

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

DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO
BIOANALÍTICO APLICADO EM ESTUDO DE FARMACOCINÉTICA
PRÉ-CLÍNICA E ENSAIO PRELIMINAR DE SEGURANÇA DE NOVO
DERIVADO DE TIAZOLIDINODIONA COM ATIVIDADE ANTI-
INFLAMATÓRIA - LYSO-07

ELIAS CARVALHO PADILHA

ORIENTADOR: Prof. Dr. ROSÂNGELA GONÇALVES PECCININI

ARARAQUARA - SP

2014

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JULIO DE MESQUITA FILHO"
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
CÂMPUS DE ARARAQUARA

DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO
BIOANALÍTICO APLICADO EM ESTUDO DE FARMACOCINÉTICA
PRÉ-CLÍNICA E ENSAIO PRELIMINAR DE SEGURANÇA DE NOVO
DERIVADO DE TIAZOLIDINODIONA COM ATIVIDADE ANTI-
INFLAMATÓRIA - LYSO-07

ELIAS CARVALHO PADILHA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de Toxicologia, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP, como parte dos requisitos para obtenção do Título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

ORIENTADOR: Prof. Dr. ROSÂNGELA GONÇALVES PECCININI

ARARAQUARA - SP

2014

Ficha Catalográfica

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

P123d Padilha, Elias Carvalho
Desenvolvimento e validação de método bioanalítico aplicado em estudo de farmacotécnica pré-clínica e ensaio preliminar de segurança de novo derivado Tiazolidinodiona com atividade anti-inflamatória-LYSO-07 / Elias Carvalho Padilha. — Araraquara, 2014
134 f.

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

Orientador: Rosângela Gonçalves Peccinini

1. Anti-inflamatório. 2. Farmacocinética pré-clínica. 3. Validação de método bioanalítico.
4. Tiazolidinodiona . I. Peccinini, Rosângela Gonçalves, orient. II. Título.

CAPES: 40300005

Resumo

As tiazolidinodionas (TZDs) são fármacos agonistas do receptor PPAR- γ (peroxisome proliferator activated receptor) cuja ativação leva a modulação de cerca de 100 genes, o que confere a esta classe de fármacos diversas ações no organismo como o controle de glicemia, do colesterol e atividade anti-inflamatória. Entre as TZDs que foram lançadas no mercado apenas a pioglitazona permanece disponível uma vez que suas antecessoras - rosiglitazona e troglitazona - apresentaram alta toxicidade. Considerando o vasto potencial terapêutico das TZDs, pesquisadores do Laboratório de Planejamento e Síntese de Fármacos da Universidade Federal de Pernambuco sintetizaram a LYSO-07 ((5-(5-bromo-1H-indol-3-metieleno)-3-(4-cloro-benzil)-tiazolidina-2,4-diona), um derivado tiazolidino-2,4-diona cujos ensaios de atividade biológica demonstraram que a nova TZD possui atividade anti-inflamatória promissora. No desenvolvimento de novos fármacos é impreterível a avaliação precoce do seu perfil farmacocinético e de sua toxicidade com o intuito de obter informações relevantes à avaliação de risco e ao avanço dos estudos com a nova molécula. No presente trabalho foram avaliados aspectos físico-químicos e o perfil farmacocinético em dose única da nova molécula administrada em ratos Wistar por via intravenosa e por gavagem. Ainda, foram determinados alguns parâmetros bioquímicos para avaliar os efeitos da exposição de ratos Wistar a doses múltiplas de LYSO-07 por 28 dias administrado por gavagem. A LYSO-07 apresentou instabilidade em ambiente aquoso em pH 1,2 e 7,4 e logP acima de 6,5. Os parâmetros farmacocinéticos determinados após administração via intravenosa foram: meia vida de eliminação ($t_{1/2}$) de 2,3 horas; clearance (Cl) de 33,18 mL/min/Kg e volume de distribuição (Vd) de 6.648,71 mL/kg. A LYSO-07 não foi detectada no plasma dos animais que receberam o composto por gavagem (LQ=78,125 ng/mL). A exposição dos animais pelo período de 28 dias na dose de 18 mg/kg não resultou em alterações de parâmetros bioquímicos relacionados às funções hepática (AST e ALT), renal(uréia e creatinina) e metabólica (glicose e colesterol). Foram observadas alterações nos valores de CKMB dos ratos expostos a doses múltiplas de LYSO-07, o que remete à necessidade de investigações da potencial cardiotoxicidade da nova molécula em estudos posteriores.

Abstract

Thiazolidinediones (TZDs) are agonists of PPAR- γ (peroxisome proliferator-activated receptor) receptor whose activation modulates the expression of about 100 genes, which gives this class of drugs several actions in the body as the control of blood glucose, cholesterol and anti-inflammatory activity. Among the TZDs that were released on the market, only pioglitazone remains available once their predecessors - rosiglitazone and troglitazone - showed high toxicity. Considering the vast therapeutic potential of TZDs, researchers from the Laboratory of Drug Synthesis and Planning from the Federal University of Pernambuco synthesized the LYSO-07, a thiazolidine-2,4-dione derivate whose biological activity assays demonstrated that the new TZD has a promising anti-inflammatory effect. In the development of new drugs the early assessment of their pharmacokinetic profile and toxicity is unavoidable in order to obtain relevant information of the risks of the molecule and contribute to the advancement of the studies of the new molecule. The present study assessed the physicochemical properties and the single dose pharmacokinetic profile of the new molecule in rats administered intravenously and by gavage. Further, some biochemical parameters were measured to assess the effects of the exposure of LYSO-07 ((5-(5-bromo-1H-indol-3-methylene)-3-(4-chlorobenzyl)-thiazolidine-2,4-dione) to rats in multiple doses for 28 days administered by gavage. The LYSO-07 showed instability in an aqueous environment at pH 7.4 and 1.2 and log P above 6.5. Pharmacokinetic parameters determined after IV administration were: elimination half-life ($t_{1/2}$) of 2.3 hours, clearance (Cl) 33.18 mL/min/kg and volume of distribution (Vd) of 6,648.71 mL/kg. The LYSO-07 could not be detected in the plasma of animals given the compound by gavage (LOQ=78.125 ng/mL). The 28 days of exposure of animals at a dose of 18 mg/kg resulted in no biochemical parameters changes related to liver function (AST and ALT), renal (urea and creatinine) and metabolic (glucose and cholesterol). Abnormal creatine kinase levels were observed in rats exposed to multiple doses of LYSO-07, which emphasizes the need of further cardiotoxicity investigation of the new molecule in later studies.

Sumário

1. Introdução.....	1
2. Objetivos.....	5
2.1 Geral	5
2.2 Específicos.....	5
3. Revisão Bibliográfica	7
3.1 Histórico da Lyso-07	7
3.2 Toxicidade do veículo	10
3.3 Físico-química aplicada à Farmacocinética	12
4. Material e métodos	25
4.1 Determinação de LYSO-07 em solução por HPLC	25
4.1.1 Sistema Cromatográfico.....	25
4.1.2 Validação do método analítico	26
4.2 Determinação da estabilidade química da LYSO-07.....	32
4.2.1 Tampão Clark-Lubs (pH 1,2).....	32
4.2.2 Tampão fosfato de potássio (pH 7,4).....	32
4.2.3 Estabilidade química em pH ácido	33
4.2.4 Estabilidade Química em pH alcalino.....	33
4.3 Determinação do log-P teórico.....	33
4.4 Log P da LYSO-07 pelo método cromatográfico.....	33
4.5 Desenvolvimento de método bioanalítico para a determinação de LYSO-07 em plasma.	35
4.5.1 Processamento de LYSO-07 em amostras biológicas.....	36
4.5.2 Validação do método bioanalítico	36
4.6 Caracterização dos analitos por espectrometria de massas	39
4.7 Determinação de parâmetros bioquímicos e farmacocinéticos ..	39
4.7.1 Modelo animal.....	39

4.7.2 Protocolo experimental para a avaliação de segurança preliminar hepática, renal, cardíaca e metabólica da LYSO-07	40
4.7.3 Protocolo para a determinação dos níveis de concentração plasmática vs tempo da LYSO-07 em rato Wistar	42
4.8 Análise Estatística	43
5. Resultados e Discussão	44
5.1 Validação do Método analítico	44
5.1.1 Especificidade	44
5.1.2. Linearidade e Intervalo	45
5.1.3. Precisão	47
5.1.4. Exatidão	47
5.1.5. Robustez	48
5.2. Determinação da Estabilidade Química da LYSO-07	49
5.3. Determinação do Coeficiente de Partição (log P) teórico e experimental da LYSO-07 pelo método cromatográfico	50
5.4 Desenvolvimento do método bioanalítico para a determinação de LYSO-07 em plasma	51
5.4.1 Estudo de Cromatogramas para a separação de isômeros	53
5.5 Caracterização dos isômeros por espectrometria de massas	55
5.6 Validação do método bioanalítico	66
5.6.1 Linearidade	66
5.6.2 Controles de qualidade	68
5.6.3 Estabilidade de Curta duração	69
5.6.4 Estabilidade pós processamento	70
5.6.5 Ciclo de congelamento e descongelamento	73
5.7 Determinação de biomarcadores do ensaio de segurança da LYSO-07	74
5.7.1 Nefrotoxicidade	74

5.7.2 Hepatotoxicidade	77
5.7.3 Alterações metabólicas	80
5.7.4 Cardiotoxicidade	85
5.7.5 Análise estatística	89
5.8 Análise farmacocinética	90
5.8.1 Grupo i.v.....	90
5.8.2 Grupo oral	95
6. Conclusões.....	98
7. Perspectivas	100
8. Bibliografia	101
9. Anexos.....	114

Lista de tabelas

Tabela 1 - Combinação Fatorial de parâmetros cromatográficos para avaliação da robustez pelo Teste de Youden.....	30
Tabela 2 - Parâmetros analíticos e variações efetuadas para valores abaixo dos normais no teste de Youden.	31
Tabela 3 - Parâmetros analíticos e variações efetuadas para valores acima dos normais no teste de Youden.	31
Tabela 4 - Substâncias utilizadas na curva para a determinação do log P.....	34
Tabela 5 - Cálculo dos parâmetros cromatográficos para os métodos estudados.....	36
Tabela 6 - Curva analítica para a LYSO-07 em triplicata.....	46
Tabela 7 - Resultados do ensaio de repetibilidade e CV(%).	47
Tabela 8 - Resultados do ensaio de precisão intermediária e CV(%)..	47
Tabela 9 - Exatidão calculada para os controles de qualidade.....	48
Tabela 10 - Valores de efeito calculados para cada parâmetro no Teste de Youden.....	48
Tabela 11 - Testes realizados para o desenvolvimento do sistema cromatográfico com separação dos isômeros 1 e 2.	54
Tabela 12 - Concentrações em triplicata utilizadas para a confecção da curva analítica	67
Tabela 13 - Controles de qualidade utilizados para a validação do método bioanalítico.	69
Tabela 14 - Estabilidade curta duração a temperatura ambiente.	70
Tabela 15 - Estabilidade curta duração a temperatura ambiente.	71
Tabela 16 - Estabilidade de ciclos de congelamento e descongelamento.....	74
Tabela 17 - Diferenças estatísticas entre os grupos sobre os valores de peso dos animais (ANOVA com pós teste de Tukey).....	84
Tabela 18 - Parâmetros farmacocinéticos extraídos da curva de concentração plasmática vs tempo	92

Lista de Figuras

Figura 1 - Efeitos das TZDs sobre o estresse oxidativo e resposta inflamatória em múltiplos níveis (Adaptado de CERIELLO, 2008)	2
Figura 2 – Representação da estrutura molecular da LYSO-07 desenhados no ChemDraw Ultra versão 12.0.....	3
Figura 3 - Fluxograma para o cálculo de Vd (adaptado de Toutain & Bousquet-Mélou (2004d).....	18
Figura 4 - Exemplificação da medida de Volume de Distribuição (TOUTAIN & BOUSQUET-MÈLOU, 2004d).....	20
Figura 5 - Espectro UV-VIS da LYSO-07.....	44
Figura 6 - Cromatograma de uma amostra branco e de um padrão de LYSO-07.....	45
Figura 7 - Cromatograma de solução padrão 7,5 µg/mL de LYSO-07.	45
Figura 8 - Curva analítica de LYSO-07 por HPLC.	46
Figura 9 - Curva da estabilidade química em diferentes pHs.	49
Figura 10 - Curva de linearidade de log k <i>versus</i> log P dos padrões...	51
Figura 11 - Cromatograma de LYSO-07 (5µg/mL) após processamento de amostra de plasma.....	52
Figura 12 - Cromatograma de LYSO-07 com "ombro"	52
Figura 13 - Cromatogramas da LYSO-07 com separação dos isômeros.	55
Figura 14 - Espectro de massas da LYSO-07 com separação dos picos 1 e 2.	56
Figura 15 - Distribuição isotópica da fórmula molecular $C_{19}H_{13}BrClN_2O_2S$, a LYSO-07 + H.	57
Figura 16 - Perfil de fragmentação da LYSO-07 picos 1 e 2.	58
Figura 17 - Variações das condições de fragmentação e os fragmentos formados do pico 1 da LYSO-07.	59
Figura 18 - Caracterização do fragmento 252,93.	60
Figura 19 - Caracterização dos fragmentos 228,03 e 306,93.....	61
Figura 20 - Caracterização dos fragmentos 200,02 e 263,94.....	62
Figura 21 - Caracterização do fragmento 297,04.	64
Figura 22 - Caracterização do fragmento 173,03.	65
Figura 23- Curva de calibração de LYSO-07.....	66

Figura 24 - Cromatograma em triplicata de CQA no tempo 8 horas pós processamento.....	72
Figura 25 - Cromatogramas sobrepostos de CQA nos tempos 0 e 24 horas. As sobreposições são feitas a partir do mesmo vial.....	72
Figura 26 - Valores de ureia determinados nos grupos experimentais, resultados expressos em médias \pm IC 95 (n=5).	75
Figura 27 - Valores de creatinina determinados nos grupos experimentais, resultados expressos em médias \pm IC 95 (n=5).....	76
Figura 28 - Valores de TGO determinados nos grupos experimentais, resultados expressos em médias \pm IC 95 (n=5).	78
Figura 29 - Valores de TGP determinados nos grupos experimentais, resultados expressos em médias \pm IC 95 (n=5).	79
Figura 30 - Valores de colesterol (mg/dL) determinados nos grupos experimentais, resultados expressos em médias \pm IC 95 (n=5).....	81
Figura 31 - Valores de glicose determinados nos grupos experimentais, resultados expressos em médias \pm IC 95 (n=5).	82
Figura 32 - Valores de peso determinados nos grupos experimentais, resultados expressos em médias (n=5).....	84
Figura 33 - Valores de CK determinados nos grupos experimentais, resultados expressos em médias \pm IC 95 (n=5).	86
Figura 34 - Valores de CKMB determinados nos grupos experimentais, resultados expressos em médias \pm IC 95 (n=5).	87
Figura 35 - Curva de concentração plasmática média ($\mu\text{g/mL}$) vs tempo (min) (média \pm IC 95) do grupo I.V (dose 3,6 mg/kg, n=5).	91

Índice de Equações

Equação 1 - Cálculo do coeficiente de partição.....	15
Equação 2 - Cálculo de Volume de Distribuição genérico	19
Equação 3 - Cálculo genérico de Clearance	22
Equação 4 - Cálculo da meia vida a partir do Vd e Cl	24
Equação 5 - Cálculo do coeficiente de variação	28
Equação 6 - Cálculo de exatidão utilizado na validação do método analítico.....	29
Equação 7 - Equação de Youden para a determinação do efeito de um parâmetro sobre a robustez do teste.....	31
Equação 8 - Equação de Youden para a determinação de Nível	32
Equação 9 - cálculo do fator de capacidade (k).....	34
Equação 10 - Cálculo de débito cardíaco	94

Índice de Quadros

Quadro 1 - Casos da classificação biofarmacêutica	15
Quadro 2 - Classificação dos testes, segundo sua finalidade	26
Quadro 3 - Ensaio necessários para validação do método analítico, segundo sua finalidade	27
Quadro 4 - Diferenças estatísticas entre os grupos experimentais e o grupo suspensão.....	89

Lista de Abreviaturas

ACN: Acetonitrila

ANVISA: Agência Nacional de Vigilância Sanitária

ASC: Área sob a curva

BEH: Ethylene Bridged Hybrid

BHE: Barreira Hematoencefálica

CK: creatinina quinase

CKMB: creatinina quinase isoforma MB

Cl: Clearance

COX-1,2: Cicloxigenase 1,2

Cp: Concentração plasmática

CQA: Controle de Qualidade Alto

CQB: Controle de Qualidade Baixo

CQD: Controle de Diluição

CQM: Controle de Qualidade Médio

CSH: Charged Surface Hybrid

CV: Coeficiente de Variação

DAD: Diode Array Detector

DL50: dose letal 50

DM2: Diabetes mellitus tipo 2

DMSO: Dimetilsulfóxido

Et/HCl: mistura etanol/ácido clorídrico

FDA: Food and Drug Administration

HPLC: High Performance Liquid Chromatography

HSS: High Strength Silica

i.v.: intravenoso

IC95: Intervalo de confiança 95%

k: Fator de Retenção

Ka: constante de distribuição

Kel ou β : constante de eliminação

LDH: lactato desidrogenase

LYSO/PIO: LYSO-07 na dose equimolar de pioglitazona utilizado no estudo de Sengupta et al, 2012

MeOH: Metanol

NF- $\kappa\beta$: fator nuclear kappa β

OECD: Organization for Economic Cooperation and Development

PPAR- γ : peroxisome proliferator activated receptor

RDC: resolução da diretoria colegiada

RMN: Ressonância Magnética

Rs: resolução

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

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

TGI: Trato gastrointestinal

TGO: transaminase oxalacética

TGP: transaminase piruvica

TZD: tiazolidinodionas

U(H)PLC: Ultra High Performance Liquid Chromatography

UV-VIS: Ultravioleta-visível

Vd: Volume de Distribuição

Vd_{area}: Volume de distribuição no estado de pseudo equilíbrio

Vd_c: Volume de Distribuição central

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

α : constante de distribuição

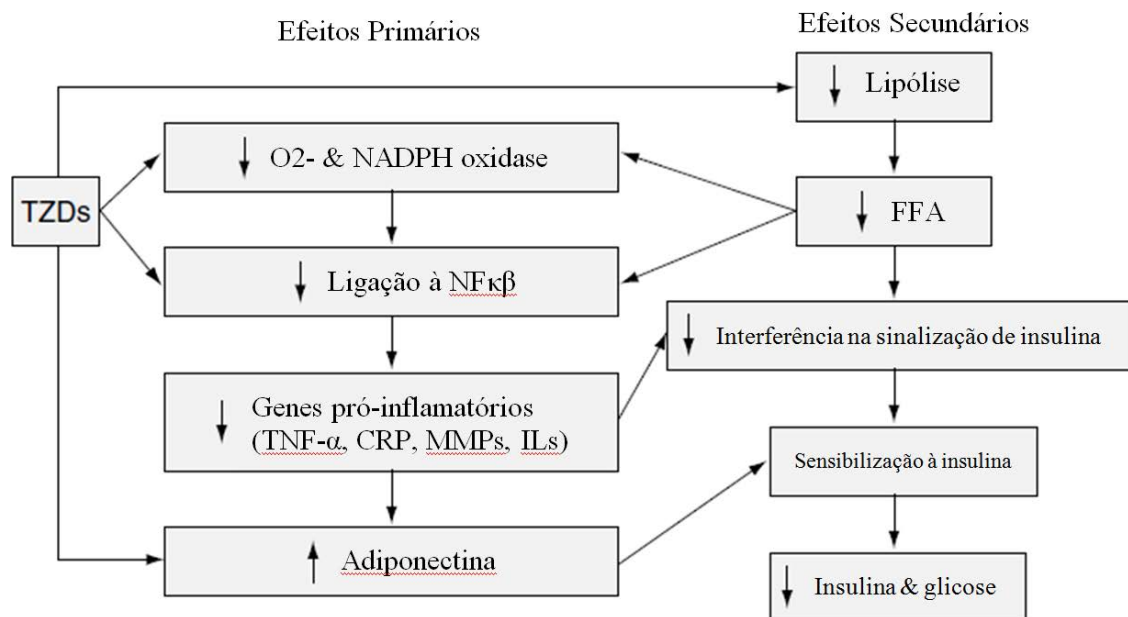
1. Introdução

As tiazolidinodionas (TZDs), também conhecidas por glitazonas, são fármacos utilizados no tratamento de Diabetes Mellitus tipo 2 (DM2) e agem principalmente reduzindo a resistência periférica à insulina. As TZDs atuam ativando os receptores do núcleo celular PPAR- γ (peroxisome proliferator activated receptor) que regulam a expressão de genes que afetam o metabolismo glicídico e lipídico, responsáveis pela captação de glicose mediada por insulina nos tecidos periféricos e pela diferenciação de pré-adipócitos em adipócitos, entre outros efeitos (JÄRVINEN, 2004).

Além de serem responsáveis pela regulação de genes associados ao metabolismo lipídico e glicídico, há evidências de que o receptor nuclear PPAR- γ esteja associado à regulação de cerca de 100 genes, proporcionando diversas ações no organismo (JÄRVINEN, 2004). Os agonistas dos receptores PPAR, as tiazolidinodionas (TZDs), vêm sendo estudados para diversas aplicações terapêuticas como antimicrobianos, tratamento de doenças neurológicas e adjuvantes na terapia oncológica (WENG et al., 2006; GARCIA-BUENO et al., 2010; ANEJA et al., 2011). Estudos sobre os efeitos anti-inflamatórios dos agonistas do PPAR tem demonstrado que essa classe de fármacos apresenta potencial aplicação na prevenção da aterosclerose (MARTENS, 2002; CERIELLO, 2008; VUCIC et al., 2011). A Figura 1 sumariza o mecanismo pelo qual estes fármacos agem nos vários níveis do processo inflamatório.

Conforme observado na Figura 1, as TZDs agem diminuindo o estresse oxidativo, diminuindo assim o estado inflamatório sub-crônico observado em diversas enfermidades. A menor oxidação sistêmica do organismo associada às TZDs contribui para a inibição do fator nuclear kappa β (NF- $\kappa\beta$), responsável pela transcrição de diversas proteínas associadas à inflamação, conforme observado na Figura 1 (CERIELLO, 2008).

Figura 1 - Efeitos das TZDs sobre o estresse oxidativo e resposta inflamatória em múltiplos níveis (Adaptado de CERIELLO, 2008)



TZD: Tiazolidinodina; O_2^- é uma espécie reativa de oxigênio; NADPH oxidase é uma enzima geradora de espécies reativas de oxigênio; TNF- α : tumor necrosis factor alfa -fator de necrose tumoral alfa; CRP: proteína reativa-C; MMP: Metaloproteinase de matriz; IL: interleucinas; FFA: Free fat acids - Ácidos graxos livres.

A Figura 1 demonstra, ainda, a influência das TZDs sobre o hormônio adiponectina. Este hormônio atua na regulação da glicemia e no metabolismo de ácidos graxos além de, por si só, possuir ação anti-inflamatória.

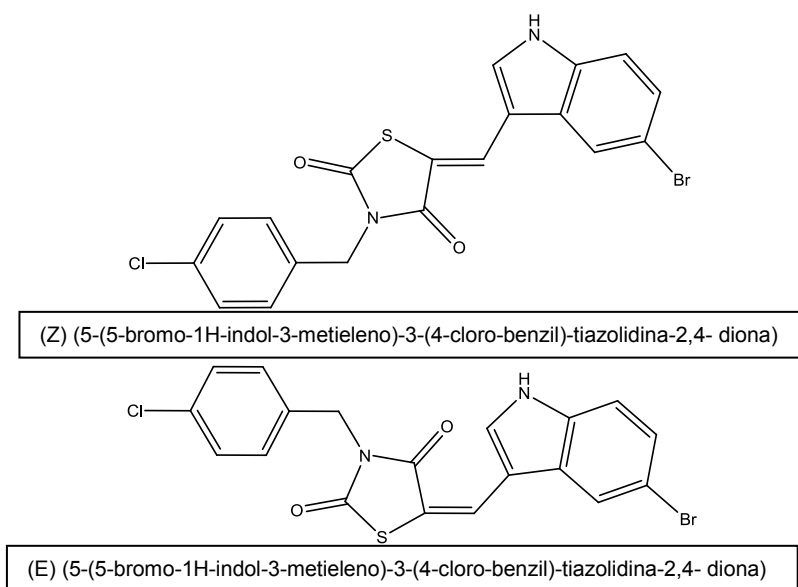
Apesar da ampla utilidade terapêutica, a primeira geração desta classe de fármacos representada pela troglitazona apresenta alta toxicidade hepática, e foi retirada do mercado americano em março de 2000, logo após seu lançamento em 1997 (FDA, 2000). Já as TZDs de segunda geração, rosiglitazona e pioglitazona, possuem efeitos tóxicos relativamente menos significativos e foram mantidas no mercado. No entanto, em 29 de setembro de 2010, a gerência de farmacovigilância da Anvisa informou, através da Resolução nº 1.466 de 28/09/2010, o cancelamento do registro do medicamento Avandia® - nome comercial sobre o qual a rosiglitazona era comercializada. A pioglitazona permanece no mercado sob avaliação do risco/benefício de sua utilização na terapêutica (ANVISA, 2010).

Diversos pesquisadores tem sintetizado novos candidatos a TZD com o intuito de obter maior especificidade entre seus efeitos aplicáveis na terapêutica ou, ainda, para diminuir a toxicidade e melhorar a relação risco/benefício (MALAMAS et al., 2001; TUNÇBILEK et al., 2001; MOURÃO et al., 2005; MOURÃO, 2006;).

Abdalla (2011) avaliou a atividade anti-aterosclerose de diversos compostos planejados por pesquisadores do Laboratório de Planejamento e Síntese de Fármacos da Universidade Federal de Pernambuco. Entre os compostos de melhores performances destacou-se a LYSO-07, um derivado tiazolidino-2,4-diona (5-(5-bromo-1H-indol-3-metieleno)-3-(4-cloro-benzil)-tiazolidina-2,4- diona) (Figura 2).

Na síntese da LYSO-07 foi observada a produção dos isômeros geométricos Z e E; sendo que em sua caracterização por ^1H RMN observou-se maior predominância do isômero Z.

Figura 2 – Representação da estrutura molecular da LYSO-07 desenhados no ChemDraw Ultra versão 12.0.



A nova TZD foi elaborada por estudos de ancoragem molecular para possuir afinidade pelo receptor PPAR e atuar sobre as COX 1 e 2, tornando a nova TZD um potente candidato à anti-inflamatório (SANTIN et al., 2013a).

Estudos de ulceração gástrica realizados por Santin et al. (2013a,b) em camundongos Swiss demonstraram que a LYSO-07 possui melhor atividade que os anti-inflamatórios indometacina e celecoxibe.

Os resultados promissores de atividade da nova molécula obtidos por Abdalla (2011) e Santin et al.(2013a) encorajam a continuidade dos estudos para o seu desenvolvimento, considerando que a avaliação da utilidade terapêutica de um novo fármaco depende, além da identificação da capacidade de exercer o efeito farmacológico desejado, da elucidação de diversas características físico-químicas, farmacocinéticas e toxicológicas.

A disposição cinética de um fármaco possui estreita relação com algumas de suas propriedades físico-químicas e, assim, a investigação destas propriedades antes da avaliação do perfil farmacocinético em modelos animais pode ter valor preditivo do seu comportamento no organismo e auxiliar no planejamento do estudo *in vivo*. O LogP, por exemplo, tem influência direta nos eventos que sucedem a administração enteral dos fármacos, pois relaciona-se diretamente com a solubilidade do composto nos fluidos estomacais e intestinais e, ainda, influencia na permeabilidade do fármaco através das membranas celulares envolvidas no processo de absorção (WATERBEEMD & GRIFFOLD, 2003). Ainda, conhecer a estabilidade do composto é fundamental para prever o comportamento farmacocinético, particularmente na administração enteral, pois ao longo do trato digestório há grande variabilidade de pH que proporciona diferentes ambientes de ionização com a possibilidade de ocorrência de decomposição do fármaco.

As características disposicionais do fármaco são relacionadas ao curso temporal dos efeitos terapêuticos, e através do estudo em farmacocinética é possível elucidar os parâmetros que fundamentarão o regime de dose em estudos futuros.

É reconhecido que a grande maioria das substâncias dotadas de atividade farmacológica sobre o organismo possui multiplicidade de efeitos. Esta característica, em algumas situações, apresenta vantagens sob o ponto de vista terapêutico; por outro lado, também pode determinar o aparecimento

de efeitos indesejados e nocivos, que devem ser precocemente investigados para viabilizar a avaliação do risco/benefício do composto.

No presente projeto foram avaliados alguns aspectos físico-químicos, o perfil farmacocinético da nova molécula LYSO-07 administrado por gavagem e pela via intravenosa em dose única em ratos Wistar e alguns efeitos da exposição ao fármaco administrado em doses múltiplas a ratos Wistar durante 28 dias.

O projeto contou com a colaboração da acadêmica Júlia Miranda Ribeiro Bazzano (Iniciação Científica/FAPESP) no desenvolvimento do método analítico e determinação dos aspectos físico-químicos; e do acadêmico Luis Fernando Guerta Salina (Iniciação Científica) na determinação dos parâmetros bioquímicos na exposição prolongada à LYSO-07.

2. Objetivos

2.1 Geral

Avaliar aspectos físico-químicos, efeitos da exposição ao fármaco administrado em doses múltiplas a ratos Wistar e o perfil farmacocinético da nova molécula LYSO-07 administrada via gavagem e intravenosa em dose única em ratos Wistar.

2.2 Específicos

- Desenvolver o método analítico para a determinação de LYSO-07 em solução por HPLC;
- Avaliar a estabilidade química em tampões de pH 1,2 e 7,4 em meio aquoso;
- Determinar o log P da LYSO-07 pelo método cromatográfico e *in silico* utilizando o programa ChemDraw[®];

- Desenvolver o método bioanalítico para a determinação de LYSO-07 em plasma por UPLC;
- Comprovar a presença dos isômeros Z e E da LYSO-07 nos picos separados por cromatografia de ultra performance através de espectrometria de massas.
- Validar os métodos desenvolvidos de acordo com as normas da ANVISA dispostas na RDC 899 de 2003 e RE 27 de 2012;
- Avaliar o perfil farmacocinético após administração por gavagem e i.v. da LYSO-07 em ratos Wistar;
- Avaliar biomarcadores de função hepática, renal, cardíaca e metabólica de ratos Wistar submetidos a administração do fármaco durante 28 dias.

3. Revisão Bibliográfica

3.1 Histórico da Lyso-07

A LYSO-07 foi planejada para ser um anti-inflamatório com um grupo tiazolidinodiona (TZD) acoplado a um grupamento indólico, dotado de atividade inibidora COX-2. Assim, explora o mecanismo anti-inflamatório das TZDs, que age por diversas vias, com a atividade clássica dos inibidores de COX-2. As TZDs possuem atividade agonista sobre o receptor nuclear PPAR- γ , o que lhes confere, dentre a ativação de cerca de 100 genes com diversos efeitos biológicos, efeitos sobre vias de sinalização que culminam na inibição da resposta inflamatória. A síntese, caracterização e atividade *in vitro* da LYSO-07 foram publicados por Santin e colaboradores (2013).

Nesta mesma publicação, foi estudada em modelo *in silico* - "docking" molecular - a interação dos grupamentos que compõe a molécula de LYSO-07 com as estruturas cristalinas dos receptores PPAR α e γ , além das enzimas COX 1 e 2. Estes estudos confirmaram que a LYSO-07 tem atividade sobre estas proteínas, comprovando que o planejamento do candidato à fármaco correspondeu ao esperado (SANTIN et al., 2013a).

A atividade agonista sobre os receptores da família PPAR também foi realizada *in vitro*. Os genes que codificam os receptores da família PPAR (γ , α e β/δ) foram expressos em células HeLa (células humanas imortalizadas) e então incubados com LYSO-07. Através deste experimento observou-se que a LYSO-07 é um agonista PPAR-pan, ou seja, tem atividade sobre os receptores PPAR γ , α e β/δ . Nas maiores concentrações a ativação máxima exibida pela LYSO-07 foi de 70 e 25% para os receptores α e β/δ respectivamente. Esta porcentagem foi calculada sobre a ativação observada do bezafibrato, utilizado como controle positivo do estudo. Já para o receptor PPAR- γ , a LYSO-07 apresentou ativação máxima de 30%, utilizando-se rosiglitazona como controle positivo. Portanto, para os efeitos observados nos estudos com LYSO-07 de Santin e colaboradores (2013a,b) deve-se levar em consideração não apenas a sua atividade sobre o receptor PPAR- γ , mas também sobre PPAR α e β/δ , embora o papel destes dois últimos sobre a resposta inflamatória ainda necessite de maior elucidação (SANTIN et al., 2013a).

A ativação de 30% do receptor PPAR- γ faz com que a LYSO-07 seja categorizada como um ativador moderado deste receptor. Contudo, outras tiazolidinodionas com ativação parcial deste receptor provaram-se mais interessantes do que TZDs que exerciam ativação total para a diminuição da sensibilidade a insulina. A ativação parcial reduz os efeitos desfavoráveis que podem ser causados por uma maior ativação deste receptor, como aumento do peso e alterações cardíacas e hepáticas observadas em outras tiazolidinodionas de alta ativação de PPAR- γ (COCK et al., 2004; AMATO & NEVES, 2012). Ou seja, através da ativação parcial deste receptor é possível manter os efeitos terapêuticos com menor aparecimento de efeitos adversos.

Em relação às COX 1 e 2, a LYSO-07 exibiu concentrações efetivas em doses de μM . Para as doses de 0,01, 1 e 10 μM a molécula exibiu respectivamente 30,3, 35,3 e 38,5% de inibição para a COX 1 e 13,9, 23,1 e 16,5% de inibição para a COX-2. Quando comparados aos controles (celecoxibe e indometacina), a LYSO-07 exibiu atividade sobre COX-1 menor do que a indometacina (100% nas doses de 1 e 10 μM) e atividade inibitória de COX-2 menores do que o celecoxibe (11,6, 47,5 e 54,7% para as doses 0,01, 1 e 10 μM respectivamente). Notou-se que a LYSO-07 na dose mais baixa, 0,01 μM , apresentou efeito inibitório sobre a COX-2 maior do que os outros fármacos na mesma concentração, o que não se observou nas concentrações superiores (SANTIN et al., 2013a).

Após os experimentos *in silico* e *in vitro*, foram realizados experimentos *in vivo* para determinação da resposta anti-inflamatória da LYSO-07 em camundongos. Para isso, foi analisada a migração de neutrófilos no modelo animal. Os fármacos indometacina (10 mg/kg), celecoxibe (10 mg/kg), pioglitazona (50 mg/kg) ou LYSO-7 (3, 12.5 or 50 mg/kg) foram administrados pela via oral em veículo (suspensão de carboximetilcelulose 2%) a camundongos. Uma hora após a administração do fármaco, foi injetada a suspensão a 1% de carragenina numa bolsa de ar subcutânea nos animais com o intuito de causar inflamação local. Após seis horas, a bolsa de ar foi lavada com 3 mL tampão fosfato (PBS) com heparina (10 U/L). Alíquotas deste lavado foram diluídas em solução de Turk e os neutrófilos foram contados em câmara de Neubauer. Como resultado, a LYSO-07 apresentou inibição da

migração de leucócitos para o local da inflamação na dose de 3mg/kg semelhante a inibição apresentada pela pioglitazona na dose de 50mg/kg e celecoxibe na dose de 10mg/kg. A atividade mais eficiente da LYSO-07 reflete a atuação da combinação de inibição da COX com a ativação de PPAR- γ , α e β/δ no processo de migração de neutrófilos para locais inflamados (SANTIN et al., 2013a).

A LYSO-07 também foi testada quanto à atividade anti-ulcerativa em camundongos. O protocolo de Mizui e Doteuchi (1983) foi utilizado para induzir úlcera nos animais. Trata-se da administração de uma solução de etanol (Et) 60% + 0,03M HCl (Et/HCl) (100 μ L para cada 10g de animal). Diversos testes foram realizados, como o efeito gastroprotetor, efeito sobre a quantidade de suco gástrico, efeito angiogênico nos locais lesionados do estômago, expressão do receptor PPAR- γ na mucosa estomacal, dentre outros marcadores inflamatórios. Nestes estudos, observou-se que a LYSO-07 possui efeito protetor da mucosa estomacal quando administrada anteriormente à mistura Et/HCl e, quando administrada após a geração da úlcera, a LYSO-07 contribuiu para a regeneração do tecido, reestabelecendo a microcirculação no local lesionado (SANTIN et al., 2013b).

Ainda, na síntese da LYSO-07 há a formação dos isômeros geométricos Z e E. Estes isômeros possuem abundâncias diferenciais na sua síntese, como apontada em sua caracterização por ^1H RMN, onde observou-se a maior estabilidade do isômero Z em relação ao isômero E, com estabilidade relativa de 25,42 kJ/mol entre eles. Este perfil de maior abundância do isômero Z é o mesmo observado em outros estudos cristalográficos envolvendo moléculas similares as quais também confirmam que a configuração Z é mais estável (KAROLAK-WOJCIECHOWSKA et al., 2009; HANDZLIK et al., 2012; SANTIN et al., 2013a). É importante ressaltar que isômeros geométricos possuem propriedades físicas diferentes, tais como ponto de ebulição, ponto de fusão e densidade e que também podem apresentar reatividade química diferente. Dessa forma a ocorrência de diferenças na atividade farmacológica é uma possibilidade para compostos que possuem isomeria geométrica como a LYSO-07.

3.2 Toxicidade do veículo

Para a administração da LYSO-07 nos estudos de toxicidade e farmacocinética (via gavagem), a molécula foi veiculada numa suspensão de carboximetilcelulose 2% a qual utilizou Tween 20 (5%) e etanol (1%) como surfactante/molhante, o mesmo veículo utilizado nos testes de atividade de Santin et al. (2013a e b). Segundo o *Handbook of Pharmaceutical Excipients* (2009), os componentes deste veículo apresentam baixa toxicidade na quantidade utilizada, particularmente a carboximetilcelulose, descrita como um excipiente não tóxico e não irritante, sem restrições de porcentagem quanto ao seu uso.

Contudo, o etanol e o Tween 20 possuem características que podem influenciar os resultados dos estudos de toxicidade. O etanol, apesar de utilizado como excipiente em formulações cosméticas, farmacêuticas e alimentícias possui restrições quanto à sua dose, pois em altas concentrações pode causar efeitos adversos. Estes efeitos incluem desde reações comportamentais até efeitos deletérios capazes de alterar biomarcadores hepáticos como TGO e TGP entre outros (LEE et al., 2013). Portanto, a quantidade de etanol nas formulações devem ser restritas para evitar interferências sobre os resultados do experimento. Em formulações pediátricas para crianças de até 12 anos de idade a porcentagem máxima de etanol é de 5% (v/v). Já abaixo de 6 anos de idade recomenda-se utilizar no máximo 0.5% (v/v). Para estudos pré-clínicos utilizando roedores, Neervanan e colaboradores (2006) recomendam que a dose máxima de etanol a ser administrada por gavagem neste modelo animal não ultrapasse 125 μ L, ainda a DL50 do etanol para ratos pela via oral é 7,06 g/kg (ROWE et al., 2009).

Xie e colaboradores (2013) administraram etanol a ratos Sprague-Dawley na dose de 5 a 5,6% (v/v) durante 8 semanas para determinar fatores relacionados à exposição crônica a baixas doses de etanol. Esta exposição foi suficiente para causar alterações no perfil de expressão de ácidos biliares em diversos tecidos.

A porcentagem de etanol utilizada para veicular a LYSO-07, neste experimento, foi 5 vezes menor que a recomendada para crianças de menos

de 12 anos de idade nos EUA, 5% (v/v), e é 5 vezes menor do que a dose utilizada por Xie e colaboradores (2013) a ratos sob exposição crônica a etanol. Assim, consideramos segura a exposição dos animais a esse produto em nosso protocolo de estudo.

O Tween 20 também é considerado um solvente pouco tóxico e pouco irritativo, porém seu uso requer restrições. O *Handbook of Pharmaceutical Excipients* (2009) descreve o Tween 20 e sua família de excipientes, os polissorbatos, como excipientes de vasta utilização na indústria cosmética, alimentícia e farmacêutica. Porém há casos reportados de hipersensibilidade aos polissorbatos quando administrados pela via tópica e intramuscular.

Geetha e colaboradores (2013) utilizaram o modelo animal das artêmias, uma espécie de crustáceo, para desenvolver estudos de toxicidade e atividade de extratos de plantas. Neste estudo, o grupo analisou se os solventes utilizados para fazer os extratos poderiam interferir no modelo animal utilizado e concluíram que o Tween 20 deveria ser evitado como adjuvante nos extratos neste modelo pois demonstrou-se mais tóxico do que etanol, metanol e DMSO sobre as artêmias.

O Tween 20 também não é um solvente favorável em estudos de eletrofisiologia, podendo interferir com a estabilidade das membranas de células que irão receber potencial de ação, interferindo no disparo destes, e portanto, para testar fármacos em modelos *in vitro* utilizando fibras nervosas, células de Purkinje, etc., o Tween 20 não é recomendado, dando-se preferência ao metanol, acetonitrila, DMSO e ciclodextrinas (HIMMEL, 2007).

A toxicidade dos polissorbatos pode inclusive induzir convulsões em modelos animais, como no estudo de Veldhuis e colaboradores (2003). Neste trabalho, utilizou-se do Tween 80 com injeção intracerebroventricular para induzir convulsões em ratos Wistar e testar os efeitos neuroprotetores de um canabinóide endógeno. O Tween 80 administrado pela via oral também é capaz de modificar o perfil de secreção de muco e lactato desidrogenase (LDH) pela mucosa intestinal no jejuno e íleo de ratos Wistar. Exames histológicos corroboraram as alterações sofridas por estes tecidos na presença do surfactante. O dano observado, contudo, é reversível (OBERLE et al., 1995).

A ingestão de dose única elevada de polissorbatos resulta em poucos efeitos tóxicos, geralmente associados a diarreia osmótica, onde o polissorbato retém umidade no lúmen intestinal (LANIGAN et al., 2001). Porém, os polissorbatos também podem ser absorvidos, inclusive métodos para determinação de Tween 80 em plasma humano já foram desenvolvidos com a finalidade de determinar sua disposição no organismo (BAKER et al., 2003; SPARREBOOM et al., 2003; TEN TIJE et al., 2003). Uma vez absorvidos, os polissorbatos podem gerar reações de hipersensibilidade. Estas reações são a maior restrição quanto ao uso dos polissorbatos. Isso ocorre pois os Tween 20 e 80 possuem grupamentos imunorreativos capazes de ativar *in vitro* os produtos do sistema complemento C3a, C5a e C5b-9 (WEISZHÁR et al., 2011).

A Organização Mundial da Saúde considera segura a ingestão de até 25 mg/kg de polissorbatos para humanos. Já para estudos pré-clínicos, Neervannan e colaboradores (2006) recomendam que a dose máxima de Tween 80 a ser administrado pela via oral a roedores seja de 1.25mL/kg, ou seja, para um rato de 250g, a dose máxima recomendada é de 312,5µL. A DL50 do Tween 20 em ratos é 37g/kg.

A quantidade de Tween 20 utilizada em nossos ensaios de segurança, 50µL com um volume de administração de 1 mL aproximadamente por animal, é seguro segundo o recomendado por Neervannan e colaboradores (2006). Assim, considerou-se adequado o veículo utilizado no desenvolvimento deste estudo.

3.3 Físico-química aplicada à Farmacocinética

A avaliação dos parâmetros farmacocinéticos tem sido cada vez mais valorizada no desenvolvimento de novas moléculas uma vez que a indústria passa a reconhecer que grande parte de seus candidatos à fármacos tem seu desenvolvimento descontinuado devido à farmacocinética desfavorável (WATERBEEMD & GRIFFOLD, 2003). O desenvolvimento de novas tecnologias para o *screening* de novas moléculas, como química combinatória, modelagem molecular, *high-throughput screening* e design racional de

fármacos aumentou a necessidade de otimizar as fases de restrição que dificultam o prosseguimento do desenvolvimento destas moléculas para o mercado. Entre essas fases, a farmacocinética tem se destacado como alvo de estudos, tendo em vista a sua influência no processo de desenvolvimento de novos fármacos (TESTA et al., 2000).

Um dos aspectos de maior importância no desenvolvimento de novas moléculas é a absorção; processo no qual um fármaco administrado por uma via extravascular permeia os tecidos para atingir a corrente sanguínea. É o processo farmacocinético que constitui a primeira barreira para a molécula atingir a circulação sistêmica e assim exercer seu efeito terapêutico.

A biodisponibilidade é a quantidade de fármaco que de fato atinge a circulação sistêmica após uma administração extravascular e é constituída de um conjunto de processos que incluem, além da absorção, também o metabolismo pré-sistêmico. Desta forma um fármaco pode ser 100% absorvido pela via oral, porém sofrer metabolismo pré-sistêmico em grande extensão e, assim, apenas uma pequena quantidade do fármaco fica disponível para a circulação sistêmica. Por isso é importante diferenciar absorção de biodisponibilidade (TOUTAIN & BOUSQUET MÉLOU 2004a).

Os parâmetros que influenciam no processo de absorção estão relacionados principalmente às características físico-químicas dos fármacos. Para ser absorvida pela via oral, por exemplo, um fármaco administrado através de uma forma farmacêutica sólida necessita sofrer liberação através da desintegração da forma farmacêutica e solubilizar-se no ambiente estomacal/intestinal para formar uma dispersão molecular, de forma que a molécula possa interagir com as membranas celulares, ou mesmo com eventuais transportadores, e então esta possa ser absorvida. Isso faz da solubilidade uma característica limitante do processo de absorção (CLARYSSE et al., 2011). Após a solubilização no fluido do trato digestório, a molécula deve permear a membrana dos enterócitos e, então, outro fator determinante para a absorção é a permeabilidade da molécula, característica intimamente ligada à lipofilicidade dos compostos (JANA et al., 2010; LIPINSKI, 2004; TESTA et al., 2000). Este mecanismo de absorção - difusão passiva - depende diretamente

da superfície de contato, do coeficiente de partição do composto, do pH do meio e da quantidade de fármaco disponível na biofase para absorção, cuja velocidade tende a obedecer uma cinética linear.

Alguns fármacos apresentam processo de absorção especializado – antibióticos, antifúngicos, glicosídeos cardíacos e vitaminas – necessitam de transportadores específicos para a sua penetração e, neste caso, o processo pode obedecer a uma cinética não linear em decorrência da saturação destes transportadores e em geral a lipofilicidade apresenta pouca importância sobre o processo de absorção (LIPINSKI et al., 2001).

Lipinski e colaboradores (1997) relacionaram as características de diversas moléculas bem sucedidas do mercado e elencaram 4 regras entre as quais 90% destas moléculas se encaixavam. A regra trata de características que aumentam a probabilidade dos candidatos a fármacos serem absorvidos (solubilizarem-se e permearem membranas por difusão passiva), são elas: $\log P < 5$, menos de 5 doadores de hidrogênio (soma de OHs e NHs), peso molecular < 500 daltons, menos de 10 aceptores de hidrogênio (soma de Os e Ns). Esta publicação de 1997 teve sua importância reconhecida pelas indústrias e pesquisadores de forma que em 2004 já havia mais de 1000 citações deste artigo, revelando a importância da absorção para a seleção de candidatos à fármacos (LIPINSKI, 2004).

Também baseado no parâmetro absorção foi criado um sistema de classificação de fármacos por Amidon e colaboradores (1995), o qual sugere que os fármacos possam ser classificados em 4 grupos baseados em sua solubilidade e permeabilidade através das membranas biológicas (Quadro 1).

Quadro 1 - Casos da classificação biofarmacêutica

<p>Grupo 1</p> <p>Alta solubilidade</p> <p>Alta permeabilidade</p>	<p>Grupo 2</p> <p>Baixa solubilidade</p> <p>Alta permeabilidade</p>
<p>Grupo 3</p> <p>Alta solubilidade</p> <p>Baixa permeabilidade</p>	<p>Grupo 4</p> <p>Baixa solubilidade</p> <p>Baixa permeabilidade</p>

Apesar de diversas ressalvas quanto à simplicidade da classificação proposta, a mesma foi adotada pelo FDA no guia para a indústria de 2000 (FDA, 2000).

Pode-se observar que tanto a regra dos 5 de Lipinski quanto o sistema de classificação biofarmacêutica relacionam características físico-químicas das moléculas com a fase de absorção, demonstrando a importância de pesquisar parâmetros físico-químicos para maior compreensão da farmacocinética de um novo fármaco.

Uma característica que os dois sistemas compartilham é a necessidade de se conhecer o coeficiente de partição log P. Este coeficiente está ligado a quantidade de moléculas que se distribui em uma mistura octanol/água onde o coeficiente P é representado pela equação:

Equação 1 - Cálculo do coeficiente de partição

$$P = \frac{[M]_{octanol}}{[M]_{gua}}$$

Onde [M] é a concentração da molécula.

Quanto mais lipofílica é a molécula mais ela se concentra na fase orgânica e aumenta o valor numérico do dividendo da equação e portanto maior o P. Enquanto que se a molécula tiver maior a afinidade pela água, a mesma se concentrará na fase aquosa e então o valor numérico do divisor será maior, o que diminui o valor de P. Se a molécula tem alto logP, esta tem menor

afinidade pela água e assim sua solubilidade neste solvente fica comprometida. Uma vez que os fluidos do organismo são aquosos, ser solúvel nestes solventes pode ser determinante para o sucesso de uma molécula como fármaco (ELDER et al., 2013).

Porém as membranas biológicas, através das quais os fármacos devem permear para atingir a circulação sistêmica, são compostas por uma bicamada lipídica. Portanto para sofrer difusão de forma passiva através destas membranas, os candidatos à fármaco devem possuir lipofilicidade suficiente para interagir com a bicamada lipídica e permeá-la. Assim, um Log P ótimo não é tão alto de forma a ser inadequado para a solubilidade nos fluidos biológicos; nem tão baixo ao ponto de ser incapaz de interagir e permear membranas lipídicas (ELDER et al., 2013; TESTA et al., 2000; LIPINSKI et al., 1997).

Um exemplo de como log P afeta o processo de biodisponibilidade e conseqüentemente de absorção é o caso dos beta bloqueadores. Essa classe de fármacos apresenta uma faixa ampla de log P como segue: sotalol (-0,79), atenolol (0,23), nadolol (0,71), practolol (0,76), pindolol (1,75), acebutolol (1,87), timolol (2,10), metoprolol (2,15), oxprenolol (2,18), alprenolol (2,61) e propranolol (3,65). Os primeiros quatro fármacos, de logP mais baixo, apresentam absorção pela via oral incompleta. Sua absorção depende principalmente da permeação dos mesmos por poros presentes nas membranas celulares relacionados ao transporte aquoso de substâncias. Enquanto que os outros, de maior log P, tem absorção maior, cujas constantes de absorção estão intimamente ligadas ao log P de cada um (TESTA et al., 2000).

A solubilidade, apesar de ser significativamente influenciada pelo log P também sofre influência de outros fatores físico-químicos, como a ionização da molécula, que depende de suas características estruturais e de seu pKa. Se uma molécula em dispersão molecular encontrar-se ionizada, esta terá maior dificuldade de interagir com membranas apolares, o que pode dificultar a absorção destas espécies químicas. É importante ressaltar que ao administrar um fármaco pela via oral, o mesmo encontrará diversos ambientes ao longo do trato gastrointestinal (TGI), desde a presença de enzimas já no ambiente bucal

cujas quantidades e tipos enzimáticos alteram-se ao longo do TGI até as mudanças bruscas de pH ao longo deste trajeto, o que pode culminar na ionização de moléculas dificultando a absorção.

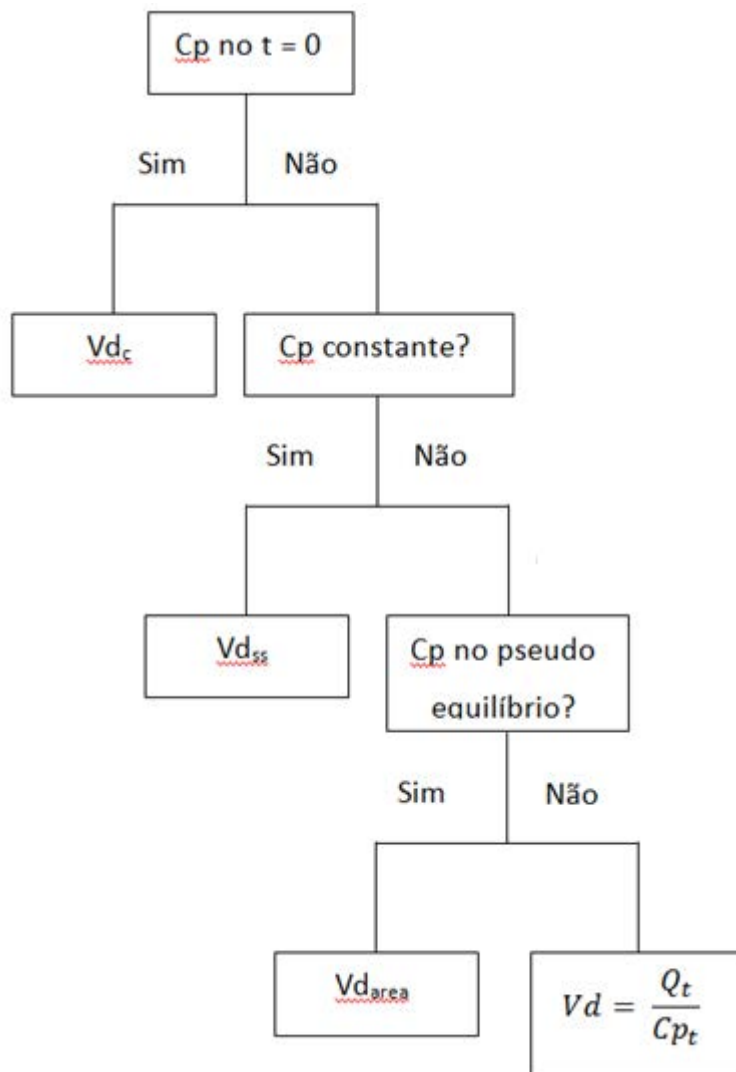
Uma vez absorvido, o fármaco tende a se distribuir no organismo até chegar ao seu local de ação para que assim exerça seu efeito terapêutico. Contudo, a distribuição de moléculas no organismo são processos que dependem intimamente de suas características físico-químicas (WATERS & LOMBARDO, 2010; van der WATERBEEMD et al., 2001).

O parâmetro farmacocinético Volume de Distribuição (V_d) não é uma medida de distribuição dos fármacos, é um conceito teórico que relaciona a quantidade de fármaco administrada com a concentração plasmática num dado momento (TOUTAIN & BOUSQUET-MÉLOU, 2004d).

Devido ao conceito de V_d estar atrelado ao tempo em que este é medido, existem vários V_d s que podem ser determinados ao longo da exposição de um indivíduo à um xenobiótico. Alguns destes V_d s são notáveis, principalmente o V_{d_c} , $V_{d_{ss}}$ e $V_{d_{area}}$. Toutain & Bousquet-Mélou (2004d) apresentaram um fluxograma para esclarecer o tipo de V_d calculado dependendo do momento em que a concentração plasmática foi determinada.

O esquema proposto na Figura 3 torna simples a identificação do cálculo de cada um dos principais V_d s.

Figura 3 - Fluxograma para o cálculo de V_d (adaptado de Toutain & Bousquet-Mélou (2004d))



O Vd_c é calculado a partir da concentração plasmática que ocorre no tempo 0 (zero), contudo, a medida da concentração plasmática neste tempo zero é impraticável, uma vez que administração e coleta deveriam ocorrer exatamente ao mesmo tempo e que a concentração real no tempo zero provavelmente não será a concentração máxima até por motivos físicos, uma vez que a dose não terá tempo de circular pela corrente sanguínea de forma suficiente para captar toda a concentração no exato momento da administração. Por estes motivos a Cp no tempo 0 é calculada de forma teórica, extrapolando os outros pontos obtidos para o tempo 0. O Vd_c é

importante no cálculo da dose de ataque para alguns casos, principalmente em anestesiologia para prever concentrações plasmáticas máximas que possam ocorrer numa única administração i.v. (TOUTAIN & BOUSQUET-MÈLOU, 2004d). Assim como todo V_d , o V_{d_c} é calculado a partir da Equação 2:

$$V_d = \frac{Q_t}{C_{p_t}}$$

Equação 2 - Cálculo de Volume de Distribuição genérico

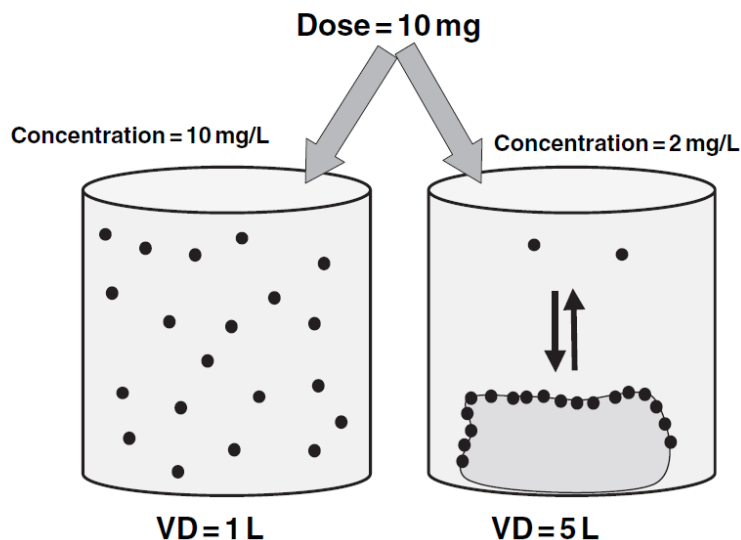
Onde Q_t é a quantidade de fármaco disponível no tempo t (no caso da administração i.v. para o cálculo do V_{d_c} , $Q = \text{dose}$) e C_{p_t} é a concentração plasmática no tempo t , para o V_{d_c} , $t = 0$.

Na Figura 3 também pode-se identificar o $V_{d_{ss}}$, que é o V_d obtido a partir da concentração plasmática no estado de equilíbrio. O estado de equilíbrio só acontecerá em administrações múltiplas ou em infusão contínua, neste caso, consegue-se identificar e medir o $V_{d_{ss}}$. Este V_d é o mais utilizado para o cálculo da dose de ataque, dose para atingir a concentração plasmática alvo após a primeira administração, e que será mantida no regime de doses múltiplas. (TOUTAIN & BOUSQUET-MÈLOU, 2004d).

O $V_{d_{area}}$ ou de pseudo-equilíbrio é obtido a partir da área sob a curva das concentrações plasmáticas versus tempo, momento no qual todos os processos de distribuição já estão em equilíbrio e o declínio da concentração plasmática ocorre somente devido ao metabolismo e excreção. Assim, o $V_{d_{area}}$ utiliza toda a exposição do organismo ao fármaco após atingir o pseudo-equilíbrio e, portanto, este parâmetro proporciona a ideia de quanto fármaco existe no organismo para ser excretado (TOUTAIN & BOUSQUET-MÈLOU, 2004d).

Frequentemente o V_d assume um valor muito maior do que o próprio volume corporal do indivíduo. A Figura 4 de Toutain & Bousquet-Mélou (2004d) é bastante ilustrativa quanto à interpretação dos valores exacerbados de V_d .

Figura 4 - Exemplificação da medida de Volume de Distribuição (TOUTAIN & BOUSQUET-MÈLOU, 2004d)



Percebe-se na Figura 4 que em um frasco de 1 L existem 10 mg de uma substância, portanto 10 mg de dose por 10 mg encontrados no recipiente, assume-se que o recipiente tem 1L. No segundo, um material com propriedades adsorventes sequestra 8mg da substância, nesta medida observa-se apenas 2mg, portanto 10 mg de dose por 2 mg encontrados no recipiente, este recipiente teoricamente tem 5 L. Portanto quando se administra um fármaco e os tecidos "adsorvem" mais o fármaco, a medição da concentração plasmática será bem menor do que a originalmente administrada e assim tem-se a impressão de que há muito mais volume para conter a dose inicialmente administrada do que o corpo realmente comporta.

Ou seja, quanto mais o fármaco se distribuir, mais ele será adsorvido pelos tecidos e assim maior será o volume de distribuição, portanto embora o Vd seja uma medida teórica que não foi desenhada para o propósito da distribuição de fato de um fármaco, o mesmo acaba refletindo estas características.

A distribuição do fármaco e sua capacidade de penetrar em certos tecidos dependem primariamente de suas características físico-químicas. Trazendo novamente os exemplos dos β -bloqueadores e seu vasto espectro de log Ps, sabe-se que o propranolol (log P 3,65) penetra prontamente no Sistema Nervoso Central (SNC) e causa efeitos adversos como a sonolência. O mesmo

não ocorre com o atenolol (log P 0,23) que tem efeitos desprezíveis no SNC por não possuir características físico-químicas favoráveis para a penetração pela Barreira Hematoencefálica (BHE) (TESTA, 2000).

No desenho de novas moléculas que tenham como tecido alvo o cérebro torna-se necessário incorporar certas características a estas moléculas de forma que a mesma consiga se distribuir para este tecido, ou seja ser permeável a BHE. Van der Waterbeemd e colaboradores (2001) reuniram dados sobre a determinação de características favoráveis para a penetração de moléculas no SNC e observaram que estas deveriam ter peso molecular menor do que 350 da e log P de 0 a 4, um pouco mais restritivo do que a regra dos 5 de Lipinski *et al.* (1997).

O log P e o volume de distribuição de uma molécula também são intimamente ligados demonstrando uma distribuição linear quando se relaciona log P e Vd. Se Vd aumenta quanto mais a molécula está adsorvida em algum tecido, o logP tem relação bastante semelhante. O log P e basicidade de uma molécula estão intimamente ligados à sua afinidade por membranas de moléculas e proteínas plasmáticas. Isso ocorre pois as membranas plasmáticas são formadas por uma dupla camada de fosfolipídeos com cabeça muitas vezes carregadas ou com grupamentos ácidos (SMITH *et al.*, 2010; van de WATERBEEMD *et al.*, 2001). Voltando ao exemplo dos β -bloqueadores, o Vd do propranolol (log P 3,65) é de 50 L/kg enquanto que o do atenolol (0,23) é de apenas 1 L/kg.

A ligação à proteínas plasmáticas é outro fator que influencia o Vd e está intimamente ligada à lipofilicidade das moléculas. A afinidade de um fármaco à proteínas do plasma faz com que este ligue-se às proteínas e não esteja disponível para outros processos biológicos, seja de atividade ou de metabolismo. A proteína mais abundante do plasma, a albumina, é a principal responsável pela ligação a fármacos. Assim como ocorre com as membranas plasmáticas, a lipofilicidade de uma molécula também influi na sua interação com proteínas, seja no seu sítio de atividade ou com proteínas inespecíficas que vão diminuir a fração livre de fármaco. Como nos exemplos anteriores,

quanto menor a quantidade de fármaco livre (não adsorvido) no sangue, maior será o Vd calculado (SMITH et al, 2010; van de WATERBEEMD et al, 2001).

A maior interação à proteínas gerada pelo aumento da lipofilicidade também influi em seu metabolismo, uma vez que o fármaco também terá maior afinidade pelas enzimas responsáveis por este processo. O Clearance (Cl), portanto, também é afetado pelas características físico-químicas dos fármacos, pois grande parte do Cl é decorrente da ação de enzimas nos órgãos metabolizadores, principalmente fígado e rins (BENET, 2010, TOUTAIN & BOUSQUET-MÉLOU, 2004c).

O Clearance expressa a quantidade de sangue que fica livre de fármaco por unidade de tempo e reflete a capacidade dos órgãos metabolizadores e excretoras de retirar o fármaco da corrente sanguínea, seja através da biotransformação ou de sua excreção. Por isso o Cl é considerado o parâmetro farmacocinético mais importante, pois através dele obtém-se a informação da taxa de saída do fármaco da corrente sanguínea e portanto pode-se planejar quanto fármaco precisa ser administrado para que haja equilíbrio entre a taxa de entrada e de saída de fármacos, e assim estabelecer-se o regime posológico (TOUTAIN & BOUSQUET-MÉLOU, 2004c).

O Cl é definido como a taxa de retirada do fármaco em relação a um processo específico pela concentração plasmática no tempo, determinado como segue:

$$Cl = \frac{\text{taxa de eliminação}}{\text{concentração (t)}}$$

Equação 3 - Cálculo genérico de Clearance

Na Equação 3, a taxa de eliminação pode ser de qualquer órgão, seja fígado, rins, pulmões, intestinos, etc. A soma dos clearances de cada órgão compõe o Clearance corporal. Ou ainda, a taxa de eliminação total do corpo dividido pela concentração plasmática do indivíduo também culmina na determinação do Clearance corporal (TOUTAIN & BOUSQUET-MÉLOU, 2004c).

Embora diversos órgãos possam contribuir para o Cl total do organismo, o fígado e os rins são os principais órgãos retiradores de fármaco do organismo. O fígado principalmente através de biotransformação utilizando essencialmente a família de enzimas do complexo citocromo P450 e os rins através de filtração glomerular e retirada do fármaco inalterado do organismo (TOUTAIN & BOUSQUET-MÉLOU, 2004c).

As características físico-químicas de um fármaco, principalmente a lipofilicidade, são determinantes para a via de escolha para a sua excreção. Fármacos lipofílicos tendem a ter maior afinidade por proteínas, conseqüentemente também por enzimas, e então estes fármacos tem maior clearance preferencialmente por metabolismo. A excreção por filtração glomerular renal tem a habilidade de retirar da corrente sanguínea moléculas menos lipofílicas, que tenham afinidade suficiente para serem excretadas em meio aquoso e, assim, fármacos menos lipofílicos possuem como rota principal de excreção os rins. No exemplo dos β -bloqueadores, no qual o propranolol tem Cl metabólico de 450 ml/min/kg e Cl renal desprezível e o atenolol o inverso, Cl metabólico desprezível e Cl renal de 2mL/min/kg (TOUTAIN & BOUSQUET-MÉLOU, 2000c; van de WATERBEEMD et al, 2001; TESTA, 2000).

Dentro do Cl metabólico, na família de citocromos P450 (CYP450), as isoformas mais frequentemente associadas ao metabolismo de xenobióticos são os CYP2C9, CYP2D6 e CYP3A4. A afinidade destas isoformas por seus substratos também se dá devido às suas características físico-químicas, o CYP2C9 metaboliza principalmente compostos lipofílicos que são ácidos ou com alta capacidade de fazer ligações de hidrogênio; o CYP2D6 principalmente moléculas básicas com um nitrogênio ligado à uma distância fixa do local de metabolismo; e o CYP3A4, o de maior extensão de metabolismo, tem afinidade por substâncias básicas e neutras ou ainda alguns ácidos (van de WATERBEEMD et al, 2001).

O Cl e o Vd são os parâmetros que influenciam a meia-vida de eliminação ($t_{1/2}$). Este é o parâmetro farmacocinético mais frequentemente reportado pois mesmo quando não se sabe a dose administrada ele pode ser

calculado como no caso do estudo farmacocinético de metabólitos. Ainda, a meia vida de eliminação tem maior significado para profissionais não especialistas em farmacocinética pois sua compreensão não requer abstrações teóricas como o Cl e o Vd (TOUTAIN & BOUSQUET-MÉLOU, 2004b).

A meia vida ($t_{1/2}$) é a medida de quanto tempo é necessário para a concentração plasmática, depois de atingir o estado de pseudo-equilíbrio, decline à metade. Tem grande utilidade na estimativa do intervalo entre doses, cálculo de acúmulo de doses e de eliminação completa de uma substância (Wash-out) (TOUTAIN & BOUSQUET-MÉLOU, 2004b).

Os parâmetros físico-químicos influenciam indiretamente na $t_{1/2}$ à medida em que modificam o Cl e o Vd. A $t_{1/2}$ relaciona-se com estes dois parâmetros de acordo com a seguinte equação:

$$t_{\frac{1}{2}} = \frac{0,693 \times Vd}{Cl}$$

Equação 4 - Cálculo da meia vida a partir do Vd e Cl

De acordo com a Equação 4, o aumento do Vd e diminuição do Cl corroboram para o aumento da $t_{1/2}$, portanto, a maior distribuição do fármaco leva ao acúmulo deste fora da corrente sanguínea e, assim, a substância fica menos disponível para o metabolismo e excreção, o que aumenta o tempo necessário para que seja excretada. Já o aumento do Cl fará com que o fármaco seja metabolizado/excretado mais rapidamente e assim a concentração plasmática diminuirá mais rapidamente, diminuindo o tempo com que a C_p se reduz à metade. Porém, um alto Vd pode compensar o alto valor de Cl e manter a meia vida. No caso dos β -bloqueadores, o Vd e o Cl do propranolol é 50 L/kg e 470 mL/min/kg, respectivamente e do atenolol 1L/kg e 2mL/min/kg, apesar da grande diferença de volume de distribuição e clearance, ambos possuem meias vidas semelhantes de 3 a 5 horas (TOUTAIN & BOUSQUET-MÉLOU, 2004b; van de WATERBEEMD et al, 2001; TESTA, 2000).

Portanto, as características físico-químicas dos fármacos influenciam diversos parâmetros farmacocinéticos e seu estudo em conjunto com a farmacocinética de forma precoce no desenvolvimento de uma nova molécula pode contribuir para auxiliar na previsão de fenômenos que interferem na absorção, distribuição metabolismo e excreção. Determinando parâmetros como log P, pka e solubilidade é possível identificar a necessidade de preparar uma formulação de modo a melhorar a solubilidade do fármaco e, assim, a absorção, ou compreender a falha de absorção do composto quando administrado por determinada via. Ainda, esses parâmetros podem auxiliar o entendimento dos processos de distribuição ou clearance, entre outras utilidades no estudo em farmacocinética.

4. Material e métodos

4.1 Determinação de LYSO-07 em solução por HPLC

4.1.1 Sistema Cromatográfico

O método analítico desenvolvido para a determinação de LYSO-07 em solução utilizou um sistema de cromatografia líquida de alta eficiência Waters Alliance®, equipado com detector UV-VIS 2487, operando em 366 nm. O composto foi separado em coluna analítica de fase reversa Symmetry® C18, 3,5 µm, 2,1mm x 50mm (Waters, EUA). A fase móvel foi constituída por Metanol:Solução aquosa de ácido fórmico 0,1%:Acetonitrila (10:5:85), em modo isocrático e um fluxo de 1,0 mL/min. O volume de cada injeção foi de 50µL.

O método foi validado de acordo com a resolução da ANVISA RE - n° 899, de 29 de maio de 2003. Assim, foram determinados, para o método desenvolvido, os seguintes parâmetros: especificidade, linearidade, precisão (repetibilidade e intermediária), exatidão e robustez.

4.1.2 Validação do método analítico

A validação consiste em avaliações de determinados parâmetros visando garantir a confiabilidade do método analítico desenvolvido. De tal forma, deve ser realizada para qualquer metodologia analítica não descrita em farmacopeias ou em formulários oficiais devidamente reconhecidos pela Agência de Vigilância Sanitária (ANVISA). Essa validação foi baseada no Guia para Validação de Métodos Analíticos e Bioanalíticos da ANVISA descrito na RE nº 899, de 29 de maio de 2003.

De acordo com a Quadro 2, determinou-se a finalidade para a qual se destina o método desenvolvido nesse trabalho. O mesmo enquadra-se na categoria I. Os parâmetros analisados para validação deste método estão descritos na Quadro 2 e 3.

Quadro 2 - Classificação dos testes, segundo sua finalidade

Categoria	Finalidade do Teste
I	Testes quantitativos para a determinação do princípio ativo em produtos farmacêuticos.
II	Testes quantitativos ou ensaio limite para determinação de impurezas e produtos de degradação em produtos farmacêuticos e matérias-primas.
III	Testes de performance (por exemplo: dissolução, liberação do ativo).
IV	Testes de identificação.

(Fonte: Brasil, 2009)

Quadro 3 - Ensaio necessários para validação do método analítico, segundo sua finalidade

Parâmetro		Categoria I	Categoria II		Categoria III	Categoria IV
			Quantitativo	Ensaio Limite		
Especificidade		Sim	Sim	Sim	*	Sim
Linearidade		Sim	Sim	Não	*	Não
Intervalo		Sim	Sim	*	*	Não
Precisão	Repetibilidade	Sim	Sim	Não	Sim	Não
	Intermediária	**	**	Não	**	Não
Limite de Detecção		Não	Não	Sim	*	Não
Limite de Quantificação		Não	Sim	Não	*	Não
Exatidão		Sim	Sim	*	*	Não
Robustez		Sim	Sim	Sim	Não	Não

*Pode ser necessário, dependendo da natureza do teste específico.

**Se houver comprovação de reprodutibilidade não é necessária a comprovação da Precisão Intermediária.

(Fonte: Brasil, 2009)

4.1.2.1 Especificidade/Seletividade

Para o estudo de especificidade realizou-se três análises de amostras branco, constituída pelo solvente acetonitrila, veículo no qual o produto foi solubilizado. Comparou-se tais amostras com solução de LYSO-07 10µg/mL, para certificar-se que o resultado da análise não é alterado pelo solvente.

4.1.2.2 Linearidade e Intervalo

O estudo de linearidade e intervalo foram realizados através da construção de uma curva analítica de soluções padrão de LYSO-07 em sete diferentes concentrações e em triplicata, 10 µg/mL, 7,5 µg/mL, 5 µg/mL, 2,5 µg/mL, 1 µg/mL e 0,5 µg/mL, compreendendo o intervalo de análise de 80 a 120% da concentração teórica do teste. O coeficiente de correlação (r) deve ser maior ou igual a 0,99.

4.1.2.3 Precisão

Uma vez determinada a faixa de linearidade, selecionou-se os valores de concentração para os controles de qualidade baixo, médio e alto (CQB, CQM e CQA), que foram analisados simultaneamente às amostras durante o estudo. Sendo eles, CQB 1 µg/mL, CQM 5 µg/mL e CQA 7,5 µg/mL.

Os estudos de repetibilidade (precisão intra-corrída) e precisão intermediária (precisão inter-corrídas) envolveram a análise de CQB, CQM e CQA, em triplicata. Para tal parâmetro ser aceito o coeficiente de variação (CV%) das amostras analisadas deve ser inferior a 5%, sendo esse determinado segundo a Equação 5 abaixo:

$$CV(\%) = \frac{\text{Desvio Padrão}}{CMD} \times 100$$

Equação 5 - Cálculo do coeficiente de variação

Sendo, CMD a concentração média determinada.

4.1.2.6 Exatidão

A exatidão foi determinada através da análise, em triplicata, de CQB, CQM e CQA. Calculou-se esse parâmetro como sendo a porcentagem da recuperação do analito ou então, comparando as concentrações obtidas experimentalmente com as concentrações teóricas, de acordo com Equação 6 a seguir:

$$\text{Exatidão} = \frac{\text{Conc.MédiaExperimental}}{\text{Conc.Teórica}} \times 100$$

Equação 6 - Cálculo de exatidão utilizado na validação do método analítico

O critério de aceitação para este parâmetro é o valor obtido na faixa de 80% a 120% da concentração teórica do teste.

4.1.2.7 Robustez

Realizou-se os estudos de robustez fazendo pequenas variações nas condições cromatográficas determinadas na metodologia analítica, sendo essas: tipo de coluna, composição da fase móvel (alteração de $\pm 2\%$ na concentração de acetonitrila e outra modificação com alteração de $\pm 2\%$ na concentração de metanol), pH da fase móvel (2,43-2,83), comprimento de onda no detector (364-368 nm), fluxo da fase móvel (0,8 – 1,2 mL/min) e marca do solvente orgânico (Metanol J.T.Baker® e Merck®). Esse ensaio foi realizado de acordo com o teste de Youden, o qual avalia não somente a robustez mas também a influência da variação de cada parâmetro sobre o resultado final (RIBANI et al., 2004). Através desta metodologia foram realizadas duas determinações independentes, sendo que em uma determinação variou-se os parâmetros cromatográficos para valores acima dos reais, e na outra variou-se os parâmetros para valores menores do que os reais. Cada uma das análises foi realizada em triplicata usando-se o valor médio para os cálculos. A combinação fatorial utilizada no teste é apresentada na Tabela 1, letras maiúsculas significam manutenção das condições cromatográficas normais e as minúsculas representam variação de tais condições.

Tabela 1 - Combinação Fatorial de parâmetros cromatográficos para avaliação da robustez pelo Teste de Youden.

Parâmetro Cromatográfico	Combinação Fatorial							
	1	2	3	4	5	6	7	8
Qualidade das colunas	A	A	A	A	a	a	a	a
Concentração de metanol	B	B	b	b	B	B	b	b
Concentração de acetonitrila	C	c	C	c	C	c	C	c
Fluxo	D	D	d	d	d	d	D	D
Comprimento de onda UV-VIS	E	e	E	e	e	E	e	E
pH da fase móvel	F	f	F	F	F	f	f	F
Marca do Metanol	G	g	g	G	g	G	G	g
Resultados	s	t	u	v	w	x	y	z

As condições do teste de Youden com variações para valores acima dos normais e abaixo dos normais são apresentadas, respectivamente, nas Tabelas 2 e 3.

Tabela 2 - Parâmetros analíticos e variações efetuadas para valores abaixo dos normais no teste de Youden.

Parâmetro		Condição normal		Variação	
A a	Tipo da coluna	Symmetry – Waters®	- A	SunFire – Waters®	- a
B b	% de metanol	10%	- B	8%	- b
C c	% de acetonitrila	85%	- C	83%	- c
D d	Fluxo da fase móvel	1,00 mL min	- D	0,8 mL min	- d
E e	Comprimento de onda	366 nm	- E	363	- e
F f	pH água ácida	2,63	- F	2,43	- f
G g	Marca do metanol	J.T.Baker	- G	Merck	- g

Tabela 3 - Parâmetros analíticos e variações efetuadas para valores acima dos normais no teste de Youden.

Parâmetro		Condição normal		Variação	
A a	Tipo da coluna	Symmetry – Waters®	- A	SunFire – Waters®	- a
B b	% de metanol	10%	- B	12%	- b
C c	% de acetonitrila	85%	- C	87%	- c
D d	Fluxo da fase móvel	1,00 mL min	- D	1,2 mL min	- d
E e	Comprimento de onda	366 nm	- E	369	- e
F f	pH água ácida	2,63	- F	2,83	- f
G g	Marca do metanol	J.T.Baker	- G	Merck	- g

A variação de cada condição cromatográfica alterada será mensurada pela Equação de Youden (Equação 7), que calcula o efeito das variações propostas sobre o cromatograma.

$$\text{Efeito}^A/a = \frac{s+c+u+v}{4} - \frac{w+x+y+z}{4}$$

Equação 7 - Equação de Youden para a determinação do efeito de um parâmetro sobre a robustez do teste

De acordo com o teste de Youden a alteração dos parâmetros passa a ser significativa quando o valor do efeito é maior do que o nível do teste, o nível para o método analítico desenvolvido foi determinado - em condições normais - através da Equação 8.

$$\text{Nível} = S\sqrt{2}$$

Equação 8 - Equação de Youden para a determinação de Nível

Sendo, S o desvio padrão dos teores.

4.2 Determinação da estabilidade química da LYSO-07

Os ensaios de estabilidade química em diferentes pHs foram realizados para observar se há degradação na exposição da molécula LYSO-07 à condições de pH semelhantes ao trato digestório. Para isso uma quantidade determinada de LYSO-07 foi pesada e adicionada a duas soluções tampão diferentes, sendo uma com pH 1,2, mimetizando o ambiente estomacal, e outro no pH 7,4, mimetizando as condições plasmáticas.

Para que o composto seja considerado estável o critério de aceitação é não apresentar degradação maior que 10%.

4.2.1 Tampão Clark-Lubs (pH 1,2)

Para preparo da solução tampão Clark-Lubs preparou-se uma solução de cloreto de potássio na concentração de $0,2 \text{ mol.L}^{-1}$ e uma solução de ácido clorídrico $0,2 \text{ mol.L}^{-1}$. Posteriormente adicionou-se à solução de cloreto de potássio volume suficiente da solução de ácido clorídrico até atingir o pH de 1,2.

4.2.2 Tampão fosfato de potássio (pH 7,4)

Para preparar a solução tampão fosfato de potássio preparou-se uma solução de fosfato de potássio $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ e uma solução de ácido clorídrico na concentração de $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$. Posteriormente adicionou-se à solução de fosfato de potássio volume suficiente da solução ácida até atingir pH 7,4.

4.2.3 Estabilidade química em pH ácido

Para determinar a estabilidade química em pH 1,2, pesou-se o fármaco em quantidade suficiente dissolvendo-o em tampão Clark-Lub para preparo de uma solução de concentração 2 µg/mL.

Essa solução foi submetida a agitação constante em agitador magnético Nova Ética® à $37 \pm 2^\circ\text{C}$ durante todo o ensaio. Os tempos de coleta foram zero; 0.25; 0.5; 1; 2; 4; 6; 8; 16; 24 h. As amostras coletadas foram analisadas através do método analítico desenvolvido e validado.

4.2.4 Estabilidade Química em pH alcalino

Para determinar a estabilidade química em pH 7,4, pesou-se o fármaco em quantidade suficiente dissolvendo-o em tampão fosfato de potássio para preparo de uma solução de concentração 2 µg/mL.

Essa solução foi submetida a agitação constante em agitador magnético Nova Ética® à $37 \pm 2^\circ\text{C}$ durante todo o ensaio. Os tempos de coleta foram zero; 0.25; 0.5; 1; 2; 4; 6; 8; 16; 24 h. . As amostras coletadas foram analisadas através do método analítico desenvolvido e validado

4.3 Determinação do log-P teórico.

Determinou-se o log P teórico do composto LYSO-07 através do software Chem Draw ultra 12.0 – Cambridge.

4.4 Log P da LYSO-07 pelo método cromatográfico

O sistema cromatográfico consistiu de um UPLC Acquity® com detector UV-Visível. A separação foi feita por uma coluna BEH 2,1x50mm, mantida a uma temperatura de 30°C. A fase móvel foi Metanol:Ácido fórmico 0,1% (70:30) pH 4 e fluxo de 0,4 mL/min. O volume de injeção foi de 2µL. O ensaio foi realizado com base no Guideline 117 (1989) da OECD. Foram selecionadas substâncias cuja curva de log k (log do fator de capacidade) versus o log P compreendesse o log P previsto para o composto (Tabela 4).

Tabela 4 - Substâncias utilizadas na curva para a determinação do log P.

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

O logaritmo do fator de capacidade k de cada substância da Tabela 4 foi calculado e plotado em função de seu log P para construção da equação de regressão linear que foi utilizada para o cálculo do log P do candidato a fármaco, LYSO-07.

Para determinar o log P foi necessária a construção de uma curva analítica, baseada nos tempos de retenção dos padrões. A média do tempo de retenção de cada padrão foi utilizada para cálculo do fator de capacidade (k) através da equação 9:

$$k = \frac{t_r - t_M}{t_M}$$

Equação 9 - cálculo do fator de capacidade (k)

Onde t_r é o tempo de retenção da substância e t_M é o tempo morto. O fator de capacidade de cada substância foi correlacionado ao coeficiente de partição teórico da mesma, para que dessa forma fosse construída a curva analítica (OECD, 1989). A equação da reta obtida foi utilizada para cálculo do coeficiente de partição da LYSO-07. Também calculou-se o coeficiente de determinação (r^2) da reta para avaliar sua linearidade.

4.5 Desenvolvimento de método bioanalítico para a determinação de LYSO-07 em plasma.

Com o objetivo de desenvolver um método bioanalítico para a determinação de LYSO-07 em plasma foram avaliadas diferentes condições cromatográficas através dos parâmetros Fator de Retenção (k) e resolução(Rs).

O espectro de absorvidade da LYSO-07 foi obtido no leitor de placas Biotek® PowerWave HT. O cromatógrafo utilizado foi o Waters UPLC H-Class ® com detector UV-Vis. As colunas testadas foram Acquity UPLC HSS C18 SB 1,8um 2,1x100mm; Acquity UPLC CSH C18 1,7um 2,1x100mm; Acquity UPLC BEH C18 1,7um 2,1x50mm.

A estrutura química do composto lhe confere a existência de isômeros geométricos e, assim, considerou-se adequado que o método bioanalítico fosse capaz de separar esses isômeros. Diferentes isômeros podem conferir diferentes atividade biológicas e também diferentes efeitos tóxicos (BISBY et al., 2012, QI et al., 2012).

Como critério de aceitação do cromatograma final, consideramos que a Rs deve ser maior que 1,25 (SNYDER, 2010). Segundo Snyder (2010), dependendo do encaudamento dos picos, pode ser necessário até mesmo uma $R_s \geq 2,0$. Para determinar cada parâmetro selecionado utilizou-se as equações apresentadas na Tabela 5:

Tabela 5 - Cálculo dos parâmetros cromatográficos para os métodos estudados

Parâmetro	Fórmula
Fator de Retenção (k)	$k = \frac{t_r - t_M}{t_M}$
Pratos Teóricos(N)	$N = 16 \times \left(\frac{t_r}{W_b}\right)^2$
Seletividade (α)	$\alpha = \frac{k_b}{k_a}$
Resolução (Rs)	$Rs = 2 \times \frac{(t_{r2} - t_{r1})}{(w_1 + w_2)}$
Resolução (Rs2)	$Rs = \frac{\sqrt{N}}{4} \times \frac{(\alpha - 1)}{\alpha} \times \frac{k'_{r2}}{(k'_{r2} + 1)}$

t_r = tempo de retenção do pico ; t_M = tempo "morto" determinado pela primeira inflexão do cromatograma ; W_b , W_1 e W_2 = largura da base do pico; k_a e k_b = fator de retenção de cada pico

4.5.1 Processamento de LYSO-07 em amostras biológicas

A uma alíquota de 100 μ L de plasma foram adicionados 100 μ L acetoneitrila contendo o padrão interno (diazepam 10 μ g/mL), agitou-se por 30 segundos em vortex (Phoenix Lufenco ® AP56). Em seguida, centrifugou-se a 15000 RPM (20879 g) por 15 minutos e o sobrenadante (aproximadamente 150 μ L) foi separado e filtrado em membrana TFA com poro de 0.22 μ m. O filtrado foi acondicionado em vial Max Recovery e inserido no cromatógrafo para análise.

4.5.2 Validação do método bioanalítico

A validação foi realizada de acordo com a resolução da ANVISA RE n° 899, de 29 de maio de 2003 e RDC 27, de 27 de maio de 2012. Para o método bioanalítico, foram analisados os parâmetros: especificidade, linearidade, precisão, exatidão, limite de quantificação, limite de detecção e estabilidades de curta duração e ciclos de congelamento e descongelamento.

4.5.2.1 Especificidade/Seletividade

Para o estudo de especificidade realizou-se três análises de amostras branco, constituída pelo plasma extraído utilizando-se acetonitrila sem a adição de padrão interno. Ainda, a RDC 27 preconiza a determinação do controle Zero, que é obtido através da extração de um plasma branco porém com a adição de padrão interno. Foi analisada a área destas amostras nos tempos de retenção de LYSO-07, nas amostras zero e para as amostras branco foi analisado também o tempo de retenção do padrão interno para certificar-se da inexistência de componentes do plasma ou do padrão interno em co-eluição com os analitos de interesse.

4.5.2.2 Linearidade e Intervalo

Os estudos de linearidade e intervalo foram realizados através da construção de uma curva analítica de plasma adicionado de LYSO-07 nas seguintes concentrações: 5 μ g/mL, 2,5 μ g/mL, 1,25 μ g/mL, 0,625 μ g/mL, 0,3125 μ g/mL e 0,15625 μ g/mL. O critério de aceitação de linearidade foi coeficiente de correlação (r) maior ou igual a 0,98.

A faixa de linearidade foi estabelecida de forma a explorar o método bioanalítico até a mínima concentração passível de ser determinada pelo sistema cromatográfico com precisão e exatidão. Através de estudos piloto, pôde-se observar quais tempos de coleta extrapolariam a curva, os mesmos foram calculados empregando-se a diluição destas amostras conforme protocolo estabelecido ao controle de diluição (CQD). Uma vez determinada a faixa de linearidade, selecionou-se os valores de concentração para os controles de qualidade baixo, médio e alto (CQB, CQM e CQA), que foram analisados simultaneamente às amostras durante o estudo. Sendo eles, CQB 0,3125 μ g/mL, CQM 1,25 μ g/mL e CQA 4 μ g/mL.

4.5.2.3 Precisão

Os estudos de repetibilidade (precisão intra-corrída) e precisão intermediária (precisão inter-corrídas) envolveram a análise de CQB, CQM e CQA , em triplicata. Para tal parâmetro ser aceito o coeficiente de variação

(CV%) das amostras analisadas deve ser inferior a 15%, sendo esse determinado segundo a equação 1 anteriormente apresentada.

4.5.2.4 Exatidão

A exatidão foi determinada através da análise em triplicata de CQB, CQM e CQA. Calculou-se esse parâmetro como sendo a porcentagem da recuperação do analito ou então, comparando as concentrações obtidas experimentalmente com as concentrações teóricas, de acordo com Equação 6 apresentada anteriormente

4.5.2.5 Estabilidade

Os estudos de estabilidade visam determinar se a concentração do analito permanece dentro de limites estabelecidos, numa dada matriz, sob condições específicas. Com estes dados é possível estabelecer o protocolo de tratamento e análise das amostras de forma a determinar corretamente os níveis do candidato à fármaco na matriz biológica.

4.5.2.5.1 Estabilidade de Curta Duração

Foi realizado à temperatura ambiente em bancada por até 24 horas com os controles CQA e CQB. Alíquotas dos controles foram retiradas no momento da adição de fármaco e 8, 12 e 24 horas após a mesma. A diferença entre as os testes e a amostra do tempo zero deve ser menor do que 10% para a mesma ser considerada estável.

4.5.2.5.2 Estabilidade Pós Processamento

Foi realizado à temperatura ambiente dentro do auto-injetor do UPLC por até 24 horas com os controles CQA e CQB. Os controles foram diretamente injetados logo após seu processamento e 8, 12 e 24 horas após o mesmo. A diferença entre as os testes e a amostra do tempo zero deve ser menor do que 10% para a mesma ser considerada estável.

4.5.2.5.3 Estabilidade de Ciclo de congelamento e descongelamento

As amostras foram congeladas à -20°C e mantidas por no mínimo 12 horas, sendo então submetidas ao descongelamento à temperatura ambiente. Quando completamente descongeladas, as amostras foram novamente congeladas por, no mínimo, 12 (doze) horas, e assim sucessivamente, o analito foi quantificado a cada ciclo. Foram realizados 3 ciclos para a determinação do ciclo de congelamento e descongelamento. As amostras foram consideradas estáveis enquanto a diferença entre análises foi menor do que 10%.

4.6 Caracterização dos analitos por espectrometria de massas

A determinação da presença dos isômeros do cromatograma foi realizada no laboratório Chroma da Universidade de São Paulo situada no campus de São Carlos com auxílio do Professor Doutor Álvaro José dos Santos Neto. O método desenvolvido neste estudo para o Waters UPLC H-Class foi transferido para o sistema UHPLC UltiMate 3000 RSLC da Thermo Scientific / Dionex e acoplado ao espectrômetro de massas MicrOTOF-Q II, espectrômetro de massas híbrido de alta resolução tipo quadrupolo - tempo de voo, da marca Bruker Daltonics.

Foram selecionados os íons de m/z 447,73 e fragmento 252 evidenciados durante as primeiras varreduras. A energia de colisão foi variada entre 20 e 40 eV e a resolução de isolamento do quadrupolo foi variado de 0 até 10 m/z para observar-se diferentes fragmentos que possam corroborar a fórmula estrutural da LYSO-07 e seus isômeros.

4.7 Determinação de parâmetros bioquímicos e farmacocinéticos

4.7.1 Modelo animal

Foram utilizados ratos Wistar (200-370g) machos provenientes do Biotério Central da UNESP Botucatu para a realização de todos os experimentos *in vivo*. Os animais foram transferidos para o biotério do Departamento de Princípios Ativos Naturais e Toxicologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP campus Araraquara, os quais foram

mantidos em condições controladas de temperatura ($23 \pm 1^\circ \text{C}$), umidade ($55 \pm 5\%$) e ciclo de luz automatizado de 12h – sendo as luzes diariamente acesas as 07h e apagadas às 19h. Os animais foram mantidos em caixas apropriadas em grupos de cinco, com ração balanceada e água *ad libitum*.

4.7.2 Protocolo experimental para a avaliação de segurança

preliminar hepática, renal, cardíaca e metabólica da LYSO-07

O experimento envolveu a utilização de 20 animais distribuídos em quatro grupos, a saber: Água, Suspensão, LYSO-07 e LYSO-07 na dose equimolar da pioglitazona detalhados a seguir. Os dois primeiros grupos são considerados controles por não conterem o fármaco em estudo.

A coleta de amostras foi feita nos dias 0, 7, 14 e 28 após o início do experimento. Considera-se dia 0 o dia em que a amostra de sangue foi coletada anterior à primeira administração e dia 28 o pós-exposição do fármaco. As coletas foram realizadas através de pequenas excisões na parte distal da cauda – cerca de dois centímetros - e as amostras de sangue foram colhidas e armazenadas em frascos *ependorf* de 2,0 mL previamente heparinizados (20 μL) e identificados de acordo com o animal, o grupo experimental e o dia de exposição.

As amostras foram centrifugadas a 3000 rpm (1127 g) durante 15 minutos. O plasma (sobrenadante) foi retirado e armazenado em outro frasco *ependorf* de 2,0 ml previamente identificados. Estes foram mantidos sob refrigeração, a uma temperatura de -20°C , até a execução das análises bioquímicas.

A dose de fármaco para a condução deste estudo foi calculada por extrapolação alométrica a partir da dose média utilizada em estudos de atividade do composto em camundongos. Santin e colaboradores (2013) avaliaram a atividade anti-ulcerativa da LYSO-07 em camundongos Swiss nas doses de 3, 25 e 50 mg/kg. A dose de 25mg/kg foi extrapolada do modelo camundongo Swiss para rato Wistar através do método descrito por Mahmood e colaboradores (1998) resultando na dose de 18mg/kg em ratos Wistar.

O período de administração foi baseado no trabalho do Sengupta et al. (2012), que avaliou o perfil farmacodinâmico e toxicológico da pioglitazona - fármaco referência no mercado - e determinou diversos parâmetros bioquímicos frente a exposição crônica. Para o cálculo de dose do grupo LYSO-07 na dose equimolar da pioglitazona, utilizado no estudo de Sengupta e colaboradores, considerou-se as relações de massa molecular da LYSO-07 e pioglitazona para a equivalência da quantidade de fármaco aos quais os animais foram expostos.

Este protocolo foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP (Protocolo n.15/2012).

4.7.2.1 Grupo água

Os animais deste grupo (n=5) receberam água na dose diária de 1ml para cada 250g de animal pela via oral (gavagem) por um período de 28 dias ininterruptos.

4.7.2.2 Grupo suspensão

Os animais deste grupo (n=5) receberam suspensão de carboximetilcelulose 2% dose diária de 1ml para cada 250g de animal de pela via oral (gavagem) por um período de 28 dias ininterruptos.

4.7.2.3 Grupo LYSO-07

Os animais deste grupo (n=5) receberam suspensão da LYSO-07 (18 mg/kg) na dose diária de 1ml para cada 250g de animal pela via oral (gavagem) por um período de 28 dias ininterruptos.

4.7.2.4 Grupo LYSO-07 na dose equimolar da pioglitazona (LYSO/PIO)

Os animais deste grupo (n=5) receberam suspensão da LYSO-07 na dose equimolar da pioglitazona (14,33 mg/kg) na dose diária de 1ml para cada 250g de animal pela via oral (gavagem) por um período de 28 dias ininterruptos.

4.7.2.5 Parâmetros bioquímicos

Foram avaliados os biomarcadores de toxicidade hepática, TGO e TGP; de toxicidade renal, creatinina e ureia; cardíaca, CK e CKMB; e metabólica, colesterol e glicose. As análises foram realizadas através de kits Labtest® e a leitura foi realizada em leitor de placas Powerwave HT da Biotek®.

4.7.3 Protocolo para a determinação dos níveis de concentração plasmática vs tempo da LYSO-07 em rato Wistar

Grupo i.v.: Foram utilizados 5 animais para a realização do grupo i.v. cuja dose de LYSO-07 administrada foi de 3,6 mg/kg em cânula previamente implantada na veia femoral. As doses e tempos de coleta foram definidos através de estudo piloto, definindo o desenho experimental para este grupo. O protocolo consistiu em 6 horas de coleta nos tempos 5, 10, 15, 30, 45, 60, 90, 240, 360 minutos. As coletas foram realizadas em cânula previamente inserida na artéria femoral dos animais. O volume de cada coleta foi de 250 µL de sangue.

Grupo oral: Foram utilizados 2 animais para o grupo oral. As coletas foram realizadas ao longo de 12 horas, nos tempos 5, 30, 45, 60, 90, 120, 360, 480, 600 e 720 minutos. As amostras foram tratadas de acordo com o protocolo de processamento de amostras biológicas do item 4.5.1. O volume de cada coleta foi de 250 µL de sangue.

4.7.3.1 Protocolo de preparo das formulações administradas nos animais

Para a via intravenosa foi utilizado o solvente DMSO na concentração de 45mg/mL, o que conferiu um volume de aproximadamente 100µL para um animal de 250g, seguro para esta via e espécie segundo Neervanan et al. (2006).

Para a via oral utilizou-se uma suspensão, a mesma descrita por Santin et al. (2013b) para os testes de atividade. Para cada mL de suspensão foram utilizados 2mg de carboximetilcelulose, 2 gotas de Tween 20 e 40µL de etanol. Porém, para os ensaios de segurança, na qual o veículo foi administrada por 28 dias aos animais, a concentração de etanol nesta formulação revelou-se

inadequada (4%). Utilizou-se, para os ensaios de segurança, uma adaptação do veículo utilizado por Santin et al. (2013b) substituindo a quantidade de etanol de 40 $\mu\text{L}/\text{mL}$ para 10 $\mu\text{L}/\text{mL}$. Nesta proporção o etanol se mostrou eficaz como molhante da carboximetilcelulose e o aspecto da suspensão permaneceu inalterado apesar da adaptação. A suspensão foi preparada para 4,5mg/mL (aproximadamente 1mL para um animal de 250g). Todas as formulações foram planejadas para atingir a dose de 18mg/kg.

4.7.3.2 Determinação de parâmetros farmacocinéticos

Os parâmetros farmacocinéticos foram calculados através das curvas concentração plasmática vs tempo (BJORNSSON, 1997). As meias vidas e as constantes de velocidade foram determinadas pelo modelo bicompartimental que melhor se adaptou aos dados experimentais. As constantes de velocidade foram calculadas com base na equação $0.693/t_{1/2}$ (TOUTAIN & BOUSQUET-MÉLOU, 2004). A área sob a curva de concentração plasmática vs tempo (ASC_{0-t}) foi calculada através do método dos trapezóides e a ASC_{0-inf} foi calculada através da equação $ASC_{0-inf} = ASC_{0-t} + C_n/k_{el}$, sendo C_n a última concentração plasmática determinada. Para o cálculo de clearance total foi utilizada a equação modelo independente $Cl = \text{dose}/ASC_{0-inf}$ (TOUTAIN & BOUSQUET-MÉLOU, 2004b) e para o cálculo de volume aparente de distribuição a equação $V_d = Cl/k_{el}$ (TOUTAIN & BOUSQUET-MÉLOU, 2004c).

4.8 Análise Estatística

Os parâmetros farmacocinéticos foram apresentados através das medianas, médias e intervalo de confiança (IC 95). O teste t não pareado e não paramétrico (Mann-Whitney) foi empregado para avaliar razões diferentes da unidade, com nível de significância fixado em 5% na comparação entre os grupos IV e gavagem. Os cálculos de regressão linear das curvas analíticas e coeficientes de variação (CV%) foram realizados utilizando-se o programa Origin®.

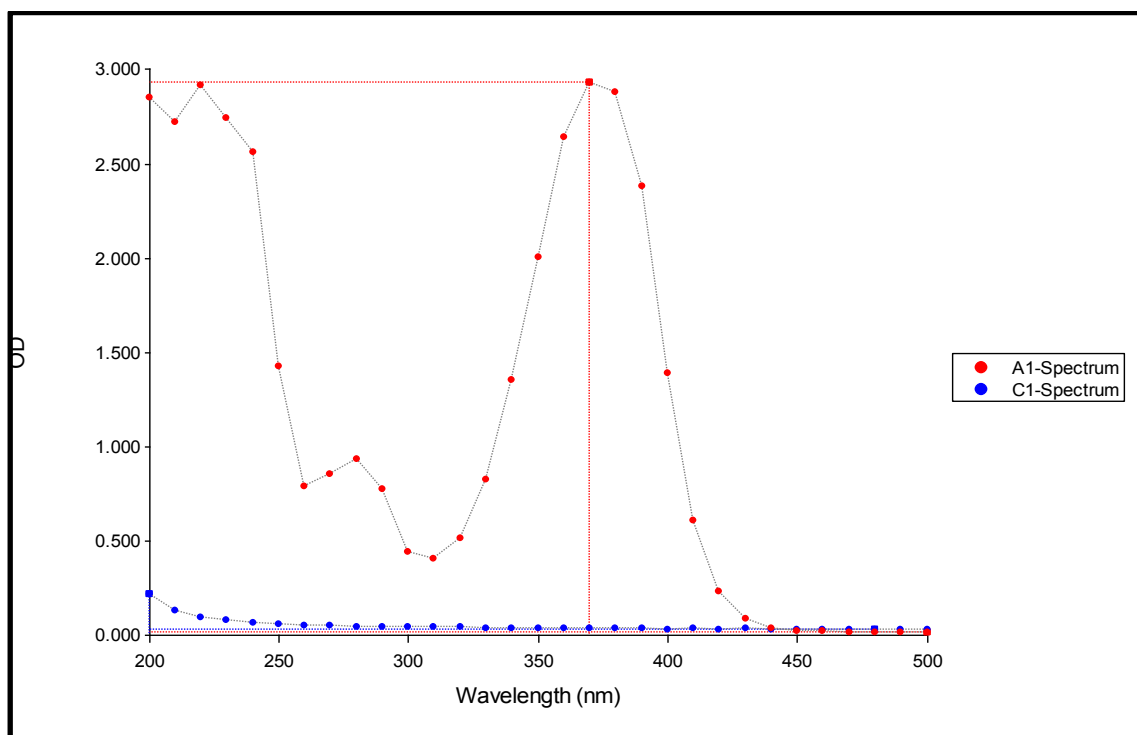
Os dados de parâmetros bioquímicos obtidos foram apresentados através das médias – intervalo de confiança 95%. O teste ANOVA foi empregado para avaliar as diferenças obtidas nos parâmetros bioquímicos da LYSO-07 entre os grupos seguidos de Mann-Whitney ou Tukey. Foi

considerado o nível de significância de $p < 0.05$. Foram empregados os programas GraphPad InStat e Microcal Origin™ para a realização dos cálculos.

5. Resultados e Discussão

Após a leitura do espectro de absorvância da LYSO-07 dissolvida em acetonitrila na concentração $100\mu\text{g/mL}$, o comprimento de onda de maior absorvância obtido foi o de 366nm . O espectro está demonstrado na Figura 5.

Figura 5 - Espectro UV-VIS da LYSO-07



A1-Spectrum refere-se à absorvância de LYSO-07 em acetonitrila; C1-Spectrum refere-se à absorvância de acetonitrila pura.

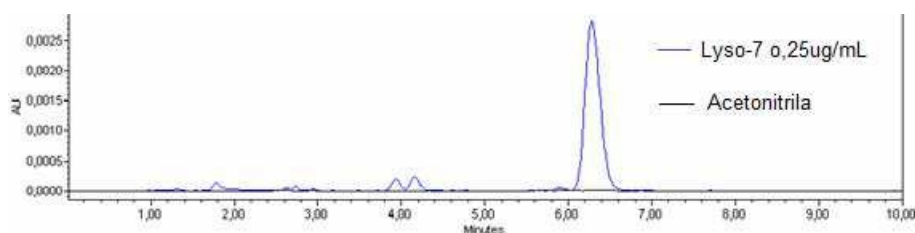
5.1 Validação do Método analítico

5.1.1 Especificidade

A seletividade foi avaliada através da análise, em triplicata, de amostras branco e solução padrão de LYSO-07 na concentração de $10\mu\text{g/mL}$. A partir dos cromatogramas obtidos (Figura 6) integrou-se a área dos picos e observou-se que não houve interferência significativa no resultado da análise na presença de acetonitrila. Não houve necessidade de realizar o teste de seletividade com outros tipos de interferentes além da acetonitrila, solvente

utilizado para solubilizar o composto, pois na execução desse estudo não foi utilizado outro tipo de matriz.

Figura 6 - Cromatograma de uma amostra branco e de um padrão de LYSO-07



5.1.2. Linearidade e Intervalo

A curva analítica foi construída com 6 diferentes concentrações de LYSO-07, analisadas em triplicata. Os resultados obtidos demonstraram que o método analítico desenvolvido apresentou resultados diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra, obtidos através da correlação da área dos cromatogramas (Figura 7 e Tabela 6).

Figura 7 - Cromatograma de solução padrão 7,5 µg/mL de LYSO-07.

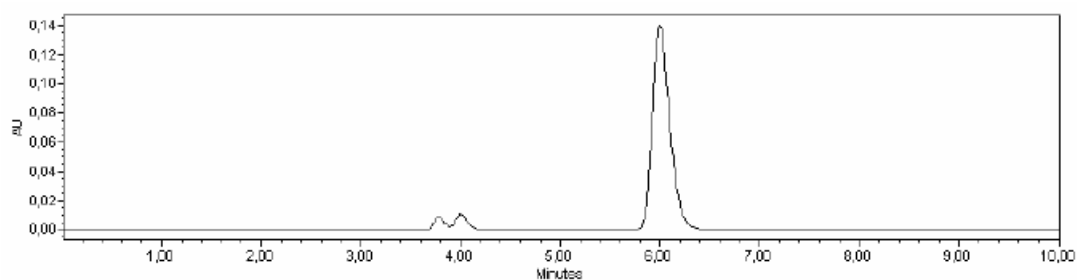


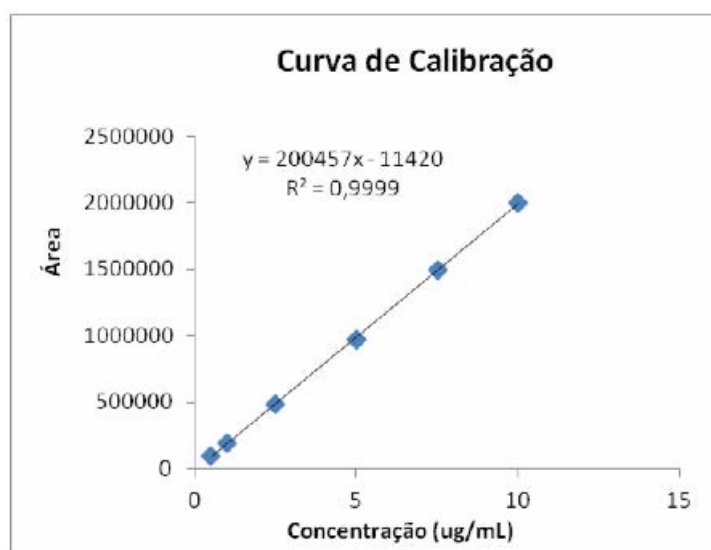
Tabela 6 - Curva analítica para a LYSO-07 em triplicata

Concentração (µg/mL)	Curva 1 (UA)	Curva 2 (UA)	Curva 3 (UA)
0,5	96070	92206	9621
1	189135	192404	200825
2,5	495579	482932	483069
5	980928	957030	986086
7,5	1476961	1495964	1488357
10	2000738	2028142	1977105
	r= 0,999	r= 0,999	r= 0,999

UA - unidade de área

Os resultados obtidos foram analisados pelo método de regressão dos mínimos quadrados para determinação da linearidade e coeficiente de correlação (r). De acordo com a resolução da ANVISA - RE 899 - 2003 (r) deve ser maior ou igual a 0,99, sendo obtido experimentalmente, um valor médio de 0,999 como mostrado na Tabela 6. A equação de linearidade e valor de p foram, respectivamente, $y=200457x-11420$ e $7,59 \times 10^{-9}$.

A curva analítica utilizada para a conversão entre as absorbâncias obtidas nas análises e as concentrações do analito, está representada na Figura 8.

Figura 8 - Curva analítica de LYSO-07 por HPLC.

5.1.3. Precisão

A precisão foi avaliada através da análise de nove amostras, em triplicata, dos controles de qualidade (CQA, CQM, CQB), que apresentaram coeficientes de variação - CV(%) - menores ou iguais a 5%, para a repetibilidade e precisão intermediária, calculado de acordo com a equação 1. Os resultados obtidos estão apresentados nas Tabelas 7 e 8.

Tabela 7 - Resultados do ensaio de repetibilidade e CV(%).

CQ	1 (UA)	2 (UA)	3 (UA)	Média (UA)	CV(%)
LIQ	77245	71233	76812	75097	4,46
CQB	161958	161827	165455	163080	1,26
CQM	836554	824969	845226	835583	1,22
CQA	1465255	1493994	1484563	1481271	0,99

UA - unidade de área

Tabela 8 - Resultados do ensaio de precisão intermediária e CV(%).

CQ	1 (UA)	2 (UA)	3 (UA)	Média	CV(%)
LIQ	96070	92206	96219	94831	2,40
CQB	189135	192404	180825	194112	3,11
CQM	980928	957030	986086	974681	1,59
CQA	1476961	1495964	1499357	1490761	0,81

UA - unidade de área

5.1.4. Exatidão

Este parâmetro pôde ser avaliado mediante análise dos controles de qualidade em triplicata, utilizando a Equação 5 para avaliar se houve concordância entre o resultado experimental e o teórico. Os resultados obtidos apresentam-se na Tabela 9.

Tabela 9 - Exatidão calculada para os controles de qualidade

CQ	1 (UA)	2 (UA)	3 (UA)	Média (UA)	CV(%)
LIQ	77245	71233	76812	75097	92,09
CQB	161958	161827	16455	163080	90,21
CQM	836554	824969	845226	835583	92,78
CQA	1465255	1493994	1484563	1481271	109,16

UA - unidade de área

5.1.5. Robustez

Para o teste de robustez, analisou-se um controle de qualidade alto em triplicata para cada condição modificada. Na Tabela 10 estão representados os valores de efeito calculados pelo Teste de Youden.

Tabela 10 - Valores de efeito calculados para cada parâmetro no Teste de Youden

Valores acima do normal		Valores abaixo do normal	
Parâmetro	Efeito^a	Parâmetro	Efeito^a
Qualidade da coluna (A=Symmetry® ; a=SunFire®)	1,742	Qualidade da coluna (A=Symmetry® ; a=SunFire®)	4,378
% de Metanol (B=10% ; b=8%)	2,850	% de Metanol (B=10% ; b=8%)	0,455
% de Acetonitrila (C=85% ; c=83%)	3,240	% de Acetonitrila (C=85% ; c=83%)	5,184
Fluxo da fase móvel (D=1mL□min;d=0,8mL□min)	17,855	Fluxo da fase móvel (D=1mL□min;d=0,8mL□min)	25,458
Comprimento de onda (E=366nm ; e=364nm)	0,186	Comprimento de onda (E=366nm ; e=364nm)	10,984
pH água ácida (F=2,63 ; f=2,43)	0,205	pH água ácida (F=2,63 ; f=2,43)	4,489
Marca do Metanol (G=J.T.Baker® ; g=Merck®)	0,845	Marca do Metanol (G=J.T.Baker® ; g=Merck®)	2,277

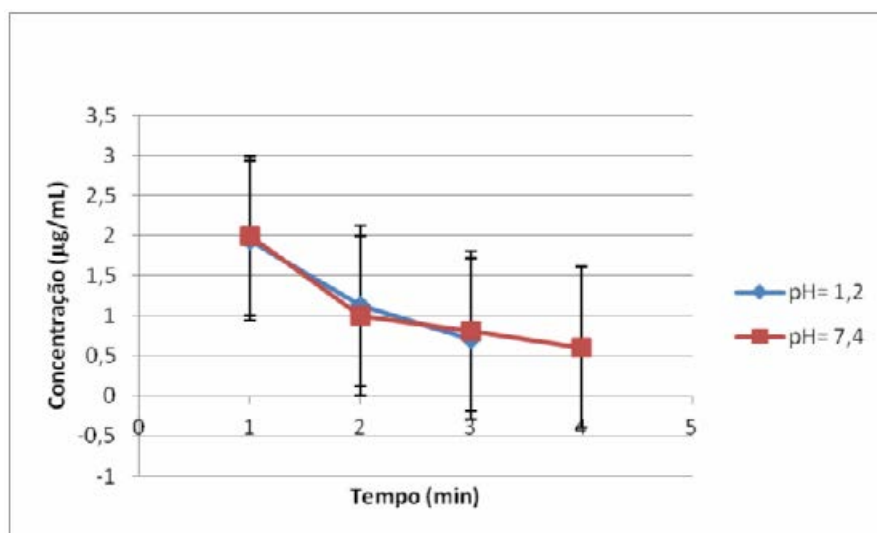
^a calculado a partir da diferença entre as médias de teor dos parâmetros com valores normais e dos parâmetros com valores alterados, como descrito no item 4.1.2.7.

O nível calculado no teste de Youden, explicados no item 4.1.2.7 para efeitos abaixo do normal foi 13,96, e o nível calculado para variação dos valores acima do normal foi 21,91. Sendo assim, ao comparar os valores de efeito (Tabela 10) e nível concluiu-se que o método foi robusto para todos os parâmetros excetuando-se na variação do fluxo da fase móvel.

5.2. Determinação da Estabilidade Química da LYSO-07

Os resultados da estabilidade química demonstraram que em ambos os pHs a LYSO-07 degradou mais do que 10%, sendo considerada instável para essas condições. Nota-se na Figura 9 que no tempo de 2 minutos o composto em pH ácido decaiu de uma concentração de 1,94 µg/mL para 1,13 µg/mL e em pH alcalino de 2,00 µg/mL para 1,00 µg/mL.

Figura 9 - Curva da estabilidade química em diferentes pHs.



Inicialmente o estudo de estabilidade foi planejado para o período de 12 horas, porém em decorrência da precipitação da LYSO-07 após 30 minutos em pH 1,2 e após 1 hora em pH 7,4, o ensaio foi interrompido. Esses resultados demonstraram a instabilidade da molécula, sugerindo que é provável que a administração oral do composto resulte em sua degradação.

Os resultados obtidos nos ensaios de estabilidade, foram comparados por ANOVA, seguidos por teste de Tukey. Todos os tempos apresentaram diferença estatística significativa em relação ao tempo zero.

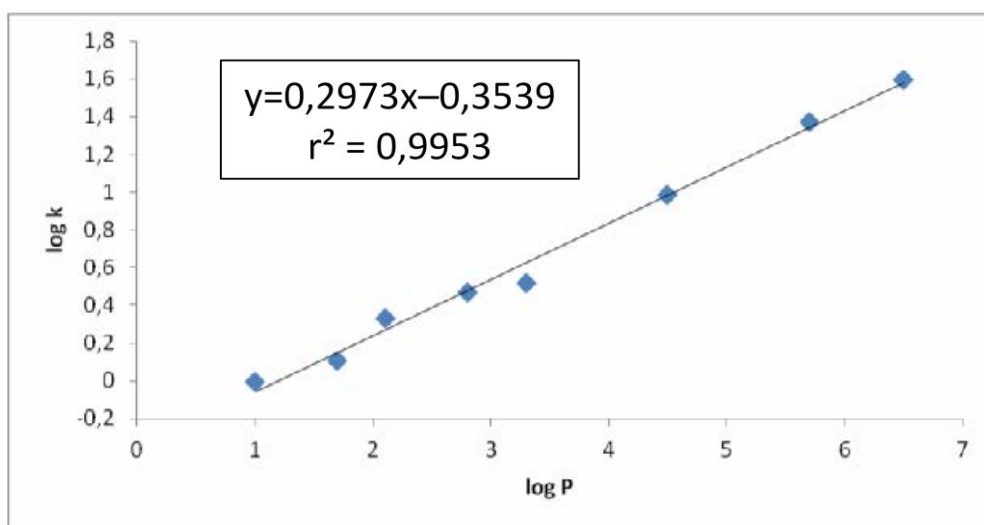
5.3. Determinação do Coeficiente de Partição (log P) teórico e experimental da LYSO-07 pelo método cromatográfico

O log P teórico previsto da LYSO-07 foi determinado pelo *software* ChemDraw® Ultra 12.0 e ALOGPS 2.1, sendo obtidos os valores de 4,39 e 4,86, respectivamente.

Para a determinação do log P experimental foi construída a curva de linearidade (Figura 10) dos padrões em duplicata, obtendo-se a equação $y = 0,2973x - 0,3539$ e coeficiente de determinação, $r^2 = 0,9953$ (Figura 10). O log k da LYSO-07 foi determinado a partir de seu tempo de retenção. Aplicando-se a equação da curva de linearidade ao log k obteve-se um valor de $6,582 \pm 0,00036$. Entretanto, embora todos os padrões recomendados pelo guia OECD 117 (1989) tenham sido inseridos na curva analítica, o valor máximo atingido foi ainda inferior ao fator de retenção do LYSO-07. Assim, os resultados obtidos permitiram apenas afirmar que o log P da LYSO-07 é maior ou igual a 6,5.

Para avaliar os efeitos do log P sobre a disposição do fármaco no organismo Lipinski e colaboradores (1997) elencaram alguns parâmetros físico-químicos desejáveis para moléculas desenvolvidas com fins terapêuticos, gerando a conhecida "Regra dos 5". Um desses parâmetros é o log P, para o qual Lipinski e colaboradores recomendam valores inferiores a 5. A LYSO-07 possui log P superior ou igual a 6,5 o que dificulta a formação de dispersão molecular nos fluidos biológicos para posterior permeação através da membranas biológicas. Contudo Lipinski e colaboradores postulam que nem todos os fármacos de sucesso no mercado atendem a todos os requisitos estipulados pela "Regra dos 5", sendo que os fármacos bem sucedidos falhavam no máximo em 2 parâmetros. Assim, o elevado log P do composto indica a necessidade do planejamento de uma formulação que auxilie em sua solubilização, o que viabilizaria a sua administração por via oral, por exemplo.

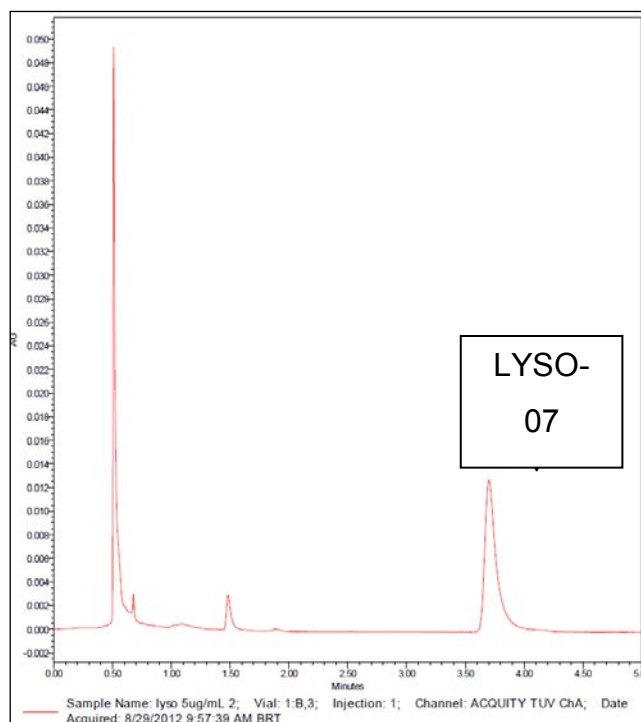
Figura 10 - Curva de linearidade de $\log k$ versus $\log P$ dos padrões.



5.4 Desenvolvimento do método bioanalítico para a determinação de LYSO-07 em plasma

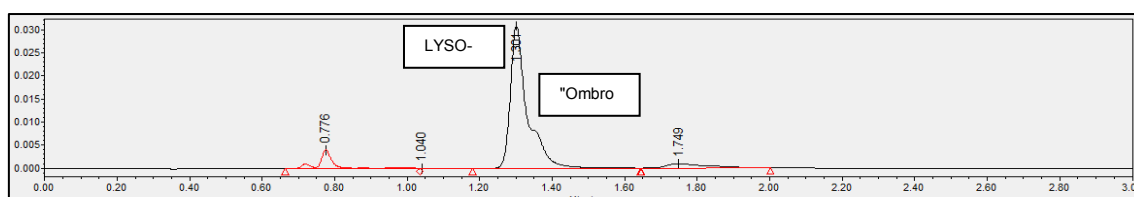
O desenvolvimento do método bioanalítico da LYSO-07 foi iniciado utilizando-se fase móvel acetonitrila:ácido fórmico 0,1% na proporção 70:30, apresentando o seguinte cromatograma (Figura 11).

Figura 11 - Cromatograma de LYSO-07 (5 μ g/mL) após processamento de amostra de plasma.



Porém alguns cromatogramas, dependendo da concentração utilizada, apresentaram um perfil de pico com "ombro" como pode ser observado na Figura 12.

Figura 12 - Cromatograma de LYSO-07 com "ombro"



A presença deste "ombro", eluindo no mesmo tempo de retenção da LYSO-07, sugere a presença de um isômero. A estrutura da LYSO-07 contém uma dupla ligação entre o anel tiazolidinodionico e o grupamento indólico. Esta estrutura permite a formação dos isômeros geométricos E e Z (Figura 2). Segundo Santin et al (2013), o isômero Z é o mais abundante por apresentar maior estabilidade teórica sobre o isômero E. Portanto, na Figura 12, é grande

a probabilidade de que o pico de maior área corresponda ao isômero Z e o "ombro" (menor área) ao isômero E.

Tendo em vista a separação dos isômeros (Figura 2), foram reiniciados os estudos sobre o método cromatográfico.

Para o estudo dos cromatogramas foram avaliados os parâmetros relacionados no item 4.5, a saber: Resolução, Pratos Teóricos, Fator de Retenção e Seletividade.

5.4.1 Estudo de Cromatogramas para a separação de isômeros

Foi adotada a convenção de que o pico de maior amplitude de "Pico 1", seria o isômero Z da LYSO-07. O pico de menor amplitude será indicado por "Pico 2" (isômero E). Como critério de aceitação do cromatograma, consideramos que a R_s deve ser maior que 1,25 (SNYDER, 2010). Segundo Snyder (2010), dependendo do encaudamento dos picos, pode ser necessário até mesmo uma $R_s \geq 2,0$. Os experimentos realizados estão dispostos na Tabela 11.

Tabela 11 - Testes realizados para o desenvolvimento do sistema cromatográfico com separação dos isômeros 1 e 2.

Teste	Fase Móvel MeOH/ACN/Ác For 0,1%	Coluna	Resolução (Rs)	Fator de Retenção (k)
I	0/73/27	HSS	0,264	2,717
II	10/63/27	HSS	0,410	3,886
III	10/53/37	HSS	0,883	17,324
IV	5/58/37	HSS	1,194	10,810
V	4/54/42	HSS	1,22	11,404
VI	4/50/46	HSS	1,386	18,226
VII	0/56/44	HSS	1,407	11,628
VIII	0/55/45	HSS	1,393	12,966
IX	0/60/40	CSH	2,351	12,545
X	0/70/30	CSH	1,750	6,500
XI	0/65/35	CSH	2,015	10,834
XII	0/65/35	BEH	---	---
XIII	60/40	BEH	---	---

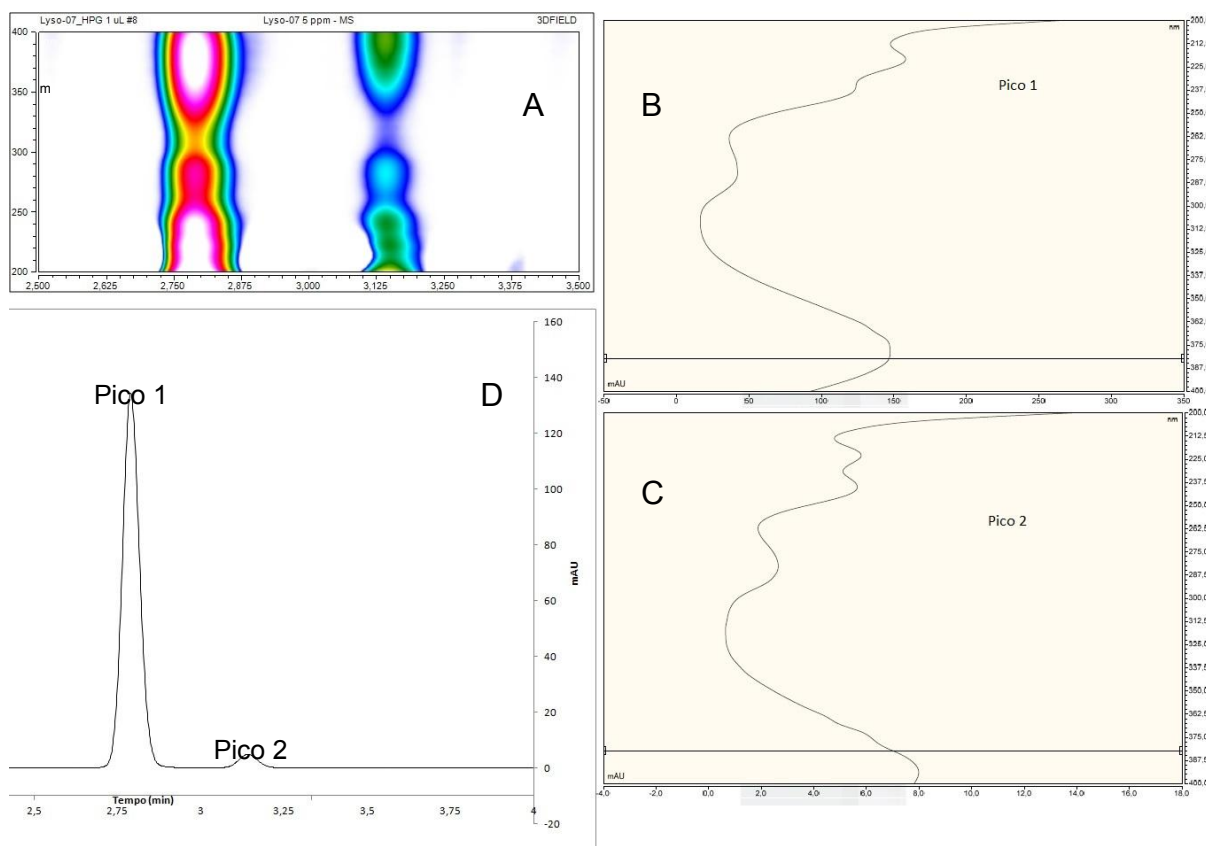
Na Tabela 11 estão apresentados os testes de diversas condições de fase móvel com o intuito de obter resolução maior do que 2,00. Foi observado nos testes II a VI que os sistemas que utilizavam ACN com Metanol (MeOH) de fase orgânica melhoraram a resolução entre os picos até 1,3 aproximadamente, contudo, o uso apenas de ACN teve efeito mais promissor na separação dos picos, chegando até 1,4 de resolução. A mudança de colunas foi determinante para a separação dos picos foram testadas as colunas HSS (High Strength Silica), CSH (Charged Surface Hybrid) e BEH (Ethylene Bridged Hybrid) que apresentam seletividades diferentes embora sejam colunas C18. Nos experimentos utilizando a coluna BEH não foi possível calcular os parâmetros do cromatograma pois não houve separação mensurável dos compostos. Enquanto que a coluna CSH apresentou a melhor performance das três na resolução entre os picos. Portanto, colunas mais longas (de 5cm da BEH para 10cm da CSH e HSS) de menor tamanho de partícula (de 1.8um da HSS para 1.7um da CSH) além da superfície carregada

presente na CSH (Charged Surface Hybrid) favorecem a separação dos isômeros, como pôde ser observado nas condições IX a XI. Com esta coluna obtiveram-se os resultados que reúnem de forma mais eficiente o tempo de retenção e resolução. O método selecionado foi o XI, que reúne de forma mais eficiente fator de retenção e resolução.

5.5 Caracterização dos isômeros por espectrometria de massas

Foi possível reproduzir o método cromatográfico desenvolvido no sistema UPLC H-Class Waters com coluna CSH (Waters) no sistema da Thermo, sem perda de resolução entre os picos devido a troca de sistema. No sistema UHPLC da Thermo foi utilizada a coluna CSH da Waters sem problemas de compatibilidade. Este cromatógrafo foi acoplado a um detector DAD (Diode Array Detector), onde foi possível utilizar esta técnica hifenada para obter informações estruturais além da separação cromatográfica.

Figura 13 - Cromatogramas da LYSO-07 com separação dos isômeros.

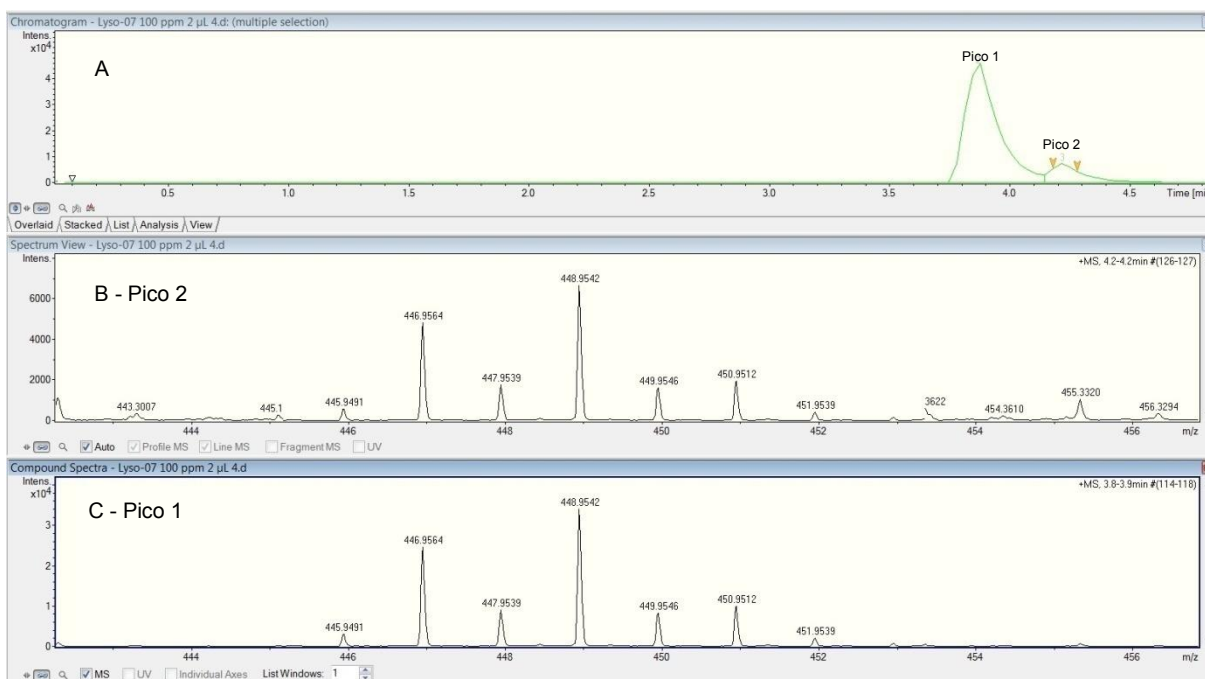


Na figura, A é o espectrograma UV dos picos 1 e 2; B e C os espectros UV dos picos 1 e 2 respectivamente; e D o cromatograma da LYSO-07 no UHPLC UltiMate 3000 RSLC com coluna CSH C18 com fase móvel de Acetonitrila:Ácido Fórmico 0,1% em água (65:35).

Pode-se observar na Figura 13 - D o cromatograma obtido no sistema da Thermo, bastante semelhante aos cromatogramas obtidos no UPLC Waters. Figura 13 - A, B e C são dados fornecidos pelo detector DAD que demonstram que a substância eluída no tempo de retenção de 2,765 (min) possui espectro de absorvância na região UV-Vis muito semelhante da substância eluída no tempo de retenção 3,140 (min). Apesar de fornecer pouca informação estrutural sobre a molécula, os espectros UV-Vis semelhantes sugerem que as estruturas das moléculas eluídas como pico 1 e 2 tem resposta semelhante quando expostas à radiação eletromagnética nestes comprimentos de onda e portanto possuem estruturas muito similares.

Além do DAD, o experimento contou com acoplamento no MicrOTOF-Q II, da Bruker Daltonics. Em um primeiro experimento, utilizou-se 20 eV na câmara de colisão e resolução de isolamento no quadrupolo de 0 m/z.

Figura 14 - Espectro de massas da LYSO-07 com separação dos picos 1 e 2.

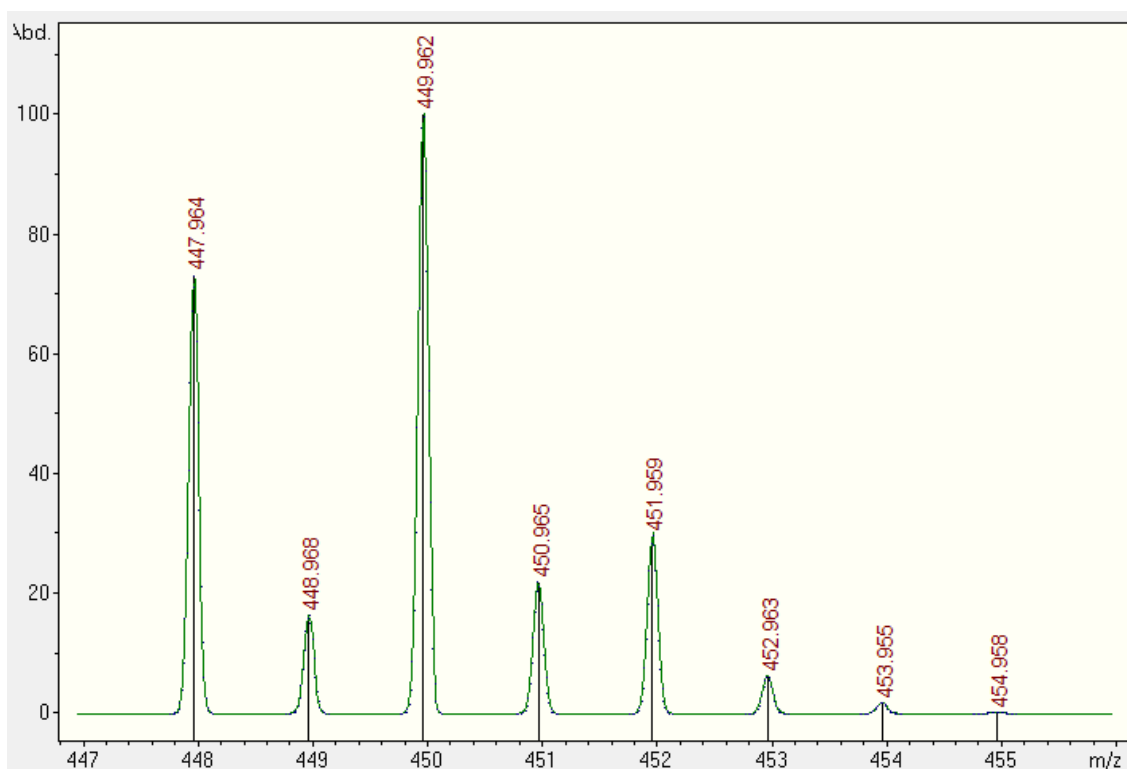


No quadro A está o massograma da LYSO-07 com separação dos isômeros. Nos quadros B e C estão os espectros de massas dos picos 1 e 2.

Pode-se observar na Figura 14 que quando selecionada especificamente a massa de da LYSO-07 observa-se os dois picos semi-separados, ou seja,

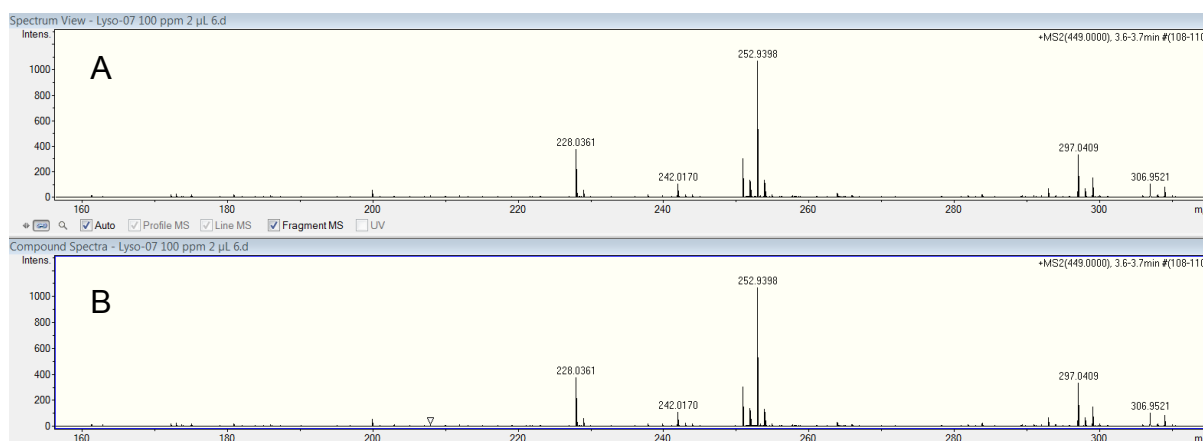
ambos os picos possuem a mesma massa exata (com 4 casas decimais) cujo $M+H$ é 448.9542, a massa calculada da LYSO-07 é 447,73. Com auxílio da ferramenta "Isotope Pattern" da Bruker Daltonics foi possível observar a distribuição isotópica teórica da LYSO-07 apresentada na Figura 15.

Figura 15 - Distribuição isotópica da fórmula molecular $C_{19}H_{13}BrClN_2O_2S$, a LYSO-07 + H.



Na Figura 15 pode-se observar que a distribuição isotópica das massas da fórmula molecular teórica da LYSO-07, $C_{19}H_{12}BrClN_2O_2S + H$, é bastante semelhante à experimental apresentada na Figura 14 para ambos os picos. Portanto, os espectros de massas dos picos apresentados na Figura 14 corresponde à distribuição teórica de massas da LYSO-07 e ambos os picos possuem a mesma distribuição isotópica. Estes dados apontam para a confirmação da hipótese de que os picos 1 e 2 sejam isômeros da LYSO-07.

Em seguida, selecionou-se a resolução de isolamento de 5 m/z mantendo a energia de colisão em 20 eV e os picos da LYSO-07 (100ppm) foram fragmentados conforme apresentado na Figura 16.

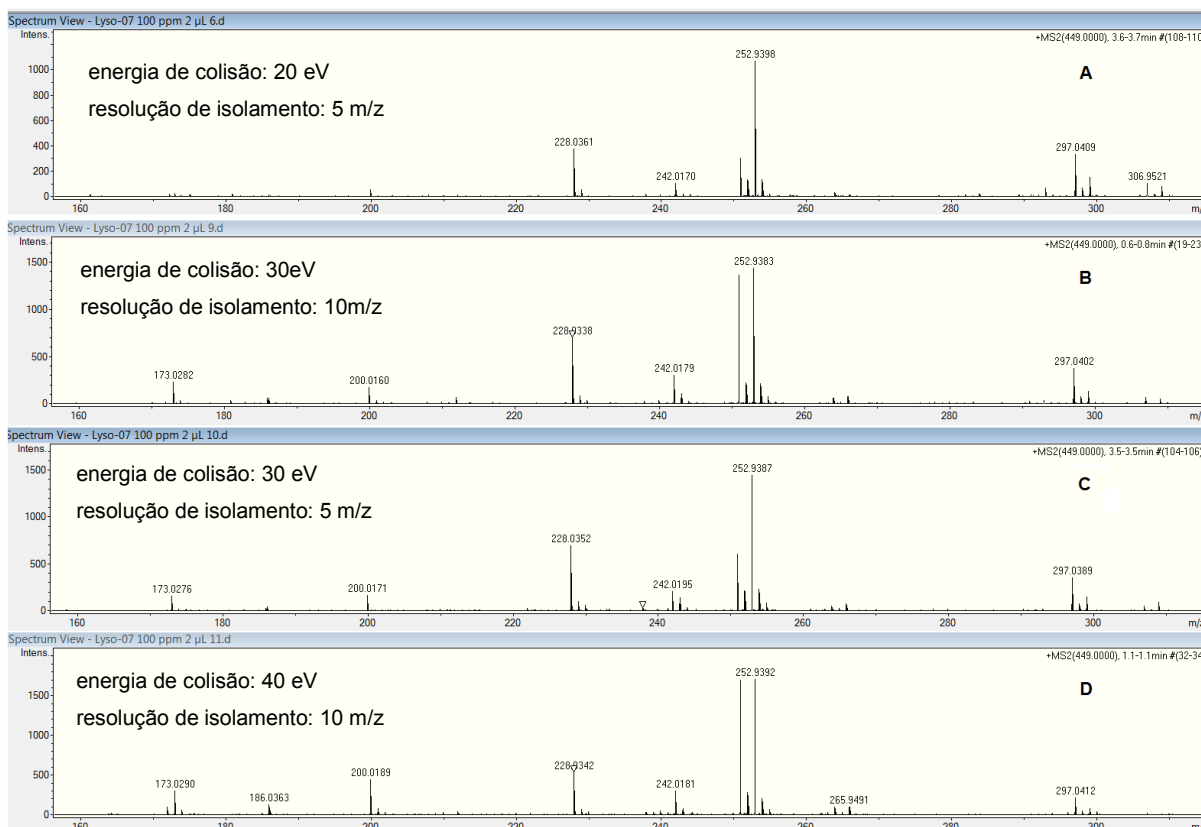
Figura 16 - Perfil de fragmentação da LYSO-07 picos 1 e 2.

A pico 1; B pico 2. Fragmentos obtidos com energia de colisão de 20 eV e 5 m/z de resolução de isolamento.

Na Figura 16 observa-se a semelhança no perfil de fragmentação de ambos os picos obtidos na separação da LYSO-07, onde o pico de m/z 252,93 revelou-se o fragmento majoritário, portanto, as moléculas possuem estruturas semelhantes e com labilidade em grupos funcionais equivalentes de forma que a fragmentação de ambas as moléculas geraram os mesmos fragmentos, assim as quebras das moléculas ocorreram nos mesmos pontos.

Na Figura 17 está representada as variações na energia de colisão e resolução de isolamento dos fragmentos.

Figura 17 - Variações das condições de fragmentação e os fragmentos formados do pico 1 da LYSO-07.

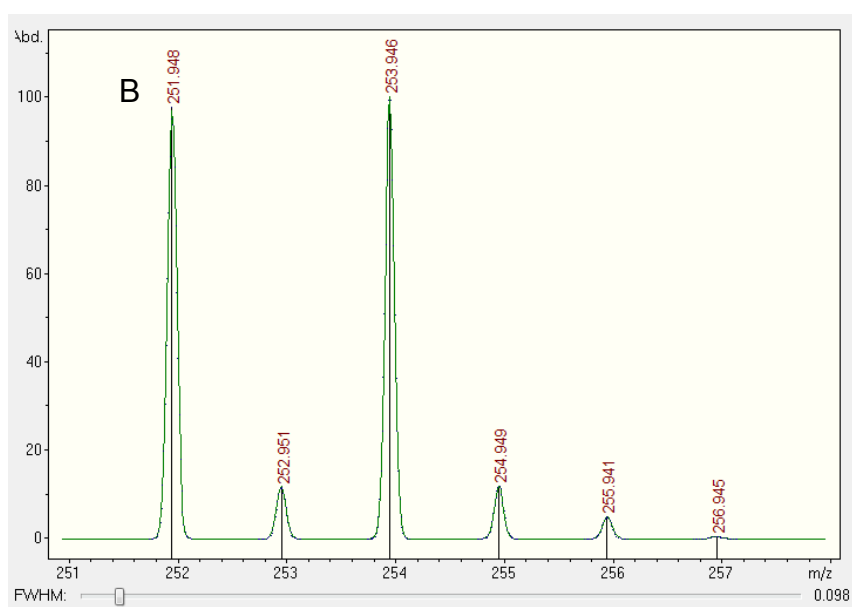
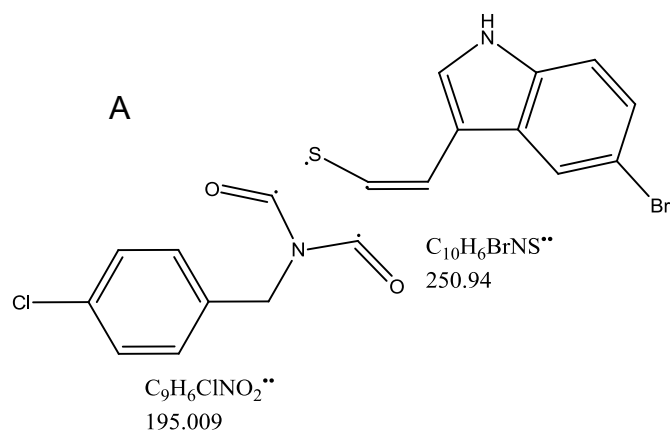


A: utilizou energia de fragmentação 20 eV e resolução de isolamento de 5 m/z; B: utilizou energia de fragmentação 30 eV e resolução de isolamento de 10 m/z; C: utilizou energia de fragmentação 30 eV e resolução de isolamento de 5 m/z; D: utilizou energia de fragmentação 40 eV e resolução de isolamento de 10 m/z;

Na Figura 17 é possível observar a influência da variação da energia de colisão e janela de isolamento de íons sobre a formação dos fragmentos do pico 1 da LYSO-07. O aumento da resolução de isolamento de 5 para 10 m/z favorece a detecção dos íons laterais aos fragmentos principais que são importantes para identificar a abundância dos isótopos dos átomos de cada fragmento. Já o aumento da energia de colisão faz com que sejam formados mais fragmentos, aumentando de 20 para 30 eV, observa-se a formação dos fragmentos 200,02 e 173,03. Já o aumento da energia de colisão para 40 eV favorece a formação do fragmento 186,04. O aumento do número de fragmentos e sua identificação pode fornecer ainda mais informações estruturais sobre as moléculas.

A quebra que originou o fragmento majoritário de m/z 252,9387 está apresentada na Figura 18.

Figura 18 - Caracterização do fragmento 252,93.

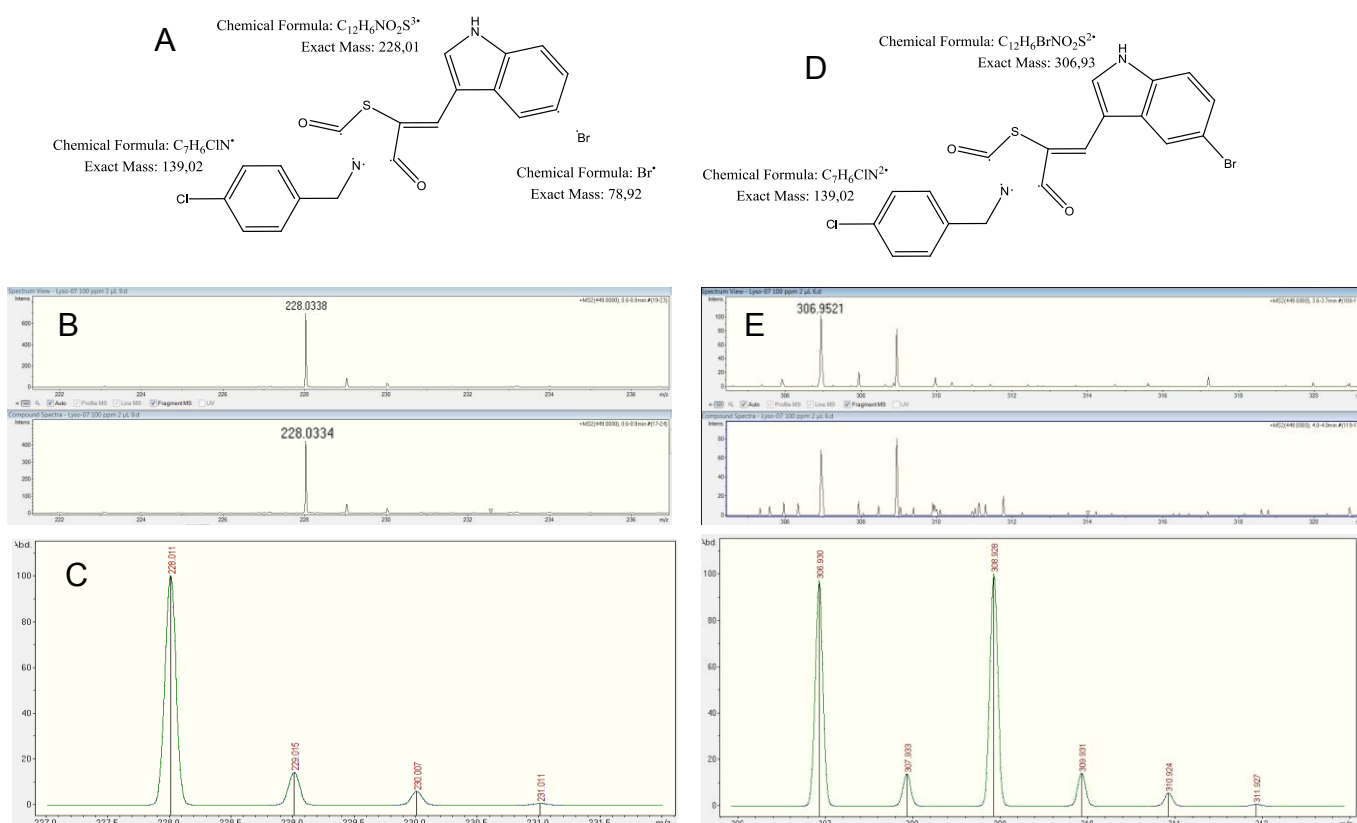


A: representação estrutural da quebra utilizando o ChemDraw Ultra versão 12.0.2. B: espectro que massas dos picos 1 e 2 respectivamente analisados no Compass DataAnalysis da Bruker Daltonics. C: Distribuição isotópica obtida com a ferramenta Compass Isotope Pattern da Bruker Daltonics

A quebra que originou o fragmento 252,93, bastante evidente no espectro de massas, é um pico lateral originado devido a abundância isotópica do bromo, o qual possui os isótopos de massas 78,92 e 80,92 cuja abundância natural é de aproximadamente 50% para cada isótopo, originando dois picos de tamanhos semelhantes de m/z 250,9427 e 252,9392 (Figura 18 - B). A quebra proposta na Figura 18 - A originou a distribuição isotópica teórica representada na Figura 18 - C, estes dados foram condizentes com o espectro de massas experimental observado na Figura 18 - B, portanto esta quebra é plausível dentro dos dados experimentais e teóricos para os fragmentos formados.

Os fragmentos 228,01 e 306,93 possuem quebras semelhantes e portanto foram agrupados na Figura 19.

Figura 19 - Caracterização dos fragmentos 228,03 e 306,93.



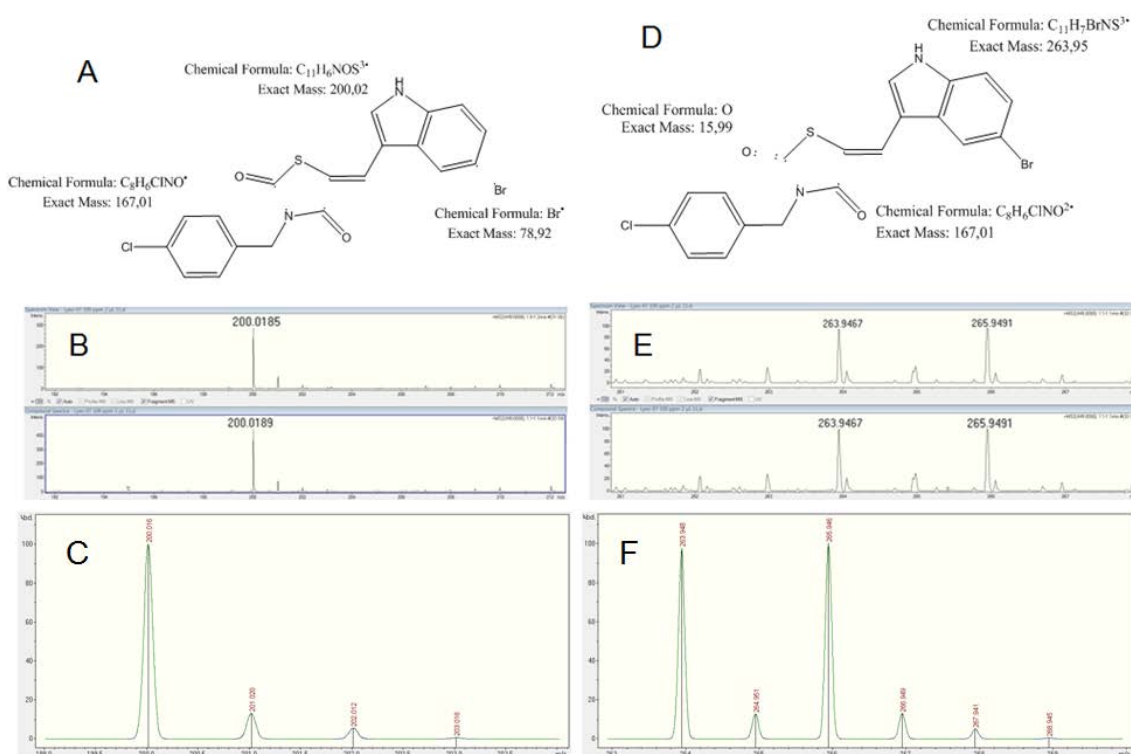
A: representação estrutural da quebra utilizando o ChemDraw Ultra versão 12.0.2. B: espectro que massas dos picos 1 e 2 respectivamente analisados no Compass DataAnalysis da Bruker Daltonics. C: Distribuição isotópica obtida com a ferramenta Compass Isotope Pattern da Bruker Daltonics

Percebe-se que o fragmento 228,93, não possui em sua estrutura os átomos de Cloro ou Bromo devido a distribuição isotópica experimental (Figura 19 - B), portanto, na proposta de quebra da Figura 19 - A, há a perda neutra de Bromo como Br_2 ou HBr e a quebra no anel tiazolidinodiona numa posição diferente da quebra que originou o fragmento 252,93. A distribuição isotópica teórica representada na Figura 19 - C corresponde à experimental da Figura 19 - B. Portanto, a quebra proposta na Figura 19 - A é plausível para corresponder ao fragmento 228,03.

O mesmo ocorre para o fragmento 306,93, onde não há perda do Bromo e o perfil isotópico para o pico lateral de massa 308,93 tem a mesma intensidade do fragmento principal devido a abundância dos isótopos do Br serem de 50% para cada. Assim as Figuras 19 - E e F corroboram que a proposta de fragmentação na Figura 19 - D também seja plausível.

Os fragmentos seguintes também possuem quebras semelhantes e portanto foram agrupados na Figura 20.

Figura 20 - Caracterização dos fragmentos 200,02 e 263,94.



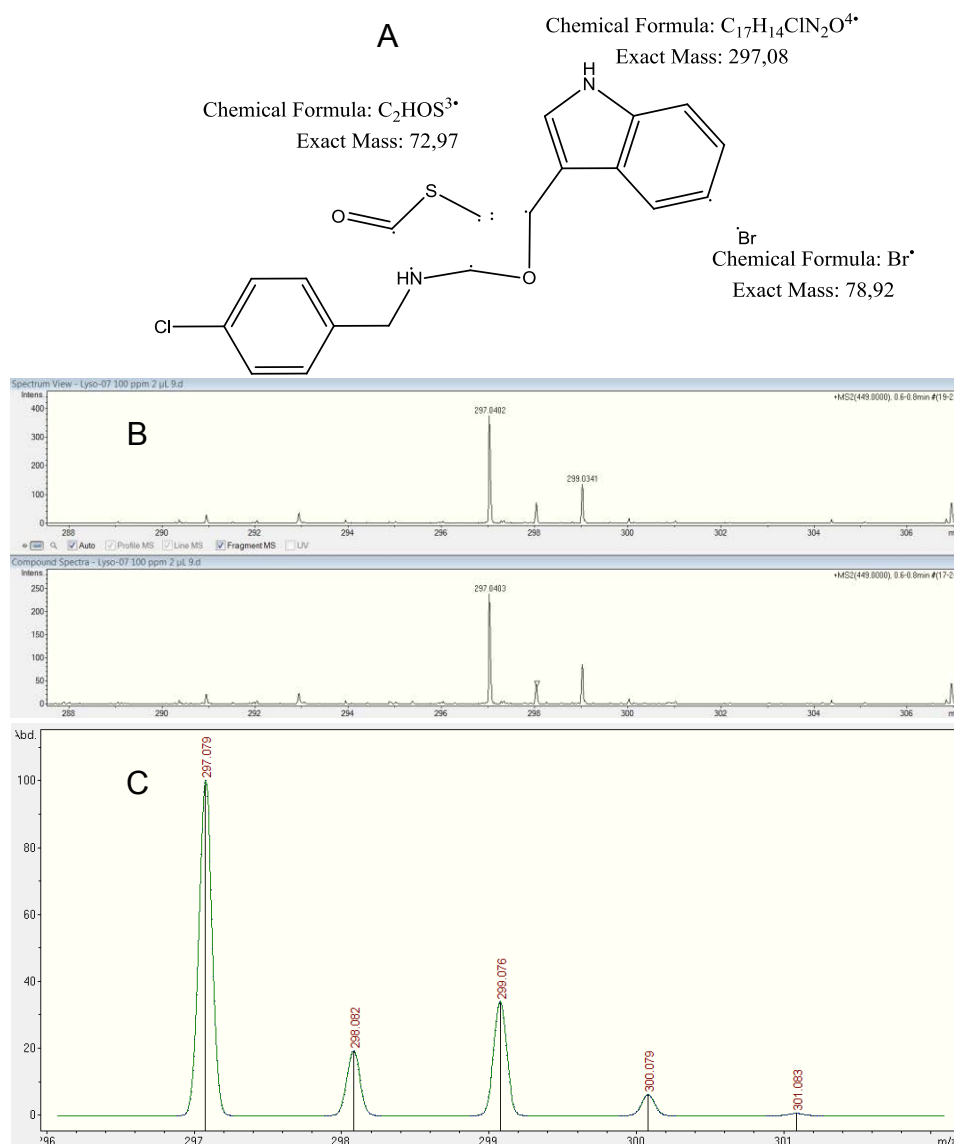
A e D: representação estrutural das quebras utilizando o ChemDraw Ultra versão 12.0.2. B e E: espectro que massas dos picos 1 e 2 respectivamente analisados no Compass DataAnalysis

da Bruker Daltonics. C e F: Distribuição isotópica obtida com a ferramenta Compass Isotope Pattern da Bruker Daltonics

Na Figura 20 - A e D observa-se quebras bastante semelhantes propostas para os fragmentos de massa 200,02 e 263,95 cujas quebras originaram-se do rompimento do anel tiazolidinodiônico nos mesmos pontos. As diferenças estão na perda de um Bromo no fragmento de m/z 200,02, confirmado pela distribuição isotópica teórica e espectro de massas experimental das Figuras 20 - C e D, onde não há grande abundância em pico lateral de massa $M+2$ como seria esperada para um fragmento contendo Bromo, o mesmo poderia deixar a estrutura como perda neutra na forma de Br_2 ou HBr . Já o fragmento 263,95 visivelmente possui um átomo de Bromo na sua estrutura pela abundância do pico lateral de massa $M+2$ e na Figura 20 - D a estrutura da quebra proposta contempla estes dados experimentais. Contudo, neste fragmento há a perda de um oxigênio carbonílico adjacente ao Enxofre no anel tiazolidinodiônico. A fórmula molecular da quebra proposta na Figura 20 - D foi utilizada na ferramenta "Isotope Distribution Calculator and Mass Spec Plotter" para gerar a Figura 20 - F, a distribuição isotópica do fragmento proposto está condizente com os dados experimentais apresentados na Figura 20 - E, portanto aceitou-se a proposta de quebra como plausível para estes fragmentos.

Com uma quebra semelhante às anteriores, o fragmento 297,04 sofre um rearranjo no anel tiazolidinodiônico, mantém a perda do Bromo porém apresenta Cloro em sua estrutura, como apresentado na Figura 21.

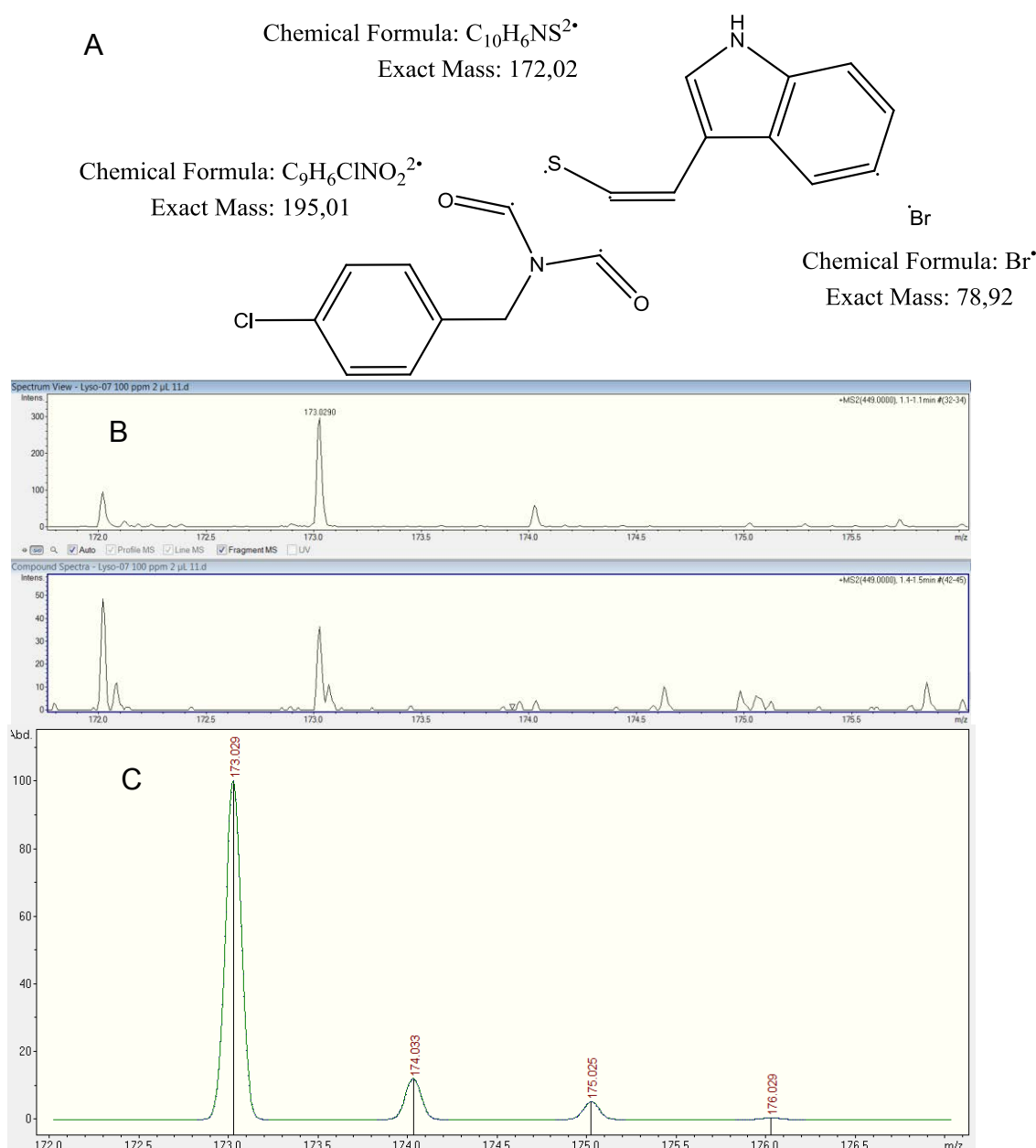
Figura 21 - Caracterização do fragmento 297,04.



A: representação estrutural da quebra utilizando o ChemDraw Ultra versão 12.0.2. B: espectro que massas dos picos 1 e 2 respectivamente analisados no Compass DataAnalysis da Bruker Daltonics. C: Distribuição isotópica obtida com a ferramenta Compass Isotope Pattern da Bruker Daltonics

Na Figura 21 - A está a fórmula estrutural da proposta de quebra para o fragmento 297,04. A quebra é bem semelhante às propostas na Figura 20 - A e D porém há um rearranjo do oxigênio carbonílico do anel tiazolidinodiónico com o carbono beta ocorrendo a abertura do anel e a formação da estrutura proposta. A fórmula molecular desta estrutura gerou a distribuição isotópica da Figura 21 - C que é condizente com o espectro de massas do fragmento 297,04 representado na Figura 21 - B.

Figura 22 - Caracterização do fragmento 173,03.



A: representação estrutural da quebra utilizando o ChemDraw Ultra versão 12.0.2. B: espectro que massas dos picos 1 e 2 respectivamente analisados no Compass DataAnalysis da Bruker Daltonics. C: Distribuição isotópica obtida com a ferramenta Compass Isotope Pattern da Bruker Daltonics

A proposta de quebra do fragmento 173,03 está representada na Figura 22 - A. Mais uma vez há o rompimento do anel tiazolidinodiona em uma posição diferente das anteriores além da perda neutra de Bromo. O fragmento proposto tem m/z 172,02 e o fragmento experimental $M+H$ tem m/z 173,03, a proposta corresponde à distribuição isotópica da Figura 22 - B e C.

Portanto, foi possível transferir o método do sistema UPLC - Waters para o sistema UHPLC - Thermo sem perda de separação entre os picos da LYSO-07. A utilização do UHPLC acoplado ao QTOF - Bruker Daltonics gerou dados que comprovam que os picos separados por cromatografia no método desenvolvido neste estudo são os isômeros geométricos da LYSO-07, por possuírem o mesmo espectro de absorvância quando excitados por radiação UV-Vis além de possuírem mesma massa exata e perfil de fragmentação. Ainda, foi possível propor brevemente alguns fragmentos gerados quando há a quebra da LYSO-07 no espectrômetro de massas. Estes fragmentos, sua interpretação teórica e as propostas estruturais estão de acordo e são possíveis na estrutura da LYSO-07 apresentada por Santin et al. (2013).

5.6 Validação do método bioanalítico

5.6.1 Linearidade

A curva analítica em plasma de rato foi construída, em triplicata, nas concentrações 5, 2,5, 1,25, 0,625, 0,3125 e 0,15625 $\mu\text{g/mL}$, apresentada na Figura 23.

Figura 23- Curva de calibração de LYSO-07

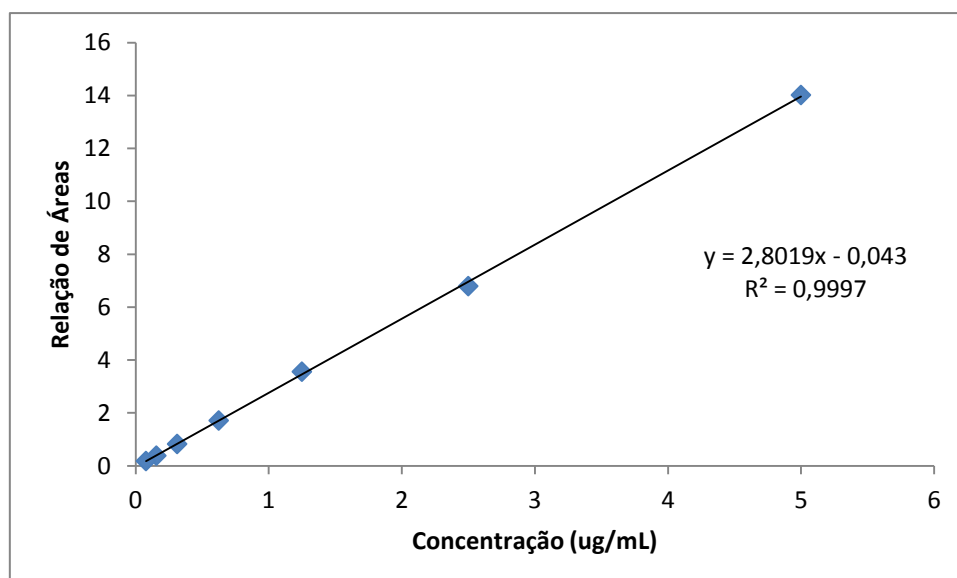


Tabela 12 - Concentrações em triplicata utilizadas para a confecção da curva analítica

Especificação	Concentração ($\mu\text{g/mL}$)	Área Pi	Área Z- Lyso	Área E- Lyso	Relação (Z+E)/Pi	Exatidão (%)	Precisão (%)	Média
LSQ	5	1626	19070	2137	13,04243542	93,40413	7,651085	14,02229
		1754	23022	1281	13,85575827	99,20964		
		1743	23825	2614	15,1686747	108,5813		
---	2,5	1569	9553	1010	6,732313576	96,72475	4,902925	6,79742
		1661	9759	1040	6,501505117	93,42972		
		1540	10203	821	7,158441558	102,8082		
CQM	1,25	1608	5527	261	3,599502488	104,0013	4,18335	3,562155
		1556	5457	283	3,688946015	106,5551		
		1613	4831	650	3,398016119	98,24842		
---	0,625	1566	2281	366	1,690293742	98,97883	2,320842	1,715809
		1582	2541	246	1,761694058	103,0561		
		1622	2424	326	1,695437731	99,27257		
CQB	0,3125	1634	1241	139	0,844553244	101,3671	1,682734	0,829084
		1648	1162	198	0,825242718	99,16168		
		1627	1188	142	0,817455439	98,27231		
LIQ	0,15625	1348	492	---	0,364985163	93,19293	5,157659	0,388033
		1575	627	---	0,398095238	100,7558		
		1571	630	---	0,40101846	101,4235		
LD	0,078125	1632	304	---	0,18627451	104,7449	9,824314	0,184227
		1645	331	---	0,201215805	111,5706		
		1695	280	---	0,16519174	95,11362		

A Tabela 12 representa os dados obtidos na validação do método de maior performance observada, o da condição X, a saber: ACN:Ácido Fórmico 0,1% na proporção 65:35 com diazepam (10 $\mu\text{g/mL}$) como padrão interno (Pi). A precisão e exatidão do método, até 78,125 ng/mL são compatíveis com as da RE 27 de 2012, sendo que a exatidão está no intervalo de 80 a 120% e a precisão não extrapolou o limite de CV em 15% estabelecido na mesma norma, habilitando a curva de calibração a ser utilizada nos procedimentos da

validação do método bioanalítico e análise de plasma dos grupos experimentais.

Observa-se na Tabela 12 a quantificação diferencial dos isômeros Z e E. Considerando que, por serem isômeros, as estruturas excitam-se igualmente frente à luz UV (366nm), a área obtida nestas condições são proporcionais à massa (ou concentração) de cada isômero na matéria prima. É interessante conhecer e diferenciar os isômeros pois os mesmos podem possuir diferentes atividades terapêuticas e/ou tóxicas, porém, cromatograficamente a informação das áreas isoladas oferece pouca utilização prática, uma vez que sua quantificação precisa depende da obtenção dos isômeros puros e isolados para que cada um tenha sua curva analítica e assim sua concentração precisa possa ser mensurada. Portanto, para os cálculos de validação e de concentração de LYSO-07 nas amostras biológicas, a área dos isômeros Z e E foram somadas, para a obtenção da concentração total de LYSO-07, tanto em solução quanto em matriz biológica.

5.6.2 Controles de qualidade

A Tabela 13 demonstra a confiabilidade do método para a quantificação das amostras de controle de qualidade utilizados nos estudos de estabilidade e nas análises de rotina do método bioanalítico.

Tabela 13 - Controles de qualidade utilizados para a validação do método bioanalítico.

Replicata	LD	LIQ	CQB	CQM	CQA	LSQ	CQD
1	0,2193	0,3650	0,9440	3,0995	11,3407	13,0424	9,6093
2	0,1862	0,3981	0,8446	3,5995	11,2923	15,3062	9,2904
3	0,2012	0,4773	0,8252	3,6889	11,8358	13,8558	9,3240
4	0,1652	0,4010	0,8175	2,8765	12,1672	10,8183	9,5614
5	0,2106	0,4614	0,8940	3,3980	11,9173	15,1687	9,2522
Média	0,1965	0,4206	0,8651	3,3325	11,7107	13,6383	9,4075
Precisão	10,8640	11,1921	6,1570	10,2299	3,2480	13,4598	1,7568
Exatidão	109,4171	105,8864	103,7091	96,3774	104,8724	97,6573	84,3220

LD = Limite de Detecção (0,078125 ug/mL); LIQ = Limite de Quantificação (0,156250 ug/mL); CQB = Controle de Qualidade Baixo (0,312500 ug/mL); CQM = controle de qualidade médio (1,25000 ug/mL); CQA = Controle de qualidade Alto (4,00000 ug/mL); LSQ = Limite Superior de Quantificação (5,0000 ug/mL); CQD = Controle de Diluição (20,00000 ug/mL).

Os controles de qualidades apresentaram-se com precisão e exatidão de até 15%, suficientes para serem utilizados nos testes subsequentes e demonstrando que o método tem reprodutibilidade nas diferentes concentrações.

A amostra de CQD apresentou com exatidão abaixo dos 15% de variação permitidos, embora o parâmetro precisão apresente valores dentro dos limites estabelecidos. Pode-se atribuir inexatidão do CQD à forma com que foi adicionado o fármaco ao plasma. A adição de solvente orgânico em plasma não deve ultrapassar 10% do volume total da matriz, no entanto, foram utilizados 20% de solvente orgânico no plasma em decorrência da insolubilidade do composto em água, o que pode ter ocasionado problemas na extração e assim a inexatidão obtida. Uma vez que não se pôde comprovar a exatidão do CQD, o processamento com diluição não foi utilizado neste estudo.

5.6.3 Estabilidade de Curta duração

A estabilidade de curta duração foi avaliada à temperatura ambiente durante o período de 24 horas com quantificação de amostras do fármaco nos

tempos 0, 2, 8 e 24 horas. Na Tabela 14 estão apresentados os resultados obtidos.

Tabela 14 - Estabilidade curta duração a temperatura ambiente.

Replicata	CQB				CQA			
	0 horas	2 horas	8 horas	24 horas	0 horas	2 horas	8 horas	24 horas
1	0,7574	0,6580	0,7213	0,8570	10,9921	9,3583	10,2488	10,1034
2	0,7489	0,6610	0,8247	0,7683	10,7932	9,1143	11,6191	11,3671
3	0,7263	0,7189	0,7902	0,8737	9,3859	9,0706	12,1625	11,2766
Médias	0,7442	0,6793	0,7787	0,8330	10,3904	9,1811	11,3435	10,9157
DP	0,0161	0,0343	0,0527	0,0566	0,8756	0,1550	0,9862	0,7049
CV	2,1585	5,0555	6,7619	6,7987	8,4268	1,6886	8,6940	6,4576
% desvio	---	-8,7254	4,6396	11,9264	---	-11,6390	9,1728	5,0556

DP = desvio padrão; CV = coeficiente de variação; CQB = Controle de Qualidade Baixo; CQA = controle de qualidade alto.

Pode-se observar na Tabela 14 que a porcentagem de desvio da amostras variou dentro da faixa de 10 % até 8 horas em relação ao tempo 0, e variação acima de 10% em 24 horas. O tempo 2 horas do controle alto demonstrou-se acima do esperado, porém nas horas subseqüentes a variabilidade foi aceitável. Considerou-se um desvio analítico neste tempo (2 horas) e que o composto apresenta estabilidade nos tempos posteriores.

5.6.4 Estabilidade pós processamento

A estabilidade pós processamento foi realizada mantendo a amostra pós processada no auto-injetor do equipamento, ao abrigo de luz e à temperatura ambiente durante o período de 24 horas com quantificação das amostras nos tempos 0, 2, 8 e 24 horas. Na Tabela 15 estão apresentados os resultados obtidos.

Tabela 15 - Estabilidade curta duração a temperatura ambiente.

Replicata	CQB				CQA			
	0 horas	2 horas	8 horas	24 horas	0 horas	2 horas	8 horas	24 horas
1	0,8475	0,8299	0,9176	0,8925	11,1191	10,9872	11,6929	11,1646
2	0,8959	0,8142	0,8938	0,9341	10,8950	12,4281	12,1768	12,6206
3	0,8747	0,9791	0,9021	1,0369	10,8302	11,9604	11,9604	11,5546
médias	0,8727	0,8744	0,9045	0,9545	10,9481	11,7919	11,9434	11,7799
DP	0,0243	0,0910	0,0121	0,0743	0,1516	0,7351	0,2424	0,7537
CV	2,7799	10,4076	1,3343	7,7863	1,3846	6,2338	2,0296	6,3981
% desvio	---	0,1892	3,6386	9,3677	---	8,8796	10,2786	8,7695

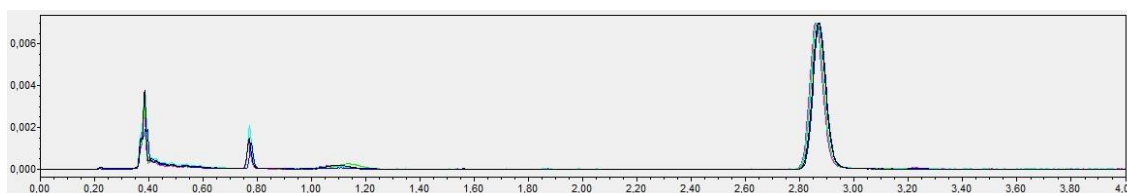
DP = desvio padrão; CV = coeficiente de variação; CQB = Controle de Qualidade Baixo; CQA = controle de qualidade alto.

Considerou-se estável durante o período de 24 horas as amostras pós processamento, com desvio apenas no tempo 8 horas no CQA, porém o tempo de 24 horas ratifica a estabilidade da substância neste período além do controle de qualidade baixo, mais susceptível a variações de concentração, não ter revelado variação maior do que 10% no período estudado.

Contudo, deve-se reportar um fenômeno ocorrido durante as injeções dos controles de qualidade pós processados. O método bioanalítico, capaz de diferenciar os isômeros Z e E da LYSO-07, demonstrou que, ao longo do período estudado, o pico denominado E diminuiu de área até que a determinação de sua área não fosse mais possível, porém a área do pico Z aumentou proporcionalmente, mantendo inclusive a estabilidade das áreas, como pode ser observado na Tabela 15. No tempo 8 horas já não era possível determinar a área do pico E. Esses resultados sugerem que há uma conversão do isômero E em isômero Z.

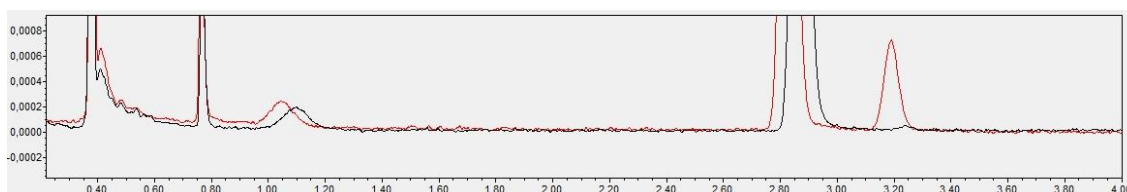
Na Figura 38 estão apresentados os resultados da triplicata do CQA analisadas no tempo 8 horas, onde a área do pico E já era mínima.

Figura 24 - Cromatograma em triplicata de CQA no tempo 8 horas pós processamento



Na Figura 24 está apresentada em aproximação a sobreposição dos tempos 0 e 24 horas. É possível verificar que o cromatograma em vermelho possui dois picos, enquanto que o cromatograma em preto apresenta um pico com área superior e outro de área inferior. Nota-se que, como apresentado na Tabela 15, a área da soma dos picos em ambos os tempos se mantém, com estabilidade de até 10%, aceito pelas normas vigentes.

Figura 25 - Cromatogramas sobrepostos de CQA nos tempos 0 e 24 horas. As sobreposições são feitas a partir do mesmo vial.



Os ensaios de estabilidade de curta duração, no entanto, não demonstraram este perfil, sendo que até 24 horas os picos permaneceram inalterados e sua soma também foi estável nestes períodos.

As matrizes onde encontra-se o fármaco têm influência sobre a estabilidade do mesmo, uma vez que a solução estoque do fármaco foi mantida em acetonitrila na concentração de 100 µg/mL e foi estável ao longo de meses de estudo. Neste período demonstrou exatidão em diversos testes feitos em ocasiões diferentes. Em água, deve-se ressaltar que sua estabilidade em pH 1,2 e 7,4 não passa de 5 minutos (Figura 9). Ao observar a matriz plasma, composta em sua maior parte por água, não ocorre o mesmo perfil de estabilidade, sendo estável por 24 horas na mesma. A matriz na qual o fármaco fica contida pós processamento é um extrato com precipitação de proteínas com acetonitrila e padrão interno. Ao centrifugar a mistura vortexada de 100 µL

plasma e 100 μL de acetonitrila é possível recuperar cerca de 150 a 170 μL de volume sobrenadante, portanto, além de recuperar a acetonitrila, há cerca de 60 μL de volume aquoso proveniente do plasma no extraído. Os cromatogramas revelam picos, até 0,6 minutos, de substâncias extraídas simultaneamente com o fármaco que têm absorção em 364nm, e é possível que algum componente do plasma, em contato com acetonitrila e água, seja capaz de converter o isômero E no isômero Z.

E quanto à estabilidade observada em plasma, apesar de poder haver algum componente reativo no plasma em relação à LYSO-07 e pelo menos 60% de água na composição do plasma onde o fármaco não tem estabilidade maior do que 5 minutos (Figura 9), a estabilidade nesta matriz se mantém. Isso pode ser devido à ligação à proteínas plasmáticas, isentando-o da hidrólise pela água e outros fatores plasmáticos. Após a precipitação destas proteínas, o fármaco fica livre e disponível para hidrólise. Contudo, o que se observa na amostra pós processada é que apenas o isômero E se converte no isômero Z, o isômero mais estável (SANTIN et al., 2013).

5.6.5 Ciclo de congelamento e descongelamento

Com a intenção de conhecer a estabilidade da LYSO-07 frente ao congelamento das amostras em plasma, realizou-se os experimentos de estabilidade de congelamento. Com estes resultados pode-se estabelecer o protocolo de coleta de forma a conservar as amostras congeladas para serem analisadas posteriormente sem perder a estabilidade do analito.

Na Tabela 16 apresentamos os valores obtidos após 2 ciclos de congelamento e descongelamento. Realizou-se 2 ciclos para permitir que a amostra seja analisada após um congelamento e reanalisada caso seja necessário num segundo congelamento.

Tabela 16 - Estabilidade de ciclos de congelamento e descongelamento.

Replicata	CQB			CQA		
	Dia 0	Dia 1	Dia 2	Dia 0	Dia 1	Dia 2
1	0,7809	0,6633	0,7477	9,4690	7,9767	10,6553
2	0,7509	0,7127	0,9646	9,7984	9,2746	11,1260
3	0,6854	0,6470	0,6470	10,2582	9,4489	9,4489
Média	0,7391	0,6743	0,7864	9,8419	8,9000	10,4101
DP	0,0488	0,0342	0,1623	0,3964	0,8044	0,8650
CV	6,6067	5,0761	20,6387	4,0275	9,0381	8,3095
% desvio	---	-8,7625	6,4060	---	-9,5695	5,7732

DP = desvio padrão; CV = coeficiente de variação; CQB = Controle de Qualidade Baixo; CQA = controle de qualidade alto.

Pode-se observar pela Tabela 16 que é possível conservar amostras de plasma contendo LYSO-07 por 24 horas congeladas para então analisá-las. Ainda, é possível congelar novamente o plasma para analisá-lo 48 horas após a coleta. Pode-se entender ainda que a estabilidade se mantém caso haja um problema no sistema de refrigeração do freezer e haja descongelamento das amostras, e quando recongeladas, a LYSO-07 não perde a estabilidade.

5.7 Determinação de biomarcadores do ensaio de segurança da LYSO-07

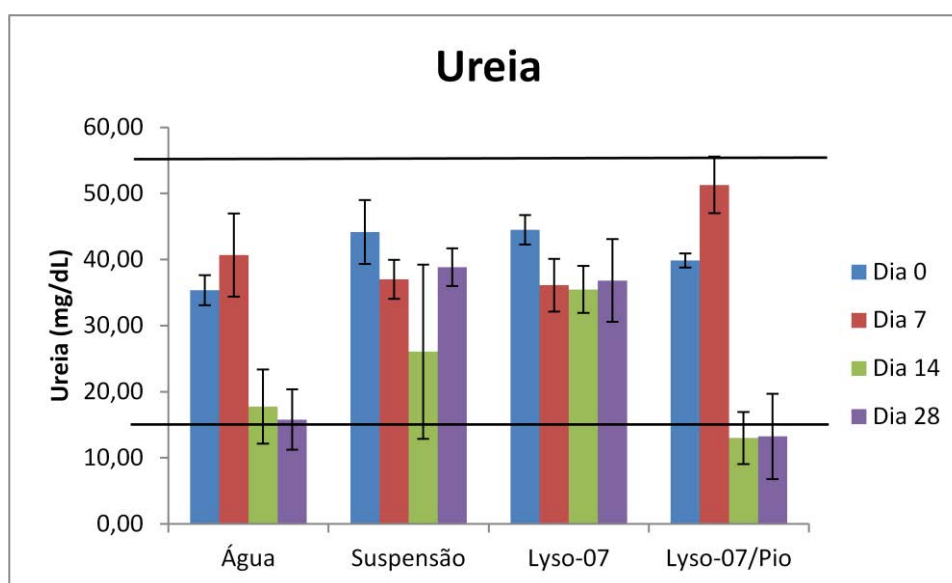
5.7.1 Nefrotoxicidade

Os rins são órgãos significativamente susceptíveis à ação tóxica de fármacos pois concentram uma variedade de substâncias e metabólitos para a excreção. Ainda, os rins captam grande parte do débito cardíaco, cerca de 25%, entrando em contato com grande quantidade de sangue contendo xenobióticos. Estas características fazem com que substâncias que possuem a capacidade de lesar o tecido renal tenham amplo contato com o tecido alvo (KANEKO & HARVEY, 1997).

Apesar de anti-inflamatórios terem uma incidência pequena de nefrotoxicidade em pacientes que não possuam insuficiência cardíaca, cirrose ou nefropatia preexistente, no desenvolvimento de um candidato à fármaco, este é um órgão crítico para o estudo (KUMMER & COELHO, 2002).

Foram utilizados os biomarcadores ureia e creatinina para determinar se a LYSO-07 é capaz de produzir danos renais em dose terapêutica durante o tempo estipulado. Na Figura 26 estão apresentados os resultados obtidos para o biomarcador ureia.

Figura 26 - Valores de ureia determinados nos grupos experimentais, resultados expressos em médias \pm IC 95 (n=5).



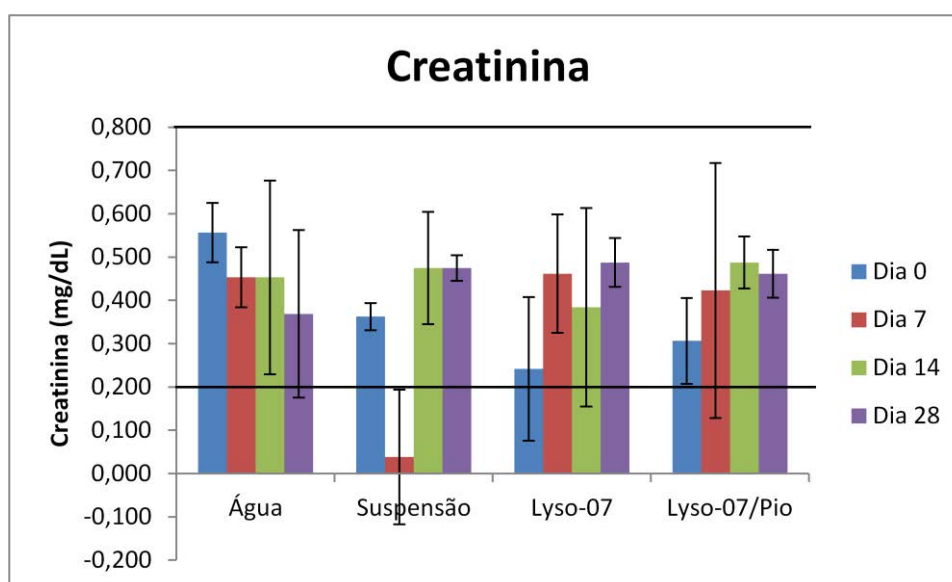
A área delimitada pelas linhas representa a faixa de normalidade deste parâmetro para esta espécie de animal. Grupo Água (n=5) animais receberam água tratada por 28 dias. Grupo Suspensão (n=5) animais receberam o veículo de carboximetilcelulose 2% por 28 dias. Grupo Lyso-07 (n=5) animais receberam LYSO-07 (18mg/kg) em suspensão de carboximetilcelulose 2% por 28 dias. Grupo LYSO-07/PIO receberam LYSO-07 (14,33 mg/kg) na dose equimolar de pioglitazona utilizada em Sengupta e colaboradores (2013) que conduziram estudos de segurança semelhantes

Na Figura 26 pode-se observar que os níveis de ureia nos grupos que receberam fármacos permaneceram constantes ao longo dos dias de tratamento ou diminuíram. Há de se observar que existem diferenças estatísticas significativas (sumarizadas no quadro 4) entre os grupos água/Pio e suspensão/LYSO-07. É importante notar que os grupos foram feitos em meses diferentes e com diferentes gerações de animais. Suspensão/LYSO-07 foram realizados e analisados ao mesmo tempo, enquanto Água/Pio também, porém em outra geração de animais. É interessante notar que os resultados assemelham-se entre os grupos realizados juntamente e diferem quando comparados aos animais cujo procedimento foram realizado em outra época.

As diferenças entre os resultados pode ser devido às diferenças existentes entre as gerações produzidas pelo Biotério Central. Mesmo que os resultados tenham sido discrepantes entre si, estes não extrapolaram os limites considerados normais para esta espécie de animais. Segundo o Canadian Concil of Animal Care, os níveis de ureia normais para ratos Wistar são de 17 até 55 mg/dL.

Ainda, a creatinina demonstrada na Figura 27, apresentam valores condizentes com aqueles obtidos para ureia.

Figura 27 - Valores de creatinina determinados nos grupos experimentais, resultados expressos em médias \pm IC 95 (n=5).



A área delimitada pelas linhas representa a faixa de normalidade deste parâmetro para esta espécie de animal. Grupo Água (n=5) animais receberam água tratada por 28 dias. Grupo Suspensão (n=5) animais receberam o veículo de carboximetilcelulose 2% por 28 dias. Grupo Lyso-07 (n=5) animais receberam LYSO-07 (18mg/kg) em suspensão de carboximetilcelulose 2% por 28 dias. Grupo LYSO-07/PIO receberam LYSO-07 (14,33 mg/kg) na dose equimolar de pioglitazona utilizada em Sengupta e colaboradores (2013) que conduziram estudos de segurança semelhantes

Os resultados de creatinina demonstram baixa frequência de diferenças estatísticas entre si (Quadro 4) e os resultados se mantêm dentro da faixa de normalidade clínica esperada para esta espécie (valores de referencia retirados da revisão de Santos et al., 2010 e Harkness & Vagner, 1993).

Os resultados de creatinina e ureia nos permitem inferir que a LYSO-07 não tem efeitos sobre a taxa de filtração glomerular de forma a alterar a excreção destes biomarcadores.

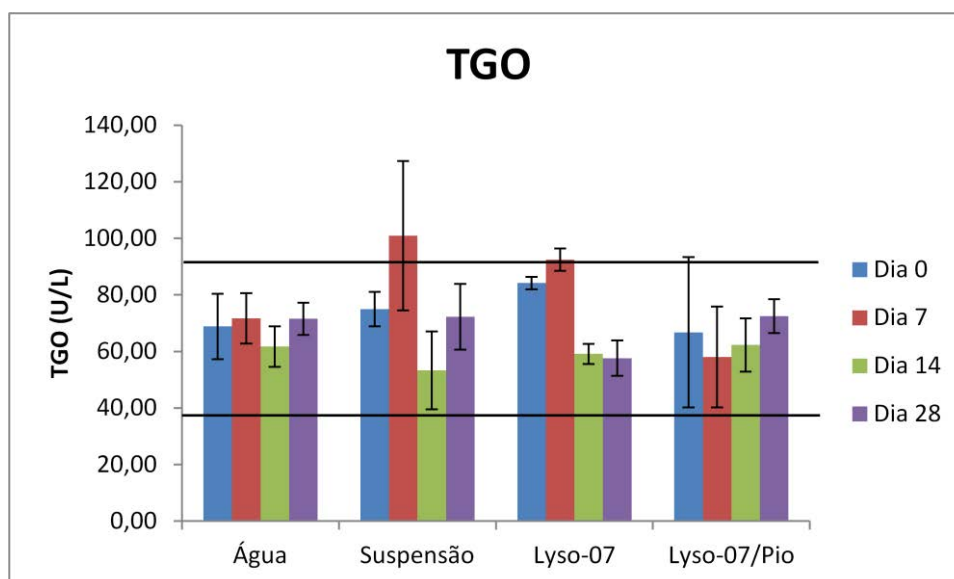
No artigo de Sengupta, Nandi & Pal (2011) onde o mesmo protocolo experimental fora adotado para o fármaco pioglitazona - referência de tiazolidinodiona atualmente disponível no mercado -, os valores de creatinina também não demonstraram-se alterados ao longo dos dias de tratamento, assim como o grupo experimental de LYSO-07 na dose equimolar de pioglitazona utilizada neste estudo.

5.7.2 Hepatotoxicidade

O fígado é um órgão de ampla circulação sanguínea, que recebe 25% do débito cardíaco e, portanto, entra em contato com grande quantidade de xenobióticos circulantes. Ainda, o fígado é responsável por parte do metabolismo pré-sistêmico, e ao entrar em contato com xenobióticos ingeridos e metaboliza-os para inativar moléculas potencialmente prejudiciais e torná-las mais hidrossolúveis para que sejam excretadas mais rapidamente pelos rins. Este órgão pode gerar metabólitos tóxicos destes xenobióticos, que estarão em maior concentração no local, antes de serem distribuídos para a circulação sistêmica, tornando-o, também por este motivo, alvo de efeitos nocivos de fármacos e seus metabólitos. O estudo de hepatotoxicidade da LYSO-07 se faz muito importante pois o histórico das tiazolidinodionas com relação à este efeito adverso. A troglitazona foi retirada do mercado em 2000 devido à sua alta hepatotoxicidade.

Na Figura 28 estão representados os resultados sobre o biomarcador TGO.

Figura 28 - Valores de TGO determinados nos grupos experimentais, resultados expressos em médias \pm IC 95 (n=5).



A área delimitada pelas linhas representa a faixa de normalidade deste parâmetro para esta espécie de animal. Grupo Água (n=5) animais receberam água tratada por 28 dias. Grupo Suspensão (n=5) animais receberam o veículo de carboximetilcelulose 2% por 28 dias. Grupo Lyso-07 (n=5) animais receberam LYSO-07 (18mg/kg) em suspensão de carboximetilcelulose 2% por 28 dias. Grupo LYSO-07/PIO receberam LYSO-07 (14,33 mg/kg) na dose equimolar de pioglitazona utilizada em Sengupta e colaboradores (2013) que conduziram estudos de segurança semelhantes

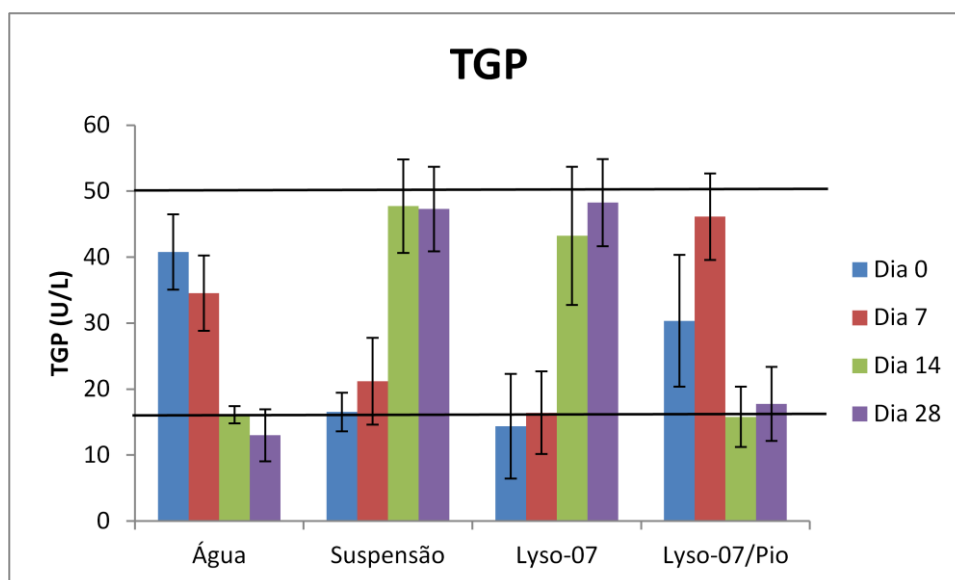
Os resultados de TGO não apresentaram diferenças estatísticas significativas entre os grupos controle (água e suspensão) e os grupos que receberam LYSO-07, não revelando potencial hepatotóxico do fármaco através deste biomarcador. Ainda, pode-se observar na Figura 28 que os valores encontrados para esta enzima nos animais estão compatíveis com os níveis de normalidade para esta espécie. Segundo o Canadian Council of Animal Care (referência), os valores de TGO para ratos Wistar varia de 39 a 92 U/L.

No artigo de Sengupta, Nandi & Pal (2011), a TGO apresentou-se sem variação ao longo dos 28 dias de estudo onde o mesmo protocolo experimental fora adotado para o fármaco pioglitazona, o grupo experimental de LYSO-07 na dose equimolar de pioglitazona utilizada neste estudo também reproduziu este resultado.

Porém a TGO isoladamente não é um bom parâmetro para avaliar a ocorrência de lesões hepáticas em um indivíduo, pois esta enzima não é

exclusiva do fígado, ela está presente em grande quantidade também no intestino, rins e coração, deste último, a TGO também pode ser um marcador de lesões cardíacas por ser liberada em grandes quantidades em eventos de lesão do miocárdio. Para avaliar-se com maior especificidade a lesão hepática é necessário a determinação de um biomarcador mais específico para este órgão, a TGP. Na Figura 29 estão apresentados os resultados de TGP para os grupos estudados.

Figura 29 - Valores de TGP determinados nos grupos experimentais, resultados expressos em médias \pm IC 95 (n=5).



A área delimitada pelas linhas representa a faixa de normalidade deste parâmetro para esta espécie de animal. Grupo Água (n=5) animais receberam água tratada por 28 dias. Grupo Suspensão (n=5) animais receberam o veículo de carboximetilcelulose 2% por 28 dias. Grupo Lyso-07 (n=5) animais receberam LYSO-07 (18mg/kg) em suspensão de carboximetilcelulose 2% por 28 dias. Grupo LYSO-07/PIO receberam LYSO-07 (14,33 mg/kg) na dose equimolar de pioglitazona utilizada em Sengupta e colaboradores (2013) que conduziram estudos de segurança semelhantes

Assim como os resultados da creatinina, os valores da TGP dos grupos suspensão e LYSO-07 não apresentaram diferenças significativas entre si, assim como entre os grupos água e LYSO/Pio, pelos mesmos motivos anteriormente apresentados na discussão do parâmetro creatinina.

O biomarcador TGP é mais específico para a determinação de hepatotoxicidade de uma substância por ser mais específica do fígado do que a TGO e juntamente com esta podem levar ao diagnóstico de lesão hepática. A TGP tem seus níveis de atividade menores do que os da TGO em estado basal do organismo, estes marcadores invertem de magnitude em evento de lesão do tecido hepático, tornando a TGP maior do que a TGO. No caso de hepatotoxicidade causada por medicamentos, a TGP frequentemente aumenta na ordem de 3 vezes acima dos valores superiores de normalidade, caracterizando o quadro de lesão hepática, assim como ocorre com o paracetamol, que é utilizado em estudos como controle positivo de hepatotoxicidade em ratos Wistar (ABDEL-AZEEM et al., 2013; KIM et al., 2013; LU et al., 2013).

Embora haja diferenças significativas entre os grupos, os níveis mensurados para TGP em todos os animais não superaram o limite superior de normalidade para esta espécie de animal, que segundo o Canadian Council of Animal Care vai de 17 a 50 U/L para ratos Wistar. Com o auxílio do outro biomarcador de hepatotoxicidade, TGO, é possível inferir que a LYSO-07 não leva a injúria hepática na dose, período e via de administração estudados.

No artigo de Sengupta, Nandi & Pal (2011), a TGP também apresentou-se constante ao longo do estudo com a pioglitazona empregando o mesmo protocolo experimental do estudo de toxicidade da LYSO-07, o grupo experimental de LYSO-07 na dose equimolar de pioglitazona utilizada no estudo de Sengupta e colaboradores (2013) também reproduziu este resultado.

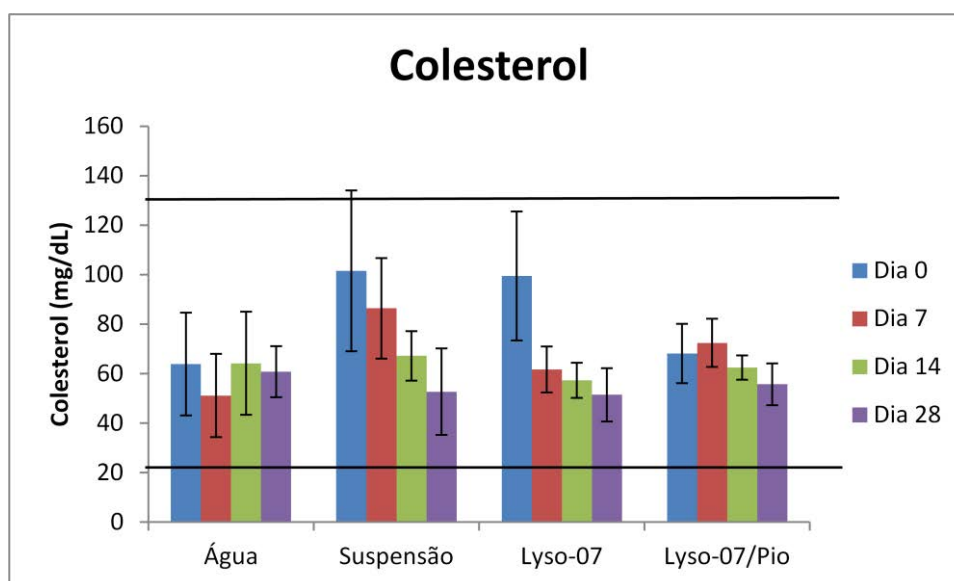
5.7.3 Alterações metabólicas

As tiazolidinodionas são capazes de promover/inibir a transcrição de cerca de 100 genes relacionadas ao metabolismo glicídico e lipídico, por isso se tornaram uma boa alternativa para o tratamento de diabetes tipo 2 e da síndrome metabólica decorrente de seu progresso, o que inclui hipercolesterolemia. Ainda, esta classe de fármacos tem como efeito adverso o ganho de peso, devido a retenção de líquidos e aumento da captação de colesterol pelos adipócitos. Como mecanismo de controle lipídico, aumenta a gordura abdominal. Assim, a influência de um novo candidato à fármaco

derivado desta classe farmacológica deve ter componentes metabólicos, assim como o ganho de peso monitorado para evidenciar se a nova molécula possui os mesmos efeitos adversos de seus antecessores (MELONI et al., 2013; Ryan et al., 2013; JÄRVINEN, 2004; DEFRONZO et al, 1995). Porém, a LYSO-07 foi projetada com o objetivo de controlar a inflamação crônica sistêmica também presente na síndrome metabólica, ainda assim, por estar envolvida com diversos mecanismos fisiológicos, alterações sobre o metabolismo devem ser avaliadas.

Na Figura 30 estão apresentados os resultados de colesterol para os grupos avaliados.

Figura 30 - Valores de colesterol (mg/dL) determinados nos grupos experimentais, resultados expressos em médias \pm IC 95 (n=5).



A área delimitada pelas linhas representa a faixa de normalidade deste parâmetro para esta espécie de animal. Grupo Água (n=5) animais receberam água tratada por 28 dias. Grupo Suspensão (n=5) animais receberam o veículo de carboximetilcelulose 2% por 28 dias. Grupo Lyso-07 (n=5) animais receberam LYSO-07 (18mg/kg) em suspensão de carboximetilcelulose 2% por 28 dias. Grupo LYSO-07/PIO receberam LYSO-07 (14,33 mg/kg) na dose equimolar de pioglitazona utilizada em Sengupta e colaboradores (2013) que conduziram estudos de segurança semelhantes

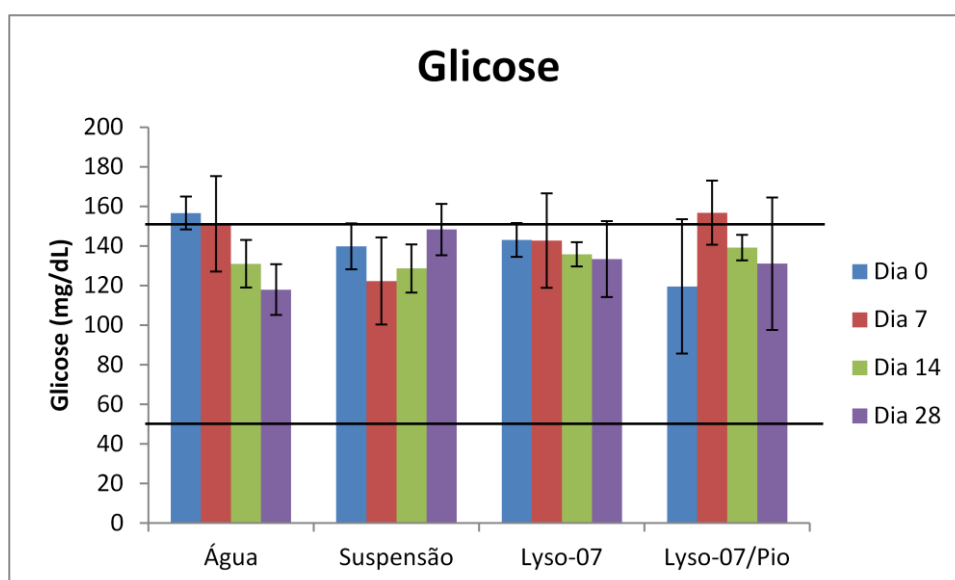
Os resultados de colesterol apresentaram diferença significativa ($p < 0,05$) entre os grupos água e suspensão no dia 7, os outros resultados não apresentaram diferenças significativas entre si, de forma que todos eles

permaneceram dentro da faixa de normalidade de colesterol total para ratos Wistar, segundo Santos e colaboradores (2010), de 21 a 130 mg/dL.

As tiazolidinodionas têm a capacidade de reduzir os níveis plasmáticos de colesterol total, porém este efeito não foi evidenciado nos testes realizados, ao longo de 28 dias com administração, uma vez ao dia e pela via oral. Portanto, para este regime, a LYSO-07 não tem a capacidade de reduzir significativamente os níveis de colesterol. Também há de se notar que a LYSO-07 está sendo estudada como potencial anti-inflamatório e para este fim, pode-se inferir, através dos resultados de colesterol acima apresentados, que a LYSO-07, no regime estudado, é segura quanto à este parâmetro para a utilização terapêutica, uma vez que este fármaco tende a ser utilizado também por pacientes com desequilíbrio lipídico.

Na Figura 31 estão apresentados os resultados de glicose determinados no presente estudo.

Figura 31 - Valores de glicose determinados nos grupos experimentais, resultados expressos em médias \pm IC 95 (n=5).



A área delimitada pelas linhas representa a faixa de normalidade deste parâmetro para esta espécie de animal. Grupo Água (n=5) animais receberam água tratada por 28 dias. Grupo Suspensão (n=5) animais receberam o veículo de carboximetilcelulose 2% por 28 dias. Grupo Lyso-07 (n=5) animais receberam LYSO-07 (18mg/kg) em suspensão de carboximetilcelulose 2% por 28 dias. Grupo LYSO-07/PIO receberam LYSO-07 (14,33 mg/kg) na dose equimolar de

pioglitazona utilizada em Sengupta e colaboradores (2013) que conduziram estudos de segurança semelhantes

A glicose apresentou-se estável durante o período estudado, apenas com variação estatística significativa ($p < 0,05$) no dia 7 entre os grupos água e suspensão e LYSO/PIO e suspensão (Quadro 4). Contudo, estas variações estatísticas não alteram a história clínica do experimento, onde os animais permaneceram dentro da faixa de normalidade para esta espécie.

Os níveis de glicose obtidos condizem com aqueles considerados normais para animais que não passaram por jejum prévio, chegando a ser considerado normal por autores até 150mg/dL de glicose (SANTOS et al., 2010).

Atualmente as TZDs tem como utilidade terapêutica melhor definida o controle glicêmico em pacientes com diabetes tipo 2. A LYSO-07, como derivado desta classe de fármacos, também possui este potencial através da ativação dos receptores PPAR- γ , porém este efeito não foi evidenciado nos grupos experimentais ao longo dos 28 dias de tratamento. A não diminuição da glicose nos grupos experimentais demonstra que a dose para atingir efeito anti-inflamatório pode não ser a mesma necessária para atingir o controle glicêmico, ou ainda, o tratamento proposto não evidenciou acúmulo de fármaco suficiente para chegar aos níveis plasmáticos necessários para a redução da glicose nestes grupos animais.

É importante ressaltar que embora não haja efeito significativo na redução da glicose, os animais continuam em normoglicemia, portanto o candidato à fármaco não causa o efeito adverso hipoglicemia, que poderia ser esperado devido às indicações terapêuticas de sua classe de fármacos, nos animais que receberam doses terapêuticas de LYSO-07 para atingir o efeito anti-inflamatório.

Ainda esperando efeitos sobre o metabolismo, na Figura 32 estão representados os valores de peso dos animais ao longo do experimento.

Figura 32 - Valores de peso determinados nos grupos experimentais, resultados expressos em médias (n=5).

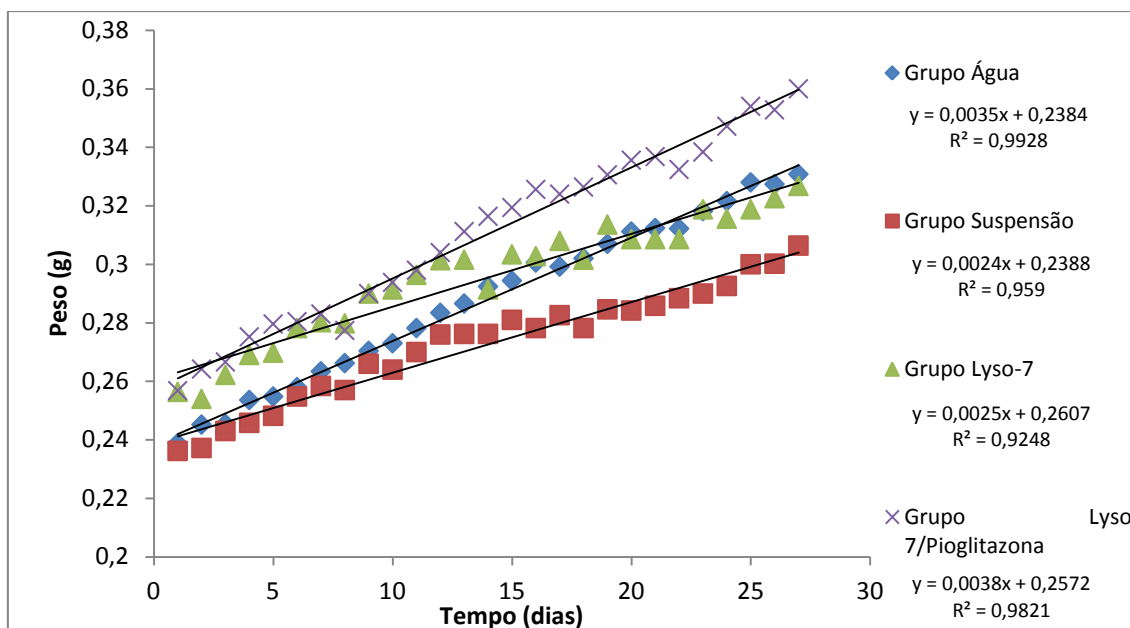


Tabela 17 - Diferenças estatísticas entre os grupos sobre os valores de peso dos animais (ANOVA com pós teste de Tukey).

Variação 0 - 28 dias	Água	Suspensão	LYSO-07	LYSO-07/PIO
Água	-	*	*	-
Suspensão	*	-	-	*
LYSO-07	*	-	-	*
LYSO-07/PIO	-	*	*	-

* = $p < 0,05$; - = sem variação estatística

A medida de peso dos animais aumentou de forma linear ($R^2 > 0,9$) ao longo do estudo como pode ser observado na Figura 32, com pouca variação de peso entre os animais num mesmo grupo. Pode-se observar no Quadro 1 que o aumento de peso dos animais dos grupos água e LYSO-07/PIO diferiram estatisticamente do aumento de peso dos animais dos grupos suspensão e LYSO-07, porém entre eles não houve diferenças estatísticas. Este aumento de peso semelhante entre estes grupos pode ser evidenciado inclusive pelo coeficiente angular das equações que descrevem o crescimento destes animais, onde para os grupos água e LYSO-07/PIO foi de 0,035 e 0,038 respectivamente e para os grupos suspensão e LYSO-07 foi de 0,024 e 0,025,

portanto estas diferentes lotes de animais possuíam características fisiológicas distintas, o que pode ter ocasionado a variação de alguns parâmetros bioquímicos, como ureia TGP e colesterol que apresentaram diferenças estatísticas entre estas diferentes lotes de animais, recebidos em meses diferentes do biotério.

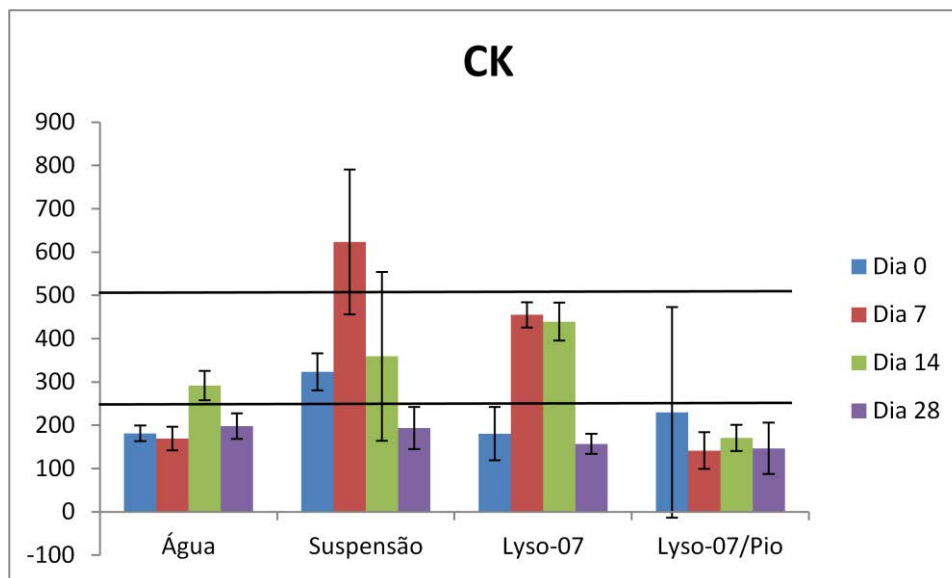
É importante a quantificação do peso dos animais para o estudo de uma nova tiazolidinodiona pois a pioglitazona, atual referência de TZD no mercado, tem como efeito adverso o ganho de peso (BALAJI, 2013; JÄRVINEN, 2004). Contudo, o novo candidato a fármaco assemelhou-se aos grupos suspensão e água em relação à este parâmetro, portanto, neste regime terapêutico, a LYSO-07 não causa o aumento de peso em ratos Wistar.

5.7.4 Cardiotoxicidade

A avaliação do potencial cardiotoxíco é fundamental para a segurança de um novo fármaco, principalmente quando o mesmo pertence à classe das tiazolidinodionas. A rosiglitazona, uma TZD, foi retirada do mercado devido ao aumento da incidência de complicações de ordem cardiovascular nos pacientes, portanto novos candidatos à fármaco desta classe terapêutica podem oferecer o mesmo tipo de risco (POUWELS & van GROOTHEEST, 2012).

Na Figura 33 estão apresentados os resultados de CK para os animais estudados.

Figura 33 - Valores de CK determinados nos grupos experimentais, resultados expressos em médias \pm IC 95 (n=5).



A área delimitada pelas linhas representa a faixa de normalidade deste parâmetro para esta espécie de animal. Grupo Água (n=5) animais receberam água tratada por 28 dias. Grupo Suspensão (n=5) animais receberam o veículo de carboximetilcelulose 2% por 28 dias. Grupo Lyso-07 (n=5) animais receberam LYSO-07 (18mg/kg) em suspensão de carboximetilcelulose 2% por 28 dias. Grupo LYSO-07/PIO receberam LYSO-07 (14,33 mg/kg) na dose equimolar de pioglitazona utilizada em Sengupta e colaboradores (2013) que conduziram estudos de segurança semelhantes

Os valores de CK apresentam-se dentro da normalidade para este parâmetro para ratos Wistar; apenas o dia 7 do grupo suspensão ultrapassou este limite, porém o aumento não foi evidenciado nos dias subsequentes.

Em comparação estatística, o grupo suspensão apresentou diferenças estatísticas significativas no dia 0 entre os grupos suspensão e LYSO-07, porém estas diferenças devem-se à valores basais dos animais, ao longo dos dias de tratamento, os quais não foram evidenciadas mais diferenças estatísticas entre estes grupos.

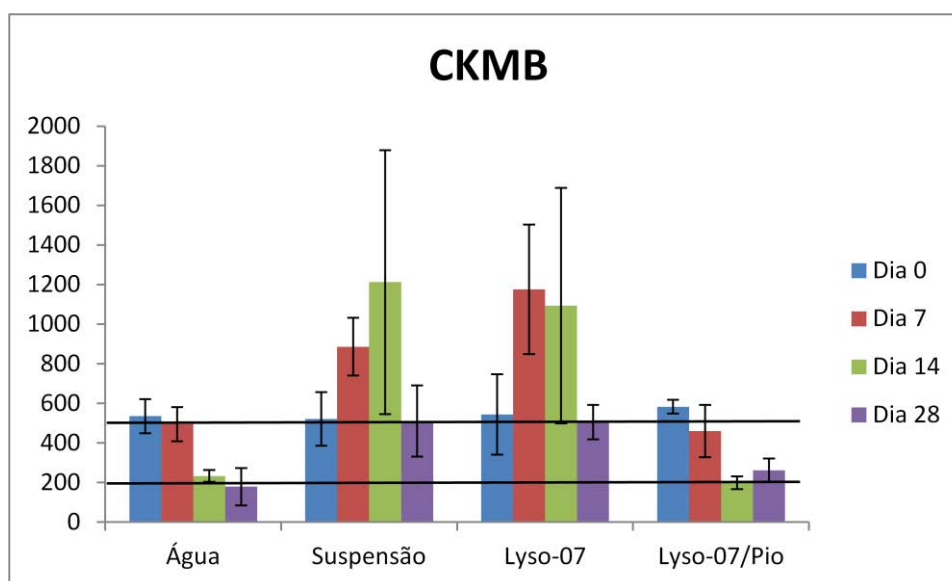
Neste experimento, as diferenças de lotes de animais foi evidente. Houve diferenças estatísticas significativas entre o par de grupos Suspensão/LYSO-07 e Água/PIO, mas não entre eles. Mesmo assim, os valores agruparam-se dentro da faixa considerada normal para esta espécie de animal.

Porém, a CK está presente em diversos órgãos por ser necessária para a conversão de ADP em ATP para a manutenção e para a célula exercer sua funcionalidade. Está presente em grandes quantidades na musculatura esquelética, miocárdio e cérebro, e em menores quantidades no trato gastrointestinal, bexiga, útero e tireoide. Portanto, resultados alterados da CK pode resultar de danos em qualquer destes órgãos ou ainda por exercício físico, por exemplo. Contudo, a CK é uma proteína dimérica cujas subunidades são denominadas M e/ou B. Estas combinam-se para formar isoenzimas de CK que são específicas de cada um destes órgãos. Existe portanto a CKMM, CKMB e CKBB, sendo que a CKMB é específica para o coração, assim, a determinação da CKMB é mais apropriada e específica para determinar a cardiotoxicidade de uma substância (KANEKO & HARVEY, 1997).

Os valores de referência encontrados para a CK são considerados normais de acordo com os dados apresentados por Edet et al. (2009) e Araújo et al. (2000).

Para complementar a avaliação da cardiotoxicidade da LYSO-07 foi determinada a atividade de CKMB nos grupos experimentais. A Figura 34 apresenta os resultados obtidos para este parâmetro.

Figura 34 - Valores de CKMB determinados nos grupos experimentais, resultados expressos em médias \pm IC 95 (n=5).



A área delimitada pelas linhas representa a faixa de normalidade deste parâmetro para esta espécie de animal. Grupo Água (n=5) animais receberam água tratada por 28 dias. Grupo Suspensão (n=5) animais receberam o veículo de carboximetilcelulose 2% por 28 dias. Grupo Lyso-07 (n=5) animais receberam LYSO-07 (18mg/kg) em suspensão de carboximetilcelulose 2% por 28 dias. Grupo LYSO-07/PIO receberam LYSO-07 (14,33 mg/kg) na dose equimolar de pioglitazona utilizada em Sengupta e colaboradores (2013) que conduziram estudos de segurança semelhantes

Na Figura 34 pode-se observar a provável influência dos lotes de animais nos resultados dos exames bioquímicos. Os animais do grupo LYSO-07 e suspensão apresentaram perfis semelhantes de atividade da CKMB. Pode-se observar que as linhas que delimitam os limites considerados normais para este parâmetro neste modelo animal são ultrapassadas pelos níveis encontrados de CKMB neste experimento. Uma vez que o limite superior de 500 U/L foi considerado por Amani e colaboradores (2013) como sendo padrão para animais modelos de insuficiência cardíaca congestiva a CKMB neste nível é indício de que o fármaco pode ter apresentado cardiotoxicidade. A elevação de CKMB foi observada porém não houve manifestação clínica do quadro, por exemplo, morte de algum animal. Além disso, o biomarcador também apresentou-se elevado nos grupos controle (água e suspensão), o que não nos permite inferir que a LYSO-07 foi responsável por este aumento.

Esta enzima é o biomarcador mais específico para toxicidade cardíaca e juntamente com a quantificação de troponina, formam os padrões de maior importância na avaliação da toxicidade cardíaca de fármacos (ADAMS et al., 1993). Porém não foi possível obter evidências conclusivas em relação à possibilidade de dano cardíaco causado pela LYSO-07.

O que compete a favor do fármaco, contra a possibilidade de cardiotoxicidade é o fato de o parâmetro TGO ter mantido-se dentro dos limites considerados normais para o modelo animal utilizado, esta enzima também está presente em grande quantidade no miocárdio, como já citado anteriormente, e o fato de não apresentar alterações aponta para a segurança deste fármaco em relação a cardiotoxicidade.

Contudo, a TGO não é específica para este órgão e as discrepâncias experimentais observadas para a CKMB faz com que não possa ser

descartada a cardiotoxicidade como um possível efeito da LYSO-07 em ratos Wistar, sob o tratamento proposto até que sejam realizados mais estudos em relação à este efeito.

5.7.5 Análise estatística

O Quadro 4 sumariza as diferenças estatísticas encontradas entre os grupos animais.

Quadro 4 - Diferenças estatísticas entre os grupos experimentais e o grupo suspensão.

teste vs suspensão	Ureia	TGO	TGP	Colesterol	Glicose	CK	CKMB	Creatinina	Dias
Água	a<s (1,24)	x	a>s (2,46)	x	x	a<s (1,78)	X	a>s (1,93)	0
	x	x	x	a<s (1,68)	x	a<s (3,68)	a<s (1,78)	a>s (11,87)	7
	x	x	a<s (2,96)	x	x	x	a<s (5,20)	x	14
	a<s (2,46)	x	x	x	a>s (1,25)	x	a<s (2,85)	x	28
LYSO-07	x	x	x	x	x	l<s (1,79)	X	x	0
	x	x	x	x	x	x	X	l>s (12)	7
	x	x	x	x	x	x	X	x	14
	x	x	x	x	x	x	X	x	28
LYSO/PIO	x	x	x	x	x	x	X	x	0
	p>s (1,41)	p<s (1,73)	p>s (2,17)	x	p>s (1,28)	p<s (4,40)	p<s (2,55)	p>s (11)	7
	x	x	p<s (3,02)	x	x	x	p<s (6,09)	x	14
	p<s (2,93)	x	p<s (2,66)	x	x	x	p<s (1,95)	x	28

x= sem diferenças significativas; a < ou > s = grupo água foi diferente significativamente do grupo suspensão para mais (a>s) ou para menos (a<s); p < ou > s = grupo LYSO/PIO foi diferente significativamente do grupo suspensão para mais (p>s) ou para menos (p<s); o número entre parênteses representa a ordem da diferença, exemplo a<s (2,96) significa que houve diferença estatística significativa (p<0,05) sendo que o grupo água foi 2,96 vezes menor que o grupo suspensão. Todos os resultados foram analisados por ANOVA seguidos pelo teste de Tukey ou Mann-Whitney dependendo da distribuição de normalidade apresentada nos grupos animais.

O Quadro 4 foi construído para melhorar a visualização das diferenças estatísticas entre os grupos animais. Ele foi plotado levando em consideração que o grupo mais relevante para ser comparado com os demais grupos é o grupo suspensão, pois é o veículo no qual a LYSO-07 foi administrada. O

grupo água, apesar de ser um grupo controle foi utilizado principalmente para verificar a influência do próprio veículo nos parâmetros bioquímicos dos animais, portanto as comparações têm maior significado quando comparadas ao grupo suspensão, o grupo de referência para todos os outros.

Esta tabela também corrobora, assim como visto nos biomarcadores isolados anteriormente descritos, que os animais do grupo LYSO-07 e suspensão são bastante semelhantes bioquimicamente, uma vez que só há diferença significativa entre estes dois grupos para o parâmetro CK no dia 0 e no dia 7 do biomarcador creatinina, os demais parâmetros não apresentaram diferenças significativas entre estes dois grupos.

Contudo, o grupo água e o grupo LYSO/PIO apresentaram diferenças significativas em diversos parâmetros em relação ao grupo suspensão. Entretanto interpretar estas diferenças significativas em biomarcadores de toxicidade não levaria a conclusões clinicamente significativas, pois apesar de haver diferenças significativas entre vários parâmetros, os níveis plasmáticos destes biomarcadores não ultrapassaram os níveis considerados normais para estes animais e assim, apesar das diferenças estatísticas encontradas, o significado clínico permanece normal.

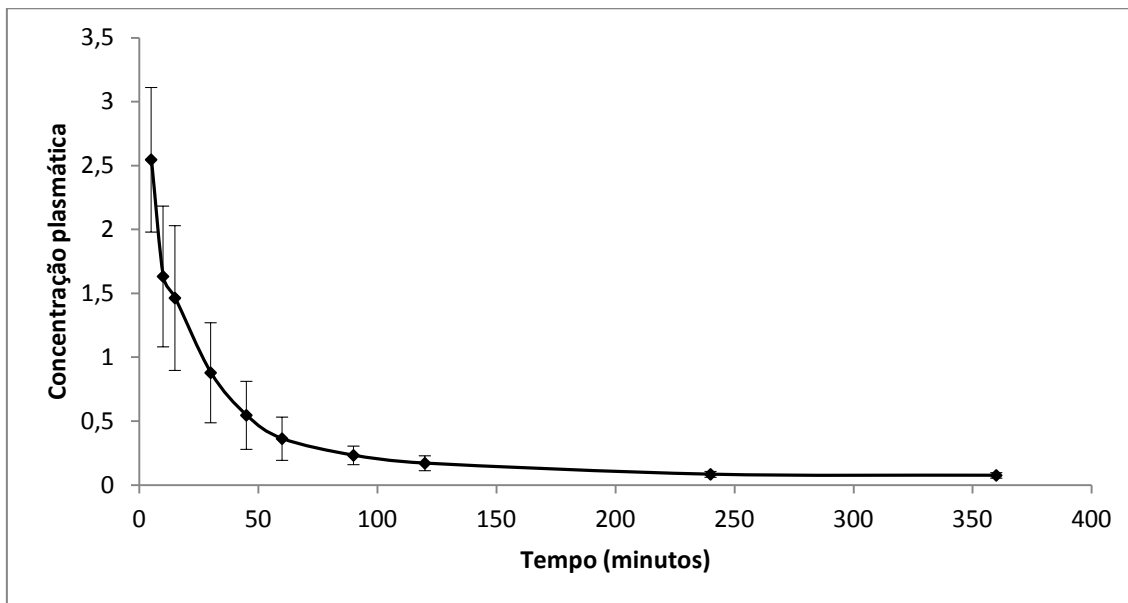
Assim, os resultados sugerem que a LYSO-07 não apresenta toxicidade significativa com base nos parâmetros estudados na dose de 18mg/kg em ratos Wistar no período de 28 dias quando administrada por via oral no veículo de carboximetilcelulose 2%.

5.8 Análise farmacocinética

5.8.1 Grupo i.v.

Os animais foram submetidos ao protocolo descrito anteriormente sendo possível a construção do perfil de concentração plasmática vs tempo apresentado na Figura 35.

Figura 35 - Curva de concentração plasmática média ($\mu\text{g/mL}$) vs tempo (min) (média \pm IC 95) do grupo I.V (dose 3,6 mg/kg, n=5).



Na Figura 35 está apresentado o perfil da média das concentrações plasmáticas obtidas para os animais que participaram do grupo i.v. (n=5). Pode-se observar através das barras de erro que houve pouca variação entre os animais com relação à concentração plasmática. A curva descreve uma trajetória compatível com o modelo bicompartimental onde há dois ângulos de decaimento da curva de concentração plasmática por tempo. O primeiro decaimento se mantém uniforme até 45 minutos da administração do fármaco, de 60 a 360 minutos há o segundo ângulo de decaimento.

Através destes resultados foi possível calcular os parâmetros farmacocinéticos da LYSO-07 para estes animais, apresentados na Tabela 18.

Tabela 18 - Parâmetros farmacocinéticos extraídos da curva de concentração plasmática vs tempo

Parâmetro	Média	Desvio Padrão	Coefficiente de Variação (%)	Intervalo de Confiança	Unidades
Dose	3600	---	---	---	µg/kg
β	0,00499	0,001386	25,68246	0,001215	min-1
t1/2β	138,8778	37,82983	27,43534	33,1587	min
α	0,0524	0,021369	40,7808	0,018731	min-1
t1/2α	15,14077	4,851252	32,04099	4,252232	min
ASC₀₋₆	93,25077	41,1124	43,19301	36,03595	µg/ml.min
ASC_{0-inf}	108,5087	45,72366	40,92432	40,07782	µg/ml.min
r áreas	85,93848	3,105003	3,658243	2,721605	%
Cl	33,17705	13,24635	35,45326	11,61073	ml/min*kg
Vd	6648,707	2027,15	28,80815	1776,842	ml/kg

β - constante de eliminação; t1/2β - meia vida de eliminação; α - constante de distribuição; t1/2α - meia vida de distribuição; ASC₀₋₆ - área sob a curva do tempo zero a 6 horas; ASC_{0-inf} - área sob a curva do tempo zero extrapolada ao infinito; r áreas - relação entre ASC₀₋₆ e ASC_{0-inf}; Cl - clearance; Vd - volume de distribuição.

Na Tabela 18 é possível observar que a relação entre áreas (r áreas) foi de aproximadamente 85%, demonstrando que o tempo de coleta foi suficiente para contemplar 80% de exposição do animal ao fármaco na dose administrada. A relação entre as áreas de no mínimo 80% é fundamental para determinar se o desenho experimental foi adequado para o cálculo confiável dos parâmetros farmacocinéticos.

O parâmetro meia vida de eliminação, de $2,31 \pm 0,5526$ horas (138.87 min), foi obtido e representa a metade da meia vida da pioglitazona, $4,12 \pm 0,21$ horas. Portanto, a concentração plasmática de LYSO-07 reduz-se à metade com o dobro da velocidade de sua referência atualmente no mercado (SENGUPTA et al., 2012). A troglitazona, outra referência, também apresenta meia vida superior à da LYSO-07 em ratos (KAWAI et al., 1997). Conseqüentemente, a posologia para a LYSO-07 demandará maior número de administrações para evitar grandes variações na concentração plasmática deste fármaco ao longo do dia. Assim como a rosiglitazona, que, devido à sua baixa meia vida (humanos) de 3 a 4 horas, necessita estar contido em uma

formulação de liberação modificada para obter-se um regime posológico desejável (SATHISH et al., 2012). A pioglitazona e troglitazona, são administradas uma vez ao dia em suas terapias atualmente estabelecidas.

A meia vida da LYSO-07, curta em relação aos seus pares, pode ser explicada pelo alto clearance deste candidato à fármaco ($33,177 \pm 11,61$ ml/min/kg). Porém, para avaliar se o valor numérico de Cl é alto ou baixo é preciso considerar o modelo animal.

Basicamente dois fatores fisiológicos interferem significativamente na capacidade de Cl: a perfusão sanguínea do órgão eliminador e a capacidade intrínseca deste órgão para efetivar a eliminação do fármaco.

A perfusão sanguínea está intimamente ligada ao débito cardíaco - quantidade de sangue ejetada pelo coração em litros/minuto – que se expressa pela relação entre o volume sistólico e frequência cardíaca, fatores intimamente relacionados às características anatômicas e funcionais de um organismo, ou do modelo animal em questão.

O débito cardíaco pode ser o fator limitante ao Cl e em condições fisiológicas ideais de eliminação o valor numérico máximo de Cl será aproximadamente o valor do débito cardíaco.

Assim, para compreender se o valor numérico de Cl obtido é alto ou baixo no modelo animal utilizado é importante conhecer qual é o fluxo máximo de sangue que passa pelos órgãos depuradores por unidade de tempo. O clearance é definido como a capacidade dos órgãos depuradores (principalmente fígado e rins) de eliminar o fármaco de uma quantidade de sangue por unidade de tempo. Portanto, estes processos são limitados pela quantidade de sangue que permeia estes órgãos neste período de tempo. Assim, é necessário calcular o débito cardíaco total para a espécie estudada e estimar o fluxo em cada órgão baseado em modelos pré-estabelecidos. Toutain e Busquet-Mélou (2004c) postularam modelos para a utilização deste parâmetro. Segundo os mesmos, o débito cardíaco de ratos pode ser calculado através da Equação 10:

$$DC = 180 \times M^{-0,19}$$

Equação 10 - Cálculo de débito cardíaco

sendo DC o débito cardíaco em mL/kg/min e M a massa do animal, para um rato Wistar utiliza-se o valor 0,25 kg. O valor do débito cardíaco para um animal com estas características é de 234ml/kg/min. Considerando que os principais órgãos que participarão da depuração destes fármacos são o fígado e os rins e que ambos somados recebem cerca de 50% do débito cardíaco total, pode-se esperar no máximo 117 ml/kg/min como sendo o total de fluxo sanguíneo que permeia estes órgãos e, portanto, não é possível obter clearance maior do que este valor, caso o fármaco seja eliminado apenas por estas vias (TOUTAIN & BOUSQUET-MÉLOU, 2004^b).

É sabido que a excreção renal é dependente da hidrofília dos fármacos, e o fígado e outros órgão metabolizadores, utilizam-se de enzimas para modificar moléculas com o intuito de inativá-las e torná-las mais hidrofílicas para que possa ser excretada pela principal via de excreção de moléculas no sangue, os rins. O log P experimental da LYSO-07 calculada neste trabalho superou os limites estabelecidos nos guias da OECD de substâncias para a realização deste ensaio, apresentando log P acima de 6,5, ou seja, a LYSO-07 é considerada extremamente lipofílica em relação aos outros fármacos. Isso pode significar que sua excreção pela via renal na forma inalterada é mínima, a não ser que haja transportadores para facilitar a passagem deste fármaco por esta via de excreção. Contudo, devido às características físico-químicas das TZDs, que são extensamente metabolizadas pelo sistema hepático, principalmente pelo CYP 2D6, cabe inferir que a LYSO-07 também tenha o fígado como principal órgão metabolizador. Portanto, o fluxo de sangue que passa pelo fígado, considerando que este seja permeado por 30% do débito cardíaco, é de aproximadamente 70,2 ml/kg/min.

Assim, o clearance da LYSO-07, de 33,18 ml/kg/min, é considerado mediano, uma vez que o fígado pode eliminar o fármaco cerca de 47,26% de todo o fluxo de sangue que passa pelo principal órgão metabolizador para este tipo de fármaco. Assim é possível inferir que a taxa de extração hepática da LYSO-07 é 0,47. Com menos suposições, Toutain e Bousquet-Mélou (2004^b) postulam que é possível determinar a taxa de extração corpórea, considerando

o volume sanguíneo total do indivíduo. Nestes termos, o clearance da LYSO-07 representa 14,18% do volume total de sangue do organismo do animal que fica livre do fármaco por minuto, sendo 0,14 a taxa de extração corpórea da LYSO-07 em ratos Wistar.

O volume de distribuição (V_d) calculado foi como $V_{d_{\text{área}}}$, que é o V_d no estado de pseudo-equilíbrio, onde a distribuição do fármaco pelos tecidos já está estabelecida e as trocas com o compartimento central é nula. (TOUTAIN & BOUSQUET-MÉLOU, 2004d). O V_d da LYSO-07 é de $6648,71 \pm 1776,84$ mL/kg, um V_d bastante alto, considerando que o volume sanguíneo total desse modelo animal é de 16 mL.

O fármaco apresenta o perfil farmacocinético compatível com o modelo bicompartimental, ou seja, se distribui para outros compartimentos em velocidade diferente da velocidade de eliminação do fármaco, fazendo com que a concentração plasmática caia com maior velocidade num momento inicial, exibindo uma meia vida de distribuição de $15,14 \pm 4,25$ minutos enquanto não há equilíbrio entre o compartimento central e o compartimento periférico. Considerando o Logp do composto, é provável que o compartimento no qual a LYSO-07 se distribui seja rico em lipídios, como o próprio tecido adiposo ou ainda o cérebro. Ainda, a quantidade de fármaco que continua no plasma pode estar ligada à proteínas plasmáticas, característica comum entre as TZDs. A pioglitazona, rosiglitazona e troglitazona possuem ligação a proteínas plasmáticas maior que 95%, com ligação principalmente à albumina (SATHISH et al., 2012, BUDDE et al., 2013, OTT et al., 1998).

5.8.2 Grupo oral

O piloto do grupo oral (p.o.) foi realizado em 2 animais, porém, não foi possível a determinação da concentração plasmática em nenhum dos pontos de coleta. Portanto, chegou-se a conclusão de que a LYSO-07 quando administrada por esta via não apresenta concentrações plasmáticas mínimas para a detecção pelo método cromatográfico desenvolvido.

A obtenção dos parâmetros farmacocinéticos possibilita a elaboração de regimes terapêuticos para a utilização desta nova molécula, principalmente para pesquisa de segurança e atividade de forma a fazer com que este candidato à fármaco possa chegar aos testes clínicos. A obtenção dos parâmetros farmacocinéticos apenas dos animais do grupo i.v. fornece as informações principais para a elaboração do regime terapêutico, embora o fator biodisponibilidade oral (F) não possa ser obtido apenas com estes dados. É muito importante obter o F uma vez que para conceber-se um regime terapêutico compatível com a utilidade terapêutica da molécula, atividade anti-inflamatória, é recomendada a utilização desta via.

Porém, os resultados apresentados por Santin et al. (2013) demonstram atividade da molécula quando administrada nas mesmas condições (veículo, dose e via), portanto, hipóteses devem ser levantadas para explicar os fatos ocorridos:

a) A LYSO-07 pode não possuir capacidade de atravessar membranas na sua forma íntegra. Sem as evidências sobre possíveis transportadores para facilitar a entrada da LYSO-07 no organismo, assume-se a difusão passiva como a opção mais provável para a entrada do candidato à fármaco na circulação sistêmica. Para permear membranas plasmáticas é necessário haver lipofilicidade suficiente para interagir com a bicamada lipídica das membranas biológicas porém hidrossolubilidade compatível com a dissolução destas moléculas no fluido biológico aquoso. Lipinski e colaboradores (1997), através da regra dos 5, postulam que o log P de moléculas com potencial terapêutico não deveria ser maior do que 5, leva a crer que a LYSO-07 não seja capaz de solubilizar-se nas interfaces necessárias para a concretização da passagem do fármaco para a circulação sistêmica por possuir log P maior do que 6,5.

b) Devido ao alto log P da LYSO-07 é possível a ocorrência de precipitação do fármaco nos fluidos gástricos, o que impossibilitaria a absorção do mesmo. Sabe-se pelos estudos de hidrólise de Santin et al. (2013), que a LYSO-07 precipita e não se mantém estável por mais de 5 minutos em ambiente aquoso, tanto em pH 1,2 quanto em 7,4. Portanto em ambiente

estomacal, a LYSO-07 pode precipitar e ser excretada pelas fezes, não sendo absorvida por esta via. Porém, a validação desta hipótese contraria a evidência da atividade biológica registrada por Santin et al. (2013).

c) Devido a um ou mais fatores acima descritos, quantidades de LYSO-07 podem ter sido absorvidas e gerado efeito terapêutico, porém o método bioanalítico aqui estabelecido não foi sensível o suficiente para quantificar estas concentrações (LD=78 ng/mL). Ao observar a publicação de Santin et al. (2013) as concentrações utilizadas para evidenciar efeito de inibição da COX-2 foram de 0,01 a 10 μ M, o que convertendo para μ g/mL resulta em 44,473 ng/mL a 4,4473 μ g/mL. Ou seja, mesmo em concentrações abaixo do limite de quantificação do método bioanalítico estabelecido neste estudo é possível haver atividade farmacológica *in vitro*, o que pode corroborar os estudos de atividade mesmo não havendo concentrações quantificáveis do analito neste estudo.

d) O modelo animal utilizado pode ter influenciado na absorção do fármaco. O estudo de atividade da LYSO-07 foi realizado em camundongos, enquanto que os estudos de farmacocinética foram conduzidos em ratos.

Com o intuito de evitar a degradação da molécula no ambiente estomacal e o metabolismo de primeira passagem - hipóteses da absorção restrita da LYSO-07 - é possível utilizar recursos farmacotécnicos e vias de administração alternativas, como a sublingual ou transmucosa. Esta via de administração pode viabilizar a absorção de moléculas devido à alta vascularização da região, membrana bastante permeável e evitar o metabolismo de primeira passagem, o que pode melhorar a biodisponibilidade de moléculas, como ocorre no estudo de Fischer e colaboradores (2013), onde a biodisponibilidade das pastilhas de buprenorfina e naloxona foi melhorada através de estudos farmacotécnicos utilizando administração sublingual.

Embora haja limitações para seu uso, como a existências de enzimas, alto fluxo de saliva, gosto potencialmente desagradável, pouca região de contato e limitação na dose passível de ser absorvida pela pequena região de contato utilizada, é possível haver absorção melhorada neste local por evitar os

empecilhos de outras porções do trato gastrointestinal (MADHAV et al., 2009; PATEL et al., 2011).

6. Conclusões

- O método analítico para a determinação de LYSO-07 apresentou limites de confiança adequados para sua aplicação nos estudos de estabilidade química;
- A LYSO-07 apresentou instabilidade no pH 1,2 e 7,4 com degradação significativa em 2 minutos;
- Foi determinado o log P teórico e experimental da LYSO-07 pelo método cromatográfico e concluiu-se que o log P da LYSO-07 é maior do que 6,5;
- Foi desenvolvido um método cromatográfico que atende a separação ideal ($R_s \geq 2,0$) dos isômeros Z e E da LYSO-07;
- Foi possível comprovar por espectrometria de massas a identidade dos isômeros Z e E nos picos separados no método bioanalítico além de identificar alguns fragmentos de massa gerados no experimento.
- O método bioanalítico desenvolvido apresentou limites de confiança adequados para sua aplicação no estudo de farmacocinética;
- Na exposição a doses múltiplas não foi evidenciado qualquer indício de toxicidade renal, hepática ou alteração sobre os níveis de colesterol ou glicêmicos dos animais. A cardiotoxicidade deve ser investigada em decorrência dos resultados inconclusivos obtidos neste estudo com o biomarcador CKMB;
- A ausência de toxicidade observada nos grupos que receberam a LYSO-07 pela via oral pode estar relacionada com os baixos

níveis plasmáticos, embora haja evidências de efeitos terapêuticos por esta via.

- A LYSO-07 apresentou meia vida de eliminação curta (2,31 horas) em relação aos seus pares (tiazolidinodionas), Cl mediano para o modelo experimental utilizado (33,177 mL/kg/min) e Vd elevado (6.648,707 mL/kg).
- Não foi possível quantificar a LYSO-07 após administração oral, Sendo possível a degradação do fármaco no ambiente estomacal, precipitação do fármaco no TGI ou incapacidade da molécula de permear membranas devido ao alto log P;

7. Perspectivas

- As publicações sobre a LYSO-07 continuam a ocorrer, revelando a confiança que os pesquisadores depositam no fármaco (Santin et al., 2013a e b). Contudo este estudo deixa em aberto uma série de possibilidades de investigação para elucidar aspectos importantes da molécula como sua permeabilidade através de membranas plasmáticas e se subunidades da LYSO-07 poderiam ter atividade e neste caso, redefinir o pensamento sobre a molécula;
- Suas características físico-químicas anômalas para um fármaco (logP acima de 6,5) pode significar uma maior dificuldade de utilização terapêutica da molécula, mas simultaneamente abre novas perspectivas para o planejamento de uma formulação com o intuito de explorar estas características, por exemplo para sua utilização via sublingual ou transmucosa.;
- A farmacocinética da molécula até o momento revelou-se incompatível com a utilização terapêutica pela via oral. Porém mais estudos necessitam ser realizados para determinar se há atividade, mesmo em concentrações plasmáticas mínimas ou ainda se há um metabólito ativo que justifique seu uso.

8. Bibliografia

1. ABDALLA D. S. P., New Thiazolidine-2,4-dione improve lipid profile and down-regulate pro-inflammatory gene expression in LDL deficient mice. **In: The 79th EAS Congress.** Gothenburg, Sweden. Realizado de 26 a 29 de junho de 2011.
2. ABDEL-AZEEM A.S., HEGAZY A.M., IBRAHIM K.S., FARRAG A.R., EL-SAYED E.M. Hepatoprotective, antioxidant, and ameliorative effects of ginger (*Zingiber officinale* Roscoe) and vitamin E in acetaminophen treated rats. **J Diet Suppl.** v. 10, n. 3, p. 195-209. 2013.
3. ADAMS J.E., BODOR G.S., DÁVILA-ROMÁN V.G., DELMEZ J.A., APPLE F.S., LADENSON J.H., JAFFE A.S. Cardiac troponin I. A marker with high specificity for cardiac injury. **Circulation.** v. 88, n. 1, p. 101-6. 1993.
4. AMANI M., JEDDI S., AHMADIASL N., USEFZADE N., ZAMAN J. Effect of HEMADO on Level of CK-MB and LDH Enzymes after Ischemia/Reperfusion Injury in Isolated Rat Heart. **Bioimpacts.** v. 3, n. 2, p. 101-4. 2013.
5. AMATO, A.A., NEVES, F.A., Idealized PPARgamma-Based Therapies: Lessons from Bench and Bedside. **PPAR Res.** 2012.
6. ANEJA D.K., LOHAN P., ARORA S., SHARMA C., ANEJA K.R., PRAKASH O. Synthesis of new pyrazolyl-2, 4-thiazolidinediones as antibacterial and antifungal agents. **Org Med Chem Lett.** v. 1,n. 1, p. 15. 2011.
7. ANVISA. Agência nacional de Vigilância Sanitária. **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 11 de Janeiro de 2013.
8. ANVISA. Agência nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RE 1466, de 29 de setembro de 2010. **Alerta SNVS/Anvisa/Nuvig/Gfarm n° 04, de 29 de setembro de 2010.** Disponível em <http://s.anvisa.gov.br/wps/s/r/huV>. Acesso em: 28 de março. de 2012.
 9. ANVISA. Agência nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução RE 27, de 17 de maio de 2012.** Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/e-legis/>. Acesso em 11 de Janeiro de 2013.
 10. ARAÚJO, L. M. B.; BRITTO M. M. S.; CRUZ, T. R. P. Tratamento do Diabetes Mellitus do Tipo 2: Novas Opções; **Arq Bras Endocrinol Metab.** v. 44, n. 6, p. 509-18. 2000.
 11. AUGUSTIJNS P., WUYTS B., HENS B., ANNAERT P., BUTLER J., BROUWERS J. A review of drug solubility in human intestinal fluids: Implications for the prediction of oral absorption. **Eur J Pharm Sci.** 2013.
 12. AVDEEF A. Physicochemical profiling (solubility, permeability and charge state). **Curr Top Med Chem.** v. 1, n. 4, p. 277-351. 2001.
 13. BAKER S.D., ZHAO M., HE P., CARDUCCI M.A., VERWEIJ J., SPARREBOOM A. Simultaneous analysis of docetaxel and the formulation vehicle polysorbate 80 in human plasma by liquid chromatography/tandem mass spectrometry. **Anal Biochem.** v. 324, n. 2, p. 276-84. 2004.
 14. BALAJI V. Efficacy and safety of pioglitazone in type 2 diabetes in the Indian patients: Results of an observational study. **Indian J Endocrinol Metab.** v. 17, n. 4, p. 709-15. 2013.

15. BENET L.Z. Clearance (née Rowland) concepts: a downdate and an update. **J Pharmacokinet Pharmacodyn.** v. 37, n. 6, p. 529-39. 2010.
16. BIJLAND S., MANCINI S. J., SALT I. P. Role of AMP-activated protein kinase in adipose tissue metabolism and inflammation. **Clin Sci (Lond).** v. 124, n. 8. p. 491-507. Apr. 2013 .
17. 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, n. 1, p. 1-14. 1997.
18. BOROUJERDI, M. **Pharmacokinetics: Principles and Applications.** New York: McGraw-Hill. p. 51-72. 2002.
19. BUDDÉ K., NEUMAYER H.H., FRITSCHÉ L., SULOWICZ W., STOMPÔR T., ECKLAND D. The pharmacokinetics of pioglitazone in patients with impaired renal function. **Br J Clin Pharmacol.** v. 55, n. 4, p. 368-74. 2003.
20. CERIELLO A. Thiazolidinediones as anti-inflammatory and anti-atherogenic agents. **Diabetes Metab Res Rev.** v. 24, n. 1, p. 14-26. 2008.
21. CLARYSSE S., BROUWERS J., TACK J., ANNAERT P., AUGUSTIJNS P. Intestinal drug solubility estimation based on simulated intestinal fluids: comparison with solubility in human intestinal fluids. **Eur J Pharm Sci.** v. 43, n. 4, p. 260-9. 2011.
22. COCK, T.A., HOUTEN, S.M., AUWERX, J. Peroxisome proliferator-activated receptor- γ : too much of a good thing causes harm. **EMBO Rep.** v. 5, p. 142–147. 2004.

23. DEFRONZO R.A., MEHTA R.J., SCHNURE J.J. Pleiotropic effects of thiazolidinediones: implications for the treatment of patients with type 2 diabetes mellitus. **Hosp Pract (1995)**. v. 41, n. 2, p. 132-47. 2013.
24. DINARELLO C.A. Anti-inflammatory Agents: Present and Future. **Cell**. v. 140, n. 6, p. 935-50. 2010.
25. EDET E.E., AKPANABIATU M.I., ENO A.E., UMOH I.B., ITAM E.H. Effect of Gongronema latifolium crude leaf extract on some cardiac enzymes of alloxan-induced diabetic rats. **Afr J Bio Res**. v. 3, n. 11, p. 366-369. 2009.
26. EHLERS S., SCHAIBLE U. E. The granuloma in tuberculosis: dynamics of a host-pathogen collusion. **Front Immunol**. n. 3, p. 411. 2013.
27. EIKELENBOOM P., HOOZEMANS J. J., VEERHUIS R., VAN EXEL E., ROZEMULLER A. J., VAN GOOL W. A. Whether, when and how chronic inflammation increases the risk of developing late-onset Alzheimer's disease. **Alzheimers Res Ther**. v. 4, n. 3, p. 15. 2012.
28. ELDER D., HOLMB R. Aqueous solubility: Simple predictive methods (in silico, in vitro and bio-relevant approaches). **Int. J. Pharm**. v. 453, n. 1, p. 3–11. 2013.
29. FDA. Food and Drugs Administration. **New Safety Releases**. Rezulin(troglitazone) withdraw from the Market. 03/21/2000. Disponível em:
<http://www.fda.gov/Safety/MedWatch/SafetyInformation/SafetyAlertsforHumanMedicalProducts/ucm173081.htm>. Acessado em 21/10/2013.
30. FISCHER A., JÖNSSON M., HJELMSTRÖM P. Pharmaceutical and pharmacokinetic characterization of a novel sublingual buprenorphine/naloxone tablet formulation in healthy volunteers. **Drug**

Dev Ind Pharm. 2013.

31. GARCÍA-BUENO B.; PÉREZ-NIEVAS B. G.; LEZA J. C. Is there a role for the nuclear receptor PPAR γ in neuropsychiatric diseases? **Int J Neuropsychopharmacol.** v. 13, n. 10, p. 1411-29. 2010.
32. GEETHAA S., THAVAMANY P.J., CHIEW S.P., THONG O.M. Interference from ordinarily used solvents in the outcomes of *Artemia salina* lethality test. **J Adv Pharm Technol Res.** v. 4, n. 4, p. 179-82. 2013.
33. HANDZLIK J., SZYMAŃSKA E., WÓJCIK R., DELA A., JASTRZĘBSKA-WIĘSEK M., KAROLAK-WOJCIECHOWSKA J., FRUZIŃSKI A., SIWEK A., FILIPEK B., KIEĆ-KONONOWICZ K. Synthesis and SAR-study for novel arylpiperazine derivatives of 5-arylidenehydantoin with α 1-adrenoceptor antagonistic properties. **Bioorg. Med. Chem.** v. 20, p. 4245–4247. 2012.
34. HARKNESS, J.E. & WAGNER, J.E. **Biologia e clínica de coelhos e roedores.** 3^aed, Editora Roca, São Paulo (1993).
35. HIMMEL H.M. Suitability of commonly used excipients for electrophysiological in-vitro safety pharmacology assessment of effects on hERG potassium current and on rabbit Purkinje fiber action potential. **J Pharmacol Toxicol Methods.** v. 56, n. 2, p. 145-58. 2007.
36. JÄRVINEN H. Y. Thiazolidinediones. **The New England Journal of Medicine.** v. 351, n. 11, p. 1106-18. 2004.
37. KANEKO, J. J.; HARVEY, J. W.; BRUSS, M. L; **Clinical Biochemistry of Domestic Animals,** v. 6. p. 388-400. 2008.

38. KAROLAK-WOJCIECHOWSKA J., SZYMANSKA E., MROZEK A., KIEC-KONONOWICZ K. Crystallographic and spectroscopic studies of 5-arylidene-2-amino-imidazol-4-ones. **J. Mol. Struct.** v. 930, p. 126–134. 2009.
39. KAWAI K., KAWASAKI-TOKUI Y., ODAKA T., TSURUTA F., KAZUI M., IWABUCHI H., NAKAMURA T., KINOSHITA T., IKEDA T., YOSHIOKA T., KOMAI T., NAKAMURA K. Disposition and metabolism of the new oral antidiabetic drug troglitazone in rats, mice and dogs. **Arzneimittelforschung.** v. 47, n. 4, p. 356-68. 1997.
40. KIM Y.R., LEE N.J., BAN J.O., YOO H.S., LEE Y.M., YOON Y.P, EUM S.Y., JEONG H.S., YOON D.Y., HAN S.B., HONG J.T. Curative Effects of Thiacremonone against Acetaminophen-Induced Acute Hepatic Failure via Inhibition of Proinflammatory Cytokines Production and Infiltration of Cytotoxic Immune Cells and Kupffer Cells. **Evid Based Complement Alternat Med.** 2013.
41. KOBAYASHI S. D., DELEO F. R. Role of neutrophils in innate immunity: a systems biology-level approach. **Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med.** v. 1, n. 3, p. 309-33. 2009.
42. KUMMER C.L., COELHO T.C.R.B. Antiinflamatórios Não Esteróides Inibidores da Ciclooxygenase-2 (COX-2): Aspectos Atuais. **Rev Bras Anesthesiol.** v. 52, n. 4, p. 498-512. 2002.
43. LANIGAN R.S., YAMARIK T.A. Cosmetic Ingredient Review Expert Panel Final report on the safety assessment of PEG-6, -8, and -20 sorbitan beeswax. **Int J Toxicol.** v. 20, n. 4, p. 27-38. 2001.
44. LEE H.I., MCGREGOR R.A., CHOI M.S., SEO K.I., JUNG U.J., YEO J., KIM M.J., LEE M.K. Low doses of curcumin protect alcohol-induced liver damage by modulation of the alcohol metabolic pathway, CYP2E1 and

- AMPK. **Life Sci.** v. 93, n. 18-19, p. 693-9. 2013.
45. 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.** v. 46, p. 3-26. 1997.
46. LIPINSKI C.A. Lead- and drug-like compounds: the rule-of-five revolution. **Drug Discov Today Technol.** v. 1, n. 4, p. 337-41. 2004.
47. LU X.T., ZHAO Y.X., ZHANG Y., JIANG F. Psychological stress, vascular inflammation and atherogenesis: potential roles of circulating cytokines. **J Cardiovasc Pharmacol.** v. 62, n. 1, p. 6-12. 2013.
48. LU Y., SUN J., PETROVA K., YANG X., GREENHAW J., SALMINEN W.F., BEGER R.D., Schnackenberg L.K. Metabolomics evaluation of the effects of green tea extract on acetaminophen-induced hepatotoxicity in mice. **Food Chem Toxicol.** 2013.
49. MADHAV N.V., SHAKYA A.K., SHAKYA P., SINGH K. Orotransmucosal drug delivery systems: a review. **J Control Release.** v. 140, n. 1, p. 2-11. 2009.
50. MAHMOOD I. Interspecies scaling: predicting volumes, mean residence time and elimination half-life. Some suggestions. **J Pharm Pharmacol.** v. 50, n. 5, p. 493-9. 1998.
51. MALAMAS, M. S.; SREDY, J.; MCCALED, M.; GUNAWAN, I.; MIHAN, B.; SULLIVAN, D. Antihyperglycemic activity of new 1,2,4-oxadiazolidine-3,5-diones. **European Journal of Medicinal Chemistry.** v. 36, n. 1, p. 31-42. 2001.

52. MARTENS, F. M. A. C FABRICE M. A. C.; VISSEREN, FRANK L. J.; LEMAY, JACINTHE; DE KONING, EELCO J. P.; RABELINK, TON J. Metabolic and Additional Vascular Effects of Thiazolidinediones. **Drugs**. v. 62, n. 10, p. 1463-80. 2002.
53. MELONI A.R., DEYOUNG M.B., HAN J., BEST J.H., GRIMM M. Treatment of patients with type 2 diabetes with exenatide once weekly versus oral glucose-lowering medications or insulin glargine: achievement of glycemic and cardiovascular goals. **Cardiovasc Diabetol**. v. 12, p. 48. 2013.
54. MIZUI T., DOTEUCHI M. Effect of polyamines on acidified ethanolinduced gastric lesion in rats. **Jpn J Pharmacol**. v. 33, p. 939–945. 1983.
55. MOURÃO R. H., SILVA T. G., SOARES A. L., VIEIRA E. S., SANTOS J. N., LIMA M. C., LIMA V. L., GALDINO S. L., BARBE J., PITTA I. R. Synthesis and biological activity of novel acridinylidene and benzylidene thiazolidinediones. **European Journal of Medicinal chemistry**. v. 40, n. 11, p. 1129-33. 2005.
56. MOURÃO, R. H. V. Síntese, modelagem molecular e atividade hipoglicemiante de novas arilideno-tiazolidinadionas. **Tese (Doutorado) Centro de Ciências Biológicas**, Universidade Federal de Pernambuco. Recife, 2006:143.
57. NEERVANNAN S. Preclinical formulations for discovery and toxicology: physicochemical challenges. **Expert Opin Drug Metab Toxicol**. v. 2, n. 5, p. 715-31. 2006.
58. OBERLE R.L., MOORE T.J., KRUMMEL D.A. Evaluation of mucosal damage of surfactants in rat jejunum and colon. **J Pharmacol Toxicol Methods**. v. 33, n. 2, p. 75-81. 1995.

59. OECD GUIDELINE FOR TESTING OF CHEMICALS. Adopted by the Council on 3th March 1989. ref. 117.
60. OLFERT E.D., CROSS B.M., MCWILLIAM A.A. **Guide To The Care And Use Of Experimental Animals**. v. 1. 1993.
61. OTT P., RANEK L., YOUNG M.A. Pharmacokinetics of troglitazone, a PPAR-gamma agonist, in patients with hepatic insufficiency. **Eur J Clin Pharmacol**. v. 54, n. 7, p. 567-71. 1998.
62. OYAMA M.A., SISSON D.D. Cardiac troponin-I concentration in dogs with cardiac disease. **J Vet Intern Med**. v. 18, n. 6, p. 831-9. 2004.
63. PATEL V.F., LIU F., BROWN M.B. Advances in oral transmucosal drug delivery. **J Control Release**. v. 153, n. 2, p. 106-16. 2011.
64. POUWELS K.B., VAN GROOTHEEST K. The rosiglitazone decision process at FDA and EMA. What should we learn? **Int J Risk Saf Med**. v. 24, n. 2, p. 73-80. 2012.
65. RIBANI M., BOTTOLI C.B.C., COLLINS C.H., JARDIM I.C.S.F. VALIDAÇÃO EM MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS E ELETROFORÉTICOS **Quim. Nova**. v. 27, n. 5, p. 771-780, 2004.
66. ROWE R.C., SHESKEY P.J., QUINN M.E. **Handbook of Pharmaceutical Excipients**. Sixth edition. Data Standards Ltd. Royal Pharmaceutical Society of Great Britain. 2009.
67. Ryan G.J., Moniri N.H., Smiley D.D. Clinical effects of once-weekly exenatide for the treatment of type 2 diabetes mellitus. **Am J Health Syst Pharm**. v. 70, n. 13, p. 1123-31. 2013.

68. SANTIN J. R., UCHÔA F. D., LIMA M. D., RABELLO M. M., MACHADO I. D., HERNANDES M. Z., AMATO A. A., MILTON F. A., WEBB P., NEVES F. D., GALDINO S. L., PITTA I. R., FARSKY S. H. Chemical synthesis, docking studies and biological effects of a pan peroxisome proliferator-activated receptor agonist and cyclooxygenase inhibitor. **Eur J Pharm Sci.** v. 48, n. 4-5, p. 689-97. 2013.
69. SANTIN J.R., DAUFENBACK MACHADO I., RODRIGUES S.F., TEIXEIRA S., MUSCARÁ M.N., LINS GALDINO S., DA ROCHA PITTA I., FARSKY S.H. Role of an Indole-Thiazolidine Molecule PPAR Pan-Agonist and COX Inhibitor on Inflammation and Microcirculatory Damage in Acute Gastric Lesions. **PLoS One.** v. 8, n. 10. 2013.
70. SANTOS M. R. V., SOUZA V. H., MENEZES I. A. C., BITENCURT J. L., REZENDE-NETO J. M., BARRETO A. S., CUNHA F. A., MARÇAL R. M., TEIXEIRA-SILVA F., QUÍNTANS-JÚNIOR L. J., Parâmetros bioquímicos, fisiológicos e morfológicos de ratos (*Rattus norvegicus* linhagem Wistar) produzidos pelo Biotério Central da Universidade Federal de Sergipe. **Scientia Plena.** v. 6, n. 10. 2010.
71. SATHISH R., ANBU J., ANJANA A., AHAMED K.F.H.N, SRINIVASA RAO G. Pharmacokinetic And Pharmacodynamic Interaction Between Aceclofenac And Rosiglitazone In Rats. **International Journal of Pharma and Bio Sciences.** v. 3, n. 2, p. 385-94. 2012.
72. SENGUPTA, P.; NANDI, U.; PAL, T.K. Development of safety profile evaluating pharmacokinetics, pharmacodynamics and toxicity of a combination of pioglitazone and olmesartan medoxomil in wistar albino rats. **Regulatory Toxicology and Pharmacology.** v. 62, n. 1, p. 7-15. 2012.
73. SISSON D.D. Neuroendocrine evaluation of cardiac disease. **Vet Clin North Am Small Anim Pract.** v. 34, n. 5, p. 1105-26. 2004.

74. SMITH D.A., DI L., KERNS E.H. The effect of plasma protein binding on in vivo efficacy: misconceptions in drug discovery. **Nat Rev Drug Discov.** v. 9, n. 12, p. 929-39. 2010.
75. SNYDER, L. R., KIRKLAND, J. J., DOLAN, J. W. **Introduction to Modern Liquid Chromatography.** Third Edition. Hoboken New Jersey: John Wiley & Sons. 2010.
76. SPARREBOOM A., ZHAO M., BRAHMER J.R., VERWEIJ J., BAKER S.D. Determination of the docetaxel vehicle, polysorbate 80, in patient samples by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.** v. 773, n. 2, p. 183-90. 2002.
77. TANTI J. F., CEPPO F., JAGER J., BERTHOU F. Implication of inflammatory signaling pathways in obesity-induced insulin resistance. **Front Endocrinol (Lausanne).** v. 3, p.181. 2012.
78. TEN TIJE A.J., LOOS W.J., VERWEIJ J., BAKER S.D., DINH K., FIGG W.D., SPARREBOOM A. Disposition of polyoxyethylated excipients in humans: implications for drug safety and formulation approaches. **Clin Pharmacol Ther.** v. 74, n. 5, p. 509-10. 2003.
79. TOUTAIN PL, BOUSQUET-MÉLOU A. Bioavailability and its assessment. **J Vet Pharmacol Ther.** v. 27, n. 6, p. 455-66. 2004a.
80. TOUTAIN PL, BOUSQUET-MÉLOU A. Plasma Terminal Half-Life. **J Vet Pharmacol Ther.** v. 27, n. 6, p. 427-39. 2004b.
81. TOUTAIN, P. L.; BOUSQUET-MELOU, A. Plasma clearance. **Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics.** v. 27, n. 6, p. 415-425, 2004c.

82. TOUTAIN, P. L.; BOUSQUET-MELOU, A. Volumes of distribution. **Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics**. v. 27, p. 441-453, 2004d.
83. TUNÇBILEK, M.; BOZDAĞ-DÜNDAR, O.; AYHAN-KILCIGIL, G.; CEYLAN, M.; WAHEED, A.; VERSPOHL, E. J.; ERTAN, R. Synthesis and hypoglycemic activity of some substituted flavonyl thiazolidinedione derivatives-fifth communication: flavonyl benzyl substituted 2,4-thiazolidinediones. **IL Farmaco**. v. 58, n. 1, p. 79-83. 2003.
84. UNZUETA A., VARGAS H.E. Nonsteroidal anti-inflammatory drug-induced hepatotoxicity. **Clin Liver Dis**. v. 17, n. 4, p. 643-56. 2013.
85. van de WATERBEEMD H., GIFFORD E. ADMET in silico modelling: towards prediction paradise? **Nat Rev Drug Discov**. v. 2, n. 3, p. 192-204. 2003.
86. van de WATERBEEMD H., SMITH D.A., JONES B.C. Lipophilicity in PK design: methyl, ethyl, futile. **J Comput Aided Mol Des**. v. 15, n. 3, p. 273-86. 2001.
87. VELDHUIS W.B., van der STELT M., WADMAN M.W., van ZADELHOFF G., MACCARRONE M., FEZZA F., VELDINK G.A., VLIEGENTHART J.F., BÄR P.R., NICOLAY K., di MARZO V. Neuroprotection by the endogenous cannabinoid anandamide and arvanil against in vivo excitotoxicity in the rat: role of vanilloid receptors and lipoxygenases. **J Neurosci**. v. 23, n. 10, p. 4127-33. 2003.
88. VUCIC, E.; DICKSON, S. D.; CALCAGNO, C.; RUDD, J. H.; MOSHIER, E.; HAYASHI, K.; MOUNESSA, J. S.; ROYTMAN, M.; MOON, M. J.; LIN, J.; TSIMIKAS, S.; FISHER, E. A.; NICOLAY, K.; FUSTER, V.; FAYAD, Z. A. Pioglitazone modulates vascular inflammation in atherosclerotic rabbits noninvasive assessment with FDG-PET-CT and dynamic

- contrast-enhanced MR imaging. **JACC Cardiovasc Imaging**. v. 4, n. 10, p. 1100-9. 2011.
89. WATERS NJ., LOMBARDO F. Use of the Øie-Tozer model in understanding mechanisms and determinants of drug distribution. **Drug Metab Dispos**. v. 38, n. 7, p. 1159-65. 2010.
90. WEISZHÁR Z., CZÚCZ J., RÉVÉSZ C., ROSIVALL L., SZEBENI J., ROZSNYAY Z. Complement activation by polyethoxylated pharmaceutical surfactants: Cremophor-EL, Tween-80 and Tween-20. **Eur J Pharm Sci**. v. 45, n. 4, p. 492-8. 2012.
91. WENG, J. R.; CHEN, C.Y.; PINZONE, J. J.; RINGEL, M. D.; CHEN, C. S. Beyond peroxisome proliferator-activated receptor gamma signaling: the multi-facets of the antitumor effect of thiazolidinediones. **Endocr Relat Cancer**. v. 13, n. 2, p. 401-13. 2006.
92. WHITE G.E., IQBAL A.J., GREAVES D.R. CC chemokine receptors and chronic inflammation--therapeutic opportunities and pharmacological challenges. **Pharmacol Rev**. v. 65, n. 1, p. 47-89. 2013.

9. Anexos

ANEXO I - Carta de aprovação no comitê de ética para os experimentos de farmacocinética.

Protocolo CEUA/FCF/CAr nº 42/2012

Pesquisador: ELIAS CARVALHO PADILHA

Orientador: Prof^{Dr} Rosângela Gonçalves Peccinini

Projeto: Desenvolvimento e validação de método bioanalítico e farmacocinética pré-clínica do composto [5-(5-bromo-1H-indol-3-metieleno)-3-(4-cloro-benzil)-tiazolidina-2,4-diona] (Lyso-07).

Despacho nº 35/2012 – Comissão de Ética no Uso de Animais

A Comissão de Ética no Uso de Animais, em reunião do dia 26 de outubro de 2012, verificou que o protocolo para uso de animais na pesquisa: "Desenvolvimento e validação de método bioanalítico e farmacocinética pré-clínica do composto [5-(5-bromo-1H-indol-3-metieleno)-3-(4-cloro-benzil)-tiazolidina-2,4-diona] (Lyso-07)", apresentado pelo pós-graduando Elias Carvalho Padilha, sob orientação da Prof^{Dr} Rosângela Gonçalves Peccinini, do Departamento de Princípios Ativos Naturais e Toxicologia, desta Faculdade, necessita dos seguintes esclarecimentos/ adequações:

- No item nº 5 – Condições de Manutenção:
 - 5.3 – preencher ambiente de contenção
 - 5.5 – mencionar se a água será tratada e autoclavada
 - 5.7 – não é recomendado a limpeza diária das caixas, pois isto pode estressar os animais
- No item nº 6 – Procedimentos Experimentais:
 - 6.5 – esta informado que não haverá uso de anestésico, sendo que na verdade serão utilizados cetamina e xilazina, conforme descrição do item 6.9
 - 6.13 – é mencionado a administração de veículo, mas um grupo veículo não é contemplado nos grupos experimentais.

Solicita-se, ainda, que a resposta a este despacho seja enviada em forma de carta/ofício de forma ordenada, conforme os itens constantes deste despacho, com os esclarecimentos ou indicações das possíveis alterações efetuadas no novo protocolo preenchido. O projeto em questão terá prazo de até 30 dias para sua adequação, após o que o processo de análise será arquivado, conforme letra c do Art. 21 do Regimento desta CEUA.

Araraquara, 29 de outubro de 2012.



Prof.Dr. CARLOS CESAR CRESTANI
Coordenador da CEUA

ANEXO II - Carta de aprovação no comitê de ética para os experimentos de segurança.

Protocolo CEUA/FCF/CAr nº 15/2012

Pesquisador: LUIS FERNANDO GUERTA SALINA

Orientador: Prof^{Dr}a Rosângela Gonçalves Peccinini

Projeto: Avaliação toxicológica do composto [5-(5-bromo-1H-indol-3-metieleno)-3-(4-cloro-benzil)-tiazolidina-2,4-diona]] (Lyso-07).

Parecer nº 38/2012 – Comissão de Ética no Uso de Animais

A Comissão de Ética no Uso de Animais desta Faculdade, reunida em 23 de julho de 2012, considerou que o protocolo para uso de animais na pesquisa: "Avaliação toxicológica do composto [5-(5-bromo-1H-indol-3-metieleno)-3-(4-cloro-benzil)-tiazolidina-2,4-diona]] (Lyso-07)", apresentado pelo acadêmico Luis Fernando Guerta Salina, sob orientação da Prof^{Dr}a Rosângela Gonçalves Peccinini, do Departamento de Princípios Ativos Naturais e Toxicologia, desta Faculdade, esta estruturado dentro dos princípios éticos na experimentação animal do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal - CONCEA, manifestando-se FAVORÁVEL à sua execução.

O relatório final do protocolo de pesquisa deverá ser entregue em OUTUBRO 2013, em formulário próprio para esse fim.

Araraquara, 24 de julho de 2012.



Prof^{Dr}a ALEXANDRA IVO DE MEDEIROS
Vice-Coordenadora da CEUA

ANEXO III - Valores individuais do experimento de segurança

		Ureia (mg/dL)								
		Rato 01	Rato 02	Rato 03	Rato 04	Rato 05	Média	DP	CV	IC
Grupo Água	Dia 0	38,819	37,137	35,035	32,793	33,073	35,3714	2,600348	7,351556	2,279264
	Dia 7	48,488	38,819	41,201	29,71	45,265	40,6966	7,177419	17,63641	6,29117
	Dia 14	20,279	18,914	20,553	22,484	6,545	17,755	6,394728	36,01649	5,605124
	Dia 28	19,186	7,823	17,559	20,827	13,552	15,7894	5,208533	32,98753	4,565397
Grupo Lyso-07	Dia 0	46,989	43,287	41,517	47,31	43,448	44,5102	2,528194	5,680033	2,216019
	Dia 7	39,239	31,391	31,111	40,781	38,118	36,128	4,552425	12,60082	3,990303
	Dia 14	35,037	32,365	36,076	31,919	42,015	35,4824	4,050975	11,41686	3,550771
	Dia 28	45,546	38,539	29,289	29,71	41,061	36,829	7,147583	19,40749	6,265018
Grupo Suspensão	Dia 0	35,402	45,057	48,759	42,805	48,759	44,1564	5,514634	12,48887	4,833701
	Dia 7	36,296	34,615	39,379	41,481	33,353	37,0248	3,362305	9,081224	2,947136
	Dia 14	14,252	21,527	25,09	51,962	17,519	26,07	15,03978	57,68998	13,1827
	Dia 28	35,315	43,724	36,436	39,099	39,66	38,8468	3,270992	8,420235	2,867098
Grupo Lyso-07/Pio	Dia 0	41,061	39,099	40,36	40,641	38,118	39,8558	1,216137	3,051343	1,065972
	Dia 7	52,412	47,648	52,833	45,546	58,018	51,2914	4,877587	9,50956	4,275315
	Dia 14	14,081	7,055	9,887	15,945	18,099	13,0134	4,496507	34,5529	3,941289
	Dia 28	17,019	17,019	14,346	17,559	0,273	13,2432	7,358358	55,56329	6,449766

		Creatinina (mg/dL)								
		Rato 01	Rato 02	Rato 03	Rato 04	Rato 05	Média	DP	CV	IC
Grupo Água	Dia 0	0,440129	0,608414	0,569579	0,556634	0,440129	0,556634	0,077993	14,01151	0,068362
	Dia 7	0,401294	0,504854	0,453074	0,414239	0,595469	0,453074	0,07906	17,44964	0,069298
	Dia 14	0,478964	0,608414	0,012945	0,453074	0,116505	0,453074	0,255381	56,36615	0,223847
	Dia 28	0,660194	0,440129		0,20712	0,297735	0,368932	0,197455	53,52075	0,193503
Grupo Lyso-07	Dia 0	0,539374	0,24164	0,26753	0,13808	0,03452	0,24164	0,189014	78,22162	0,165675
	Dia 7	0,487594	0,125135	0,461704	0,500539	0,422869	0,461704	0,156254	33,84288	0,13696
	Dia 14	0,694714	0,073355	0,384035	0,125135	0,513484	0,384035	0,261476	68,08655	0,229189
	Dia 28	0,487594	0,409924	0,487594	0,3452	0,487594	0,487594	0,064465	13,22113	0,056505
Grupo Suspensão	Dia 0	0,36246	0,36246	0,297735	0,323625	0,38835	0,36246	0,035921	9,910312	0,031485
	Dia 7	0,349515	0,038667	0,021667		0,037667	0,038167	0,158615	415,5859	0,15544
	Dia 14	0,16397	0,526429	0,474649	0,474649	0,487594	0,474649	0,147709	31,1196	0,12947
	Dia 28	0,513484	0,448759	0,474649	0,474649	0,422869	0,474649	0,033756	7,111857	0,029588
Grupo Lyso-07/Pio	Dia 0	0,306365	0,358145	0,31931	0,306365	0,073355	0,306365	0,113444	37,02913	0,099436
	Dia 7	0,422869	0,422869	0,474649	0,3452	1,160734	0,422869	0,336071	79,47401	0,294574
	Dia 14	0,435814	0,3452	0,513484	0,487594	0,500539	0,487594	0,068864	14,12329	0,060361
	Dia 28	0,487594	0,474649	0,461704	0,332255	0,461704	0,461704	0,063152	13,67811	0,055355

		TGO (U/L)								
		Rato 01	Rato 02	Rato 03	Rato 04	Rato 05	Média	DP	CV	IC
Grupo Água	Dia 0	63,398	75,707	69,436	50,229	85,354	68,8248	13,19286	19,16876459	11,56384
	Dia 7	59,788	74,726	62,943	76,694	84,309	71,692	10,14475	14,15046749	8,892105
	Dia 14	62,943	68,492	67,554	48,126	61,583	61,7396	8,157894	13,21339016	7,150578
	Dia 28	75,216	76,2	76,694	67,554	62,035	71,5398	6,481233	9,059618238	5,680947
Grupo Lyso-07	Dia 0	76,15	77,51	52,37	134,56	80,22	84,162	30,30953	36,01331879	26,56699
	Dia 7	127,08	89,73	82,26	89,05	74,11	92,446	20,36165	22,02545108	17,84744
	Dia 14	69,085	49,716	68,558	62,373	46,002	59,1468	10,71766	18,12043307	9,394267
	Dia 28	63,855	62,943	53,645	59,788	47,708	57,5878	6,818229	11,83971008	5,976331
Grupo Suspensão	Dia 0	76,82	72,07	84,3	76,14	65,28	74,922	6,966615	9,29849	6,106395
	Dia 7	73,43	74,11	93,13	122,35	141,35	100,874	30,12051	29,85953	26,4013
	Dia 14	73,906	48,314	52,079	60,863	31,43	53,3184	15,70392	29,4531	13,76484
	Dia 28	57,569	92,891	72,3	74,238	64,313	72,2622	13,30914	18,41784	11,66576
Grupo Lyso-07/Pio	Dia 0	59,342	74,726	77,688	49,806	72,3	66,7724	11,79019	17,65728	10,33436
	Dia 7	61,583	74,726	49,806	37,556	66,622	58,0586	14,59467	25,13782	12,79256
	Dia 14	51,929	74,726	67,087	52,357	65,233	62,2664	9,903769	15,90548	8,680877
	Dia 28	51,502	68,023	98,534	81,728	62,488	72,455	18,19419	25,11103	15,94762

		TGP (U/L)								
		Rato 01	Rato 02	Rato 03	Rato 04	Rato 05	Média	DP	CV	IC
Grupo Água	Dia 0	47,966	42,476	42,207	30,147	41,139	40,787	6,514228	15,97133402	5,709868
	Dia 7	39,551	40,873	25,31	30,64	36,431	34,561	6,503722	18,8180948	5,700659
	Dia 14	14,62	17,559	14,346	17,019	17,019	16,1126	1,506978	9,352789357	1,3209
	Dia 28	18,099	15,945	9,887	7,055	14,081	13,0134	4,496507	34,55289556	3,941289
Grupo Lyso-07	Dia 0	23,83	3,7	10	10,41	23,83	14,354	9,049991	63,04856213	7,932521
	Dia 7	25,38	20,22	10	18,15	8,35	16,42	7,142405	43,49820376	6,260479
	Dia 14	56,078	34,897	56,078	37,723	31,382	43,2316	11,9403	27,61938465	10,46594
	Dia 28	55,182	51,089	36,431	45,467	53,118	48,2574	7,5373	15,61895102	6,606613
Grupo Suspensão	Dia 0	12,56	18,75	20,3	13,59	17,48	16,536	3,333471	20,15887	2,921863
	Dia 7	25,22	24,19	9,22	28,32	19,03	21,196	7,483718	35,30722	6,559647
	Dia 14	33,38	51,955	49,944	52,535	50,802	47,7232	8,08084	16,93273	7,083038
	Dia 28	56,98	43,827	50,802	47,406	37,463	47,2956	7,328128	15,49431	6,423269
Grupo Lyso-07/Pio	Dia 0	34,39	33,632	34,39	39,026	10,353	30,3582	11,38604	37,50564	9,980118
	Dia 7	52,245	38,503	51,955	37,463	50,516	46,1364	7,480786	16,2145	6,557078
	Dia 14	13,552	20,827	17,559	7,823	19,186	15,7894	5,208533	32,98753	4,565397
	Dia 28	6,545	22,484	20,553	18,914	20,279	17,755	6,394728	36,01649	5,605124

		Coolesterol (mg/dL)								
		Rato 01	Rato 02	Rato 03	Rato 04	Rato 05	Média	DP	CV	IC
Grupo Água	Dia 0	77,143	85,714	40,714	80	35,714	63,857	23,67736	37,07872348	20,75374
	Dia 7	82,857	48,571	51,429	32,857	40	51,1428	19,17693	37,49683806	16,80901
	Dia 14	91,429	42,143	42,857	87,143	57,143	64,143	23,76773	37,05428196	20,83295
	Dia 28	80	49,286	57,857	62,143	54,286	60,7144	11,76937	19,38481473	10,31612
Grupo Lyso-07	Dia 0	147,994	101,766	69,984	82,504	95,024	99,4544	29,73586	29,89898788	26,06415
	Dia 7	54,61	70,922	46,63	68,794	67,376	61,6664	10,54697	17,10327137	9,244658
	Dia 14	47,732	63,283	53,564	67,819	54,212	57,322	8,085223	14,10492052	7,08688
	Dia 28	50	53,571	37,857	45	70,714	51,4284	12,28894	23,89525002	10,77154
Grupo Suspensão	Dia 0	88,283	70,947	103,692	164,366	80,578	101,5732	37,09049	36,51602	32,51065
	Dia 7	124,823	73,05	81,56	87,943	64,539	86,383	23,22853	26,89016	20,36033
	Dia 14	70,41	72,354	74,946	71,058	47,084	67,1704	11,36224	16,91554	9,959255
	Dia 28	48,571	37,143	87,143	49,286	41,429	52,7144	19,90024	37,75106	17,44301
Grupo Lyso-07/Pio	Dia 0	80	59,286	48,571	74,286	78,571	68,1428	13,68007	20,0756	11,99089
	Dia 7	71,429	54,286	81,429	81,429	73,571	72,4288	11,10712	15,33523	9,735643
	Dia 14	59,286	58,571	71,429	64,286	58,571	62,4286	5,569902	8,922035	4,882144
	Dia 28	64,286	46,429	50	67,857	50	55,7144	9,649384	17,31937	8,457903

		Coolesterol (mg/dL)								
		Rato 01	Rato 02	Rato 03	Rato 04	Rato 05	Média	DP	CV	IC
Grupo Água	Dia 0	161,759	146,267	164,271	164,689	146,267	156,6506	9,544899	6,093113855	8,366319
	Dia 7	143,336	167,202	106,071	169,714	169,295	151,1236	27,49864	18,19612667	24,10318
	Dia 14	121,653	114,435	130,126	148,326	140,481	131,0042	13,71686	10,47055026	12,02314
	Dia 28	94,038	118,201	120,711	123,222	133,577	117,9498	14,58995	12,36962975	12,78842
Grupo Lyso-07	Dia 0	158,142	136,005	144,02	132,952	144,02	143,0278	9,762805	6,825809235	8,557318
	Dia 7	158,801	98,502	134,457	156,554	165,169	142,6966	27,28297	19,11956513	23,91414
	Dia 14	132,547	130,425	131,486	136,792	147,406	135,7312	6,959577	5,127470519	6,100226
	Dia 28	151,71	146,267	103,559	148,779	116,539	133,3708	21,8638	16,39324679	19,16412
Grupo Suspensão	Dia 0	125,7	151,272	139,822	127,608	154,707	139,8218	13,24083	9,46979	11,60589
	Dia 7	118,352	136,704	148,689	125,094	82,397	122,2472	25,09723	20,5299	21,99828
	Dia 14	107,075	138,561	122,288	136,792	138,561	128,6554	13,86275	10,7751	12,15101
	Dia 28	132,031	147,523	140,823	171,807	149,197	148,2762	14,78657	9,972314	12,96076
Grupo Lyso-07/Pio	Dia 0	103,978	169,295	125,75	134,124	64,62	119,5534	38,68203	32,35544	33,90567
	Dia 7	133,287	162,177	144,592	181,019	163,015	156,818	18,41191	11,74094	16,13845
	Dia 14	149,895	139,226	129,498	136,715	140,481	139,163	7,353942	5,284409	6,445896
	Dia 28	111,925	198,536	124,477	108,787	111,611	131,0672	38,19962	29,14507	33,48283

		CK (U/L)								
		Rato 01	Rato 02	Rato 03	Rato 04	Rato 05	Média	DP	CV	IC
Grupo Água	Dia 0	215,833	198,566	198,567	155,4	138,133	181,300	32,874	18,132	28,815
	Dia 7	215,833	215,833	164,033	112,233	138,133	169,213	46,331	27,380	40,610
	Dia 14	415,300	200,951	375,109	200,951	267,935	292,049	99,081	33,926	86,847
	Dia 28	281,332	214,348	174,158	120,571	200,951	198,272	58,701	29,606	51,453
Grupo Lyso-07	Dia 0	21	224	287	259	112	180,6	111,276	61,614	97,535
	Dia 7	483	658	427	413	294	455	132,723	29,169	116,335
	Dia 14	580,517	223,275	616,2414	535,862	241,137	439,407	191,383	43,554	167,751
	Dia 28	138,133	172,667	198,5667	103,6	172,667	157,128	36,831	23,440	32,283
Grupo Suspensão	Dia 0	357	308	364	343	245	323,4	48,849	15,105	42,817
	Dia 7	751,1	500,733	897,8667	483,4667	483,4667	623,326	190,950	30,634	167,372
	Dia 14	716,566	388,5	207,2	336,7	146,7667	359,146	222,096	61,840	194,672
	Dia 28	189,933	112,233	207,2	189,9333	267,633	193,386	55,482	28,689	48,631
Grupo Lyso-07/Pio	Dia 0	716,566	103,6	198,567	60,433	69,067	229,646	277,652	120,904	243,369
	Dia 7	189,933	189,933	129,5	77,7	120,867	141,586	48,300	34,113	42,336
	Dia 14	112,233	181,3	189,933	172,6667	198,567	170,940	34,208	20,011	29,984
	Dia 28	155,4	155,4	233,1	146,7667	43,167	146,766	67,704	46,130	59,344

		CKMB (U/L)									
		Rato 01	Rato 02	Rato 03	Rato 04	Rato 05	Média	DP	CV	IC	
Grupo Água	Dia 0	520	595	650	390	520	544,1429	231,6519	42,57188997	203,0481105	
	Dia 7	555	380	540	400	600	1175,857	373,8699	31,79551733	327,705361	
	Dia 14	225	270	215	190	265	1093,235	678,1314	62,02977865	594,3974865	
	Dia 28	15	295	220	135	230	505	98,55202	19,51525084	86,38306408	
Grupo Lyso-07	Dia 0	285,714	525	740	815	355	544,142	231,651	42,571	203,048	
	Dia 7	1214,28	1660	1165	1230	610	1175,857	373,869	31,795	327,705	
	Dia 14	1782,35	763,235	1870,588	472,058	577,941	1093,235	678,131	62,029	594,397	
	Dia 28	425	565	650	445	440	505	98,552	19,515	86,383	
Grupo Suspensão	Dia 0	557,142	278,571	675	621,428	475	521,428	154,915	29,7097	135,787	
	Dia 7	832,149	725	1164,286	889,285	817,857	885,714	166,522	18,801	145,960	
	Dia 14	2532,35	1080,88	2	864,705	988,235	595,588	1212,353	760,126	62,698	666,268
	Dia 28	535	355	835	315	515	511	205,134	40,144	179,804	
Grupo Lyso-07/Pio	Dia 0	595	530	555	605	630	583	40,093	6,877	35,142	
	Dia 7	385	380	710	490	335	460	150,872	32,798	132,243	
	Dia 14	185	215	255	180	160	199	36,979	18,582	32,413	
	Dia 28	180	255	360	230	285	262	66,951	25,554	58,684	

ANEXO IV - Valores individuais do estudo de farmacocinética

Parâmetro	Animal 1	Animal 2	Animal 3	Animal 4	Animal 5	Média	Unidades
β	0,00718	0,00346	0,00444	0,00671	0,00520	0,00499	min-1
t_{1/2β}	96,5181	200,289	156,0811	103,2787	133,2692	138,8778	min
α	0,039	0,033	0,06	0,091	0,039	0,0524	min-1
t_{1/2α}	17,76923	21	11,55	7,615385	17,76923	15,14077	min
ASC₀₋₆	72,05652	106,1775	72,24175	55,03917	170,4001	93,25077	µg/ml.min
ASC_{0-inf}	84,4371	131,2092	88,3417	62,9212	191,7276	108,5087	µg/ml.min
r áreas	85,3376	80,9223	81,7754	87,4731	88,8762	85,9385	%
Cl	42,63530	27,43709	40,75087	57,21440	18,77664	33,17705	ml/min*kg
Vd	5938,065	7929,795	9178,124	8526,736	3610,893	6648,707	ml/kg