95), k _{α} or α (min⁻¹) 5,51 (4,7-6,3), t_{1/2 α} (min) 0,13 (0,11-0,14), k _{β} or β (min⁻¹) 0,24 (0,08-0,39), t_{1/2 β} (min) 4,44 (2,14-6,74). For the administration of GQ-2 in a single dose orally (12 mg/Kg) and intraperitoneally (12 mg/Kg) was not possible to construct the pharmacokinetic profile, as no detectable plasma concentration levels were found by the bioanalytical method developed.

Keywords: Evaluation toxicological, Diabetes, Thiazolidinedione, Preclinical pharmacokinetics, 5-(4-chloro-benzylidene)-3-(4-methyl-benzyl)-thiazolidine-2,4-dione (GQ-2).

LISTA DE ABREVIATURAS

AGL: ácidos graxos livres

ALT (TGP): alanina aminotransferase (transaminase glutâmico pirúvica)

ASC_{0-t}: área sob a curva de 0 a um tempo definido t

ASC_{0-inf.}: área sob a curva de 0 ao infinito

AST (TGO): Aspartato aminotransferase (transaminase glutâmico oxalacética)

ATZDs: arilideno-tiazolidinadionas

C₀: concentração plasmática no tempo 0

CAP: *catabolite activator protein* (proteína ativadora catabólica)

Cl: clearance

CLAE: cromatografia líquida de alta eficiência

C_{max}: concentração máxima

C_p: concentração plasmática

C_{pn}: concentração plasmática no tempo 0

C_{pt}: concentração plasmática em determinado tempo t

CQ: amostra de controle de qualidade

CQA: amostra de controle de qualidade de alta concentração

CQB: amostra de controle de qualidade de baixa concentração

CQD: amostra de controle de qualidade diluída

CQM: amostra de controle de qualidade de média concentração

CV: coeficiente de variação

CYP450: citocromo P450

DC: débito cardíaco

DM2: diabetes mellitus tipo 2

DMSO: dimetilsulfóxido

DPR: desvio padrão relativo

EMA: *European Agency for the Evaluation of Medicinal Products*

ERK: quinase extracelular reguladora de sinal (*extracellular-signal-regulated kinase*)

eNOS: óxido nítrico sintase endotelial

GSK-3: enzima glicogênio sintetase

GLUT4: transportador de glicose 4

HDL: lipoproteína de alta densidade (*High Density Lipoprotein*)

IC 95: intervalo de confiança 95

IKK: quinase inibidora do fator nuclear

IL-6: interleucina 6

IMC: índice de massa corpórea

I.P.: intraperitoneal

IRS: substrato de receptor de insulina

I.V.: intravenoso

JNK: *Jun N-terminal kinase*

K_{el} ou β : constante de eliminação

K_{α} ou α : constante de distribuição

LBD: domínio de ligação ao ligante (*ligand binding domain*)

LD: limite de detecção

LDL: lipoproteína de baixa densidade (*Low Density Lipoprotein*)

LIQ: limite inferior de quantificação

LSQ: limite superior de quantificação

MAP: proteína ativada pelo mitógeno

MMP-9: metaloproteinase de matriz 9

MRT: tempo de residência média (*mean residence time*)

PC: padrão de calibração

PDK1: fosfoinositol dependente de quinase 1

PECK: fosfoenolpiruvato carboxiquinase

PI: padrão interno

PI3K: fosfatidilinositol 3-quinase

PIP3: fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato

PKB: proteína quinase B

PPAR γ : receptor gama ativado por proliferadores de peroxissoma (*peroxisome proliferator-activated receptor gamma*)

PTPases: proteína tirosina-fosfatase

RI: resistência à insulina

R: coeficiente de correlação

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

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

tmax: tempo para a concentração máxima

TNF α : fator de necrose tumoral alfa

TZDs: tiazolidinadionas

Vd: volume de distribuição

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura química do GQ-2.....	3
Figura 2. Obesidade e suas relações com a resistência à insulina, diabetes mellitus tipo 2 e doenças cardiovasculares.....	7
Figura 3. Representação esquemática das vias de sinalização da insulina....	12
Figura 4. Mecanismo proposto de ação das tiazolidinadionas.....	21
Figura 5. Representação esquemática de um modelo com dois compartimentos.....	36
Figura 6. Perfil farmacocinético com duas velocidades de decaimento. Modelo bicompartimental.....	37
Figura 7. Representação gráfica do método dos resíduos.....	56
Figura 8. Espectrograma do composto GQ-2 na concentração de 100 µg/mL em acetonitrila.....	65
Figura 9. Curva analítica do GQ-2 (7,8 a 250 ng/mL).....	66
Figura 10. Estabilidade do GQ-2 em solução tampão pH 1,2 (200 ng/mL).....	67
Figura 11. Estabilidade do GQ-2 em solução tampão pH 7,4 (200 ng/mL).....	68
Figura 12. Curva bioanalítica preliminar do GQ-2 (125 a 1500 ng/mL).....	69
Figura 13. Estabilidade do GQ-2 em plasma de rato (700 ng/mL).....	70
Figura 14. Estabilidade do GQ-2 em plasma humano (700 ng/mL).....	71
Figura 15. Curva de linearidade de log k das substâncias selecionadas.....	72
Figura 16. Curva analítica do GQ-2.....	75
Figura 17. Cromatograma de amostra zero. Tempo de retenção do padrão interno de 0,48 minutos.....	77
Figura 18. Cromatograma do GQ-2 na concentração de 1ug/mL. Tempo de retenção de 1,10 minutos.....	77

Figura 19. Cromatograma do GQ-2 (1 µg/mL) e padrão interno (2,5 µg/mL)..	77
Figura 20. Efeito residual do GQ-2.....	80
Figura 21. Média dos resultados para os níveis plasmáticos de ALT antes e após o tratamento com GQ-2 pela via intraperitoneal (12mg/Kg) e intravenosa. (3mg/Kg).....	81
Figura 22. Média dos resultados para os níveis plasmáticos de AST antes e após o tratamento com GQ-2 pela via intraperitoneal (12mg/Kg) e intravenosa. (3mg/Kg).....	81
Figura 23. Média dos resultados para os níveis plasmáticos de creatinina antes e após o tratamento com GQ-2 pela via intraperitoneal (12mg/Kg).....	82
Figura 24. Média dos resultados para os níveis plasmáticos de ureia antes e após o tratamento com GQ-2 pela via intraperitoneal (12mg/Kg) e intravenosa. (3mg/Kg).....	84
Figura 25. Média dos resultados para os níveis plasmáticos de colesterol antes e após o tratamento com GQ-2 pela via intraperitoneal (12mg/Kg) e intravenosa (3mg/Kg).....	85
Figura 26. Média dos resultados para os níveis plasmáticos de colesterol antes e após o tratamento com GQ-2 pela via intraperitoneal (12mg/Kg) e intravenosa (3mg/Kg).....	86
Figura 27. Curva de concentração plasmática <i>versus</i> tempo para o GQ-2 (n=10, média ± IC95).....	87

LISTA DE FLUXOGRAMAS

Fluxograma 1: Processamento da amostra biológica para quantificação do GQ-2.....	49
---	----

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Classificação de solubilidade segundo a farmacopeia brasileira.....	44
Tabela 2. Substâncias utilizadas na curva para a determinação do log P do GQ-2.....	47
Tabela 3. Classificação de solubilidade do GQ-2.....	64
Tabela 4. Valores dos perfis de decaimento em plasma de rato e humano. Expressos pela média, desvio padrão (5) e IC (95).....	71
Tabela 5. Concentrações da solução estoque, de trabalho, padrões de calibração e controles de qualidades. Valores em ng/mL.....	74
Tabela 6. Concentrações experimentais médias que geraram a curva de calibração. Precisão, expressa pelo desvio padrão relativo (DPR) e exatidão da curva (n=5).....	74
Tabela 7. Precisão e exatidão intra e inter-corridas para o GQ-2.....	76
Tabela 8. Porcentagem de recuperação do GQ-2.....	78
Tabela 9. Estabilidade do GQ-2.....	79
Tabela 10. Parâmetros farmacocinéticos determinados a partir da administração i.v. do GQ-2 na dose 3mg/kg (n=10, média e mediana ± IC95).....	88

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	5
2.1 Obesidade como principal fator de risco para o Diabetes Mellitus tipo 2.....	5
2.2 Sinalização normal da insulina.....	10
2.3 Alterações na sinalização insulínica resultante da resistência à insulina.....	13
2.4 Diabetes mellitus tipo 2.....	15
2.5 Farmacoterapia do DM2: Tiazolidinedionas e seu mecanismo de ação....	18
2.6 Toxicidade das tiazolidinadionas.....	22
2.7 Farmacocinética.....	30
2.8 Ensaios pré-clínicos no desenvolvimento de novos fármacos.....	38
3. OBJETIVOS.....	41
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	42
4.1 Material.....	42
4.1.1 Matérias primas, reagentes e solventes.....	42
4.1.2 Equipamentos.....	42
4.1.3 Correlatos.....	43
4.1.4 Softwares.....	43
4.2 Estudos de pré-formulação.....	43
4.2.1 Solubilização do fármaco.....	43
4.3 Desenvolvimento de método analítico para a determinação do GQ-2.....	44
4.3.1 Determinação da absorvidade do composto por análise espectrofotométrica.....	44
4.3.2 Condições cromatográficas.....	44
4.4 Determinação da estabilidade química do GQ-2 em tampão (pH 1,2 e 7,4).....	45
4.4.1 Curva analítica.....	45
4.4.2 Tampão Clark-Lubs (pH 1,2).....	45
4.4.3 Tampão fosfato de potássio (pH 7,4).....	45
4.4.4 Procedimento de análise das amostras.....	46
4.5 Determinação da estabilidade <i>ex vivo</i> do GQ-2 em plasma de rato e humano.....	46
4.5.1 Curva bioanalítica.....	46

4.5.2 Procedimento de análise das amostras.....	46
4.6 Determinação do log P.....	47
4.7 Desenvolvimento de método bioanalítico para determinação do GQ-2 em plasma.....	48
4.7.1 Condições cromatográficas.....	48
4.7.2 Processamento da amostra biológica.....	48
4.7.3 Validação do método bioanalítico.....	49
4.7.3.1 Linearidade.....	50
4.7.3.2 Limite Inferior de Quantificação (LIQ).....	50
4.7.3.3 Limite de Detecção (LD).....	50
4.7.3.4 Precisão e Exatidão.....	50
4.7.3.5 Seletividade.....	51
4.7.3.6 Recuperação.....	51
4.7.3.7 Estabilidade.....	51
4.7.3.8 Efeito residual (carryover).....	52
4.7.4 Análise dos resultados da validação.....	52
4.8 Perfil farmacocinético.....	52
4.8.1 Protocolo experimental.....	52
4.8.2 Animais.....	53
4.8.3 Procedimento cirúrgico para implantação de cânulas.....	53
4.8.4 Grupo Farmacocinética I, II e III.....	54
4.8.5 Análise farmacocinética.....	54
4.9 Determinação dos parâmetros bioquímicos hepáticos e renais.....	57
4.9.1 Determinação de ALT e AST.....	58
4.9.2 Determinação de Creatinina.....	59
4.9.3 Determinação de Ureia.....	60
4.10 Determinação glicose e colesterol.....	61
4.10.1 Determinação de Colesterol.....	61
4.10.2 Determinação de Glicose.....	62
4.11 Análise estatística.....	63
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	64
5.1 Estudos de pré-formulação.....	64
5.1.1 Solubilização do fármaco.....	64

5.2	Determinação da absorvidade do composto por análise espectrofotométrica.....	65
5.3	Determinação da estabilidade química do GQ-2 em tampão (pH 1,2 e 7,4).....	66
5.3.1	Curva analítica.....	66
5.3.2	Determinação da estabilidade química do GQ-2 em tampão (pH 1,2).....	67
5.3.3	Determinação da estabilidade química do GQ-2 em tampão (pH 7,4).....	67
5.4	Determinação da estabilidade <i>ex vivo</i> do GQ-2 em plasma de rato e humano.....	68
5.4.1	Curva bioanalítica.....	69
5.4.2	Determinação da estabilidade <i>ex vivo</i> do GQ-2 em plasma de rato.....	69
5.4.3	Determinação da estabilidade <i>ex vivo</i> do GQ-2 em plasma humano.....	70
5.5	Determinação do log P	72
5.6	Validação do método bioanalítico.....	73
5.6.1	Curva analítica e Linearidade.....	74
5.6.2	Limite de Detecção.....	76
5.6.3	Precisão e Exatidão.....	76
5.6.4	Seletividade.....	77
5.6.5	Recuperação.....	78
5.6.6	Estabilidade.....	78
5.6.7	Efeito residual (carryover).....	79
5.7	Determinação dos parâmetros bioquímicos.....	80
5.7.1	Determinação de ALT e AST.....	80
5.7.2	Determinação de Creatinina.....	82
5.7.3	Determinação de Ureia.....	83
5.7	Determinação de glicose e colesterol.....	84
5.7.1	Determinação de colesterol.....	85
5.7.2	Determinação de glicose.....	85
5.9	Análise farmacocinética.....	87
6.	CONCLUSÕES.....	93

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	95
8. ANEXOS.....	110

1. INTRODUÇÃO

O diabetes mellitus tipo 2 (DM2) é uma doença de origem metabólica caracterizada por hiperglicemia, resultante da diminuição da sensibilidade dos tecidos-alvos à insulina, denominada resistência insulínica (GROSS et al., 2002; KAHN et al., 2005;).

A obesidade é o principal fator relevante no aumento da prevalência do DM2 (GRUNDY et al., 2013) e a resistência à insulina – considerada o elo entre obesidade e DM2 - relacionada à obesidade é devida, na maior parte, a anormalidades nas vias de sinalização deste hormônio, em que o excesso de peso promove o acúmulo de lipídios no tecido muscular, adiposo e hepático que, por sua vez, resulta em interferência na transmissão do sinal insulínico e subsequentemente na cascata de efeitos celulares (GUYTON et al., 2006).

Os recursos terapêuticos disponíveis para o tratamento do DM2 incluem os agentes antidiabéticos orais e a insulinoterapia, sendo esta necessária somente com a evolução da doença (GUYTON et al., 2006).

Entre as classes de antidiabéticos orais disponíveis para uso clínico, as tiazolidinonas (TZDs) ou “glitazonas” tem demonstrado, através de experimentos com diferentes modelos animais e pacientes com esta patologia, ser potencialmente benéficas para o tratamento do DM2 (MARTENS et al., 2002). Esses fármacos atuam reduzindo a resistência à insulina e assim melhoram a sensibilidade a este hormônio em tecidos insulino-sensíveis. (HAUNER, 2002; MARTENS et al., 2002).

Dois compostos da classe das tiazolidinonas tem sido utilizados na clínica para o tratamento do DM2, a pioglitazona (Actos[®]) - aprovada pela Food and Drug Administration (FDA) em julho de 1999 e a rosiglitazona (Avandia[®]) - aprovada em maio deste mesmo ano (MARTENS et al., 2002; HAUNER., 2002).

Entretanto, em 2010, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) por meio da Resolução n° 4.466 de 28/09/2010 cancelou o registro do medicamento Avandia[®], que contém o fármaco rosiglitazona em todas as

suas apresentações farmacêuticas e associações. Este fato foi decorrente da grande possibilidade de doenças isquêmicas, como infarto do miocárdio; parada cardíaca; insuficiência cardíaca; dentre outros (BRASIL, 2010; MONAMI et al., 2008).

Em adição, ensaios em humanos evidenciaram a possibilidade de aumento do colesterol LDL (lipoproteína de baixa densidade) e triglicerídeos (NISSEN e WOLSKI, 2007; SINGH et al., 2007), além da retenção de líquidos, caracterizada pelo rápido ganho de peso corporal, e a formação de edema periférico e pulmonar os quais são outros efeitos adversos comuns da rosiglitazona (ZHANG et al., 2005; MOURÃO, 2006)

Atualmente apenas a pioglitazona continua sendo utilizada para o tratamento do DM2, entretanto está sob monitoramento da ANVISA . Seu uso é contra indicado em pacientes que apresentam insuficiência cardíaca classe III ou IV, doença hepática ou níveis de transaminases séricas aumentados; hipersensibilidade ao cloridrato de pioglitazona, insuficiência cardíaca sintomática, cetoacidose diabética ou DM1 (BRASIL, 2010).

Quanto à teratogenicidade, este composto é classificado na categoria C (classificação do FDA) – apresenta efeitos adversos em fetos animais - e também está relacionado com a incidência de leiomiosarcoma (tumor maligno do tecido muscular liso), câncer de bexiga e fraturas ósseas distais. Em contrapartida, diminui os níveis de triglicerídeos, aumentando o colesterol HDL (BRASIL 2010).

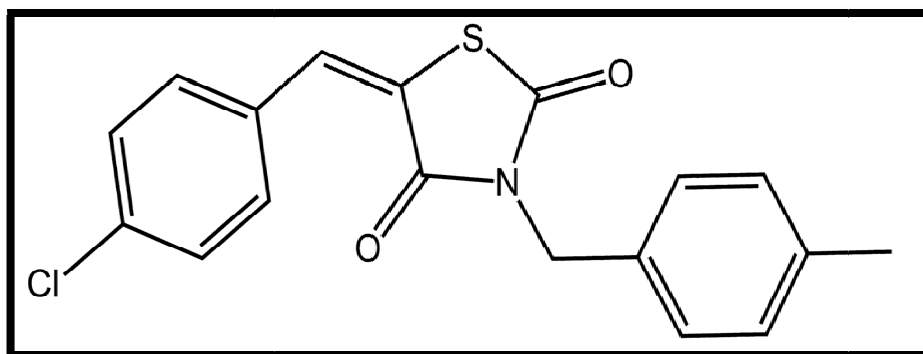
Assim, embora as TZDs sejam consideradas uma inovação no tratamento do DM2, sabe-se que sua aplicabilidade clínica é limitada e o desenvolvimento de novos compostos hipoglicemiantes, capazes de minimizar os distúrbios metabólicos com efeitos tóxicos mínimos é de grande importância clínica.

Várias TZDs têm sido desenvolvidas por meio da tiazolidina-2,4-diona substituída – estrutura comum das TZDs – (CLARK et al., 1991; CANTELLO et al., 1994; TUNÇBILEK et al., 2001; MALAMAS et al., 2001) com o objetivo de

suprimir os efeitos adversos e melhorar a eficácia desses compostos (IWATA et al., 2001).

O composto 5-(4-cloro-benzilideno)-3-(4-metil-benzil)-tiazolidina-2,4-diona (GQ-2) (Figura 1) - desenvolvido pelo grupo de pesquisa da Universidade Federal de Pernambuco – foi sintetizado a partir da molécula 5-benzilideno-3-(4-metil-benzil)-tiazolidina-2,4-diona, com substituição na posição 4 do anel benzidileno por uma molécula de cloro e apresentou potencial efeito hipoglicemiante (MOURÃO, 2006). Ainda quando administrado em camundongos *swiss* submetidos à dieta hiperlipídica pela via intraperitoneal, demonstrou reduzir a resistência à insulina, a glicemia em jejum, os níveis de leptina (fator de sinalização regulador de peso corporal), de insulina, de fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) - associado com a indução da resistência insulínica - e redução da resistência periférica à insulina (MOURÃO, 2006).

Figura 1. Estrutura química do composto GQ-2.



Um fato relevante é que, em indivíduos submetidos ao tratamento com rosiglitazona, observa-se aumento no ganho de peso devido à retenção de líquidos. Entretanto, para o GQ-2, foi observado que a média do ganho de peso corporal dos animais após o tratamento com o fármaco foi significativamente menor ($p < 0,05$) quando comparado com a rosiglitazona, devido à capacidade de diminuir a retenção de líquidos (MOURÃO, 2006).

Por fim, o composto demonstrou reverter completamente as anormalidades na via de sinalização da insulina provocadas pela dieta

hiperlipídica, aumentando a sensibilidade dos tecidos-alvos a este hormônio (MOURÃO, 2006).

Entretanto, para que um novo fármaco alcance a fase clínica são necessários estudos que comprovem sua eficácia terapêutica – efeitos farmacológicos e tóxicos - e segurança (GOLDIM, 2007). Deste modo, o estudo da fase pré-clínica do GQ-2 - investigação do perfil farmacocinético e das propriedades tóxicas - torna-se imprescindível para avaliar sua aplicabilidade terapêutica e sua futura aplicação em ensaios clínicos.

A farmacocinética pré-clínica constitui um importante aspecto da investigação, os quais são determinados os parâmetros farmacocinéticos e as relações concentração-resposta, que permitem determinar os regimes posológicos, via e modo de administração. Estes parâmetros permitem a administração de doses que mantenham as concentrações plasmáticas efetivas, minimizando os efeitos tóxicos.

Deste modo, torna-se imprescindível que os ensaios de farmacocinética e toxicidade pré-clínica sejam realizados nos estágios iniciais do processo de desenvolvimento de fármacos, pois um perfil farmacocinético desfavorável e/ou efeitos tóxicos incompatíveis com o uso clínico – quando o risco supera os benefícios - são as principais causas de falhas no desenvolvimento de novos fármacos (WATERBEEMD e GIFFORD, 2003).

As características físico-químicas do composto também exercem grande influência nos parâmetros farmacocinéticos. Propriedades biofarmacêuticas inapropriadas, como baixa solubilidade aquosa, resultam em baixa absorção oral e biodisponibilidade reduzida, influenciando no volume de distribuição e clearance. Além disso, compostos com maior lipofilicidade, em geral, sofrem maior biotransformação, podendo resultar em ineficácia terapêutica consequente da baixa biodisponibilidade oral, ou ainda, podendo gerar metabólitos de alta toxicidade, fato que inviabiliza a continuidade do desenvolvimento do novo fármaco (WATERBEEMD e GIFFORD, 2003; AMORE et al., 2010).

Assim, os estudos pré-clínicos tem como finalidade a identificação de candidatos a fármacos adequados para estudos da fase clínica e por intermédio da integração de todas as etapas da fase pré-clínica – ensaios *in vitro* e *in vivo* – torna-se possível obter dados sobre o perfil de segurança e eficácia do composto e possibilita a projeção bem sucedida de regimes de doses para humanos identificando-se um candidato potencial para futuros estudos clínicos (AMORE et al., 2010).

Dessa forma, no presente trabalho, o objetivo foi avaliar o perfil farmacocinético do composto 5-(4-cloro-benzilideno)-3-(4-metil-benzil)-tiazolidina-2,4-diona (GQ-2) após administração de dose única por via oral (12 mg/Kg), pela via intraperitoneal (12 mg/Kg) e pela via intravenosa (3 mg/Kg) em ratos wistar. Para realizar esta avaliação, um método bioanalítico por UPLC foi desenvolvido e validado para a determinação do fármaco em plasma. Ainda, neste trabalho, foi realizado a avaliação preliminar dos efeitos nefrotóxicos e hepatotóxicos do novo composto, através de parâmetros bioquímicos dos grupos de animais que receberam GQ-2, bem como a determinação da estabilidade química e *ex vivo* em plasma de rato e humano.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Obesidade como principal fator de risco para o Diabetes Mellitus tipo 2

Atualmente a obesidade é considerada como um dos principais problemas de saúde pública mundial e sua incidência tem aumentado progressivamente nas últimas décadas, sendo considerada uma epidemia tanto em países desenvolvidos como em subdesenvolvidos (CUMMINGS, 2003; OLIVEIRA et al., 2004; STEIN e COLDITZ et al., 2004; GOMES et al., 2006; AZAGURY et al., 2011).

De acordo com o recente levantamento realizado pelo Ministério da Saúde, o percentual de pessoas obesas no Brasil subiu de 11,4% em 2006 para 15,8% em 2011 (OMS, 2012). Nos Estados Unidos a epidemia aumenta rapidamente (KAHN et al., 2001; STEIN e COLDITZ et al., 2004; NGUYEN e

El-SERAG, 2010) e, segundo dados do relatório “Estatísticas Mundiais de Saúde 2012” da Organização Mundial de Saúde (OMS), 26% dos adultos americanos são obesos. A obesidade acomete não somente a população adulta, mas também a mais jovem e é causa de morte de 2,8 milhões de pessoas por ano.

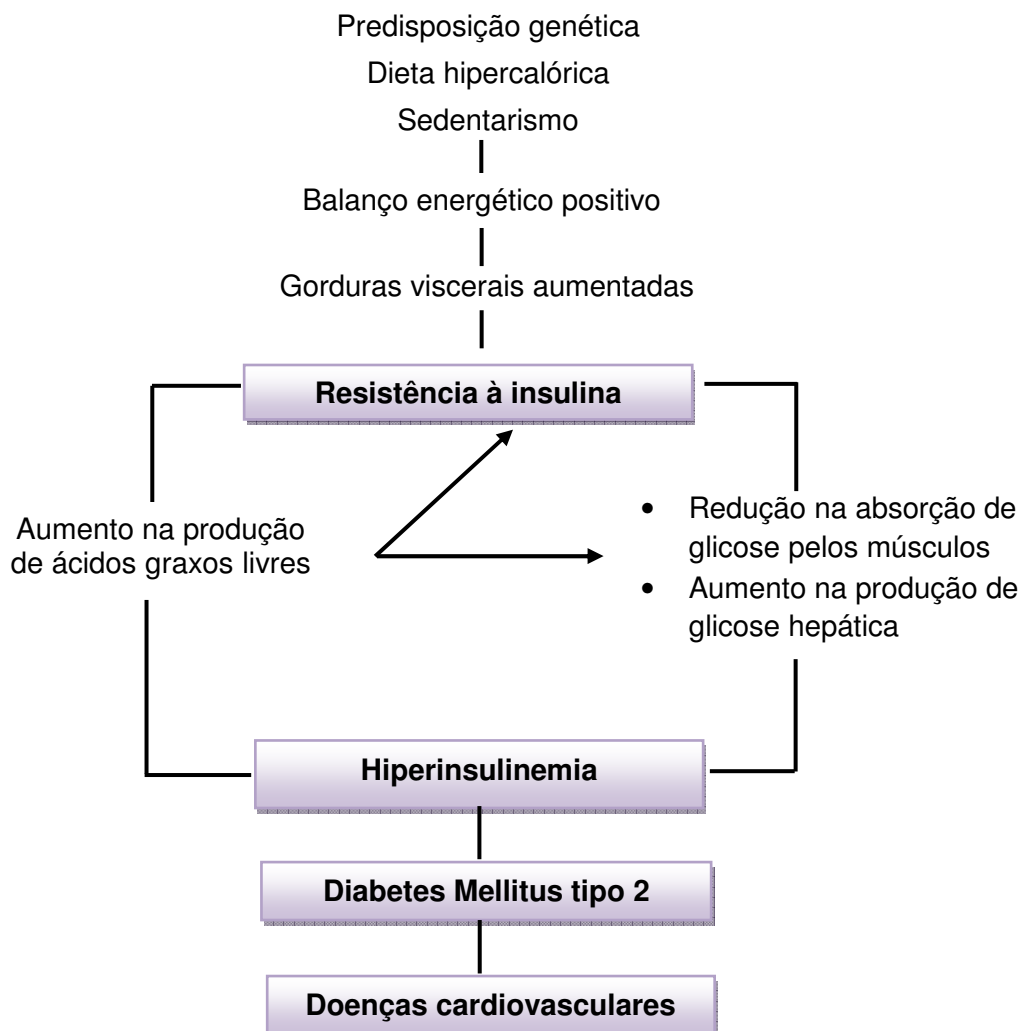
A obesidade é uma desordem nutricional que se caracteriza pelo acúmulo de gordura corpórea resultante de um balanço energético positivo prolongado causado pelo alto consumo de energia, baixo gasto energético ou a combinação de ambos. A predisposição genética também é um fator relevante no desenvolvimento da doença, porém são os fatores ambientais e comportamentais como hábitos alimentares inadequados e o sedentarismo que favorecem o aumento do ganho de peso (WEBBER, 2003; STEIN e COLDITZ et al., 2004; OLIVEIRA et al., 2004; NGUYEN e EL-SERAG, 2010) .

Esta patologia apresenta íntima relação com o desenvolvimento da síndrome metabólica a qual é diagnosticada clinicamente por hiperglicemia, pressão arterial elevada, dislipidemia aterogênica – altos níveis de triglicerídeos e baixos níveis de HDL (lipoproteína de alta densidade) colesterol, obesidade abdominal e resistência à insulina (TREMBLAY et al., 2004; RADENKOVIĆ et al., 2011; GRUNDY et al., 2013).

O aumento na prevalência da obesidade está associado com o aumento na prevalência da síndrome metabólica, portanto a resistência insulínica pode ser considerada como elo entre a obesidade e os fatores de risco desencadeantes de doenças cardiovasculares e diabetes mellitus tipo 2 (KAHN et al., 2001; GRUNDY et al., 2013).

Na Figura 2 estão dispostos os principais fatores que ocasionam a resistência à insulina e suas inter-relações com o diabetes mellitus tipo 2 e doenças cardiovasculares.

Figura 2. Obesidade e suas relações com a resistência à insulina, diabetes mellitus tipo 2 e doenças cardiovasculares.



A resistência insulínica (RI) é a diminuição da capacidade deste hormônio em promover a captação e o metabolismo da glicose pelos tecidos-alvos (FORMIGUERA, 2004; WANG et al., 2004) . Em consequência a essa diminuição ocorre a liberação de elevados níveis de insulina – a hiperinsulinemia. Esta, por sua vez, atua como um mecanismo compensatório por tempo limitado com o intuito de manter os efeitos fisiológicos do hormônio e a normoglicemia (WANG et al., 2004; SCHINNER et al., 2005).

A medida da obesidade é realizada através do índice de massa corpórea (IMC) e indivíduos com $IMC \geq 30 \text{ Kg/m}^2$ são considerados obesos e, portanto propensos à resistência insulínica (STEIN e COLDITZ et al., 2004; GOMES et al., 2006; KAHN et al., 2001; OMS, 2012) . Porém, segundo KAHN et al (2001) essa medida é equivocada uma vez que indivíduos com IMC semelhantes podem apresentar variação na distribuição da adiposidade e o padrão de distribuição da gordura corporal, em particular a gordura intra-abdominal ou visceral, influencia no desenvolvimento da RI.

Embora a RI possa acometer indivíduos magros (CNOP et al., 2002), o aumento na prevalência de resistência insulínica e hiperinsulinemia está diretamente relacionado com o aumento no ganho de massa corpórea (KAHN et al., 2001).

A adiposidade central ou intra-abdominal se manifesta clinicamente pela circunferência da cintura e este parâmetro é o melhor indicador na suscetibilidade da RI, pois sua prevalência aumenta com o aumento do teor de gordura corporal. Valores $>102 \text{ cm}$ para homens e $> 88 \text{ cm}$ para mulheres, caracterizam a obesidade abdominal (ST-PIERRE et al., 2002; SHAMSEDDEEN et al., 2011; GRUNDY et al., 2013).

Estudos tem comprovado que a adiposidade central ou intra-abdominal é o fator desencadeante da resistência insulínica (DESPRÉS et al., 1989; BJÖRNTORP, 1997; KAHN et al., 2001; TREMBLAY et al., 2004; DESPRÉS et al., 2008;). O mecanismo pelo qual isso ocorre não é bem compreendido, mas deve-se, em parte, a maior sensibilidade à lipólise induzida por catecolaminas e menor sensibilidade aos efeitos antilipolíticos da insulina na região visceral. O aumento da atividade lipolítica oferta maior quantidade de ácidos graxos livres no sistema porta. Este fato inibe a depuração hepática de insulina e estimula a produção de glicose através da gliconeogênese favorecendo a hiperinsulinemia, a hiperglicemia e a resistência insulínica (JENKINS e CAMPBELL, 2004; SHAMSEDDEEN et al., 2011).

Os tecidos periféricos envolvidos com os efeitos metabólicos da insulina são passíveis de resistência a este hormônio. O tecido muscular esquelético é responsável por mais de 75% da captação de glicose induzida por insulina. No

tecido hepático a insulina não promove a captação de glicose, mas age no bloqueio da gliconeogênese, glicogenólise e no estímulo da síntese de glicogênio atuando como componente regulador dos níveis de glicose (SALTIEL e KAHN, 2001; SCHINNER et al., 2005).

No tecido adiposo a captação de glicose representa uma pequena fração. Porém sabe-se que esse tecido não é apenas um reservatório de energia e que tem um importante papel do ponto de vista tanto metabólico – por manter o metabolismo da glicose através da regulação dos níveis circulantes de ácidos graxos livres que estão associados com a diminuição da sensibilidade à insulina – como órgão endócrino por secretar adipocinas (KERSHAW e FLIER, 2004; SHULMAN, 2004; SCHINNER et al., 2005; SHAMSEDDEEN et al., 2011).

Uma dessas adipocinas liberadas é o fator de necrose tumoral-alfa (TNF α). Estudos demonstraram que o TNF α é expresso em altos níveis na gordura intra-abdominal de ratos e humanos obesos (KERN et al., 1995; KERSHAW e FLIER, 2004) e apresenta propriedades antagonistas à insulina que contribui no desenvolvimento da resistência a este hormônio. Além disso, suprime a expressão de genes envolvidos na absorção e metabolismo da glicose (SCHINNER et al., 2005).

A leptina e a adiponectina - também secretadas pelo tecido adiposo - apresentam efeitos contrários ao TNF α por agirem diretamente na sensibilidade à insulina. A adiponectina é secretada abundantemente pelos adipócitos e na obesidade ocorre deficiência desse hormônio proteico, fato que contribui com a RI. Já a leptina regula a ingestão de alimentos e o gasto energético e a deficiência, ou mutações em seu receptor, provoca distúrbios nesses fatores que estão relacionados com o desenvolvimento da obesidade (SCHINNER et al., 2005; SHAMSEDDEEN et al., 2011; RYAN et al., 2011).

Diante exposto é evidente a relação entre a obesidade – em especial a obesidade abdominal – e a resistência à insulina, a qual é acompanhada pela hiperinsulinemia. A associação entre esses dois fatores leva a alterações que prejudicam o equilíbrio entre a função das células β e resistência à insulina, o que desencadeia o diabetes mellitus tipo 2.

Em adição, o conhecimento do mecanismo de ação da insulina, bem como as alterações que ocorrem na cascata de sinalização deste hormônio, é de suma importância para o entendimento entre RI na obesidade e DM2.

2.2 Sinalização normal da insulina

A insulina é um potente hormônio anabólico sintetizado pelas células β pancreáticas em resposta ao aumento dos níveis circulantes de glicose e aminoácidos após as refeições. Atua nos tecidos insulino-sensíveis incluindo tecido hepático, muscular e adiposo. Desempenha importante papel na homeostase da glicose por estimular sua captação periférica - principalmente em músculo e tecido adiposo - a lipogênese e a síntese proteica, além de inibir a gliconeogênese e a glicogenólise, responsáveis pela produção hepática de glicose, a lipólise e a proteólise. Outras funções da insulina estão relacionadas com o transporte de íons, proliferação e diferenciação celular e síntese de óxido nítrico (SALTIEL e KAHN, 2001; RUAN et al., 2003; WANG et al., 2004; SESTI, 2006).

A cascata de sinalização da insulina inicia-se com a ligação do hormônio a um receptor específico presente na membrana plasmática dos tecidos-alvos, denominado receptor de insulina (GREENFIELD e CAMPBELL, 2004; GUYTON et al., 2006). Este receptor é uma proteína tetramérica com atividade quinase constituído por duas subunidades α , extracelulares, e duas subunidades β , intracelulares, que tem função de enzima alostérica, em que a subunidade α inibe a atividade tirosina quinase da subunidade β (SALTIEL e KAHN, 2001; CARVALHEIRA et al., 2002).

A insulina acopla-se à subunidade α do receptor fato que leva à ativação da atividade quinase das subunidades β , ocasionando alteração conformacional e a autofosforilação dessas subunidades em vários resíduos de tirosina, que aumenta ainda mais sua atividade quinase (PESSIN e SALTIEL, 2000; CARVALHEIRA et al., 2002; SUN e LIU, 2009).

Uma vez fosforilado, o receptor de insulina fosforila vários outros substratos proteicos ou sinalizadores citoplasmáticos intracelulares, dentre eles

os substratos do receptor de insulina (IRS), principalmente IRS-1 e IRS-2 (DOMINICI et al., 2005).

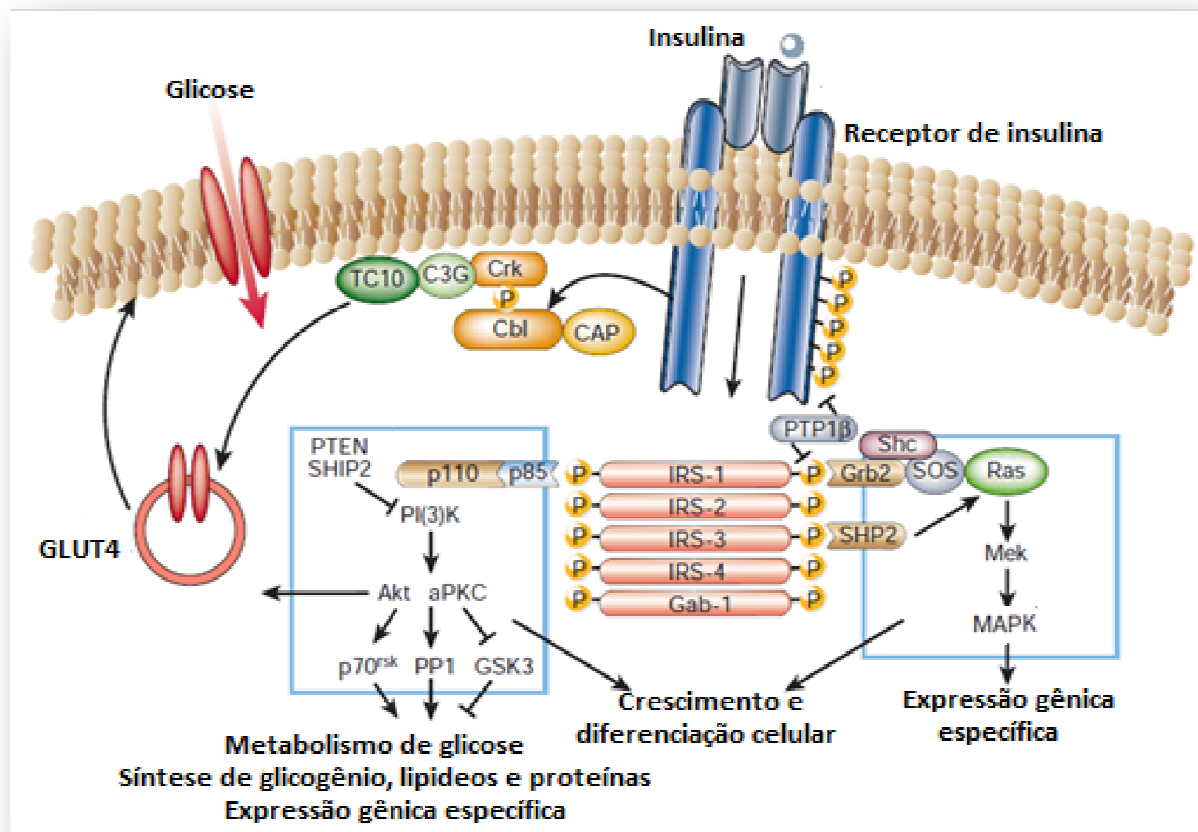
Após a fosforilação das proteínas IRS em tirosina, estas passam a apresentar sítios de reconhecimento para proteínas contendo domínios com homologia a Src 2 (SH2) (AROOR et al., 2012).

A fosfatidilinositol 3-quinase (PI3K) é uma enzima mediadora de praticamente todos os efeitos da insulina. Age na estimulação da captação de glicose, ativação da síntese de glicogênio e inibição da gliconeogênese por regulação da fosfoenolpiruvato carboxiquinase (DOMINICI et al., 2005; SCHINNER et al., 2005)

A ativação dessa via ocorre através da ligação de dois domínios SH2 da subunidade reguladora da PI3K (p85) com os sítios fosforilados em tirosina de IRS-1 (SUN e LIU, 2009). Essa enzima catalisa a fosforilação dos fosfoinosítídeos na posição 3 do anel de inositol em fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato (PIP3). Este último atua como um segundo mensageiro ativando fosfoinositol dependente de quinase 1 (PDK1) o qual fosforila a proteína quinase B (PKB) ou Akt, ativando-a (SCHINNER et al., 2005; MLINAR et al., 2006; AROOR et al., 2012).

A via da proteína quinase B, também chamada de Akt é de grande importância na síntese de glicogênio, pois é responsável pela ativação da enzima glicogênio sintetase quinase 3 (GSK-3) (MLINAR et al., 2006). No tecido adiposo e muscular, a Akt está relacionada com a translocação do principal transportador de glicose – o transportador de glicose 4 (GLUT4) - para a membrana plasmática e, portanto, é essencial na captação de glicose (SALTIEL e PESSIN, 2002; RUBIN e BOGAN, 2009). Atua também na regulação dos genes que codificam enzimas hepáticas como a fosfoenolpiruvato carboxiquinase (PECK), enzima limitante da gliconeogênese (SESTI, 2006), síntese proteica e diferenciação celular. Na Figura 3 estão representadas as vias de sinalização da insulina.

Figura 3. Representação esquemática das vias de sinalização da insulina. O receptor de insulina é uma tirosina quinase que se autofosforila e catalisa a fosforilação de proteínas intracelulares como os membros da família IRS, Shc e Cbl. As proteínas fosforiladas, interagem com moléculas de sinalização através de seus domínios SH2 resultando na ativação das vias de sinalização intracelular incluindo a PI3K, a cascata da MAPK e a ativação de TC10 via Cbl/CAP. Essas vias atuam em conjunto coordenando a síntese de proteínas, ativação e inativação de enzimas e a expressão gênica, resultando na regulação do metabolismo da glicose, lipídeos e proteínas.



Fonte: (SALTIEL e KAHN, 2001)

Entretanto, para que a captação de glicose induzida por insulina ocorra de maneira eficiente, uma segunda via de sinalização ocorre em adição à atividade de PI3K (CHIANG et al., 2006; MLINAR et al., 2006).

A ativação da via CAP/Cbl, através de algumas etapas de fosforilação, torna a proteína TC10 ativa promovendo o segundo sinal responsável pela translocação do transportador GLUT4, em paralelo com o sinal de PI3K (SALTIEL e KAHN, 2001; DOMINICI et al., 2005; CHIANG et al., 2006).

Como outros fatores de crescimento, a insulina também é capaz de ativar a proteína ativada pela mitógeno (MAP) quinase e da ERK que é responsável por catalisar a fosforilação de fatores de transcrição que levam a proliferação ou a diferenciação celular (SALTIEL e KAHN, 2001; CARVALHEIRA et al., 2002).

2.3 Alterações na sinalização insulínica resultante da resistência à insulina

A resistência insulínica induzida pela obesidade manifesta-se pela diminuição do transporte da glicose, bem como por alterações no seu metabolismo. Essas alterações podem resultar de defeitos em um ou mais níveis na cascata de sinalização da insulina nos tecidos-alvos que prejudica a fosforilação dos substratos, com conseqüente interrupção do sinal insulínico (SESTI, 2006; FRÖJDÖ et al., 2009).

O aumento na fosforilação em resíduos de serina da proteína IRS-1 é um fator essencial que contribui com a RI (MLINAR et al., 2007).

A fosforilação em serina/treonina tanto do receptor de insulina como de IRS-1 afeta a cascata de sinalização insulínica por inibir a fosforilação em tirosina mediada pelo hormônio o que leva a resistência à insulina (MÜSSIG et al., 2005). Essas fosforilações inibitórias causam feedback negativo na sinalização da insulina e age como um mecanismo indutor de outras vias relacionadas com RI (SALTIEL e KAHN, 2001).

Entretanto, para que a fosforilação em tirosina e a sinalização da insulina ocorra de modo eficiente é necessário que haja um estado basal na fosforilação em serina de IRS-1. Porém, o grau em que essa fosforilação deve ocorrer e qual sítio de IRS-1 dever ser fosforilado em serina para provocar resistência à insulina são desconhecidos (MLINAR et al., 2007).

A fosforilação de IRS-1 em serina 307 causa perturbações na interação proteína-proteína entre IRS-1 e o receptor de insulina resultando na inibição da fosforilação em tirosina estimulada pela insulina (CARLSON et al., 2004).

As proteínas tirosina-fosfatases (PTPases), em especial a PTP1B, também atenuam a ação da insulina por catalisar a rápida desfosforilação dos receptores de insulina e seus substratos (SALTIEL e KAHN, 2001).

A citocina TNF α , altamente expressa no tecido adiposo, é um fator essencial que contribui na patogênese da resistência insulínica relacionada à obesidade (MLINAR et al., 2007). O TNF α age em pós-receptor através da ativação da quinase inibidora do fator nuclear KB (IKK- β) que induz a fosforilação em serina do receptor de insulina e de IRS-1. Também é responsável pela baixa regulação de proteínas, incluindo IRS-1, GLUT4, PPAR γ , dentre outras (RUAN e LODISH, 2003).

A ativação de IKK- β medeia à repressão dos genes dos adipócitos imprescindíveis para a função adipocitária, o que favorece a liberação de ácidos graxos e a produção de citocina. Em adição, a subunidade p65 de IKK- β é potencialmente capaz de inibir a transcrição dos genes de PPAR γ em adipócitos induzindo a resistência à insulina. O mecanismo antagônico entre p65 e PPAR γ é de grande importância, pois são dois fatores que podem estar relacionados com a regulação dos genes de adipócitos e assim com a função metabólica e secretora. Portanto, o equilíbrio entre esses dois fatores determina a sensibilidade à insulina no tecido adiposo (RUAN e LODISH, 2003).

Em síntese, os caminhos que levam a desregulação na transdução do sinal insulínico são muito complexos e envolvem alterações de vários níveis que resultam na redução da densidade do receptor de insulina e de sua atividade quinase, na fosforilação de IRS-1 e atividade de PI3K com consequente redução de GLUT4, como também de outras enzimas celulares envolvidas nesse processo (FRÖJDÖ et al., 2009).

Defeitos genéticos no receptor de insulina pode levar a resistência à insulina severa embora esse evento seja raro (SALTIEL e KAHN, 2001).

Várias proteínas expressas pelo tecido adiposo, com notável destaque para TNF α , são responsáveis pela gênese da RI relacionada à obesidade, afetando não só as proteínas descritas acima como também várias outras

proteínas enzimáticas que catalisam a transmissão do sinal insulínico, o que torna o tecido adiposo o principal mediador dos defeitos pós-receptores da insulina e o desenvolvimento do DM2 (RUAN e LODISH, 2003).

2.4 Diabetes mellitus tipo 2

O diabetes mellitus tipo 2 (DM2) é uma desordem metabólica caracterizada pela hiperglicemia resultante da resistência à insulina – principal evento fisiopatológico - e pela disfunção das células β pancreáticas ocasionada pela secreção compensatória deste hormônio na tentativa de suprimir a resistência à insulina (CAMPBELL, 2000; JENKINS e CAMPBELL, 2004; SHAMSEDDEEN et al., 2011; SHÄFER et al., 2011).

É uma epidemia global considerada como uma das principais causas de morbimortalidade no mundo e sua prevalência aumentou de forma exponencial nos últimos tempos. Em 2010, o número de casos foi de aproximadamente 285 milhões representando um aumento de 50% comparado ao ano de 2011. Estima-se que no ano de 2030 esse número saltará para 438 milhões e que 90 – 95% dos casos serão de DM2 (CAMPBELL, 2000; HERDER e ROLDEN, 2010; SHÄFER et al., 2011; WHO, 2012;).

Causas multifatoriais são responsáveis pelo desenvolvimento da patologia. As mais comuns são dieta desequilibrada associada com inatividade física e a obesidade – em particular a obesidade intra-abdominal - que leva ao aparecimento da resistência insulínica, principal condição clínica do DM2 (SHAMSEDDEEN et al., 2011).

Contudo, há fortes evidências de que os componentes genéticos também apresentam influência tanto na diminuição da sensibilidade à insulina quanto na diminuição na secreção deste hormônio. Segundo estudos realizados mais de 25 genes relacionados com a patogênese do DM2 foram identificados (HERDER e ROLDEN, 2010; SHÄFER et al., 2011).

Os sintomas clássicos do DM2 são poliúria, polidipsia, visão turva, polifagia, infecções vaginais, fadiga e dormência e formigamento nas

extremidades. Já as complicações da doença que estão atribuídas com a morbimortalidade são divididas em: a) complicações microvasculares: retinopatia, nefropatia, neuropatia e problemas nos pés que podem resultar em amputação b) complicações macrovasculares: doenças cardiovasculares, cerebrovasculares e doença vascular periférica (CAMPBELL, 2000; SKELLY et al., 2005; GARCÍA, 2011; SHANG et al., 2012).

Pelo fato da resistência à insulina ser uma característica comum à obesidade e o fator desencadeante do DM2, a compreensão do processo fisiopatológico entre obesidade e resistência à insulina torna-se imprescindível.

Embora avanços nos estudos na área da biologia molecular e na identificação de várias moléculas envolvidas na via de sinalização da insulina tenham ocorrido, o mecanismo entre obesidade e diminuição na sensibilidade à insulina não estão completamente elucidados (KAHN et al., 2001).

Há evidências de que a deficiência quantitativa dos receptores de insulina nos tecidos-alvos em indivíduos obesos esteja envolvida com esse processo. Porém, a maioria dos estudos sugerem que anormalidades na via de sinalização da insulina, com consequentes efeitos na ativação do receptor e na cascata de fosforilação, são a causa predominante do surgimento da resistência (KAHN et al., 2001; GUYTON et al., 2006, MOURÃO, 2006).

Sabe-se que a complexidade do tecido adiposo vai além do fato de ser um tecido metabolicamente ativo, pois também é responsável por controlar o metabolismo energético e a função imunológica. Entretanto, ressalta-se a importância de sua função endócrina por estar relacionada às disfunções ocasionadas pelo excesso desse tecido, em particular, a gordura visceral que leva a resistência à insulina (SPIEGELMAN, 1998; KERSHAW e FLIER, 2004).

O tecido adiposo modula o metabolismo da glicose através da regulação dos níveis de ácidos graxos livres no plasma. Assim, o aumento na concentração de ácidos graxos livres circulantes provenientes de uma dieta calórica, altera o metabolismo dos ácidos graxos levando a resistência insulínica e o DM2 (SHULMAN, 2004; SCHINNER et al., 2005).

A relação entre a adiposidade abdominal com os elevados níveis de ácidos graxos na circulação ocorre porque o armazenamento da gordura nos adipócitos é ineficiente nessa região. Assim, tem-se um aumento na suscetibilidade à atividade lipolítica devido a diferenças na expressão de receptores lipolíticos nos adipócitos como, por exemplo, receptores de catecolamina. Como consequência, os ácidos graxos liberados resultam na diminuição da sensibilidade à insulina no fígado e tecido muscular esquelético por afetarem a cascata de sinalização da insulina (BJÖRNTOFT, 1997; SHULMAN, 2004; FORMIGUERA, 2004).

Um estudo realizado com indivíduos jovens portadores de DM2 com peso normal, demonstram que a concentração de ácidos graxos livres (AGL) é inversamente proporcional à sensibilidade à insulina, reforçando a hipótese de que alterações no metabolismo dos AGL contribuem para o desenvolvimento do DM2 (SHULMAN, 2004).

Randle e colaboradores (1963) iniciaram estudos com o intuito de demonstrar que os ácidos graxos livres interferiam no metabolismo da glicose. Os estudos foram realizados *in vitro* em músculo cardíaco e diafragma de ratos e os resultados mostraram que a inibição do metabolismo da glicose ocorre pela competição entre a glicose e os ácidos graxos pelos substratos de oxidação, acarretando no aumento do processo oxidativo de gordura no músculo. Este aumento inibe a atividade da enzima piruvato desidrogenase e fosfofrutoquinase a qual é responsável pela glicólise. O bloqueio dessa enzima, por sua vez, leva ao acúmulo de glicose-6-fosfato que inibe a hexoquinase II que provoca o aumento da glicose intracelular e, conseqüente, a diminuição na sua captação. Dessa forma, levantaram a hipótese da resistência à insulina ser decorrente do aumento da concentração de glicose-6-fosfato intramuscular.

No entanto, estudos *in vivo* realizados por Shulman (2000) corroboram a hipótese de Randle (1963) de que o aumento na concentração de glicose-6-fosfato é responsável pela resistência à insulina induzida por ácidos graxos. Nesses estudos observaram que, na verdade, há diminuição na concentração de glicose-6-fosfato a qual é precedida pelo decaimento na síntese de glicogênio intramuscular. Isso pode ocorrer pelo transporte da glicose ou por

inibição na atividade de fosforilação. Esse mecanismo ocorre pela acumulação intracelular dos ácidos graxos ou seus metabólitos, que interfere na sinalização pela IRS/PI3-kinase com consequente redução na translocação de GLUT4 para a membrana plasmática. Em adição a esse mecanismo, também ocorre o aumento na fosforilação das proteínas IRS em serina, prejudicando a transdução do sinal insulínico.

A atividade endócrina do tecido adiposo também contribui no desenvolvimento da resistência à insulina pela liberação de TNF α que prejudica a ação da insulina e favorece a lipólise. A nível molecular está associado ao aumento da fosforilação de IRS-1 em resíduos de serina e com a diminuição na expressão de GLUT4. Em contra partida há a liberação de leptina e adiponectina que estão diretamente relacionadas com o aumento da sensibilidade à insulina (FORMIGUERA, 2004).

2.5 Farmacoterapia do DM2: Tiazolidinedionas e seu mecanismo de ação

O tratamento atual do DM2 visa manter o controle glicêmico adequado através da supressão da resistência insulínica e da disfunção das células β pancreáticas. A dieta hipocalórica associada com a prática de exercícios físicos é uma alternativa inicial para o tratamento do DM2 por aumentar a sensibilidade à insulina e diminuir a hiperinsulinemia através da redução dos níveis de ácidos graxos circulantes e, portanto, na reversão das anormalidades na via de sinalização da insulina (ARAÚJO et al., 2000).

Porém, devido a fatores genéticos e/ou comportamentais a combinação entre dieta e atividade física pode ser ineficaz, levando a uma maior depleção das células β pancreáticas e a quantidade de insulina secretada não suporta a carga de resistência a este hormônio (GALE, 2001). Desse modo, a farmacoterapia para o DM2 é adotada com o objetivo de manter o controle glicêmico – glicemia de jejum e pós prandial e hemoglobina glicada em níveis adequados (ARAÚJO et al., 2000).

Os agentes antidiabéticos orais utilizados na clínica diferem quanto ao mecanismo de ação e as principais classes são: os secretagogos de insulina

(sulfoniluréias, glimiperida e repaglinida), os redutores da produção hepática de glicose (biguanidas), que retardam a digestão e a absorção intestinal de glicose (inibidores da α -glicosidade) e os sensibilizadores de insulina (metformina e tiazolidinadionas) (MERIDEN, 2003; KRENTZ e BAILEY, 2005).

As tiazolidinadionas (TZDs) ou glitazonas destacam-se frente aos outros agentes antidiabéticos orais por apresentar atividade hipoglicemiante mediada pelo aumento da sensibilidade à insulina no músculo esquelético, fígado e tecido adiposo, ao mesmo tempo em que diminui a concentração da insulina no plasma – a hiperinsulinemia. Além disso, impede a depleção das células β pancreáticas e apresenta efeitos potencialmente benéficos nos parâmetros da síndrome metabólica, incluindo pressão arterial elevada, distúrbios lipídicos e doenças cardiovasculares (HAUNER, 2002).

Estes fármacos foram desenvolvidos a partir de análogos do ácido clofíbrico, sem conhecimento exato do seu sítio de ação. Atuam ligando-se e ativando a isoforma do receptor nuclear Peroxisome Proliferator-Activated Receptor gamma (PPAR γ) que modifica a transcrição de vários genes envolvidos diretamente no metabolismo de glicose e de lipídios (SCHEEN, 2001a; DEROSA et al., 2004). Esse receptor é expresso seletivamente em maior quantidade no tecido adiposo tanto de roedores como de seres humanos e é também encontrado em outros órgãos, como fígado e músculo esquelético (HAUNER, 2002; GUO e TABRIZCHI, 2006).

O mecanismo de ação das TZDs não é completamente elucidado, entretanto sabe-se que seus efeitos são mediados pelo tecido adiposo. Esse fato ocorre não só pela redução dos níveis de ácidos graxos livres, mas também por afetar a via de sinalização insulínica nos tecidos-alvos (GREENFIELD e CAMPBELL, 2004).

As TZDs apresentam alta afinidade de ligação com os receptores nucleares PPAR γ os quais são expressos em maior quantidade no tecido adiposo. A ativação desses receptores induz positivamente a diferenciação de pré adipócitos em pequenos adipócitos, mais sensíveis à insulina do que os grandes adipócitos, bem como a sua proliferação na gordura subcutânea (KERSTEN, 2002; MARTENS et al., 2002; PAKALA et al., 2004; GUO e

TABRIZCHI, 2006). Embora os receptores sejam expressos em alta quantidade na gordura visceral, as TZDs não exercem efeito nesse local (GREENFIELD e CAMPBELL, 2004).

O aumento quantitativo de adipócitos subcutâneos por sua vez, intensifica a captação – por intermédio da enzima ácido graxo translocase - e o armazenamento dos ácidos graxos que resulta na diminuição dos níveis de ácidos graxos e triglicerídeos em tecido muscular, hepático e gordura visceral, diminuindo a resistência à insulina (GREENFIELD e CAMPBELL, 2004; GUO e TABRIZCHI, 2006). A hipótese de Randle (1963) pode estar envolvida nesse mecanismo em que a diminuição nos níveis de ácidos graxos possibilita maior oxidação da glicose (HAUNER, 2001).

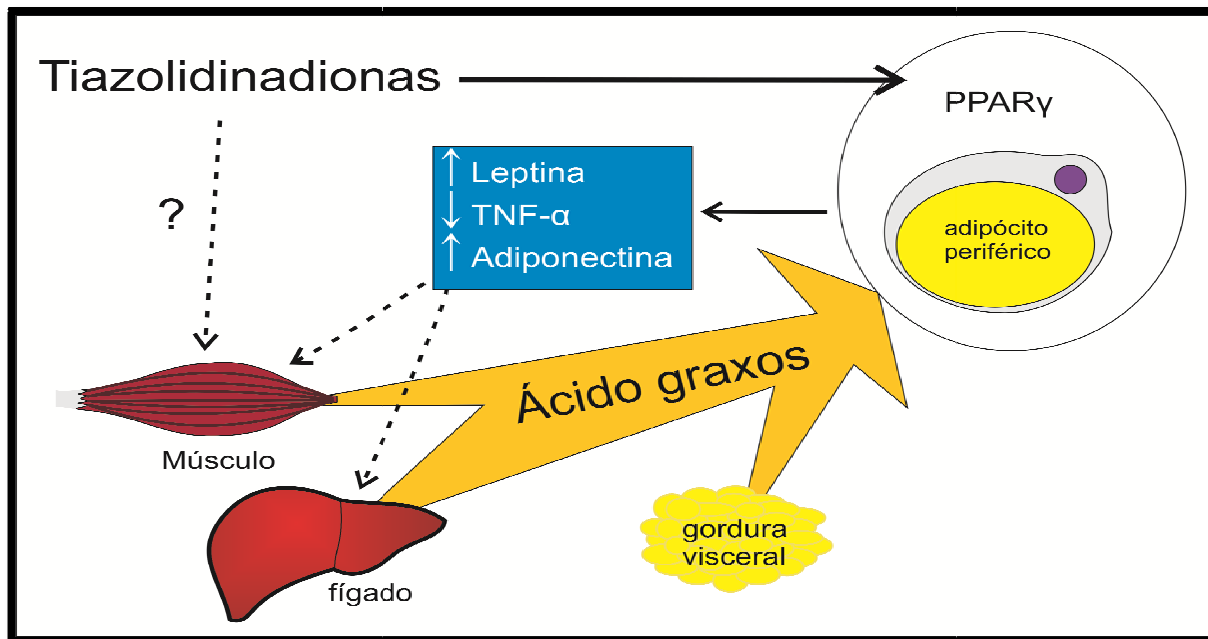
O ganho de peso é uma característica comum do tratamento com TZDs. Estudo realizado com pacientes tratados com rosiglitazona sugeriu que o ganho de peso está relacionado com o aumento da gordura subcutânea ao invés da visceral e que o ganho de peso não é decorrente apenas do aumento na massa de células de gordura, mas também por uma maior retenção de líquidos (HAUNER, 2001; BAYS et al., 2004; BALAS et al., 2007).

Embora a quantidade de PPAR γ no músculo esquelético seja de 10 a 30 vezes menor que no tecido adiposo, as TZDs também aumentam a sensibilidade à insulina neste local (SPIEGELMAN, 1998). Alguns possíveis mecanismos foram propostos para explicar este fato.

O primeiro deles sugere que a ativação do PPAR γ induzida pela TZD no tecido adiposo desencadeie uma sinalização endócrina dos adipócitos para o músculo esquelético. Este mecanismo pode acontecer através de dois processos distintos: a) primeiro, devido a uma ação direta das TZDs que promove o aumento da adipogênese no tecido adiposo que leva à maior “depuração” dos ácidos graxos livres e diminui o transporte destes para o músculo aumentando a sensibilidade à insulina: b) segundo, através de ação indireta, ou seja, por desencadear a sinalização endócrina dos adipócitos para o músculo esquelético modulando a produção de hormônios relacionados com a resistência insulínica promovendo aumento na produção de adiponectina e

leptina e redução de $\text{TNF}\alpha$ (Figura 4) (HAUNER, 2002; MARTENS et al., 2002; PAKALA et al., 2004; GUO e TABRIZCHI, 2006).

Figura 4. Mecanismo proposto de ação das tiazolidinadionas.



Fonte: (Adaptado de GREENFIELD e CAMPBELL, 2004)

O segundo mecanismo sugere que o efeito sensibilizador das TZDs não é mediado pela ativação de $\text{PPAR}\gamma$ no tecido adiposo, mas sim por agir diretamente nesse tecido (YKI-JÄRVINEN, 2004).

De acordo com Yki-Järvinen (2004) um estudo realizado em camundongos demonstrou que a ausência do $\text{PPAR}\gamma$ no tecido adiposo não induz a resistência á insulina no tecido muscular, considerando que a exclusão desse receptor no músculo é que causa a resistência. Também foi observado que a resistência no músculo não responde ao efeito das TZDs mediados pelo tecido adiposo, implicando que esses agentes promovem a sensibilização por estimulação direta de receptores $\text{PPAR}\gamma$ musculares.

Outro estudo realizado por Hevener et al (2003) reforça essa hipótese. Através de perturbações específicas na expressão de $\text{PPAR}\gamma$ no tecido muscular constatou-se que a redução desses receptores resulta em um estado severo de resistência à insulina mostrando que esse tecido é crucial para

sinalização por PPAR γ . Esse fato ocorre, em parte, através da regulação de genes alvos específicos e porque os defeitos no músculo podem resultar em efeitos adversos na ação da insulina no tecido adiposo e hepático.

No tecido hepático o efeito sensibilizador da TZD ocorre através da diminuição na concentração de ácidos graxos livres e no conteúdo de triglicerídeos hepáticos mediados pelos receptores PPAR γ no tecido adiposo (Figura 4). Isso leva a maior captação de glicose induzida por insulina devido ao aumento na oxidação da glicose (FULGENCIO et al., 1996; MAYERSON et al., 2002). A inibição da gliconeogênese (MARTENS et al, 2001) e a ativação da glicólise nos hepatócitos também ocorrem (KOMERS e VRÁNA, 1998).

A secreção de adiponectina pelos adipócitos está estreitamente relacionada com o aumento na resposta insulínica. De acordo com estudos realizados por Bajaj et al. (2004) após o tratamento com pioglitazona foi observado diminuição no teor de gordura hepática e aumento na sensibilidade à insulina decorrente do aumento dos níveis plasmáticos de adiponectina.

As TZDs também podem exercer seus efeitos diretamente nos receptores PPAR γ hepáticos, embora a expressão desses receptores seja diminuída (YKI-JÄRVINEN, 2004).

2.6 Toxicidade das tiazolidinonas

O desenvolvimento clínico das TZDs foi postergado em decorrência da baixa eficácia e/ou perfis de toxicidade observados nos estudos de fase clínica II, inviabilizando a aplicação clínica da ciglitazona e da englitazona (STAFYLAS et al., 2009; SCHEEN, 2011a).

A troglitazona foi o primeiro fármaco da classe das TZDs aprovado pelo FDA em janeiro de 1997 para uso clínico por demonstrar eficácia na redução da hiperglicemia em pacientes com DM2. Entretanto, em março de 2000 foi retirada do mercado por estar relacionada com insuficiência hepática grave com necessidade de transplante de órgão e alguns casos de morte, revelando ser um fármaco hepatotóxico (MALIK, et al., 2000; GALE, 2001).

Os efeitos tóxicos da troglitazona que culminaram com a sua proibição em alguns países, despertou enorme interesse da área científica em desenvolver novas TZDs devido a esses fármacos apresentarem um mecanismo de ação promissor capaz de reverter a resistência à insulina. Assim, outros dois membros da classe das TZDs - rosiglitazona e pioglitazona – foram aprovadas pelo FDA em 1999 e pela European Agency for the Evaluation of Medicinal Products (EMA) em 2000 por apresentarem boa eficácia e baixo perfil tóxico quando comparados com a troglitazona (SCHEEN, 2001a).

No entanto, ainda permanecia incerto se a hepatotoxicidade era um efeito comum da classe das TZDs relacionadas, pelo menos em parte, com a ativação de PPAR γ , ou se estava unicamente relacionado com a estrutura específica da troglitazona (SCHEEN, 2001b).

De acordo com Scheen (2001b) os resultados de ensaios clínicos realizados com troglitazona, rosiglitazona, pioglitazona e um grupo placebo demonstraram que a incidência de anormalidade hepáticas – definida como qualquer alteração no nível de ALT \geq 3x o limite superior normal – para a rosiglitazona e para a pioglitazona foi semelhante ao grupo placebo, com exceção de um único caso para rosiglitazona em que o paciente apresentou nível de ALT dez vezes maior. Já a troglitazona apresentou um nível de ALT cerca de três vezes maior quando comparado ao grupo placebo.

Assim, pode-se observar que a hepatotoxicidade que retirou a troglitazona do mercado é inerente a propriedades específicas da molécula ao invés da estrutura comum compartilhada entre as TZDS, a tiazolidina-2,4-diona (SCHEEN, 2001b).

Em decorrência desse fato, rosiglitazona e pioglitazona adquiriram grande relevância no tratamento do DM2 e a rosiglitazona foi um dos 25 fármacos mais vendidos na década de 90 (PANICKER et al., 2012). Entretanto, após a publicação de uma meta-análise realizada por Nissen e Wolski (2007) a rosiglitazona passou a ser associada com o aumento de riscos cardiovasculares. Os resultados mostraram que o tratamento com rosiglitazona está associado com um aumento significativo tanto no risco de infarto do

miocárdio como de mortes por causas cardiovasculares quando comparado com placebo e outros antidiabéticos orais.

A rosiglitazona é metabolizada através da isoforma CYP2C8. Esta enzima, por sua vez, catalisa o metabolismo do ácido araquidônico em substâncias vasoativas aumentando o risco de aterosclerose e infarto agudo do miocárdio. Estudos em animais evidenciaram a ocorrência de aumento no volume plasmático e hipertrofia cardíaca. Já estudos realizados em humanos, constataram o aumento de colesterol LDL e triglicerídeos (SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES, 2010).

Não se sabe ao certo qual é o mecanismo responsável por esses efeitos, porém níveis elevados de colesterol LDL estão associados com o aumento de riscos cardiovasculares. Em adição, a rosiglitazona tem a capacidade de provocar insuficiência cardíaca congestiva que está relacionada com o aumento no volume intravascular, o qual requer uma demanda de oxigênio que, em indivíduos suscetíveis, pode ocasionar isquemia. A rosiglitazona também diminui os níveis de hemoglobina provocando estresse fisiológico e conseqüentemente isquemia miocárdica (NISSEN e WOLSKI, 2007).

Uma atualização dessa meta-análise foi realizada e observou-se que o número de infarto do miocárdio continua aumentando no tratamento com a rosiglitazona, porém o mesmo não acontece em relação a outras doenças cardiovasculares, as quais não apresentaram aumento evidente na sua prevalência nos últimos anos (NISSEN e WOLSKI, 2010).

A retenção de líquidos, caracterizada pelo rápido ganho de peso corporal e a formação de edema periférico e pulmonar, são outros tipos de efeitos colaterais comuns da rosiglitazona (ZHANG et al., 2005; CONSOLI e FORMOSO, 2013).

Além disso, apresenta algumas limitações no seu uso clínico, como a exclusão da monoterapia e associação com a insulina, aprovando-se somente a associação com a sulfoniluréia e a metiformina (SCHEEN, 2001a).

Várias outras meta-análises de ensaios clínicos randomizados foram realizadas de modo a investigar o perfil de segurança cardiovascular da rosiglitazona, e todos os estudos demonstram que a rosiglitazona está associada com o aumento de riscos cardiovasculares, em particular, o infarto agudo do miocárdio (SINGH et al., 2007; PSATY e FURBERG, 2007; MONAMI et al., 2008; ZIYADEH, et al., 2009).

Assim, no ano de 2010, a EMEA retirou a rosiglitazona do mercado europeu e proibiu o uso deste medicamento em decorrência da associação com o aumento de risco cardiovascular, enquanto que o FDA restringiu severamente o seu uso (PANICKER et al., 2012; CONSOLI e FORMOSO, 2013). Já no Brasil, nesse mesmo ano, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária por meio da Resolução nº 4.466 de 28/09/2010 cancelou o registro do medicamento Avandia® - que contém rosiglitazona em todas as suas apresentações farmacêuticas e associações (ANVISA, 2010).

Assim, a pioglitazona é o único fármaco da classe das TZDs ainda listada na American Diabetes Association – European Association for the Study of Diabetes 2012 Position Statement, e que continua sendo utilizada na clínica no tratamento do DM2 (CONSOLI e FORMOSO, 2013).

A pioglitazona apresenta como vantagem alguns efeitos benéficos quando comparada com a rosiglitazona apesar de serem da mesma classe. Atua de modo diferente sobre o metabolismo de lipídios, reduzindo os níveis de triglicérides e aumentando os níveis de HDL colesterol (NISSEN e WOLSKI, 2010; SINHA e GHOSAL, 2013), além de apresentar perfil cardiovascular mais seguro do que a rosiglitazona, pois não tem sido associada com riscos cardiovasculares (PANICKER et al., 2012; SINHA e GHOSAL, 2013).

No entanto, o uso da pioglitazona tornou-se restrito e está sob monitoramento por apresentar, assim como as outras TZDs, alguns efeitos tóxicos limitando o seu uso clínico (CONSOLI e FORMOSO, 2013).

Estudos clínicos constataram que a pioglitazona aumenta de modo expressivo o risco de desenvolver câncer de bexiga. O desenvolvimento desta patologia apresenta íntima relação com o período de duração da terapia, por

mais de 24 meses, e com o acúmulo de dose, o qual não deve exceder 28.000 mg (TSENG, 2013). Pacientes que se submetem a tratamento com pioglitazona por tempo superior a dois anos tem 40% de chances de desenvolver câncer de bexiga e aproximadamente o dobro de risco para aqueles que utilizam altas doses do medicamento (SINHA e GHOSAL, 2013).

Ensaio pré-clínicos ressaltaram o fato de que elevadas doses de pioglitazona tem relação como desenvolvimento de câncer de bexiga, o que levou o FDA a advertir sobre a prescrição deste medicamento em altas doses e por período prolongado (FUJIMOTO, et al., 2013).

A ANVISA, através do informe nº 03 de 29 de setembro de 2010, publicou as principais advertências e contra-indicações a respeito do uso da pioglitazona (Actos®). O uso não é indicado para pacientes que apresentem hipersensibilidade ao cloridrato de pioglitazona, com insuficiência cardíaca de classe III ou IV, com evidência clínica de doença hepática ativa ou níveis de transaminase sérica aumentado (TGP > 2,5 vezes o limite da normalidade) e pacientes com insuficiência cardíaca sintomática. Quanto à teratogenicidade, é considerado como categoria C (classificação do FDA) por causar efeitos tóxicos em fetos animais, porém não existem estudos controlados em mulheres (BRASIL, 2010).

Diante do exposto é evidente a necessidade do desenvolvimento de novas TZDs que apresentem perfil tóxico mais favorável do que as TZDs já sintetizadas e utilizadas na clínica, pois apresentam um mecanismo de ação diferenciado quando comparado com os outros agentes antidiabéticos orais disponíveis, sendo um fármaco promissor para o tratamento do DM2.

Assim, Mourão (2006) sintetizou 12 derivados arilideno-tiazolidinadionas (ATZDs) da 5-benzilideno-3-(4-metil-benzil)-thiazolidina-2,4-diona com substituição no anel benzilideno. As novas ATZDs, que compartilham a estrutura 5-arilideno-3-(4-metil-benzil)-tiazolidinadiona-2,4-dionas, foram obtidas através de adição nucleofílica da 3-(4-metil-benzil)-tiazolidina-2,4-diona com etil-(2-ciano-3-fenil)-acrilatos substituídos.

A avaliação da atividade biológica *in vivo* em modelo experimental de camundongos diabéticos foi realizada após a administração de doses diárias de 5-40 mg/Kg pela via oral durante 15 dias de tratamento. Deste modo, foi possível observar que as novas 5-arilideno-3-(4-metil-benzil)-tiazolidinadiona-2,4-dionas apresentam atividade hipoglicemiante promissora e que sua ação sob os níveis de triglicérides é semelhante à encontrada para a rosiglitazona quando utilizada na mesma concentração, entretanto a atividade em altas concentrações (30mg/Kg) apresenta efeito superior e pode ser usada de forma segura por apresentar baixo perfil tóxico (MOURÃO, et al., 2005; LEITE, et al., 2007).

Além disso, através dos estudos de “Docking”, avaliou-se a interação das ATZDs com o domínio de ligação ao ligante (LBD) do receptor PPAR γ e constatou-se que os complexos formados entre esses compostos e o receptor apresentam boa estabilidade (energia de ligação negativa) quando comparada com a energia de ligação da rosiglitazona (LEITE et al., 2007).

Após as análises dos estudos de atividade biológica juntamente com os dados obtidos através dos estudos de “Docking” foi possível inferir que a presença de um átomo de cloro no anel fenil resulta em significativa atividade hipoglicemiante (LEITE et al., 2007).

Assim, o composto 5-(4-cloro-benzilideno)-3-(4-metil-benzil)-tiazolidina-2,4-diona (GQ-2), devido a sua capacidade hipoglicemiante promissora demonstrada em estudos preliminares, foi selecionado com o intuito de avaliar os seus efeitos moleculares e metabólicos na sensibilização da insulina sobre os tecidos alvos – tecido muscular esquelético, adiposo e hepático - bem como a sua capacidade de reverter às anormalidades na via de sinalização da insulina em camundongos *swiss* com obesidade induzida por dieta hiperlipídica. Para a realização do estudo, os animais foram submetidos ao tratamento com GQ-2 na dose de 20 mg/Kg/dia pelo período de 14 dias e utilizou-se rosiglitazona como substância padrão na dose de 10 mg/Kg/dia pelo mesmo período de tempo, ambos administrados pela via oral (MOURÃO, 2006).

O ganho de peso corporal é um efeito adverso característico do tratamento com rosiglitazona devido, em parte, a maior retenção de líquidos. Nesse estudo, os animais tratados com GQ-2 apresentaram menor ganho de peso corporal ($0,7 \pm 0,35\text{g}$ – $n=21$) quando comparado com os animais tratados com rosiglitazona ($2,9 \pm 0,46\text{g}$ – $n=12$). Observou-se que, durante o período de 24 horas, não houve diferença significativa ($p > 0,05$) em relação ao consumo de ração, assim como não foi observada diferença significativa ($p > 0,05$) entre a quantidade de massa adiposa peri-epididimal dos animais tratados com o GQ-2 e com a rosiglitazona, embora as TZDs tenham apresentado redução de aproximadamente 33% em relação ao grupo da dieta hiperlipídica. Portanto, através da avaliação da quantidade de água medida através do peso seco da carcaça, o menor ganho de peso corporal relacionado ao GQ-2 atribui-se, em parte, a sua capacidade em reter menor quantidade de líquidos em comparação a rosiglitazona (MOURÃO, 2006).

O GQ-2, assim como a rosiglitazona, reduziu de forma significativa os níveis basais de glicose plasmática, 30 e 27% respectivamente, demonstrando ser capaz de diminuir a resistência periférica à insulina induzida pela dieta hiperlipídica, com menores níveis de insulina em jejum. Em adição, reduziu os níveis de leptina, TNF α e IL-6 após 10 dias de tratamento (MOURÃO, 2006).

O aumento na sensibilidade à insulina induzida pelo GQ-2 ocorre devido à capacidade da nova TZD em reverter as anormalidades na transmissão do sinal insulínico - principalmente as etapas iniciais da via de sinalização deste hormônio - ocasionada pela dieta hiperlipídica em tecido adiposo, muscular e hepático. Isso ocorre devido ao fato do GQ-2 promover uma redução no grau de fosforilação de IRS-1^{ser307}, em paralelo com a redução da atividade de serinas quinases como JNK e IKK e dos níveis teciduais de TNF- α e óxido nítrico sintase induzível (iNOS) os quais participam no desenvolvimento da resistência à insulina (MOURÃO, 2006).

Além disso, camundongos obesos tratados com GQ-2 apresentaram aumento na expressão de PPAR γ no tecido adiposo após estímulo com insulina podendo, a ativação desse receptor por GQ-2, estar envolvida no controle da adipogênese (MOURÃO, 2006).

Vários estudos têm demonstrado que as TZDs além de melhorar a sensibilidade à insulina, também apresentam efeitos protetores contra a aterosclerose (CONSOLI e FORMOSO, 2013).

Deste modo, Silva e colaboradores (2012) realizaram um estudo com o objetivo de avaliar o efeito de novos derivados tiazolidínicos sobre as lesões ateroscleróticas. Para este fim, camundongos *swiss* obesos foram submetidos ao tratamento com GQ-16 e GQ-2 (30 mg/Kg/dia) utilizando a pioglitazona (20 mg/Kg/dia) como substância padrão, administrados uma vez ao dia por via oral, pelo período de 14 dias.

Através dos resultados deste estudo observou-se que não houve alterações no perfil lipídico plasmático após o tratamento com os fármacos estudados. Porém, as novas TZDs demonstraram maior eficácia na redução da resistência à insulina em comparação com a pioglitazona. Um fato relevante foi que, dos fármacos testados (pioglitazona, GQ-2 e GQ-16), somente o GQ-2 promoveu redução na área das lesões ateroscleróticas. Em adição, tanto a pioglitazona quanto o GQ-16 provocaram extensiva degeneração do endotélio e aumento de células apoptóticas no espaço subendotelial, enquanto que o GQ-2 provocou mínimas alterações celulares no endotélio da aorta (SILVA et al., 2012).

Em relação a óxido nítrico sintase endotelial (eNOS) – enzima responsável pela produção de óxido nítrico no vaso endotelial promovendo vasodilatação - e a metaloproteinase de matriz 9 (MMP-9) – enzima envolvida no processo inflamatório e doenças cardiovasculares - os três fármacos em questão apresentaram comportamentos diferentes sobre a expressão desses marcadores. A pioglitazona e o GQ-16 não exerceram efeito sobre a expressão de eNOS, entretanto aumentaram a expressão de MMP-9. Já o GQ-2 reduziu de maneira eficaz a expressão de MMP-9 e aumentou de eNOS (SILVA et al., 2012).

Assim, diante dos resultados obtidos, sugere-se que o GQ-2 além de ser um eficaz sensibilizador de insulina e, portanto apresentar grande potencial para se tornar a mais nova TZD para o tratamento do DM2, é também um candidato promissor para o tratamento da aterosclerose. Para atingir esse

propósito é imprescindível realizar a avaliação do perfil farmacocinético do fármaco bem como, a avaliação preliminar de toxicidade para a continuidade dos estudos.

2.7 Farmacocinética

O efeito biológico de um fármaco em um sítio de ação específico envolve uma cadeia complexa de eventos no organismo que engloba desde a administração do fármaco por determinada via até a sua chegada à proteína alvo *in vivo* com a consequente produção de efeitos terapêuticos. Assim, antes de atingir seu local de ação o fármaco passa por várias etapas de interação com o organismo as quais irão determinar o movimento do fármaco através do mesmo. Essas etapas compreendem quatro fenômenos, tais como: a absorção para a circulação sistêmica, quando a administração é por via extravascular; a distribuição, que envolve a ligação do fármaco as proteínas plasmáticas, bem como a distribuição para os tecidos e a excreção (biotransformação e eliminação) pelos órgãos eliminadores - fígado e rins (HUISINGA et al., 2006).

A farmacocinética estuda as alterações das concentrações do fármaco e seus metabólitos ativos no organismo em relação ao tempo, porém para a compreensão do processo farmacocinético é necessário o conhecimento de princípios fundamentais em fisiologia, cinética química e bioquímica (TOZER, 1981).

A administração do fármaco e o processo de absorção, quando ocorre, favorece a elevação da concentração plasmática do fármaco, fase esta denominada de INPUT. Já a distribuição aos tecidos juntamente com o processo de eliminação, fase denominada de disposição, desfavorecem a concentração plasmática do fármaco. Esses processos ocorrem de forma simultânea e determinam as oscilações das concentrações plasmáticas no decorrer do tempo após a administração (BANKER e RHODES, 2002).

Assim, é possível construir uma curva de concentração plasmática *versus* tempo e quantificar o movimento do fármaco no organismo através do uso de equações matemáticas obtendo-se vários parâmetros farmacocinéticos,

os quais possibilitam a construção ou adequação de regimes posológicos, determinação de vias e modo de administração adequada, além da determinação das vias metabólicas e de excreção.

A absorção corresponde à primeira fase farmacocinética e é definida como a passagem do fármaco de um meio externo ao organismo para a circulação sistêmica, direcionando-o para diferentes órgãos e tecidos (WINTER, 2012). Esse processo sofre influência de vários fatores biológicos e, principalmente, físico-químicos como a lipossolubilidade e a solubilidade que irão determinar a capacidade do fármaco em atravessar as membranas biológicas e atingir a circulação sanguínea (LIN e LU, 1997).

O processo de absorção é avaliado através de cinco parâmetros farmacocinéticos obtidos após a construção da curva concentração plasmática *versus* tempo: C_{max} (concentração plasmática máxima), t_{max} (tempo para a ocorrência de C_{max}), ASC (área sob a curva), k_a (constante de absorção) e biodisponibilidade (F), que representa a fração da dose administrada que efetivamente alcança a circulação sanguínea (WINTER, 2012).

Após a absorção ou a introdução do fármaco diretamente na corrente sanguínea, o mesmo fica disponível para se ligar as proteínas plasmáticas ou atravessar as membranas biológicas alcançando órgãos e tecidos. A fração de fármaco livre, ou seja, não ligada às proteínas plasmáticas é que entra em equilíbrio com o sítio receptor e exerce o efeito farmacológico (BJORNSSON, 1997; WINTER, 2012).

A quantidade de fármaco que se liga às proteínas plasmáticas é em decorrência de suas características físico-químicas, solubilidade em lipídeos e solubilidade aquosa, que conferem maior ou menor afinidade de ligação fármaco-proteína. Alguns fatores como a baixa lipossolubilidade, alta ligação às proteínas plasmáticas ou redução da ligação aos tecidos, favorecem o aumento da concentração plasmática e reduzem a quantidade de fármaco distribuído. Entretanto, a diminuição da ligação às proteínas plasmáticas, alta lipossolubilidade e aumento da ligação aos tecidos, desfavorecem a concentração plasmática e aumentam a quantidade de fármaco distribuído (WINTER, 2012).

O processo de distribuição de um fármaco é quantificado através do parâmetro volume de distribuição (V_d) e é definido como o volume extravascular que contém o fármaco na mesma concentração observada no plasma. Entretanto, por definição, o V_d deve ser considerado somente como um parâmetro de constante de proporcionalidade entre a concentração plasmática e a quantidade correspondente de fármaco no organismo (TOUTAIN e BOUSQUET-MÉLOU, 2004b).

Três diferentes V_d estão descritos na literatura científica: o V_{d_c} – volume de distribuição inicial ou central – determinado imediatamente após administração endovenosa; o $V_{d_{ss}}$ – volume de distribuição no estado de equilíbrio – determinado quando o volume de distribuição envolve a concentração plasmática no estado de equilíbrio e o $V_{d_{\text{área}}}$ quando a determinação do volume de distribuição é realizada na fase de pseudo-equilíbrio (TOUTAIN e BOUSQUET-MÉLOU, 2004b).

A diferença entre os tipos de V_d ocorre porque a concentração plasmática oscila devido ao movimento constante do fármaco no organismo e, assim a medida das concentrações plasmáticas em diferentes momentos favorece a determinação de diferentes tipos de volume de distribuição, conforme a fase da disposição do fármaco em que houve a quantificação da concentração plasmática (TOUTAIN e BOUSQUET-MÉLOU, 2004b).

A aplicabilidade clínica do V_d está relacionada com o cálculo da dose de ataque, das concentrações plasmáticas máximas e mínimas em regimes de doses múltiplas (BJORNSSON, 1997).

A fase de eliminação do fármaco abrange o processo de biotransformação e excreção e os parâmetros farmacocinéticos clearance (Cl), meia-vida de eliminação ($t_{1/2}$) e constante de eliminação (k_{el}) estão relacionados a esse processo (RUIZ-GARCIA et al., 2008).

O processo de biotransformação é responsável por converter o fármaco através de reações químicas, normalmente mediadas por enzimas, em compostos com estruturas moleculares diferentes, geralmente com característica de maior hidrossolubilidade, denominados de metabólitos. Estes

metabólitos, após sofrerem o processo de biotransformação, podem adquirir atividade farmacológica semelhante ou até mais potente que o fármaco original, ser inativos ou possuir perfil de toxicidade (WINTER, 2004).

As vias metabólicas mais comuns são as reações de oxidação, redução e hidrólise, denominadas de reação de Fase I, e as conjugações denominadas de reações de Fase II. No entanto, alguns fármacos sofrem somente reações de Fase II (TOZER e ROWLAND, 2009).

O fígado é considerado o principal órgão metabolizador, entretanto alguns fármacos são metabolizados por outras vias como a renal e pulmonar, além da biotransformação por enzimas plasmáticas e aquelas presentes na parede gastrointestinal (TOZER e ROWLAND, 2009).

O complexo enzimático citocromo P450 (CYP450) é o principal responsável pela oxidação e redução da maioria dos fármacos e está presente em maior quantidade e variabilidade no fígado, podendo ser encontrado em outros órgãos como rins, bexiga e pulmões. Esse complexo é constituído por várias isoformas que diferem entre si no grau de especificidade para um determinado substrato, além de apresentar diferentes inibidores, indutores e fármacos marcadores (TOZER e ROWLAND, 2009; WINTER, 2012).

O polimorfismo genético, com conseqüentes alterações na atividade das isoformas do CYP450, pode levar a alterações do perfil cinético de vários fármacos, provocando respostas diferentes após a administração. Deste modo, a determinação do fenótipo metabolizador, em muitos casos, pode auxiliar no ajuste de regimes posológicos (WINTER, 2012).

Outro tipo de metabolismo que ocorre com a maioria dos fármacos é o metabolismo de primeira passagem ou pré-sistêmico. Nesse caso, fármacos administrados pela via oral alcançam o sistema porta expondo toda a dose administrada ao fígado, antes de alcançar a circulação sistêmica. Se o fármaco apresenta alta afinidade pelo fígado, ocorre um extensivo processo de metabolização pré-sistêmica e somente uma pequena quantidade da dose administrada atinge a circulação, acarretando em baixa biodisponibilidade do fármaco (WINTER, 2012).

O processo de excreção consiste na passagem do fármaco da circulação sistêmica para o meio externo. Os rins são os principais órgãos eliminadores e os mecanismos envolvidos na excreção renal são a filtração glomerular, secreção tubular ativa e difusão passiva pelo epitélio tubular (FUCHS e HEWITT, 2011).

Alterações nos parâmetros farmacocinéticos relacionados ao processo de eliminação como o clearance (Cl), a constante de eliminação (k_{el}) e a meia-vida de eliminação ($t_{1/2}$) podem ocorrer na presença de insuficiência renal devido ao acúmulo de fármacos e metabólicos que não são excretados satisfatoriamente (TOZER e ROWLAND, 2009).

O clearance plasmático é definido como o volume de plasma que é totalmente depurado do fármaco por unidade de tempo e é expresso em volume por unidade de tempo (mL/min ou L/h). A capacidade intrínseca dos órgãos metabolizadores e eliminadores, principalmente fígado e rins, somada a outros processos que resultam na eliminação do fármaco do organismo é definida como clearance total (Equação 1) (TOUTAIN e BOUSQUET-MÉLOU, 2004).

Equação 1 $Cl_{Total} = Cl_{renal} + Cl_{hepático} + Cl_{outras\ vias\ de\ excreção}$

É considerado o parâmetro farmacocinético mais importante por estar relacionado com a determinação da taxa de dose que deve ser administrada para manter as concentrações plasmáticas desejadas no estado de equilíbrio em administração de doses múltiplas, calcular a dose/tempo necessária para atingir determinada concentração plasmática média e fazer ajustes de dose para pacientes com hepatopatias ou nefropatias (TOUTAIN e BOUSQUET-MÉLOU, 2004).

A constante de eliminação (k_{el}) expressa a porcentagem da quantidade total de fármaco presente no organismo que é removida por unidade de tempo, ou seja, a velocidade com que ocorre o processo de eliminação. Essa constante é uma função do Vd e do Cl (TOZER e ROWLAND, 2009. WINTER, 2012).

Em adição, apresenta relação com a meia vida de eliminação a qual é expressa por $0,693$, o logaritmo natural de 2 . Esta relação é baseada no fato de que as concentrações do fármaco no organismo relacionam-se exponencialmente com o tempo. Na análise farmacocinética, a constante de eliminação, corresponde à inclinação da reta descendente da concentração plasmática, ou coeficiente angular da reta terminal, que pode ser calculada através da variação do logaritmo das concentrações no período de tempo transcorrido para que esta variação ocorra (BOROUJERDI, 2002).

O parâmetro meia-vida de eliminação ($t_{1/2}$) expressa o tempo necessário para que a concentração plasmática diminua pela metade logo após que o processo de pseudo-equilíbrio da distribuição tenha sido alcançado (TOUTAIN e BOUSQUET-MÉLOU, 2004c). Em modelos bicompartimentais é considerada como sendo $t_{1/2 \beta}$, para diferenciar da meia-vida de distribuição ($t_{1/2 \alpha}$) (WINTER, 2012).

Na clínica, é um parâmetro importante, pois é utilizado para selecionar o intervalo de dose de um regime posológico, prever o grau de flutuação da concentração plasmática durante o intervalo de dose, prever o tempo necessário para atingir o estado de equilíbrio e para prever o tempo necessário para que determinada concentração plasmática decline a outra concentração específica desde que não seja administrada uma nova dose (TOUTAIN e BOUSQUET-MÉLOU, 2004c).

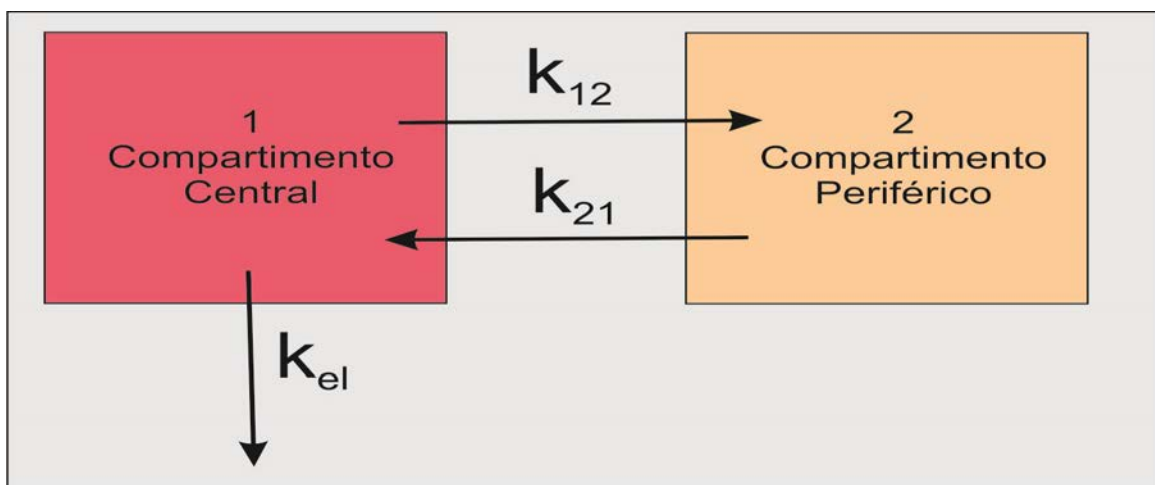
O cálculo dos parâmetros farmacocinéticos que explicam a evolução temporal das concentrações de um fármaco no organismo após sua administração por determinada via são descritos através de modelos farmacocinéticos tais como os modelos não compartimentais, modelos compartimentais e modelos fisiológicos (KWON, 2002).

Dentre estes, os modelos compartimentais são os mais utilizados e retratam o movimento do fármaco considerando que o organismo é constituído por um ou mais compartimentos que recebem o fármaco em diferentes velocidades e que o sítio de ação está localizado em um desses compartimentos. Assim, dependendo da disposição do fármaco no organismo

pode-se adotar um modelo monocompartimental, bicompartimental ou tricompartmental (TANG et al., 2011).

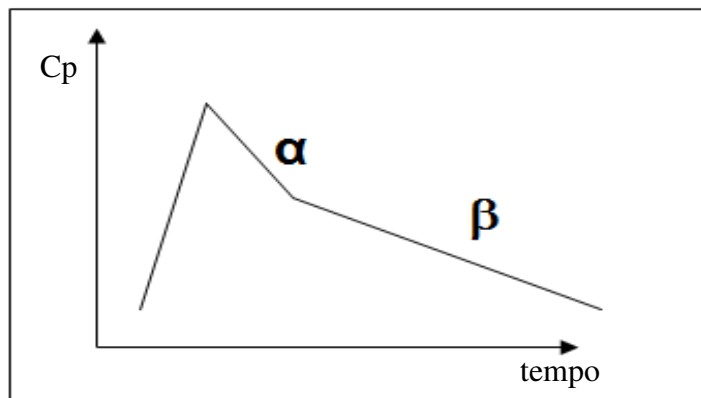
No modelo bicompartimental (Figura 5) ocorrem duas velocidades de decaimento das concentrações plasmáticas ao longo do tempo, pois nesse modelo assume-se que o organismo é composto por dois compartimentos que intercambiam o fármaco entre si, portanto a velocidade de distribuição para alguns órgãos e tecidos é maior do que para outros. Neste modelo, considera-se que o fármaco se equilibra rapidamente no sangue e órgãos com maior perfusão sanguínea – compartimento central – e em menor velocidade nos órgãos e tecidos menos perfundidos, os quais constituem o compartimento periférico. Conseqüentemente, o perfil da concentração plasmática *versus* tempo exhibe um declínio bifásico (TOZER e ROWLAND, 2009).

Figura 5. Representação esquemática de um modelo com dois compartimentos



O declínio inicial da curva é denominado de fase de distribuição ou fase α . O rápido decaimento das concentrações plasmáticas, nessa fase, refere-se ao processo de distribuição somado ao processo de eliminação que ocorre de modo simultâneo. Já a segunda velocidade de decaimento, denominada de fase de eliminação, fase terminal ou fase β , é caracterizada pela redução mais lenta das concentrações plasmáticas e é considerada uma reta pura, pois está relacionada apenas com o processo de eliminação do fármaco (Figura 6) (KWON, 2002).

Figura 6. Perfil farmacocinético com duas velocidades de decaimento. Modelo bicompartimental.



Além do cálculo das constantes de distribuição ($k\alpha$ ou α) e de eliminação ($k\beta$ ou β), também é possível calcular as microconstantes K_{12} , K_{21} e K_{10} (Figura 5), as quais estão relacionadas com a passagem do fármaco do compartimento central para o periférico, com a passagem do fármaco do compartimento periférico para o central e a eliminação do fármaco a partir do compartimento central, respectivamente (TANG et al., 2011).

Nesse modelo, a mudança de velocidade de decaimento ocorre no t_{ss} (tempo que ocorre o estado de equilíbrio), o qual é alcançado quando há a saturação do compartimento periférico e o estado de equilíbrio entre os dois compartimentos é atingido. O cálculo de t_{ss} é utilizado para prever o tempo de ocorrência do efeito máximo de um fármaco quando o sítio de ação está localizado no compartimento periférico (BOROUJERDI, 2002).

A farmacocinética é uma ferramenta útil que, através de modelos matemáticos, prevê a disposição do fármaco no organismo por meio da obtenção dos parâmetros farmacocinéticos – absorção, distribuição, biotransformação e excreção. Deste modo, é possível a construção de regimes posológicos adequados, determinação e/ou modificação de vias de administração, a aplicação em estudos de bioequivalência para determinar a intercambialidade de apresentações farmacêuticas, dentre outras aplicações (WINTER, 2004).

Entretanto, a maior parte das falhas no desenvolvimento de novos fármacos está relacionada com propriedades farmacocinéticas inapropriadas. A

baixa absorção, distribuição inadequada e extensiva metabolização pré-sistêmica propiciam baixa concentração do fármaco no tecido alvo, resultando em baixa resposta farmacológica. Sendo assim, torna-se necessário que o estudo de farmacocinética de novos fármacos seja realizado nas etapas iniciais de desenvolvimento de novos fármacos (WATERBEEMD e TESTA, 2007).

2.8 Ensaios pré-clínicos no desenvolvimento de novos fármacos.

A pesquisa de novos fármacos é um processo multidisciplinar que tem como objetivo principal o desenvolvimento de novos fármacos e é dividida em duas etapas: a descoberta e o desenvolvimento. A descoberta consiste na identificação e caracterização de enzimas ou receptores alvos para determinada doença, a síntese de novas moléculas, caracterização biofarmacêutica e físico-química e estudos de atividade biológica *in vitro* e *in vivo*. Já a etapa de desenvolvimento avalia a segurança/toxicidade e eficácia de novos candidatos a fármacos, garantindo um regime posológico com perfil de segurança adequado para futura comercialização (LIN e LU, 1997; PANCHAGNULA e THOMAS, 2000).

Nos últimos anos, uma gama de novos fármacos tem sido sintetizada através de ferramentas de alta tecnologia como, por exemplo, a química combinatória, com o intuito de que novos fármacos com potencialidade terapêutica alcancem o mercado. Para isso, o estudo do perfil farmacocinético *in vitro* e *in vivo*, bem como o de toxicidade, torna-se imprescindível nos estágios iniciais do desenvolvimento de novos compostos, uma vez que, perfil farmacocinético desfavorável e/ou características de toxicidade indesejáveis são responsáveis por interromper os estudos com o candidato a fármaco (WATERBEEMD e GIFFORD, 2003; WATERBEEMD e TESTA, 2007).

A farmacocinética pré-clínica é uma importante ferramenta no desenvolvimento de novos fármacos tanto em ensaios *in vitro* com em ensaios *in vivo*, pois dita a disposição do fármaco no organismo e a disponibilidade do mesmo na biofase, dentre outros parâmetros. Deste modo, a investigação pré-clínica é de fundamental importância para identificar possíveis novos fármacos

adequados para a realização de ensaios clínicos (PANCHAGNULA e THOMAS, 2000).

Os estudos *in vitro* são realizados de forma a avaliar se o fármaco apresenta propriedades adequadas que possibilitem que o mesmo seja exposto de maneira suficiente ao tecido alvo a fim de exercer sua atividade biológica, ou seja, são realizados de modo a comprovar a atividade biológica do fármaco (AMORÉ et al., 2010). Assim, os modelos *in vitro* são utilizados para prever os fenômenos farmacocinéticos em humanos e os principais são: ensaio de permeação em membrana artificial paralela e linhagens celulares caco-2 e Madin-Darby canine kidney (MDCK) que são utilizados como modelos de absorção oral, sistemas microssomais hepáticos, fatias de fígado e enzimas expressas por DNA complementar ou hepatócitos como modelos de metabolismo, dentre outros (WATERBEEMD e GIFFORD, 2003).

Entretanto, devido às dificuldades na correlação *in vitro/in vivo*, a predição do perfil farmacocinético em humanos é incerta. Embora exista uma variedade de testes *in vitro* que auxiliem no processo de seleção de novos fármacos e forneçam informações relevantes, a probabilidade de apresentarem o mesmo perfil farmacocinético em humanos é baixa, pois não refletem a realidade *in vivo* por não serem realizados em condições fisiológicas (LIN e LU, 1997; SINGH, 2006).

Assim, após os estudos dos processos de absorção e metabolismo *in vitro*, os ensaios de farmacocinética em roedores são realizados e o modelo animal utilizado dever ser, de preferência, aquele que foi observado o efeito farmacológico. Comprovada a eficácia *in vivo* outros ensaios como a investigação mais detalhada do metabolismo são necessários para avaliar o potencial terapêutico do candidato a fármaco (JANG et al., 2001).

Estudo do perfil farmacocinético em animais não roedores também deve ser realizado e a escolha da espécie animal adequada para a realização dos estudos deve ser criteriosa, uma vez que as diferenças entre espécies pode levar a interrupção do estudo de uma molécula potencialmente eficaz e segura ou a continuidade de uma molécula que não é segura (DIXIT e BOELSTERLI, 2007).

Os ensaios *in vitro*, a farmacocinética pré-clínica, bem como a escolha do modelo animal apropriado para a sua realização, são ferramentas importantes que oferecem suporte na decisão da continuidade dos estudos com o candidato a fármaco, comprovando sua eficácia e segurança o que possibilita que o mesmo alcance a fase clínica e seja futuramente comercializado.

3. OBJETIVOS

❖ **Objetivo Geral**

- Avaliação do perfil farmacocinético e de toxicidade preliminar do composto 5-(4-cloro-benzilideno)-3-(4-metil-benzil)-tiazolidina-2,4-diona (GQ-2)

❖ **Objetivos específicos**

- Desenvolvimento de método analítico para a quantificação do GQ-2 em solução aquosa tamponada;
- Determinação da estabilidade química do GQ-2 em pH 1,2 e 7,4.
- Determinação da estabilidade *ex vivo* do GQ-2 em plasma de rato e humano;
- Desenvolvimento e validação de método bioanalítico para a determinação do GQ-2 em plasma utilizando um sistema UPLC Acquity®;
- Avaliação do perfil farmacocinético do GQ-2 administrado em dose única pela via oral e intraperitoneal (12 mg/Kg) e pela via intravenosa (3 mg/Kg) em ratos wistar (n=20);
- Avaliação da toxicidade hepática e renal expressa pelos parâmetros bioquímicos ALT, AST, ureia e creatinina;
- Determinação dos níveis de glicose e colesterol antes e após a administração de dose única pela via oral e intraperitoneal (12 mg/Kg) e pela via intravenosa (3 mg/Kg).

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Materiais

4.1.1 Matérias primas, reagentes e solventes

- 5-(4-cloro-benzilideno)-3-(4-metil-benzil)-tiazolidina-2,4-diona (GQ-2) - sintetizado e concedido pelo grupo de pesquisa da Universidade Federal de Pernambuco;
- Acetonitrila (J. T. Backer), USA;
- Ácido clorídrico (Vetec), Brasil;
- Água ultrapurificada obtida em sistema Milli Q com condutividade de $18,2\mu\text{S. cm}^{-1}$;
- Cloreto de potássio (Synth), Brasil;
- Dimetilsufóxido (Synth), Brasil;
- Etanol (J. T. Backer), USA;
- Fosfato de potássio (Synth), Brasil;
- Heparina sódica (Blausiegel), Brasil;
- Kit Labtest® Uréia, ref. (27); TGP, ref. (53); TGO, ref. (52); Creatinina, ref. (35); Colesterol, ref. (76); Glicose, ref. (133), Brasil.
- Propilenoglicol (Synth), Brasil;
- ketamina (Agener União), Brasil;
- Soro fisiológico (Equiplex), Brasil;
- Tween 20 (Synth), Brasil;
- Tween 80 (Synth), Brasil;
- xilazina (Agener União), Brasil;

4.1.2 Equipamentos

- Agitador magnético com aquecimento (Ethiktechnology);
- Balança analítica AY 220 (Shimadzu);
- Banho Maria 1147 (Fanem);

- Banho ultrassônico Ultrasonic Cleaner 284ODA (Odontobrás);
- Leitor de placas Power Wave HT (Biotek);
- Mini-centrífuga, Gilson;
- Ultracentrífuga Sorvall Biofugue Stratos (Thermo scientific);
- UPLC Acquity® (Waters);
- Vórtex AP56 (Phoenix Lufenco).

4.1.3 Correlatos

- Coluna BEH C18 (2,1 x 50mm, 1,7 μ m) (Waters®);
- Pré-coluna BEH C18 (2,1 x 5mm, 1,7 μ m) (Waters®);
- Filtro de seringa PVDF, poro de 0,22 μ m (Flowsupply);

4.1.4 Softwares

- Empower 3 (Waters®);
- Gen 5 versão 2.00 (Biotek®);
- Graphpad Prism® versão 5.0
- Origin® versão 7

4.2 Estudos de pré-formulação

4.2.1 Solubilização do fármaco

O GQ-2 apresenta baixa solubilidade aquosa, portanto foram avaliados diferentes veículos para solubilização do mesmo, de modo a obter pré-formulações cujas concentrações sejam adequadas para a administração da dose proposta pelas vias oral, intraperitoneal e intravenosa, respeitando o volume máximo aceitável. De acordo com Diehl et al (2001) e Neervannan (2006) o volume de dose ideal para a via oral, intraperitoneal e intravenosa é de 2,5, 2,5 e 1,25 mL, respectivamente.

Diferentes veículos foram testados tais como: água, soro fisiológico, etanol, propilenoglicol, DMSO (dimetilsulfóxido) e misturas propilenoglicol/água,

propilenoglicol/DMSO e tween 80/soro fisiológico (NEERVANNAN, 2006), com o auxílio de aquecimento e banho ultrassônico. A classificação de solubilidade foi adotada de acordo com a FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 2010 (Tabela 1).

Tabela 1. Classificação de solubilidade segundo a Farmacopeia Brasileira, 2010.

Classificação	Termo descritivo
Muito solúvel	Menos de 1 parte
Facilmente solúvel	De 1 a 10 partes
Solúvel	De 10 a 30 partes
Ligeiramente solúvel	De 30 a 100 partes
Pouco solúvel	De 100 a 1000 partes
Muito pouco solúvel	De 1000 a 10 000 partes
Praticamente insolúvel ou insolúvel	Mais de 10 000 partes

*Partes referem-se à dissolução de 1g da substância no número de mL do solvente estabelecido como o número de partes.

4.3 Desenvolvimento de método analítico para a determinação do GQ-2

4.3.1 Determinação da absorvidade do composto por análise espectrofotométrica

A determinação da absorvidade foi determinada de modo a auxiliar no desenvolvimento do método analítico e bioanalítico do GQ-2. Para a realização da análise espectrofotométrica foi preparada uma solução de GQ-2 na concentração de 100 µg/mL em acetonitrila. A determinação da absorvidade foi realizada com leitor de placa Power Wave HT – Biotek.

4.3.2 Condições cromatográficas

Um sistema UPLC Acquity® equipado com um detector UV-Visível foi utilizado para a detecção do GQ-2 e do diazepam (padrão interno). Para a separação dos compostos utilizou-se uma coluna BEH C18 (2,1 x 50 mm, 1,7 µm) com pré-coluna C18 (2,1 x 5 mm, 1,7 µm) mantidas a temperatura de 30°C e a fase móvel foi constituída de acetonitrila: água na proporção de 80 e 20% respectivamente, em modo isocrático e fluxo de 0,4 mL/min. O volume de amostra injetado foi de 10 µL e o tempo de corrida de 2,5 minutos.

4.4 Determinação da estabilidade química do GQ-2 em tampão (pH 1,2 e 7,4)

4.4.1 Curva analítica

Uma curva analítica (7,8 a 250 ng/mL) foi construída para a quantificação do GQ-2 em solução aquosa tamponada (pH 1,2 e 7,4).

4.4.2 Tampão de Clark-Lubs (pH 1,2)

Para a realização do teste de estabilidade em pH 1,2 foi preparada uma solução tampão de Clark-Lubs.

- *Tampão de Clark-Lubs*: preparou-se uma solução de cloreto de potássio na concentração de 0,2 M e uma solução de ácido clorídrico na concentração de 0,2 M. Em seguida foi adicionada quantidade suficiente da solução de ácido clorídrico à solução de cloreto de potássio até alcançar o pH desejado de 1,2.

4.4.3 Tampão fosfato de potássio (pH 7,4)

Para a realização do teste de estabilidade em pH 7,4 foi preparada uma solução tampão fosfato de potássio.

- *Tampão fosfato de potássio*: preparou-se uma solução de fosfato de potássio na concentração de 0,1 M e uma solução de ácido clorídrico na concentração de 0,1 M. Em seguida foi adicionada quantidade suficiente da solução de ácido clorídrico à solução de fosfato de potássio até alcançar o pH desejado de 7,4.

4.4.4 Procedimento de análise das amostras

O ensaio foi realizado em triplicata. Em 14,7 mL de tampão foi adicionado 300 µL da solução estoque de GQ-2 (100 µg/mL em acetonitrila) para produzir uma concentração nominal de 200 ng/mL. A mistura foi mantida sob agitação e temperatura (37°C) constantes com o auxílio de um agitador magnético e manta aquecedora. As amostras – alíquotas de 100 µL - foram coletadas nos tempos: 0; 0,08; 0,25; 0,5; 1; 2; 4 e 6 horas para o ensaio em pH 1,2. Já para o ensaio em pH 7,4 as amostras foram coletadas nos tempos: 0; 0,08; 0,25; 0,5; 1; 2; 4; 6; 12, 18 e 24 horas. Em seguida foram diluídas em fase móvel [acetonitrila:água (80:20)] na proporção 1:10 e analisadas pelo método analítico descrito no item 4.3.2 a fim de determinar se o fármaco é estável em condições que simulam as condições estomacal e intestinal.

4.5 Determinação da estabilidade *ex vivo* do GQ-2 em plasma de rato e humano

4.5.1 Curva bioanalítica

Uma curva bioanalítica preliminar (125 a 1500 ng/mL) foi construída para a quantificação do GQ-2 em plasma.

4.5.2 Procedimento de análise das amostras

O ensaio foi realizado em triplicata. Em 9,93 mL de plasma isento de analito, foi adicionado 70 µL da solução de trabalho de GQ-2 (10 µg/mL em acetonitrila) para produzir uma concentração nominal de 700 ng/mL. A mistura foi mantida sob agitação e temperatura (37°C) constantes com o auxílio de um agitador magnético e manta aquecedora. As amostras – alíquotas de 200 µL - foram coletadas nos tempos: 0, 0,08, 0,25, 0,5, 1, 2, 4, 6, 8, 12, 18 e 24 horas, processadas de acordo com o item 4.6.2 e analisadas pelo método bioanalítico

descrito no item 4.3.2, a fim de determinar se o fármaco é susceptível à ação das enzimas plasmáticas.

4.6 Determinação do log P

Inicialmente foi determinado o log P previsto do GQ-2 pelo *software* Chemdraw® Ultra v. 8.0 e pelo *software on-line* ALOGPS 2.1. A partir desses resultados foi realizada a determinação experimental por método cromatográfico.

O sistema cromatográfico consistiu de um UPLC Acquity® com detector UV-Visível. A separação foi feita por uma coluna C18 BEH 2,1 x 50mm, 1,7µm e com pré-coluna C18 BEH 2,1 x 5mm, 1,7µm, mantida a uma temperatura de 30°C. A fase móvel foi Metanol:Ácido fórmico 0,1% (70:30) pH 4 e fluxo de 0,4 mL/min. O volume de injeção foi de 2µL.

O ensaio foi realizado com base no Guideline 117 (1989) da OECD. Foram selecionadas substâncias cuja curva de log k (log do fator de capacidade) *versus* o log P compreendesse o log P previsto para o GQ-2 (Tabela 2).

Tabela 2. Substâncias utilizadas na curva para a determinação do log P do GQ-2.

Substância	Log P
Acetanilida	1
Acetofenona	1,7
Benzeno	2,1
Clorobenzeno	2,8
Timol	3,3
Fenantreno	4,5
Trifenilamina	5,7
DDT	6,5

O logaritmo do fator de capacidade k de cada substância da Tabela 1 foi calculado e plotado em função de seu $\log P$ para construção da equação de regressão linear que foi utilizada para o cálculo do $\log P$ do candidato a fármaco, GQ-2.

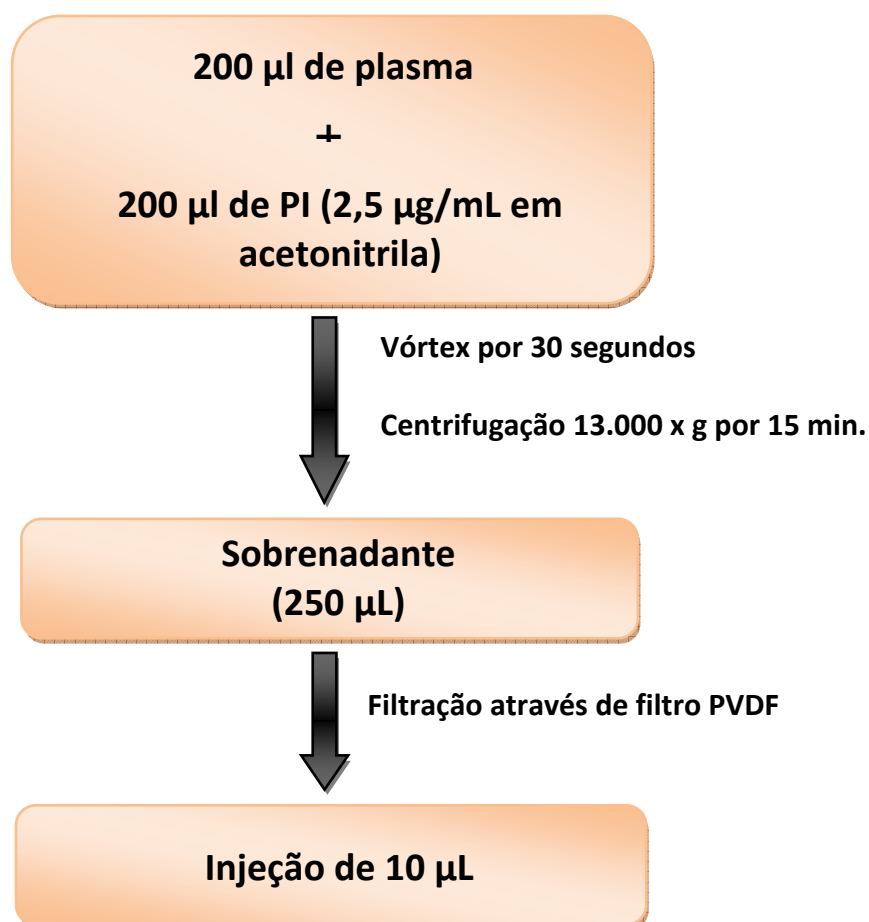
4.7 Desenvolvimento de método bioanalítico para determinação do GQ-2 em plasma

4.7.1 Condições cromatográficas

As condições cromatográficas utilizadas para o desenvolvimento e validação do método bioanalítico estão descritas no item 4.3.2.

4.7.2 Processamento da amostra biológica

Em um microtubo plástico de 1,5 mL contendo 200 μL de plasma adicionado de GQ-2, foram adicionados 200 μl de PI (diazepam 2,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ em acetonitrila). A mistura foi agitada em vórtex por 30 segundos e, em seguida, centrifugada a 13.000 x g por 15 minutos. Retirou-se 250 μL do sobrenadante, o qual foi filtrado em filtro PVDF com tamanho de poro de 0,22 μm e 10 μL foram introduzidos no sistema cromatográfico (Fluxograma 1).

Fluxograma 1: Processamento da amostra biológica para quantificação do GQ-2.

4.7.3 Validação do método bioanalítico

A validação garante, através de estudos experimentais, que os procedimentos adotados no método bioanalítico desenvolvido atenda aos requisitos pré-estabelecidos, assegurando os seus limites de confiança e possibilitando que o mesmo seja aplicado nos estudos de farmacocinética. O método foi validado de acordo com o Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) resolução RE n° 899, de 29 de maio de 2003 e resolução RDC n° 27, de 17 de maio de 2012. Os parâmetros determinados foram: seletividade, linearidade, precisão e exatidão, limite inferior de quantificação (LIQ), limite de detecção (LD), recuperação, estabilidade e efeito residual.

4.7.3.1 Linearidade

A curva analítica para o GQ-2 (1,953 a 250 ng/mL) foi construída plotando-se a razão da área dos picos do analito e do PI contra a concentração nominal do analito. Os critérios de aceitação da linearidade são: coeficiente de correlação acima de 0,98 e exatidão de 85 a 115%, exceto para o LIQ, em que a exatidão pode ser de 80 a 120%.

4.7.3.2 Limite Inferior de Quantificação (LIQ)

O LIQ foi determinado como sendo a menor concentração do analito quantificada com exatidão de 80 a 120% e precisão de 0 a 20%.

4.7.3.3 Limite de Detecção (LD)

O LD foi determinado como sendo a menor concentração do analito detectada, cuja área do pico apresente um valor 3 vezes superior ao ruído da linha de base.

4.7.3.4 Precisão e Exatidão

A precisão e a exatidão foram avaliadas intra-corridas – determinada através de 5 análises dos controles de qualidade alto (CQA), médio (CQM), baixo (CQB), controle de qualidade diluído (CQD) e LIQ (CQ-LIQ) em um mesmo dia, e inter-corridas – determinada em três dias consecutivos. Os critérios de aceitação foram precisão de 0 a 15% e exatidão de 85 a 115%, exceto para o LIQ, cujos valores aceitáveis são precisão de 0 a 20% e exatidão de 80 a 120%.

4.7.3.5 Seletividade

A seletividade do método foi avaliada em relação às substâncias endógenas presentes na matriz biológica utilizada (plasma de rato).

4.7.3.6 Recuperação

A recuperação expressa a eficiência do procedimento de extração da amostra a partir da matriz biológica. O teste foi realizado comparando-se os resultados de amostras extraídas com os resultados das soluções não extraídas que representam 100% de recuperação, em 3 concentrações: 200 ng/mL (CQA), 62,5 ng/mL (CQM) e 3,9 ng/mL (CQB). As soluções não extraídas foram preparadas pela adição de concentrações conhecidas do composto (CQA, CQM e CQB) ao extrato final do processamento das amostras de plasma isentas de fármaco (plasma branco). É desejável uma recuperação do analito próximo a 100%.

4.7.3.7 Estabilidade

A estabilidade visa determinar a capacidade do analito em se manter quimicamente inalterado durante determinado intervalo de tempo, sob condições específicas. Essa avaliação é necessária devido à necessidade de armazenamento das amostras após coleta ou processamento.

Foram realizados os ensaios de estabilidade de curta duração, no qual os CQs foram mantidos à temperatura ambiente (37°C) pelo período de 4 horas; estabilidade pós-processamento, em que a estabilidade do fármaco foi avaliada no extrato final obtido após o processamento das amostras, mantidas à temperatura de 10°C (temperatura do auto injetor) pelo período de 24 horas; estabilidade após ciclo de congelamento e descongelamento, no qual os CQs foram congelados a -20°C pelo período de 24 horas seguido pelo descongelamento à temperatura ambiente. Este ciclo foi realizado por três vezes.

Os ensaios em matriz biológica foram realizados utilizando-se o CQA (200 ng/mL) e CQB (3,9 ng/mL), em quintuplicata. Os compostos são considerados estáveis quando não se observa desvio maior que 15% do valor obtido das amostras recém-preparadas. Todas as amostras de controle de qualidade (CQs) foram processadas e analisadas conforme descrito anteriormente nos itens 4.6.2 e 4.3.2, respectivamente.

4.7.3.8 Efeito residual (carryover)

O efeito residual expressa a ocorrência do aparecimento ou o aumento do sinal gerado pelo analito ou PI, devido à contaminação resultante de amostras anteriormente analisadas. O teste foi realizado através de 3 análises da mesma amostra branco, sendo uma análise realizada antes e outras duas logo após a análise de uma amostra processada – CQA (200 ng/mL). Os resultados foram comparados com aqueles obtidos de amostras processadas do LIQ e os picos interferentes no tempo de retenção do analito e do PI devem ser inferiores a 20% e a 5% da resposta do LIQ, respectivamente.

4.7.4 Análise dos resultados da validação

Os cálculos de regressão linear, desvio padrão relativo (DPR) e acurácia foram realizados utilizando-se o programa Origin[®] versão 7.

4.8 Perfil farmacocinético

4.8.1 Protocolo experimental

O protocolo descrito foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Ciências Farmacêuticas UNESP/Araraquara, sob o parecer de número 31/2011 (anexo 1).

4.8.2 Animais

Foram utilizados ratos wistar, com peso aproximado de 250-300g, provenientes do biotério central da Universidade Estadual Paulista Unesp/Botucatu. Os animais foram transferidos para o biotério do Departamento de Princípios Ativos Naturais e Toxicologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas Unesp/Araraquara, os quais 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 25 animais, distribuídos nos seguintes grupos:

- Grupo farmacocinética I (n=5): dose única de GQ-2 (12mg/Kg) por via oral.
- Grupo farmacocinética II (n=10): dose única de GQ-2 (12mg/Kg) por via intraperitoneal.
- Grupo farmacocinética III (n=10): dose única de GQ-2 (3mg/Kg) por gavagem via intravenosa.

A dose selecionada para este estudo foi calculada por extrapolação alométrica a partir dos estudos de atividade realizados por MOURÃO e colaboradores (2006) em camundongo *swiss* (20 mg/Kg).

4.8.3 Procedimento cirúrgico para implantação de cânulas

A canulação da artéria femoral do animal foi realizada para a coleta das amostras de sangue, enquanto a canulação da veia foi realizada para a administração do fármaco.

Antes do início do procedimento cirúrgico o animal foi anestesiado com xilazina (5,5 mg/Kg) e quetamina (73 mg/Kg) por via intraperitoneal. Em seguida foi realizada a tricotomia da face ventral superior da pata traseira e da região dorsal próxima à nuca, onde a cânula é externada. Uma pequena

incisão foi realizada na face ventral superior da pata traseira e pelo tato encontrou-se a artéria femoral através de sua pulsação. O feixe vásculo-nervoso foi exposto e, em seguida, o vaso a ser canulado foi isolado e por meio de pequena secção foi introduzido o tubo de polietileno P-10 fundido a um tubo polietileno P-50 preenchido com heparina 2% para impedir a coagulação. Com auxílio de um trocater a cânula na região cervical do animal foi externada e entrelaçada com a sutura do local. O animal manteve-se em recuperação por um período de 24 horas e foi utilizado no máximo 72 horas depois do período de recuperação (CAMPOS, 2012).

4.8.4 Grupo Farmacocinética I, II e III

Os animais após jejum de 12 horas receberam GQ-2 pela via oral, em dose única (12mg/Kg) (grupo farmacocinética I), pela via intraperitoneal, em dose única (12 mg/Kg) (grupo farmacocinética II) e pela via intravenosa em dose única (3 mg/Kg) (grupo farmacocinética III) com livre acesso somente à água. Após a administração do fármaco, foram realizadas coletas seriadas de sangue por cânula previamente implantada na artéria femoral. Alíquotas de 500 µL cada foram coletadas em eppendorfs heparinizados nos tempos 0,08; 0,25; 0,5; 0,75; 1; 1,5; 3; 6; 12 e 24 horas após a administração. Foi respeitado o volume máximo de remoção de sangue permitido para cada animal sem que haja alterações fisiológicas significativas o qual, de acordo com DIEHL et al (2001), é de 3,5 mL. Para a construção da curva de concentração plasmática *versus* tempo de cada grupo, foi utilizado um total de 10 animais.

As amostras de sangue foram centrifugadas a 13.000 x g e os plasmas mantidos a -20° C até a realização das análises laboratoriais

4.8.5 Análise farmacocinética

A disposição cinética do composto GQ-2 foi avaliada após a administração em dose única de 12 mg/Kg pela via oral e intraperitoneal e em dose única de 3mg/Kg pela via intravenosa. Os parâmetros farmacocinéticos

foram calculados através das curvas concentração plasmática *versus* tempo (BJORNSSON, 1997). As meias vidas e as constantes de velocidade foram determinadas através do modelo bicompartimental, escolhido após inspeção visual e avaliação do coeficiente de correlação (BOROUJERDI, 2002).

A ASC_{0-t} foi calculada através do método dos trapezoides, em que a média das concentrações plasmáticas de cada intervalo é multiplicada por este intervalo de tempo, com posterior soma de todos (Equação 2).

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

Na equação, Cp é a concentração plasmática e t é o tempo.

Já para o cálculo da $ASC_{0-\infty}$ utilizou-se a equação 3.

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

Sendo que Cp_n é a última concentração da curva de concentração plasmática *versus* tempo e k_{el} ou β é a inclinação da reta de regressão linear do logaritmo das concentrações plasmáticas pelo tempo, na fase de eliminação. A reta de regressão também apresenta o parâmetro B, o qual é a intersecção da reta de regressão linear do logaritmo das concentrações plasmáticas *versus* tempo, na fase de eliminação.

No modelo bicompartimental além de determinar a constante de eliminação, também determina a constante de distribuição (K_α ou α) que rege o primeiro decaimento da curva de concentração plasmática *versus* tempo. Porém, a primeira inclinação observada nos dados absolutos é a soma da eliminação e da distribuição, sendo necessário isolar a reta de distribuição através dos métodos dos resíduos (Figura 7). Para este fim, a equação 4 foi utilizada para calcular os valores teóricos das concentrações plasmáticas através da equação exponencial da fase de eliminação.

Equação 4

$$Cp_{teórica} = B \times e^{-\beta t}$$

Em que B e β representam a intersecção e a inclinação da reta de regressão linear do logaritmo das concentrações plasmáticas *versus* tempo, respectivamente, na fase de eliminação e t é o tempo, o qual deve ser o mesmo das concentrações experimentais.

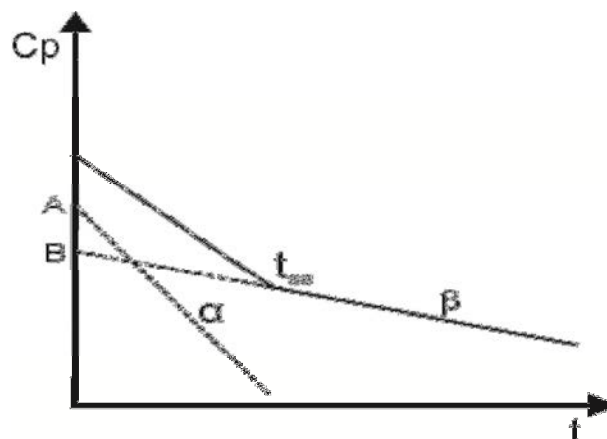
O logaritmo do resíduo entre a concentração plasmática teórica e a concentração plasmática experimental possibilitará a criação da reta residual, cuja inclinação e intersecção são k_{α} e A, respectivamente. Através desses parâmetros, a equação biexponencial (equação 5) que rege o modelo bicompartimental é criada.

Equação 5

$$Cp_t = A \times e^{-\alpha t} + B \times e^{-\beta t}$$

Em que Cp_t é uma concentração plasmática em determinado tempo t.

Figura 7 Representação gráfica do método dos resíduos. Cp (concentração plasmática), t (tempo), t_{ss} (tempo em que ocorre o equilíbrio entre compartimento periférico e central), B e β (intersecção e a inclinação da reta na fase terminal, respectivamente) e A e α (inclinação e a intersecção da reta, respectivamente).



Para o cálculo da meia vida de eliminação foi utilizada a constante k_{el} ou β aplicando-se a equação 6.

Equação 6
$$t_{1/2} = \frac{\ln 2}{\beta}$$

O cálculo do clearance total foi realizado através da equação 7, modelo independente.

Equação 7
$$Cl = \frac{DOSE}{ASC_{0-\infty}}$$

O volume de distribuição ($Vd_{\text{área}}$) foi calculado pela equação 8.

Equação 8
$$Vd_{\text{área}} = \frac{Cl}{k_{el}}$$

A relação entre ASC_{0-t} e $ASC_{0-\infty}$ foi utilizada para verificar se o tempo de coleta foi suficiente para a determinação confiável dos parâmetros farmacocinéticos. Deseja-se que esta relação seja igual ou superior a 0,8, de acordo com a RE n° 1.170, de 19 de abril de 2006 (ANVISA).

Equação 9
$$R_{\text{área}} = \frac{ASC_{0-t}}{ASC_{0-\infty}}$$

4.9 Determinação dos parâmetros bioquímicos hepáticos e renais

A avaliação das funções hepática e renal foi realizada através da determinação de alanina transaminase (ALT), aspartato transaminase (AST), creatinina e ureia antes e após exposição ao GQ-2. Para a determinação dos parâmetros bioquímicos foram utilizados 5 animais, os quais receberam GQ-2 pela via intraperitoneal e pela via intravenosa, em dose única de 12 mg/Kg e 3 mg/Kg, respectivamente. As amostras de sangue foram coletadas antes e após

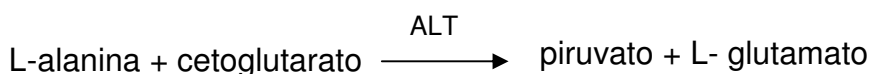
o tratamento (24 horas) com o fármaco através de cânula previamente implantada na artéria femoral e, em seguida, centrifugadas a 13.000 x g e os plasmas mantidos a -20°C até a realização das análises laboratoriais.

O equipamento utilizado para quantificação das enzimas supracitadas foi o leitor de placa Power Wave HT – Biotek.

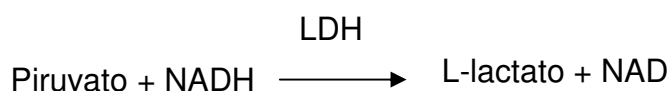
4.9.1 Determinação de ALT e AST

As determinações de ALT e AST foram realizadas por método colorimétrico - reação de Reitman Frankel utilizando-se Kit Labtest[®] (Ref. 53 e 52). As etapas envolvidas na determinação das transaminases estão descritas a seguir:

A ALT catalisa a transferência do grupo amino da alanina para o cetoglutarato com a formação de glutamato e piruvato.

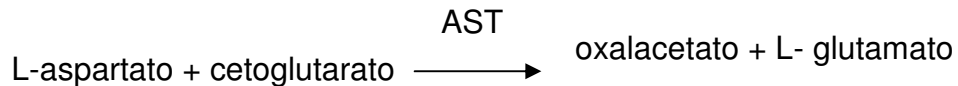


O piruvato é reduzido a lactato pela ação da lactato desidrogenase (LDH), enquanto que a coenzima NADH é oxidada a NAD^+ .

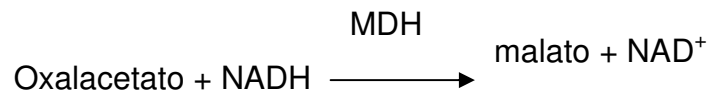


A diminuição da absorbância em 340 nm, em função do tempo, devido à oxidação da coenzima NADH, é diretamente proporcional à atividade da ALT na amostra.

A AST catalisa a transferência do grupo amino do ácido aspártico para o cetoglutarato com a formação de glutamato e oxalacetato.



O oxalacetato é reduzido a malato pela ação da malato desidrogenase (MDH), enquanto que a coenzima NADH é oxidada a NAD⁺.



A diminuição da absorbância em 340 nm, em função do tempo, devido à oxidação da coenzima NADH, é diretamente proporcional à atividade da AST na amostra.

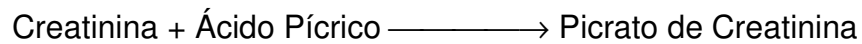
As análises de transaminases foram realizadas antes e depois do início do tratamento dos animais para que se tenha um parâmetro comparativo.

4.9.2 Determinação de Creatinina

Alterações da função renal podem ser avaliadas através da determinação dos níveis séricos de creatinina. Essa avaliação foi realizada em amostras de sangue por reação de ponto final utilizando Kit Labtest[®] (Ref. 35).

O método utilizado baseia-se na observação de que a reação da creatinina com o picrato alcalino é muito rápida, enquanto a reação do picrato com os cromogênios é mais lenta. A medida da reação nos primeiros minutos permite a determinação da creatinina.

A creatinina e outros componentes do soro reagem com a solução de picrato em meio alcalino, formando um complexo de cor vermelha que será medido fotometricamente (Kit Labtest).

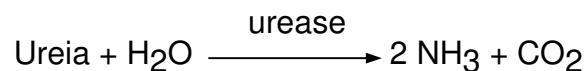


A determinação de creatinina foi feita antes e após o tratamento com os descritos anteriormente.

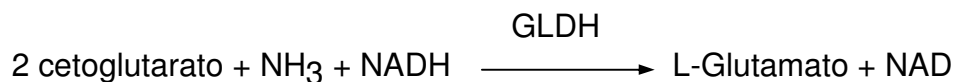
4.9.3 Determinação de Ureia

A determinação da ureia em amostras de sangue através de reação de ponto final é útil na avaliação da função renal. Esse parâmetro bioquímico foi determinado utilizando-se Kit Labtest[®] (Ref. 27). O princípio da técnica para determinação de ureia é descrito a seguir:

A ureia é hidrolisada pela urease, gerando amônia e dióxido de carbono.



A amônia reage com o 2 cetoglutarato e NADH em uma reação catalisada pela glutamato desidrogenase (GLDH), ocorrendo oxidação da NADH a NAD. A consequente redução da absorbância, medida em 340 ou 365 nm, é proporcional à concentração de ureia na amostra (Kit Labtest).



A determinação de ureia foi feita antes e após os determinados tratamentos.

4.10 Determinação glicose e colesterol

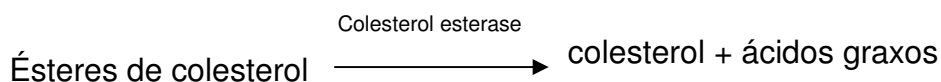
Devido ao potencial hipoglicemiante do GQ-2 para o tratamento do DM2, a avaliação dos níveis de colesterol e glicose torna-se relevante. As determinações foram realizadas antes e após a exposição ao GQ-2. Foram utilizados 5 animais, os quais receberam GQ-2 pela via intraperitoneal e pela via intravenosa, em dose única de 12 mg/Kg e 3 mg/Kg, respectivamente. As amostras de sangue foram coletadas antes e após o tratamento (24 horas) com o fármaco através de cânula previamente implantada na artéria femoral e, em seguida, centrifugadas a 13.000 x g e os plasmas mantidos a -20° C até a realização das análises laboratoriais.

O equipamento utilizado para quantificação das enzimas supracitadas foi o leitor de placa Power Wave HT – Biotek.

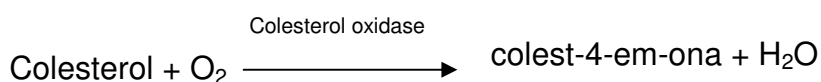
4.10.1 Determinação de Colesterol

A determinação do colesterol em amostras de sangue foi realizada através de reação de ponto final – método enzimático-Trinder utilizando-se Kit Labtest[®] (Ref. 76). As etapas envolvidas na determinação do colesterol estão descritas a seguir:

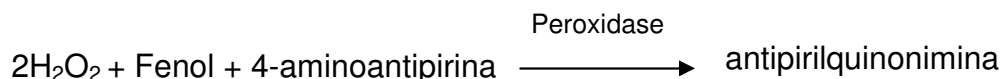
Os ésteres de colesterol na amostra são hidrolisados a colesterol livre e ácidos graxos pela ação da enzima colesterol esterase.



O colesterol formado é, em seguida, oxidado pela colesterol oxidase a colest-4-em-ona e peróxido de hidrogênio:



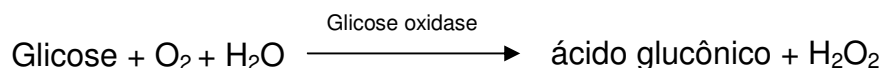
O peróxido de hidrogênio em reação catalisada pela peroxidase oxida o fenol e a 4-aminoantipirina formando antipirilquinonimina. A intensidade de cor da antipirilquinonimina é proporcional à concentração de colesterol presente na amostra que tem absorvidade máxima em 500 nm.



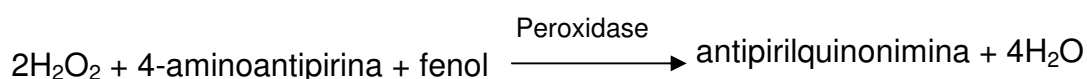
4.10.2 Determinação de Glicose

A determinação da glicose em amostras de sangue foi realizada através de reação de ponto final – método GOD-Trinder utilizando-se Kit Labtest® (Ref. 133). As etapas envolvidas na determinação da glicose estão descritas a seguir:

A enzima glicose oxidase, em fase aquosa, catalisa a oxidação da glicose presente na amostra produzindo ácido glucônico e peróxido de hidrogênio:



O peróxido de hidrogênio formado reage com 4-aminoantipirina e fenol, sob ação catalisadora da peroxidase formando a antipirilquinonimina de cor vermelha cuja intensidade da cor é proporcional à concentração da glicose presente na amostra.



4.11 Análise estatística

Os ensaios de estabilidade química e *ex vivo* foram analisados utilizando-se ANOVA simples seguido do teste de Tukey. Os parâmetros farmacocinéticos dos grupos foram apresentados através das medianas, médias e intervalo de confiança (IC 95). Já os parâmetros bioquímicos foram comparados por análise de teste t pareado e pelo teste de Wilcoxon não paramétrico para os parâmetros que não passaram no teste de normalidade, considerando-se as diferenças intra-grupo (tempos 0 e 24 h) e inter-grupos. As análises estatísticas foram realizadas utilizando o programa Graphpad Prism versão 5.0, com nível de significância de 0,05. Os cálculos de regressão linear das curvas de calibração e coeficientes de variação (CV%) foram realizados utilizando-se o programa Origin[®].

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Estudos de pré-formulação

5.1.1 Solubilização do fármaco

Recomenda-se que as avaliações preliminares do perfil farmacocinético de novos fármacos sejam realizadas através da solubilização do composto e administração na forma de solução. Desta forma, os parâmetros farmacocinéticos obtidos devem sofrer pouca ou nenhuma influência das características da pré-formulação e, em geral, são particularmente relacionados com as características do fármaco *per se* (NEERVANNAN, 2006; BUGGINS et al., 2007).

A solubilização do fármaco em água ou em solução salina é considerada ideal para este tipo de investigação. No entanto, nem sempre a solubilidade de novos fármacos nestes veículos é suficiente para que se obtenham soluções de volume adequado para a administração por diferentes vias.

A Tabela 3 apresenta a classificação de solubilidade encontrada para o GQ-2.

Tabela 3. Classificação de solubilidade do GQ-2.

Solventes	Classificação de solubilidade do GQ-2
H ₂ O	Praticamente insolúvel
Propilenoglicol	Muito pouco insolúvel
DMSO	Pouco solúvel
Metanol	Muito pouco solúvel
Etanol	Muito pouco solúvel
Tween 80	Muito pouco solúvel
Acetonitrila	Muito pouco solúvel

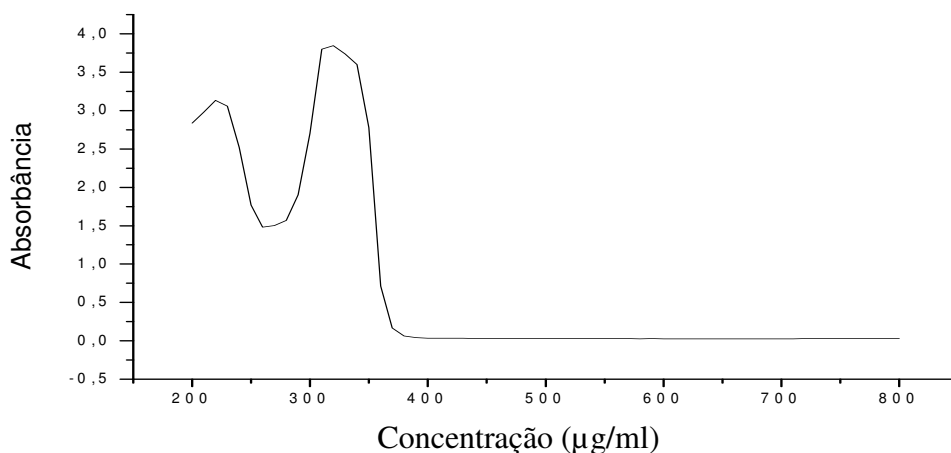
Considerando os resultados de solubilidade, para a via IP foi escolhida uma mistura de propilenoglicol: tween 20 na proporção 2:1. Cinco gotas dessa mistura foi adicionada a 10 mg do fármaco e, em seguida, 5 mL de soro fisiológico foi adicionado formando uma suspensão na concentração de 5

mg/mL, portanto o volume administrado foi de 2,4 mL/Kg. Já para a via IV, utilizou-se dimetilsulfóxido (DMSO) como veículo obtendo uma solução na concentração de 5 mg/mL e o volume administrado foi de 0,6 mL/Kg, pois segundo NEERVANNAN (2006) e DIEHL et al (2001), o volume de dose ideal administrado pela via intravenosa em ratos com peso aproximado de 250g é de 1,25 mL. Deste modo, a dose de 12 mg/Kg foi diminuída em 4 vezes (3 mg/Kg) a fim de respeitar o volume ideal de dose e evitar efeitos tóxicos do veículo.

5.2 Determinação da absorvidade do composto por análise espectrofotométrica

A solução de GQ-2 (100 µg/mL em acetonitrila) foi submetida à análise de varredura através do espectrofotômetro (Power Wave HT, Biotek®).

Figura 8. Espectrograma do composto GQ-2 na concentração de 100 µg/mL em acetonitrila.



De acordo com o espectrograma acima (Figura 8) foi possível observar que o resultado da análise apontou dois picos de absorção: o primeiro próximo a 200 nm e o segundo em 330 nm. Deste modo, o comprimento de onda em 330 nm foi escolhido para ser utilizado nos experimentos por apresentar maior absorvidade, ou seja, maior intensidade de resposta.

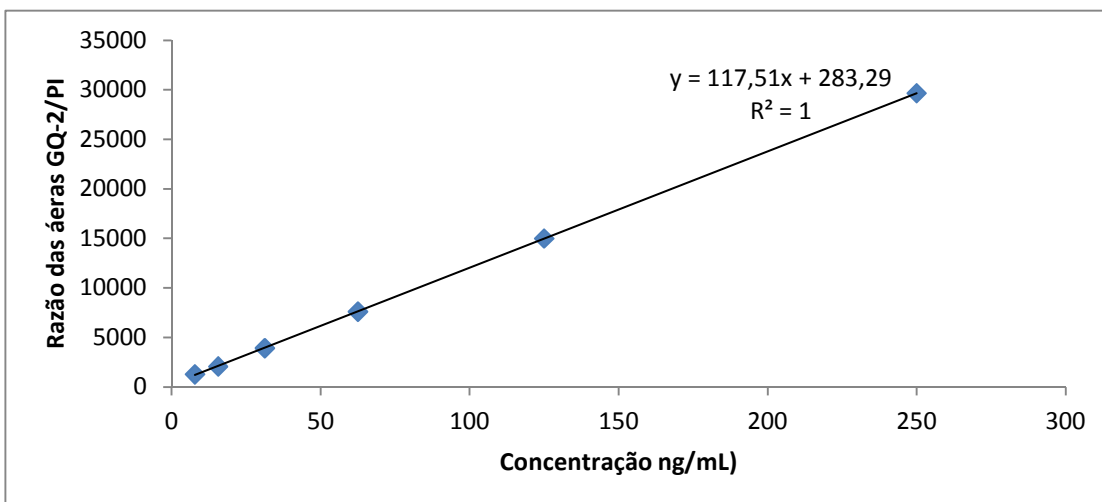
5.3 Determinação da estabilidade química do GQ-2 em tampão (pH 1,2 e 7,4)

O GQ-2 foi submetido aos ensaios de estabilidade química em solução aquosa tamponada (pH 1,2 e 7,4) de modo a mimetizar a ação do pH estomacal e intestinal e assim, observar o comportamento do fármaco sob essas condições.

5.3.1 Curva analítica

A curva analítica foi desenvolvida para a quantificação do GQ-2 em solução aquosa tamponada. Construiu-se a curva analítica com 6 níveis de concentração – 7,8 a 250 ng/mL em triplicata. O método de regressão dos mínimos quadrados foi utilizado para verificar a linearidade da curva analítica. O coeficiente de correlação (r) obtido foi de 1, acima de 0,98, e os valores de exatidão foram entre 97,3-108,7%, demonstrando que a curva analítica está de acordo com os critérios de aceitação da linearidade estabelecidos pela ANVISA. A equação de linearidade e o valor de p foram $y=117,51 \pm 81,6x+283,29 \pm 0,69$ e $p= 1,22 \times 10^{-10}$, respectivamente de acordo com a figura 9.

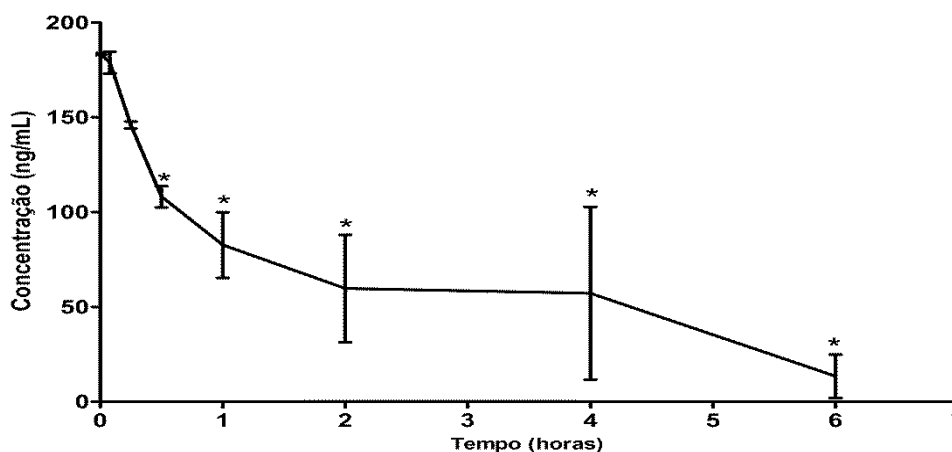
Figura 9 Curva analítica do GQ-2 (7,8 a 250 ng/mL).



5.3.2 Determinação da estabilidade química do GQ-2 em tampão (pH 1,2)

O GQ-2 foi quantificado através do método analítico desenvolvido a partir de alíquotas retiradas nos tempos determinados, em triplicata. A figura 10 demonstra a estabilidade do GQ-2 sob temperatura e agitação constante em pH 1,2.

Figura 10. Estabilidade do GQ-2 em solução tampão pH 1,2 (200 ng/mL).



* $p < 0,05$ em relação ao tempo 0 (ANOVA simples, seguido do teste de tukey).

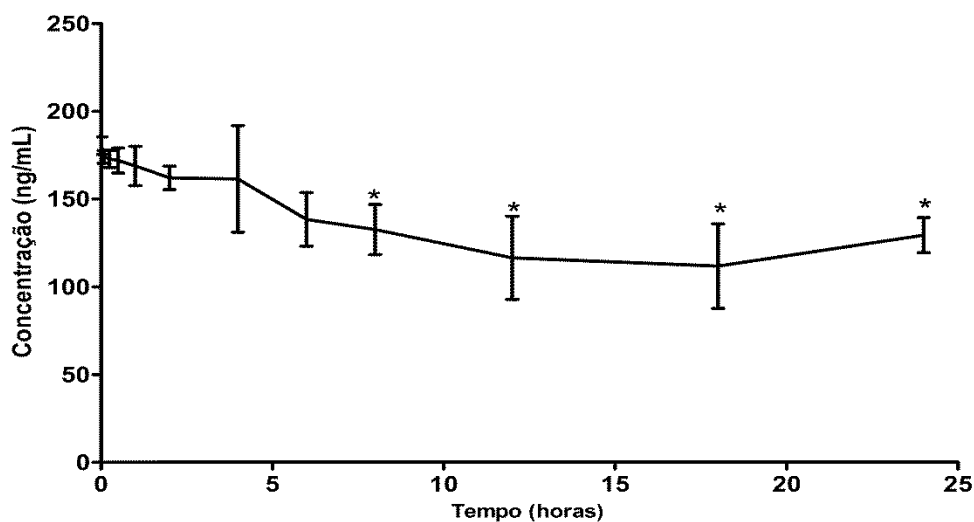
Em pH 1,2 o GQ-2 manteve-se estável até o período de 15 minutos, pois houve diferença significativa ($p < 0,05$) nas concentrações dos tempos de 0,5, 1, 2, 4 e 6 horas ($108,1 \pm 5,54$; $82,58 \pm 17,32$; $59,64 \pm 28,35$; $57,19 \pm 45,55$ e $13,46 \pm 11,40$ ng/mL, respectivamente) em relação ao tempo 0 hora ($183,4 \pm 0,56$ ng/mL). Assim, foi possível observar que o GQ-2 não apresenta estabilidade adequada em pH ácido havendo a precipitação e/ou degradação do mesmo sob essas condições, o que implica na ausência e/ou ineficácia do processo de absorção do fármaco no estômago quando administrado pela via oral.

5.3.3 Determinação da estabilidade química do GQ-2 em tampão (pH 7,4)

O GQ-2 foi quantificado através do método analítico desenvolvido a partir de alíquotas retiradas nos tempos determinados, em triplicata. A figura 11

demonstra a estabilidade do GQ-2 sob temperatura e agitação constante em pH 7,4.

Figura 11. Estabilidade do GQ-2 em solução tampão pH 7,4 (200 ng/mL).



* $p < 0,05$ em relação ao tempo 0 (ANOVA simples, seguido do teste de tukey).

Em pH 7,4 o GQ-2 manteve-se estável até o período de 6 horas, pois houve diferença significativa ($p < 0,05$) nas concentrações dos tempos 8, 12, 18 e 24 horas ($133,6 \pm 14,26$; $116,5 \pm 23,68$; $111,7 \pm 24,07$ e $129,4 \pm 10,03$ ng/mL, respectivamente) em relação ao tempo 0 horas ($180,5 \pm 5,03$ ng/mL). Assim, foi possível observar que o GQ-2 apresenta estabilidade adequada em pH básico pelo período de 6 horas, sugerindo que não ocorre interferência no processo de absorção do fármaco pelo intestino decorrente da precipitação ou degradação do fármaco em contato com o pH intestinal.

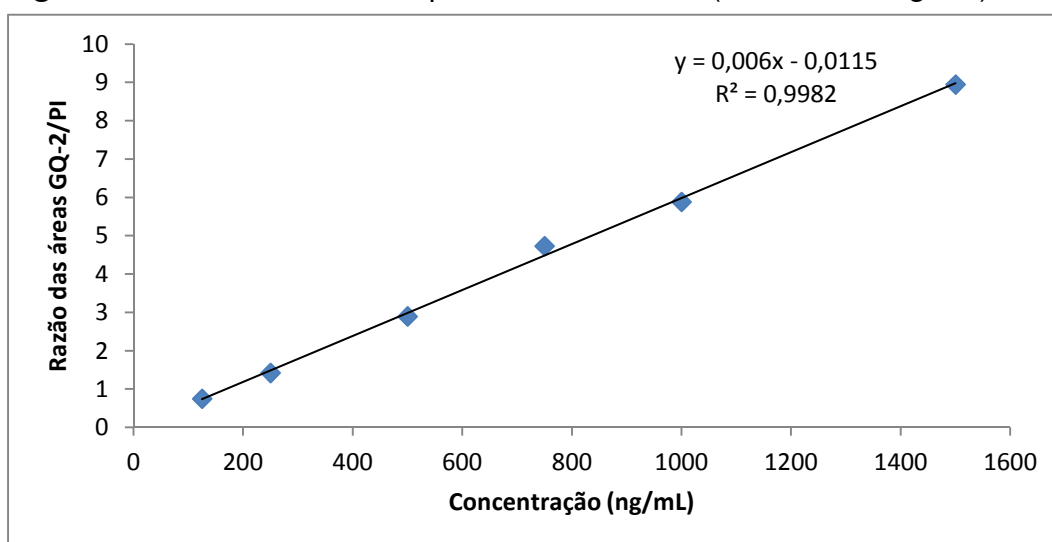
5.4 Determinação da estabilidade *ex vivo* do GQ-2 em plasma de rato e humano

O ensaio da estabilidade *ex vivo* em plasma de rato e humano foi realizado com a finalidade de avaliar a suscetibilidade do GQ-2 à degradação pelas enzimas plasmáticas.

5.4.1 Curva bioanalítica

Uma curva bioanalítica preliminar foi desenvolvida para a quantificação do GQ-2 em plasma durante os ensaios de estabilidade *ex vivo*. Construiu-se a curva analítica com 6 níveis de concentração – 125 a 1500 ng/mL em triplicata (Figura 12). O método de regressão dos mínimos quadrados foi utilizado para verificar a linearidade da curva analítica. O coeficiente de correlação (r) obtido foi de 0,99, acima de 0,98, e os valores de exatidão foram entre 96,0-105,6%, demonstrando que a curva analítica está de acordo com os critérios de aceitação da linearidade estabelecidos pela ANVISA. A equação de linearidade e o valor de p foram $y=0,006 \pm 0,0003-0,0115 \pm 0,29$ e $p=1,21 \times 10^{-6}$, respectivamente.

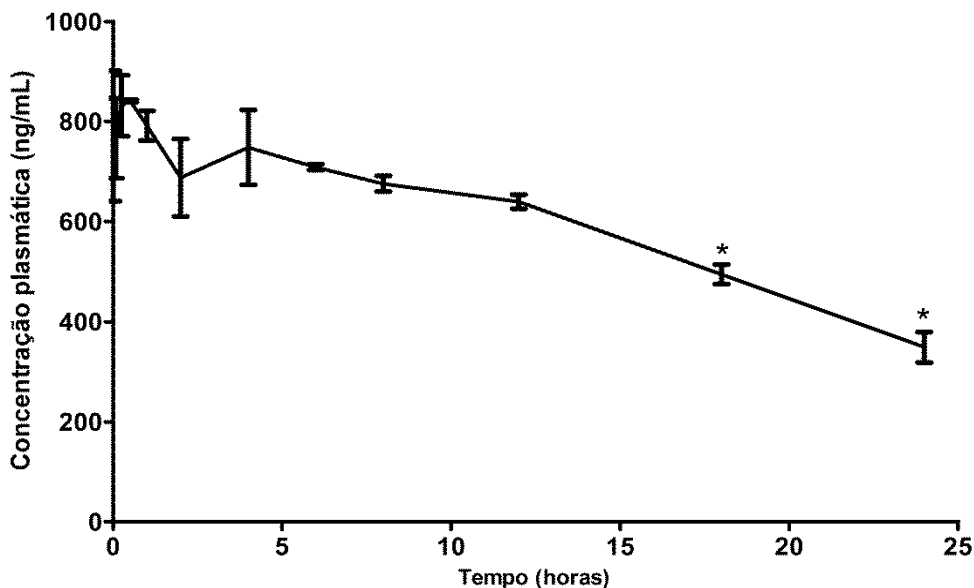
Figura 12. Curva bioanalítica preliminar do GQ-2 (125 a 1500 ng/mL).



5.4.2 Determinação da estabilidade *ex vivo* do GQ-2 em plasma de rato

O GQ-2 foi quantificado através do método bioanalítico desenvolvido a partir de alíquotas retiradas nos tempos determinados, em triplicata. A figura 13 demonstra a estabilidade do GQ-2 sob temperatura e agitação constante em plasma de rato.

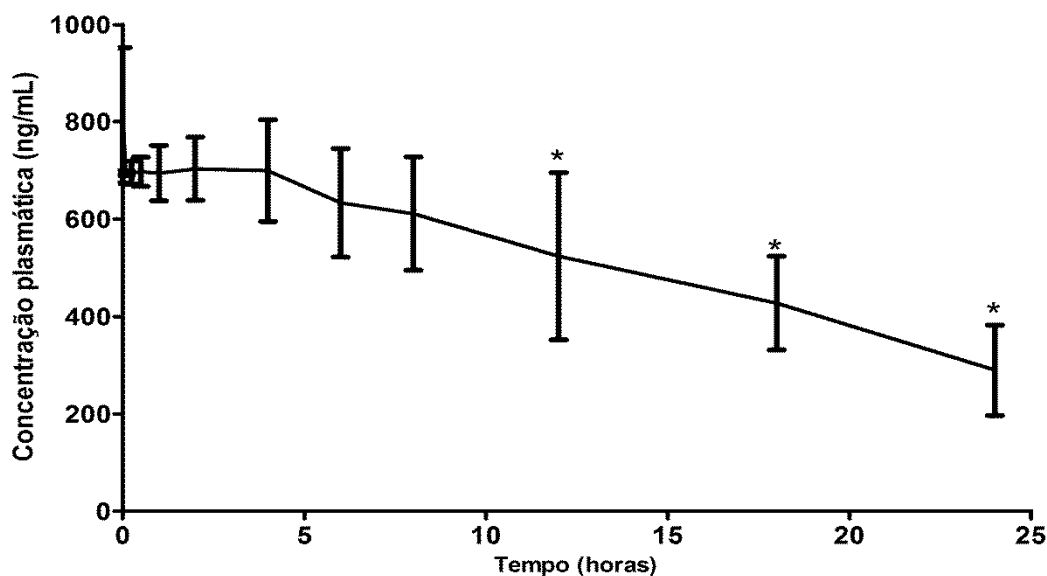
Figura 13. Estabilidade do GQ-2 em plasma de rato (700 ng/mL).



Através dos resultados obtidos na figura 13 pode-se observar que houve diferença significativa ($p < 0,05$) nas concentrações dos tempos 18 e 24 horas ($494,6 \pm 19,54$ e $348,8 \pm 30,56$ ng/mL, respectivamente) quando comparado ao tempo 0 hora ($771,0 \pm 130,2$ ng/mL). Esses resultados demonstram que o GQ-2, até o período de 12 horas, apresentou-se estável frente à hidrólise enzimática, em plasma de rato.

5.4.3 Determinação da estabilidade *ex vivo* do GQ-2 em plasma humano

O GQ-2 foi quantificado através do método bioanalítico desenvolvido a partir de alíquotas retiradas nos tempos determinados, em triplicata. A figura 14 demonstra os resultados da estabilidade do GQ-2 sob temperatura e agitação constante em plasma humano.

Figura 14. Estabilidade do GQ-2 em plasma humano (700 ng/mL).

Através dos resultados obtidos na figura 14 pode-se observar que houve diferença significativa ($p < 0,05$) nas concentrações dos tempos 12, 18 e 24 horas ($523,8 \pm 171,8$, $427,3 \pm 96,12$ e $289,7 \pm 92,8$ ng/mL, respectivamente) quando comparado ao tempo 0 hora ($579,5813,1 \pm 139,6$ ng/mL). Esses resultados demonstram que o GQ-2, até o período de 8 horas, apresentou-se estável frente à hidrólise enzimática, em plasma humano.

O GQ-2 apresentou maior estabilidade em plasma de rato (12 horas) quando comparado ao plasma humano (8 horas), no entanto, não há diferença estatística ($p < 0,05$ – teste de Mann - Whitney) entre os dois perfis de decaimento (Tabela 4).

Tabela 4. Valores dos perfis de decaimento em plasma de rato e humano. Expressos pela média, desvio padrão (%) e IC (95).

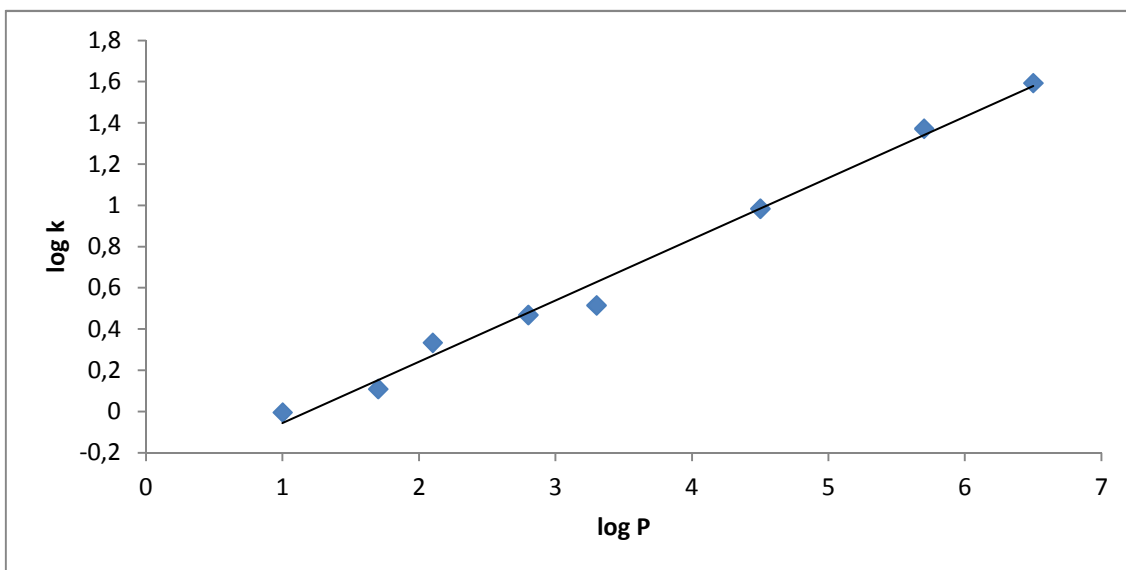
Plasma	Média	DP (%)	IC-	IC+
Rato	0,03	0,01	0,01	0,04
Humano	0,04	0,01	0,01	0,07

5.5 Determinação do log P

O log P previsto do GQ-2 foi determinado pelo *software* ChemDraw® Ultra 8.0 e ALOGPS 2.1, sendo observados os valores de 4,5 e 4,4, respectivamente. Deste modo, foram selecionadas as substâncias cuja curva do log k *versus* o log P compreendesse esses valores.

A curva de linearidade (Figura 15) dos padrões em duplicata permitiu a construção da equação $y=0,2973x - 0,3539$ e coeficiente de correlação, $r = 0,9953$. O log k do GQ-2 foi determinado a partir de seu tempo de retenção. Aplicando-se a equação da curva de linearidade ao log k obteve-se um log P de $6,168 \pm 0,000394$.

Figura 15. Curva de linearidade de log k versus log P das substâncias selecionadas.



O coeficiente de partição (log P) é utilizado em estudos estruturalidade (QSAR) e expressa de modo quantitativo a lipossolubilidade de compostos bioativos (GOODWIN et al., 2012). A lipossolubilidade, por sua vez, é uma característica físico-química de grande relevância por estar relacionada diretamente com o perfil farmacocinético dos fármacos, influenciando na permeabilidade da membrana e, portanto, nos processos de absorção e distribuição, na ligação as proteínas plasmáticas e no metabolismo (hepático

ou renal). Assim, a avaliação dos parâmetros físico-químicos no início do processo de desenvolvimento de novos fármacos é essencial para a escolha de moléculas com perfil farmacocinético promissor (PANCHAGNULA e THOMAS, 2000; GOODWIN et al., 2012).

Deste modo, Lipinski e colaboradores (1997) criaram a “regra dos 5 de Lipinski” que estabelece os parâmetros desejados para que um fármaco apresente perfil farmacocinético adequado, são eles: $\log P < 5$; peso molecular < 500 Da; número de ligações de hidrogênio < 5 e número de aceptores de hidrogênio < 10 . Esta regra é considerada uma ferramenta preditiva do comportamento *in vivo* do composto com base em suas características físico químicas, de forma direta e determinante.

Dentre os parâmetros da “regra dos 5 de Lipinski” cita-se o $\log P$ que refere-se à quantidade de espécies não ionizadas distribuídas na interface octanol/água. $\log P$ positivo infere que há mais moléculas não ionizadas no solvente octanol do que em água, sugerindo que esta espécie é mais lipofílica. Enquanto que $\log P$ negativo, ao contrário, infere que a molécula é mais hidrofílica (TSAIOUN e KATES, 2011).

O GQ-2 apresentou um valor de $\log P$ experimental de 6,168 sendo classificado, portanto, como um fármaco altamente lipofílico, pois apresenta um valor superior ao estabelecido pela regra de Lipinski ($\log P < 5$). A alta lipossolubilidade, inerente ao GQ-2, indica que o fármaco pode apresentar comportamento farmacocinético inadequado como, por exemplo, extensivo clearance hepático, alta afinidade de ligação às proteínas plasmáticas com conseqüente aumento no volume de distribuição aparente e baixa solubilidade aquosa que interfere no processo de absorção resultando em baixa biodisponibilidade oral.

5.6 Validação do método bioanalítico

O método bioanalítico foi validado utilizando-se amostras padrões de calibração (PC) para a construção da curva analítica, e controles de qualidade (CQ) para a determinação da precisão e exatidão e para monitoramento do

método. As amostras foram preparadas em plasma isento de substâncias exógenas que, por sua vez, foram adicionadas de soluções de trabalho diluídas em fase móvel [acetonitrila:água (80:20)]. Na tabela 5 estão apresentadas as concentrações da solução estoque, de trabalho, PC e CQs.

Tabela 5. Concentrações da solução estoque, de trabalho, padrões de calibração e controles de qualidades. Valores em ng/mL.

Solução Estoque	100 000							
Soluções de Trabalho	2 500	2 000	1 250	625	312,5	156,25	39,06	19,53
*PC	250	200	125	62,5	31,25	15,625	3,906	1,953
**CQ		200		62,5			3,906	1,953

*PC padrões de calibração.

**CQ controles de qualidade.

5.6.1 Curva analítica e Linearidade

A curva analítica para o GQ-2 foi construída com 9 níveis de concentração - 1,9 a 250 ng/mL - em quintuplicata, plotando-se a razão da área dos picos do composto e do PI (área do composto/área do PI) contra a concentração nominal do composto. Os resultados de linearidade estão apresentados na tabela 6.

Tabela 6. Concentrações experimentais médias que geraram a curva de calibração. Precisão, expressa pelo desvio padrão relativo (DPR) e exatidão da curva (n=5).

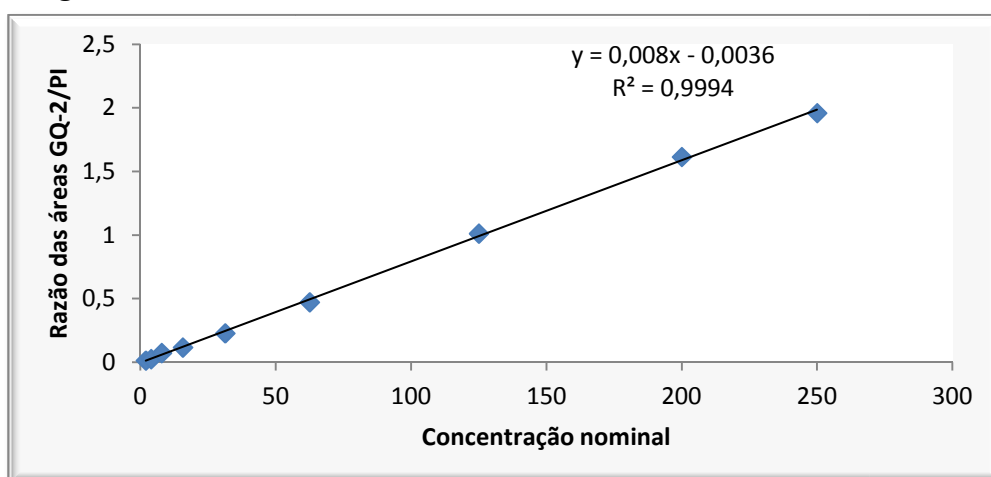
Nominal (ng/mL)	1,9	3,9	15,6	31,2	7,8	62,5	125	200	250
Experimental (ng/mL)	2,3	3,8	15,2	29,2	9,7	59,9	127,7	203,4	246,7
*DPR (%)	16,4	8,5	4,0	4,5	26,3	2,3	2,8	5,1	3,7
Exatidão (%)	116,9	96,4	97,5	93,5	124,5	95,8	102,2	101,7	98,7

*DPR desvio padrão relativo.

De acordo com a RDC n°27, de 17 de maio de 2012 (ANVISA) e com o Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation, de maio de 2001[Food and Drug Administration (FDA)] uma curva analítica adequada deve apresentar, no mínimo, 75% dos padrões de calibração de concentrações diferentes, incluindo o LIQ e o limite superior de quantificação (LSQ) dentro dos critérios de aceitação. Deste modo, o PC de concentração 7,8 ng/mL não invalida a curva analítica pelo fato de apresentar precisão e exatidão fora dos critérios de aceitação - precisão e exatidão de 0 a 15% e 85 a 115%, respectivamente exceto para o LIQ, cujos valores aceitáveis são precisão de 0 a 20% e exatidão de 80 a 120% - uma vez que 25% dos PC podem estar fora dos critérios citados.

O método de regressão dos mínimos quadrados foi utilizado para verificar a linearidade da curva analítica. O coeficiente de correlação (r) obtido foi de 0,9994, acima de 0,98, e os valores de exatidão foram entre 85-115%, exceto para o LIQ, que a exatidão é de 80-120%. A equação de linearidade e o valor de p foram $y=0,008 \pm 0,0002x-0,0036 \pm 0,02$ e $p= 2,03 \times 10^{-12}$ (Figura 15). O LIQ foi de 1,9 ng/mL com precisão e exatidão de 16,4% e 116,9% respectivamente (Tabela 5).

Figura 15. Curva analítica do GQ-2.



5.6.2 Limite de Detecção

O limite de detecção foi determinado como sendo a menor concentração do analito detectada, cuja área do pico apresente um valor 3 vezes superior ao ruído da linha de base. O LD encontrado para o GQ-2 foi de 0,976 ng/mL com precisão de 8,48%.

5.6.3 Precisão e Exatidão

A precisão e a exatidão foram avaliadas intra-corridas – determinada através de 5 análises dos controles de qualidade alto (CQA), médio (CQM), baixo (CQB), controle de qualidade diluído (CQD) e LIQ (CQ-LIQ) em um mesmo dia, e inter-corridas – determinada em três dias consecutivos. Para o ensaio intra-corrída, os valores de precisão e exatidão foram de 1,5-7,3% e de 90,4-93,6% respectivamente, e para o LIQ os valores foram de 11,0% de precisão e 92,8% de exatidão. Já para os ensaios inter-corridas os valores encontrados foram 2,1-8,1% e 89,5-90,3% para precisão e exatidão respectivamente, e para o LIQ o valor de precisão encontrado foi de 13,1% e 99,6% para exatidão (Tabela 7).

Tabela 7. Precisão e exatidão intra e inter-corridas para o GQ-2.

PRECISÃO/EXATIDÃO	ESTATÍSTICA	CONCENTRAÇÃO TEÓRICA (ng/mL)				
		1,9 (LIQ)	3,9 (CQB)	62,5 (CQM)	200 (CQA)	2000 (CQD)
	n	5	5	5	5	5
	Média	1,8	3,6	58,5	183,1	1807,3
INTRA-CORRIDA	DPR* (%)	11,0	7,3	4,6	2,1	1,5
	Exatidão (%)	92,8	93,6	93,6	91,5	90,4
	n	10	10	10	10	10
	Média	1,9	3,5	55,9	180,7	1797,5
INTER-CORRIDA	DPR* (%)	13,1	8,1	6,6	2,1	1,8
	Exatidão (%)	99,6	89,8	89,5	90,3	89,9

*DPR: desvio padrão relativo,

LIQ: limite inferior de quantificação, CQB: controle de qualidade baixo, CQM: controle de qualidade médio, CQA: controle de qualidade alto; CQD: controle de qualidade diluído.

5.6.4 Seletividade

O método mostrou-se seletivo não havendo interferências de substâncias endógenas, presentes na matriz biológica como, por exemplo, produtos de decomposição, hormônios, precursores de síntese, dentre outros, no tempo de retenção do GQ-2 e do PI (figuras 16, 17 e 18).

Figura 16. Cromatograma de amostra zero. Tempo de retenção do padrão interno de 0,48 minutos.

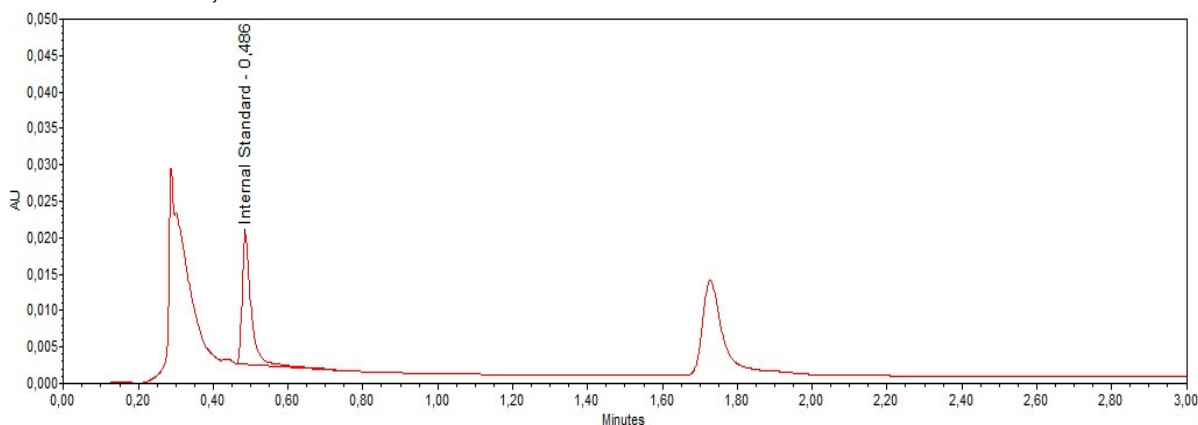


Figura 17. Cromatograma do GQ-2 na concentração de 1 μ g/mL. Tempo de retenção de 1,10 minutos.

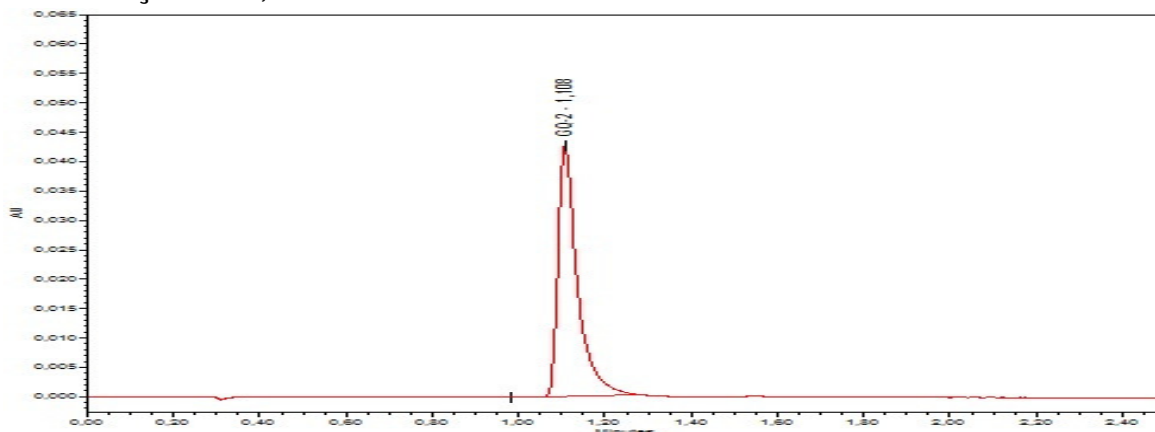
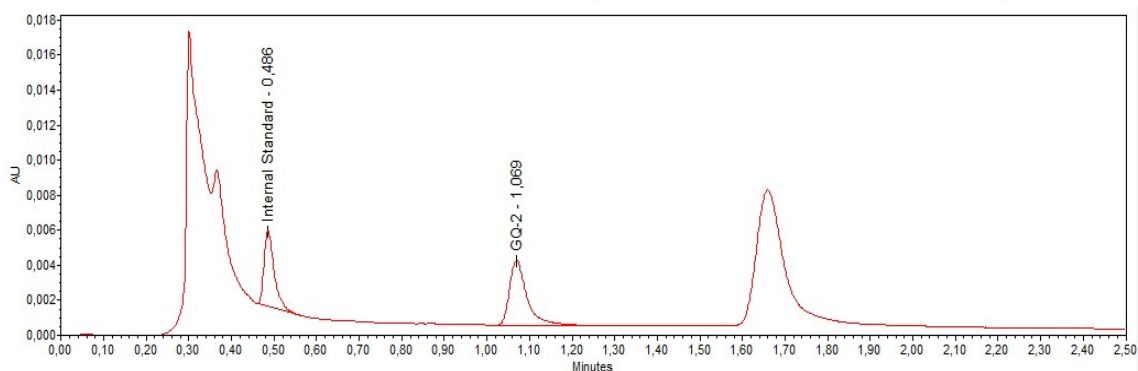


Figura 18. Cromatograma do GQ-2 (1 μ g/mL) e padrão interno(2,5 μ g/mL).



5.6.5 Recuperação

A recuperação expressa à eficiência do procedimento de extração da amostra a partir da matriz biológica. Para o GQ-2 a recuperação obtida foi em média de $100,3 \pm 6,8\%$ (Tabela 8). Já o PI teve uma recuperação de 112,3 com DPR de 10,4% para a análise das amostras extraídas e 2,5% para a análise das amostras não extraídas.

Tabela 8. Porcentagem de recuperação do GQ-2.

CQs	Estatística	GQ-2
CQB	DPR (%)	13,3**/13,7
	Recuperação (%)	107,6
CQM	DPR (%)	6,5/3,9
	Recuperação (%)	94,06
CQA	DPR (%)	6,4/4,3
	Recuperação (%)	99,4
Total	*DPR (%)	6,8
	Recuperação (%)	100,3

*DPR de cinco replicatas de CQ extraído/DPR de cinco replicatas de CQ não extraído.

CQB: controle de qualidade baixo, CQM: controle de qualidade médio e CQA: controle de qualidade alto.

**três replicatas

A recuperação não possui critérios de aceitação, mas valores próximos a 100% são desejáveis.

5.6.6 Estabilidade

A avaliação da estabilidade é necessária devido à necessidade de armazenamento das amostras após coleta ou processamento. Foram analisadas as estabilidades de curta duração, pós-processamento, ciclo de

congelamento e descongelamento e de longa duração. Os resultados das estabilidades do GQ-2 estão apresentados na tabela 9.

Tabela 9. Estabilidade do GQ-2.

CQs	Estatística	CD 4h	PP 20h (10°C)	CCD -20°C	LD -20°C
	n	5	5	5	**4
CQB	DPR* (%)	13,0	9,4	3,9	15,0
	Exatidão (%)	106,9	107,6	92,3	91,0
	n	5	5	5	*4
CQA	DPR (%)	6,3	5,3	6,9	3,9
	Exatidão (%)	96,1	106,8	97,9	125,8

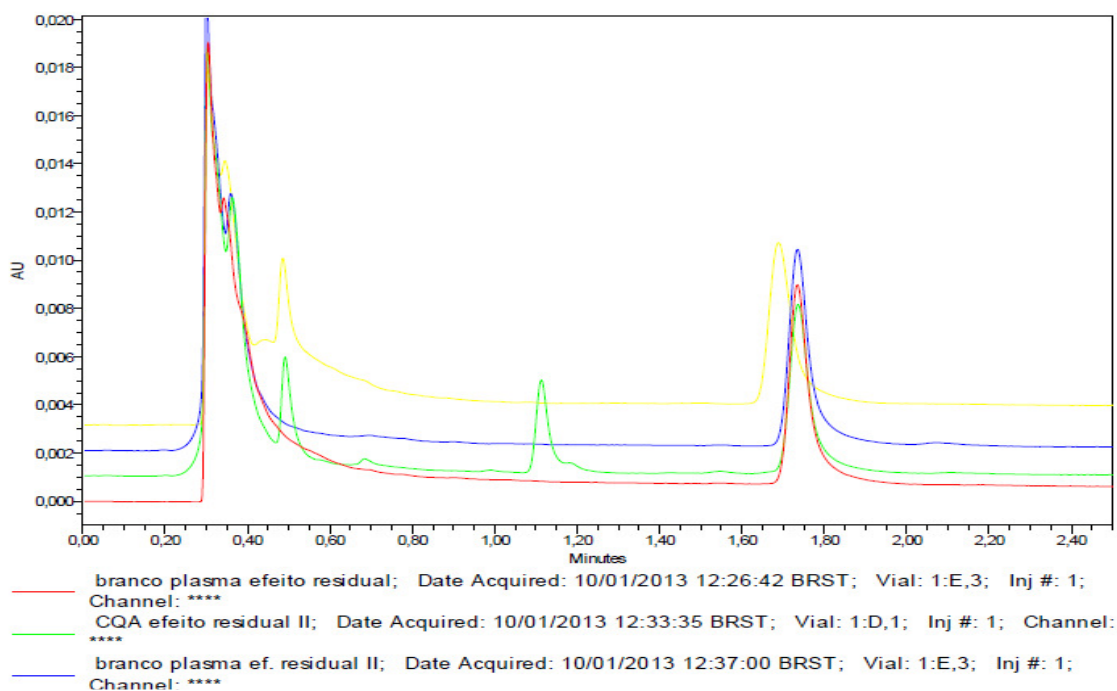
*DPR: desvio padrão relativo, CQB: controle de qualidade baixo, CQA: controle de qualidade alto, CD: curta duração a temperatura da sala de processamento, PP: pós-processamento, CCD: após 3 ciclos de congelamento e descongelamento e LD: longa

** quatro replicatas

Os compostos são considerados estáveis uma vez que não se observa desvio maior que 15% do valor obtido das amostras recém-preparadas. Portanto, o GQ-2 apresentou estabilidade frente às condições avaliadas.

5.6.7 Efeito residual (carryover)

O efeito residual expressa a ocorrência do aparecimento ou o aumento do sinal gerado pelo analito ou PI, devido à contaminação resultante de amostras anteriormente analisadas. Como observado na figura 19, não há a presença de picos interferentes no tempo de retenção do analito e do PI, portanto o método não apresenta efeito residual.

Figura 19. Efeito residual do GQ-2.

5.7 Determinação dos parâmetros bioquímicos

A determinação dos parâmetros bioquímicos estudados (ALS, AST, creatinina e ureia) foi avaliada antes e após a administração de dose única do GQ-2, tanto pela via intraperitoneal (dose de 12mg/Kg) quanto pela via intravenosa (dose de 3 mg/Kg).

5.7.1 Determinação de ALT e AST

Os parâmetros bioquímicos ALT e AST são amplamente utilizados para investigar o perfil hepatotóxico de novos fármacos na fase pré-clínica (BOONE et al., 2005)

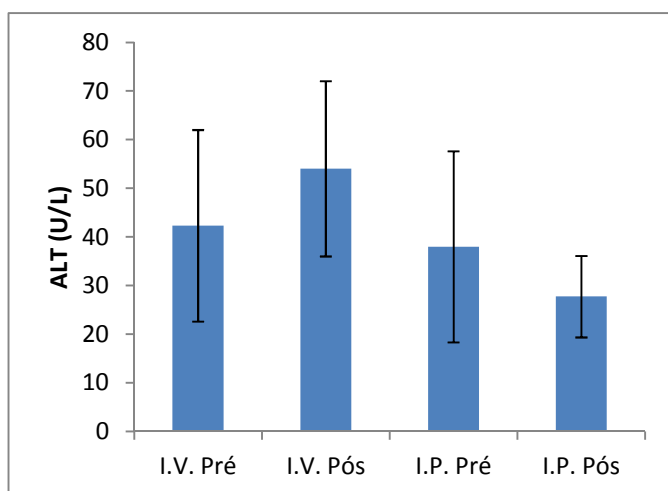
As enzimas aminotransferases ou transaminases são produzidas pelo fígado e concentram-se nesse tecido pelo fato de serem responsáveis pela atividade catalítica nas reações de transferência de um grupo amino presente em aminoácidos para um alfa-cetoácido produzindo, em seguida, outro

aminoácido e outro alfa-cetoácido correspondente (BURTIS e ASHWOOD, 2005).

A atividade de AST plasmática é maior do que a atividade de ALT em condições fisiológicas. Porém, quando ocorre lesão hepática com o rompimento dos hepatócitos e consequente extravazamento do conteúdo celular, os níveis de ALT – enzima considerada indicador específico de dano hepático - na circulação sanguínea são superiores aos níveis de AST (BURTIS e ASHWOOD, 2005; BOONE et al., 2005).

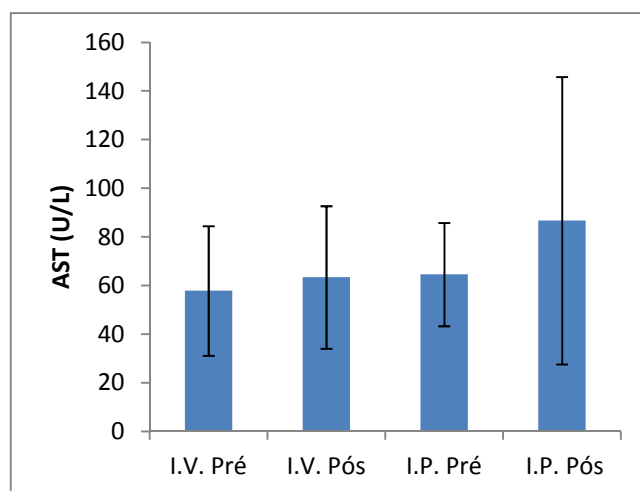
Assim, os resultados obtidos demonstraram que o GQ-2 não provoca danos hepáticos, pois não foram observadas alterações significativas nos níveis de ALT ($p > 0,05$ – teste de Wilcoxon) e de AST ($p > 0,05$ – teste t pareado) após a administração em dose única, tanto pela via intraperitoneal quanto pela via intravenosa, após o tratamento com o fármaco. As figuras 20 e 21 apresentam as médias dos resultados obtidos para ALT e AST, antes e após o tratamento e pelas duas vias de administração.

Figura 20. Média dos resultados para os níveis plasmáticos de ALT antes e após o tratamento com GQ-2 pela via intraperitoneal (12mg/Kg) e intravenosa. (3mg/Kg).



$p(>0,05)$ – teste de Wilcoxon.

Figura 21. Média dos resultados para os níveis plasmáticos de AST antes e após o tratamento com GQ-2 pela via intraperitoneal (12mg/Kg) e intravenosa. (3mg/Kg).



$p(>0,05)$ – teste t pareado.

5.7.2 Determinação de Creatinina

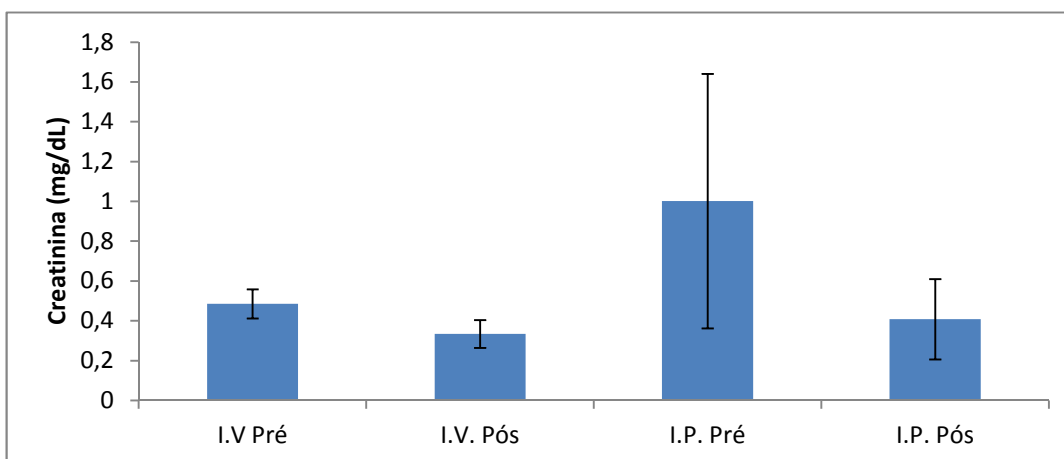
A creatinina é um produto da degradação da fosfocreatina (creatina fosforilada) presente principalmente em tecido muscular e é produzida a uma taxa relativamente constante pelo corpo a qual apresenta relação direta com a taxa de massa muscular do indivíduo, ou seja, quanto maior a massa muscular, maior a taxa de creatinina (BURTIS e ASHWOOD, 2005; SODRÉ et al., 2007).

É encontrada em todos os fluidos e secreções corporais e é filtrada principalmente pelos rins, embora uma pequena quantidade seja secretada na forma ativa (BURTIS e ASHWOOD, 2005).

A dosagem de creatinina plasmática é utilizada como principal indicador da função renal, porém altos níveis de creatinina no plasma são encontrados somente em estágios avançados de nefrotoxicidade, impedindo que esse indicador seja confiável para detectar dano renal em estágio inicial (BURTIS e ASHWOOD, 2005).

Os resultados obtidos demonstraram que o GQ-2 não altera os níveis plasmáticos de creatinina após a administração de dose única tanto pela via intraperitoneal como pela via intravenosa, pois não foram observadas alterações significativas ($p > 0,05$) nos níveis de creatinina após o tratamento com o fármaco. A figura 22 apresenta a média dos resultados obtidos para creatinina, antes e após o tratamento pela via intraperitoneal.

Figura 22. Média dos resultados para os níveis plasmáticos de creatinina antes e após o tratamento com GQ-2 pela via intraperitoneal (12mg/Kg).



$p(>0,05)$ – teste de Wilcoxon

5.7.3 Determinação de Ureia

A ureia é o principal produto metabólico nitrogenado resultante do catabolismo proteico e sua excreção - mais de 90% - ocorre através dos rins. Sofre filtração glomerular e cerca de 40% a 70% retornam a circulação sanguínea pelo processo de difusão passiva, o qual é dependente do fluxo urinário (BURTIS e ASHWOOD, 2005).

O aumento nos níveis de ureia plasmática, denominado de uremia, pode ser considerado um indicador preliminar de nefrotoxicidade, entretanto existem outros fatores extra-renais que induz o aumento na concentração de ureia plasmática, tais como: dieta rica em proteínas, elevado catabolismo proteico, desidratação, perfusão reduzida dos rins, dentre outros fatores. Portanto, a ureia como parâmetro isolado não pode ser considerada um marcador de função renal confiável (BURTIS e ASHWOOD, 2005).

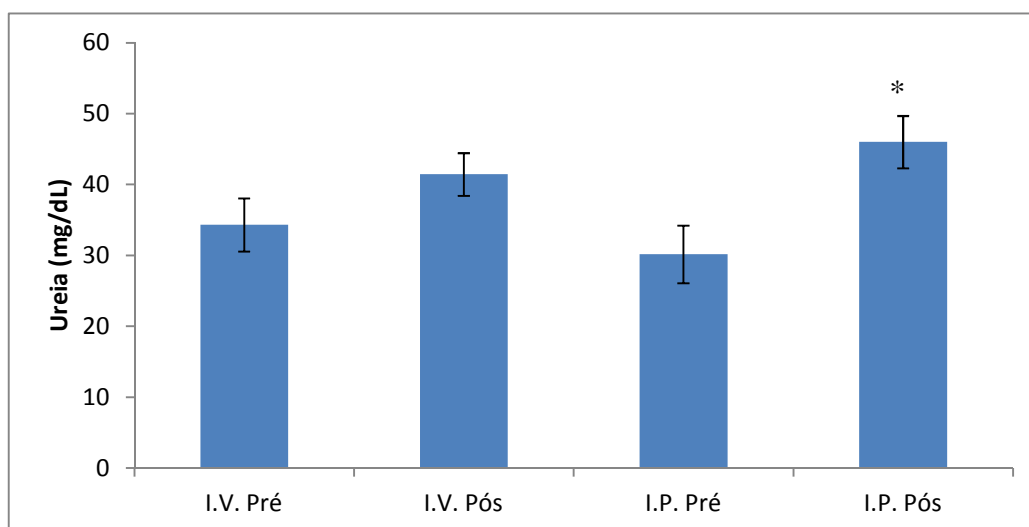
Assim, a principal aplicabilidade clínica da dosagem dos níveis séricos de ureia esta relacionada com a determinação, em conjunto, com os níveis séricos de creatinina que refletem de modo mais apropriado os aspectos de nefrotoxicidade (SODRÉ et al., 2007).

A razão ureia plasmática/creatinina plasmática indica diferentes estados patológicos que dependem se os níveis de creatinina estão ou não dentro dos valores de referência. Se a concentração de ureia plasmática está aumentada, porém os níveis de creatinina estão dentro dos valores de referência isso pode indicar a ocorrência de qualquer fator extra-renal. Entretanto, se os elevados níveis de ureia estiverem associados com elevados níveis de creatinina, pode indicar a ocorrência de processo obstrutivo pós-renal ou estenose de vias urinárias (SODRÉ et al., 2007).

Os resultados obtidos demonstraram que o GQ-2 não altera os níveis plasmáticos de ureia após a administração de dose única do GQ-2 pela via intravenosa, pois não houve diferença significativa ($p > 0,05$) após o tratamento. Entretanto, após a administração de dose única do GQ-2 pela via intraperitoneal, houve diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$ – teste t pareado) após o tratamento com o fármaco. Apesar de ter havido diferença

estatística entre pré e pós administração, os resultados indicam que o GQ-2 não causa dano renal pois, segundo Diniz et al (2006) os valores encontrados para o fármaco em questão estão dentro dos valores aceitáveis para ratos wistar machos ($55 \pm 1,9$ mg/dL). Além disso, não houve alterações nos níveis plasmáticos de creatinina pela via intraperitoneal o que reforça a ausência de nefrotoxicidade do fármaco, uma vez que a interpretação dos níveis plasmáticos de ureia juntamente com os níveis plasmáticos de creatinina expressam de modo mais apropriado as funções hepáticas do que o parâmetro ureia isolado. A figura 23 apresenta as médias dos resultados obtidos para ureia, antes e após o tratamento e pelas duas vias de administração.

Figura 23. Média dos resultados para os níveis plasmáticos de ureia antes e após o tratamento com GQ-2 pela via intraperitoneal (12mg/Kg) e intravenosa. (3mg/Kg).



* $p < 0,05$ em relação ao pré-tratamento com GQ-2 pela via i.p. (teste t pareado)

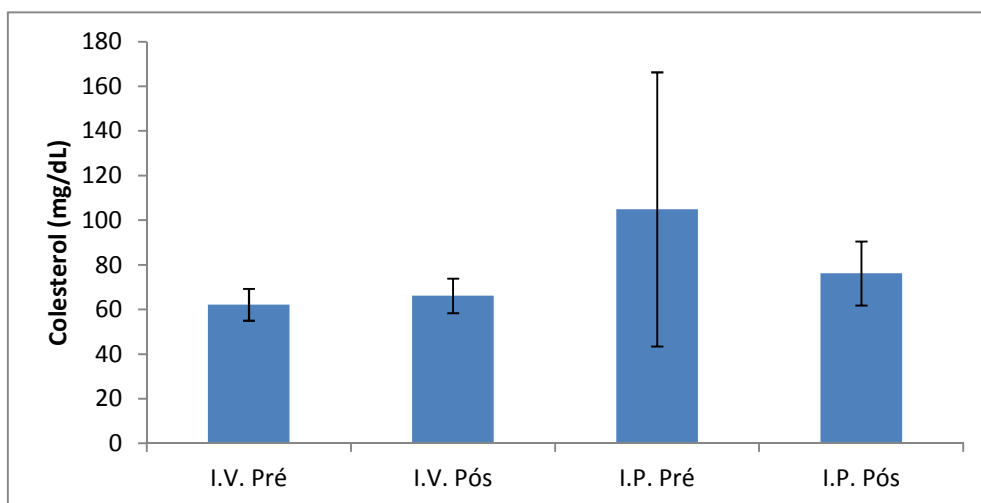
5.8 Determinação de glicose e colesterol

A determinação dos níveis de glicose e colesterol foi avaliada antes e após a administração de dose única do GQ-2, tanto pela via intraperitoneal (dose de 12mg/Kg) quanto pela via intravenosa (dose de 3 mg/Kg).

5.8.1 Determinação de colesterol

Através dos resultados obtidos pode-se observar que o GQ-2 não altera os níveis plasmáticos de colesterol, pois não foram observadas diferenças significativas após a administração em dose única pela via intraperitoneal ($p>0,05$ – teste t pareado) e pela via intravenosa ($p>0,05$) após o tratamento com o fármaco. A figura 24 apresenta as médias dos resultados obtidos para o colesterol, antes e após o tratamento e pelas duas vias de administração.

Figura 24. Média dos resultados para os níveis plasmáticos de colesterol antes e após o tratamento com GQ-2 pela via intraperitoneal (12mg/Kg) e intravenosa. (3mg/Kg).

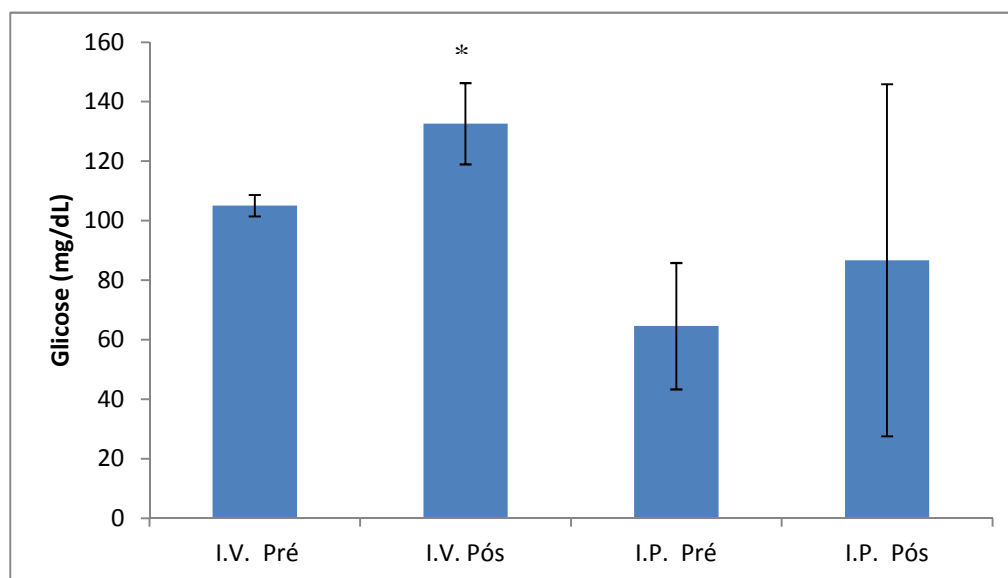


$p(>0,05)$ – teste de Wilcoxon.

5.8.2 Determinação de glicose

Através dos resultados obtidos pode-se observar que o GQ-2 não altera os níveis plasmáticos de glicose após a administração de dose única do GQ-2 pela via intraperitoneal, pois não houve diferença significativa após o tratamento ($p>0,05$). Entretanto, após a administração de dose única do GQ-2 pela via intravenosa, houve diferença significativa ($p<0,05$) após o tratamento com o fármaco. A figura 25 apresenta as médias dos resultados obtidos para glicose, antes e após o tratamento e pelas duas vias de administração.

Figura 25. Média dos resultados para os níveis plasmáticos de colesterol antes e após o tratamento com GQ-2 pela via intraperitoneal (12mg/Kg) e intravenosa. (3mg/Kg).



* $p < 0,05$ em relação ao pré-tratamento com GQ-2 pela via i.p. (teste t pareado)

O aumento da glicose após a administração IV de GQ-2 pode ter ocorrido devido a uma hiperglicemia rebote. Os animais permaneceram em jejum previamente a administração do fármaco e durante todo o período de exposição ao mesmo (24 horas), portanto o aporte de glicose dos animais era deficitário. Concomitantemente, fora administrado um fármaco com características hipoglicemiantes, sendo assim, a soma desses fatores pode ter ocasionado uma hipoglicemia severa nos animais no intervalo de exposição e em resposta ao déficit de glicose o organismo do animal pode ter respondido com a liberação de reservas energéticas proteicas e/ou lipídicas ocasionando uma hiperglicemia de rebote (HSIA et al., 2012).

Embora o GQ-2 seja um fármaco com características hipoglicemiantes e o resultado observado foi de hiperglicemia, é importante ressaltar que o fármaco apresentou meia-vida de 4,4 horas e que os efeitos foram medidos 24 horas após a administração do fármaco (5,5 meias-vidas), portanto os níveis plasmáticos do fármaco no momento da coleta eram próximos do wash out (mínimo de 7 meias-vidas). Assim, as concentrações plasmáticas do fármaco

no momento da medição poderiam estar abaixo da concentração terapêutica, não evidenciando seu efeito sobre a glicemia nesse momento.

Portanto, mais estudos precisam ser realizados para medir a glicemia no intervalo de 24 horas e evidenciar se há hipoglicemia severa antes de ocorrer a hiperglicemia rebote.

5.9 Análise farmacocinética

A disposição cinética do composto GQ-2 foi avaliada após a administração de dose única de 12 mg/Kg por via intraperitoneal e oral e de 3mg/Kg pela via intravenosa. Na administração oral e intraperitoneal não foram observados níveis plasmáticos detectáveis pelo método bioanalítico desenvolvido.

Na administração intravenosa foi possível detectar níveis plasmáticos efetivos por um período de 24 horas (Figura 26). Com base nesses resultados foi possível calcular os parâmetros farmacocinéticos para o GQ-2 (Tabela 10).

Figura 26. Curva de concentração plasmática *versus* tempo para o GQ-2 (n=10, média \pm IC95).

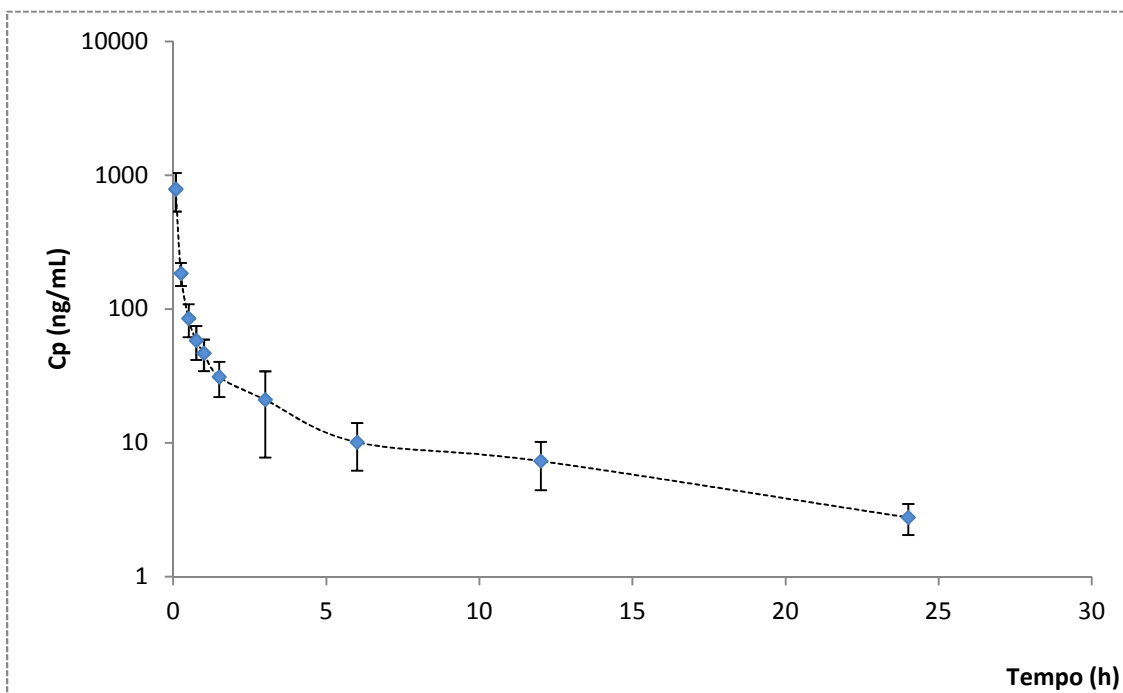


Tabela 10. Parâmetros farmacocinéticos determinados a partir da administração i.v. do GQ-2 na dose 3mg/Kg (n=10, média e mediana \pm IC95).

Parâmetros Farmacocinéticos	GQ-2 (I.V.)
C_{max} (ng/mL)	786,2 678,5 (534,62-1037,76)
t_{max} (h)	0,08 n.a.
ASC_{0-t} (ng/mL.h)	390,84 370,45 (282,28-499,41)
ASC_{0-inf} (ng/mL.h)	411,60 388,35 (296,41-526,79)
Cl (L/h/kg)	8,0 7,73 (5,45-10,55)
Vd (L/kg)	45,6 48,8 (23,9-67,3)
r áreas (%)	0,95 0,95 (0,94-0,95)
k_α ou α (h)	5,507 5,08 (4,7-6,3)
t_{1/2α} (h)	0,1283 0,1136 (0,11-0,14)
k_β ou β (h⁻¹)	0,2388 0,1225 (0,08-0,39)
t_{1/2β} (h)	4,44 5,66 (2,14-6,74)

C_{máx} (concentração plasmática máxima), t_{máx} (tempo de ocorrência da concentração plasmática máxima), t_{1/2 β} (meia vida de eliminação), ASC_{0-t} (área sob a curva do tempo zero ao último tempo determinado), ASC_{0-inf} (área sob a curva do tempo zero ao infinito), Cl (clearance), Vd (volume de distribuição), r áreas (relação entre as áreas), k_α ou α (constante de distribuição), t_{1/2 α} (meia vida de distribuição), k_β ou β (constante de eliminação).

Através da análise da curva de concentração plasmática *versus* tempo foi possível observar duas velocidades de decaimento das concentrações plasmáticas, o que permitiu a aplicação do modelo bicompartimental. No modelo em questão, a primeira velocidade de decaimento da curva sofre influência não só da fase de eliminação (k_β ou β), mas também da fase de distribuição (K_α ou α) para ocasionar a queda das concentrações plasmáticas. Já a segunda velocidade de decaimento ocorre após o equilíbrio do processo

de distribuição, em que apenas a fase de eliminação é responsável pela queda das concentrações plasmáticas.

A constante de eliminação (k_{β}) caracteriza a quantidade total de fármaco presente no organismo que é removida por unidade de tempo, ou seja, expressa a eficiência do processo de eliminação (biotransformação + excreção) quando a distribuição já está em equilíbrio. Para o GQ-2 a constante de eliminação foi de $0,24 \text{ h}^{-1}$, o que significa que 24% do fármaco é eliminado por hora.

A relação entre as ASC_{0-t} e ASC_{0-Inf} apresentou valores superiores a 80% indicando que o desenho experimental proposto foi apropriado para a obtenção dos parâmetros farmacocinéticos adequados.

Através do parâmetro volume de distribuição (V_d) é possível estimar a extensão da distribuição do fármaco no organismo. Baixos valores de V_d indicam que o fármaco apresenta limitada captação pelos tecidos, já valores altos, indicam que o fármaco apresenta alta captação tecidual. O GQ-2 apresentou um valor de V_d alto ($45,6 \text{ L/Kg}$), pois segundo DIEHL et al (2001) o volume de sangue total de um rato com peso médio de 250g é de 16 mL e qualquer valor acima desse volume é considerado um valor de V_d alto para o modelo animal em questão. Assim, o V_d encontrado para o GQ-2 foi de $45,6 \text{ L/Kg}$ ou 45600 mL/Kg , o qual em um rato com peso médio de 250g representaria $\frac{1}{4}$ desse valor ($11,4 \text{ L}$ ou $11.400,0 \text{ mL}$). Além disso, outro fator que contribui para que o V_d seja alto é o valor de $\log P$ do GQ-2 ($6,168$). De acordo com Lipinski e colaboradores (1997) compostos com $\log P > 5$ apresentam a capacidade de bioacúmulo que ocorre tanto pela alta afinidade às proteínas plasmáticas como pela alta captação tecidual, resultando no aumento do volume de distribuição aparente do fármaco, com consequente aumento da $t_{1/2}$. Portanto, esses resultados demonstram que o fármaco apresenta alto volume de distribuição e isso ocorre, em parte, devido a sua alta lipossolubilidade que favorece o transporte passivo pelas membranas biológicas. Entretanto, ressalta-se que não é possível especificar se há distribuição homogênea – incomum na maioria dos casos – ou se houve acúmulo do fármaco em tecidos ou locais específicos.

O Cl total representa a capacidade intrínseca dos órgãos depuradores em remover o fármaco de um volume específico de sangue por unidade de tempo. O débito cardíaco (DC) representa o fluxo sanguíneo máximo do corpo, sendo que fígado e rins – principais órgãos depuradores do organismo - recebem 50% desse fluxo. Deste modo, o Cl hepático e renal de um fármaco é a metade do DC do modelo animal de experimentação e qualquer valor acima indica que pode ocorrer metabolização e/ou excreção por outros órgãos. A interpretação do Cl consiste não somente do DC como também da taxa de extração (E) que representa a porcentagem de fármaco que está sendo depurada através de uma única passagem pelos diferentes órgãos depuradores (TOUTAIN e BOUSQUET-MÉLOU, 2004). O cálculo de E e DC está representado nas equações à seguir:

Equação 9

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

Sendo E a taxa de extração corporal do fármaco e DC o débito cardíaco.

Equação 10

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

Em que M é a massa corporal do animal.

Considerando ratos com peso médio de 250g, o DC encontrado foi de 234 mL/Kg/min e aplicando esse valor na equação 9 encontrou-se uma taxa de extração para o GQ-2 de 0,5, portanto pode-se concluir que o fármaco apresenta um Cl muito alto (8 L/h/Kg ou 133,3 mL/min/Kg), pois de acordo com TOUTAIN e BOUSQUET-MÉLOU (2004) um Cl alto é aquele que a taxa de

extração é maior ou igual a 0,35. Assim como no volume de distribuição, o Log P do GQ-2 exerce influência no parâmetro Cl. A alta lipossolubilidade do fármaco torna-o mais susceptível ao metabolismo por apresentar sítios ativos lipofílicos que permitem a ação das enzimas do citocromo P450. Em decorrência a esse fato tem-se um aumento no clearance hepático e consequente diminuição da meia vida.

A meia vida ($t_{1/2 \beta}$) – função da constante de eliminação (k_{β}) expressa o tempo necessário para que a concentração plasmática do fármaco diminua pela metade. Para o GQ-2 o valor de $t_{1/2 \beta}$ encontrado foi de 4,44 h. O parâmetro meia-vida sofre influência direta do Cl e do Vd, sendo assim o valor de Cl que o fármaco apresenta contribui para que a meia-vida do mesmo não seja elevada estando de acordo com os resultados de $t_{1/2 \beta}$ encontrado nesse trabalho.

Na administração oral, a ausência de concentrações detectáveis pelo método bioanalítico pode ser decorrente de vários fatores, a saber: pode ter ocorrido degradação química do composto no trato digestório uma vez que observa-se hidrólise química em pH ácido; o composto pode não ter sido absorvido em decorrência de suas características físico-químicas, como por exemplo, a alta lipossolubilidade (logP 6,168), fato que dificulta a formação de dispersões moleculares nos fluidos biológicos do trato digestório necessária para o contato do fármaco com as membranas. Em adição, a ocorrência de extensiva metabolização pré-sistêmica, o que determinaria baixa biodisponibilidade após administração oral.

Por outro lado, na administração intraperitoneal também não foram observados níveis plasmáticos detectáveis pelo método bioanalítico desenvolvido. Neste caso não há processo de degradação química como fator limitante. No entanto, toda a vascularização presente na região peritoneal sofre confluência para a veia hepática, provocando a oferta de todo o conteúdo absorvido para o tecido hepático anterior à circulação sistêmica. Assim, é possível a ocorrência da metabolização pré-sistêmica na administração por essa via, podendo explicar a ausência de níveis plasmáticos quantificáveis. Outra possibilidade, para essa via, é a ocorrência de precipitação do composto

na cavidade peritoneal após administração, o que também pode explicar a ausência de níveis plasmáticos quantificáveis.

Portanto, os resultados deste trabalho não descartam os resultados obtidos por MOURÃO et al (2006) e Silva et al (2012) em que foi observado os efeitos moleculares e metabólicos do GQ-2 e o efeito do fármaco sobre o processo aterosclerótico, respectivamente, em modelo *in vivo* e por administração pela via oral, pois o fato de não ter sido detectado níveis plasmáticos quantificáveis pelo método bioanalítico, não significa que o fármaco não tenha sofrido o processo de absorção e gerado efeito. Além disso, deve-se considerar que os autores utilizaram modelo animal diferente - camundongos swiss – onde as diferenças interespecies podem influenciar na quantidade bioativa do fármaco no organismo, também utilizaram um regime de dose múltipla (1x ao dia/14 dias) o que sugere que o efeito observado pode ser provindo do acúmulo do fármaco, ou ainda, o efeito observado pode ser decorrente do metabólito do GQ-2, o qual não foi identificado neste trabalho.

6. CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos nesse trabalho pode-se concluir que:

- O estudo de estabilidade química do GQ-2 demonstrou que o fármaco é susceptível a degradação em pH 1,2 e 7,4. No pH 1,2 o fármaco apresenta características desfavoráveis para absorção oral. Já no pH 7,4, o fármaco se mantém estável por um período maior de tempo (até 6 horas).
- Os ensaios de estabilidade *ex vivo* em plasma humano e de rato demonstraram que o GQ-2 é susceptível a hidrólise pelas enzimas plasmáticas.
- O método bioanalítico validado demonstrou limites de confiança adequados para a quantificação do GQ-2 em plasma e, portanto permitiu a sua aplicação para o estudo de farmacocinética na administração intravenosa.
- A administração de dose única (12mg/Kg) do GQ-2 pela via oral não apresentou níveis plasmáticos detectáveis pelo método bioanalítico desenvolvido para a construção do perfil farmacocinético.
- A administração de dose única (12 mg/Kg) do GQ-2 pela via intraperitoneal não apresentou níveis plasmáticos detectáveis pelo método bioanalítico desenvolvido para a construção do perfil farmacocinético.
- Na administração intravenosa foi possível detectar níveis plasmáticos significativos por um período de 24 horas e através dos resultados foi possível calcular os parâmetros farmacocinéticos para o GQ-2.
- Não há evidências de hepatotoxicidade ou nefrotoxicidade na exposição de dose única pela via intraperitoneal (12mg/Kg) e pela via intravenosa (3mg/Kg) no período de 24 horas.

- Não há evidências de alterações significativas nos níveis de glicose e colesterol na exposição de dose única pela via intraperitoneal (12m/Kg) e pela via intravenosa (3mg/Kg) no período de 24 horas.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMORÉ, B. M.; GIBBS, J. P.; EMERY, M.G. Application of *in vivo* animal models to the characterize the pharmacokinetic and pharmacodynamic properties of drug candidates in discovery settings. **Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening**. v. 13, n. 2, p, 207-218, 2010.

ARAÚJO, L. M. B.; BRITTO, M. M. dos S.; CRUZ, T. R. P. da. Tratamento do diabetes mellitus do tipo 2: novas opções. **Arquivo Brasileiro de Endocrinologia e Metabologia**. v. 44, n. 6, p. 509-517, 2000.

AROR, A. R.; MANDAVIA, C. H.; SOWERS, J. R. Insulin resistance and heart failure: molecular mechanisms. **Heart Failure Clinics**. v. 8, p. 609-617, 2012.

AZAGURY, D. E.; LAUTZ, D. B. Obesity overview: epidemiology, health and financial impact, and guidelines for qualification for surgical therapy. **Gastrointestinal Endoscopy Clinics of North America**. v. 21, p. 189-201, 2011.

BAJAJ, M. et al. Decreased plasma adiponectin concentrations are closely related to hepatic fat content and hepatic insulin resistance in pioglitazone-treated type 2 diabetic patients. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**. v. 89, n. 1, p. 200-206, 2004.

BALAS, B. et al. Pioglitazone treatment increases whole body fat but not total body water in patients with non-alcoholic steatohepatitis. **Journal of Hepatology**. v. 47, p. 565-570, 2007.

BANKER, G. C.; RHODES, C. T. Modern Pharmaceutics. 4th ed. New York, NY: Marcel Dekker, 2002. p. 67.

BAYS, H.; MANDARINO, L.; DeFRONZO, R. A. Mechanisms of endocrine disease. Role of the adipocyte, free fatty acids, and ectopic fat in pathogenesis of type 2 diabetes mellitus: peroxisomal proliferator-activated receptor agonists provide a rational therapeutic approach. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**. v. 89, n. 2, p. 463-478, 2004.

BJORNSSON, T. D. Practical uses of individual pharmacokinetic parameters in drug development and clinical practice: examples and simulations. **European Journal of Drug Metabolism and Pharmacokinetics**. v. 22, n. 1, p. 1-14, 1997.

BJÖRNTORP, P. Body fat distribution, insulin resistance, and metabolic diseases. **Nutrition**. v. 13, n. 9, p. 795-803, 1997.

BOONE, L. et al. Selection and interpretation of clinical pathology indicators of hepatic injury in preclinical studies. **Veterinary Clinical Pathology**. v. 34, n. 3, p. 182-188, 2005.

BOROUJERDI, M. **Pharmacokinetics: Principles and Applications**. New York: McGraw-Hill, 2002. p. 51-72.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA. Resolução RE 899, de 29 de maio de 2003. Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 02 de junho de 2003. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br/e-legis/>> Acesso em: 13 abr. de 2011.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA. Resolução RE nº1.170, de 19 de abril de 2000. Guia para validação de métodos bioanalíticos. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 24 de abril de 2006. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br/e-legis/>> Acesso em: 20 jul. de 2012.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA. Resolução RDC nº 27, de 17 de maio de 2012. Guia para validação de métodos bioanalíticos. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 22 de maio de 2012. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br/e-legis/>> Acesso em: 20 jul. de 2012.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA. Resolução RE 1466, de 29 de setembro de 2010. Alerta SNVS/Anvisa/Nuvig/Gfarm nº 04, de 29 de setembro de 2010. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 29 de setembro de 2010. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br>>. Acesso em: 01 de Fev. de 2012.

BUGGINS, T. R.; DICKINSON, P.A.; TAYLOR, G. The effects of pharmaceutical excipients on drug disposition. **Advanced Drug Delivery Reviews**. v. 59, p. 1482-1503, 2007.

BURTIS, C. A.; ASHWOOD, E. R. **Tietz fundamentals of clinical chemistry**. 5th ed. Philadelphia: W. B. Saunders, 2001. 1091p.

CAMPBELL, I.W. Epidemiology and clinical presentation of type 2 diabetes. **Value in Health**. v. 3, p. 3-6, 2000.

CAMPOS, M. L. **Farmacocinética pré-clínica do composto 1-(2,6-diclorofenil)indolin-2-ona (DICCIC), pró-fármaco de diclofenaco**. 97f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Araraquara, 2012.

CANTELLO, B. C. C. et al.[omega-(heterocyclylamino)alkoxy]benzyl]-2,4-thiazolidinediones as potent antihyperglycemic agents. **Journal of Medicinal Chemistry**. v. 37, p. 3977-3985, 1994.

CARLSON, C. J.; WHITE, M. F.; RONDINONE, C. M. Mammalian target of rapamycin regulates IRS-1 serine 307 phosphorylation. **Biochemical and Biophysical Research Communications**. v. 316, p. 533-539, 2004.

CARVALHEIRA, J. B. C.; ZECCHIN, H. G.; SAAD, M. J. A. Vias de sinalização da insulina. **Arquivo Brasileiro de Endocrinologia e Metabologia**. v. 46, n. 4, p. 419-425, 2002.

CHIANG, S. H.; CHANG, L.; SALTIEL, A. R. TC10 and insulin-stimulated glucose transport. **Methods in Enzymology**. v. 406, p. 701-714, 2006.

CLARK, D. A. et al. Substituted dihydrobenzopyran and dihydrobenzofuran thiazolidine-2,4-diones as hypoglycemic agents. **Journal of Medicinal Chemistry**. v. 34, n. 1, p. 319-325, 1991.

CNOP, M. et al. The concurrent accumulation of intra-abdominal and subcutaneous fat explains the association between insulin resistance and plasma leptin concentrations. **Diabetes**. v. 51, p. 1005-1015, 2002.

CONSOLI, A.; FORMOSO, G. Do thiazolidinediones still have a role in treatment of type 2 diabetes mellitus?. **Diabetes, Obesity and Metabolism**. DOI: 10.1111/dom.12101.

CUMMINGS, D. E.; SCHWARTZ, M. W. Genetics and pathophysiology of human obesity. **Annual Review of Medicine**. v. 54, p. 453-471, 2003.

DEROSA, G. et al. Metabolic effects of pioglitazone and rosiglitazone in patients with diabetes and metabolic syndrome treated with glimepiride: a twelve-month, multicenter, double-blind, randomized, controlled, parallel-group trial. **Clinical Therapeutics**. v. 26, n. 5, p. 744-754, 2004.

DESPRÉS, J. P. et al. Adipose tissue distribution and plasma lipoprotein levels in obese women. Importance of intra-abdominal fat. **Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology**. v. 9, n. 2, p. 203-210, 1989.

DESPRÉS, J.P. et al. Abdominal obesity: the cholesterol of the 21st century?. **Canadian Journal of Cardiology**. v. 24, p. 7-11, 2008.

DIEHL, K. H. et al. A good practice guide to the administration of substances and removal of blood, including routes and volumes. **Journal of Applied Toxicology**. n. 21, p. 15-23, 2001.

DINIZ, M. de F. F. de M. et al. Padronização dos parâmetros hematológicos e bioquímicos de camundongos swiss e ratos wistar. **Revista Brasileira de Ciências da Saúde**. v. 10, n. 2, p. 171-176, 2006.

DIXIT, R.; BOELSTERLI, U. A. Healthy animals and animal models of human disease(s) in safety assessment of human pharmaceuticals, including therapeutic antibodies. **Drug Discovery Today**. v. 12, n. 7, p. 336-342, 2007.

DOMINICI, F. P. et al. Influence of the crosstalk between growth hormone and insulin signalling on the modulation of insulin sensitivity. **Growth Hormone & IGF Research**. v. 15, p. 324-336, 2005.

FARMACOPÉIA brasileira . 5. ed. Brasília: Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2010.

FORMIGUERA, X. Obesity: epidemiology and clinical aspects. **Best Practice & Research Clinical Gastroenterology**. v. 18, n. 6, p. 1125-1146, 2004.

FRÖJDÖ, S.; VIDAL, H.; PIROLA, L. Alterations of insulin signaling in type 2 diabetes: a review of the current evidence from humans. **Biochimica et Biophysica Acta**. v. 1792, p. 83-92, 2009.

FUCHS, T. C.; HEWITT, P. Biomarkers for drug-induced renal damage and nephrotoxicity – an overview for applied toxicology. *The AAPS Journal*., v. 13, p. 615 – 631, 2011.

FUJIMOTO, K. et al. Possible link of pioglitazone with bladder câncer in japanese patients with type 2 diabetes. **Diabetes Research and Clinical Practice**. v. 99, p. 21-23, 2013.

FULGENCIO, J. P. et al. Troglitazone inhibits fatty acid oxidation and esterification, and gluconeogenesis in isolated hepatocytes from starved rats. **Diabetes**. v. 45, p. 1556-1562, 1996.

GALE, E. A. M. Lessons from the glitazones: a story of drug development. **The Lancet**. v. 357, p. 1970-1875, 2001.

GARCÍA, A. A. The diabetes symptom self-care inventory: development and psychometric testing with Mexican Americans. **Journal of Pain and Symptom Management**. v. 41, n. 4, p. 215-727, 2011.

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

GOMES, M. B. et al. Prevalência de sobrepeso e obesidade em pacientes com diabetes mellitus do tipo 2 no Brasil: estudo multicêntrico nacional. **Arquivo Brasileiro de Endocrinologia e Metabologia**. v. 50, n. 1, p. 136-144, 2006.

GOODWIN, R. et al. Targeted agents: how to select the winners in preclinical and early clinical studies?. **European Journal of Cancer**. v. 48, p. 170-178, 2012.

GREENFIELD, J. R.; CAMPBELL, L. V. Insulin resistance and obesity. **Clinics in Dermatology**. v. 22, p. 289-295, 2004.

GROSS, J. L. et al. Diabetes Melito: diagnóstico, classificação e avaliação do controle glicêmico. **Arquivo Brasileiro de Endocrinologia e Metabologia**. v. 46, n. 1, p. 1-11, 2002.

GRUNDY, S. M. et al. Definition of metabolic syndrome. **Journal of the American Heart Association**. DOI: 10.1161/01.CIR.0000111245.75752.C6, 2004.

GUO, L.; TABRIZCHI, R. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma as a drug target in the pathogenesis of insulin resistance. **Pharmacology & Therapeutics**. v. 111, p. 145-173, 2006.

GUYTON, A. C.; HALL, J. E. **Tratado de Fisiologia Médica**. 11th ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2006. p. 972-974.

HAUNER, H. The mode of action of thiazolidinediones. **Diabetes, Metabolism, Research and Reviews**. v. 18, p. 10-15, 2002.

HERDER, C.; RODEN, M. Genetics of type 2 diabetes: pathophysiologic and clinical relevance. **European Journal of Clinical Investigation**. v. 41, p. 679-692, 2010.

HEVENER, A. L. et al. Muscle-specific Pparg deletion causes insulin resistance. **Nature Medicine**. v. 9, n. 12, p. 1491-1497, 2003.

HSIA, E. et al. Subcutaneous administration of glargine to diabetic patients receiving insulin infusion prevents rebound hyperglycemia. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**. v. 97, n. 9, p. 3132-3137, 2012.

HUISINGA, W.; TELGMANN, R.; WULKOW, M. The virtual laboratory approach to pharmacokinetics: design principles and concepts. **Drug Discovery Today**. v. 11, p. 800 - 805, 2006.

IWATA, Y. et al. Interaction between peroxisome proliferator-activated receptor γ and its agonists: docking study of oximes having 5-benzyl-

2,4thiazolidinedione. **Journal of Molecular Graphics and Modelling**. v. 19, n. 6, p. 536-542, 2001.

JANG, G. R.; HARRIS, R. Z.; LAU, D. T. Pharmacokinetics and its role in small molecule drug discovery research. **Medicinal Research Reviews**. v. 21, n. 5, p. 382-396, 2001.

JENKINS, A. B.; CAMPBELL, L. V. The genetics and pathophysiology of diabetes mellitus type 2. **Journal of Inherited Metabolic Disease**. v. 27, p. 331-347, 2004.

KAHN, S. E. et al. Obesity, body fat distribution, insulin sensitivity and islet β -cell function as explanations for metabolic diversity. **Journal of Nutrition** v. 131, p. 354-360, 2001.

KAHN, C. R. et al. **Diabetes Mellitus**. 14th ed. Boston: Lippincott Williams & Wilkins, 2005. p. 331- 342.

KERN, P. A. et al. The expression of tumor necrosis factor in human adipose tissue. Regulation by obesity, weight loss, and relationship to lipoprotein lipase. **The Journal of Clinical Investigation**. v. 95, p. 2111-2119, 1995.

KERSHAW, E. E.; FLIER, J. S. Adipose tissue as an endocrine organ. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**. v. 89, n. 6, p. 2548-2556, 2004.

KERSTEN, S. Peroxisome proliferator activated receptors and obesity. **European Journal of Pharmacology**. v. 440, p. 223-234, 2002.

KRENTZ, A. J.; BAILEY, C. J. Oral antidiabetic agents. **Drugs**. v. 65, n. 3, p. 385-411, 2005.

KOMERS, R.; VRÁNA. Thiazolidinediones – tools for the research of metabolic syndrome X. **Physiological Research**. v. 47, p. 215-225, 1998.

KWON, Y. **Handbook of Essential Pharmacokinetics, pharmacodynamics and Drug Metabolism for Industrial Scientists**. 1^a ed. New York: Kluwer Academic Publishers, 2002, 287p.

LEITE, L. F. C. da C. et al. Synthesis, biological evaluation and molecular modeling studies of arylidene-thiazolidinediones with potential hypoglycemic and hypolipidemic activities. **European Journal of Medicinal Chemistry**. v. 42, p. 1263-1271, 2007.

LIN, J. H.; LU, A. Y. H. Role of pharmacokinetics and metabolism in drug discovery and development. **The American Society for Pharmacology and Experimental Therapeutics**. v. 49, n. 4, p. 403-449, 1997.

LIPINSKI C.A.; LOMBARDO, F.; DOMINY, B.W.; FREENEY, P.J. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. **Advanced Drug Delivery Reviews**. n. 46, p. 3-26, 1997.

MALAMAS, M. S. et al. Antihyperglycemic activity of new 1,2,4-oxadiazolidine-3,5-diones. **European Journal of Medicinal Chemistry**. v. 36, p. 31-42, 2001.

MALIK, A. H.; PRASAD, P.; SABOORIAN, M. H. Hepatic injury due to Troglitazone. **Digestive Diseases and Sciences**., v. 45, n. 1, p. 210-214, 2000.

MARTENS, F. M. A. C. et al. Metabolic and additional vascular effects of thiazolidinediones. **Drugs**. v. 62, n. 10, p. 1463-1480, 2002.

MAYERSON, A. B. et al. The effects of rosiglitazone on insulin sensitivity, lipolysis, and hepatic and skeletal muscle triglyceride content in patients with type 2 diabetes. **Diabetes**. v. 51, p. 797-802, 2002.

MERIDEN, T. Progress with thiazolidinediones in the management of type 2 diabetes mellitus. **Clinical Therapeutics**. v. 26, n. 2, p. 177-190, 2004.

MLINAR, B. et al. Molecular mechanisms of insulin resistance and associated diseases. **Clinica Chimica Acta**. v. 375, p. 20-35, 2007.

MONAMI, M.; MARCHIONNI, N.; MANNUCCI, E. Winners and losers at the rosiglitazone gamble a meta-analytical approach at the definition of the cardiovascular risk profile of rosiglitazone. **Diabetes Research and Clinical Practice**. v. 82, p. 48-57, 2008.

MOURÃO, R. H. et al. Synthesis and biological activity of novel acridinylidene and benzylidene thiazolidinediones. **European Journal of Medicinal Chemistry**. v. 40, p. 1129-1133, 2005.

MOURÃO, R. H. V. **Síntese, modelagem molecular e atividade hipoglicemiante de novas arilideno-tiazolidinadionas**. 2006. 143 f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) - Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife.

MÜSSIG, K. et al. Insulin-induced stimulation of JNK and the PI 3-kinase/mTOR pathway leads to phosphorylation of serine 318 of IRS-1 in C2C12 myotubes. **Biochemical and Biophysical Research Communications**. v. 335, p. 819-825, 2005.

NEERVANNAN, S. Preclinical formulations for discovery and toxicology: physicochemical challenges. **Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology**. v. 2, n. 5, p. 715-731, 2006.

NGUYEN, D. M.; EL-SERAG, H. B. The epidemiology of obesity. **Gastroenterology Clinics of North America**. v. 39, p. 1-7, 2010.

NISSEN, S. E.; WOLSKI, K. Effect of rosiglitazone on the risk of myocardial infarction and death from cardiovascular causes. **The New England Journal of Medicine**. v. 356, n. 24, p. 2457-2471, 2007.

NISSEN, S. E.; WOLSKI, K. Rosiglitazone Revisited. An updated meta-analysis of risk for myocardial infarction and cardiovascular mortality. **Archives of Internal Medicine**. v. 170, n. 14, p. 1191-1201, 2010.

OECD GUIDELINE FOR THE TESTING OF CHEMICALS. Partition Coefficient (n-octanol/water), High Performance Liquid Chromatography (HPLC) Method. Adopted by the Council on 30th March 1989.

OLIVEIRA, C. L. de. et al. Obesidade e síndrome metabólica na infância e adolescência. **Revista de Nutrição de Campinas**. v. 17, n.2, p. 237-245, 2004.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE - OMS. Relatório: Estatísticas da Saúde Mundial 2012. Disponível em:

<http://www.who.int/gho/publications/world_health_statistics/2012/en/index.html
> Acesso em: 04 de fev. de 2013.

PANCHAGNULA, R.; THOMAS, N. S. Biopharmaceutics and pharmacokinetics in drug research. **International Journal of Pharmaceutics**. v. 201, p. 131-150, 2000.

PAKALA, R. et al. Peroxisome proliferator-activated receptor γ : its role in metabolic syndrome. **Cardiovascular Radiation Medicine**. v. 5, p. 97-103, 2004.

PANICKER, G. K. et al. Cardiovascular risk of oral antidiabetic drugs: current evidence and regulatory requirements for new drugs. **Japi**. v. 60, p. 56-61, 2012.

PESSIN, J. E.; SALTIEL, A. R. Signaling pathways in insulin action: molecular targets of insulin resistance. **The Journal of Clinical Investigation**. v. 106, n. 2, p. 165-169, 2000.

PSATY, B. M.; FURBERG, C. D. Rosiglitazone and cardiovascular risk. **The New England Journal of Medicine**. v. 356, n. 24, p. 2522-2524, 2007.

RADENKOVIĆ, S. P. et al. The hypertriglyceridemic waist phenotype and metabolic syndrome by differing criteria in type 2 diabetic patients and their relation to lipids and blood glucose control. **Polish Journal of Endocrinology**. v. 62, n. 4, p. 316-323, 2011.

RANDLE, P.J. et al. The glucose fatty-acid cycle its role in insulin sensitivity and the metabolic disturbances of diabetes mellitus. **The Lancet**. v. 13, p. 785-789, 1963.

RANG, H. P. et al. **Rang & Dale Farmacologia**. 5th ed. London: Churchill Livingstone. 2003, cap. 7, p. 98-127.

RUAN. H.; LODISH, H. F. Insulin resistance in adipose tissue: direct and indirect effects of tumor necrosis factor- α . **Cytokine & Growth Factor Reviews**. v. 14, p. 447-455, 2003.

RUBIN, B. R.; BOGAN, J. S. Intracellular retention and insulin-stimulated mobilization of GLUT4 glucose transporters. **Vitamins and Hormones**. v. 80, p. 155-192, 2009.

RUIZ-GARCIA, A.; BERMEJO, M.; MOSS, A.; CASABO. Pharmacokinetics in drug Discovery. **Journal of Pharmaceuticals Scienses**. v. 97, p. 654-690, 2008.

RYAN, A. M. et al. Obesity, metabolic syndrome and esophageal adenocarcinoma: epidemiology, etiology and new targets. **Cancer Epidemiology**. v. 35, p. 309-319, 2011.

SALTIEL, A. R.; KAHN, C. R. Insulin signaling and the regulation of glucose and lipid metabolism. **Nature**. v. 414, p. 799-806, 2001.

SALTIEL, A. R.; PESSIN, J. E. Insulin signaling pathways in time and space. **Trends in Cell Biology**. v. 12, n. 2, p. 65-71, 2002.

SCHÄFER, S. A. et al. New type 2 diabetes risk genes provide new insights in insulin secretion mechanisms. **Diabetes Research and Clinical Practice**. v. 93, p. 9-24, 2011.

SCHEEN, A. J. Thiazolidinediones and liver toxicity. **Diabetes & Metabolism**. v. 27, n. 3, p. 305-313, 2001a.

SCHEEN, A.L. Hepatotoxicity with thiazolidinediones. Is it a class effect?. **Drug Safety**. v. 24, n.12, p. 873-888, 2001b.

SCHINNER, S. et al. Molecular mechanisms of insulin resistance. **Diabetic Medicine**. v. 22, p. 674-682, 2005.

SESTI, G. Pathophysiology of insulin resistance. **Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism**. v. 20, n. 4, p. 665-679, 2006.

SHAMSEDDEEN, H. et al. Epidemiology and economic impact of obesity and type 2 diabetes. **Surgical Clinics of North America**. v. 91, p. 1163-1172, 2011.

SHANG, N. et al. Adipogenic constituents from the bark of *Larix laricina* du Roi (K. Koch; Pinaceae), an important medicinal plant used traditionally by the Cree of Eeyou Istchee (Quebec, Canada) for the treatment of type 2 diabetes symptoms. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 141, p. 1051-1057. 2012.

SHULMAN, G. I. Cellular mechanisms of insulin resistance. **The Journal of Clinical Investigation**. v. 106, p. 171-176, 2000.

SHULMAN, G. I. Unraveling the cellular mechanism of insulin resistance in humans: new insights from magnetic resonance spectroscopy. **Physiology**. v. 19, p. 183-190, 2004.

SINGH, S. S. Preclinical pharmacokinetics: an approach towards safer and efficacious drugs. **Current Drug Metabolism**. v. 7, p. 165-182, 2006.

SILVA, A. K. S. et al. Effect of new thiazolidine derivatives LPSF/GQ-02 and LPSF/GQ-16 on atherosclerotic lesions in LDL receptor-deficient mice. **Cardiovascular Pathology**. v. 22, p. 81-90, 2013.

SINGH, S.; LOKE, Y. K.; FURBERG, C. D. Long-term risk of cardiovascular events with rosiglitazone. **The Journal of the American Medicinal Association**. v. 298, n. 10, p. 1189-1195, 2007.

SINHA, B.; GHOSAL, S. Pioglitazone – Do we really need it to manage type 2 diabetes?. **Diabetes & Metabolic Syndrome: Clinical Research & Reviews**. v. 7, p. 52-55, 2013.

SKELLY, A. H. et al. Symptom-focused management for African American women with type 2 diabetes: a pilot study. **Applied Nursing Research**. v. 18, p. 213-220, 2005.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES. **Carta circular nº 08 - GFARM/NUVIG/ANVISA/MS**. Disponível em: <<http://www.diabetes.org.br/sala-de-noticias/noticias/noticias-da-sbd/1512>>. Acesso em: 01 de Fev. de 2012.

SODRÉ, F. L.; COSTAS, J. C. B.; LIMA, J. C. C. Avaliação da função e da lesão renal. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**. v. 43, n. 5, p. 329 – 337, 2007.

SPIEGELMAN, B. M. PPAR- γ : adipogenic regulator and thiazolidinedione receptor. **Diabetes**. v. 47, p. 507-514, 1998.

STEIN, C. J.; COLDITZ, G. A. The epidemic of obesity. **The Journal of clinical endocrinology & Metabolism**. v. 89, n. 6, p. 2522-2525, 2004.

ST-PIERRE, J. et al. Contribution of abdominal obesity and hypertriglyceridemia to impaired fasting glucose and coronary artery disease. **The American Journal of Cardiology**. v. 90, p. 15-18, 2002.

SUN, X. J.; LIU, F. Phosphorylation of IRS proteins: yin-yang regulation of insulin signaling. **Vitamins and Hormones**. v. 80, p. 351-387, 2009.

TANG, J. et al. Pharmacokinetics of propofol in patients undergoing total hip replacement: effect of acute hypervolemic hemodilution. **Anaesthetist**. v. 60, p. 835-840, 2011.

TOUTAIN, P. L.; BOUSQUET-MELOU, A. Plasma clearance. **Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics**. v. 27, p. 415-425, 2004.

TOUTAIN, P. L.; BOUSQUET-MELOU, A. Volumes of distribution. **Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics**. v. 27, p. 441-453, 2004b.

TOUTAIN, P. L.; BOUSQUET-MELOU, S. Plasma terminal half-life. **Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics**. v. 27, p. 427-439, 2004c.

TSAIOUN, K.; KATES, S.A. ADMET for Medicinal Chemists, A Practical Guide. **John Wiley & Sons Publication**. Hoboken, New Jersey, 2011. 46-51.

TOZER, T. N. Concepts basic to pharmacokinetics. **Pharmacology & Therapeutics**. v. 12, n. 1, p. 109-131, 1981.

TOZER, T. N.; ROWLAND, M. **Introdução à Farmacocinética e à Farmacodinâmica: As Bases Quantitativas da Terapia Farmacológica**. 1^a ed. Porto Alegre: ArtMed. 2009. cap. 5, p. 75-116.

TREMBLAY, A. J. et al. Associations between the fatty acid content of triglyceride, visceral adipose tissue accumulation, and components of the insulin resistance syndrome. **Metabolism**. v. 53, n. 3, p. 31-317, 2004.

TSENG, C. H. Rosiglitazone is not associated with an increased risk of bladder cancer. **Cancer Epidemiology**. v. 37, p. 385-389, 2013.

TUNÇBILEK, M. et al. Synthesis and hypoglycemic activity of some substituted flavonyl thiazolidinedione derivatives-fifth communication: flavonyl benzyl substituted 2,4-thiazolidinediones. **IL Farmaco**. v. 58, p. 79-83, 2003.

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

WANG, C. C. L.; GOALSTONE, M. L.; DRAZNIN, B. Molecular mechanisms of insulin resistance that impact cardiovascular biology. **Diabetes**. v. 53, p. 2735-2740, 2004.

WATERBEEMD, H. V.; GIFFORD, E. ADMET *in silico* modeling: towards prediction paradise?. **Nature**. v. 2, p. 192-204, 2003.

WATERBEEMD, H. V.; TESTA, B. The why and how of absorption, distribution, metabolism, excretion, and toxicity research. **Comprehensive Medicinal Chemistry II**. v. 5, p. 1-9, 2007.

WEBBER, J. Energy balance in obesity. **Proceedings of the Nutrition Society**. v. 62, p. 539-543, 2003.

WINTER, M. E. **Farmacocinética Clínica Básica**. 1^a ed. São Paulo: Pharmabooks. 2012. p. 10-50.

YKI-JÄRVINEN, H. Drug therapy thiazolidinediones. **The New England Journal of Medicine**. v. 351, n. 11, p. 1106-1118, 2004.

ZHANG, H. et al. Collecting duct-specific deletion of Peroxisome proliferator-activated receptor γ blocks thiazolidinedione-induced fluid retention.

Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. v. 102, n. 26, p. 9406-9411, 2005.

ZIYADEH, N. et al. The thiazolidinediones rosiglitazone and pioglitazone and the risk of coronary heart disease: a retrospective cohort study using a US health insurance database. **Clinical Therapeutics.** v. 31, n. 11, p. 2665-2667, 2009.

8. ANEXOS

Anexo 1 – Aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais

unesp

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



Protocolo CEUA/FCF/CAr nº 31/2011

Pesquisador: CARLA MONALIZI VIEIRA

Orientador: Profa. Dra. Rosângela Gonçalves Peccinini

Projeto: Farmacocinética pré-clínica e avaliação toxicológica do composto 5-(4-cloro-benzilideno)-3-(4-metil-benzil)-tiazolidina-2,4-diona (GQ2).

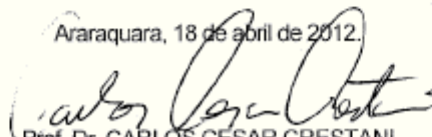
Experimento: -.-

Parecer nº 13/2012 – Comissão de Ética no Uso de Animais

A Comissão de Ética no Uso de Animais desta Faculdade, considerou o protocolo para uso de animais na pesquisa "Farmacocinética pré-clínica e avaliação toxicológica do composto 5-(4-cloro-benzilideno)-3-(4-metil-benzil)-tiazolidina-2,4-diona (GQ2)", apresentado pela pós-graduanda Carla Monalizi Vieira sob orientação da Profa. Dra. Rosângela Gonçalves Peccinini do Departamento de Princípios Ativos Naturais e Toxicologia desta Faculdade, estruturado dentro dos princípios éticos na experimentação animal do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal - CONCEA, manifestando-se FAVORÁVEL à sua execução.

O relatório final do protocolo de pesquisa deverá ser entregue em janeiro de 2014, em formulário próprio para esse fim.

Araraquara, 18 de abril de 2012.


Prof. Dr. CARLOS CESAR CRESTANI
Coordenador da CEUA

Anexo 2 – Resultados individuais da estabilidade química do GQ-2 em tampão (pH 1,2).

Estabilidade química do GQ-2 em tampão (pH 1,2)				
Tempo (horas)	Concentração (ng/mL)	DP (%)	IC -	IC+
0	183,4	0,6	182,0	184,8
0,08	178,8	5,7	164,7	193,0
0,25	145,9	1,8	141,3	150,4
0,5	108,1	5,5	94,3	121,8
1	82,6	17,3	39,6	125,6
2	59,6	28,3	-10,8	130,1
4	57,2	45,5	-56,0	170,3
6	13,5	11,4	-14,8	41,7

Anexo 3 - Resultados individuais da estabilidade química do GQ-2 em tampão (pH 7,4).

Estabilidade química do GQ-2 em tampão (pH 7,4)				
Tempo (horas)	Concentração (ng/mL)	DP (%)	IC -	IC+
0	180,5	5,0	168,0	193,0
0,08	174,0	3,7	164,8	183,1
0,25	172,8	4,8	160,8	184,8
0,5	171,9	7,1	154,3	189,6
1	168,8	11,2	141,1	196,5
2	162,1	6,6	145,6	178,5
4	161,5	30,3	86,1	236,8
6	138,4	15,3	100,4	176,4
8	132,6	14,3	97,2	168,0
12	116,5	23,7	57,7	175,3
18	111,7	24,1	51,9	171,5
24	129,4	10,0	104,4	153,3

Anexo 4 - Resultados individuais da estabilidade *ex vivo* do GQ-2 em plasma de rato.

Estabilidade <i>ex vivo</i> do GQ-2 – plasma de rato				
Tempo (horas)	Concentração (ng/mL)	DP (%)	IC -	IC+
0	771,0	130,2	447,4	1094,0
0,08	766,8	80,2	567,5	966,0
0,25	831,5	60,9	680,3	982,8
0,5	841,7	2,1	836,4	847,0
1	791,7	29,7	717,9	865,5
2	687,7	77,4	495,4	880,0
4	748,2	74,8	562,3	934,1
6	709,0	6,0	694,1	723,8
8	675,7	15,4	637,5	714,0
12	639,6	14,1	604,6	674,7
18	494,6	19,5	446,1	543,2
24	348,8	30,6	273,0	424,7

Anexo 5 - Resultados individuais da estabilidade *ex vivo* do GQ-2 em plasma humano.

Estabilidade <i>ex vivo</i> do GQ-2 – plasma humano				
Tempo (horas)	Concentração (ng/mL)	DP (%)	IC -	IC+
0	813,1	139,6	466,2	1160,0
0,08	694,1	5,1	681,5	706,8
0,25	695,3	24,0	635,6	755,1
0,5	697,4	29,7	623,5	771,3
1	694,5	56,74	553,5	835,4
2	703,5	65,1	541,7	865,3
4	700,0	104,5	440,2	959,3
6	633,8	116,3	322,2	910,3
8	611,3	116,3	357,2	900,3
12	523,8	171,8	97,0	950,7
18	427,3	96,1	188,5	666,0
24	289,7	92,8	59,1	520,3

Anexo 6 – Parâmetros bioquímicos antes e após o tratamento com GQ-2 em dose única pela via intraperitoneal (12 mg/Kg) e pela via intravenosa (3 mg/Kg).

Parâmetros bioquímicos do GQ-2				
Parâmetros bioquímicos	Via i.p. pré-tratamento	Via i.p pós-tratamento	Via i.v. pré-tratamento	Via i.v. pós-tratamento
	média – DPR (%) IC	média – DPR (%) IC	média – DPR (%) IC	média – DPR (%) IC
AST	64,6 – 37,5	86,7 – 77,8	57,9 – 52,5	63,4 – 52,8
	43,3 – 85,8	27,6 – 145,9	31,2 – 84,5	34,1 – 92,7
ALT	38,0 – 58,9	27,7 – 34,4	42,3 – 53,1	54,0 – 38,0
	18,4 – 57,6	19,4 – 36,1	22,6 – 62,0	36,0 – 72,0
Ureia	30,2 – 15,3	46,0 – 9,2	34,3 – 12,4	41,4 – 8,3
	26,1 – 34,2	42,3 – 49,7	30,6 – 38,1	38,4 – 44,4
Creatinina	1,0 – 72,8	0,41 – 56,4	0,48 – 17,2	0,33 – 23,9
	0,36 – 1,64	0,2 – 0,61	0,41 – 0,56	0,26 – 0,4

Anexo 7 – Determinação dos níveis plasmáticos de colesterol e glicose após o tratamento com GQ-2 em dose única pela via intraperitoneal (12 mg/Kg) e pela via intravenosa (3 mg/Kg).

Determinação dos níveis de glicose e colesterol				
Parâmetros	Via i.p. pré-tratamento	Via i.p pós-tratamento	Via i.v. pré-tratamento	Via i.v. pós-tratamento
	média – DPR (%) IC	média – DPR (%) IC	média – DPR (%) IC	média – DPR (%) IC
Colesterol	105,0 – 66,8	76,2 – 21,5	62,2 – 13,1	66,1 – 13,4
	43,5 – 166,3	61,8 – 90,5	55,0 – 69,3	58,4 – 74,0
Glicose	64,6 – 37,5	86,7 – 77,8	105,1 – 3,9	132,6 – 11,7
	43,3 – 85,8	27,6 – 145,9	101,5 – 108,7	119,0 – 146,3

Anexo 7

GQ-2: concentrações plasmáticas (ng/ml) em administração IV

Tempo (horas)	A1	A2	A3	A4	A5	Média	Mediana	DP	IC	IC-	IC+
0,08	569,5937	508,1386	678,5044	1009,056	1165,667	786,1919	678,5044	287,0081	251,5691	534,6228	1037,761
0,25	146,8947	159,4847	157,9447	233,587	225,6521	184,7126	159,4847	41,37606	36,26705	148,4456	220,9797
0,5	61,86804	100,9309	55,24401	119,4937	87,90498	85,08831	87,90498	26,79791	23,48897	61,59934	108,5773
0,75	47,1063	58,54658	33,37015	81,23282	70,72918	58,19701	58,54658	18,88917	16,55678	41,64022	74,75379
1	42,58301	46,37471	27,94402	67,25514	49,47086	46,72555	46,37471	14,13356	12,38839	34,33716	59,11394
1,5	27,56728	34,86777	15,55627	43,55816	34,06699	31,12329	34,06699	10,39579	9,112145	22,01115	40,23544
3	9,794448	46,20316	14,14639	11,05385	23,8661	21,01279	14,14639	15,12345	13,25605	7,756741	34,26884
6	4,402941	15,84668	9,748767	7,591138	13,0461	10,12712	9,748767	4,488161	3,933974	6,19315	14,0611
12		8,484445	4,398666		9,059761	7,314291	8,484445	2,541338	2,875741	4,438549	10,19003
24		2,825222	2,116026		3,391146	2,777465	2,825222	0,6389	0,722971	2,054494	3,500435