

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JULIO DE MESQUITA FILHO"
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
CAMPUS DE ARARAQUARA
Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas

**Farmacocinética pré-clínica e avaliação
toxicológica do novo composto α_2 -adrenérgico 3-
(2-cloro-6-fluorobenzil)-imidazolidina-2,4-diona -
PT-31 GIRSUPAN**

HELEN MARIANA BALDAN CIMATTI

Orientadora: Profa. Dra. Rosângela Gonçalves Peccinini

Araraquara
2013

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JULIO DE MESQUITA FILHO"
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
CAMPUS DE ARARAQUARA
Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas

**Farmacocinética pré-clínica e avaliação
toxicológica do novo composto α_2 -adrenérgico 3-
(2-cloro-6-fluorobenzil)-imidazolidina-2-4-diona -
PT-31 GIRSUPAN**

HELEN MARIANA BALDAN CIMATTI

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

C573f Cimatti, Helen Mariana Baldan
Farmacocinética pré-clínica e avaliação toxicológica do novo composto
alfa2-adrenérgico 3-(2-cloro-6-fluorobenzil)-imidazolidina-2-4-diona - PT-31
GIRSUPAN / Helen Mariana Baldan Cimatti. – Araraquara, 2013
131 f.

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

Orientador: Rosângela Gonçalves Peccinini

1. Farmacocinética. 2. Farmacocinética pré-clínica. 3. PT-3 GIRSUPAN.
4. Alfa2-adrenérgicos. I. Peccinini, Rosângela Gonçalves, orient. II. Título.

Vida

Há momentos na vida em que sentimos tanto a falta do passado, que o que mais queremos é sair do sonho e voltar no tempo.

Sonho com aquilo que quero.

Sou o que quero ser, porque possuo apenas uma vida e nela só tenho uma chance de fazer aquilo que quero.

Tenho felicidade bastante para fazê-la doce.

Dificuldades para fazê-la forte.

Tristeza para fazê-la humana.

E esperança suficiente para fazê-la feliz.

As pessoas mais felizes não têm as melhores coisas.

Elas sabem fazer o melhor das oportunidades que aparecem em seus caminhos.

A felicidade aparece para aqueles que choram.

Para aqueles que se machucam.

Para aqueles que buscam e tentam sempre.

E para aqueles que reconhecem a importância das pessoas que passam por suas vidas.

O futuro mais brilhante é baseado num passado intensamente vivido.

Você só terá sucesso na vida quando perdoar os erros e as decepções do passado.

A vida é curta, mas as emoções que podemos deixar duram uma eternidade.

A vida não é de se brincar porque em um belo dia "se morre".

(Clarice Lispector)

Dedicatoria

Dedico esse trabalho à minha família, preciosidade em minha vida, motivo de
grandes alegrias...

Agradecimentos

Em primeiro lugar agradeço a **Deus** pela minha vida, pela família maravilhosa que me deste e que tanto me apoia, agradeço pelas melhores oportunidades e também pelos obstáculos, os quais me faz perceber que sou capaz de superá-los. Agradeço pelo discernimento e força concedidos nos momentos mais críticos no decorrer do trabalho, carregando-me em seus braços e aliviando todo fardo pesado. Obrigada Senhor por chegar até aqui e dizer que esta foi mais uma etapa cumprida!

Aos meus pais **Walter** e **Neusa** por estarem sempre ao meu lado incondicionalmente. Por todo amor, superproteção, compreensão, repreensão e ensinamentos que me fizeram crescer e amadurecer, e que assim me transformou alguém de palavra. Obrigada por me ensinarem sobre a verdade. Amo vocês com todo o meu coração e com toda a minha alma.

Ao meu marido **Marco Aurélio** por todo amor, carinho, dedicação e compreensão depositados. Agradeço pela paciência e por toda força durante este período, incentivando-me a caminhar cada vez mais longe e a buscar novos horizontes, novas conquistas. Você é um grande homem, um grande marido, um grande pai. Um verdadeiro casal é assim, apoiamos-nos um no outro em nossos momentos de dificuldades e de conquistas, compartilhando juntos cada momento de nossas vidas. Você é um grande exemplo de ser humano para mim. Obrigada por me fazer sentir a mulher mais feliz e importante do mundo.

Ao meu irmão **Cristiano**, que mesmo à distância, continua sendo meu espelho de vida, um amigo que nunca deixou de acreditar em mim, fazendo-me lembrar sempre de que sou capaz. Toda essa vontade de vencer eu devo a você, que mesmo sem perceber, é você quem me faz levantar todas as vezes quando penso em desistir. Você, Cris, é um verdadeiro exemplo de inteligência, capacidade, ética e, acima de tudo, humildade, e é por isso que você está onde

merece estar. E à minha cunhada e amiga, **Alessandra**, pelo incentivo, força e momentos de diversão.

À minha mais nova família, **Cimatti**, pelo incentivo e momentos de descontração.

À orientadora e amiga **Rosângela**, agradeço a oportunidade e a credibilidade em mim depositada, contribuindo sempre para o meu crescimento pessoal e científico. Agradeço pelas repreensões e pelos conselhos cedidos, ajudando a me tornar uma pessoa cada vez mais forte e preparada para a vida.

Ao prof. Dr. **Ivan da Rocha Pitta**, da Universidade Federal de Pernambuco, por depositar em mim a confiança, cedendo-me o composto PT-31 e, dessa forma, desenvolver todo o meu trabalho de doutorado.

À profa. Dra. **Cleópatra da Silva Planeta**, uma verdadeira educadora no sentido da palavra. Obrigada pela paciência e disponibilidade nos ensinamentos repassados.

Aos meus grandes amigos do laboratório de Toxicologia e do Centro de Bioequivalência: Kelly, Marcos, Andréia, Juliana, Carla, Caroline, Martina, Júlia, Michel, Elias, Marcelo, Marco Antônio, Diego, Salina, Pedro, e aos mais novos, Gabriel, Emiliana e Evelin, amigos que se tornaram cada dia mais especiais. Obrigada pelo apoio e aos ótimos e contínuos momentos de bom humor.

Aos amigos e mestres do laboratório de Farmacologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP (Araraquara) pelo apoio e auxílio, cedendo-me espaço para realização de uma parte do meu trabalho.

À CNPq e ao INCT-if por financiarem os experimentos através de verba destinada ao projeto.

Ao Programa de Pós-graduação de Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP (Araraquara), pela disposição e atenção constantes em todos os momentos.

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

À Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP (Araraquara), que me forneceu conhecimentos, ensinando-me a formar o meu espírito crítico. Obrigada pela oportunidade de trabalhar nesta grande Instituição.

A todos aqueles que não citei aqui, mas que contribuíram de alguma maneira para que eu terminasse essa tão sonhada tese. Muito obrigado a todos.

RESUMO

O composto 3-(2-cloro-6-fluorobenzil)-imidazolidina-2-4-diona - PT-31 GIRSUPAN, planejado pelo grupo de pesquisa da Universidade Federal de Pernambuco, apresenta perfil analgésico resultante da ativação do α_2 -adrenoceptor no sistema nervoso central. Ainda, quando administrado pela via intraperitoneal (*i.p.*), em camundongos (15 mg/kg), o produto apresenta efeito sinérgico com a morfina. O objetivo desse estudo foi investigar características físico-químicas, aspectos de toxicidade e de farmacocinética do composto PT-31 GIRSUPAN com potencial aplicação no tratamento de dor. Os ensaios realizados para o composto foram: determinação do coeficiente de partição (logP); estudo de estabilidade química “*in vitro*” e “*ex vivo*” (plasma de rato); avaliação do perfil farmacocinético em ratos wistar após administração intraperitoneal (*i.p.*) e oral em dose única (10 mg/kg), isolado e em associação com a morfina; avaliação da toxicidade hepática e renal em ratos wistar; e avaliação do potencial de dependência. Ainda, para realizar o estudo de estabilidade e farmacocinético foram desenvolvidos e validados métodos analíticos e bioanalíticos por HPLC/UV e por LCMS para a determinação do PT-31 GIRSUPAN em solução e em plasma de rato. A determinação do coeficiente de partição (logP) do composto PT-31 GIRSUPAN resultou em logP de $1,6 \pm 0,1$ pelo método *in silico* e $1,2 \pm 0,1$ pelo método “shake flask”. Os métodos analítico e bioanalítico desenvolvidos apresentaram limites de confiança para a finalidade proposta e os resultados de estabilidade química e “*ex vivo*” demonstraram que o composto foi estável nos pHs estudados (3,0 e 7,4) e em plasma de rato por 12 horas. Na análise farmacocinética do composto administrado isoladamente foi possível observar valor de clearance (Cl) semelhante entre as vias *i.p.* e oral, entretanto os parâmetros volume de distribuição ($V_d = 0,978$ vs $0,681$ L/kg) e meia vida de eliminação ($t_{1/2} = 3,7$ vs $2,9$ h) foram significativamente maiores na administração oral ($p < 0,05$). A associação do composto à morfina administrado pela via intraperitoneal revelou aumento de Cl e diminuição da $t_{1/2}$ e tempo de residência médio (MRT) sugerindo interação farmacocinética ($p < 0,05$). Além disso, foi possível observar alterações nos parâmetros bioquímicos relacionados à hepatotoxicidade e nefrotoxicidade quando o fármaco foi associado à morfina ($p < 0,05$). Os resultados do teste de atividade locomotora demonstraram que o produto não modificou o comportamento dos animais nas doses administradas (3, 5, 10 e 20 mg/kg), sugerindo que o composto não apresenta potencial de dependência ($p > 0,05$). As investigações realizadas até o momento evidenciam que o composto PT-31 GIRSUPAN possui características promissoras para potencial aplicação na terapêutica.

Palavras-chave: farmacocinética, farmacocinética pré-clínica, PT-31 GIRSUPAN, α_2 -adrenérgicos.

ABSTRACT

The compound 3-(2-chloro-6-fluoro-benzyl)-imidazolidine-2,4-dione - GIRSUPAN PT-31 was designed by the research group of the Federal University of Pernambuco. The PT-31 GIRSUPAN has analgesic effect from the activation of α_2 -adrenoceptor in central nervous system. Still, when administered by intraperitoneal (ip) route in mice (15 mg/kg), the compound has synergistic effect with morphine. The aim of this study was to investigate the physicochemical properties, toxicity aspects and pharmacokinetic profile of the compound PT-31 GIRSUPAN with potential application in the treatment of pain. The tests for the compound were: determination of the partition coefficient (logP); study chemical stability "in vitro" (buffer) and "ex vivo" (rat plasma); evaluation of pharmacokinetic profile in Wistar rats after intraperitoneal and oral administrations in a single dose. The PT-31 GIRSUPAN was administered alone and in association with morphine to assessment of liver and kidney toxicity in Wistar rats, and to assessment of the potential for addiction. Moreover, to achieve the pharmacokinetic and stability studies were developed and validated HPLC methods with UV and mass detection, for the determination of PT-31 GIRSUPAN in solution and rat plasma. The logP of PT-31 GIRSUPAN was 1.6 ± 0.1 by in silico method and 1.2 ± 0.1 by shake flask method. The analytical and bioanalytical methods developed showed confidence limits appropriate for the intended purpose and the results of chemical stability and "ex vivo" demonstrated that the compound was stable in the evaluated pHs (3.0 and 7.4) and in the rat plasma, both by 12 hours. In pharmacokinetic analysis of the compound administered alone was observed clearance (Cl) similar between ip and oral routes, however the volume of distribution (0.978 and 0.681 L/kg) and elimination half-life (3.7 and 2.9 h) were significantly higher in oral administration ($p < 0,05$). The association of the compound with morphine administered through intraperitoneal route revealed an increase in Cl and a decrease in both half-life and mean residence time (MRT), suggesting pharmacokinetic interaction ($p < 0,05$). Furthermore we observed changes in biochemical parameters related to hepatotoxicity and nephrotoxicity when the drug was associated with morphine ($p < 0,05$). The test results demonstrate that locomotor activity of the compound did not change the behavior of the animals at the administered doses (3, 5, 10 and 20 mg/kg) ($p > 0,05$). This indicates the compound has no addictive potential. The investigations carried out so far showed the compound PT-31 GIRSUPAN has promising features for potential clinical application.

Key words: pharmacokinetic, preclinic pharmacokinetic, PT-31 GIRSUPAN, α_2 adrenergics

LISTA DE ABREVIATURAS

- AINEs: anti-inflamatórios não esteroides
- ALT (TGP): alanina transaminase
- AST (TGO): aspartato transaminase
- ASC: área sob a curva da concentração plasmática *versus* tempo
- ASC_{0-t}: área sob a curva concentração plasmática *versus* tempo do tempo zero a um tempo determinado
- ASC_{0-INF}: área sob a curva concentração plasmática *versus* tempo extrapolada ao infinito
- CK: creatinina quinase
- Cl: *clearance* total
- C_{max}: concentração plasmática máxima
- Cp₀: concentração plasmática no tempo zero
- Cp_{ss}: concentração plasmática no estado de equilíbrio
- CV: coeficiente de variação
- CYP450: citocromo P450
- DMSO: dimetil sulfóxido
- DP: desvio padrão
- F: fator de biodisponibilidade
- FM: fase móvel
- GLDH: glutamato desidrogenase
- CLAE: Cromatografia Líquida de Alta Eficiência.
- i.p.*: via intraperitoneal
- ITIES: voltametria cíclica na interface entre duas soluções de eletrólito imiscíveis
- K_a: constante de velocidade de absorção
- K_α ou α : constante de velocidade de distribuição
- K_{el} ou β : constante de velocidade de eliminação
- K₁₂: microconstante relacionada à passagem do fármaco do compartimento central para o periférico
- K₂₁: microconstante relacionada à passagem do fármaco do compartimento periférico para o central
- K₁₀: microconstante relacionada à eliminação do fármaco a partir do compartimento central

LC-MS/MS: Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada ao espectrômetro de massas

LC-UV: Cromatografia líquida acoplada ao detector ultra-violeta - visível

LD: limite de detecção

LIQ: limite inferior de quantificação

Ln: logaritmo natural

LogP: coeficiente de partição entre o sistema octanol/água

MAO: monoaminoxidase

MRM: monitoramento de reação múltipla

MRT: tempo de residência médio

NKA: neurocina A

NKB: neurocina B

NO: óxido nítrico

PI: padrão interno

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

R: coeficiente de correlação

R²: coeficiente de determinação

r áreas: relação entre ASC_{0-t} e ASC_{0-inf}

t: tempo

TGI: trato gastrintestinal

tmax: tempo de ocorrência da concentração plasmática máxima

T_{ss}: tempo que ocorre o estado de equilíbrio

t ½ α: meia vida de absorção

t ½ β: meia vida de eliminação

UV-vis: ultra-violeta – visível

Vd: volume de distribuição aparente

Vd_c: volume de distribuição inicial ou central

Vd_{ss}: volume de distribuição no estado de equilíbrio

Vd_{área}: volume de distribuição na fase de pseudo-equilíbrio

SNC: Sistema Nervoso Central

LISTA DE FLUXOGRAMA

Fluxograma 1: Processamento da amostra biológica para identificação e quantificação do composto PT-31 GIRSUPAN.....	60
--	----

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estrutura química da molécula 3-(2-cloro-6-fluorobenzil)-imidazolidina-2-4-diona (PT-31 GIRSUPAN).....	13
Figura 2: Diferentes volumes de distribuição (V_{d_c} e $V_{d_{\text{área}}}$) relacionados com a fase da disposição do fármaco no momento da quantificação da concentração plasmática.....	36
Figura 3: Perfil farmacocinético com apenas uma velocidade de decaimento. Modelo monocompartimental.....	42
Figura 4: Perfil farmacocinético com duas velocidades de decaimento. Modelo bicompartimental.....	44
Figura 5: Curva analítica em água do PT-31 GIRSUPAN.....	73
Figura 6: Curva analítica em octanol do PT-31 GIRSUPAN.....	73
Figura 7: Curva de estabilidade química em diferentes pH (3,0 e 7,4) e em plasma.....	76
Figura 8: Curva analítica do composto PT-31 GIRSUPAN em metanol.....	77
Figura 9: Perfil Farmacocinético do composto PT-31 GIRSUPAN isolado e em associação à morfina (ip) e PT-31 GIRSUPAN isolado (oral).....	82
Figura 10: Atividade locomotora em ratos Wistar após administração do composto PT-31 GIRSUPAN.....	93

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Determinação do coeficiente de partição do composto PT-31 GIRSUPAN através do método Shake Flask.....	74
Tabela 2: Valores do limite de detecção, limite de quantificação e linearidade apresentados pelo composto PT-31 GIRSUPAN.....	77
Tabela 3: Valores de precisão e exatidão intra e inter-corridas do PT-31 GIRSUPAN.....	78
Tabela 4: Valores de estabilidade de curta e longa duração, pós processamento e ciclo de congelamento e descongelamento apresentados pelo composto PT-31 GIRSUPAN.....	78
Tabela 5: Perfil farmacocinético determinado a partir da administração i.p. de PT-31 GIRSUPAN isolado e associado à morfina e administração oral de PT-31 GIRSUPAN.....	83
Tabela 6: Parâmetros bioquímicos dos animais (ratos Wistar, n=10 animais por grupo) que receberam o composto PT-31 GIRSUPAN e a associação PT-31 GIRSUPAN + morfina. O grupo DMSO foi utilizado como controle.....	84

Sumário

1. INTRODUÇÃO	12
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	17
2.1 O tratamento da dor e os agonistas α -adrenérgicos	17
2.2 Estudos pré-clínicos no desenvolvimento de fármacos.....	232
2.2.1 Propriedades físico-químicas.....	23
2.2.1.1 Solubilidade.....	24
2.2.1.2 Log P	27
2.2.2 Farmacocinética	30
2.2.3 Toxicidade	47
2.3 Sensibilização comportamental	51
3. OBJETIVOS.....	55
3.1 Objetivo Geral	55
3.2 Objetivos Específicos	55
4. MATERIAIS E MÉTODOS	56
4.1 Métodos Analíticos para determinação de PT-31 GIRSUPAN.....	56
4.1.1 Análise Espectrofotométrica	56
4.1.1.1 Determinação do Coeficiente de Partição (logP) do composto PT-31 GIRSUPAN.....	56
4.1.2 Método analítico por LC-MS	57
4.1.2.1 Estudo de estabilidade química.....	58
4.2 Método Bioanalítico para determinação de PT-31 GIRSUPAN.....	59
4.2.1 Análise cromatográfica por LC-MS	59
4.2.1.1.1 Curva analítica.....	61
4.2.1.1.2 Linearidade.....	61
4.2.1.1.3 Limite de Detecção	62
4.2.1.1.4 Limite de Quantificação	62
4.2.1.1.5 Precisão e Exatidão intra e inter-ensaios.....	62
4.2.1.1.6 Recuperação	63
4.2.1.1.7 Estabilidade	63
4.2.2 Estudo de estabilidade <i>ex vivo</i>	65
4.2.3 Avaliação do perfil farmacocinético.....	65
4.2.3.1. Casuística.....	65
4.2.3.2. Protocolo experimental.....	66
4.2.3.3. Análise farmacocinética	67
4.3 Avaliação dos parâmetros bioquímicos	68
4.3.1 Determinação da atividade enzimática de AST e ALT.....	69
4.3.2 Determinação de creatinina	70
4.3.3 Determinação de ureia.....	71
4.4 Atividade Locomotora.....	71
4.5 Análise Estatística	72
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	73
5.1 Métodos analíticos para determinação de PT-31 GISUPAN.....	73
5.1.1 Análises espectrofotométricas	73
5.1.1.1 Determinação do coeficiente de partição (logP) do composto PT-31 GIRSUPAN.....	73
5.1.2 Análises cromatográficas por LC-MS/MS	75
5.1.2.1 Estabilidade química e <i>ex vivo</i>	75
5.2 Método bioanalítico para determinação do PT-31 GIRSUPAN.....	76

5.2.1 Análises cromatográficas por LC-MS/MS	76
5.2.1.1 Desenvolvimento e validação do método bioanalítico	76
5.2.2 Perfil farmacocinético.....	78
5.3 Determinação dos parâmetros bioquímicos	83
5.4 Atividade Locomotora.....	90
6. CONCLUSÕES.....	94
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	95

1. INTRODUÇÃO

A inovação farmacêutica envolve uma complexa cadeia de investigações necessárias à elucidação da capacidade do novo composto para exercer o efeito farmacológico desejado assim como de suas propriedades tóxicas (SCHOENWALD, 2002).

Kennedy (1997) levantou as principais causas pelas quais novos fármacos têm seu estudo interrompido durante a fase clínica e apontou que em 39% dos casos as moléculas apresentavam propriedades farmacocinéticas inadequadas, como absorção e biodisponibilidade reduzidas, clearance elevado e metabolismo rápido, além de produzir metabólitos tóxicos, e em outros 11% ocorreram efeitos tóxicos com seu uso clínico (WATERBEEMD; GIFFORD, 2003; RUIZ-GARCIA et al., 2008; TSAIOUN; KATES, 2011).

Assim, para considerar a utilidade terapêutica de um novo composto é necessário que esse seja submetido a uma série de investigações tais como a elucidação de suas propriedades físico-químicas - estabilidade, solubilidade, permeabilidade - propriedades farmacológicas e toxicológicas em diferentes espécies animais, sob diferentes doses, vias e formas de administração (PANCHAGNULA; THOMAS, 2000; SCHOENWALD, 2002).

As características farmacocinéticas são influenciadas pelas características físico-químicas do composto e ambas constituem informações essenciais para continuidade do desenvolvimento de um produto farmacêutico. A farmacocinética determina os níveis plasmáticos do fármaco no organismo e, em geral, possui relação direta com a resposta clínica obtida, seja terapêutica ou tóxica (BENET et al., 2011).

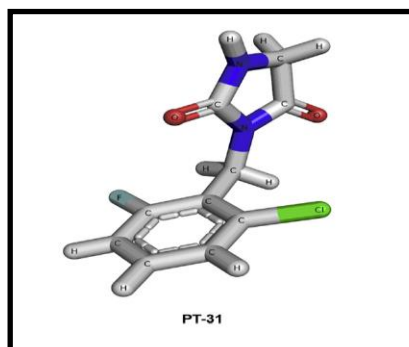
A avaliação do perfil farmacocinético proporciona a determinação de parâmetros que constituem a base da construção do regime posológico que deve ser adotado na terapêutica (BANKER; RHODES, 2002; TSAIOUN; KATES, 2011).

Um perfil farmacocinético desfavorável, como baixa biodisponibilidade, volume de distribuição limitado ou excreção e metabolismo excessivamente rápidos, assim como a formação de metabólitos de alta toxicidade, pode determinar ineficácia terapêutica ou o aparecimento de efeitos tóxicos (RUIZ-GARCIA et al., 2008; TSAIOUN; KATES, 2011).

Assim, os estudos em farmacocinética e toxicidade pré-clínica são fundamentais para a avaliação de novos fármacos anteriormente à sua aplicação em ensaios clínicos (GOLDIM, 2007).

O composto PT-31 GIRSUPAN (figura 1) é um derivado imidazolidina-2,4-diona - planejado pelo grupo de pesquisa da Universidade Federal de Pernambuco – que apresentou um perfil analgésico resultante da ativação do α_2 -adrenoceptor no sistema nervoso central (SNC). Ainda, quando administrado pela via intraperitoneal (*i.p.*), em camundongos (15 mg/kg), o produto apresentou efeito sinérgico com a morfina (SUDO et al, 2010).

Figura 1. Estrutura química da molécula 3-(2-cloro-6-fluorobenzil)-imidazolidina-2-4-diona (PT-31 GIRSUPAN) (SUDO et al., 2010).



O tratamento da dor deve considerar seu mecanismo predominante. A dor pode ser aguda (duração inferior a 30 dias) ou crônica (duração superior a 30 dias), sendo classificada segundo seu mecanismo fisiopatológico em três tipos: a) dor de predomínio nociceptivo, b) dor de predomínio neuropático e c) dor mista. A dor de predomínio nociceptivo, ou simplesmente dor nociceptiva, ocorre por ativação fisiológica de receptores nociceptivos e está relacionada à lesão de tecidos ósseos, musculares ou ligamentares (BENNETT et al., 2006) e geralmente responde bem ao tratamento sintomático com analgésicos ou anti-inflamatórios não esteroides (AINEs). Já a dor neuropática é definida como dor iniciada por lesão ou disfunção do sistema nervoso, sendo melhor compreendida como resultado da ativação anormal da via da dor ou nociceptiva (MERSKEY; BOGDUK, 1994; SCHESTATSKY; NASCIMENTO, 2009). Contrariamente à dor nociceptiva, a dor neuropática apresenta baixa resposta aos analgésicos usuais como os AINEs (SCHESTATSKY; NASCIMENTO, 2009).

O tipo de dor mais frequente na prática clínica é o misto. Um exemplo de dor mista é a radiculopatia ou a dor devida ao tumor (“oncológica”), casos em que não há somente compressão de nervos (gerando dor neuropática), mas também de ossos, facetas, articulações e ligamentos (estruturas musculoesqueléticas), gerando dor nociceptiva (SCHESTATSKY; NASCIMENTO, 2009).

Atualmente o tratamento indicado para dor crônica se faz com o uso de analgésicos e anti-inflamatórios associados aos opioides, além do uso de fármacos adjuvantes (antidepressivos e relaxantes musculares). Os anticonvulsivantes (carbamazepina, gabapentina, ácido valpróico e fenitoína)

também auxiliam no controle da dor neuropática aguda e crônica, caso ocorra tolerância aos fármacos anteriormente citados (BRASIL, 2012).

Os α_2 -agonistas, desde 1970, têm sido utilizados com sucesso como descongestionantes nasais, anti-hipertensivos e nas síndromes de abstinência causadas pelo abuso de drogas. Os α_2 -agonistas produzem diversas respostas favoráveis ao seu uso terapêutico, tais como analgesia, sedação, ansiolítica e simpatorlítica, e são utilizados no tratamento de pacientes com dor crônica e em processos cirúrgicos (KAMABYASHI, 2000).

A clonidina, por exemplo, possui atividade α_2 -adrenérgica espinal e supraespinal no circuito da dor – efeito antinociceptivo – com aplicação em processos cirúrgicos e para potencialização dos efeitos de opioides (FANG et al., 2013). A dexmedetomidina – outro α_2 -adrenérgico – foi introduzida recentemente na anestesia por produzir efeito sedativo-analgésico no contexto dos cuidados intensivos (KAMIBAYASHI, 2000; MAIA et al., 2005; KANAZI et al., 2006; MOHAMED et al., 2012).

A utilização da clonidina peridural para a dor oncológica é a única aplicação aprovada como analgésico desta classe de compostos, porém há advertências ao seu uso e ao da dexmedetomidina devido aos efeitos adversos tais como a hipotensão e a bradicardia (MOTSCH et al., 1990; KAMIBAYASHI, 2000).

Assim, as vantagens clínicas dos agonistas α_2 -adrenérgicos para terapia de dor estão esclarecidas, mas poucos fármacos apresentam esse perfil. Portanto, a identificação de novos compostos é relevante.

O objetivo desse estudo foi investigar características físico-químicas, aspectos de toxicidade e de farmacocinética da nova molécula - 3-(2-cloro-6-fluorobenzil)-imidazolidina-2-4-diona - com potencial aplicação no tratamento da dor de forma a contribuir na avaliação de sua futura aplicabilidade na terapêutica.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 O tratamento da dor e os agonistas α -adrenérgicos

Os mecanismos neurais da dor envolvem projeções periféricas e centrais, com uma série de fibras nervosas de características peculiares e diferentes substâncias químicas que promovem sua estimulação, sensibilização ou modulação, como a serotonina, a bradicinina, a histamina, as prostaglandinas, os leucotrienos, a substância P, o glutamato, o aspartato, a neurocinina A (NKA), a neurocinina B (NKB), o peptídeo geneticamente relacionado com a calcitonina (CGRP), a colecistocinina (CCK), a somatostatina, o óxido nítrico (NO), as endorfinas, entre outras (CARVALHO; LEMÔNICA, 1998; KLAUMANN et al., 2008, ETO et al., 2013).

Mecanismos inibitórios de transmissão do estímulo nociceptivo constituem o sistema analgésico endógeno. Esses mecanismos possuem papel fundamental na modulação da analgesia, estão presentes em segmentos neurais medulares e supraespinhais e tem sido alvo para o desenvolvimento de novos fármacos com potencial aplicação no tratamento da dor (CARVALHO; LEMÔNICA, 1998, ETO et al., 2013).

Esse sistema inibitório da dor é constituído por segmentos interconectados do SNC que compreende regiões dotadas de altas concentrações de encefalinas e receptores opioides, fibras serotoninérgicas e noradrenérgicas. Assim, além do sistema opioide endógeno, os neurônios noradrenérgicos apresentam importante papel na modulação do sistema endógeno da dor (CARVALHO; LEMÔNICA, 1998).

Aos receptores α_2 -adrenérgicos tem sido atribuídos os efeitos antinociceptivos do sistema adrenérgico central, porém, em decorrência da

localização tanto periférica como central, é possível que estes efeitos também ocorram em nível periférico (HYDEN; WILCOX, 1983).

A estimulação dos receptores α_2 -adrenérgicos resulta na elevação do efluxo de potássio através da ativação de seus canais, com consequente hiperpolarização da membrana e supressão da estimulação neuronal. Ainda, a ativação dos receptores α_2 -adrenérgicos suprime o influxo de cálcio com consequente redução da liberação de neurotransmissores cálcio-dependente. Ainda, o sistema colinérgico medular parece ser ativado por receptores α_2 -adrenérgicos na produção de analgesia (CARVALHO; LEMÔNICA, 1998).

Diversos agonistas α_2 -adrenérgicos, isoladamente ou associados a opioides, tem sido utilizados no tratamento da dor crônica e como adjuvantes em anestesia - como a xilazina, por exemplo - particularmente em medicina veterinária (CARVALHO; LEMÔNICA, 1998).

A morfina é considerada padrão ouro no tratamento de dor sistêmica. Entretanto, seus efeitos adversos como prurido, náusea, retenção urinária, dependência, depressão respiratória e tolerância podem ser significantes. Portanto, novos compostos são necessários para melhorar a potência e diminuir os efeitos adversos da morfina. O sucesso da combinação da morfina com agonistas α_2 -adrenérgicos tem sido experimentalmente e clinicamente relatado (OSSIPOV et al.; 1989; STEIN et al., 1991; KHOURY et al., 1992; LIKAR et al., 1997; STEIN et al, 1999).

Meyer et al. (2009) também demonstraram que os efeitos antinociceptivos da morfina têm relação intrínseca com a dopamina na região da substância cinzenta periaquedutal do mesencéfalo. Essa região faz parte do sistema de analgesia, que compreende também o núcleo magno da rafe e o complexo

inibitório da dor (localizado no corno dorsal) que, ao ser estimulado, por estímulo elétrico ou microinjeção de dopamina, pode desencadear a ativação de pelo menos duas das vias descendentes de controle da dor: a serotoninérgica e a noradrenérgica, promovendo analgesia por vários mecanismos, dentre eles: secreção de encefalinas, envio de sinais para secreção de serotonina, que leva à liberação também de encefalinas que medeiam à inibição das vias aferentes tipo A δ e C (LENT, 2005; GUYTON; HALL, 2006). Dessa forma, injeções de morfina nessa região podem estimular as vias antinociceptivas, pois, sabidamente, a morfina pode levar à liberação de dopamina em muitas áreas encefálicas (MEYER et al., 2009).

Um dos efeitos mais descritos dos opioides são as ações excitatórias, geralmente atribuídas à capacidade desses fármacos em estimular a liberação de dopamina em diversas regiões encefálicas (SODERMAN; UNTERWALD, 2008) existindo forte relação entre liberação de dopamina e estimulação locomotora (DI CHIARA; IMPERATO, 1998).

Embora desde 1970, o uso terapêutico de α_2 -agonistas tenha sido essencialmente no controle da hipertensão e da congestão nasal, a expansão de sua aplicação terapêutica deve-se à ampliação do conhecimento dos mecanismos moleculares de diversos sistemas fisiológicos (KAMIBAYASHI, 2000).

Usados primariamente como sedativos, os agonistas α_2 -adrenérgicos também possuem ações analgésicas (DAUNT; STEFFEY, 2002), sendo esse efeito também dose-dependente (KAMERLING et al., 1988). A interação desses fármacos com os adrenocetores α_2 , quando aplicados sistemicamente ou intratecalmente, parece ser de fundamental importância no desenvolvimento da

ação antinociceptiva em animais (GUNELI et al., 2007); contudo, ainda não está bem estabelecida de que forma os receptores periféricos α_2 -adrenérgicos participam no processo de antinocicepção (ULGER et al., 2009). Para esses autores, supracitados, o mecanismo pelos quais esses fármacos causariam analgesia, quando aplicados por via sistêmica, pode envolver os receptores adrenérgicos espinhais e supraespinhais.

Paddleford (2001) relata que a ativação dos receptores α_2 -adrenérgicos compartilha os mesmos mecanismos de ação dos receptores opioides μ . Dessa forma, ao serem estimulados, causam, por meio das proteínas G das membranas, hiperpolarização, pela maior perda de potássio intracelular. Esses efeitos também foram relatados em ratos (ÖZDOGAN et al., 2006), sendo o corno dorsal da medula espinhal o local de maior interação entre esses dois mecanismos. Esses agentes podem ainda ativar a via analgésica noradrenérgica descendente, que se origina nos núcleos da formação reticular pontina (OTERO, 2005), interferindo, dessa forma, na liberação da substância P, inibindo os nociceptores espinhais (VALVERDE; GUNKEL, 2005).

A clonidina é o α_2 -adrenérgico de maior aplicação em medicina humana, como adjuvante analgésico pré-anestésico, analgesia pós-operatória e em pediatria (CHEN et al., 2011).

A capacidade dos α_2 -adrenérgicos de potencializar a ação analgésica dos opioides - com possibilidade de redução da dose desses últimos - é uma grande vantagem da associação pré-anestésica (CARVALHO; LEMÔNICA, 1998).

A dexmedetomidina, agonista altamente seletivo de α_2 -adrenoceptor, é utilizada como adjuvante na anestesia geral em crianças e analgesia pós-operatória. Em contraste com outros agentes anestésicos, a dexmedetomidina

preserva a ventilação espontânea (SHUKRY; KENNEDY, 2007). A atividade neuroprotetora da dexmedetomidina (PARIS et al., 2006) sugere que agonistas α_2 -adrenoceptores podem ser usados em várias situações perioperatórias. A fadolmidina, conhecida como MPV-2426, outro agonista α_2 -adrenoceptor, foi desenvolvida para terapia de dor para administração espinal (PERTOVAARA, 2004; LEINO et al., 2009). A fadolmidina apresenta atividade antinociceptiva semelhante à dexmedetomidina após administração intratecal, porém com a propriedade de não atravessar a barreira hematoencefálica, resultando em poucos efeitos adversos como a sedação e a hipotensão (XU et al., 2000). Portanto, devido à confirmação dos seus efeitos analgésicos, estimula-se a expansão de estudos sobre seu uso (NIEMI et al., 2005; ANSAH; PERTOVAARA, 2007).

A ação antinociceptiva da xilazina é atribuída ao seu efeito agonista em α_2 -receptores e ainda por um mecanismo indireto que envolve a participação de células imunes que contém peptídeos opioides, as β -endorfinas (BREAZILE, 1987), que, subsequentemente, produzem analgesia pela via opioide (ROMERO et al., 2009). Outro mecanismo de ação antinociceptiva atribuído à xilazina envolve a ativação da via arginina/óxido nítrico (NO)/ monofosfato cíclico de guanosina (GMPc) (ROMERO; DUARTE, 2009).

A clonidina, um agonista α_2 -adrenérgico usada clinicamente como anti-hipertensivo, apresenta diversas propriedades farmacológicas devido ao seu efeito no SNC (sedação, midríase, xerostomia, efeito anticonvulsivante e aumento da secreção hormonal). Em adição, este fármaco apresenta forte atividade antinociceptiva, apresentando papel importante na clínica médica utilizada na anestesia e terapia de dor (SIERRALTA et al., 1996).

Os agonistas α_{2A} -adrenérgicos são importantes adjuvantes no controle da dor neuropática e dor resistente à morfina. O uso associado requer doses menores de cada componente e pode reduzir os efeitos adversos da morfina e dos agonistas α_{2A} -adrenoceptores (SUDO et al, 2010).

A atividade antinociceptiva do composto PT-31 GIRSUPAN e da morfina foi avaliada através do teste da placa quente para avaliar as respostas supra espinhais. A potência e a intensidade da atividade antinociceptiva do PT-31 GIRSUPAN foram menores do que a morfina, mas apresentaram efeito analgésico sinérgico quando administrados sistematicamente, segundo análise isobolográfica descrita por Tallarida (2006).

O mecanismo de ação do novo composto foi investigado com uso de antagonistas de α_2 -adrenoceptores. A iombina (10 mg/kg), um antagonista inespecífico para α_2 -adrenoceptores, ARC 239 (10 mg/kg), antagonista seletivo α_{2B} e α_{2C} -adrenérgicos (BYLUND et al., 1994), e BRL 44408 (10 mg/kg), antagonista seletivo α_{2A} -adrenérgico (UHLÉN; WIKBERG, 1991) foram injetados, pela via i.p., 10 minutos antes da administração do PT-31 GIRSUPAN e isoladamente para elucidar o subtipo de α_2 -adrenérgico envolvido na atividade do composto. Como resultados apresentados por Sudo e colaboradores (2010), a iombina isolada não apresentou atividade antinociceptiva, mas foi capaz de bloquear o efeito do PT-31 GIRSUPAN, confirmando a interação com α_2 -adrenoceptores. Em relação à seletividade aos subtipos α_2 -adrenérgicos, o antagonista BRL 44408 foi o único a modificar o efeito antinociceptivo do novo composto, produzindo efeito analgésico assim como a clonidina e a dexmedetomidina (MILLAN, 1992; LAKHANI et al., 1997).

Os α_{2A} -adrenérgicos atuam como adjuvantes no controle da dor neuropática e nas dores resistentes à morfina. Ativam o caminho noradrenérgico inibitório descendente (MIRANDA; PINARDI, 2004) e a associação desses dois compostos requer doses inferiores de ambos, reduzindo os efeitos adversos causados pela morfina (sonolência e náuseas) e pelos α_{2A} -adrenérgicos (hipotensão e bradicardia) (LINK et al., 1996; MACMILLAN et al., 1996).

2.2 Estudos pré-clínicos no desenvolvimento de fármacos

2.2.1 Propriedades físico-químicas

Apesar do aumento nos custos em investigações e desenvolvimento de novos fármacos, o lançamento de medicamentos tem diminuído. Apenas 11% dos compostos que se encontram na fase de desenvolvimento clínico alcançam o mercado (LEESON; DAVIS, 2004).

As características físico-químicas do composto exercem grande influência nos parâmetros farmacocinéticos. Propriedades biofarmacêuticas inapropriadas, como baixa solubilidade aquosa, resultam em baixa absorção oral e biodisponibilidade reduzida, e também influenciam no volume de distribuição e clearance. Além disso, compostos com maior lipofilicidade, em geral, sofrem maior biotransformação, podendo gerar metabólitos de alta toxicidade e consequente ineficácia terapêutica, fato que inviabiliza a continuidade do desenvolvimento do novo fármaco (WATERBEEMD; GIFFORD, 2003; HENCHOZ et al., 2009; AMORE et al., 2010; LEESON, 2012).

2.2.1.1 Solubilidade

A solubilidade aquosa e oleosa de uma substância é uma propriedade fundamental que deve ser avaliada no início do desenvolvimento. A falta de solubilidade pode afetar a capacidade desses compostos alcançar concentrações eficazes. Esta característica também pode afetar a formulação de escolha para o composto (CHEN et al., 2006).

A taxa de dissolução, solubilidade e permeabilidade são os três fatores principais que influenciam na absorção do fármaco. Após a administração oral (AMIDON et al., 1995), se a taxa de dissolução é o passo limitante da velocidade na absorção do fármaco, qualquer fator que a afete terá um impacto sobre a biodisponibilidade (TONG, 2008). Esta taxa é principalmente influenciada pela solubilidade do fármaco, que depende de suas propriedades físico-químicas (AMIDON et al., 1995; GOOLE et al., 2010).

A absorção a partir do trato gastrointestinal é dependente do fármaco estar disponível na forma de solução nos locais de absorção. A solubilidade do fármaco não é somente uma função das suas propriedades físico-químicas, como a cristalinidade e a lipofilicidade, mas também depende do meio no qual ele deve dissolver. No trato gastrointestinal, os tensoativos, pH, a capacidade de tamponamento e componentes alimentares apresentam um papel determinante na solubilidade do composto (DRESSMAN et al., 2008).

O primeiro passo no processo de absorção oral da forma sólida do fármaco é a desintegração do comprimido ou da cápsula, seguida pela dissolução do composto ativo. A baixa solubilidade em água é prejudicial para uma adequada e completa absorção oral, e assim, a avaliação inicial desta

propriedade é de grande importância na descoberta de novos fármacos (WATERBEEND; GIFFORD, 2003).

A constante de ionização também pode afetar a solubilidade, a lipofilicidade, a permeabilidade e a absorção de um composto, as abordagens têm sido desenvolvidas para a medição rápida de valores de pKa de fármacos moderadamente solúveis. Métodos rápidos e robustos como a turbidimetria e a nefelometria têm sido desenvolvidos para determinar, de forma eficiente, a solubilidade de um grande número de compostos (WATERBEEND; GIFFORD, 2003).

Amidon et al. (1995) descreveram os critérios de alta e baixa solubilidade, os quais foram incorporados aos Guias Regulatorios - “Food and Drug Administration” (FDA) e “European Medicines Agency”. O critério para a alta solubilidade consiste em que a dose de saturação do fármaco deve ser solúvel em 250 mL em uma faixa de pH entre 1 – 7,5 a 37°C. Os critérios do FDA exigem que as determinações de solubilidade devam ser realizadas em água e não em um fluido intestinal, e para que os fármacos apresentem alta permeabilidade, a absorção da dose administrada deve ser superior 90% no intestino delgado (BENET et al., 2011).

A baixa solubilidade aquosa de novos compostos requer a utilização de co-solventes e excipientes para produzir formulações intravenosas adequadas, para os estudos pré-clínicos de desenvolvimento. Existem evidências na literatura que os compostos das formulações podem ter efeitos fisiológicos e físico-químicos que afetam a farmacocinética dos fármacos, através de uma variedade de efeitos sobre distribuição e eliminação. Os estudos farmacocinéticos iniciais, delineados para determinar as características

farmacocinéticas intrínsecas de um fármaco, são desejáveis para evitar qualquer alteração da farmacocinética do fármaco pelos aditivos da formulação (PIFFERI; RESTANI, 2003; NEERVANNAN, 2006; BUGGINS et al., 2007; GOOLE, et al., 2010).

Segundo Buggins et al. (2007), o dimetil sulfóxido (DMSO) tem sido extensivamente estudado na avaliação de seus efeitos sobre o metabolismo de fármacos. Este veículo tem demonstrado que é capaz de inibir CYP1A2, 2C8/9, 2C19, 2D6, 2E1 e 3A4, e arilhidrocarbono hidroxilase, em microsomas hepáticos, principalmente em doses elevadas.

Estudos realizados para avaliação dos efeitos do DMSO sobre a função renal, o veículo demonstrou elevado potencial para afetar a eliminação de fármacos, sendo capaz de causar diurese osmótica em seres humanos. No entanto, DMSO não afetou os níveis de creatinina no plasma em ratos, após a dosagem com 0,25-1 mL/kg durante 10 dias, ou em seres humanos após a dosagem com 0,9 mL/kg durante três dias (BUGGINS et al. 2007). Em 2006, Pestel et al. relataram que o DMSO, na dose de 200 mg/kg *i.v.* não afetou o volemia em ratos, mas foi capaz de causar proteinúria.

Outros estudos sugerem possíveis efeitos de DMSO na distribuição. Há relatos de que o DMSO (0,9 mL/kg) aumenta os níveis plasmáticos da α_1 -glicoproteína ácida reagente de fase aguda em ratos, demonstrando que ele tem o potencial para afetar a ligação de fármacos que se ligam às essas proteínas plasmáticas (BUGGINS et al. 2007).

2.2.1.2 Log P

O valor do coeficiente de partição (log P) é frequentemente usado em estudos estrutura-atividade (QSAR) como medida quantitativa da lipofilicidade de compostos bioativos. O valor do log P de um composto pode ser interpretado como sendo a somatória de dois termos: um relacionado com volume (estéricos) e o outro com interações intermoleculares (interações dipolo-dipolo e ligações por hidrogênio). A investigação da natureza e grandeza destes termos pode contribuir para uma compreensão do comportamento cinético de compostos candidatos a fármacos (GOODWIN et al., 2012).

O padrão-ouro para expressar a lipofilicidade é o coeficiente de partição P (logP) em um sistema octanol/água (WATERBEEMD; GIFFORD, 2003; TSAIOUN; KATES, 2011). Este parâmetro refere-se à quantidade de espécies não ionizadas distribuídas na interface octanol/água. O logP positivo infere que há mais moléculas não ionizadas no solvente octanol do que em água, sugerindo que esta espécie é mais lipofílica. Enquanto que logP negativo, ao contrário, infere que a molécula é mais hidrofílica (TSAIOUN; KATES, 2011). Em estudos de atividade biológica é bastante empregado o coeficiente de partição octanol/água, o qual informa a tendência de um determinado composto se distribuir entre as fases formadas (CHEN et al., 2006).

A lipofilicidade é um parâmetro físico-químico importante, capaz de causar grande impacto no comportamento farmacocinético (GOODWIN et al., 2012), pois influencia na permeação da membrana, ligação às proteínas plasmáticas e metabolismo. A partição do composto é dependente de seu estado de ionização, portanto, dependente do pH do meio (PANCHAGNULA; THOMAS, 2000; CHEN et al., 2006).

A abordagem pragmática para o entendimento da relação das propriedades físico-químicas e o perfil farmacocinético adequado nos casos de administração oral apresentou grandes avanços, principalmente com fármacos utilizados por essa via. Pidgeon e colaboradores (1995) demonstraram primariamente a influência do peso molecular do composto para um perfil farmacocinético adequado, seguido por Lipinski et al. (1997), o qual ampliou tais propriedades consideradas críticas que devem ser consideradas para compostos de administração oral, resultando na tão bem conhecida como a “regra dos 5” (WENLOCK et al., 2003; NEERVANNAN, 2006).

A “regra dos 5 de Lipinski” descreve como desejáveis, para um perfil farmacocinético adequado, os seguintes parâmetros: $\log P < 5$; peso molecular < 500 Da; número de ligações de hidrogênio < 5 e número de aceptores de hidrogênio < 10 . Lipinski (1997) propôs, portanto, que compostos que excederem dois ou mais parâmetros acima citados apresentam solubilidade e permeabilidade reduzidas (WATERBEEMD; GIFFORD, 2003; WENLOCK et al., 2003).

A relação entre lipofilicidade e as propriedades farmacocinéticas têm sido discutida por vários pesquisadores da área. A lipofilicidade é o parâmetro físico chave que liga a permeabilidade da membrana - e, portanto, a absorção do fármaco e da distribuição - com a via de depuração (metabólica ou renal) (WATERBEEMD; GIFFORD, 2003; TSAIOUN; KATES, 2011).

O peso molecular, segundo a regra de Lipinski, não deve exceder 500 Da, pois além do aumento da cadeia pode aumentar o $\log P$, torna-se desfavorável para moléculas grandes a difusão passiva pelas membranas celulares. Vale ressaltar que o número de ligações de hidrogênio representa uma barreira para

a absorção do composto uma vez que ligações de hidrogênio precisam ser quebradas com o solvente aquoso para que esse possa interagir com as membranas celulares e para que seja absorvido em etapas seguintes, assim como os receptores de ligação de hidrogênio. Dessa forma, essas informações sugerem que as propriedades físico-químicas estão intimamente relacionadas ao controle fisiológico (TSAIOUN; KATES, 2011).

Compostos altamente lipofílicos ($\log P > 5$) apresentam alta potência, porém tornam-se vulneráveis ao metabolismo aumentando o CI hepático, pois essas moléculas apresentam sítios ativos lipofílicos que permitem a ação das enzimas do citocromo P450. Além disso, esses compostos apresentam baixa solubilidade, absorção oral errática e alta afinidade às proteínas plasmáticas, proporcionando o bioacúmulo. Compostos com lipofilicidade moderada ($\log P$ entre 0 e 3) apresentam balanço entre a solubilidade e a permeabilidade, melhora na absorção oral, apresentam maior permeabilidade pelas membranas celulares, permitindo a passagem pela barreira hematoencefálica (BHE) e, geralmente, metabolismo hepático reduzido. Já os compostos hidrofílicos ($\log P < 0$) apresentam ótima solubilidade em água, porém baixa permeabilidade pelo trato gastrointestinal (TGI) e são mais suscetíveis ao CI renal (TSAIOUN; KATES, 2011).

Assim, nos estudos preliminares com novos compostos, conhecer os requisitos da regra dos 5 de Lipinski e a estabilidade química pode auxiliar no planejamento dos estudos *in vivo* assim como na interpretação dos resultados obtidos na avaliação do perfil farmacocinético.

Para determinação do $\log P$, a técnica clássica “Shake-flask” é utilizada como referência. O composto é misturado a dois solventes imiscíveis –

geralmente água e octanol - até o alcance do equilíbrio de saturação. Após a separação das fases, o composto é quantificado em ambas. Entretanto, essa técnica despende de tempo e apresenta alta sensibilidade a impurezas, necessitando de um maior número de amostras (HENCHOZ et al., 2009).

Novas técnicas vêm sendo desenvolvidas para otimizar o processo de Shake-flask, automatizando-o através dos sistemas LC-UV e LC-MS com injeção automática. Um novo sistema de alta velocidade com amostragem automatizada foi desenvolvido para reduzir a contaminação da fase orgânica na fase aquosa com base em amostragem automatizada (HENCHOZ et al., 2009).

Em relação aos compostos ionizáveis, pode-se utilizar a dupla titulação potenciométrica. Este método baseia-se no deslocamento de pKa que ocorre na presença do solvente de particionamento (octanol). A diferença entre os valores pKa, verdadeiro e aparente, indica um alto valor de logP (HENCHOZ et al., 2009).

2.2.2 Farmacocinética

O efeito biológico de um fármaco em uma proteína alvo envolve várias etapas desde a sua administração por determinada via até alcançar o efeito terapêutico. Assim, antes de alcançar o local de ação, o fármaco passa por uma cadeia de eventos resultante da sua interação com o organismo, o que determina o seu perfil de movimento através desse organismo. Essa cadeia compreende quatro processos fundamentais: a absorção (quando a administração do fármaco é por via extravascular); a distribuição (que compreende sua ligação às proteínas plasmáticas e teciduais e sua penetração nos diferentes locais do organismo); a biotransformação, ou metabolismo, na

qual a molécula original é convertida ao seu metabólito e a excreção, caracterizada pela retirada definitiva do fármaco do organismo (HUISINGA et al., 2006). A introdução direta do fármaco na circulação sanguínea (administração intravenosa ou intra-arterial) e o processo de absorção favorecem a concentração plasmática do composto, enquanto a distribuição para os tecidos, o metabolismo e a excreção desfavorecem essa concentração. Este fato, aliado a simultaneidade de ocorrência dos processos, determina as oscilações das concentrações plasmáticas no decorrer do tempo após a administração (BANKER; RHODES, 2002).

A farmacocinética é o estudo da relação entre o tempo e a concentração do fármaco, e seus metabólitos ativos, no organismo. A compreensão do processo farmacocinético requer o conhecimento de princípios fundamentais em cinética química, fisiologia e bioquímica (TOZER, 1981; WINTER, 2004). Através do uso de equações matemáticas é possível quantificar o movimento do fármaco no organismo ao longo do tempo. Essa quantificação é ferramenta fundamental para a construção ou adequação de regimes posológicos em situações clínicas relevantes como, por exemplo, a ocorrência de níveis plasmáticos inadequados - elevados ou insuficientes - consequentes de peculiaridades fisiológicas em determinado paciente (LIN; LU, 1997; WINTER, 2004).

Os parâmetros farmacocinéticos de aplicação clínica direta são a meia-vida ($t_{1/2}$), o volume de distribuição (Vd), o clearance (Cl) e a biodisponibilidade (F); e esses parâmetros possuem relações diretas ou indiretas com os processos fisiológicos e com um ou mais processos farmacocinéticos (LIN; LU, 1997; BOROUJERDI, 2002; WINTER, 2004).

A absorção pode ser definida como a passagem do fármaco do meio externo ao organismo para o sangue, que o conduzirá aos diferentes tecidos e órgãos. Para que esse processo ocorra é necessário que o fármaco atravesse as membranas biológicas sob influência das características físico-químicas de ambos (LIN; LU, 1997; URSO et al., 2002; WINTER, 2004).

O processo de absorção pode ser avaliado por quatro parâmetros farmacocinéticos obtidos através da construção de uma curva de concentração plasmática *versus* tempo: k_a (constante de absorção), C_{max} (concentração plasmática máxima), t_{max} (tempo de ocorrência da concentração plasmática máxima), ASC (área sob a curva) e biodisponibilidade (F), que representa a quantidade disponível no organismo após a administração de determinada dose do fármaco por determinada via (LIN; LU, 1997; BOROJERDI, 2002).

Uma vez ocorrida a absorção ou introdução direta do fármaco na circulação sanguínea, o fármaco está disponível para ligar-se às proteínas plasmáticas e para ultrapassar o endotélio vascular e, assim, atingir tecidos e órgãos (WINTER, 2004). A porcentagem de ligação às proteínas plasmáticas é função das características físico-químicas do composto, que lhe confere afinidade peculiar. Uma grande porcentagem de ligação plasmática tem como consequência uma menor distribuição aos tecidos e órgãos, embora exista um equilíbrio dinâmico entre a fração ligada às proteínas e livre no plasma com a fração livre no tecido/órgãos e ligada às proteínas teciduais (KWON, 2002).

A velocidade de distribuição sofre interferência de alguns fatores fisiológicos como fluxo sanguíneo - e assim, depende do débito cardíaco - e características das membranas, que apresentam diferentes perfis de

composição e espessura dependendo da região do organismo (LIN; LU, 1997; TOUTAIN; BOUSQUET-MÉLON, 2004c; WINTER, 2004).

O processo de distribuição de um fármaco pode ser quantificado através do parâmetro volume de distribuição (Vd) que descreve a relação entre a quantidade do fármaco existente em todo o organismo e a quantidade existente no plasma, e conceitualmente se define como o volume no qual o fármaco está contido em concentrações que estão em equilíbrio com aquelas presentes no plasma (TOUTAIN; BOUSQUET-MÉLON, 2004c; WINTER, 2004).

O volume de distribuição corresponde à relação - ou constante de proporcionalidade - entre uma quantidade do fármaco administrada no organismo num dado momento e a concentração plasmática nesse momento (TOUTAIN; BOUSQUET-MÉLON, 2004c; RUIZ-GARCIA et al., 2008).

A equação conceitual de Vd está descrita a seguir:

Equação 1
$$Vd = dose/Cp$$

Em que: Cp é a concentração plasmática após a administração do fármaco.

No entanto, após a administração, a concentração plasmática apresenta oscilações em decorrência do movimento constante do fármaco no organismo. Dessa forma, a medida das concentrações plasmáticas em diferentes momentos - imediatamente após administração intravenosa, durante a fase de distribuição e durante a fase de eliminação ou no equilíbrio - proporciona a determinação de diferentes tipos de volume de distribuição, de acordo com a fase da disposição

do fármaco em que houve a quantificação da concentração plasmática (LIN; LU, 1997; TOUTAIN; BOUSQUET-MÉLON, 2004c).

Quando se determina o volume de distribuição através da concentração plasmática no tempo zero (imediatamente após a administração intravenosa) determina-se o Vd_c , volume de distribuição inicial ou central. Quando a determinação do volume de distribuição envolve a concentração plasmática no estado de equilíbrio – a concentração é constante – determina-se Vd_{ss} , volume de distribuição no estado de equilíbrio. Quando a determinação do volume de distribuição é realizada na fase de pseudoequilíbrio determina-se o $Vd_{\text{área}}$ (TOUTAIN; BOUSQUET-MÉLON, 2004c).

Em termos práticos pode-se considerar que quando a determinação do volume de distribuição é baseada na concentração plasmática que ocorre no tempo zero após administração intravenosa tem-se Vd_c . Após uma administração intravenosa instantânea do fármaco – e somente nessa situação - a concentração plasmática é máxima no tempo zero (Cp_0), antes que ocorra qualquer processo de distribuição ou eliminação. Assim, o volume inicial de distribuição (Vd_c) pode ser calculado a partir da equação 2 (TOUTAIN; BOUSQUET-MÉLON, 2004c):

Equação 2

$$Vd_c = \text{dose}/Cp_0$$

Essa equação assume que a Cp_0 corresponde à concentração plasmática inicial resultante da homogeneização do fármaco administrado no organismo antes que ocorra qualquer processo de eliminação, o que é uma situação absolutamente teórica. Cp_0 é estimada por extrapolação ao tempo zero a partir

da curva de concentração plasmática *versus* tempo (TOUTAIN; BOUSQUET-MÉLON, 2004c).

Quando o cálculo do volume de distribuição é realizado a partir da concentração plasmática que ocorre no estado de equilíbrio ($C_{p_{ss}}$), após infusão contínua, tem-se $V_{d_{ss}}$. Esta é a situação ideal para a determinação do volume de distribuição, pois ao atingir $C_{p_{ss}}$ considera-se que o fármaco atingiu amplamente os locais de distribuição em concentrações de saturação. No entanto esse tipo de administração nem sempre é viável para qualquer fármaco e, assim, este tipo de volume de distribuição dificilmente é determinado em estudos pré-clínicos ou clínicos (TOUTAIN; BOUSQUET-MÉLON, 2004c).

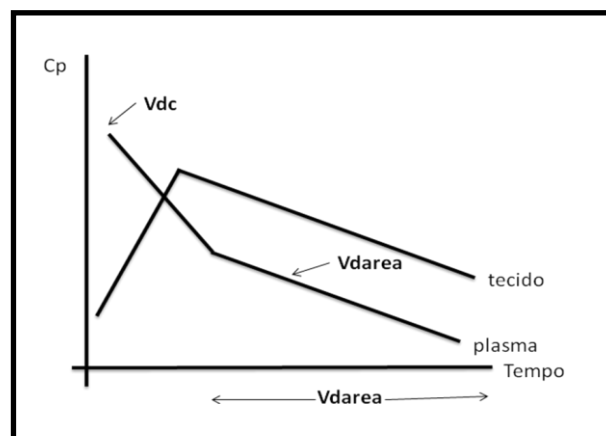
Em geral o volume de distribuição é determinado no estado de pseudoequilíbrio. É possível compreender este parâmetro fazendo as seguintes considerações: para a maioria dos fármacos a distribuição no organismo não ocorre instantaneamente e a partir da administração – no tempo zero - a concentração plasmática sofre decaimento não somente porque ocorre a eliminação, mas também porque o processo de distribuição aos tecidos e órgãos está em andamento. Assim, durante a fase de distribuição, o V_d pode ser visto como um parâmetro tempo-dependente, que se expande a partir do V_{d_c} imediatamente após a administração iv bolus até atingir um valor máximo. Portanto, de acordo com a definição de V_d (Equação 2), este último vai aumentando progressivamente até atingir um valor assintótico de pseudoequilíbrio (TOUTAIN; BOUSQUET-MÉLON, 2004c).

Para calcular o V_d no estado de pseudoequilíbrio utiliza-se toda a curva de concentração plasmática *versus* tempo, utilizando a relação entre a dose administrada, as concentrações plasmáticas temporais e a velocidade de

disposição do fármaco. Para relacionar esses três elementos utiliza-se a área sob a curva (ASC), e por isso o V_d no estado de pseudoequilíbrio é denominado de $V_{d\text{área}}$ (TOUTAIN; BOUSQUET-MÉLON, 2004c).

Na figura 2 estão representados os diferentes tipos de V_d .

Figura 2: Diferentes volumes de distribuição (V_{d_c} e $V_{d\text{área}}$) relacionados com a fase da disposição do fármaco no momento da quantificação da concentração plasmática.



A principal aplicação clínica do V_d é o cálculo da dose de ataque para atingir a concentração plasmática alvo imediatamente, que será mantida pelo regime de manutenção. Ainda, o valor de V_d é útil para o cálculo de concentrações plasmáticas máximas e mínimas nos regimes de doses múltiplas (BJORNSSON, 1997).

O processo de eliminação de um fármaco compreende as etapas de biotransformação e excreção. A esse processo relacionam-se os parâmetros clearance (Cl), constante de eliminação (k_{el}) e meia vida de eliminação ($t_{1/2}$) (KWON, 2002; RUIZ-GARCIA et al., 2008).

A biotransformação é o processo no qual o fármaco é convertido a estruturas moleculares diferentes, em geral de maior hidrossolubilidade e mediado por enzimas. Essas estruturas moleculares – metabólitos – podem ser dotados de atividade farmacológica, ser inativos ou possuir toxicidade peculiar. Os metabólitos podem, por sua vez, também sofrer biotransformação sequencial para originar outras estruturas. Entre as reações mais comuns da biotransformação de fármacos estão a oxidação, a redução, a hidrólise e a conjugação. As reações de oxidação, de redução e de hidrólise são classificadas como de fase I, as de conjugação como de fase II do processo de biotransformação (LIN; LU, 1997; WINTER, 2004).

Ao tecido hepático tem sido atribuída a maior e, em alguns casos, a única região de biotransformação de fármacos; ocasionalmente o fármaco é biotransformado em outros tecidos como nos rins, na pele, nos pulmões, no sangue e trato gastrointestinal (WATERBEEMD; GIFFORD, 2003; WINTER, 2004).

O sistema enzimático de maior participação nesse processo é o sistema de enzimas microssomais que pertencem à superfamília de enzimas do citocromo P450 (CYP450) (WINTER, 2004). Além dessas, uma série de enzimas não microssomais como a monoaminoxidase (MAO), de origem mitocondrial, e esterases solúveis presentes no plasma também possuem importante ação na biotransformação (WATERBEEMD; GIFFORD, 2003).

O complexo enzimático CYP450, presente em maior quantidade e variabilidade no tecido hepático, pode também ser encontrado nos pulmões, nos rins, na bexiga e em outros órgãos em menor quantidade. O CYP450 apresenta várias isoformas, que são formas múltiplas de uma mesma enzima que

catalisam o mesmo tipo de reação com afinidades diferentes frente aos substratos. Além disso, as isoformas diferem na sua distribuição pelo organismo e na modulação de sua atividade, apresentando diferentes inibidores, indutores e fármacos marcadores (WINTER, 2004). O polimorfismo do CYP450 pode ter consequências sobre o perfil cinético de grande número de fármacos, levando à diferenças de respostas após a administração. Assim, determinação do fenótipo metabolizador, em muitos casos, pode auxiliar no ajuste de regimes posológicos (WATERBEEMD; GIFFORD, 2003).

Quando administrados pela via oral, os fármacos atingem a veia porta, que então penetra pelo tecido hepático expondo a dose administrada aos sistemas enzimáticos antes da chegada à circulação sistêmica. Se o fármaco sofre rápida e considerável biotransformação nessa primeira passagem pelo tecido hepático, somente pequena fração da dose administrada alcançará a circulação sistêmica (metabolização pré-sistêmica), com consequente baixa biodisponibilidade (WINTER, 2004; RUIZ-GARCIA et al., 2008).

A excreção é a passagem do fármaco da circulação sanguínea para o meio externo, sendo os rins as principais vias de excreção dessas substâncias. Os mecanismos envolvidos na excreção renal são filtração glomerular, a secreção tubular ativa e a difusão passiva; sendo os dois primeiros os mais efetivos (LIN; LU, 1997; WINTER, 2004; FUCHS; HEWITT, 2011).

Para maioria dos fármacos utilizados na terapêutica, a biotransformação é um processo essencial para a sua inativação e excreção renal. Apenas uma pequena parte das substâncias é eliminada do organismo de forma inalterada, alguns fármacos são excretados via bile e substâncias voláteis são excretadas

pelos pulmões (KWON, 2002; WATERBEEMD; GIFFORD, 2003; RUIZ-GARCIA et al., 2008).

Na presença de insuficiência renal, fármacos e metabólitos ativos excretados fundamentalmente pelos rins podem acumular-se, alterando-se os parâmetros farmacocinéticos relacionados ao processo de eliminação como a constante de eliminação (K_{el}) e o clearance (Cl), com consequências sobre a meia vida do fármaco (WINTER, 2004; FUCHS; HEWITT, 2011).

O clearance plasmático é um termo usado para indicar a remoção de determinada concentração de um composto contido em um volume específico de sangue na unidade de tempo. O clearance é expresso em volume por unidade de tempo (mL/min ou L/h), e compreende todos os processos que resultem na eliminação do fármaco do organismo. Assim, a biotransformação hepática somada à excreção renal de um determinado fármaco levam ao que se chama de depuração sistêmica total, ou clearance total (Cl), de acordo com a equação a seguir (LIN; LU, 1997; WINTER, 2004).

Equação 3
$$Cl_{Total} = Cl_{renal} + Cl_{hepático} + Cl_{outros}^*$$

**refere-se a outras vias de excreção*

Quando o fármaco é parcial ou totalmente excretado pelos rins de forma inalterada, o clearance renal pode ser calculado dividindo-se a velocidade de excreção urinária (mg/min) pela sua concentração sanguínea (mg/mL) (TOUTAIN; BOUSQUET-MÉLON, 2004a).

O clearance não é o parâmetro mais relatado nas publicações científicas, mas é um dos mais importantes, devido à sua influência tanto na quantidade a

ser administrada quanto na frequência (TOUTAIN; BOUSQUET-MÉLON, 2004a).

Utilizando o parâmetro clearance pode-se determinar a concentração plasmática média no estado de equilíbrio da 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; BOUSQUET-MÉLON, 2004a; WINTER, 2004).

A constante de eliminação é um dos parâmetros farmacocinéticos que expressa a velocidade com que ocorre este processo e está relacionado à meia vida de eliminação. A relação entre meia vida de eliminação e a constante de eliminação é 0,693, o logaritmo natural de 2. Esta relação baseia-se no fato de que as concentrações do fármaco no organismo relacionam-se exponencialmente com o tempo (LIN; LU, 1997; WINTER, 2004).

$$\text{Então,} \quad t_{1/2} = \ln 2 / k_{el} \quad \text{(Equação 4)}$$

Em que: $t_{1/2}$ é a meia vida de eliminação e k_{el} é a constante de eliminação.

A constante de eliminação, em uma análise farmacocinética, 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. A equação abaixo demonstra, de forma simplificada, o cálculo básico para a constante de eliminação (KWON, 2002; WINTER, 2004).

Equação 5

$$k_{el} = (\ln C_{p1} - \ln C_{p2}) / (t_2 - t_1)$$

A meia vida ($t_{1/2}$) de eliminação é um parâmetro híbrido, dependente do clearance e do volume de distribuição, e representa o tempo necessário para que a concentração plasmática do fármaco decline para a metade (ATHANI et al., 1990; TOUTAIN; BOUSQUET-MÉLON, 2004b).

O parâmetro $t_{1/2}$ é útil para selecionar o intervalo de dose de um regime posológico, para prever o grau de flutuação da concentração plasmática durante o intervalo de dose, prever quanto tempo será necessário para atingir-se o estado de equilíbrio, e para prever quanto tempo será necessário para que uma dada concentração decline à outra concentração específica uma vez que não seja administrada nova dose (LIN; LU, 1997; TOUTAIN; BOUSQUET-MÉLON, 2004b; WINTER, 2004).

O cálculo dos parâmetros farmacocinéticos pode ser realizado por diferentes abordagens, através da utilização de modelos não compartimentais, modelos compartimentais e modelos fisiológicos (KWON, 2002).

Na abordagem não compartimental os parâmetros farmacocinéticos, como Cl sistêmico, $V_{d\text{área}}$, tempo de residência média (MRT) e biodisponibilidade são estimados com base na área sob a curva (ASC) e na fase de eliminação e, devido à sua versatilidade e robustez, é o primeiro método de análise farmacocinética utilizado pela indústria farmacêutica (KWON, 2002).

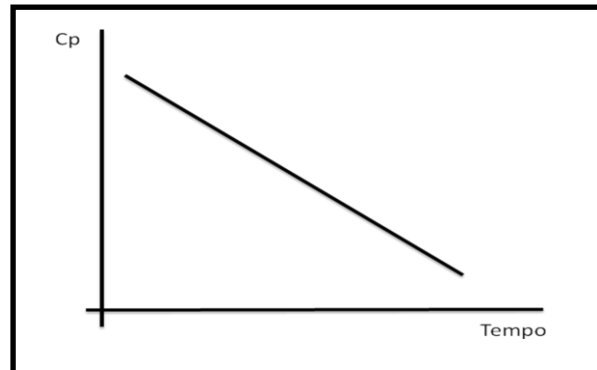
Os modelos compartimentais abordam o movimento do fármaco considerando que o organismo compreende um ou mais compartimentos que podem receber o fármaco com diferentes velocidades e, em algum compartimento está localizado o sítio alvo para o efeito farmacológico. Os

modelos mais utilizados são o de compartimento único – monocompartimental – e o de dois compartimentos, ou bicompartimental (TANG et al., 2011).

O modelo compartimental utilizado em análise farmacocinética é função dos resultados experimentais da disposição do fármaco no organismo e depende da existência de uma ou mais velocidades de decaimento das concentrações plasmáticas ao longo do tempo após a administração (KWON, 2002; TANG et al., 2011).

O fármaco pode apresentar perfil cinético com declínio de concentrações monofásico, o que representa que o organismo pode ser considerado compartimento único (modelo monocompartimental) (Figura 3).

Figura 3: Perfil farmacocinético com apenas uma velocidade de decaimento. Modelo monocompartimental.



A equação que expressa o movimento do fármaco no organismo no modelo monocompartimental após administração intravenosa está descrita a seguir:

Equação 6

$$C_p = C_{p_0} \times e^{-k_{el} \cdot t}$$

Em que: C_p é a concentração plasmática que pode ser calculada para qualquer tempo; C_{p_0} é a concentração extrapolada ao tempo zero; k_{el} é a constante de eliminação e t o tempo.

Na administração extravascular de fármacos, mesmo que ocorra decaimento monofásico das concentrações plasmáticas, a equação para cálculo das concentrações em qualquer momento deve considerar a fase de absorção, que é um processo que se contrapõe à eliminação. A equação de modelo monocompartimental com cinética de absorção está representada a seguir (KWON, 2002).

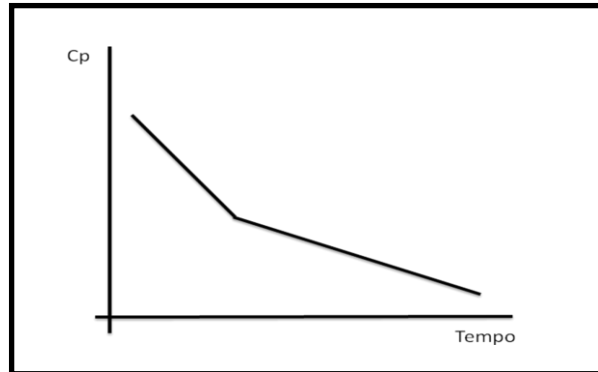
Equação 7

$$C_p = \frac{\text{dose} \times F \times k_a (e^{-k_{el}.t} - e^{-k_a.t})}{V_d \times (k_a - k_{el})}$$

Em que: C_p é a concentração plasmática que pode ser calculada para qualquer tempo; F é a biodisponibilidade do fármaco para aquela via de administração; k_{el} é a constante de eliminação; k_a é a constante de absorção; V_d é o volume de distribuição e t , o tempo.

Quando há duas velocidades de decaimento das concentrações plasmáticas ao longo do tempo, assume-se que a velocidade de distribuição para alguns órgãos e tecidos é menor do que para outros. Neste caso têm-se um compartimento central – que recebe o fármaco rapidamente - e um periférico. Neste último modelo, o perfil da curva C_p x tempo exhibe um declínio bifásico (Figura 4) (TANG et al., 2011).

Figura 4: Perfil farmacocinético com duas velocidades de decaimento. Modelo bicompartimental.



No modelo bicompartimental parâmetros como a constante de distribuição ($K\alpha$ ou α) e as microconstantes de transferência do fármaco entre os compartimentos central e o periférico podem ser calculados (TANG et al., 2011).

A equação que expressa o movimento do fármaco no organismo no modelo bicompartimental após administração intravenosa está descrita a seguir:

Equação 8
$$C_p = A \times e^{-\alpha \cdot t} + B \times e^{-\beta \cdot t}$$

Em que: C_p é a concentração plasmática que pode ser calculada para qualquer tempo; A é o valor da concentração no tempo zero a partir da extrapolação da reta na fase de distribuição; α é a constante de distribuição; B é o valor da concentração no tempo zero a partir da extrapolação da reta na fase de eliminação; β é a constante de eliminação e t o tempo.

O declínio inicial da curva, no modelo bicompartimental 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 ocorrem simultaneamente. A segunda velocidade de decaimento, denominada de fase de eliminação, fase terminal ou fase β , caracteriza-se pela redução mais lenta das concentrações plasmáticas que está relacionada apenas à eliminação do fármaco (KWON, 2002).

A mudança de velocidade de decaimento, nesse modelo, ocorre no momento em que ocorre saturação do compartimento periférico e o estado de equilíbrio entre compartimento central e periférico é atingido (t_{ss} – tempo em que ocorre o estado de equilíbrio). O t_{ss} pode ser calculado a partir da equação descrita a seguir:

Equação 9 $t_{ss} = \frac{\ln \alpha/\beta}{(\alpha-\beta)}$

Em que: t_{ss} é o tempo de ocorrência do estado de equilíbrio entre os compartimentos central e periférico; \ln é o logaritmo natural; α é a constante de distribuição e β é a constante de eliminação.

O cálculo de t_{ss} pode ser particularmente útil para prever o tempo de ocorrência do efeito máximo de um fármaco quando o seu sítio de ação pertence ao compartimento periférico (KWON, 2002).

Na administração extravascular de fármacos, mesmo que ocorra decaimento bifásico das concentrações plasmáticas, a equação para cálculo das concentrações em qualquer momento deve considerar a fase de absorção, que é um processo que se contrapõe à eliminação. A equação de modelo bicompartimental com cinética de absorção está representada pela equação 10.

Equação 10 $C_p = A \times e^{-\alpha.t} + B \times e^{-\beta.t} - G \times e^{-k_a.t}$

Em que: C_p é a concentração plasmática que pode ser calculada para qualquer tempo; A é o valor da concentração no tempo zero a partir da extrapolação da reta na fase de distribuição; α é a constante de distribuição; B é o valor da concentração no tempo zero a partir da extrapolação da reta na fase de eliminação; β é a constante de eliminação; G é a somatória de A e B ; K_a é a constante de absorção e t , o tempo.

As estimativas de A , B , α e β podem ser obtidas através dos interceptos e slopes a partir da plotagem da curva C_p *versus* tempo. Tais parâmetros podem ser utilizados para estimar C_{p0} , V_{d_c} e as microconstantes K_{12} , K_{21} e K_{10} (KWON, 2002).

A concentração teórica no tempo zero (C_{p0}) corresponde a somatória de A e B :

$$C_p(0) = A + B \quad \text{(Equação 11)}$$

Então, $V_c = \text{Div}/C_p(0)$ **(Equação 12)**

Conforme relatado anteriormente, é possível calcular, no modelo bicompartimental, as microconstantes K_{12} , K_{21} e K_{10} ; sendo que K_{12} se refere à constante relacionada à passagem do fármaco do compartimento central para o periférico, K_{21} se refere à constante relacionada à passagem do fármaco do compartimento periférico para o central, e K_{10} à eliminação do fármaco a partir do compartimento central (KWON, 2002).

As relações existentes entre as microconstantes K_{12} , K_{21} e K_{10} e os valores de A , B , α e β estão descritas nas equações 13, 14 e 15:

Equação 13
$$K_{21} = (A\beta + B\alpha)/(A+B)$$

Equação 14
$$K_{10} = \alpha\beta/K_{21}$$

Equação 15
$$K_{12} = \alpha + \beta - K_{21} - K_{10}$$

A determinação dos parâmetros Cl e Vd pode ser realizada através de relações encontradas entre concentração plasmática e tempo por equações modelo independentes, descritas nas equações 16 e 17.

Equação 16
$$Cl = (Dose \times F)/ASC$$

e

Equação 17
$$Vd_{\text{área}} = Cl/kel \text{ ou } \beta$$

2.2.3 Toxicidade

Os efeitos tóxicos, assim como um perfil farmacocinético, incompatíveis com o uso clínico, são as principais causas de falhas no desenvolvimento de novos fármacos, portanto, torna-se imprescindível que os ensaios de farmacocinética e toxicidade pré-clínica sejam realizados nos estágios iniciais do processo de desenvolvimento de fármacos (HORII, 1998; GUPTA; ATUL, 2000; WATERBEEMD; GIFFORD, 2003).

Devido às restrições éticas sobre a realização de estudos de toxicidade em humanos, a avaliação de segurança tem sido estudada em animais de laboratório, embora extrapolação de avaliação de risco de animais para humanos é ainda considerada desafiadora (GUPTA; ATUL, 2000).

A atividade de várias enzimas metabolizadoras de fármacos, como citocromo P450, glutationa-S-transferase, epóxido hidrolase e várias outras enzimas - presentes no fígado e outros tecidos extra-hepáticos – sofre influência de fatores ambientais, como os poluentes, os solventes industriais, a idade e até mesmo o sexo dos animais (GUPTA; ATUL, 2000). Outro ponto importante, é que os estudos toxicológicos requerem veículos desprovidos de efeitos adversos para que não haja interpretação equívoca de efeitos do composto ou de seus metabólitos (NEERVANNAN, 2006).

Os parâmetros bioquímicos que serão avaliados neste estudo são ferramentas amplamente utilizadas para determinar a toxicidade de produtos em modelos animais, procurando estabelecer relações entre a exposição e o efeito. Estas avaliações podem ser extrapoladas ao homem, desde que feitas as considerações adequadas interespécies.

A biotransformação de fármacos pode resultar na formação de metabólitos reativos capazes de produzir danos celulares, e tem sido considerada como um importante processo da patogênese de algumas formas de hepatotoxicidade (GUPTA; ATUL, 2000).

As reações de Fase I ocorrem principalmente no retículo endoplasmático liso (REL) do hepatócito e são mediadas pelo complexo enzimático CYP450.

Estima-se que o CYP450 apresente de 20 a 200 isoformas, sendo as mais importantes para a biotransformação de fármacos: CYP3A4, CYP2D6, CYP2C19, CYP1A2 E CYP2E1 (DAVIES, 1998).

Em geral, a maioria dos metabólitos reativos relacionados ao desenvolvimento de danos hepáticos é originada a partir de reações de Fase I (DAVIES, 1998).

O tecido hepático, dado o conteúdo de sistemas enzimáticos presentes, é o principal sítio de biotransformação de fármacos e mais susceptível aos efeitos tóxicos desses metabólitos reativos (ZIMMERMAN; ISHAK, 1987).

A intensidade dos efeitos tóxicos depende de vários fatores, tais como velocidade de formação de metabólitos reativos e existência de mecanismos de defesa e reparação. O uso concomitante de fármacos pode levar a alterações na produção de metabólitos uma vez que ocorram interações na fase de biotransformação, e assim o efeito tóxico decorrente do uso de uma associação medicamentosa pode ser diferente daquele observado quando há administração do fármaco isoladamente (LIN; LU, 1997; GUPTA; ATUL, 2000). Idade, sexo, peso corpóreo, espécie animal, ingestão crônica de álcool e presença de hepatopatia são alguns outros fatores que podem determinar diferenças na capacidade de biotransformação de determinado fármaco, desde que o sistema enzimático envolvido, em cada circunstância, apresente características diferenciadas (HUANG et al., 2003; KUNIMOTO et al., 2003; MADDREY, 2005; MEIER et al., 2005).

As transaminases são enzimas produzidas principalmente no tecido hepático e que permanecem neste local em grande quantidade com a função de catalisar as reações de transferência de um grupo amino, presente em um

aminoácido para um alfa cetoácido, com consequente produção de outro aminoácido e outro alfa cetoácido correspondente (BURTIS; ASHWOOD, 2001).

Estas enzimas são liberadas em grande quantidade na circulação sanguínea quando ocorre destruição do hepatócito e, desta forma, a determinação da sua atividade sérica pode ser utilizada como parâmetro indireto para a avaliação de danos hepáticos (BURTIS; ASHWOOD, 2001).

Níveis elevados de ALT e AST são encontrados em quadros de necrose hepática extensa, como ocorre nas hepatites agudas A ou B, nas exposições a toxinas ou em doses elevadas de acetaminofeno. A esteatose hepática também determina elevações moderadas das transaminases no sangue; o que é comum na exposição crônica ao etanol, nos quadros de diabetes e na obesidade. Alguns medicamentos podem elevar as transaminases, tais como o ibuprofeno, diclofenaco, fenilbutazona, fenitoína, ácido valpróico, carbamazepina, fenobarbital, sulfonamidas, nitrofurantoína, sinvastatina, amiodarona, quinidina, antidepressivos tricíclicos, entre outros (BURTIS; ASHWOOD, 2001).

Para a avaliação da hepatotoxicidade em animais têm sido utilizados criterios como aparecimento de necrose tissular e inflamação intralobular do fígado no exame histopatológico e níveis séricos das transaminases três vezes superiores aos estabelecidos como referência (BAHRI et al., 1981; ATTRI et al., 2000; RAVINDEL et al., 2006) e os critérios estabelecidos pela Organização Mundial de Saúde para classificar o grau de hepatotoxicidade induzida por fármacos: grau 1 ALT - 51-125UI/L ou 1,25-2 vezes superior ao valor basal; grau 2 ALT - 126-250UI/L ou 2,6-5 vezes superior ao valor basal; grau 3 ALT - 251-500UI/L ou 5,1-10 vezes superior ao valor basal; grau 4 ALT - >500UI/L ou 10 vezes superior ao valor basal (LENAERTS et al., 2005).

A creatinina é sintetizada nos rins, fígado e pâncreas por reações mediadas enzimaticamente. É produzida endogenamente e liberada nos fluidos a uma taxa constante, mantendo-se níveis plasmáticos constantes. A excreção da creatinina é essencialmente dependente da filtração glomerular e, então, as alterações dos seus níveis plasmáticos sugerem alterações na capacidade renal para a sua excreção por este processo (BURTIS; ASHWOOD, 2001).

A ureia é um metabólito derivado do catabolismo de proteínas exógenas (dieta) e endógenas (tecidos). A taxa da síntese de ureia hepática depende da ingestão de compostos nitrogenados e catabolismo proteico endógeno e a sua excreção é essencialmente renal. A relação entre as concentrações de ureia/ creatinina é utilizada para discriminar quadros de uremia pré e pós-renal. Relações inferiores a 20 sugerem necrose tubular aguda, baixa ingestão de proteína ou disfunção hepática severa. Taxas maiores, associadas a concentrações elevadas de creatinina, sugerem obstrução pós-renal ou uremia pré-renal sobreposta à disfunção renal (BURTIS; ASHWOOD, 2001).

2.3 Sensibilização comportamental

O estudo de farmacodependência apresentou grandes avanços conceituais e científicos nas últimas décadas.

Inicialmente, a dependência de drogas foi dividida em dependência física e psíquica. A dependência física foi definida como um estado fisiológico alterado, que resulta de adaptações do organismo produzidas pela administração repetida da droga e manifesta-se pelo surgimento da síndrome de abstinência quando há interrupção abrupta do uso da droga (JAFFE, 1990).

A dependência é caracterizada por um conjunto de sintomas indicativos de que o indivíduo perdeu o controle do uso da droga e o mantém a despeito das suas consequências adversas. Na sua forma extrema a dependência caracteriza-se pelo uso compulsivo da droga. Neste contexto, a síndrome de abstinência é um dos sinais que constam dos critérios para o diagnóstico de dependência, mas sua presença não é necessária nem suficiente para diagnóstico (O'BRIEN, 2001).

Uma das características comuns das drogas que produzem dependência é o aumento gradual e progressivo da atividade locomotora observado após a administração repetida, esse fenômeno é denominado sensibilização comportamental (POST; CONTEL, 1983; ROBINSON; BECKER, 1986). A sensibilização comportamental foi descrita para a cocaína (MISERENDINO; NESTLER, 1995), anfetamina (ROBISON E BECKER, 1986; AIZENSTEIN et al., 1990; VEZINA; QUENN, 2000); morfina (KALIVAS; DUFFY, 1987; POWEL; HOLTZMAN, 2001), etanol (PHILLIPS et al., 1997), nicotina (DOMINO, 2001; SHIM et al., 2001) e delta-9-THC (CADONI et al., 2001).

Em modelos animais a sensibilização comportamental, observa-se o aumento gradual e progressivo da atividade locomotora após administração repetida de compostos com atividades psicoativas e de abuso. O aumento da atividade locomotora é decorrente de adaptações neuroquímicas e moleculares do sistema dopaminérgico mesolímbico homólogas (CONVIGTON; MICZEK, 2001; NESTLER et al., 2001; ROBINSON; BERRIDGE, 2001). Drogas de abuso tendem a aumentar a atividade locomotora, por meio de mecanismos que estão relacionados ao reforço (via da dopamina mesolímbica) (BITTENCOURT, 2000). Os anestésicos são capazes de interagir com sistema neuronais, incluindo os

sistemas GABAérgico, glicinérgico, colinérgico e glutamatérgico, podendo levar a alterações em número e/ou afinidade de receptores (MEDEIROS, 2010).

Vários trabalhos demonstram que a administração repetida de substâncias de abuso causa sensibilização à mesma e sensibilização cruzada com outras substâncias (AKIMOTO et al., 1990; HORGER et al., 1991; 1992; ROBINSON; BERRIDGE, 1993; LESSOV; PHILLIPS, 2003; MCDAID et al., 2005).

A sensibilização comportamental resulta de adaptações neuroquímicas e moleculares do sistema dopaminérgico (ROBINSON; BECKER, 1986; NESTLER et al., 2001), contudo, segundo Robinson e Berridge (1993), a sensibilização não resultaria no aumento do efeito reforçador das drogas, mas da relevância motivacional do estímulo que levaria ao uso compulsivo característico da dependência.

As respostas locomotoras para o inibidor seletivo da recaptação da dopamina (DA) (GBR-12.909) foram também sensibilizadas em ratos pré-expostos à morfina ou anfetamina, confirmando os mecanismos de hiperreatividade da dopamina no núcleo accumbens que estão envolvidos na expressão de sensibilização locomotora (VANDERSCHUREN et al., 1999). Portanto, embora os fármacos foram administrados sistemicamente, os resultados são consistentes com o conceito de que a hipersensibilidade de neurônios do mesoaccumbens representa uma adaptação comum subjacente à expressão de longo prazo da sensibilização comportamental induzida por opiáceos e psicoestimulantes (KALIVAS; STEWART, 1991; PIERCE; KALIVAS, 1997a).

A maioria das drogas de abuso apresentam efeitos característicos na atividade locomotora que se tornam reforçados após repetidas doses. Portanto, a sensibilização comportamental é mais frequentemente avaliada em termos de locomoção. Curiosamente, o sistema mesolímbico, o substrato primário de sensibilização comportamental induzida por drogas, tem sido sugerido ter um papel crucial na motivação e comportamentos direcionados (SALAMONE 1994; KIYATKIN, 1995; SCHULTZ et al., 1997). Isto levou a um propósito de que a sensibilização comportamental pode estar envolvida em certos aspectos motivacionais na dependência de drogas, como a fissura e o comportamento compulsivo de busca pela droga (ROBISON; BERRIDGE, 1993).

Os resultados descobertos por Vanderchuren et al. (1999) concluem que a adaptação persistente nos nervos terminais do núcleo accumbens, torna-os hipersensíveis à capacidade de cocaína, anfetamina e GBR-12909 de aumentar a concentração de DA sináptica, representando efeitos neuroadaptativos pré-sinápticos subjacentes à sensibilização locomotora induzida pela morfina e anfetamina.

Em nosso estudo como a atividade locomotora foi avaliada apenas em dose única do composto PT-31 GIRSUPAN, sugere-se a administração do composto em doses múltiplas para avaliação da sensibilização comportamental.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Investigar as características de logP, os aspectos de toxicidade e a farmacocinética do composto 3-(2-cloro-6-fluorobenzil)-imidazolidina-2-4-diona – PT-31 GIRSUPAN – com potencial aplicação no tratamento de dor.

3.2 Objetivos Específicos

- Determinação do logP *in silico* e experimental do PT-31 GIRSUPAN;
- Determinação da estabilidade química e *ex vivo*;
- Desenvolvimento e validação de método bioanalítico para a determinação de PT-31 GIRSUPAN em plasma por LC-MS;
- Avaliação do perfil farmacocinético do PT-31 GIRSUPAN (10 mg/kg) administrado em dose única via intraperitoneal em ratos Wistar;
- Avaliação do perfil farmacocinético do PT-31 GIRSUPAN (10 mg/kg) administrado em associação com a morfina (6 mg/kg) em dose única via intraperitoneal em ratos Wistar;
- Avaliação do perfil farmacocinético do PT-31 GIRSUPAN (10 mg/kg) administrado em dose única via oral em ratos Wistar;
- Avaliação da toxicidade hepática e renal do composto PT-31 GIRSUPAN (10 mg/kg) administrado em dose única via intraperitoneal através dos parâmetros bioquímicos ALT, AST, ureia e creatinina.
- Avaliação do potencial de dependência do PT-31 GIRSUPAN nas doses de 3, 5, 10 e 20 mg/kg.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Métodos Analíticos para determinação de PT-31 GIRSUPAN

4.1.1 Análise Espectrofotométrica

O sistema de leitor de placa Power Wave HT – Biotek foi utilizado para a determinação do coeficiente de partição (logP) e do comprimento de onda de maior absorvidade do composto, através de varredura, para auxiliar no desenvolvimento do método analítico do composto PT-31 GIRSUPAN por espectrofotometria. Esse método espectrofotométrico foi aplicado para a determinação do LogP do composto.

4.1.1.1 Determinação do Coeficiente de Partição (logP) do composto PT-31 GIRSUPAN

A determinação do coeficiente de partição *in silico* do composto PT-31 GIRSUPAN foi realizada através do software Chem Draw ultra 12.0 - Cambridge Software. Em seguida, a determinação experimental do logP foi baseada na técnica descrita pelo “OECD Guideline for the testing of chemicals” - Partition Coefficient (n-octanol/water): Shake Flask Method (1995). Neste método, avalia-se a dispersão do produto nas fases óleo/água, utilizando água Milli-Q e octanol como fase orgânica, em três situações distintas de proporção A/O (1:1; 2:1; 1:2).

Procedimento

Antes do coeficiente de partição ser determinado, os dois solventes, n-octanol e água, foram saturados à temperatura de $25 \pm 1^\circ\text{C}$, durante 24 horas, em um agitador mecânico (Nova Ética), e em seguida foram mantidos em repouso por 24h para permitir a separação das fases.

Análise

As concentrações do PT-31 GIRSUPAN foram determinadas em ambas as fases após período de saturação e separação. Para a quantificação do composto foi utilizado o leitor de placa Power Wave HT – Biotek, utilizando um comprimento de onda de 205 nm. A quantidade total do PT-31 GIRSUPAN presente em ambas as fases foi calculada e comparada com a quantidade originalmente introduzida através das equações das retas (água/octanol) previamente determinadas.

As curvas analíticas em água e octanol foram construídas nas concentrações de 15,62; 31,25; 62,5; 125, 250, 500 µg/mL, em triplicata e com critério de aceitação para o coeficiente de correlação (R) acima de 0,99, segundo a RE 899, 29 de maio de 2003.

4.1.2 Método analítico por LC-MS

Um sistema de cromatografia líquida equipado com um detector de massas triplo quadrupolo da Micromass – Quatro microTM, Waters, usando monitoramento de reação múltipla (MRM) foi utilizado. A interface elétron spray operou na ionização de modo positivo, a temperatura de solvatação foi de 450°C e a voltagem do íon spray foi ajustado a 20V, para detecção do composto PT-31 GIRSUPAN (m/z 243,45), cuja transição utilizada foi de 143,02 e para a detecção do padrão interno (PI) – clonidina 20 ng/mL. A separação das moléculas foi feita por um sistema de fase reversa com uma coluna Symmetry C₁₈ (4,6 x 75 mm, 3,5µm), protegida por uma pré-coluna Symmetry C₁₈ (3,9 x 20 mm, 5µm). A fase móvel, por sua vez, foi constituída de metanol, tampão acetato de amônio 5mM (pH 2,8 ajustado com ácido fórmico), na proporção de 90 e 10%

respectivamente, em modo isocrático e um fluxo de 0,5 mL/min e o volume de injeção foi de 50 µL. Esse método foi utilizado no ensaio de estabilidade química do PT-31 GIRSUPAN.

Reagentes

Composto 3-(2-cloro-6-fluorobenzil)-imidazolidina-2-4-diona - PT-31 GIRSUPAN (sintetizado pela Universidade Federal de Pernambuco), cloridrato de clonidina (Sigma Aldrich Chemie), metanol (J. T. Baker[®]), acetato de etila (Quemis[®]), acetato de amônio (J. T. Baker[®]), ácido fórmico (Scharlau[®]) e água milli-Q.

O tampão acetato, empregado como solvente da fase móvel, foi preparado a uma concentração de 5mM, acrescentado de ácido fórmico 0,1% para atingir o pH 2,8 e o metanol para facilitar a ionização das moléculas.

As soluções estoque de PT-31 GIRSUPAN e clonidina (100 µg/mL) foram preparadas em metanol. Essas soluções foram utilizadas para todo o processo de validação.

4.1.2.1 Estudo de estabilidade química

Os ensaios de estabilidade química foram planejados para simular as condições de pH do trato digestório. Para determinação da estabilidade química em pH 3,0 e 7,4, a concentração de 20 µg/mL de PT-31 GIRSUPAN em metanol foi submetida à agitação constante em um agitador mecânico (Nova Ética[®]) a 37 ± 1°C durante todo o ensaio.

As amostras foram coletadas nos tempos zero, 0,25, 0,5, 1, 2, 4, 8, 12h para o pH 3,0 e nos tempos zero, 0,25, 0,5, 1, 1,5, 4, 12h para o pH 7,4. Em

seguida foram quantificadas por LC-MS. Todas as análises foram realizadas em triplicata e os resultados foram expressos pela média das concentrações ($\mu\text{g/mL}$).

4.2 Método Bioanalítico para determinação de PT-31 GIRSUPAN

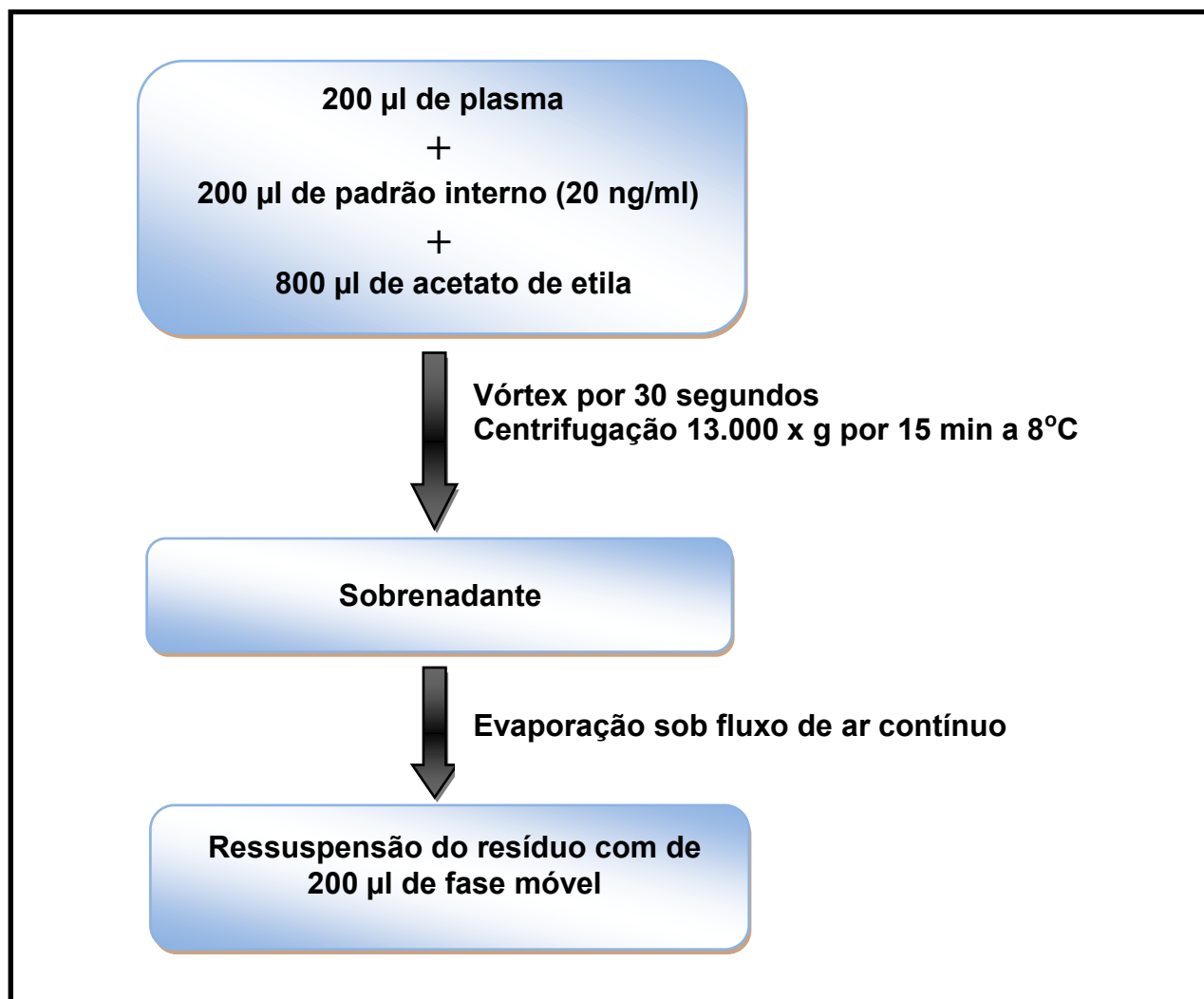
4.2.1 Análise cromatográfica por LC-MS

As condições cromatográficas utilizadas no método bioanalítico para determinação do composto PT-31 foram as mesmas do método analítico, descritas no item 4.1.2.

Processamento das amostras de plasma

Em um microtubo plástico de 1,5 mL contendo 200 μL de plasma, 20 μL de PI (clonidina) e 800 μL de acetato de etila são adicionados e em seguida a mistura é agitada em vórtex por 30 segundos. A mistura é, então, centrifugada por 15 minutos a 13 000 x g. Após a centrifugação, 750 μL do sobrenadante foram transferidos para um tubo falcon plástico de 15mL, evaporados a ar comprimido, ressuspensos com 200 μL da fase móvel e injetado no sistema LC-MS. O tempo de corrida foi de 5 min e o volume de injeção de 20 μL (**Fluxograma 1**).

Fluxograma 1: Processamento da amostra biológica para identificação e quantificação do composto PT-31 GIRSUPAN.



4.2.1.1 Validação Bioanalítica

O processo de validação incluiu os procedimentos necessários para a determinação dos limites de confiança do método, de acordo com as normas estabelecidas pela ANVISA (RESOLUÇÃO-RE nº899, de 29 de maio de 2003). O objetivo desses procedimentos foi avaliar se o método bioanalítico desenvolvido pode ser aplicado em estudos de farmacocinética do composto PT-31 GIRSUPAN.

4.2.1.1.1 Curva analítica

A curva analítica representa a relação entre a resposta do instrumento e a concentração conhecida do analito. A curva analítica é usada para calcular a concentração do fármaco nas amostras, utilizando-se a mesma matriz biológica proposta para o estudo. A curva analítica incluiu a análise da amostra branco (matriz biológica isenta de padrão do fármaco e do padrão interno), da amostra zero (matriz biológica mais o padrão interno) e de nove amostras contendo padrão do fármaco e padrão interno (PI). Alíquotas de 990 μL de plasma, em triplicata, foram enriquecidas com 10 μL de cada solução diluída de PT-31 GIRSUPAN (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) para alcançar as concentrações finais de 0,05; 0,1; 0,25; 0,5; 1; 2,5; 5; 10 e 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

Os critérios de aceitação para exatidão da curva analítica foram desvio menor ou igual a 20% em relação à concentração nominal para o LIQ e um desvio menor ou igual a 15 % em relação à concentração nominal para as outras concentrações da curva analítica. Os critérios de aceitação para precisão da curva analítica foram coeficiente de variação (CV) menor ou igual a 20% em relação à concentração nominal para o LIQ e um desvio menor ou igual a 15 % em relação à concentração nominal para as outras concentrações da curva analítica. Além disso, a curva analítica deve apresentar um coeficiente de correlação (R) igual ou superior a 0,98.

4.2.1.1.2 Linearidade

A linearidade foi estudada através da análise de amostras de plasma, contemplando o limite de variação esperado, do LIQ até 120% da concentração mais alta que se pretende analisar. O método foi considerado linear até a maior

concentração analisada, cujas replicatas apresentaram coeficiente de variação <15%. Amostras com concentrações de 0,050 a 30 µg/mL, em triplicata, foram analisadas.

4.2.1.1.3 Limite de Detecção

O limite de detecção foi determinado como a menor concentração detectada, cuja área da concentração mínima detectada corresponde a 3 vezes o valor da área do branco com coeficiente de variação menor que 20%, analisadas em três replicatas.

4.2.1.1.4 Limite de Quantificação

O limite de quantificação foi determinado como a menor concentração quantificada, cuja área da concentração mínima quantificada corresponde a 5 vezes o valor da área do branco com coeficiente de variação menor que 20%, analisadas em três replicatas.

4.2.1.1.5 Precisão e Exatidão intra e inter-ensaios

A precisão foi avaliada através dos coeficientes de variação obtidos pela análise de brancos de plasma adicionados de três concentrações diferentes do composto PT-31 GIRSUPAN (0,05, 1 e 10 µg/mL), cinco replicatas em dois dias consecutivos (inter ensaios) e em cinco replicatas em um mesmo ensaio (intra-ensaio), com coeficiente de variação menor que 15%. A exatidão (% erro sistemático) foi obtida através da avaliação da concordância dos resultados obtidos experimentalmente com os valores reais dos compostos na amostra, com coeficiente de variação entre 85 e 115%.

4.2.1.1.6 Recuperação

A recuperação é utilizada para medir a eficiência do procedimento de extração desenvolvido dentro de um limite de variação. Porcentagens de recuperação do analito e do padrão interno próximos a 100% são desejáveis, porém, admitem-se valores menores, desde que a recuperação seja precisa e exata.

Este teste foi realizado comparando-se os resultados analíticos de amostras extraídas a partir de três concentrações (0,5, 1,0 e 10 μ g/mL), contemplando a faixa de linearidade do método, com os resultados obtidos com soluções padrão não extraídas que representam 100% de recuperação.

O cálculo da recuperação foi feito em função da relação de área do padrão extraído e não extraído, tanto para o analito quanto para o padrão interno separadamente.

4.2.1.1.7 Estabilidade

O ensaio de estabilidade tem como finalidade verificar se a concentração da substância sofre alterações após um período específico de armazenamento antes e após o processamento (CHANG, 2002).

As estabilidades dos analitos foram determinadas em curta e longa duração, após ciclos de congelamento e descongelamento e pós-processamento. Alíquotas foram preparadas em duas concentrações diferentes, 0,25 e 10 μ g/mL, em triplicata.

Estabilidade de curta duração:

A estabilidade do composto PT- 31 foi determinada após permanecer a temperatura ambiente por 24h. Em seguida, as amostras foram processadas como descrito no item 4.2.3.1 e analisadas. Os resultados foram comparados com aqueles obtidos da análise das amostras recém-preparadas.

Estabilidade após ciclos de congelamento e descongelamento:

A estabilidade do analito foi determinada após três ciclos de congelamento e descongelamento. As alíquotas, de 500 μL , foram estocadas à temperatura de $-20 \pm 1^\circ\text{C}$ por 24h e descongeladas espontaneamente, à temperatura ambiente, passando por todo processo de extração para posterior análise. Tal procedimento foi repetido por três dias consecutivos, sob as mesmas condições. Os resultados foram comparados com aqueles obtidos da análise das amostras recém-preparadas.

Estabilidade de longa duração:

A estabilidade do analito foi analisada após seis meses de armazenamento à $-80 \pm 1^\circ\text{C}$, passando pelo processo de descongelamento e extração. Os resultados foram comparados com aqueles obtidos na análise das amostras recém-preparadas.

Estabilidade pós-processamento da amostra:

A estabilidade do composto PT- 31 foi determinada após processamento e permanência à temperatura ambiente por 24h, seguida de análise. Os

resultados foram comparados com aqueles obtidos da análise das amostras recém-preparadas.

4.2.2 Estudo de estabilidade *ex vivo*

Os ensaios de estabilidade *ex vivo* foram planejados para verificar possível atividade de enzimas plasmáticas sobre o composto em estudos. Para determinação da estabilidade *ex vivo*, amostras de plasma foram acrescidas da solução estoque de PT-31 GIRSUPAN, finalizando em uma concentração de 20 µg/mL e submetidas à agitação constante em um agitador mecânico (Nova Ética®) a $37 \pm 1^\circ\text{C}$ durante todo o ensaio.

As amostras foram coletadas nos tempos zero, 0,25, 0,5, 1, 2, 4, 8, 12h. Em seguida, foram quantificadas por método bionalítico previamente validado. Todas as análises foram realizadas em triplicata e os resultados foram expressos pela média das concentrações (µg/mL).

4.2.3 Avaliação do perfil farmacocinético

4.2.3.1. Casuística

Foram utilizados 48 ratos wistar, com peso aproximado de 250 ± 10 g, provenientes do biotério central de Botucatu da Universidade Estadual Paulista – Unesp foram utilizados para os estudos de farmacocinética, testes preliminares de toxicidade e potencial de dependência. Os animais foram transferidos para o biotério do Departamento de Princípios Ativos Naturais e Toxicologia da Faculdade de Farmácia Bioquímica da Unesp de Araraquara, os quais foram mantidos em condições controladas de temperatura ($23 \pm 1^\circ\text{C}$), 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.

O protocolo de estudo pré-clínico foi aprovado pelo Comitê de Ética da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP, Araraquara (Processo n ° 24/2010).

4.2.3.2. Protocolo experimental

Os animais foram distribuídos em 03 grupos:

- **Grupo I (PT-31 GIRSUPAN -10mg/Kg, i.p.)** (n= 16);
- **Grupo II (PT-31 GIRSUPAN -10mg/Kg + morfina - 6mg/Kg, i.p.)** (n= 16);
- **Grupo III (PT-31 GIRSUPAN - 10 mg/kg, via oral)** (n= 16).

As doses de 10 mg/kg do produto e 6mg/kg de morfina para ratos wistar foram estabelecidas por extrapolação alométrica, considerando-se a publicação de SUDO et al (2010), em que foram utilizadas as doses de 15 mg/kg para PT-31 GIRSUPAN e 10 mg/kg para morfina, em camundongos.

As soluções dos fármacos foram preparadas em dimetilsulfóxido (DMSO), diariamente, e as administrações foram realizadas no período matutino (8h). O veículo DMSO foi selecionado considerando-se a avaliação de atividade do composto realizada por Sudo et al (2010).

Após a administração foi realizada coleta de sangue para a determinação das concentrações do composto PT-31 GIRSUPAN, construindo-se a curva de concentração plasmática *versus* tempo. As amostras seriadas de sangue foram coletadas em 10 tempos diferentes (0; 15'; 30'; 45'; 60'; 90'; 3h; 6h; 12h e 24h); e para cada tempo de coleta foram empregados 5 animais.

As amostras de sangue obtidas da cauda e por decapitação dos animais foram coletadas, respectivamente, em microtubos de plástico e tubos de vidro, utilizando-se solução de heparina a 2500 UI. O sangue foi centrifugado a 13000 g, por 15 minutos a $8 \pm 1^\circ\text{C}$ e o plasma utilizado para as análises laboratoriais.

4.2.3.3. Análise farmacocinética

A disposição cinética do PT-31 GIRSUPAN foi avaliada após administração de dose única (10 mg/kg) em ratos wistar por via intraperitoneal isoladamente ou associado à morfina (6mg/kg) e por via oral (gavagem) isoladamente. Os valores de concentração plasmática máxima (C_{\max}) e tempo de ocorrência da concentração plasmática máxima (t_{\max}) foram obtidos diretamente dos resultados experimentais. Os parâmetros farmacocinéticos foram calculados através das curvas de concentração plasmática *versus* tempo. A meia vida de eliminação ($t_{1/2}$) foi obtida através do método gráfico e por modelo monocompartimental, selecionado após avaliação do coeficiente de correlação entre as variáveis (CATTANI et al., 2008). A constante de eliminação (k_{el}) foi obtida através da equação $k_{el} = 0,693 / t_{1/2}$. A ASC0-t foi calculada pelo método dos trapezoides, e a ASC0-INF foi calculada através da equação $ASC0-INF = ASC0-t + C_{pn} / k_{el}$, em que C_{pn} é a última concentração da curva de concentração plasmática *versus* tempo e k_{el} é a inclinação da reta de regressão linear do logaritmo das concentrações plasmáticas pelo tempo, na fase de eliminação. A relação entre as áreas sob a curva ($r \text{ áreas} = ASC0-t / ASC0-INF$) foi utilizada para verificar se o desenho experimental foi adequado para a realização dos cálculos dos parâmetros farmacocinéticos, sendo aceitável que r

áreas seja maior ou igual a 0,8 (RESOLUÇÃO-RE nº1170, de 19 de abril de 2006).

O valor de clearance (Cl) foi determinado através da equação modelo independente $Cl = \text{dose}/ASC0\text{-}INF$ e o volume de distribuição (Vd) foi calculado através da equação $Vd = Cl/kel$. O tempo de residência médio (MRT) foi calculado através de estatística dos momentos, utilizando a área sob o momento da curva (ASMC), e através da equação $MRT = ASMC/ASC0\text{-}INF$.

Para a administração oral foram calculados a meia vida de absorção ($t_{1/2}$) e a constante de absorção (k_a) através da equação $k_a = 0,693/t_{1/2}$. As áreas sob a curva extrapoladas ao infinito (ASC0-INF) da administração oral e intraperitoneal foram comparadas para verificar a necessidade de ajuste de dose em estudos pré-clínicos futuros para avaliação de efeito utilizando a administração oral.

4.3 Avaliação dos parâmetros bioquímicos

Parâmetros bioquímicos foram analisados para avaliação das funções hepática e renal antes e após a administração do composto aos animais. Os parâmetros analisados foram: alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST), ureia e creatinina.

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

Para a determinação dos parâmetros bioquímicos de função renal e hepática foram utilizados 40 animais no total. Estes receberam os compostos, pela via *i.p.*, em dose única. As coletas de sangue foram realizadas através da

cauda do animal no tempo 4h e através da decapitação no tempo de 8h. Os animais foram distribuídos nos seguintes grupos:

- **Grupo I (tratados com PT-31 GIRSUPAN -10mg/kg) (n=10);**
- **Grupo II (tratados com PT-31 GIRSUPAN -10mg/kg + morfina – 6mg/kg) (n=10);**
- **Grupo III (tratados com morfina – 6mg/kg) (n=10);**
- **Grupo IV controle (tratados com DMSO – 2,5mg/kg) (n=10).**

O objetivo do grupo controle do sistema (DMSO) é determinar os valores basais dos parâmetros bioquímicos estudados considerando-se que a exposição ao estresse pode determinar alterações. Além disso, foi realizada a coleta do material biológico antes da administração do DMSO para avaliar os efeitos desse o veículo sobre estes parâmetros.

As amostras de sangue obtidas da cauda e por decapitação dos animais foram colhidas, respectivamente, em microtubos de plástico e tubos de vidro, utilizando-se solução de heparina a 2500 UI. O sangue foi centrifugado a 13000 g, por 15 minutos a $8 \pm 1^{\circ}\text{C}$ e o plasma utilizado para as análises laboratoriais.

4.3.1 Determinação da atividade enzimática de AST e ALT

As determinações de ALT e AST foram realizadas por método colorimétrico - reação de Reitman Frankel (Kit Labtest - lotes 0001 e 1001). As etapas envolvidas na determinação das transaminases estão descritas a seguir:

Aspartato Aminotransferase (AST ou TGO) - método colorimétrico - a reação de AST resulta na formação de oxalacetato, que é medido através da

formação de hidrazona, a qual tem intensa cor castanha em meio alcalino (Kit Reagente Labtest - lote 1001).

Alanina Aminotransferase (ALT ou TGP) – método colorimétrico – a reação de ALT resulta na formação de piruvato, que é medido através da formação de hidrazona, a qual tem intensa cor castanha em meio alcalino (Kit Labtest – lote 0001).

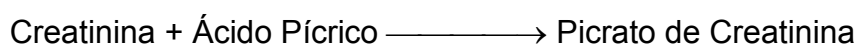
As análises de transaminases foram realizadas antes e depois do início do tratamento dos animais para que se tenha um parâmetro comparativo.

4.3.2 Determinação de creatinina

Alterações de função renal podem ser avaliadas através da determinação dos níveis séricos de creatinina.

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 foi medido fotometricamente (Kit Labtest - lote 2010).

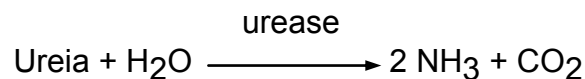


A determinação de creatinina foi feita antes e após o tratamento com os descritos anteriormente.

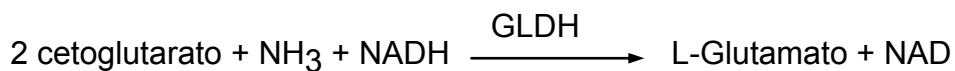
4.3.3 Determinação de ureia

A determinação da ureia em amostras de sangue e urina é útil na avaliação da função renal. 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 absorvância, medida em 340 ou 365 nm, é proporcional à concentração de ureia na amostra (Kit Labtest – lote 2002).



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

4.4 Atividade Locomotora

Para a avaliação da atividade locomotora foi utilizada caixa automática de medida locomotora (Columbus Instruments - Califórnia), de medida 51,1 x 9,5 x 69,2 cm (largura x altura x comprimento locomotora de espécie animal). Esta caixa continha 10 emissores de luz infravermelha, distante 2,5 cm entre si e a

3,0 cm do piso da caixa. Cada unidade de locomoção correspondeu à interrupção de dois feixes de luz. O animal foi colocado na caixa e deixado livre para explorar o ambiente por 45 minutos. A medida de cruzamento foi avaliada para determinar a atividade motora a cada 5 minutos. Os animais foram tratados com salina, DMSO (2,5 mg/kg) e PT-31 GIRSUPAN (doses 3; 5; 10; 20 mg/Kg), em seis replicatas para cada dose, ambos administrados pela via intraperitoneal. Os animais foram observados durante 45 minutos, tempo necessário para responder aos estímulos de locomoção em modelo animal.

4.5 Análise Estatística

Os parâmetros farmacocinéticos dos grupos estão apresentados através das medianas, médias e intervalo de confiança (IC 95).

A comparação dos parâmetros farmacocinéticos e os perfis farmacocinéticos do composto PT-31 GIRSUPAN nos diferentes grupos foram comparados através da aplicação do teste de Mann-Whitney. Os parâmetros bioquímicos foram comparados pelo teste Dunn`s. A atividade locomotora foi analisada por ANOVA. Para esta finalidade foi utilizado o programas Graphpad Prism 5. Os cálculos de regressão linear das curvas analíticas e coeficientes de variação (CV%) foram realizados utilizando-se o programa Origin[®].

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Métodos analíticos para determinação de PT-31 GISUPAN

5.1.1 Análises espectrofotométricas

5.1.1.1 Determinação do coeficiente de partição (logP) do composto PT-31 GIRSUPAN

O coeficiente de partição (logP) do composto PT-31 GIRSUPAN, determinado através do software Chem Draw, resultou em um logP de 1,56, enquanto o log P experimental do composto, baseado na técnica descrita pelo “OECD Guideline for the testing of chemicals – Shake Flask” (1995), foi de $1,24 \pm 0,1064$.

Os ensaios para determinação do coeficiente de partição do composto PT-31 GIRSUPAN foram realizados a partir das curvas analíticas em água e octanol (Figuras 5 e 6), conforme descrito no item 4.1.1.1 de Material e Métodos.

Figura 5: Curva analítica em água do PT-31

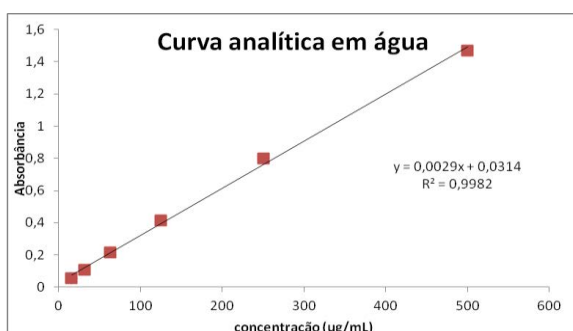
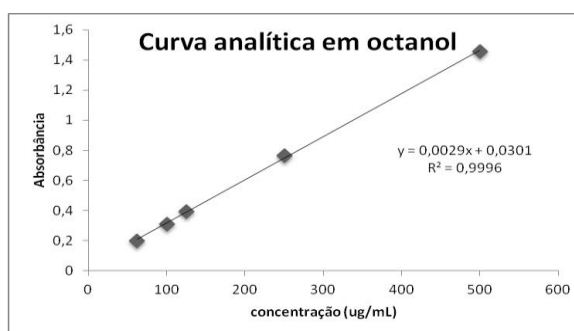


Figura 6: Curva analítica em octanol do PT-31



Os coeficientes de determinação (R^2) evidenciam linearidade adequada para a determinação de LogP experimental. Assim, a equação da reta foi utilizada para calcular o coeficiente de partição do composto, como demonstrado na Tabela 1.

Fases	Absorbância	água conc (ug/mL)	octanol conc (ug/mL)	P	log P	média	DP	CV	média total	DP	CV
A/O (1:2)	0,13084	49,92	1208,01	24,19892	1,383796	1,306486	0,06701	5,128997	1,24	0,1064	8,58
	0,15638	62,69	1154,13	18,41011	1,265056						
	0,15807	63,535	1184,73	18,64689	1,270606						
A/O (1:1)	0,15216	60,58	1131,51	18,67795	1,271329	1,264142	0,133553	10,56468			
	0,12103	45,015	1115,10	24,77174	1,393957						
	0,19501	82,005	1098,96	13,40113	1,127142						
A/O (2:1)	0,20011	84,555	1180,11	13,95671	1,144783	1,149252	0,055461	4,825808			
	0,21572	92,36	1152,51	12,47845	1,096161						
	0,17455	71,775	1155,54	16,09948	1,206812						

Tabela 1: Determinação do coeficiente de partição do composto PT-31 GIRSUPAN através do método Shake Flask.

O valor de logP encontrado neste estudo enquadra-se nas características de um composto que, segundo Tsaïoun e Kates (2012), apresenta uma melhor absorção oral, um balanço entre a permeabilidade e a solubilidade, e um metabolismo hepático reduzido.

Segundo Korinth et al. (2012), o logP com valores próximos a 1 indica que o produto químico apresenta uma solubilidade 10 vezes maior na fase orgânica em relação à fase aquosa. Por conseguinte, os produtos químicos com os valores de log P negativos são mais solúveis em meio aquoso do que em solventes orgânicos e irá solubilizar o aquoso em vez da fase lipofílica.

Benet et al. (2011) afirmam que compostos com LogP > 2,0 apresentam probabilidade de excreção hepática (fase I) em cerca de 80%, dessa forma, estes compostos permanecem por mais tempo no organismo devido à necessidade de passar por várias etapas de biotransformação, e que compostos com LogP < 0 apresentam probabilidade de baixo metabolismo (fase I) em 83,5%. Além disso, compostos com logP entre 0 e 2,0 não é possível atribuir a

probabilidade de taxa de metabolismo com segurança, cujo resultado de logP foi encontrado nesse trabalho.

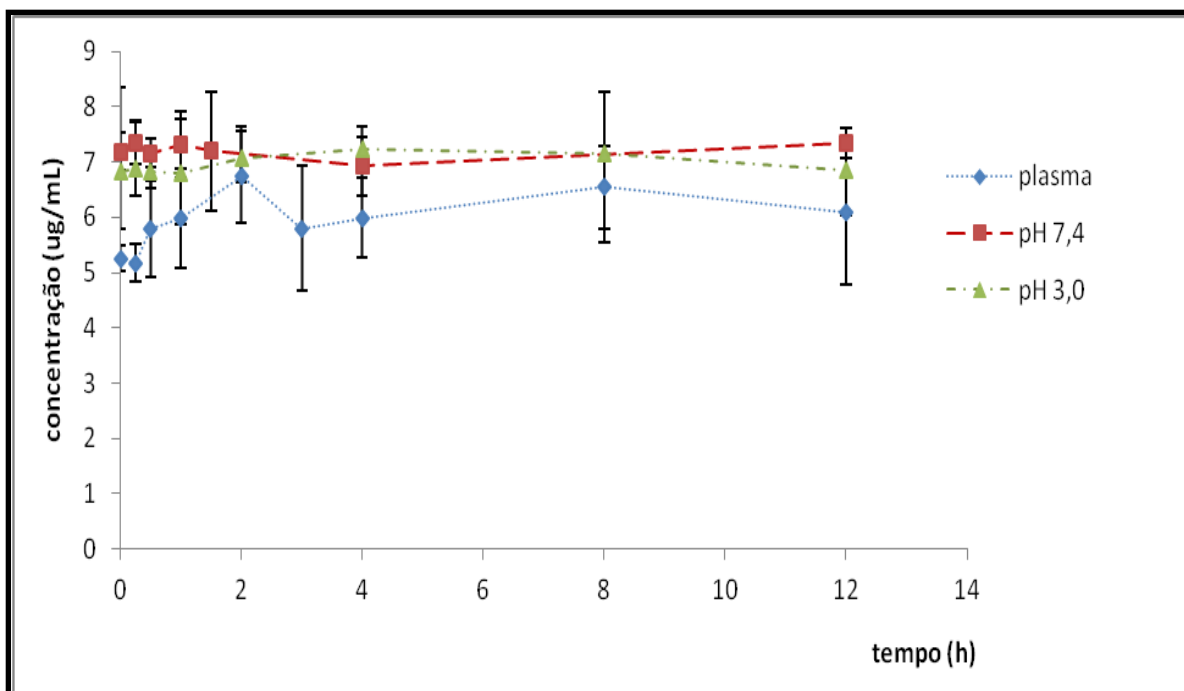
Segundo Winiwarter et al. (1998) o LogP possui boa correlação com a fração absorvida do fármaco administrado pela via oral, mas não é um parâmetro adequado para prever a biodisponibilidade por essa via. Estudos sugerem que compostos que apresentam valores de LogP em torno de 2 ± 1 possuem tanto boa absorção oral como boa expectativa para penetrar através da barreira hematoencefálica (DRESSMAN et al., 2008).

5.1.2 Análises cromatográficas por LC-MS/MS

5.1.2.1 Estabilidade química e ex vivo

O estudo de estabilidade química e *ex vivo* não demonstrou a ocorrência de hidrólise química do composto em pHs 3,0 e 7,4 e em plasma de rato, durante o período de 12h (Figura 7). Esses resultados apontam uma característica favorável à administração oral com baixa probabilidade de ocorrência de hidrólise química nos pHs do trato digestório. A estabilidade observada no estudo *ex vivo*, pelo período de 12 horas, sugere que o composto não sofre ação de enzimas plasmáticas e que há grande probabilidade de que o metabolismo do fármaco seja mediado por outros sistemas enzimáticos nos estudos *in vivo*.

Figura 7. Curva da estabilidade química em diferentes pH (3,0 e 7,4) e em plasma (*ex vivo*).



$p > 0,05$

5.2 Método bioanalítico para determinação do PT-31 GIRSUPAN

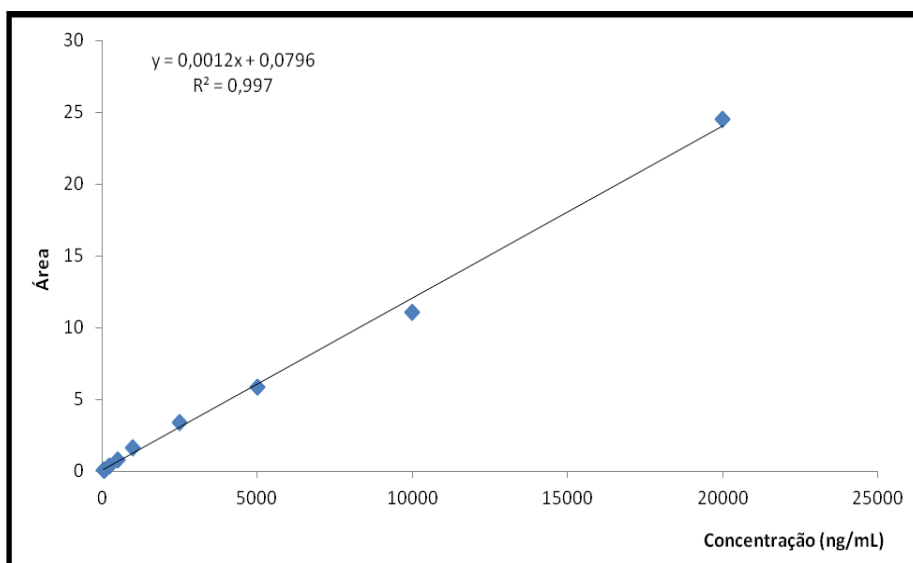
5.2.1 Análises cromatográficas por LC-MS/MS

5.2.1.1 Desenvolvimento e validação do método bioanalítico

Para o desenvolvimento e validação do método bioanalítico foi utilizada solução estoque de PT-31 GIRSUPAN na concentração de 100 $\mu\text{g/mL}$ em metanol. Em seguida, foram realizadas diluições seriadas para construção de uma curva analítica, com nove concentrações (50, 100, 250, 500, 1000, 2500, 5000, 10000 e 20000 ng/mL) em triplicata.

A curva analítica (Figura 8) foi analisada pelo método de regressão dos mínimos quadrados para verificação de linearidade. O coeficiente de correlação (R) obtido foi de 0,998. A equação da curva analítica foi $y = 0,0012x + 0,0796$.

Figura 8. Curva analítica do composto PT-31 GIRSUPAN em metanol.



O método bioanalítico apresentou limites de confiança aceitáveis para sua aplicação nos estudos de farmacocinética, de acordo com a Resolução nº 899, de 29 de maio de 2003 ANVISA (Tabelas 2, 3 e 4).

Limites de confiança	PT-31 GIRSUPAN
Limite de detecção (ng/mL)	25
CV (%)	14,8
Limite de quantificação (ng/mL)	50
CV (%)	11,3
Linearidade (ng/mL)	50 - 30000
R	0,998

Tabela 2. Valores de limites de detecção, limite de quantificação e linearidade apresentados pelo composto PT-31 GIRSUPAN.

Concentração adicionada (ng/mL)	Intra-ensaio		Inter-ensaio	
	Precisão (CV %)	Exatidão (%)	Precisão (CV %)	Exatidão (%)
PT-31 GIRSUPAN				
50	17,4	120	16,5	119
1000	12,8	101	11,0	96
10000	14,4	85	12,9	82

Tabela 3. Valores de precisão e exatidão intra e inter-corridas do PT-31 GIRSUPAN.

Concentração adicionada (ng/mL)	Curta duração	Pós processamento	Ciclo congelamento descongelamento	Longa duração
PT-31 GIRSUPAN	Exatidão (%)	Exatidão (%)	Exatidão (%)	Exatidão (%)
250	104,4	107,9	97,0	98,9
10000	102,9	97,8	99,4	101,2

Tabela 4. Valores de estabilidade de curta e longa duração, pós processamento e ciclo de congelamento e descongelamento apresentados pelo composto PT-31 GIRSUPAN.

A recuperação do PT-31 GIRSUPAN após processamento das amostras de plasma foi em média de 70%, para as 3 concentrações (0,05; 1,0 e 10 µg/mL). O padrão interno (clonidina), por sua vez, apresentou uma recuperação de 114,9% com coeficiente de variação (CV) de 10,7%.

5.2.2 Perfil farmacocinético

O perfil farmacocinético do PT-31 foi avaliado após administração de dose única (10mg/kg) pela via intraperitoneal, isoladamente e em associação com a morfina (6 mg/kg); e pela via oral (10 mg/kg) isoladamente.

Na tabela 5 estão demonstrados os parâmetros farmacocinéticos para o composto PT-31 nos três grupos experimentais supracitados, e na figura 9 os perfis de concentrações plasmáticas *versus* tempo.

As curvas de concentração plasmática *versus* tempo (Figura 9) apresentaram perfil farmacocinético compatível com o modelo monocompartimental. Dessa forma, a análise farmacocinética foi realizada considerando esse modelo.

As relações entre as ASC_{0-t} e ASC_{0-INF} apresentaram, para todos os grupos, valores superiores a 80%. Esses resultados demonstram que o delineamento experimental seguiram os criterios estabelecidos pela RE 1170, 19 de abril de 2006 e o período de coleta de amostras foi suficiente para a determinação dos parâmetros farmacocinéticos.

Na administração intraperitoneal do composto isolado a concentração plasmática máxima ocorreu em 5 minutos, indicando que a absorção por essa via é rápida, e comparável à via intravenosa em termos de velocidade. Além disso, esse resultado foi compatível com o encontrado por Sudo et al. (2010), em que os primeiros efeitos analgésicos do composto PT-31 GIRSUPAN apareceram, atingindo seu efeito máximo em 15 minutos.

Não foi observada diferença estatística significativa ($p > 0,05$) para o parâmetro Cl do composto administrado isoladamente entre as vias intraperitoneal e oral; porém para os parâmetros V_d , meia vida de eliminação, constante de eliminação e tempo de residência médio (MRT) encontra-se diferenças estatísticas significativas ($p < 0,05$) entre esses grupos.

O MRT é um parâmetro dependente da via de administração, pois se refere ao tempo despendido para a ocorrência do movimento do fármaco no

organismo (KWON, 2002). Embora na via intraperitoneal o processo de absorção também ocorra, as características anatômicas e fisiológicas da cavidade peritoneal são diferentes das características do trato digestório e mais propícias à rápida absorção do composto PT-31 GIRSUPAN. Assim, o maior tempo de residência médio na administração oral é esperado, em decorrência da sua menor velocidade de absorção.

O parâmetro meia vida de eliminação é dependente de Cl e Vd. Embora o parâmetro Cl não tenha sido diferente entre essas vias, na administração oral do produto o Vd foi significativamente maior ($p < 0,05$), fato que contribuiu para o prolongamento da meia vida do composto.

A biodisponibilidade do composto administrado pela via oral correspondeu a cerca de 93,6% da biodisponibilidade observada na administração intraperitoneal e, considerando que a avaliação do efeito analgésico foi realizada por administração intraperitoneal, é possível que na administração pela via oral os mesmos efeitos sejam observados. A possibilidade de utilização via oral representa grande vantagem para o composto, considerando que é a via de administração mais comum, dessa forma, o indivíduo pode realizar a auto-administração.

Na associação da morfina ao composto, ambos administrados pela via intraperitoneal, foi possível observar interação farmacocinética. Houve uma diminuição significativa da meia vida de eliminação, da área sob a curva (ASC_{0-T} e ASC_{0-INF}) e do MRT ($p < 0,05$). O aumento significativo de Cl ($p > 0,05$) observado pode explicar as alterações dos parâmetros anteriormente citados.

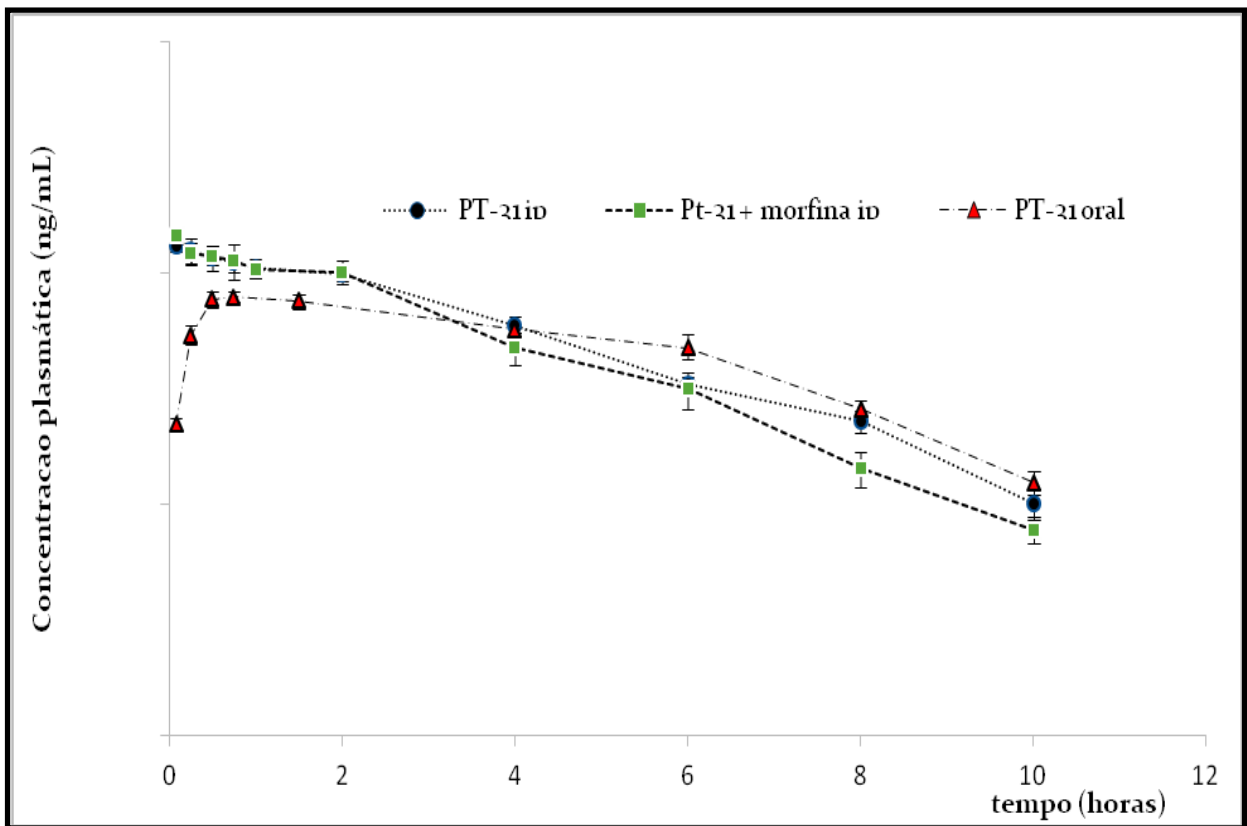
O Cl representa a capacidade intrínseca dos órgãos depuradores em remover o fármaco de um volume específico de sangue por unidade de tempo.

O débito cardíaco (DC) representa o fluxo sanguíneo máximo do corpo, sendo que fígado e rins – principais órgãos depuradores do organismo - são responsáveis por 50% desse fluxo. Deste modo, o CI máximo de um fármaco é a metade do DC do modelo animal experimental e qualquer valor acima indica que pode ocorrer metabolização por outros órgãos (TOUTAIN; BOUSQUET-MÉLOU, 2004a).

O aumento de CI é frequentemente encontrado nas interações medicamentosas e ocorre principalmente quando um dos fármacos presentes na associação apresenta características de indutor enzimático; ou quando há competição pela ligação às proteínas plasmáticas, ou quando há competição por sítios de ligação, uma vez que nessas condições ocorre aumento da fração livre do fármaco, que pode ser compensada pelo CI (MAKOID et al., 1999).

Não existem relatos na literatura de que a morfina seja indutor enzimático e sua ligação às proteínas plasmáticas é de cerca de 35%. Essas características não corroboram com as hipóteses prováveis para o aumento de CI observado para o PT-31 no grupo que recebeu a associação.

Figura 9. Perfil farmacocinético do composto PT-31 GIRSUPAN isolado e em associação à morfina (*i.p.*) e PT-31 GIRSUPAN isolado (oral).



$p > 0,05$

Parâmetros	PT-31 GIRSUPAN ip	PT-31 GIRSUPAN + morfina ip	PT-31 GIRSUPAN oral
Cmax (µg/mL)	13,125 12,897 (12,465-13,784)	14,546 14,366 (13,297-15,795)	7,891 ^{ab} 7,954 (7,512-8,269)
tmax (min)	5	5	45
kel (h⁻¹)	0,243 0,244 (0,231-0,257)	0,283 ^a 0,284 (0,272-0,297)	0,186 ^{ab} 0,183 (0,171-0,191)
meia vida (h)	2,850 2,844 (2,690-2,998)	2,450 ^a 2,438 (2,334-2,547)	3,720 ^{ab} 3,796 (3,541-4,051)
asco-t (ug/ml.h)	54,880 54,988 (54,080-55,890)	50,030 ^a 49,652 (47,260-52,040)	48,340 ^a 48,464 (47,130-49,790)
asc0-inf(ug/ml.h)	59,450 59,166 (57,790-60,550)	52,830 ^a 53,400 (49,460-57,340)	55,310 ^a 55,110 (53,060-55,310)
Cl (L/h/kg)	0,172 0,171 (0,162-0,174)	0,189 ^a 0,188 (0,172-0,200)	0,181 0,181 (0,175-0,188)
Vd (L/kg)	0,681 0,694 (0,623-0,713)	0,633 0,661 (0,597-0,723)	0,978 ^{ab} 0,985 (0,955-1,013)
MRT	4,100 4,110 (3,877-4,323)	3,516 ^a 3,530 (3,366-3,666)	5,266 ^{ab} 5,240 (4,914-5,618)
r areas (%)	92,927 92,950 (91,620-94,270)	94,454 93,119 (88,400-97,740)	87,462 87,641 (85,940-89,340)
ka (h⁻¹)	n.a	n.a.	3,840 3,424 (2,186-4,662)
t1/2 a (h)	n.a	n.a.	0,180 0,228 (0,094-0,362)
ASCO-INF oral/ASCO-INF ip	n.a	n.a.	0,935

a ($p < 0,05$ em relação ao PT-31 GIRSUPAN *ip*)

b ($p < 0,05$ em relação ao PT-31 GIRSUPAN + morfina *ip*)

n.a (não aplicável)

Tabela 5: Parâmetros farmacocinéticos determinados a partir da administração *i.p.* de PT-31 GIRSUPAN isolado e associado à morfina e administração oral de PT-31 GIRSUPAN.

5.3 Determinação dos parâmetros bioquímicos

Na avaliação dos parâmetros bioquímicos relacionados à hepatotoxicidade e nefrotoxicidade foi possível observar alterações em alguns parâmetros, especialmente quando o fármaco foi associado à morfina. Apenas

na enzima AST observaram-se alterações na administração do produto administrado isoladamente. Na tabela 6 estão demonstrados os parâmetros transaminases (AST e ALT), ureia e creatinina, em ratos Wistar, machos (250g ± 10, n=10 por grupo) antes e após a administração, em dose única (10 mg/kg), via intraperitoneal, do composto PT-31 GIRSUPAN, e da associação à morfina (6 mg/kg). O grupo DMSO foi usado como controle do sistema, uma vez que os fármacos foram solubilizados neste produto para administração.

Parâmetros bioquímicos	Tempo zero	DMSO	PT - 8h	PT+morf - 8h	morf - 8h
	média - mediana IC	média - mediana IC	média - mediana IC	média - mediana IC	média - mediana IC
AST/TGO (U/L)	151,57 - 154	155,57 - 153	219,9 ^a - 217,5	285,5 ^a - 277,5	225 ^a - 225
	112,38 - 194,89	114,25 - 196,89	189,33 - 250,47	215,61 - 355,39	189,33 - 250,51
ALT/TGP (U/L)	133,71 - 129	137,57 - 138	114,33 - 120	260,5 ^{a,b} - 232,5	126,25 ^c - 125
	98,75-168,38	103,42 - 171,72	84,39 - 144,28	209,02 - 311,98	84,39 - 144,32
Ureia (mg/dL)	4,79 - 4,90	5,15 - 5,42	4,88 - 4,46	33,24 ^{a,b} - 32,4	50,0 ^{a,b,c} - 45,4
	2,394 - 6,812	3,059 - 7,237	2,436 - 6,165	29,904 - 36,573	38,34 - 61,796
Creatinina (mg/dL)	0,61 - 0,69	0,70 - 0,72	0,64 - 0,56	0,98 ^b - 1,01	0,87 - 0,89
	0,145 - 1,102	0,1549 - 1,244	0,2931 - 0,9652	0,8941 - 1,074	0,7689 - 0,9796

a (p < 0,05 em relação ao DMSO *ip*)

b (p < 0,05 em relação ao PT-31 8h *ip*)

c (p < 0,05 em relação ao PT-31 + morfina 8h *ip*)

Tabela 6. Parâmetros bioquímicos dos animais (ratos Wistar, n=10 por grupo) que receberam o composto PT-31 GIRSUPAN (10 mg/kg), da associação PT-31 GIRSUPAN + morfina (6 mg/kg) e morfina (6 mg/kg) em dose única via *ip*. O grupo DMSO foi utilizado como controle do sistema. O tempo zero corresponde à coleta realizada antes da administração do DMSO (p < 0,05).

Os parâmetros bioquímicos avaliados neste estudo são amplamente utilizados para investigar a toxicidade de produtos em animais de experimentação, procurando estabelecer relações entre a exposição e o efeito.

Os resultados apresentados pelo grupo DMSO não apresentaram diferença estatística ($p < 0,05$) quando comparados ao grupo tempo zero, dessa forma, o veículo utilizado para solubilizar o composto PT-3 GIRSUPAN não foi capaz de alterar os parâmetros bioquímicos de avaliação hepática e renal.

As transaminases são enzimas produzidas principalmente no tecido hepático e permanecem neste local em grande quantidade com a função de catalisar as reações de transferência de um grupo amino presente em um aminoácido para um alfa-cetoácido com consequente produção de outro aminoácido e outro alfa-cetoácido correspondente (BURTIS; ASHWOOD, 2001). Em condições normais, a atividade da AST plasmática é maior do que a atividade de ALT. Quando ocorre dano hepático, com ruptura de hepatócitos, o conteúdo celular sofre extravazamento e essas enzimas atingem a circulação sanguínea. Nessa situação, a ALT, que pode ser considerada um parâmetro de maior especificidade para o dano hepático, atinge níveis de atividade plasmática maiores do que os níveis de atividade da AST (BURTIS; ASHWOOD, 2001).

Níveis elevados de ALT e AST são encontrados em quadros de necrose hepática extensa, como ocorre nas hepatites agudas A ou B, nas exposições a toxinas ou em doses elevadas de acetaminofeno. A esteatose hepática também determina elevações moderadas das transaminases no sangue; o que é comum na exposição crônica ao etanol, nos quadros de diabetes e na obesidade. A exposição a alguns fármacos pode elevar as transaminases, tais como o ibuprofeno, o diclofenaco, a fenilbutazona, a fenitoína, o ácido valproico,

carbamazepina, o fenobarbital, as sulfonamidas, a nitrofurantoína, a sinvastatina, a amiodarona, a quinidina, os anti-depressivos tricíclicos, entre outros (BURTIS; ASHWOOD, 2001).

A morfina, comumente utilizada no tratamento de dor crônica, é metabolizada essencialmente pelo fígado, trato gastrointestinal e rins (ATICI et al., 2005; SUMATHI; DEVARAJ, 2009), tornando esses órgãos mais suscetíveis à toxicidade (KAHAN et al., 2006).

Nagamatsu et al. (1986) verificaram que a exposição *in vitro* de hepatócitos isolados de ratos Wistar à morfina induz a uma diminuição dos níveis de glutathione, levando à morte celular. Os autores concluíram que a morfina apresenta hepatotoxicidade, e que esse efeito é decorrente de seu metabolismo.

A morfina é metabolizada pela glicuronosiltransferase (UGT), localizadas no retículo do hepatócito, a conjugados glucorinados, como a morfina-3-glicuronídeo (M3G), morfina-6-glicuronídeo (M6G), e a normorfina. A formação dos conjugados com glutathione explicam a diminuição dos níveis intracelulares desse composto. A M6G, que é um agonista de receptores μ -opioide e com longa meia-vida, é dotada de maior citotoxicidade quando comparada à morfina (NAGAMATSU et al., 1986; ANTONILLI et al., 2003; VAUGHAN; CONNOR, 2003; WITTEWER; KERN, 2006).

Ainda, no trabalho de Nagamatsu et al. (1986), ratos Wistar receberam morfina (100 mg/kg) em dose única pela via subcutânea e, três horas após a administração, foi encontrado aumento na atividade sérica de AST e ALT. Resultados semelhantes foram apresentados por Atici et al. (2005), cujos parâmetros como ALT, AST, lactato desidrogenase (LDH) foram

significativamente maiores em relação ao grupo controle (salina) ($p < 0,05$). Parâmetros bioquímicos renais como ureia e creatinina também apresentaram valores maiores.

Estudos realizados por Cui et al. (2005) também encontraram aumento significativo ($p < 0,0001$) das enzimas hepáticas ALT e AST e uma redução ($p < 0,05$) de glutathione após administração *i.p.* de morfina (100 mg/kg) quando comparado ao grupo salina. Outros resultados apresentados por Sumathi et al. (2009) também demonstraram aumento significativo ($p < 0,05$) para os parâmetros bioquímicos ALT, AST, LDH, fosfatase alcalina (ALP) e γ -glutamyltransferase (γ -GT) e os parâmetros renais como ureia, creatinina e ácido úrico.

Yun-Tao Zhanga et al. (2004) avaliaram os efeitos tóxicos da morfina – diluída em salina - administrada intraperitonealmente (20 mg/kg), por 20 dias, em camundongos. Nesse trabalho foi constatada diminuição da atividade das enzimas superóxido dismutase, catalase e glutathione peroxidase, além da diminuição dos níveis de glutathione hepáticos. Os autores concluíram que a morfina é capaz de causar importante estresse oxidativo e, então, dano hepatocelular.

Estudos realizados por Afify et al. (2012) reduziram o estresse oxidativo hepático da morfina na dor aguda após administração de glibenclâmida, um bloqueador de canais de potássio.

No caso de necrose hepática, pode-se observar um aumento de até 100 vezes destas enzimas acima do valor de referência (AST: 81 U/L e ALT: 51 U/L), outras patologias geralmente resultam em um valor 10 a 40 vezes maior. Isso não foi observado em nenhum grupo experimental, embora tenha sido

observada diferença estatística significativa ($p < 0,05$) para os valores de AST e ALT no grupo que recebeu morfina isoladamente e no grupo da associação; e aumento significativo ($p < 0,05$) de AST no grupo que recebeu PT-31 GIRSUPAN isoladamente.

A AST pode ser usada para a avaliação de várias funções no organismo e não apenas a hepática, devido à sua alta concentração em outros órgãos além do tecido hepático. A AST está presente em grandes quantidades no tecido muscular e cardíaco. Assim, a constatação da origem do dano tecidual por AST deve ser realizada em conjunto com outros parâmetros. O dano hepático pode ser constatado quando há aumento de AST em paralelo com os valores de ALT; caso o dano seja muscular o marcador CK (creatinina quinase) pode auxiliar na interpretação (BURTIS; ASHWOOD, 2001).

Então, como o aumento de AST para o grupo experimental que recebeu PT-31 isoladamente não foi acompanhado de aumento de ALT, sugere-se que esse aumento não seja decorrente de dano hepático causado pelo produto. A investigação de outros parâmetros, como CK, pode auxiliar a investigação da origem do aumento de AST na exposição ao PT-31 GIRSUPAN.

Observa-se, ainda aumento significativo ($p < 0,05$) dos parâmetros ureia e creatinina nos grupos que receberam morfina.

A ureia é o mais importante metabólito nitrogenado resultante do metabolismo de proteínas. Grande parte de sua excreção - cerca de 90% - ocorre através dos rins. Essa molécula sofre filtração glomerular e cerca de 60% da quantidade filtrada retorna à circulação sanguínea por processo de difusão passiva dependente do fluxo urinário (SODRÉ et al., 2007; WAIKAR; BONVENTRE, 2008; WAIKAR et al., 2012).

Embora o parâmetro ureia não seja de validade preditiva para alterações de função renal, particularmente como parâmetro isolado, o aumento dos níveis séricos de ureia é um indicativo preliminar de possível nefrotoxicidade (FUCHS; HEWITT, 2011; WAIKAR et al., 2012). É importante ressaltar que as características de dieta e alterações da produção de ureia - que ocorre no tecido hepático - podem ser origem de alterações nos níveis séricos desse parâmetro, sem que ocorra qualquer alteração de função renal (WAIKAR; BONVENTRE, 2008).

A interpretação de alterações dos níveis séricos de ureia, em conjunto com os níveis séricos de creatinina, reflete mais apropriadamente os aspectos da função renal que se busca avaliar nesse trabalho.

A creatinina é um produto de metabolismo da creatina de origem muscular e sua excreção ocorre essencialmente por filtração glomerular, mas pequena quantidade é ativamente secretada no túbulo renal (WAIKAR; BONVENTRE, 2008).

A razão aumentada de ureia sérica/creatinina sérica (> 20) pode indicar estados patológicos diferentes, dependendo se os níveis de creatinina estão ou não dentro dos valores de referência (1,6 mg/dL). Se os níveis de creatinina estão na faixa de referência, a razão aumentada indica diminuição de fluxo sanguíneo renal, aumento de ingestão proteica ou sangramento gastrointestinal. Se os níveis de creatinina estiverem acima dos valores de referência (1,6 mg/dL), a razão ureia/creatinina aumentada indica processo obstrutivo pós-renal ou estenose de vias urinárias (SODRÉ et al., 2007).

Conforme relatado anteriormente, nos animais que receberam morfina isolada ou associada, foram observados aumento nos níveis de ureia e

creatinina, com aumento da razão entre os dois parâmetros, que é o segundo caso acima citado.

Existem evidências de efeitos urodinâmicos decorrentes da administração de morfina. O efeito observado é inibição do reflexo de micção, aumento do tônus do esfíncter e do volume da bexiga, com consequente retenção urinária (DUKES; ARONSON, 2000). Ruan (2007) encontrou resultados semelhantes, cuja retenção urinária após a administração da morfina intratecal apresentou uma incidência estimada entre 42% e 80%. Isso pode explicar a diminuição da excreção de ureia e creatinina, determinando o aumento sérico observado na administração de dose única (10 mg/kg). No entanto, Marchand et al. (1969) observaram lesões de córtex, medula e papila renal em ratos Wistar tratados cronicamente com sulfato de morfina, sugerindo nefrotoxicidade do composto. Atici et al. (2005) observaram vacuolização em células tubulares em achados histopatológicos no grupo de morfina. Assim, embora nesse experimento os animais tenham recebido dose única de morfina, a avaliação histológica do tecido renal seria adequada para verificar se o aumento dos parâmetros bioquímicos poderia estar relacionado a danos renais.

5.4 Atividade Locomotora

A avaliação da atividade locomotora foi realizada para avaliar o potencial de dependência do PT-31 GIRSUPAN, uma vez que o mecanismo de ação desse composto ocorre no SNC. Vários estudos demonstram que a administração repetidas de todas as substâncias que produzem dependência causa aumento progressivo da atividade locomotora e esse fenômeno é denominado sensibilização comportamental (PLANETA et al., 2007). É um

fenômeno duradouro e reflete processos neuroadaptativos, principalmente no sistema dopaminérgico mesolímbico, que são associados ao desenvolvimento de farmacodependência (PARO et al., 2008)

Em modelos animais, na sensibilização comportamental, observa-se o aumento gradual e progressivo da atividade locomotora após administração repetida de compostos com psicoatividade e potencial de abuso. O aumento da atividade locomotora é decorrente de adaptações neuroquímicas e moleculares do sistema dopaminérgico mesolímbico (ROBINSON; BERRIDGE, 2001; PLANETA et al., 2007). Ratos Wistar (n=6 por grupo) foram submetidos ao teste de atividade locomotora em caixa Columbus Instruments[®]. Os animais foram tratados com dimetil sulfóxido (DMSO) e PT-31 GIRSUPAN (doses 3; 5; 10; 20 mg/kg), administrados pela via intraperitoneal. Os animais foram observados durante 45 minutos (BIANCHIN et al., 1993), tempo necessário para responder aos estímulos de locomoção em modelo animal. Na figura 10 estão demonstrados os resultados do teste de atividade locomotora, sendo possível observar que o novo produto não alterou o comportamento dos animais ($p > 0,05$), em relação ao grupo salina e ao grupo DMSO.

É importante salientar que esses estudos foram realizados com dose única do composto PT-31 GIRSUPAN. Dessa forma, para uma avaliação adequada sobre o possível potencial de dependência do composto, há a necessidade da realização de testes de sensibilização comportamental com administrações múltiplas.

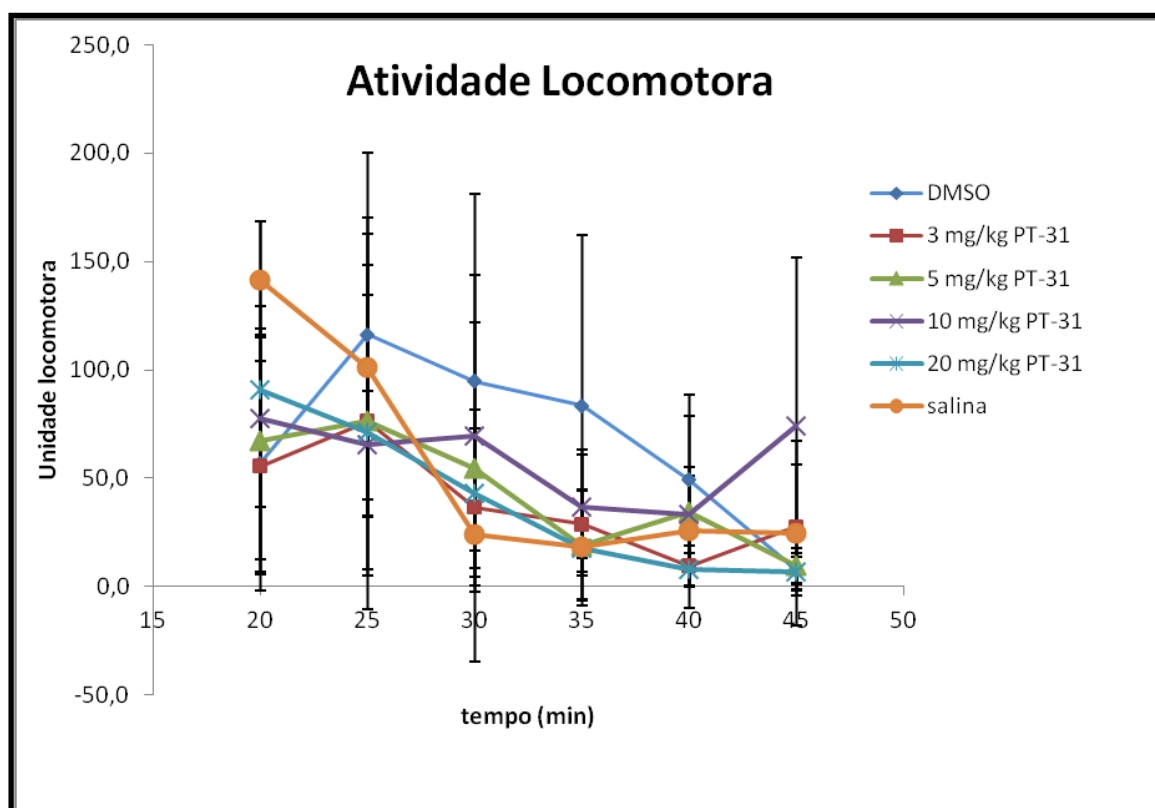
A sensibilização psicomotora é um fenômeno que é observado, principalmente, com a administração intermitente dos fármacos. Este fato torna-se mais evidente com a interrupção muito tempo depois do tratamento repetido

do que logo após a descontinuação do tratamento medicamentoso, sendo a persistência a característica mais notável da sensibilização (ROBINSON; BERRIDGE, 2001).

A morfina produz um aumento na sensibilização comportamental e este efeito é mediado pelo sistema dopaminérgico central devido à estimulação dos receptores μ -opioides. Essa sensibilização dos opiodes afeta diretamente o mecanismo de recompensa no cérebro produzindo elevadas quantidades de dopamina, as quais são liberadas no núcleo accumbens (BOMBI et al., 2011).

Estudos de atividade locomotora espontânea realizados por Silva Junior (2009), em cavalos, utilizando agonistas α_2 -adrenérgicos (xilazina) e opioides (tramadol) demonstraram que a administração de xilazina não apresentou alteração comportamental e nem foi capaz de reduzir a atividade locomotora causada pelo tramadol quando associada a ele. Esses resultados corroboram com os encontrados pelo PT-31 GIRSUPAN que os agonistas α_2 -adrenérgicos não apresentam potencial de dependência quando avaliado pela atividade locomotora.

Figura 10. Atividade locomotora em ratos Wistar após administração do composto PT-31 GIRSUPAN (media \pm DP).



$p > 0,05$

6. CONCLUSÕES

- O logP do composto PT-31 (1,24) é favorável à absorção oral.
- A estabilidade do composto nos pHs 3,0 e 7,4 é uma característica adequada à administração oral, com baixa probabilidade de ocorrência de hidrólise química nos pHs do trato digestório.
- A estabilidade em plasma sugere que o composto não sofre ação de enzimas plasmáticas e que há grande probabilidade de que o metabolismo do fármaco seja mediado por outros sistemas enzimáticos nos estudos *in vivo*.
- Não há alterações dos parâmetros bioquímicos relacionados às funções hepática e renal na exposição em dose única (10 mg/kg) ao PT-31.
- A exposição à morfina em dose única resultou em alterações dos parâmetros bioquímicos relacionados às funções hepática e renal.
- Os resultados do teste de atividade locomotora sugerem que o novo composto não demonstrou alteração em relação ao grupo salina e DMSO.
- A biodisponibilidade do composto administrado pela via oral correspondeu a cerca de 93% da observada na administração intraperitoneal e, considerando que a avaliação do efeito analgésico foi realizada por administração intraperitoneal, é possível que na administração pela via oral os mesmos efeitos analgésicos sejam observados.
- Na associação da morfina ao composto, ambos administrados pela via intraperitoneal, foi possível observar interação farmacocinética.
- As investigações realizadas até o momento evidenciam que o composto PT-31 GIRSUPAN possui características favoráveis para a continuidade do desenvolvimento do composto para potencial aplicação na terapêutica.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AFIFY, E. A.; OMAR, A. G.; NASSER, S. A. The involvement of K (ATP) channels in morphine-induced antinociception and hepatic oxidative stress in acute and inflammatory pain in rats. **Fundam. Clin. Pharmacol.**, v. 14, p. ,2012.

AIZENSTEIN, M. L.; SEGAL, D. S.; KUCZENSKY, R. Repeated amphetamine and fencamfamine: sensitization and reciprocal cross-sensitization. **Prog. Neuro-Psypharmacol. Biol. Psychiatry.**, v.7, p. 187-194, 1990.

AKIMOTO, K.; HAMAMURA, T.; KAZAHAYA, Y.; AKIYAMA, K.; OTSUKI, S. Enhanced extracellular dopamine level may be the fundamental neuropharmacological basis of cross-behavioral **sensitization** between methamphetamine and cocaine an in vivo dialysis study in freely moving rats. **Brain Res.**, v. 507, p. 344-346, 1990.

AMIDON, G. L., LENNERNAS, H., SHAH, V. P., CRISON, J. R. A theoretical basis for a biopharmaceutical drug classification: the correlation of in vitro drug product dissolution and in vivo bioavailability. **Pharm. Res.**, v. 12, p. 413–420, 1995.

AMORE, 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. **Comb. Chem. High. T Scr.**, v. 13, n. 2, p, 207-218, 2010.

ANSAH, O.B.; PERTOVAARA, A. Peripheral suppression of arthritic pain by intraarticular fadolmidine, an alpha 2-adrenoceptor agonist, in the rat. **Anesth. Analg.**, v. 105, p. 245-250, 2007.

ANTONILLI, L.; SURIANO, C.; PAOLONE, G.; BDIANI, A.; NENCINI, P. Repeated Exposures to Heroin and/or Cadmium Alter the Rate of Formation of Morphine Glucuronides in the Rat. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 307, p. 651–660, 2003.

ANVISA. **Agência nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RE 899, de 29 de maio de 2003.** Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. Disponível em <http://www.anvisa.gov.br/e-legis/>. Acesso em 10 mar 2010.

ANVISA. **Agência nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RE 1170, de 19 de abril de 2006.** Guia para provas de biodisponibilidade relativa/bioequivalência de medicamentos. Disponível em <http://www.anvisa.gov.br/e-legis/>. Acesso em 17 dez 2011.

ATHANI, A. V.; MAKOID, M. C.; BANAKAR, U. V. Issues in contemporary drug delivery. Part III. Pharmacokinetic/pharmacodynamic modeling. **J. Pharm. Technol.**, v. 6, p. 337-503, 1990.

ATICI, S.; CINEL, I.; CINEL, L.; DORUK, N.; ESKANDARI, G.; ORAL, U. Liver and kidney toxicity in chronic use of opioids: An experimental long term treatment model. **J. Biosci.**, v. 30, p. 245–252, 2005.

ATTRI, S.; RANA, S. V.; VAIPHEI, K.; SODHI, C. P.; KATYAL, R.; GOEL, R. C.; NAIN, C.K.; SINGH, K. Isoniazid and rifampicin induced oxidative hepatic injury – protection by N-acetylcysteine. **Hum. Exp. Toxicol.**, v. 19, p. 517-522, 2000.

BAHRI, A. K.; CHIANG, C. S.; TIMBRELL, A. Acetylhydrazine hepatotoxicity. **Toxicol. Appl. Pharmacol.**, v. 60, p. 561-569, 1981.

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

BENET, L. Z.; BROCCATELLI, F.; OPREA, T. I. BDDCS Applied to over 900 Drugs. **The AAPS Journal.**, v. 13, 519-547, 2011.

BENNETT, M. I.; SMITH, B. H.; TORRANCE, N.; LEE, A. J. Can pain can be more or less neuropathic? Comparison of symptom assessment tools with ratings of certainty by clinicians. **Pain.**, v. 122, p. 289 - 294, 2006.

BIANCHIN, M.; WALZ, R.; RUCHEL, AC.; ZANATTA, M.S.; DA SILVA, R.C.; BUENO E SILVA, M.; PACKO, N.; MEDINA, J.H.; IZQUIERDO, I. Memory expression is blocked by the infusion of CNQX into hippocampus and/or amygdala several days after training. **Behav. Neural.**, v.59, p.83-86, 1993.

BITTENCOURT, A. L. Mecanismo de ação do etanol: envolvimento de glutamato, gaba e dopamina. **Revista de pesquisa clínica**, v. 27, 2000. p. 64.

BJORNSSON, T. D. Practical uses of individual pharmacokinetic parameters in drug development and clinical practice: examples and simulations. **Eur. J. Drug Metab. Pharmacokinet.**, v. 22, p. 1-14, 1997.

BOMBI, L.; KNOW, S.; YEOM, M.; LEE, H.; HAHM, D. Wild Ginseng Attenuates Repetaed Morphine-Induced Behavioral Sensitization in Rats. **J. Microbiol. Biotechnol.**, v. 21, p. 757-765, 2011.

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

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Portaria nº 1083 - Protocolo clínico e diretrizes terapêuticas da dor crônica. 2012. **Diário Oficial da União**. Disponível em: http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/pt_sas_1083_dor_cronica_2012.pdf Acesso em: 25 abr 2013.

BREAZILE, J. E. Physiologic basis and consequence of distress in animals. **JAVMA.**, v.191, n.10, p.1212-1215, 1987.

BUGGINS, T. R.; DICKINSON, P.A.; TAYLOR, G. The effects of pharmaceutical excipients on drug disposition. **Adv. Drug Delivery Rev.**, 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.

BYLUND, D. B.; EIKENBERG, D. C.; HIEBLE, J. P.; LANGER, S. Z.; LEFKOWITZ, R. J.; MINNEMAN, K. P.; MOLINOF, B. P.; RUFFOLO, R. J.; TRENDELENBURG, U. International Union of Pharmacology nomenclature of adrenoceptors. **Pharmacol. Rev.**, v. 46, p. 121-136, 1994.

CADONI, C.; PISANU, A.; SOLINAS, M.; ACQUAS, E.; DI CHIARA, G. Behavioral sensitization after exposure to delta-9-tetrahydrocannabinol and cross-sensitization with morphine. **Psychopharmacology (Berl)**., v. 158, p. 259-266, 2001.

CARVALHO, W. A.; LEMÔNICA, L. Mecanismos centrais de transmissão e de modulação da dor. Atualização terapêutica. **Rev. Bras. Anesthesiol.**, v. 48, p. 221 - 240, 1998.

CATTANI, V. B.; POHLMANN, A. R.; DALLA, COSTA. T. Pharmacokinetic evaluation of indomethacin ethyl ester-loaded nanoencapsules. **Int. J. Pharm.**, v. 363, p. 214-6, 2008

CHANG, K.H. **Avaliação da bioequivalência de comprimidos contendo hidroclorotiazida**. 2002. 188f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2002.

CHEN, X. Q.; ANTMAN, M. D.; GESENBURG, C.; GUDMUNDSSON, O. S. Discovery pharmaceuticals – challenges and opportunities. **The AAPS Journal**., v. 8, p. 402 - 408, 2006.

COVINGTON, H. E.; MICZEK, K. A. Repeated social defeat stress or morphine: effects on behavioral sensitization and IV cocaine self-administration “binges”. **Psychopharmacology (Berl)**., v.158, p.388-98, 2001.

CUI, Y.; SUGIMOO, K.; ARAKI, N.; SUDOH, T.; FUJIMURA, A. Chronopharmacology of morphine in mice. **Chronobiol. Int.**, v. 22, p. 515-522, 2005.

DAUNT, D. A.; STEFFEY, E. P. Alpha-2 adrenergic agonists as analgesics in horses. **Vet. Clin. Equine.**, v. 18, p. 39-46, 2002.

DAVIES, D.M.; FERNER, R.E.; GLANVILE, H. **Textbook of adverse drug reactions**. 5th ed. London: Chapman & Hall Medical, 1998. p. 290-292.

DI CHIARA, G.; IMPERATO, A. Opposite effects of mu and kappa opiate agonists on dopamine release in the nucleus accumbens and in the dorsal caudate of freely moving rats. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v.244, n.3, p.1067-1080, 1998.

DOMINO, E.F. Nicotine-induced behavioral locomotor sensitization. **Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psych.**, v. 25, p. 59-71, 2001.

DRESSMAN, J. B.; THELEN, K.; JANTRATID, E. Towards Quantitative prediction of Oral Drug Absorption. **Clin. Pharmacokinet.**, v. 47, p. 655-667, 2008.

DUKES, M. N. G.; ARONSON, J. K. **Meyler's side effects of drugs**. 14th ed. Amsterdam, 2000, p. 205 – 210.

ETO, K.; ISHIKAWA, T.; SUN KWANG, K.; NABEKURA, J. Mechanisms of neural circuit remodeling in the primary somatosensory cortex in mouse models of chronic pain. **Brain Nerve.**, v. 65p. 623-33, 2013.

FANG, J.; LIAN, Y. H.; XIE, K. J.; CAI, S. N. Pharmacological interventions for phantom limb pain. **Chin. Med. J.**, v. 126, p. 542 - 549, 2013.

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.

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

GOODWIN, R.; GIACCONE, G.; CALVERT, H.; LOBBEZOO, M.; EISENHAUER, E. A. Targeted agents: How to select the winners in preclinical and early clinical studies? **Eur. J. Cancer.**, v. 48, p. 170–178, 2012.

GOOLE, J.; LINDLEY, D. J.; ROTH, W.; CARL, A. M.; AMIGHI, K.; KAUFFMANN, J. M.; KNIPP, G.T. The effects of excipients on transporter mediated absorption. **Int. J. Pharm.**, v. 393, p. 17-31, 2010.

GOTFRIED, J.; WIESEN, J.; RAINA, R.; NALLY, J. V. Finding the cause of acute kidney injury: Which index of fractional excretion is better? **Cleve. Clin. J. Med.**, v. 79, p. 121 – 126, 2012.

GUNELI, E.; YAVASOGLU, N. U. K.; APAYDIN, S.; UYAR, M.; UYAR, M. Analysis of the antinociceptive effect of systemic administration of Tramadol and dexmedetomidine combination on rat models of acute and neuropathic pain. **Pharmacol, Biochem, Behav.**, v. 88, p. 1-9, 2007.

GUPTA, R. C.; ATUL, B. V. Drug metabolism studies in animals models. **Indian. J. Pharmacol.**, v. 32, p. 62-66, 2000.

GUYTON, A. C.; HALL, J. E. **Tratado de fisiologia médica**. 11.ed. Rio de Janeiro:Elsevier, 2006. 115p.

HENCHOZ, Y.; BARD, B.; GUILLARME, D.; CORRUPT, P. A.; VEUTHEY, J. L.; MARTEL, S. Analytical tools for the physicochemical profiling of drug candidates to predict absorption/distribution. **Anal. Bioanal. Chem.**, v. 394, p. 707 – 729, 2009.

HORGER, B.A.; WELLMAN, P.J.; MORIEN, A.; DAVIES, B.T.; SCHENK, S. Caffeine exposure sensitizes rats to the reinforcing effects of cocaine. **Neuroreport.**, v. 2, p. 53-56, 1991.

HORGER, B.A.; GILES, M.K.; SCHENK, S. Preexposure to amphetamine and nicotine predisposes rats to self-administer a low dose of cocaine. **Psychopharmacology (Berl).**, n. 107, p. 271-276, 1992.

HORII, I. Advantages of toxicokinetics in new drug development. **Toxicol. Lett.**, v. 102, p. 657-664, 1998.

HUANG, Y.; CHERN, H.; WU, J.; CHANG, S.; CHIANG, C.; CHANG, F.; LEE, S. Cytochrome P450 2E1 genotype and the susceptibility to antituberculosis drug-induced hepatitis. **Hepatology.**, v. 37, p. 924-930, 2003.

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

HYLDEN, J. L. K.; WILCOX, M. Pharmacological characterization of substance P induced opioid and noradrenergic agonist at the spinal level. **J. Pharmacol. Exp. Therap.**, v. 404, p. 398-404, 1983.

JAFFE, J. H. Drug addiction and drug abuse. In: GILMAN, A.G.; RALL, T.W.; NIES, A.S.; TAYLOR, P. (Ed). **Goodman and Gilman's the pharmacological basis of therapeutics.** 8th ed. New York: Peragmon, 1990. p. 523-573.

KAHAN, M.; SRIVASTAVA, A.; WILSON, L.; MAILIS-GAGNON, A.; MIDMER, D. Opioids for managing chronic non-malignant pain. **Can. Fam. Physician.**, v. 52, p. 1091-1096, 2006.

KALIVAS, P.W.; DUFFY, P. Sensitization to repeated morphine injection in the rat: possible involvement of A10 dopamine neurons. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 241, p. 204-12, 1987.

KALIVAS, P.W.; STEWART, J. Dopamine transmission in the ignition an expression of drug- and stress inuced sensitization of motor activity. **Brain. Res. Rev.**, v. 16, p. 223-244, 1991.

KAMERLING, S. G.; CRAVENS, W. M. T.; BAGWELL, C. A. Objective assessment of detomidine-induced analgesia and sedation in the horse. **Eur. J. Pharmacol.**, v.151, p.1- 8, 1988.

KAMIBAYASHI, T.; MAZE, M. Clinical uses of a₂-adrenergic agonists. **Anesthesiology**, v. 93, p. 1345-1349, 2000.

KANAZI, G.E.; AOUAD, M. T.; JABBOUR-KHOURY, S. I.; AL JAZZAR, M. D.; ALAMEDDINE, M. M.; AL-YAMAN, R.; BULBUL, M.; BARAKA, A. S. Effect of low-dose dexmedetomidine or clonidine on the characteristics of bupivacaine spinal block. **Acta. Anaesthesiol. Scand.**, v. 50, p. 222 - 227, 2006.

KENNEDY, T. Managing the drug discovery/development interface. **Drug. Disc. Today.**, p. 436–444. 1997.

KHOURY, G. F.; CHEN, A. C.; GARLAND, D. E.; STEIN, C. Intraarticular morphine, bupivacaine, and morphine/bupivacaine for pain control after knee videoarthroscopy. **Anesthesiology**, v. 77, p. 263 - 266, 1992.

KIYATKIN, E. A. Functional significance of mesolimbic dopamine. **Neurosci. Biobehav. Rev.**, v. 19, p. 573-598, 1995.

KLAUMANN, P. R.; WOUK, A. F. P. F.; SILLAS, T. Pathophysiology of pain. **Archives of Veterinary Science.**, v. 13, p.1-12, 2008.

KORINTH, G.; WELLNER, T.; SCHALLER, K.; DREXLER, H. Potential of the octanol-water partition coefficient (logP) to predict the dermal penetration behavior of amphiphilic compounds in aqueous solutions. **Toxicology Letters.**, v. 215, p. 49 – 53, 2012.

KUNIMOTO, D.; WARMAN, A.; BECKON, A.; DOERING, D.; MELENKA, L. Severe hepatotoxicity associated with rifampicin-pyrazinamide preventive therapy requiring transplantation in an individual at low risk for hepatotoxicity. **Clin. Infect. Dis.**, v. 36, p. 158-161, 2003.

KWON, Y. **Handbook of essential pharmacokinetics, pharmacodynamics and drug metabolism for industrial scientists**. 1.ed. New York:Kluwer Academic Publishers, 2002. 287p.

LAKHANI, P. P.; MACMILLAN, L. B.; GUO, T. Z.; MCCOOL, B. A.; LOVINGER, D. M.; MAZE, M.; LIMBARD, L. E. Substitution of a mutant alpha(2a)-adrenergic receptor via hit and run gene targeting reveals the role of this subtype in sedative, analgesic and anesthetic-sparing responses in vivo. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, v. 94, p. 9950-9955, 1997.

LEINO, T.; VIITAMAA, T.; HAAPALINNA, A.; LEHTIMÄKI, J.; VIRTANEN, R. Pharmacological profile of intrathecal fadolmidine, a α_2 -adrenoceptor agonist, in rodent models. **Naunyn-Schmied. Arch. Pharmacol.**, v. 380, p. 539 - 550, 2009.

LENAERTS, A. J.; JOHNSON, C. M.; MARRIETA, K. S.; GRUPPO, V.; ORME, I. M. Significant increases in the levels of liver enzymes in mice treated with anti-tuberculosis drugs. **Int. J. Antimicrob. Agents.**, v. 26, p. 152-158, 2005.

LESSOV, C.N.; PHILLIPS, T.J. Cross-sensitization between the locomotor stimulant effects of ethanol and those of morphine and cocaine in mice. **Alcohol Clin. Exp. Res.**, n. 27, p.616-627, 2003.

LEESON, P. Chemical beauty contest. **Nature.**, v. 481, p. 455-456, 2012.

LEESON, P.D.; DAVIS, A. M. Time-related differences in the physical property profiles of oral drugs. **J. Med. Chem.**, v. 47, p. 6338-6348, 2004.

LENT, R. **Cem bilhões de neurônios**. São Paulo: Atheneu, 2005. p. 698.

LIKAR, R.; SCHAFER, M.; PAULAK, F.; SITTL, R.; PIPAM, W.; SCHALK, H.; GEISLER, D.; BERNATZKY, G. Intraarticular morphine analgesia in chronic pain patients with osteoarthritis. **Anesth. Analg.**, v. 84, p. 1313 - 1317, 1997.

LIN, J. H.; LU, A. Y. H. Role of Pharmacokinetics and metabolism in drug discovery and development. **Pharmacol. Rev.**, v. 49, p. 403-449, 1997.

LINK, R. E.; DESAI, K.; HEIN, L.; STEVENS, M. E.; CHRUSCINSKI, A.; BERNSTEIN, D.; BARSH, G. S.; KOBILKA, B. K. Cardiovascular regulation in mice lacking α 2-adrenergic receptor subtypes b and c. **Sci.**, v. 273, p. 803-805, 1996.

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. **Adv. Drug. Deliv. Rev.**, n. 46, p. 3-26, 1997.

MADDREY, W. C. Drug-induced hepatotoxicity. **J. Clin. Gastroenterol.**, v. 39, p. 83-89, 2005.

MAIA, J. A. C.; SUDO, G. Z.; SUDO, R. T. Dexmedetomidine prolongs spinal anaesthesia induced by levobupivacaine 0.5% in guinea-pigs. **J. Pharm. Pharmacol.**, v. 57, p. 1415 - 1420, 2005.

McDAID, J.; DALLIMORE, J.E.; MACKIE, A.R.; MICKIEWICZ, A.L.; NAPIER, T.C. Cross-sensitization to morphine in cocaine-sensitized rats: behavioral assessments correlate with enhanced responding of ventral pallidal neurons to morphine and glutamate, with diminished effects of GABA. **J. Pharmacol. Exp. Ther.** p. 1183-1193, 2005.

MACMILLAN, L. B.; HEIN, L.; SMITH, M. S.; PIASCIK, M. T.; LIMBIRD, L. E. Central hypotensive effects of the α 2A-adrenergic receptor subtype. **Sci.**, v. 273, p. 801-803, 1996.

MAIA, J. A. C.; SUDO, G. Z.; SUDO, R. T. Dexmedetomidine prolongs spinal anaesthesia induced by levobupivacaine 0.5% in guinea-pigs. **J. Pharm. Pharmacol.**, p. 1415 – 1420, 2005.

MARCHAND, C.; CANTIN, M.; CÔTÉ, M. Evidence for the nephrotoxicity of morphine sulfate in rats. **Can. J. Physiol. Pharmacol.**, v. 47, p. 649 – 655, 1969.

MEDEIROS, L.F. **Efeito da administração de anestésicos gerais, associado ou não ao procedimento cirúrgico, sobre: parâmetros comportamentais, atividades E-NTPDÁSICA e de ECTO-5'-nucleotidase em medula espinhal de ratos.** 2010. 110 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas: Fisiologia) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2010.

MEIER, Y.; CAVALLARO, M.; ROOS, M.; PAULI-MAGNUS, C.; FOLKERS, G.; MEIER, P. J.; FATTINGER, K. Incidence of drug-induced liver injury in medical inpatients. **Eur J Clin Pharmacol.** v. 61, p. 135-143, 2005.

MERSKEY H, BOGDUK N. **Classification of chronic pain: descriptions of chronic pain syndromes and definitions of pain terms.** Seattle: IASP Press; 1994. p. 101.

MEYER, P. J.; MORGAN, M. M.; KOZELL, L. B.; INGRAM, S. L. Contribution of dopamine receptors to periaqueductal gray-mediated antinociception. **Psychopharmacology.**, v. 204, p.531-540, 2009.

MILLAN, M. Evidence that an alpha-2A adrenoceptor subtype mediates antinociception in mice. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 215, p. 355-356, 1992.

MIRANDA, H.; PINARDI, G. Isobolographic analysis of the antinociceptive interactions of clonidine with nonsteroidal anti-inflammatory drugs. **Pharmacol. Res.**, v. 50, p. 273-278, 2004.

MISERENDINO, M.J.; NESTLER, E.J. Behavioral sensitization to cocaine: modulation by the cyclic AMP system in the nucleus accumbens. **Brain Res.**, v. 674, p. 299-306, 1995.

MOHAMED, A. A.; FARES, K. M.; MOHAMED, S. A. Efficacy of intrathecally administered dexmedetomidine versus dexmedetomidine with fentanyl in patients undergoing major abdominal cancer surgery. **Pain Physician.**, v. 15, p. 339 - 348, 2012.

MOTSCH, J.; GRABER, E.; LUNDWIG, K. Addition of clonidine enhances postoperative analgesia from epidural morphine: a double-blind study. **Anesthesiology.**, v. 73, p. 1067 - 1073, 1990.

NAGAMATSU, K.; OHNO, Y.; IKEBUSHI, H.; TAKAHASHI, A.; TERAO, T.; TANAKA, A. Morphine metabolism in isolated rat hepatocytes and its implications for hepatotoxicity. **Biochemical. Pharmacology.**, v. 35, p. 3543 - 3548, 1986.

NEERVANNAN, S. Preclinical formulations for discovery and toxicology: physicochemical challenges. **Expert. Opin. Drug Metab. Toxicol.**, v. 2, p. 715 – 731, 2006.

NESTLER, E.J.; HYMAN S.E.; ROBERT, C.M. **Molecular neuropharmacology: a foundation for clinical neuroscience.** New York: McGraw-Hill, 2001. p. 539.

NIEMI, R.; HUUSKONEN, J.; LAINE, K.; JARVINEN, T. Synthesis, hydrolysis, and intraocular pressure lowering effects of fadolmidine prodrugs. **Int. J. Pharm.**, v. 295, p. 121-127, 2005.

O'BRIEN, C.P. Drug addiction and drug abuse. In: HARDMAN, J.G.; LIMBIRD, L.E. (Ed). **Goodman and Gilman's the pharmacological basis of therapeutics.** 10thed. New York: Pergamon, 2001, p. 621-642.

OECD GUIDELINE FOR THE TESTING OF CHEMICALS. Partition Coefficient (n-octanol/water): Shake Flask Method. Adopted by the Council on 27th July 1995.

OSSIPOV, M.; SUAREZ, L.; SPAULDING, T. Antinociceptive interactions between alpha2-adrenergic and opiate agonists at the spinal level in rodents. **Anesth. Analg.**, v. 68, p. 194-200, 1989.

OTERO, P. E. Fármacos analgésicos. In: **Dor: avaliação e tratamento em pequenos animais**. São Caetano do Sul: Interbook, 2005. p. 293.

ÖZDOGAN, U. K.; LÄHDESMÄKI, J.; SCHEININ, M. The analgesic efficacy of partial opioid agonists is increased in mice with targeted inactivation of the $\alpha 2A$ -adrenoceptor gene. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 529, p. 105-113, 2006.

PACHAGNULA, R.; THOMAS, N. S. Biopharmaceutics and pharmacokinetics in drug research. **Inter. J. Pharm.**, v. 201, p. 131 -150, 2000.

PADDLEFORD, R. R. Fármacos pré-anestésicas. In: **Manual de anestesia em pequenos animais**. 2.ed. São Paulo: Roca, 2001. p.15-35.

PARIS, A.; MANTZ, J.; TONNER, P.; HEIN, L.; BREDE, M.; GRESSENS, P. The effects dexmedetomidine on perinatal excitotoxic brain injury are mediated by the $\alpha 2a$ -adrenoceptor subtype. **Anesth. Analg.**, p. 456-461, 2006.

PARO, A. H.; AIZENTEIN, M. L.; DELUCIA, R.; PLANETA, C.S. Exposição repetida à cafeína aumenta a atividade locomotora induzida pelo femproporex em ratos adolescentes e adultos. **Braz. J. Pharm. Sci.**, v. 44, p. 417-424, 2008.

PERTOVAARA, A. Antinociceptive properties of fadolmidine (MPV-2426), a novel alpha2-adrenoceptor agonist. **CNS Drug Rev.**, v. 10, p. 117-126, 2004.

PESTEL, S.; MARTIN, H. J.; MAIER, G. M.; GUTH, B. Effect of commonly used vehicles on gastrointestinal, renal, and liver function in rats. **J. Pharmacol. Toxicol. Methods.**, v. 54, p. 200-214, 2006.

PHILLIPS, T.J.; ROBERBS, A.J.; LESSOV, C.N. Behavioral sensitization to ethanol: genetics and the effects of stress. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, v. 57, p. 487-493, 1997.

PIDEGEON, C.; ONG, S.; LIU, H.; QIU, X.; PIDEGEON, M.; DANTZIG, A. H.; MUNROE, J.; HORNBACK, W. J.; KASHER, J. S.; GLUNZ, L.; SZCZERBA, T. IAM chromatography: an in vitro screen for predicting drug membrane permeability. **J. Med. Chem.**, v. 38, p. 590-594, 1995.

PIERCE, R.C.; KALIVAS, P.W. A circuitry model of the expression of behavioral sensitization to amphetamine-like psychostimulants cocaine. **Brain Res. Rev.**, v. 25, p. 192-216, 1997a.

PIFFERI, G.; RESTANI, P. The safety of pharmaceutical excipients. **II. Farmaco.** v. 58, p. 541-550, 2002.

PLANETA, C. S.; CRUZ, F. C.; MARIN, M. T.; AIZENSTEIN, M. L.; DELUCIA, R. Ontogênese, estresse e dependência de substâncias psicoativas. **Braz. J. Pharm. Sci.**, v. 43, p. 335-346, 2007.

POST, R.M.; CONTEL, N.R. Human and animal studies of cocaine: implications of development of behavioral pathology. In: CREESE, I. (Ed). **Stimulants: neurochemical, behavioral and clinical perspectives**. New York: Raven, 1983. p. 169 - 203.

POWEL, K.R.; HOLTZMAN, S.G. Parametric evaluation of the development of sensitization to the effects of morphine on locomotor activity. **Drug Alcohol Depend.**, v. 62, p. 83-90, 2001.

RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M.; MOORE, P. K. **Rang & Dale Farmacologia**. 5th ed. London: Churchill Livingstone. 2003, cap. 40, p. 640 – 650.

RAVINDEL, P.; VAIPHEI, K.; SINGH, K.; RANA, S. V. Effect of garlic on isoniazida and rifampicin-induced hepatic injury in rats. **World Gastroenterol.**, v. 12, p. 636-639, 2006.

ROBISON, T.E.; BECKER, J.B. Enduring changes in brain and behavior produced by chronic amphetamine administration: a review and evaluation of animals models of amphetamine psychosis. **Brain Res. Rev.**, v. 396, p. 157-198, 1986.

ROBINSON, T.E.; BERRIDGE, K.C. The neural basis of drug craving: an incentive-sensitization theory of addiction. **Brain Res. Rev.**, v.18, p.247-291, 1993.

ROBINSON, T.E.; BERRIDGE, K.C. Incentive sensitization and addiction. **Addiction.**, v.96, p.103-114, 2001.

ROMERO, T. R. L.; DUARTE, I. D. G. α 2-Adrenoceptor agonist xylazine induces peripheral antinociceptive effect by activation of the L-arginine/nitric oxide/cyclic GMP pathway in rat. **Eur. J. Pharmacol.**, v.613, p.64-67, 2009.

ROMERO, T. R. L. ; PEREZ, A. C.; FRANCISCHI, J. N.; DUARTE, I. D. G. Probable involvement of α 2C-adrenoceptor subtype and endogenous opioid peptides in the peripheral antinociceptive effect induced by xylazine. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 608, p.23-27, 2009.

RUAN, X. Drug-Related Side Effects of Long-term Intrathecal Morphine Therapy. **Pain Physician.**, v. 10, p. 357-365, 2007.

RUIZ-GARCIA, A.; BERMEJO, M.; MOSS, A.; CASABO. Pharmacokinetics in drug Discovery. **J. Pharm. Sci.**, v. 97, p. 654-690, 2008.

SALAMONE, J.D. The involvement of nucleus accumbens dopamine in appetitive and aversive motivation. **Behav. Brain Res.**, n. 61, p. 117-133, 1994.

SCHESTATSKY, P.; NASCIMENTO, O. J. What do general neurologists need to know about neuropathic pain? **Arq. Neuropsiquiatr.**, v. 67, p. 741 - 749, 2009.

SHIM, I.; JAVAID, J.I.; WIRTSHAFTER, D.; JANG, S.Y.; SHIN, K.H.; LEE, H.J.; CHUNG, Y.C.; CHUN, B.G. Nicotine-induced behavioral sensitization is associated with extracellular dopamine release and expression of c-FOS in the striatum and nucleus accumbens of the rat. **Behav. Brain Res.**, v. 121, p. 137-147, 2001.

SCHOENWALD, R. D. **Pharmacokinetics in Drug Discovery and Development**. 11th. ed. New York: CRC Press, 2002. p. 57-71.

SCHULTZ, W.; DAYAN, P.; MONTAGUE, P.R. A neural substrate of prediction and reward. **Sci.**, p. 1593-1599, 1997.

SHUKRY, M.; KENNEDY, K. Dexmedetomidine as total intravenous anesthetic in infants. **Paediatr. Anaesth.**, p. 581-583, 2007.

SIERRALTA, F.; NAQUIRA, D.; PINARDI, G.; MIRANDA, H. α_2 -adrenoceptor and opioid receptor modulation of clonidine induced antinociception. **Br. J. Pharmacol.**, v. 119, p. 551-554, 1996.

SODERMAN, A. R.; UNTERWALD, E. M. Cocaine reward and hyperactivity in the rat: sites of mu opioid receptor modulation. **Neuroscience.**, v.154, p. 1506-1516, 2008.

SODRÉ, F. L.; COSTAS, J. C. B.; LIMA, J. C. C. Avaliação da função e da lesão renal. **J Bras Patol Med Lab.**, v. 43, p. 329 - 337, 2007.

STEIN, C.; COMISEL, K.; HAIMERL, E.; YASSOURIDIS, A.; LEHRBERGER, K.; HERZ, A.; PETER, K. Analgesic effect of intraarticular morphine after arthroscopic knee surgery. **N. Engl. J. Med.**, v. 325, p. 1123 - 1126, 1991.

STEIN, A.; YASSOURIDIS, A.; SZOPKO, C.; HELMKE, K.; STEIN, C. Intraarticular morphine versus dexamethasone in chronic arthritis. **Pain.**, v. 83, p. 525 - 532, 1999.

SUDO, R. T.; CALASANS-MAIA, J. A; GALDINO, S. L.; LIMA, M. C. A; ZAPATA-SUDO, G.; HERNANDES, M. Z.; PITTA, I. R. Interaction of Morphine With a New α 2-Adrenoceptor Agonist in Mice. **J. Pain.**, v.11, p. 71-78, 2010.

SUMATHI, T.; DEVARAJ, S. N. Effect of Bacopa monniera on liver and kidney toxicity in chronic use of opioids. **Phytomedicine.**, v. 16, 897-903, 2009.

TALLARIDA, R. An overview of drug combination analysis with isobolograms. **J Pharmacol Exp Ther.**, v. 319, p. 1-7, 2006.

TANG, J.; WU, G.; PENG, L. Pharmacokinetics of propofol in patients undergoing total hip replacement: effect of acute hypervolemic hemodilution. **Anaesthesist.**, v. 60, p. 835-840, 2011.

TONG, W. Q. **Biopharmaceutics applications in drug development.** In: Krishna- Yu (Ed.) Molecular and physicochemical properties impacting oral absorption of drugs. Springer, USA, p. 26–45, 2008.

TOUTAIN, P. L.; BOUSQUET-MELOU, S. Plasma clearance. **J. Vet. Pharmacol. Therap.**, v. 27, p. 415 - 425, 2004a.

TOUTAIN, P. L.; BOUSQUET-MELOU, S. Plasma terminal half-life. **J. Vet. Pharmacol. Therap.**, v. 27, p. 427- 439, 2004b.

TOUTAIN, P. L.; BOUSQUET-MELOU, S. Volumes of distribution. **J. Vet. Pharmacol. Therap.**, v. 27, p. 441 - 453, 2004c.

TOZER, T. N. Concepts basic to pharmacokinetics. **Pharmacol. Ther.**, v. 12, p. 109 - 131, 1981.

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

UHLÉN, S.; WIKBERG, J. Delineation of rat kidney α_2A -and α_2B - adrenoceptors with [3H] RX 821002 radioligand binding: computer modeling reveals that guanfacine is an α_2A -selective compound. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 202, p. 235-243, 1991.

ULGER, F.; BOZKURT, A.; BILGE, S. S.; ILKAYA, F.; DILEK, A.; BOSTANCI, M. O.; ÇİFTÇIOĞLU, E.; GÜLDOĞUS, F. The antinociceptive effects of intravenous dexmedetomidine in colorectal distension-induced visceral pain in rats: the role of opioid receptors. **Anesth. Analg.**, v. 109, p. 616-622, 2009.

URSO, R.; BLARDI, P.; GIORGI, G. A short introduction to pharmacokinetics. **Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.**, v. 6, p. 33-44, 2002.

VAUGHAN, C. W.; CONNOR, D. M. Search of a role for the morphine metabolite morphine-3-glucuronide. **Anesth. Analg.**, v. 97, p. 311–312, 2003.

VALVERDE, A.; GUNKEL, C. I. Pain management in horses and farm animals. **J Vet. Emerg. Crit. Care.**, v.15, n.4, p.295-307, 2005.

VAN DE WATERBEEMD, H.; GRIFFORD E. ADMET *in silico* modeling: towards prediction paradise? **Nature.**, p. 192-204, 2003.

VANDERSHUREN, L.J.M.J.; SCHOFFELMEER, A.H.M.; DE VRIES, T.J. Dopaminergic mechanisms mediating the long-term expression of locomotor sensitization following pre-exposure to morphine or amphetamine. **Psychopharmacol.**, v. 143, p. 244-253, 1999.

VEZINA, P.; QUEEN, A.L. Induction of locomotor sensitization by amphetamine requires the activation of NMDA receptors in the rat ventral tegmental area. **Psychopharmacology (Berl).**, v. 151, p. 184-91, 2000.

WAIKAR, S. S.; BONVENTRE, J. V. Biomarkers for the diagnosis of acute kidney injury. **Nephron Clin Pract.**, v. 109, p. 192 – 197, 2008.

WENLOCK, M. C.; AUSTIN, R. P.; BARTON, P.; DAVIS, A. M.; LEESON, P. D. A comparison of physicochemical property profiles of development and marketed oral drugs. **J. Med. Chem.**, v. 46, p. 1250 -1256, 2003.

WINIWARTER, S.; BONHAM, N. M.; AX, F.; HALLBERG, A.; LENNERNAS, H.; KARLÉN, A. Correlation of human jejuna permeability (in vivo) of drugs with experimentally and theoretically derived parameters. A multivariate data analysis approach. **J. Med. Chem.**, v. 41, p. 4939 - 4949, 1998.

WINTER, M. E. **Basic clinical pharmacokinetics**. 4th ed. Washington, DC: Applied Therapeutics, 2004. p. 893.

WITTEWER, R.; KERN, S. E. Role of morphine's metabolites in analgesia: concepts and controversies. **The AAPS Journal.**, v. 8, p. 349-352, 2006.

WU, C. Y.; BENET, L. Z. Predicting drug disposition via application of BCS: transport/absorption/elimination interplay and development of a biopharmaceutics drug disposition classification system. **Pharm. Res.**, v. 22, p. 11-23, 2005.

XU, M.; KONTINEN, V. K.; KALSO, E. Effects of radolmidine, a novel alpha2-adrenergic agonist compared with dexmedetomidine in different pain models in the rat. **Anesthesiology.**, v. 93, p. 473-481, 2000.

YUN-TAO ZHANG, Y. T.; QIU-SHENG ZHENG, Q. S.; JING PAN, J.; RONG-LIANG ZHENG, R. L. Oxidative Damage of Biomolecules in Mouse Liver Induced by Morphine and Protected by Antioxidants. **Basic. Clin. Pharmacol. Toxicol.**, v. 95, p. 53 - 58, 2004.

ZIMMERMAN, H. F.; ISHAK, K. G. Hepatic injury due to drugs and toxins. In: MACSWEEN, R. N. M.; ANTHONY, P. P.; SCHEVER, P. J. **Pathology of the liver**. 4th ed. London: Churchill Livingstone, 1987. cap 16, p. 503-573.

ANEXOS

1. Concentrações plasmáticas do composto PT-31 GIRSUPAN isolado (10 mg/kg) e associado à morfina (6 mg/kg), nas vias oral e i.p.

PT-31 ip											
Tempo (h)	ng/mL					média	DP	CV	ic-	ic+	Mediana
	conc 1	conc 2	conc 3	conc 4	conc 5						
0,083333333	13795,65	12897,43	12896,83	13542,39	12491,93	13124,85	531,18	4,05	12465,00	13784,00	12897,43
0,25	12675,43	10430,09	13466,87	13324,87	12976,56	12574,76	1237,92	9,84	11038,00	14112,00	12976,56
0,5	10543,87	10876,98	11863,31	13634,08	11496,88	11683,02	1206,35	10,33	10185,00	13181,00	11496,88
0,75	10876,34	11804,74	12182,95	10786,29	9998,76	11129,82	869,79	7,81	10050,00	12210,00	10876,34
1	9566,01	10991,59	10115,98	11478,87	10345,21	10499,53	748,93	7,13	9570,00	11429,00	10345,21
2	9634,87	9477,95	10873,59	9723,57	10063,10	9954,62	556,58	5,59	9264,00	10646,00	9723,57
4	6507,84	6293,47	5466,59	5752,59	5654,98	5935,09	443,77	7,48	5384,00	6486,00	5752,59
6	3585,60	3018,30	3421,87	3184,64	3290,65	3300,21	217,47	6,59	3030,00	3570,00	3290,65
8	2063,62	2187,65	2257,48	2398,06	2574,98	2296,36	197,15	8,59	2052,00	2541,00	2257,48
10	818,29	998,65	1092,77	1002,65	1156,87	1013,85	127,76	12,60	855,00	1172,00	1002,65

PT-31 + morfina ip											
Tempo (h)	ng/mL					média	DP	CV	ic-	ic+	Mediana
	conc 1	conc 2	conc 3	conc 4	conc 5						
0,083333333	14365,98	13980,98	13339,14	15929,95	15115,06	14546,22	1005,90	6,92	13297,00	15795,00	14365,98
0,25	10605,16	13335,93	11983,76	12023,45	12912,56	12172,17	1050,67	8,63	10868,00	13477,00	12023,45
0,5	12875,98	11764,98	12764,99	10762,65	11342,67	11902,25	911,47	7,66	10771,00	13034,00	11764,98
0,75	10597,17	11584,53	11566,16	9277,47	13522,59	11309,58	1555,30	13,75	9378,00	13241,00	11566,16
1	10488,56	11502,75	9743,94	9803,65	10459,34	10399,65	709,49	6,82	9519,00	11281,00	10459,34
2	9374,57	10887,98	10340,09	8907,74	11000,25	10102,13	926,92	9,18	8951,00	11253,00	10340,09
4	4161,21	4125,55	5239,25	4829,39	5398,52	4750,78	592,21	12,47	4015,00	5486,00	4829,39
6	2613,10	3633,74	2846,76	3021,87	3658,27	3154,75	471,40	14,94	2569,00	3740,00	3021,87
8	1563,87	1209,03	1253,47	1665,91	1453,78	1429,21	196,30	13,73	1185,00	1673,00	1453,78
10	786,65	879,05	658,76	763,45	809,76	779,53	80,18	10,29	680,00	879,00	786,65

PT-31 oral											
Tempo (h)	ng/mL					média	DP	CV	ic-	ic+	Mediana
	conc 1	conc 2	conc 3	conc 4	conc 5						
0,083333333	2048,20	2216,98	2354,22	2287,82	2165,98	2214,64	117,17	5,29	2069,00	2360,00	2216,98
0,25	5610,47	5741,47	4695,11	5564,98	5362,89	5394,98	414,20	7,68	4881,00	5909,00	5564,98
0,5	6980,87	7564,34	8317,96	7768,98	8035,24	7733,48	507,19	6,56	7104,00	8363,00	7768,98
0,75	7750,14	7449,08	8245,98	7953,87	8054,90	7890,79	304,94	3,86	7512,00	8269,00	7953,87
1,5	8115,87	6985,16	7865,78	7564,36	7356,76	7577,58	439,52	5,80	7032,00	8123,00	7564,36
4	5525,65	5871,42	5753,47	5642,76	5743,98	5707,46	129,97	2,28	5546,00	5869,00	5743,98
6	4362,24	5676,78	4589,76	4763,67	4912,59	4861,01	499,99	10,29	4240,00	5482,00	4763,67
8	2299,14	2845,98	2564,89	2687,27	2497,63	2578,98	205,03	7,95	2324,00	2834,00	2564,89
10	1082,34	1375,92	1276,98	1183,72	1297,56	1243,30	113,05	9,09	1103,00	1384,00	1276,98

2. Parâmetros farmacocinéticos do composto PT-31 GIRSUPAN isolado (10 mg/kg) e associado à morfina (6 mg/kg), nas vias oral e i.p.

Kel (h-1)											
Grupo	1	2	3	4	5	média	DP	CV	ic-	ic+	Mediana
PT-31 ip	0,256	0,243	0,243	0,250	0,228	0,244	0,010	4,289	0,231	0,257	0,243
PT-31 + morf ip	0,281	0,287	0,299	0,272	0,283	0,284	0,010	3,459	0,272	0,297	0,283
PT-31 oral	0,190	0,167	0,183	0,190	0,186	0,183	0,010	5,199	0,171	0,195	0,186

t 1/2 (h)											
Grupo	1	2	3	4	5	média	DP	CV	ic-	ic+	Mediana
PT-31 ip	2,710	2,850	2,850	2,770	3,040	2,844	0,010	0,346	2,690	2,998	2,850
PT-31 + morf ip	2,460	2,410	2,320	2,550	2,450	2,438	0,083	3,424	2,334	2,542	2,450
PT-31 oral	3,670	4,150	3,790	3,650	3,720	3,796	0,205	5,404	3,541	4,051	3,720

ASC0-t (ug/mL.h)											
Grupo	1	2	3	4	5	média	DP	CV	ic-	ic+	Mediana
PT-31 ip	54,710	54,000	55,910	55,440	54,880	54,988	0,728	1,324	54,080	55,890	54,880
PT-31 + morf ip	47,350	52,120	50,630	48,130	50,030	49,652	1,924	3,875	47,260	52,040	50,030
PT-31 oral	46,980	49,980	48,690	48,340	48,330	48,464	1,071	2,209	47,130	49,790	48,340

ASC0-inf (ug/mL.h)											
Grupo	1	2	3	4	5	média	DP	CV	ic-	ic+	Mediana
PT-31 ip	57,910	58,110	60,410	59,450	59,950	59,166	1,111	1,877	57,790	60,550	59,450
PT-31 + morf ip	50,150	55,180	52,830	50,940	57,900	53,400	3,176	5,948	49,460	57,340	52,830
PT-31 oral	52,680	57,220	55,670	54,670	55,310	55,110	1,651	2,996	53,060	57,160	55,310

Cl (L/h)											
Grupo	1	2	3	4	5	média	DP	CV	ic-	ic+	Mediana
PT-31 ip	0,173	0,172	0,165	0,178	0,167	0,171	0,005	3,010	0,162	0,174	0,172
PT-31 + morf ip	0,199	0,181	0,189	0,196	0,173	0,188	0,011	5,711	0,172	0,200	0,189
PT-31 oral	0,189	0,175	0,179	0,183	0,181	0,181	0,005	2,854	0,175	0,188	0,181

Vd (L)											
Grupo	1	2	3	4	5	média	DP	CV	ic-	ic+	Mediana
PT-31 ip	0,674	0,710	0,681	0,673	0,731	0,694	0,026	3,699	0,623	0,713	0,681
PT-31 + morf ip	0,709	0,631	0,633	0,721	0,610	0,661	0,050	7,638	0,597	0,723	0,633
PT-31 oral	0,995	1,017	0,978	0,963	0,973	0,985	0,021	2,154	0,955	1,013	0,978

MRT (h)											
Grupo	1	2	3	4	5	média	DP	CV	ic-	ic+	Mediana
PT-31 ip	3,900	4,110	4,110	4,000	4,380	4,100	0,179	4,373	3,877	4,323	4,110
PT-31 + morf ip	3,560	3,480	3,340	3,670	3,530	3,516	0,121	3,428	3,366	3,666	3,530
PT-31 oral	4,940	5,710	5,240	5,140	5,300	5,266	0,283	5,381	4,914	5,618	5,240

r (%)											
Grupo	1	2	3	4	5	média	DP	CV	ic-	ic+	Mediana
PT-31 ip	94,474	92,927	92,551	93,254	91,542	92,950	1,067	1,148	91,620	94,270	92,927
PT-31 + morf ip	94,417	94,454	95,835	94,483	86,407	93,119	3,800	4,081	88,400	97,740	94,454
PT-31 oral	89,180	85,600	87,462	88,583	87,380	87,641	1,371	1,565	85,940	89,340	87,462

PT-31 oral	1	2	3	4	5	média	DP	CV	ic-	ic+	Mediana
Ka	1,650	3,720	3,990	3,920	3,840	3,424	0,997	29,111	2,186	4,662	3,840
t 1/2 a	0,420	0,190	0,170	0,180	0,180	0,228	0,108	47,177	0,094	0,362	0,180

3. Concentrações plasmáticas do composto PT-31 GIRSUPAN para determinação da estabilidade química (pHs 3,0 e 7,4) e estabilidade *ex vivo*.

pH 3,0							pH 7,4						
t	rel1	rel2	rel3	média	ic+	ic-	t	rel1	rel2	rel3	média	ic+	ic-
0	7,519883	6,630439	6,335407	6,828576	1,526979	1,046518	0	7,037399	7,238444	7,294886	7,190243	0,339757	0,340243
0,25	7,237614	6,852549	6,573297	6,88782	0,823291	0,506631	0,25	7,525687	7,201497	7,330858	7,352681	0,407319	0,402681
0,5	6,755324	6,794766	6,908107	6,819399	0,202823	0,285885	0,5	7,278971	7,085473	7,129887	7,164777	0,255223	0,254777
1	7,219366	6,437835	6,74565	6,80095	0,976828	0,923427	1	7,06758	7,343252	7,544119	7,318317	0,591683	0,598317
2	7,330737	6,960313	6,886989	7,059346	0,585098	0,420322	1,5	7,496707	7,402469	6,701979	7,200385	1,079615	1,080385
4	7,38951	7,275423	7,06952	7,244817	0,399627	0,225075	4	6,847034	7,17112	6,767965	6,928706	0,531294	0,528706
8	7,104413	6,71807	7,618493	7,146992	1,119675	1,59627	12	7,217242	7,438671	7,361576	7,339163	0,280837	0,279163
12	6,86188	6,61666	7,087785	6,855442	0,589003	0,821119							

Plasma						
t	rel1	rel2	rel3	média	ic+	ic-
0	5,352125	5,249676	5,163444	5,255082	0,234918	0,235082
0,25	5,02045	5,28412	5,209912	5,171494	0,338506	0,341494
0,5	5,392693	5,960877	6,041398	5,798323	0,871677	0,878323
1	5,587197	6,061124	6,292856	5,980392	0,889608	0,890392
2	7,021455	6,820449	6,367226	6,736376	0,833624	0,836376
3	5,904563	6,188624	5,298347	5,797178	1,132822	1,127178
4	5,761499	5,891236	6,316298	5,989677	0,720323	0,719677
8	6,525586	6,248722	6,844935	6,539748	0,740252	0,739748
12	6,230179	6,505342	5,497991	6,077837	1,292163	1,297837

t: tempo

4. Atividade locomotora do composto PT-31 GIRSUPAN e do grupo DMSO através da via i.p.

tempo (min)	DMSO						média	dp	cv
	1	2	3	4	5	6			
5	573	640	620	108	690	527	526,3	212,4	40,4
10	155	163	354	63	218	191	190,7	95,7	50,2
15	299	78	203	25	245	44	149,0	115,0	77,2
20	4	54	68	18	168	30	57,0	59,2	103,8
25	5	54	200	137	219	82	116,2	84,2	72,5
30	185	37	13	44	68	221	94,7	86,5	91,4
35	220	19	111	63	88	0	83,5	78,7	94,2
40	37	54	76	3	109	17	49,3	39,1	79,2
45	9	18	1	7	8	2	7,5	6,1	81,2
soma	1487	1117	1646	468	1813	1114	1274,2	484,6	197,8

tempo (min)	3 mg/kg						média	dp	cv
	1	2	3	4	5	6			
5	119	328	800	826	411	412	482,7	277,4	57,5
10	56	207	402	462	57	347	255,2	175,5	68,8
15	18	65	108	225	27	144	97,8	78,6	80,3
20	46	8	43	89	12	135	55,5	48,7	87,7
25	23	10	190	186	26	22	76,2	86,8	114,0
30	45	8	16	105	12	34	36,7	36,3	99,1
35	3	1	10	17	88	53	28,7	34,7	121,1
40	20	0	0	7	22	8	9,5	9,5	100,5
45	24	18	2	84	15	22	27,5	28,7	104,5
soma	354	645	1571	2001	670	1177	1069,7	629,7	257,1

		5 mg/kg								
tempo (min)	1	2	3	4	5	6	média	dp	cv	
5	614	318	735	572	521	474	539,0	140,4	26,0	
10	433	235	364	297	94	262	280,8	116,4	41,4	
15	326	31	280	179	69	105	165,0	118,4	71,8	
20	10	42	175	105	49	23	67,3	62,0	92,1	
25	38	16	182	141	78	5	76,7	71,5	93,2	
30	31	2	2	234	43	16	54,7	89,3	163,4	
35	9	7	0	7	22	68	18,8	25,1	133,5	
40	15	21	1	20	25	123	34,2	44,3	129,7	
45	20	4	1	12	18	2	9,5	8,3	87,8	
soma	1496	676	1740	1567	919	1078	1246,0	417,0	170,3	

		10 mg/kg								
tempo (min)	1	2	3	4	5	6	média	dp	CV	
5	776	346	474	655	189	702	523,7	227,5	43,4	
10	269	106	67	426	205	377	241,7	143,7	59,5	
15	144	117	228	196	172	235	182,0	46,7	25,6	
20	22	87	53	144	71	90	77,8	41,0	52,6	
25	39	61	65	60	54	113	65,3	25,1	38,4	
30	56	23	22	155	50	110	69,3	52,8	76,1	
35	26	68	51	52	18	6	36,8	23,8	64,5	
40	50	11	61	47	14	18	33,5	21,6	64,5	
45	50	1	3	146	51	192	73,8	78,2	105,9	
soma	1432	820	1024	1881	824	1843	1304,0	486,4	198,6	

		20 mg/kg								
tempo (min)	1	2	3	4	5	6	média	dp	CV	
5	345	369	749	517	450	354	464,0	154,6	33,3	
10	127	164	450	167	221	96	204,2	127,6	62,5	
15	71	18	259	127	64	72	101,8	84,4	82,9	
20	75	66	84	243	58	18	90,7	78,0	86,1	
25	9	40	172	117	74	16	71,3	63,5	89,0	
30	41	65	106	36	4	5	42,8	38,7	90,2	
35	37	23	9	18	10	10	17,8	10,9	61,2	
40	8	20	5	0	2	13	8,0	7,5	93,2	
45	8	24	3	2	2	3	7,0	8,6	123,2	
soma	721	789	1837	1227	885	587	1007,7	460,0	187,785	

		salina								
tempo (min)	1	2	3	4	5	6	média	dp	CV	
5	581	374	289				414,7	150,2	36,2	
10	322	191	112				208,3	106,1	50,9	
15	193	180	198				190,3	9,3	4,9	
20	159	111	155				141,7	26,6	18,8	
25	140	142	22				101,3	68,7	67,8	
30	18	53	1				24,0	26,5	110,5	
35	4	49	1				18,0	26,9	149,4	
40	26	51	0				25,7	25,5	99,4	
45	74	0	0				24,7	42,7	173,2	
soma	1517	1151	778				861,5	648,8	264,853	

5. Parâmetros bioquímicos do composto PT-31 GIRSUPAN isolado (10 mg/kg), associado à morfina (6 mg/kg) e da morfina através da via i.p.

TGO							
animais	DMSO	PT- 4h	PT- 8h	PT+morf- 4h	PT+morf- 8h	morf 4h	morf 8h
1	144	129	198	350	345	185	240
2	228	171	216	160	305	200	230
3	132		282	195	310	230	190
4	192	249	219	295	515	220	150
5	153	126	168	240	285	265	220
6	87	183	168	190	180	335	220
7	153	132	246	305	270	295	280
8		162	246	210	255	195	270
9		108	279	160	190		
10		324	177	240	200		
média	155,5714286	176	219,9	234,5	285,5	240,625	225
DP	44,67981327	69,61680832	42,73289131	64,35362374	97,7084666	53,21368648	41,74754056
CV	28,71980651	39,55500472	19,43287463	27,44290991	34,22363103	22,1147788	18,55446247
IC	114,25 - 196,89	122,49 - 229,51	189,33 - 250,47	189,33 - 250,48	189,33 - 250,49	189,33 - 250,50	189,33 - 250,51
mediana	153	162	217,5	225	277,5	225	225

TGP							
animais	DMSO	PT- 4h	PT- 8h	PT+morf- 4h	PT+morf- 8h	morf 4h	morf 8h
1	135	96	114	260	325	90	125
2	141	195	159	275	230	135	125
3	147		51	225	355	135	125
4	126	108	147	275	395	125	140
5	201	138	147	210	225	150	130
6	138	171		210	190	235	175
7	75	141	141	255	250	100	100
8		177	84	220	210	100	90
9		186	120	185	190		
10			66	235	235		
média	137,5714286	151,5	114,3333333	235	260,5	133,75	126,25
DP	36,92269917	36,60210767	38,95510236	30,36811193	71,97414659	45,96194078	25,5999442
CV	26,83892983	24,15980704	34,0715181	12,92260082	27,62923094	34,36406787	20,27718352
IC	103,42 - 171,72	120,9 - 182,1	84,39 - 144,28	84,39 - 144,29	84,39 - 144,30	84,39 - 144,31	84,39 - 144,32
mediana	138	156	120	230	232,5	130	125

Creatinina							
animais	DMSO	PT- 4h	PT- 8h	PT+morf- 4h	PT+morf- 8h	morf 4h	morf 8h
1		0,70934	0,4892	1,3161	1,0824	1,229813665	0,869565217
2	0,04892	1,24746	0,42805	1,1808	0,9963	0,819875776	0,919254658
3	0,63596		0,77049	1,0455	1,1316	0,782608696	0,757763975
4	0,72157	0,1223	0,55035	1,0209	0,8487	0,795031056	0,745341615
5	0,81941	0,57481	0,18345	1,3653	0,8733	1,440993789	1,055900621
6	1,27192		0,56258	0,738	0,738	0,919254658	0,708074534
7		0,86833	1,57767	1,1562	1,0209	0,857142857	0,956521739
8		0,39136	0,84387	1,1808	1,0086	0,956521739	0,98136646
9		0,58704	0,13453	0,9963	1,107		
10		0,4892	0,89279	1,1808	1,0332		
média	0,699556	0,62373	0,643298	1,11807	0,984	0,97515528	0,874223602
DP	0,438697447	0,334549345	0,414627263	0,178757179	0,12570362	0,236910495	0,125974791
CV	62,71084052	53,63688537	64,45337359	15,98801317	12,7747581	24,29464307	14,40990501
IC	0,1457-1,1023	0,1549 - 1,244	0,3440 - 0,9035	0,3467 - 0,9399	0,9902 - 1,246	0,8941 - 1,074	0,7771 - 1,173
mediana	0,72157	0,580925	0,556465	1,1685	1,01475	0,888198758	0,894409938

Ureia							
animais	DMSO	PT- 4h	PT- 8h	PT+morf- 4h	PT+morf- 8h	morf 4h	morf 8h
1	4,141069		7,963595	68	37,4	53,26352531	56,43979058
2	5,096701	6,68942	7,963595	52,36	26,248	54,36300175	79,04013962
3	0,995631		3,185438	57,392	34,136	38,35951134	37,13787086
4	6,68942	5,733788	3,185438	68,68	39,032	39,21465969	40,43630017
5	5,415245	3,822526		41,344	37,536	67,43455497	41,53577661
6	5,415245	0,637088	3,822526	49,504	31,552	42,87958115	39,45898778
7	8,282139	8,282139	5,096701	65,144	30,872	52,65270506	49,35427574
8		3,822526	4,459613	54,264	31,416	42,51308901	57,17277487
9		2,866894	2,866894	41,888	37,672		
10		10,83049	5,415245	39,032	26,52		
média	5,147921429	5,335608875	4,884338333	53,7608	33,2384	48,83507853	50,07198953
DP	2,258330968	3,242939598	1,950674447	11,05799786	4,661712875	9,916863987	14,02181743
CV	43,86879247	60,77918517	39,93733264	20,56888636	14,02508206	20,30684558	28,00331594
IC	2,394-6,8129	3,059 - 7,237	2,624 - 8,047	3,385 - 6,354	45,85 - 61,67	29,904 - 36,57	40,54 - 57,12
mediana	5,415245	5,335608875	4,459613	53,0604	32,3952	45,85732984	45,44502618