

Universidade Estadual Paulista

Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Campus Araraquara

**Farmacocinética pré-clínica do hidroximetilnitrofural
(NFOH) - potencial pró-fármaco antichagásico.**

Marco Antonio Ferraz Nogueira Filho

Araraquara

2013

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

FARMACOCINÉTICA PRÉ-CLÍNICA DO HIDROXIMETILNITROFURAL
(NFOH) – POTENCIAL PRÓ-FÁRMACO ANTICHAGÁSICO

MARCO ANTONIO FERRAZ NOGUEIRA FILHO

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

ORIENTADOR: Profa. Dr. Rosângela Gonçalves Peccinini

ARARAQUARA - SP

2013

Ficha Catalográfica

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

N778f Nogueira Filho, Marco Antonio Ferraz
Farmacocinética pré-clínica do hidroximetilnitrofural: potencial pró-
fármaco antichagásico / Marco Antonio Ferraz Nogueira Filho. –
Araraquara, 2013
76 f.

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

Orientador: Rosângela Gonçalves Peccinini

1. Doença de Chagas. 2. Farmacocinética pré-clínica. 3.
Hidroximetilnitrofural. 4. Pró-fármaco. 5. Nitrofural. I. Peccinini, Rosângela
Gonçalves, orient. II. Título.

CAPES: 40300005

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos os amigos do grupo que fizeram parte do estudo, me ajudando de diversas formas a concluir esse trabalho.

Elias, Michel, Marcelo e Diego pela ajuda em incontáveis noites atravessadas por experimentos na faculdade.

Kelly, pela paciência e ajuda inestimáveis nas horas em que eu mais precisei.

À minha orientadora, Rosângela Gonçalves Peccinini por todo apoio e paciência dirigidos a mim durante todo o decorrer do projeto, antes e após a realização do mesmo. Além da orientação, as lições que me foram passadas em todos os campos da farmacocinética e da vida. Sem essa orientação seria impossível a realização desse trabalho tão longo e cheio de percalços e intempéries.

Obrigado a todos que fizeram parte dessa grande empreitada por toda a sorte de auxílio fornecido.

RESUMO

O pró-fármaco hidroximetilnitrofural (NFOH) apresenta atividade antichagásica com grande diminuição da toxicidade e maior atividade contra formas amastigotas do *T. cruzi* quando comparadas ao seu fármaco matriz nitrofural (NF). Essas vantagens tornam o pró-fármaco uma possível alternativa terapêutica tanto para o tratamento da fase aguda, quanto da fase crônica da doença de Chagas. Nesse trabalho foi investigado o perfil farmacocinético do NFOH em modelo animal não roedor, estudo necessário para a continuidade do desenvolvimento do pró-fármaco. O NF foi administrado por via intravenosa e oral nas doses de 6,35 e 63,5 mg/kg, respectivamente, e o NFOH 8,05 e 80,5 mg/kg respectivamente; em coelhos albinos (n=20). Após a administração foram realizadas coletas seriadas de sangue dos animais por punção venosa. As amostras foram processadas e analisadas por método bioanalítico validado, utilizando-se um sistema MS. O sistema operou em modos positivo e negativo para as leituras dos compostos - NF e NFOH- e do padrão interno (diclofenaco 5ug/mL em metanol), sob eluição de fase móvel composta por água:metanol (50:50). As médias dos parâmetros farmacocinéticos foram calculadas pelas curvas de concentração plasmática *versus* tempo e comparadas pelo teste de Mann-Whitney ($p < 0,05$). O NF apresentou biodisponibilidade oral de 114,97% no modelo animal e na administração oral este composto apresentou meia-vida de eliminação de 276,09 minutos, estatisticamente diferente da meia vida apresentada na administração intravenosa (17,32 minutos). A administração do NFOH permitiu o cálculo dos parâmetros farmacocinéticos tanto do pró-fármaco quanto do NF liberado pelo mesmo. O perfil farmacocinético do NF administrado comparado ao do NF obtido do pró-fármaco não foi estatisticamente diferente. A biodisponibilidade oral relativa do NF a partir do pró-fármaco administrado foi de 60,1%

Palavras-chave: Doença de Chagas, farmacocinética pré-clínica hidroximetilnitrofural, pró-fármaco, nitrofural.

ABSTRACT

The prodrug hydroxymethylnitrofurzone (NFOH) presents antichagasic activity with greatly reduced toxicity compared to its drug matrix nitrofurazone (NF). Besides these new characteristics, the prodrug was more active against the parasite *T. cruzi* amastigotes. These advantages make the prodrug a possible therapeutic alternative for the treatment of both acute and the chronic phase of Chagas disease. Male albino rabbits (n=20) were divided into four groups and subjected to single administration of NF and NFOH. NF was administered intravenously and orally in doses of 6.35 and 63.5 mg / kg respectively, and NFOH, in doses 8.05 and 80.5 mg / kg respectively. After administration, serial blood samples were collected by venipuncture. The samples were processed and the final product was analyzed by MS. The system operated in positive and negative modes for the determination of compounds and internal standard, under elution of the mobile phase 50:50 water: methanol. The NF presented an oral bioavailability of 114.97% in the albino rabbits and oral administration showed half-life of 276.09 minutes due to the absorption process against 17.32 obtained in the intravenous administration. The administration of NFOH allowed the calculation of pharmacokinetic parameters of the prodrug, and the NF obtained from NFOH administration. Comparing the behavior of NF administered orally and obtained from the prodrug was not evidenced significant changes in the pharmacokinetic profiles. The relative oral bioavailability of NF obtained from the NFOH was 60,1%.

Keywords: Chagas disease, pharmacokinetics, preclinical, hydroxymethylnitrofurazone, prodrug, nitrofurazone.

LISTA DE ABREVIATURAS

ANVISA: Agência Nacional de Vigilância Sanitária

ASC0-t : área sob a curva de 0 a um tempo definido t

ASC0- ∞ área sob a curva de 0 ao infinito

Cl: Clearance

CLAE: cromatografia líquida de alta eficiência

Cp: concentração plasmática

CQ: controle de qualidade

CQA: controle de qualidade de concentração alta

CQB: controle de qualidade de concentração baixa

CQM: concentração de qualidade de concentração média

DMSO: dimetilsulfóxido

DPR: desvio padrão relativo

FDA: Food and Drug Administration

Foral: biodisponibilidade oral

IV: intravenoso

Kel, K: constante de eliminação

LCMS/MS: cromatografia líquida – espectrometria de massas/espectrometria de massas

LD: limite de detecção

LIQ: limite inferior de quantificação

NF: nitrofural

NFOH: hidroximetilnitrofural

Rarea: relação entre áreas sob a curva

$T_{1/2}$: meia-vida de eliminação

Vd: volume de distribuição

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Sistema de classificação biofarmacêutica

Figura 2: Curva de calibração do método para NFOH

Figura 3: Curva de calibração do método para NF

Figura 4: Cromatograma de NF

Figura 5: Cromatograma de NFOH

Figura 6: Cromatograma de Diclofenaco (padrão interno)

Figura 7: Curva $C_p \times t$ média de NF intravenoso

Figura 8: Curva $C_p \times t$ média de NF oral

Figura 9: Perfil farmacocinético médio NFOH oral

Figura 10: Perfil farmacocinético dos animais grupo NFOH intravenoso

Figura 11: Perfil farmacocinético de NF oral e NF obtido de NFOH oral

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Características físico-químicas do NF e NFOH

Tabela 2: Transição massa/carga dos compostos do estudo

Tabela 3: Concentração das soluções de NFOH utilizadas

Tabela 4: Concentração das soluções de NF utilizadas

Tabela 5: Média das concentrações experimentais da curva de calibração do NFOH

Tabela 6: Média das concentrações experimentais da curva de calibração do NF

Tabela 7: Precisão e exatidão do NFOH

Tabela 8: Precisão e exatidão do NF

Tabela 9: Estabilidade do NFOH

Tabela 10: Estabilidade do NF

Tabela 11: Média dos parâmetros farmacocinéticos de NF oral e IV

Tabela 12: Média dos parâmetros farmacocinéticos de NFOH oral

Tabela 13: Parâmetros farmacocinéticos médios de NF administrado e NF obtido de NFOH

Tabela 14: Parâmetros farmacocinéticos de NFOH em coelhos albinos e ratos wistar

Tabela 15: Parâmetros farmacocinéticos de NF em coelhos albinos e ratos wistar

Tabela 16: Parâmetros farmacocinéticos de NF obtido de NFOH em coelhos albinos e ratos wistar

Sumário

1. INTRODUÇÃO	9
2. Revisão Bibliográfica	13
2.1 - Ensaios pré-clínicos no desenvolvimento de novos fármacos.....	13
2.2 -Realidade terapêutica contra Chagas e novas perspectivas.....	16
2.3 - Hidroximetilnitrofurál– pró-fármaco de nitrofurál	19
2.4 –Impacto das características físico-químicas e da fase biofarmacêutica sobre o desenvolvimento de novos fármacos	23
3. Objetivos	32
4. Justificativa	33
5. Materiais e métodos	34
5.1 Material	34
5.1.1 Matérias primas, reagentes e solventes	34
5.1.2 Equipamentos	34
5.2 Solubilização dos produtos para administração no modelo animal	35
5.3 Metodologia analítica.....	35
5.3.1 Equipamentos e sistema cromatográfico	35
5.3.2 Processamento da amostra biológica	36
5.3.3 Validação	37
5.3.3.1 Linearidade.....	37
5.3.3.2 Limite inferior de quantificação (LIQ)	37
5.3.3.3 Precisão e exatidão	38
5.3.3.4 Limite de detecção (LD).....	38
5.3.3.5 Recuperação.....	38
5.3.3.6 Estabilidade	38
5.3.4 Análise dos resultados da validação	39
5.4 Perfil Farmacocinético.....	39
5.4.1 Animais.....	39
5.4.2 Protocolo experimental.....	40
5.4.3 Grupo Farmacocinética 1 e 2	40
5.4.4 Grupo Farmacocinética 3 e 4	41
5.4.5 Análise farmacocinética	41
5.5 Análise estatística.....	43
6 - Resultados e discussão.....	44

6.1. Solubilização dos produtos para administração no modelo animal	44
6.1 Validação do método bioanalítico	45
6.1.2 Curva analítica e linearidade	45
6.1.3 Precisão e exatidão	47
6.1.4 Limite de detecção	50
6.1.5 Supressão de Ionização	50
6.1.6 Estabilidade	52
6.2 Análise Farmacocinética.....	53
7. Conclusões.....	69
8. BIBLIOGRAFIA	70
9 . ANEXOS.....	76

1. INTRODUÇÃO

A doença de Chagas ou Tripanossomíase Americana é uma enfermidade que está presente em 21 países da América latina (RIVAROLA *et al.*, 2001) e é causada pelo protozoário flagelado *Trypanosoma cruzi*. Sua transmissão é realizada por insetos da família Reduviidae, incluindo as espécies *Panstrongilus megistus*, *Rhodnius prolixus* e *Triatoma infestans*. Estima-se que 15 a 16 milhões de pessoas estão atualmente infectadas pelo *T. cruzi* na América latina e 75 a 90 milhões de pessoas estejam expostas à infecção (COURA e DIAS, 2010). A área endêmica se estende do sul dos Estados Unidos à Argentina.

A infecção pelos parasitas se dá quando o inseto da família Reduviidae os elimina viabilizando o contato com a mucosa ou pele lesionada do vertebrado. O triatomíneo, enquanto se alimenta do sangue do vertebrado, deposita as fezes com o parasita na pele. A picada do inseto provoca irritação, o que facilita a entrada dos parasitas no organismo quando as fezes entram em contato com essa lesão.

Nos países em desenvolvimento, devido às baixas condições socioeconômicas e deficiências no sistema de educação e saúde, é maior a incidência de doenças parasitárias. Outros fatores que contribuem para a maior incidência da doença são a alta densidade populacional, controle inadequado dos vetores e reservatórios, aumento da migração populacional e principalmente a falta de fármacos eficazes para o tratamento (TRACY & WEBSTER Jr, 2001).

Apesar do grande número de infectados e da gravidade da parasitose, desde a década de 70 até os dias de hoje, apenas dois fármacos estão disponíveis no mercado mundial para o tratamento da doença de Chagas: o nifurtimox (Lampit®, Bayer) e o benznidazol (Radanil®, Rochagan®, Roche) (ANANDAN, 1997; TRACY, 2001; COURA e CASTRO, 2002; OTERO, 2006.). Entretanto, a eficácia desses fármacos é reconhecida apenas na fase aguda e no início da fase crônica em crianças menores de 15 anos. Sua eficácia não abrange todas as cepas presentes em regiões endêmicas e, além disso, esses fármacos não são comercializados na totalidade dessas regiões (REITHINGER, 2011).

O desenvolvimento de novas alternativas terapêuticas para o tratamento da Tripanossomíase tem sido tema de diversos grupos de pesquisa, já que em 2007 a OMS anunciou um projeto para a renovação da estratégia para o combate desta doença com objetivo de erradicá-la das Américas.

Os processos de modificação molecular ocupam um importante lugar na pesquisa e desenvolvimento de novos fármacos porque são alternativas simples e racionais voltadas ao aprimoramento de fármacos já existentes e utilizados na terapêutica.

Entre os processos de modificação molecular a latenciação merece destaque, já que permite a mudança de características desfavoráveis ao uso do fármaco. Esse procedimento tem como objetivo tornar o fármaco ativo em uma forma latente, que no interior do organismo será liberado por meio de ação química ou enzimática. Esse procedimento de modificação molecular tem sido muito utilizado na busca de novos agentes sintetizados para patologias específicas. Dessa forma a latenciação permite, mediante escolha de transportadores adequados, via de regra desprovidos de atividade biológica, o melhoramento das propriedades do fármaco (CHUNG et al,1999).

O nitrofural (NF) foi amplamente utilizado durante a II Guerra Mundial, devido ao seu amplo espectro de atividade antibacteriana, para o tratamento de feridos por queimaduras (CRENSHAW *et al.*, 1976). Andrade e Brener observaram, em 1969, que o NF era dotado de atividade tripanomicida, tornando o *T. cruzi* inativo.

Henderson e colaboradores (1988) constataram a inibição da tripanotionaredutase pela classe dos nitrofuranos, incluindo o NF. Em estudos posteriores, realizados por Gonçalves (1994), foi constatada a potencialização da ação do NF quando este é associado à primaquina.

Diante destes achados, Chung *et al.* (1996) sintetizaram pró-fármacos recíprocos de derivados do NF através do processo de latenciação. Através de estudos *in vitro* foram evidenciados aspectos favoráveis de atividade e toxicidade para um intermediário desta síntese - o hidroximetilnitrofural (NFOH) - tornando-o um produto promissor. Características farmacocinéticas favoráveis para o mesmo composto administrado em ratos wistar foram observadas por Serafim (2008).

O perfil farmacocinético desfavorável e alta toxicidade em animais corresponde à metade dos problemas relacionados à falha no desenvolvimento de fármacos, sendo ideal que ensaios de farmacocinética e toxicidade sejam realizados nos estágios iniciais de desenvolvimento do produto (WATERBEEMD, 2003).

O objetivo dos estudos pré-clínicos é a identificação de candidatos a fármacos adequados para testes clínicos e a integração bem sucedida de todas as etapas dessa fase - pré-clínica - pode sustentar projeções de regimes posológicos para humanos com maior segurança. Conceitos obtidos a partir estudos de farmacocinética e de eficácia pré-clínicas podem, dessa forma, prover um panorama que permite identificar um candidato potencial para futuros estudos clínicos (AMORE *et al.*, 2010). Assim, uma estratégia para melhorar a efetividade da descoberta de novos produtos é obter dados farmacocinéticos pré-clínicos mais rapidamente possível, de forma a avaliar mais precisamente o potencial tanto para a eficácia quanto da segurança do candidato (WALKER, 2004).

As fases do desenvolvimento de novos produtos farmacêuticos envolvem a investigação de suas características de atividade, toxicidade e perfil farmacocinético em pelo menos dois modelos animais anteriormente à sua aplicação em ensaios clínicos (FDA, 1997).

O FDA preconiza o uso de uma espécie de roedores e uma de não roedores para a avaliação de novos produtos farmacêuticos considerando que um fármaco pode afetar uma espécie de maneira diferente da outra, seja com relação ao perfil farmacocinético, farmacodinâmico ou à toxicidade. A observação de diferentes efeitos de acordo com o modelo animal estudado evidencia aspectos críticos que podem ser encontrados na espécie humana. O uso de uma espécie roedora e uma espécie não roedora para a realização de estudos pré-clínicos baseia-se na solidez das informações obtidas; com capacidade de prever toxicidade e características inadequadas dos candidatos a fármacos quando introduzidos no organismo humano (DIXIT, 2007).

No presente projeto, o objetivo foi obter informações através de experimentos *in vivo* sobre o comportamento do candidato à pró-fármaco dando continuidade ao estudo já iniciado por Serafim (2008). O foco central desta investigação foi determinar os seus parâmetros farmacocinéticos em um modelo animal não roedor

(coelhos albinos). Segundo Ramirez (1987) este modelo animal é adequado para estudos relacionados à fase crônica da Doença de Chagas. A investigação do perfil farmacocinético do produto neste modelo proporcionará informações fundamentais ao planejamento de ensaios de eficácia neste modelo, que devem preceder os ensaios clínicos.

2. Revisão Bibliográfica

2.1 - Ensaios pré-clínicos no desenvolvimento de novos fármacos

A introdução de um novo fármaco no mercado envolve uma série de etapas composta de vários elementos e aspectos distintos, que possuem relações de interdependência, de elevado custo financeiro e repleta de riscos. O número de novos fármacos introduzidos na terapêutica de 1999 a 2000 se manteve relativamente constante, enquanto o custo da pesquisa e desenvolvimento elevou-se em quase 2,5 vezes no mesmo período. A chance de sucesso de um novo candidato, passando pelos vários obstáculos do processo de desenvolvimento é de cerca de 10% e, apesar de todos os avanços tecnológicos em outras áreas de pesquisa e desenvolvimento, esse percentual pouco mudou com o passar dos anos (ARMER, 2004).

Estatísticas revelam que a vida média de comercialização de um fármaco tem diminuído drasticamente, e as taxas de problemas relacionados aos novos fármacos tem aumentado substancialmente ao longo da última década (ARMER, 2004). Essa situação projeta um quadro preocupante sobre o futuro dos novos fármacos. Um dos últimos grandes reveses se deu com a retirada do inibidor de COX-2 rofecoxibe (Vioxx®) do mercado, em decorrência do aparecimento de casos de ataques cardíacos durante os testes clínicos de outro inibidor de COX-2, o celecoxibe (Celebrex®) (SINGH, 2006).

A baixa taxa de sucesso dos programas de descoberta e planejamento de fármacos do cenário atual pode ser atribuída a vários fatores, tais como; complexidade das enfermidades atuais e os padrões e cuidados mais rigorosos das diretrizes regulamentares para implantação de novos fármacos no mercado (SINGH, 2006).

A falta de eficácia e toxicidade são consideradas as maiores razões para a falha dos novos fármacos, e a farmacocinética tem grande impacto sobre esses efeitos indesejáveis. Compostos com perfil farmacocinético desejável apresentam maiores probabilidades de eficácia e segurança (SINGH, 2006). A investigação das relações concentração-efeito, de eficácia, segurança e ensaios de farmacocinética é

conduzida em modelos animais com o intuito de prever o cenário clínico para o fármaco. A determinação dos parâmetros farmacocinéticos e a compreensão dos mecanismos biológicos subjacentes a esses importantes parâmetros é de vital importância para fundamentar o planejamento da fase clínica de testes do candidato a fármaco (AMORE,2010).

Dessa maneira, a avaliação da farmacocinética pré-clínica deve ser conduzida da forma mais adequada possível, assegurando que os compostos não falhem na fase de testes clínicos. Estudos de farmacocinética pré-clínica facilitam a eliminação de candidatos de menor potencial, que apresentam falta de atividade ou efeitos indesejáveis e para que os candidatos potencialmente mais eficazes sejam triados de maneira mais específica e direcionada. Levando em conta essa realidade, torna-se obrigatório que os candidatos sejam submetidos a quantos testes de farmacocinética pré-clínica forem possíveis. Esses experimentos proverão, juntamente com estudos metabólicos *in vitro*, indicações precoces de um provável comportamento seguro em seres humanos (SINGH, 2006). Em última análise, as previsões de regime posológico humano resultam de uma variedade de ensaios *in vitro* e *in vivo*.

A seleção de uma concentração alvo apropriada no organismo é fundamental para o sucesso futuro do candidato e, em alguns casos, a aplicação de modelos PK/PD (relação farmacocinética/farmacodinâmica) pode refinar ainda mais a orientação das seleções de concentração alvo.

Os achados pré-clínicos - obtidos em diferentes modelos animais - são necessários para planejar as doses clínicas iniciais, a progressão dessas doses e prever a duração da administração em voluntários saudáveis ou portadores da doença; com o intuito de não provocar ou minimizar possíveis danos a esses voluntários, especialmente quando não há qualquer garantia de benefícios à saúde (LIN,1997).

Dependendo da fase do desenvolvimento, os ensaios pré-clínicos podem ter diferentes objetivos - tais como caracterizar metabólitos, danos específicos, perfil farmacocinético e toxicidade em dose única ou múltipla, entre outros - no entanto, o cerne reside majoritariamente na caracterização da segurança, pré-requisito para a exposição de seres humanos (DIXIT, 2007).

Para alcançar os diferentes objetivos dos ensaios pré-clínicos, o modelo animal relevante é aquele que apresenta características similares ao humano e, preferencialmente, de maior sensibilidade (DIXIT, 2007).

Uma espécie roedora e uma não-roedora são necessárias para a avaliação de pequenas moléculas de fármacos, e isto baseia-se na força combinada já conhecida de duas espécies de mamíferos em prever a toxicidade em humanos.

Embora os *Guidelines* das organizações regulamentadoras proponham a harmonização dos ensaios pré-clínicos, não há definição objetiva do modelo animal ou ensaio específico para cada fármaco, mas apenas sugestões que possam direcionar estes estudos. Sem dúvida, a flexibilidade de planejamento destes ensaios é fundamental, devido à grande variabilidade das características de cada produto em desenvolvimento. Cabe ao pesquisador justificara seleção dos modelos e ensaios a serem utilizados de acordo com o fármaco em desenvolvimento (FDA, 1997).

Os principais critérios para a seleção do modelo animal a ser estudado em comparação ao ser humano são, basicamente, a relevância biológica, relevância farmacodinâmica e de mecanismos de ação do fármaco e a biodisponibilidade e considerações metabólicas (DIXIT, 2007)

Os modelos animais mais utilizados nestes estudos - ratos, camundongos, coelhos, cães, gatos e macacos - compartilham muitas características anatômicas, fisiológicas, patológicas, farmacológicas e bioquímicas com seres humanos. Para cada espécie, em geral, é possível observar determinada característica de maior similaridade ou susceptibilidade comparada aos humanos (DIXIT, 2007).

Apesar dos esforços dos pesquisadores de novos fármacos para desenhar moléculas seletivas e que atinjam apenas o alvo desejado em doenças humanas, pequenas moléculas, dependendo de suas propriedades farmacocinéticas, são muitas vezes não seletivas e, além de atingir o alvo desejado, atingem também alvos indesejados. Portanto, é importante para a avaliação da segurança saber: os efeitos resultante da atividade no alvo desejado, que efeitos estão relacionados com a atividade fora do alvo da molécula, e qual a natureza da relação dose-resposta para os efeitos farmacológicos desejados contra os efeitos secundários indesejados.

Além disso, comparado aos humanos, os animais tendem a depurar os fármacos de forma mais rápida. Exatamente por isso existem cálculos de extrapolação alométrica, que ajustam a dose de forma a compensar o débito cardíaco e velocidade do metabolismo dos diferentes modelos animais para a previsão da dose em humanos.

Apesar dos importantes avanços em sistemas de detecção de efeitos adversos *in vitro*, não se pode ainda considerá-los totalmente confiáveis para prever efeitos adversos em humanos. A complexidade do sistema *in vivo* o torna fundamental para prever riscos potenciais, pois apenas um organismo completo apresenta a dinâmica dos processos fisiológicos, patológicos, farmacológicos e suas complexas interações com os xenobióticos. Essa é a função dos modelos animais nos ensaios preliminares de potenciais agentes terapêuticos de uso humano.

2.2 -Realidade terapêutica contra Chagas e novas perspectivas

Atualmente, somente dois fármacos são utilizados na terapêutica da Doença de Chagas: benznidazol e nifurtimox. Essas duas alternativas terapêuticas apresentam, além de duvidosa efetividade no tratamento da fase crônica da doença de Chagas, muitos efeitos deletérios ao organismo. Estão entre os efeitos indesejáveis: anorexia e perda de peso, náusea e vômitos, excitação nervosa, insônia, depressões, convulsões, vertigens, cefaléias, sonolência, mialgias, artralgias, perda de equilíbrio, desorientação, esquecimento, parestesias, adinamias, neuropatias periféricas, gastralgia, edema de mucosa, intolerância hepática e manifestações cutâneas. Além desses efeitos, sinais de injúria testicular e ovariana foram também reportados no uso dos dois fármacos (CASTRO, 1988). Geralmente, os efeitos deletérios do benznidazol, alternativa terapêutica única no Brasil, são mais pronunciados quando comparados ao Nifurtimox.

Desde 1912, apenas alguns anos após a descoberta da doença de Chagas, inúmeras substâncias foram testadas na tentativa de combate a essa enfermidade. Mayer e Rocha Lima (1912) testaram experimentalmente, porém sem sucesso,

arsênico e fucsina, e posteriormente, ácido tartárico e cloreto de mercúrio (COURA, 2009) que também não apresentaram resultados expressivos nos testes. A partir daí, uma nova busca por substâncias eficazes e de baixo custo no tratamento da Tripanossomíase Americana foi iniciada por vários grupos de pesquisa. De acordo com Raether & Hanel (2003) os resultados mais expressivos obtidos apontam para alguns derivados do 5- e 2-nitroimidazol e do 5-nitrofurano, como o benznidazol, nifurtimox, furazolidona, metronidazol, secnidazol, ornidazol e tinidazol.

Vários grupos de pesquisa tentaram a introdução de fármacos já existentes na terapia contra a doença de Chagas. Um dos exemplos foi o alopurinol, um inibidor da síntese de purinas no humano que, quando testado, apresentou atividade significativa e comparável ao benznidazol e nifurtimox para a fase crônica da doença de Chagas (GALLERANO *et al.*, 1990). Inibidores de topoisomerases II de bactérias ofloxacina, novobiocina e ácido nalidíxico também foram testados contra a doença de Chagas e apresentaram uma inibição na diferenciação e proliferação do parasita *T. cruzi* em culturas axênicas e também em culturas de tecidos contaminados. Apesar dos testes realizados com esses outros fármacos, nenhuma evidência de atividade desses compostos em testes *in vivo* foi demonstrada (PATE, 1986).

A amiodarona, fármaco utilizado na terapêutica como antiarrítmico, também foi testado quanto a sua atividade contra o *T. cruzi*. Veiga-Santos (2012) realizaram o experimento a partir de cultura de células, obtendo-se os parasitas e tratando-os com diferentes concentrações de amiodarona com e sem o antifúngico posaconazol. Os fármacos demonstraram sinergismo na atividade antiparasitária, levando a alterações ultraestruturais do parasita e morte celular. Foram observadas através de microscopia eletrônica alterações no cinetoplasto, inchaço mitocondrial, desorganização do complexo do Golgi e formação de elevado número de vacúolos autofágicos.

Alguns grupos de pesquisa tem como tema a imunização genética contra algumas fases específicas do desenvolvimento do parasita, como a fase tripomastigota, levando a alguns resultados positivos de imunização *in vivo* contra o *T. cruzi* (TEKIEL *et al.*; 2009). Além de imunização genética através de vacinas, também são pesquisados novos alvos terapêuticos de forma que o parasita possa ser eliminado de forma total. Não existem registros mais recentes sobre a evolução

dos estudos com esta vacina. Além desse estudo, novos candidatos à vacina foram testados através de imunização por fragmentos de cDNA sequenciais levando a resultados que necessitam de um estudo mais aprofundado para a aplicação racional desses segmentos gênicos em vacinas para a doença de Chagas.

Alguns estudos demonstram que uma classe de proteínas do *T. cruzi* como as proteinases, que englobam metalo e serina proteases, podem ser um alvo em potencial para o desenho de novos fármacos e alternativas no que se diz respeito ao combate da doença de Chagas. Dentre esses novos alvos terapêuticos protéicos destaca-se a cruzipaina, que já é utilizada como alvo no combate ao parasita (CAZZULO, 2002).

Outra série de produtos que têm sido avaliados *in vitro* quanto à ação antichagásica são os derivados de azasterol. Estes compostos promovem a inibição de uma enzima da biossíntese de ergosterol em fungos, que estão também presentes em grande quantidade na parede celular dos *Trypanosomas* (GIGANTE *et al.*, 2009).

Na síntese de 1H-pirazolo[3,4-b]piridina, Dias & Santos (2007) obtiveram uma extensa série de derivados e intermediários de reação para os quais avaliou-se a relação estrutura/atividade antichagásica. Nesse estudo verificou-se que quanto menor o coeficiente de partição óleo/água (logP), menor a atividade biológica apresentada pelo produto, com conseqüente aumento da concentração inibitória média. O derivado mais ativo da série apresentava um logP de 5,37 (DIAS & SANTOS, 2007).

Em 2005, um grupo de pesquisa também iniciou estudos com um inibidor de farnesiltransferases humanas chamado de tipifarnib (R115777), o qual se mostrou um inibidor do crescimento do parasita *T. cruzi* altamente potente. Nesse estudo, foram realizados experimentos de ligação do fármaco a proteínas humanas e do parasita. Investigações relacionadas a substituições na estrutura molecular do tipifarnib foram realizadas com o intuito de evidenciar as relações estrutura/atividade e, assim otimizar o planejamento de novos fármacos (HUCKE *et al.*, 2005).

A pesquisa e desenvolvimento de novas alternativas terapêuticas para o tratamento da tripanossomíase americana é de extrema importância já que dentre os

fármacos que apresentaram resultados positivos, apenas o nifurtimox e o benznidazol ainda são utilizados na terapêutica. Vale ainda ressaltar que no nosso país, apenas o benznidazol é distribuído pelo governo e, por suas características de toxicidade já conhecidas, torna ainda mais urgente a busca por novas alternativas terapêuticas contra a doença de Chagas.

Levando-se em conta a atual situação das alternativas terapêuticas antichagásicas, em 1996, Chung e colaboradores sintetizaram pró-fármacos recíprocos do NF, obtendo um intermediário de reação das bases de Mannich ainda mais ativo contra a doença de Chagas que seu fármaco matriz, e mais ativo também que o benznidazol, já utilizado na terapêutica atual.

2.3 - Hidroximetilnitrofural– pró-fármaco de nitrofural

Diferentes abordagens para avaliação do pró-fármaco de nitrofural - hidroximetilnitrofural (NFOH) - sintetizado por Chung e colaboradores, tem sido realizadas para continuidade do desenvolvimento da potencial alternativa antichagásica.

Algumas características físico-químicas comparados ao seu protótipo NF são apresentadas na tabela 1 (SERAFIM, 2008).

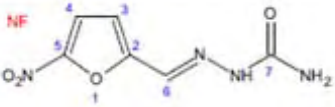
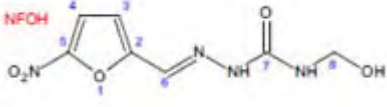
Estrutura molecular		
Nomenclatura química	5-nitro-2-furaldeído semicarbazona	5-nitro-2-furaldeído N-(hirdoximetil)semicarbazona
Peso Molecular	198,14	228,29
Fórmula Molecular	C ₆ H ₆ N ₄ O ₄	C ₇ H ₈ N ₄ O ₅
Descrição	Pó amarelo	Pó amarelo castanho
Faixa de decomposição	236-240°C	152-156°C
Estabilidade	Fotossensível	Fotossensível

Tabela 1. Características físico-químicas de NF e NFOH

O pró-fármaco foi testado em culturas do parasita *T.cruzi* e teve uma atividade antichagásica superior ao seu fármaco matriz, o NF. Nesse experimento, a atividade do NFOH a uma concentração de 5µM se equiparou ao NF em uma concentração de 10µM em culturas de tripomastigotas e amastigotas de *T.cruzi* (CHUNG, 2003).

Estudos preliminares de segurança foram também realizados para se mensurar potenciais riscos à saúde em futuros usos do novo pró-fármaco NFOH. Nesse âmbito, foi avaliada a dose letal média em camundongos swiss do produto administrado pela via intraperitoneal e avaliado o seu potencial mutagênico *in vitro*. O teste de mutagenicidade (teste de Ames) foi realizado utilizando-se *Salmonella typhimurium* (cepa TA98). O teste de Ames suporta a hipótese de que o pró-fármaco possui uma característica menos mutagênica à célula, já que o número de revertentes obtidos com a adição de NFOH é menor que seu fármaco matriz (GUIDO, 2001).

Outro resultado expressivo foi a diminuição da toxicidade aguda do fármaco traduzida pela dose letal média apresentada pelo pró-fármaco (DL50 > 2000 mg/kg), comparável à DL50 do benznidazol (SERAFIG, 2008).’ Esse valor *per se* já remete boas perspectivas para o uso do NFOH, mas, além disso, o pró-fármaco apresentou uma dose letal muito maior quando comparada ao seu fármaco matriz, o NF, que

possui dose letal média de 197,2 mg/kg (CHUNG, 2003). Com essas características, o NFOH pode ser considerado um composto promissor.

Serafim (2008) realizou ensaios de conversão *in vitro* e *ex vivo* do NFOH. Na avaliação *in vitro*, em cerca de 2 horas, 50% do NFOH foi convertido em seu fármaco matriz sob pH 1,2 - que mimetiza o ambiente estomacal –e conversão plena em 48 horas. Em pH 7,4 - o qual mimetiza o ambiente intestinal e líquidos extracelulares - observa-se uma grande estabilidade do pró-fármaco, que apresenta 50% de conversão somente após 120 h. Estes resultados demonstram estabilidade suficiente do composto nos diferentes pHs, aos quais será submetido quando administrado por via oral. Sabendo que o movimento motor migrante do trato gastrointestinal não permitirá a permanência do produto por um tempo superior à duas horas é possível a administração do produto por esta via sem que ocorra degradação anterior à sua absorção. Assim, a via oral pode ser utilizada para a avaliação de perfis farmacocinéticos sem a implicação de se realizar estudos com confecção de pré-formulações, garantindo assim resultados mais diretos, sem interferência de fatores relacionados à co-produtos presentes na formulação.

Já no ensaio *ex vivo* observou-se 50% de conversão do pró-fármaco somente após 24 horas, demonstrando a estabilidade do NFOH frente à ação de enzimas advindas do plasma (SERAFIM, 2008).

A avaliação da conversão do produto em modelos animais – estudo do perfil farmacocinético – permite a obtenção de parâmetros fundamentais para a construção e fundamentação de regimes posológicos, elucidação de eventuais fenômenos de saturação do sistema biológico ou farmacocinética não linear, além da avaliação de efeitos adversos e tóxicos.

No estudo realizado por Serafim (2008) foi também avaliado o perfil farmacocinético do NFOH administrado (200 mg/kg) em dose única via gavagem em ratos wistar, comparando-se ao perfil do fármaco matriz, NF, administrado sob as mesmas condições.

No estudo, observou-se um menor T_{máx} (tempo que a concentração atinge o ponto máximo) para o NFOH, levando o autor a conclusão de que esse evento foi consequência da maior velocidade de absorção (em cerca de quatro vezes) quando

comparado ao NF. O fármaco NFOH possui um coeficiente de partição óleo / água (logP) inferior a de seu fármaco matriz, o que traduz-se em um aumento da hidrossolubilidade em relação ao seu precursor, porém o pró-fármaco ainda apresenta a classificação 'praticamente insolúvel' em água, já que possui solubilidade de 1 : 10.000 partes, não sendo possível a administração veiculada em água. Embora se observe diferença na velocidade, é provável que a contribuição do logP seja mínima para este composto com relação ao processo de absorção.

O $C_{m\acute{a}x}$ de NFOH mostra um valor menor que seu fármaco matriz, o que levou o autor a concluir que a diferença na concentração máxima se deu pela diferença de volume de distribuição (V_d) entre eles (337,5 L/kg vs 17,64 L/kg). Além disso, a concentração plasmática do NF formado a partir da administração de NFOH foi mantida em cerca de quatro vezes menor quando comparada às concentrações plasmáticas atingidas na administração de NF sob doses equivalentes.

Além desses resultados da verificação da conversão *in vivo* do NFOH e NF em ratos wistar, o produto não pode ser caracterizado apenas como um pró-fármaco simples. Os trabalhos de Barbosa *et al.* (2007) demonstraram que o NFOH apresenta atividade inibitória do processamento de RNA mensageiro de *T.cruzi* superior ao nitrofurais, em 20 minutos de teste. Esse tempo é insuficiente para que o NFOH se converta totalmente em NF, segundo os experimentos de Serafim (2008), o que leva ao surgimento da hipótese de que o pró-fármaco pode estar agindo tanto *per se* quanto pela ação do seu metabólito ativo, e fármaco precursor, NF. O NFOH então, por essa hipótese seria classificado como um composto de atividade mista – análogo e pró-fármaco.

Experimentos de cardiotoxicidade - resultados ainda não publicados - foram realizados no nosso grupo de pesquisa, administrando-se cronicamente o NFOH em coelhos albinos e seguindo o tratamento proposto por Ferreira (1961), com doses extrapoladas alometricamente. Além disso, foram analisados os biomarcadores hepáticos: alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST), bilirrubina e gama glutamiltransferase (GGT).

As administrações foram feitas em dimetilsulfóxido (DMSO), duas vezes ao dia durante 24 dias sendo 12 dias 80,5mg/kg e 12 dias 64 mg/kg. Como controle, foi administrado o DMSO no mesmo volume utilizado nas administrações dos fármacos.

Como se pode observar, houve uma redução significativa na concentração sérica tanto de ALT quanto de AST nos coelhos, porém, os resultados obtidos se encontram ainda dentro dos valores normais encontrados na literatura para essa espécie animal. A gama glutamiltransferase não apresentou diferença estatisticamente significativa quando comparada ao grupo controle.

Além dos estudos de farmacocinética em ratos wistar (espécie roedora), o desenvolvimento de um novo produto requer a avaliação em outro modelo animal mamífero não roedor previamente ao planejamento de ensaios clínicos, conforme discutido anteriormente (FDA, 1997). No presente estudo, a administração e análise do perfil farmacocinético em coelhos albinos do candidato à pró-fármaco antichagásico foram realizados.

2.4 –Impacto das características físico-químicas e da fase biofarmacêutica sobre o desenvolvimento de novos fármacos

O desenvolvimento de novos compostos aplicáveis na terapêutica envolve uma complexa cadeia de etapas de abordagem multidisciplinar. Nas últimas décadas houve grande incremento no desenvolvimento de tecnologias capazes de prever relações estrutura/atividade de compostos, particularmente aquelas *in silico* (VAN de WATERBEEMD, 2003). A partir da síntese e otimização desses novos compostos ocorre a demanda dos ensaios que evidenciem a sua atividade, seja por modelos *in vitro* ou *in vivo*. Ocorre que essas investigações necessitam da incorporação dos compostos em ambientes adequados à sistemática da investigação e, portanto, do conhecimento de vários aspectos sobre o seu comportamento físico e químico. Assim, merece destaque no âmbito da busca de novos agentes terapêuticos a investigação de suas propriedades físico-químicas e o planejamento de pré-formulações biocompatíveis (BUGGINS, 2007; NEERVANNAN,2006).

O estudo da fase biofarmacêutica é uma das maiores e mais importantes áreas das Ciências Farmacêuticas, e se preocupa com as propriedades físico-químicas de um determinado fármaco, dosagem e respostas clínicas que são

observadas logo após a sua administração (PACHANGNULA, 2000). A fase biofarmacêutica abrange todos os fenômenos que precedem a absorção do fármaco, e depende de vários fatores como características da formulação, teor e a velocidade de liberação do fármaco a partir de sua forma farmacêutica. A disponibilidade do fármaco para absorção pelo organismo é o resultado dessa fase (BANKER& RHODES, 2002).

O advento da química combinatória elevou o número de novas entidades químicas sintetizadas com maior efetividade com relação à atividade biológica prevista e menor demanda de tempo (WATERBEEMD,2003).Coincidentemente essas tecnologias levaram a um aumento da síntese de moléculas de baixa hidrossolubilidade, característica que, em geral, determina problemas de absorção do fármaco na administração oral em decorrência de características físico químicas desfavoráveis (NEERVANNAN,2006), o que torna a confecção do produto farmacêutico mais complexa. Essa situação requer um esforço grande para as correções necessárias através de recursos farmacotécnicos.

O conhecimento das características físico-químicas dos candidatos à fármacos, da fisiologia do trato gastrointestinal, e o emprego correto de excipientes com ênfase nos bioativos, atualmente são pré-requisitos para uma formulação bem-sucedida (O'DRISCOLL, 2008).

A via enteral é de uso mais frequente e mais almejada para a maioria dos produtos em desenvolvimento, considerando a facilidade de administração e o menor risco quando comparada à outras como, por exemplo, as parenterais (AMIDON, 1995).

O mecanismo de absorção de fármacos no organismo 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. Neste tipo de transposição de membrana – difusão passiva – a velocidade de absorção tende obedecer a uma cinética linear.

Alguns fármacos apresentam processo de absorção especializado – por exemplo: amoxicilina, gabapentina, metotrexato – que necessita 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 (BANKER & RHODES, 2002).

Por outro lado, existem sistemas especializados para a externalização de substâncias como, por exemplo, a glicoproteína P(P-gp) e a proteína multifármaco resistente (MDR). São substratos destas proteínas: antitumorais como as antraciclinas, taxol e vinblastina; cardioativos como a digoxina, quinidina e verapamil; imunossupressores como a ciclosporina e tacrolimus; e outros como a eritromicina e quinina (BANKER & RHODES, 2002)..

Assim, a eficiência e velocidade da absorção de um produto dependem da via de introdução e da apresentação deste produto e, então, no caso dos medicamentos, é susceptível às suas características biofarmacêuticas. Por exemplo, sabe-se que as soluções orais tendem a ser absorvidas mais rapidamente do que as apresentações sólidas – cápsulas ou comprimidos – porque no primeiro não há necessidade de desintegração ou dissolução do fármaco para que ele entre em contato com a membrana biológica e então seja absorvido. Assim, o tipo de forma farmacêutica adotada para um medicamento possibilita a obtenção de velocidades diferentes de liberação com conseqüências sobre a dissolução (BANKER & RHODES, 2002).

Após a liberação do fármaco da forma farmacêutica, para que o produto seja absorvido, é necessário que ele apresente solubilidade no meio gástrico – na administração oral – e também seja permeável à membrana.

A solubilidade de um composto está relacionada ao seu coeficiente de partição óleo/água (P), definido como a relação das concentrações da substância em óleo e em água.

Uma alta hidrossolubilidade deve determinar melhor solubilização do composto no meio estomacal ou duodenal, no entanto esta mesma característica se opõe a permeação da substância através da membrana pelo processo de difusão passiva, dificultando sua absorção. Os valores de P guardam estreita relação com o tamanho da cadeia de carbonos presente na molécula, uma vez que o aumento desta cadeia determina menor polaridade e, então, maior solubilidade da substância na fase oleosa.

A permeabilidade de um composto através da membrana biológica depende do seu coeficiente de partição e da presença de radicais em sua estrutura que possuam a capacidade de formação de ligações de hidrogênio com a biofase aquosa. A presença de grupamentos hidroxila na molécula, por exemplo, leva a uma diminuição da permeabilidade dos compostos devido à capacidade deste grupo químico formar ligações de hidrogênio.

O grau de ionização de uma molécula possui influência sobre a sua absorção porque o coeficiente de partição da forma ionizada é sempre inferior. Desta forma, o pH do meio terá importante papel na ocorrência das formas molecular e ionizada, e então no processo de absorção. Desta forma, o pH mais propício para a disponibilização da forma molecular de fármacos ácidos é o estomacal, e o pH mais adequado para a forma molecular de fármacos básicos é o intestinal. No entanto, apesar destas questões, a região duodenal é considerada o principal sítio de absorção de fármacos em decorrência de sua extensa superfície de contato e rica vascularização.

Considerando a importância das características solubilidade e permeabilidade na absorção oral de fármacos, foi proposta a Classificação Biofarmacêutica (AMIDON, 1995). Nesta classificação os fármacos foram agregados segundo sua solubilidade em água e sua permeabilidade, em geral expressa pelo logP, logD ou através de ensaios de permeabilidade *in situ*. A permeabilidade também pode ser expressa pela taxa de metabolismo majoritário no organismo. Considera-se que o fármaco possui alta solubilidade quando sua maior dose administrada é solúvel em volume igual ou menor que 250 mL de meio aquoso em uma faixa de pH 1 a 7,5 (BANKER & RHODES, 2002)..

A figura 1 é um esquema da classificação biofarmacêutica proposta por Amidon (1995) como forma de prever o comportamento do fármaco no organismo a partir de suas características de solubilidade e permeabilidade.

	Alta Solubilidade	Baixa Solubilidade
Metabolismo Extenso	Classe 1 Alta solubilidade Metabolismo Extenso	Classe 2 Baixa solubilidade Metabolismo Extenso
Baixo Metabolismo	Classe 3 Alta solubilidade Baixo metabolismo	Classe 4 Baixa solubilidade Baixo Metabolismo

Figura 1. Sistema de classificação biofarmacêutica e de disposição de fármacos (BDDCS) onde a rota majoritária de eliminação (metabolizado *versus* não-modificado) funciona como critério de permeabilidade (O'Driscoll, 2008)

Fármacos com baixa solubilidade em fluidos biológicos são pouco absorvidos no trato digestório em decorrência da dificuldade de formação de uma dispersão molecular na biofase de absorção, que permita soluções de continuidade com as membranas biológicas (O'DRISCOLL, 2008).

Os fármacos da classe I são absorvidos rapidamente, uma vez que possuem alta solubilidade e permeabilidade. O fator limitante da absorção desta classe de fármacos é basicamente a dissolução do fármaco no meio e o tempo de esvaziamento gástrico para que o produto chegue mais rapidamente ao seu principal sítio de absorção, o intestino delgado. A presença de alimentos pode retardar a absorção desta classe de fármacos por atraso no esvaziamento gástrico, porém não é esperado que ocorra uma diminuição na extensão de absorção.

Para os fármacos da classe II, que possuem baixa solubilidade e alta permeabilidade, o fator limitante da absorção é a taxa de dissolução da forma farmacêutica e espera-se menor influência do sistema biológico na absorção. Porém, qualquer fator que altere a solubilidade do fármaco terá impacto sobre a

absorção, como por exemplo, o pH do meio, volume e viscosidade do fluido do trato gastrointestinal e secreção de bile. Vários fármacos desta classe têm sua absorção aumentada quando administrados com alimentos ricos em gordura, que estimulam a secreção de bile e diminuem a velocidade de esvaziamento gástrico.

Na classe III temos fármacos de alta solubilidade e baixa permeabilidade, sendo esta última o principal fator limitante da absorção. Assim, as variações de absorção encontradas para essa classe serão resultados das variações do trânsito intestinal, do conteúdo luminal e permeabilidade de membrana. A presença de alimentos terá influência na absorção se alterar a permeabilidade do composto à membrana. Estes fármacos normalmente têm sítios de absorção duodenais bem definidos e como consequência, a presença de alimento pode criar uma barreira física para o fármaco e então a diminuição do processo de absorção.

Para os fármacos da classe IV, com baixa solubilidade e baixa permeabilidade, há interferência da formulação e dos processos fisiológicos na absorção do fármaco e em geral apresentam baixa biodisponibilidade oral.

De maneira geral, a administração de fármacos pela via oral deve ser realizada com a ingestão concomitante de um volume mínimo de água de 150 mL de tal forma a garantir a movimentação do produto através do esôfago e para viabilizar a desintegração e dissolução da forma farmacêutica sólida.

A ingestão simultânea de alimentos deve ser realizada para aqueles fármacos irritantes do trato gastrointestinal – como, por exemplo, fenilbutazona, diclofenaco e nitrofurantoína – para aqueles fármacos que possuem transporte especializado – riboflavina e ácido ascórbico – e para aqueles cuja absorção é aumentada em decorrência da emissão de secreções do trato gastrointestinal, como é o caso da griseofulvina na presença de bile.

As vitaminas, por exemplo, em geral têm sua absorção aumentada quando administradas conjuntamente com alimentos em decorrência do retardo do esvaziamento gástrico e, assim, aumento do tempo de permanência na região duodenal.

Sabe-se que, em geral, os fármacos são ácidos ou bases fracas e que sua solubilidade varia extremamente em função do pH do meio. Assim, os fármacos de

caráter básico se dissolvem muito mais facilmente em meio ácido – como o meio estomacal – enquanto que os fármacos ácidos o fazem preferencialmente em meio alcalino. Desta forma, pequenas alterações de pH no meio de dissolução podem levar a alterações de solubilidade do fármaco, diminuindo ou aumentando sua fração ionizada com implicações sobre a dissolução e a sua absorção.

Através de recursos farmacotécnicos pode-se aumentar a solubilidade de fármacos através da adição de excipientes ácidos ou básicos. Por exemplo, na formulação da Aspirina Efervescente®, a presença de bicarbonato de sódio proporciona o meio alcalino para acelerar a velocidade de dissolução do ácido acetilsalicílico com resultante efeito analgésico mais rápido do que as formas convencionais.

A complexação de fármacos pouco hidrossolúveis com ciclodextrinas (CDs) ou polímeros também é ferramenta útil para melhorar a solubilidade (GOOLE, 2010).

As ciclodextrinas (CDs) - produtos cíclicos da hidrólise enzimática do amido por alguns microorganismos - são carboidratos complexos compostos de unidades de glicose (α -D-glicopirranose) unidas por ligações tipo α -1,4, com estrutura semelhante a um cone. Estes compostos possuem em sua estrutura grupos hidroxila primários e secundários orientados para o exterior. As hidroxilas das extremidades tornam as ciclodextrinas solúveis em água, devido à possibilidade de formação de ligações de hidrogênio. O interior da cavidade é delimitado pelo alinhamento dos hidrogênios C(3)-H e C(5)-H e pelo oxigênio da ligação éter C(1)-O-C(4), o que lhes confere caráter hidrofóbico. Assim, possuem exterior hidrofílico e uma cavidade interna hidrofóbica. Tal cavidade permite às ciclodextrinas complexarem moléculas que apresentem dimensões compatíveis e alterarem suas propriedades físico-químicas, como solubilidade em água, estabilidade e biodisponibilidade. As β - CDs são as mais utilizadas na complexação com várias classes de fármacos. Considerando suas características estruturais, a propriedade mais importante das CDs é a sua capacidade de formar complexos de inclusão com uma grande variedade de moléculas em solução (da SILVA, 2008).

Estes complexos de inclusão vêm sendo utilizados em produtos farmacêuticos. Nesses produtos, os complexos formados aumentam a solubilidade dos compostos originais em água porque as substâncias apolares estão no interior

do cone, e a interação com a água ocorre com a parte polar, que fica no exterior do cone.

Assim, fármacos que possuam características físico-químicas incompatíveis com o sistema biológico necessitam ser introduzidos em formulações mais racionais e complexas como citado anteriormente. Existem vários exemplos de complexos fármaco-ciclodextrinas no mercado farmacêutico brasileiro, entre estes, os produtos Cicladol® e Flogene® (piroxicam) e o Maxsulid® (nimesulida). Esse tipo de intervenção torna o fármaco mais compatível com o sistema biológico e permite que o perfil de absorção se torne mais efetivo, reproduzível e seguro.

Tendo em vista o significativo impacto da formulação sobre todos os aspectos de interação do fármaco com o organismo, é desejável que os ensaios pré-clínicos preliminares, com novas entidades químicas de uso terapêutico potencial, sejam realizados através da administração dessa nova entidade veiculada na forma de solução aquosa. Desta forma, os resultados obtidos terão maior relação com o produto estudado, e sofrerão pouca influência de outros componentes presentes somente para auxiliar a confecção da formulação.

No entanto, conforme citado anteriormente, a maioria dos novos compostos sintetizados com potencial terapêutico apresentam características de baixa solubilidade em água (NEERVANNAN,2006), o que leva à necessidade da utilização de co-solventes ou excipientes para produzir soluções ou pré-formulações biocompatíveis e adequadas para a condução dos ensaios pré-clínicos. Estes excipientes, embora tornem viável a administração dos novos compostos, podem produzir efeitos fisiológicos significativos e, então, alterar o perfil farmacocinético/farmacodinâmico do novo composto estudado (BUGGINS, 2007).

Compostos como dimetilsulfóxido (DMSO), propilenoglicol (PG), polietilenoglicol (PEG), etanol e tween 80 estão entre os principais produtos mais utilizados para auxiliar a confecção de pré-formulações em estudos pré-clínicos (BUGGINS, 2007; NEERVANNAN,2006). Estes compostos podem ser utilizados associados ou isoladamente, e possuem volumes e concentrações mais adequados para administração, dependendo do modelo animal envolvido (NEERVANNAN, 2006).

O impacto da utilização dessa estratégia para o planejamento de pré-formulações deve ser cuidadosamente avaliado para a adequada interpretação dos resultados obtidos nos estudos pré-clínicos.

3. Objetivos

- Avaliação do perfil farmacocinético em coelhos albinos:
 - NFOH oral e NF proveniente de NFOH oral
 - NF oral
 - NFOH i.v. e NF proveniente de NFOH i.v.
 - NF i.v.

4. Justificativa

A realidade atual com relação à terapêutica da doença de Chagas apresenta limitações significativas, levando a demanda do desenvolvimento de alternativas. O desenvolvimento de produtos para a saúde requer avaliação prévia em modelos animais, capazes de elucidar uma série de características fundamentais à decisão da viabilidade do novo composto.

Neste projeto, conduzimos a avaliação do pró-fármaco de nitrofural com características promissoras para sua aplicação no tratamento da doença de Chagas em um modelo animal mamífero não roedor. A determinação dos parâmetros farmacocinéticos do NFOH neste modelo fundamentará o planejamento de novos ensaios para a continuidade ao desenvolvimento do produto.

5. Materiais e métodos

5.1 Material

5.1.1 Matérias primas, reagentes e solventes

- Hidroximetilnitrofural (produto sintetizado pelo Laboratório de Pesquisa e Desenvolvimento de Fármacos – FCF/UNESP).
- Nitrofural (Sigma-Aldrich®) padrão analítico - Estados Unidos da América
- Diclofenaco sódico (DEG) - Brasil
- Metanol (JT Baker®) grau HPLC – México
- Acetonitrila (JT Baker®) grau HPLC – México
- Heparina sódica (Blausiegel®) – Brasil
- DMSO (Sigma-Aldrich®) padrão analítico – Estados Unidos da América
- Acetato de Etila (Mallinckrodt Chemicals®) padrão analítico – Alemanha

5.1.2 Equipamentos

- Banho ultrassônico ALT Plus 3LDA
- CLAE Alliance 2695 Waters®
- Espectrômetro de massas Micromass Quattro Micro Waters® Software Masslynx 4.1
- Ultracentrífuga Sorvall Biofuge Thermo Scientific®
- Agitador vórtex Tecnal®
- Balança semi-analítica Shimadzu®
- Evaporador miVac Genevac®

5.2 Solubilização dos produtos para administração no modelo animal

Para a administração de fármacos nos modelos animais é necessária a solubilização em veículos apropriados. Para a solubilização dos compostos NF e NFOH foram avaliados os veículos: soro fisiológico, propilenoglicol:soro fisiológico, dimetilsulfóxido:propilenoglicol; em diferentes proporções. Todas as avaliações foram realizadas com auxílio de banho ultrassônico variando de 5 a 15 minutos, excluindo-se as soluções que não apresentassem resultados de solubilização do fármaco, condizentes com a administração em animais.

5.3 Metodologia analítica

5.3.1 Equipamentos e sistema cromatográfico

No método bioanalítico desenvolvido foi utilizado um sistema de Cromatografia Líquida Waters Alliance® acoplado a um detector de massas Micromass Quattro Micro® (MS). Foi utilizado diclofenaco (10µg/mL em metanol) como padrão interno (PI). A fase móvel composta por água:metanol (50:50; v/v), a um fluxo de 0,2mL/min em modo isocrático foi utilizada para a eluição dos compostos no sistema cromatográfico. A detecção foi feita através do espectrômetro de massas com ionização por electrospray em modo positivo para o NFOH e negativo para o NF e o padrão interno foi detectado em ambos os modos. As relações massa carga e o modo de ionização utilizado para cada composto estão descritas na tabela 2.

Composto (ESI)	Transição MS/MS
Hidroximetilnitrofural (+)	250 / 204
Diclofenaco (+)	296/250
Nitrofural (-)	197/150
Diclofenaco (-)	294/250

Tabela 2. Transição massa/carga (m/z) de cada composto e padrão interno utilizado no método de espectrometria de massas.

No método de ionização por electrospray, modo positivo (ESI +), utilizou-se o capilar em 3,0kV, cone em 35V, e a taxa de colisão em 10V. O uso do ESI+ para a quantificação do NFOH acarreta a formação de um aduto com o metal alcalino sódio, com aumento da massa do íon precursor em 23 unidades (de 228 para 251 unidades). O íon majoritário da transição foi visualizado em 204 unidades de massa atômica.

O NF foi detectado utilizando o método electrospray em modo negativo (ESI-) com o capilar também em 3,0kV, cone em 35V e taxa de colisão em 10V. O íon precursor foi visualizado em 197 e o íon majoritário da transição em 150 unidades de massa atômica.

5.3.2 Processamento da amostra biológica

Em um microtubo plástico de 1,5 mL contendo 500µL de plasma, foram adicionados 500µL de acetato de etila e 20µL de PI. Em seguida, a amostra foi agitada em vortex por 30 segundos e centrifugada a 15000x g por 20 minutos; 300µL do sobrenadante foram retirados e evaporados à secura em evaporador. O produto foi ressuspenso em 150 µL de fase móvel (50:50; água:metanol) e injetado no sistema LCMS/MS.

5.3.3 Validação

A validação compreende a avaliação sistemática dos procedimentos utilizados no método bioanalítico desenvolvido com a finalidade de estabelecer os seus limites de confiança. Esta avaliação foi fundamentada nas normas do Guia para Validação de Métodos Analíticos e Bioanalíticos da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) de acordo com a resolução RE-nº 899, de 29 de maio de 2003 e da Food and Drug Administration (FDA), de acordo com o Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation, de maio de 2001. Os limites de confiança determinados foram: linearidade, precisão e exatidão, limite inferior de quantificação (LIQ), limite de detecção (LD), recuperação, estabilidade e supressão de ionização.

5.3.3.1 Linearidade

As curvas analíticas, para NF e NFOH, foram construídas através das relações entre a razão da área dos picos de cada composto e do PI (área do composto/área do PI) contra a concentração nominal do composto (NF ou NFOH). Os critérios de aceitação da linearidade incluíram coeficiente de correlação acima de 0,98 e exatidão de 85% a 115%, exceto para LIQ, no qual a exatidão deve estar compreendida entre 80 e 120%.

5.3.3.2 Limite inferior de quantificação (LIQ)

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

5.3.3.3 Precisão e exatidão

A precisão e a exatidão do método bioanalítico foram avaliadas intra e inter-corridas para cada um dos compostos. Os resultados intra-corridas foram determinados por 5 análises dos controles de qualidade alto (CQA – 5000 ng/mL), médio (CQM- 2500 ng/mL), baixo (CQB – 500 ng/mL) e o limite inferior de quantificação (CQ-LIQ) em um mesmo dia, já para os resultados de precisão e exatidão inter-corridas, as determinações foram feitas em três dias consecutivos.

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

5.3.3.4 Limite de detecção (LD)

O limite de detecção é a menor quantidade do analito presente na amostra que pode ser detectado, porém não necessariamente quantificado nas condições experimentais previamente estabelecidas. O LD foi determinado pela relação de 3 vezes o ruído da linha de base na amostra de plasma branco.

5.3.3.5 Recuperação

Soluções de concentrações conhecidas de cada analito foram adicionadas a extratos finais de processamento de amostras "branco" e analisadas. A recuperação foi calculada com base no percentual da razão área analito/área pi extraído contra razão área analito/área PI de soluções injetadas diretamente no sistema analítico.

5.3.3.6 Estabilidade

A estabilidade foi avaliada em função da necessidade de armazenamento das amostras após cada coleta ou após processamento. Os ensaios de estabilidade determinam o tempo máximo de armazenamento com a garantia de resultados confiáveis.

Foram realizados os ensaios de estabilidade de curta duração, no qual o CQ foi mantido à temperatura ambiente no período de 6 a 24 horas; estabilidade pós-processamento, no qual avaliamos o fármaco no extrato final obtido após processamento da amostra no período de 24h; estabilidade de ciclos de congelamento e descongelamento, no qual o CQ foi congelado por 24 horas e descongelado à temperatura ambiente por três vezes. Os experimentos foram realizados utilizando-se o CQA (5000 ng/mL) e o CQB (500 ng/mL).

Os compostos foram considerados estáveis quando não observado desvio maior que 15% do valor obtido com relação às amostras recém preparadas.

5.3.4 Análise dos resultados da validação

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

5.4 Perfil Farmacocinético

5.4.1 Animais

Foram utilizados coelhos albinos (n=20), com peso aproximado de 2,5-3,0 kg provenientes do biotério central da Universidade Estadual Paulista – Unesp. Os animais foram transferidos para o biotério do Departamento de Princípios Ativos Naturais e Toxicologia (PANT) da UNESP Araraquara, onde foram mantidos em condições controladas de temperatura ($23 \pm 1^{\circ}\text{C}$) e umidade ($55 \pm 5\%$) e ciclos de luz de 12/12h, com luzes acesas as 07h. Ração balanceada e água ad libitum, o

acesso à ração foi interrompido nas 8 horas que antecederam a administração em todos os grupos estudados com o intuito de eliminar interação fármaco-alimento.

5.4.2 Protocolo experimental

O protocolo de experimental executado neste projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP/Araraquara sob o número 02/2011 (Anexo 1).

Foram usados 20 animais, distribuídos nos seguintes grupos:

- Grupo farmacocinética 1, tratados com NF, dose única , IV bolus (n=5, 6,35 mg/kg);
- Grupo farmacocinética 2, tratados NFOH, dose única, IV bolus (n=5, 8,05 mg/kg);
- Grupo farmacocinética 3, tratados com NF, dose única, via gavagem (n=5, 63,5mg/kg);
- Grupo farmacocinética 4, tratados com NFOH, dose única, via gavagem (n=5, 80,5 mg/kg).

A dose de 30 mg/kg do fármaco NF utilizada em humanos por via oral (FERREIRA, 1961) foi empregada nos cálculos de extrapolação alométrica para administração em coelhos, obtendo-se o valor de 63,5 mg/kg. A partir da dose de NF calculou-se, por relação estequiométrica, a dose de NFOH para administração em coelhos (80,5 mg/kg).

5.4.3 Grupo Farmacocinética 1 e 2

Nestes animais foram administrados NF e NFOH através de injeção na veia marginal da orelha direita. As coletas foram realizadas por punção venosa na veia marginal da orelha esquerda nos tempos de 5, 10, 15, 30, 45, 60, 90, 120, 240, 360, 480, 600 e 720 minutos após a administração. Do grupo 1 se obteve os parâmetros

farmacocinéticos do NF e do grupo 2, os parâmetros farmacocinéticos do NFOH e de NF originado a partir de NFOH após a administração IV bolus.

5.4.4 Grupo Farmacocinética 3 e 4

Nestes animais foram administrados NF e NFOH via gavagem. As coletas foram realizadas por punção venosa na veia marginal da orelha esquerda nos tempos de 5, 15, 30, 45, 60, 90, 120, 240, 360, 480, 600, 720, 960 minutos após a administração.

5.4.5 Análise farmacocinética

A disposição cinética do NF e NFOH foi avaliada após as administrações dose única tanto IV quanto oral nos animais nos softwares Microsoft Excel® e Phoenix Winonlin®. Os parâmetros farmacocinéticos foram calculados através das curvas de concentração plasmática versus tempo. As constantes de velocidade eliminação (β) foram determinadas através da inclinação das retas de regressão linear do logaritmo das concentrações plasmáticas *versus* tempo.

A ASC_{0-t} foi calculada pelo método dos trapezóides, onde a média das concentrações plasmáticas de cada intervalo de tempo é multiplicada por esse intervalo de tempo, com subsequente soma de todos os intervalos (Equação 1)

Equação 1

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

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

Para $ASC_{0-\infty}$ foi aplicada a equação 2.

Equação 2

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

Onde Cpn é a ultima concentração da curva de concentração plasmática versus tempo e kel ou β é a inclinação da reta de regressão linear do logaritmo das concentrações plasmáticas pelo tempo, na fase de eliminação.

A constante kel ou β foi utilizada para calcular a meia vida do processo a que pertence (eliminação), seguindo a equação 3

Equação 3

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

O Clearance (Cl) foi calculado pela equação 4

Equação 4

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

O volume de distribuição ($Vd_{\text{área}}$) foi calculado pela equação 5.

Equação 5

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

A relação entre ASC0-t E ASC0-inf para verificar se o tempo de coleta foi suficiente para a determinação confiável dos parâmetros farmacocinéticos. é desejável que esta relação seja igual ou superior a 0,8.

Equação 6

$$R_{\text{area}} = \frac{ASC_{0-t}}{ASC_{0-inf}}$$

A biodisponibilidade oral foi calculada pela equação 7 para se dimensionar a quantidade de fármaco foi obtida a partir da administração do pró-fármaco.

Equação 7
$$F_{oral} = \frac{ASC_{oral} \cdot DOSE_{iv}}{ASC_{iv} \cdot DOSE_{oral}}$$

5.5 Análise estatística

Os parâmetros farmacocinéticos de cada grupo estão apresentados através das médias (IC 95). Foram feitas duas comparações estatísticas: NF de NFOH, contra NF de NF; e NF oral contra NF IV. O objetivo da primeira comparação (NF obtido da administração de NFOH contra NF administrado) é observar alterações no perfil do nitrofural quando administrado latenciado. A comparação do perfil oral contra iv permite evidenciar diferenças no perfil de concentração plasmáticas decorrentes do processo de absorção e, ainda, determinar a biodisponibilidade do produto administrado pela via oral. Alterações no processo de eliminação também podem ocorrer entre as diferentes vias, particularmente nas administrações de fármacos latenciados, uma vez que a conversão do pró-fármaco ao fármaco matriz pode ser uma etapa limitante ao processo de eliminação (metabolismo e excreção). As comparações estatísticas foram realizadas através da aplicação do programa GraphPadPrism 5®, com uso do teste de Mann-Whitney ($\alpha=0,05$). Os cálculos das curvas de calibração e coeficientes de variação (CV%) foram realizados utilizando-se o programa Origin®.

6 - Resultados e discussão

6.1. Solubilização dos produtos para administração no modelo animal

A solubilidade do NF e NFOH foi satisfatória apenas em DMSO (100%). Nos outros veículos (puros ou em combinações) observou-se precipitação dos produtos, o que inviabilizou o uso destes veículos para constituir uma solução injetável adequada à administração intravenosa.

O DMSO é amplamente utilizado em estudos pré-clínicos devido à sua grande capacidade de solubilização por ser um solvente anfótero. Além disso, ele substitui solventes que seriam incompatíveis com a administração tanto oral quanto endovenosa no organismo. O DMSO é um líquido higroscópico miscível em água e álcool, éter, clorofórmio e benzeno. É uma substância altamente polar e aprótica, portanto sem propriedades ácidas ou básicas. Tem propriedades solventes excepcionais tanto para substâncias orgânicas como para inorgânicas, devido a sua capacidade de associar tanto com espécies iônicas e moléculas neutras. Possui baixa viscosidade e densidade idêntica à da água, pois possui alta afinidade ao hidrogênio. O DMSO tem sido utilizado em formulação magistral na terapêutica dermatológica, contendo medicamentos antiinflamatórios não-esteroidais, drogas esteroidais, antifúngicas, antivirais e drogas antineoplásicas. O DMSO apresenta baixa toxicidade sistêmica em modelos animais, entretanto pode causar efeitos tóxicos locais como irritação cutânea, vermelhidão, queimação, urticária, e outros.

Assim, o veículo selecionado, foi DMSO (100%), que levou à uma solubilização completa dos dois fármacos avaliados no estudo. Após a seleção do veículo apropriado, foram feitas soluções de NFOH e NF nas concentrações apropriadas para o peso de cada animal, considerando a dose alvo e o volume máximo de 0,5 mL de DMSO por kg, tanto para a administração oral quanto para administração endovenosa (NEERVANAN, 2006).

6.1 Validação do método bioanalítico

Para o monitoramento do método, foram preparadas, adicionando-se ao plasma, 10% das soluções de trabalho em metanol (tabelas 3 e 4), obtendo-se a concentração dos controles de qualidade e padrões de calibração.

NFOH						
Soluções de trabalho (ng/mL)	100000	50000	25000	10000	5000	2500
PC (ng/mL)	10000	5000	2500	1000	500	250
CQ (ng/mL)		5000	2500		500	

Tabela 3. Concentrações das soluções de trabalho, padrões de calibração e controles de qualidades, para o NFOH. Valores em ng/mL. PC padrões de calibração; CQ controles de qualidade.

NF						
Soluções de trabalho (ng/mL)	100000	50000	25000	10000	5000	2500
PC (ng/mL)	10000	5000	2500	1000	500	250
CQ (ng/mL)		5000	2500		500	

Tabela 4. Concentrações das soluções de trabalho, padrões de calibração e controles de qualidades, para o NF. Valores em ng/mL. PC padrões de calibração; CQ controles de qualidade.

6.1.2 Curva analítica e linearidade

Os resultados da linearidade obtidos das curvas analíticas estão expressos nas tabelas 5 e 6.

NFOH						
Nominal (ng/mL)	250	500	1000	2500	5000	10000
Experimental (ng/mL)	274,84	516,14	1097,13	2369,07	4942,57	10050,43
DPR (%)	0,04	0,03	0,25	0,23	0,93	0,59
Exatidão (%)	90,06	96,77	90,28	105,23	101,14	99,49

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

	NF					
Nominal (ng/mL)	250	500	1000	2500	5000	10000
Experimental (ng/mL)	291,01	498,26	1099,46	2553,78	4663,53	10143,92
DPR (%)	0,03	0,06	0,28	1,29	0,78	4,20
Exatidão (%)	83,59	100,34	90,05	97,84	106,72	98,56

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

A curva foi analisada pelo método de regressão dos mínimos quadrados para verificar a sua linearidade. O coeficiente de correlação entre os pontos foi de 0,9995 para o NFOH e de 0,9979 para o NF, que se encontram dentro dos valores aceitáveis (acima de 0,98). A precisão e exatidão se encontram dentro dos valores de referência para ambas as curvas, que é de até 15% de CV para precisão e de 85 – 115% para exatidão, excetuando-se o LIQ que pode variar entre 0 – 20% de CV na precisão e 80 – 120% para a exatidão. As equações de linearidade encontradas foram $y = 4,6411x - 414,08$ para o NFOH e $y = 3,5788x - 146,45$ para o NF. As curvas analíticas estão demonstradas nas figuras 2 e 3.

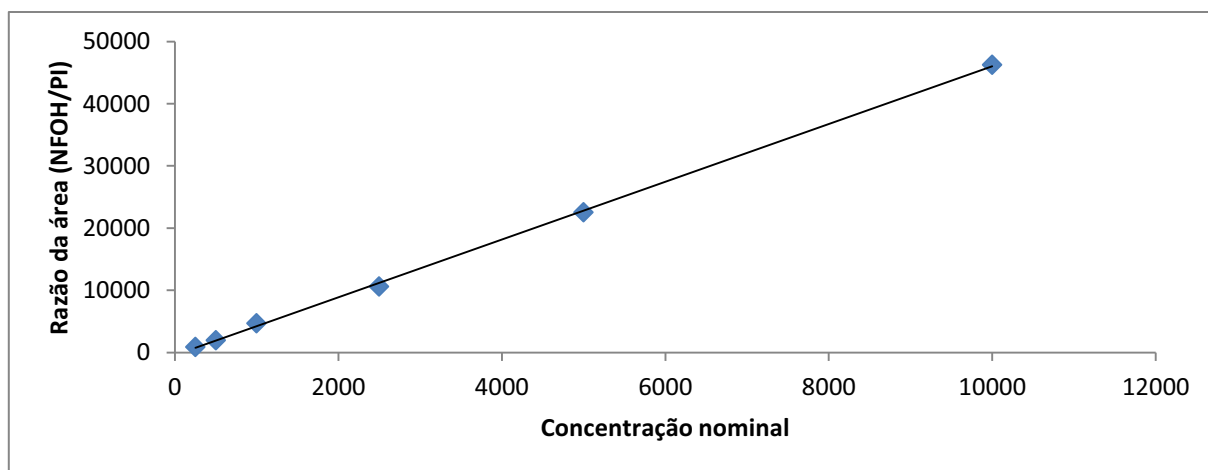


Figura 2. Curva de calibração do NFOH utilizando-se a razão da área do fármaco / padrão interno

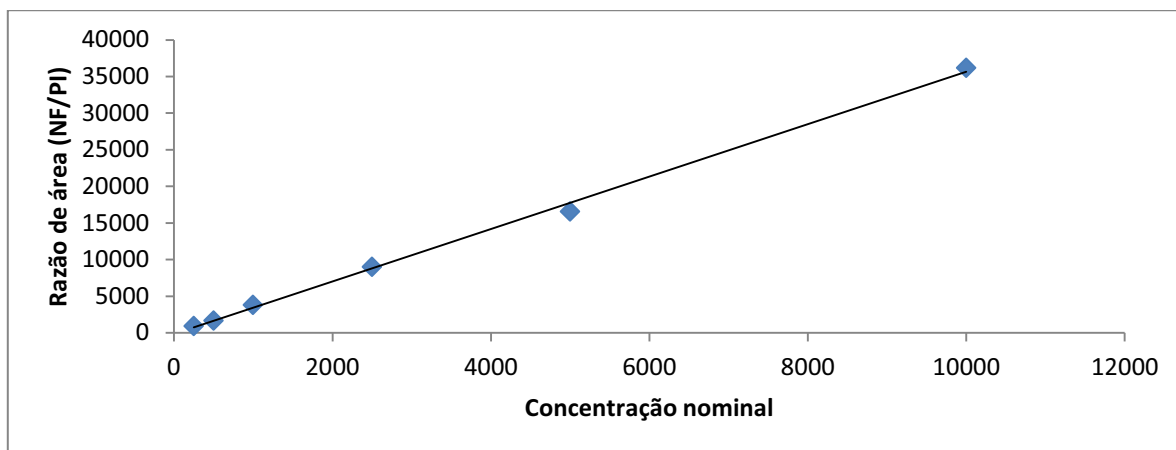


Figura 3. Curva de calibração do NF utilizando-se a razão da área do fármaco / padrão interno

O limite inferior de quantificação (LIQ) foi de 250 ng/mL para ambos os compostos.

6.1.3 Precisão e exatidão

A precisão e exatidão foram avaliadas em três dias consecutivos e os critérios de aceitação foram: precisão de 0-15% (expressa como CV) e exatidão de 85-115% exceto para o LIQ, cujos valores foram 0-20% e 80-120%, para precisão e exatidão respectivamente.

Os valores de precisão e exatidão intra-corridas do NFOH foram de 0,02 – 0,2% e 99,66 - 108,47% respectivamente. Para o ensaio inter-corridas do composto NFOH, os valores de precisão e exatidão foram de 6,52 - 8,89% e 93,99 - 100,43% respectivamente.

Os valores de precisão e exatidão intra-corridas do NF foram de 0,0073 – 0,8907% e 93,45 - 109,50% respectivamente. Para o ensaio inter-corridas do composto NF, os valores de precisão e exatidão foram 1,86 - 12,35% e 90,45 - 100,43% respectivamente. Os resultados para os dois compostos estão apresentados nas tabelas 7 e 8.

		NFOH		
		Concentrações teóricas		
Dia	Estatística	500	2500	5000
1	Média intra-corrida	479,34	2378,64	5016,53
	DPR (%)	0,006	0,052	0,205
	Exatidão (%)	104,131	104,854	99,669
2	Média intra-corrida	468,96	2372,31	5029,07
	DPR (%)	0,009	0,053	0,116
	Exatidão (%)	106,206	107,507	108,478
3	Média intra-corrida	461,64	2364,88	5019,69
	DPR (%)	0,0117	0,026	0,085
	Exatidão (%)	107,6708	107,0046	99,66602
Total	Média inter-corrida	469,98	2371,94	5021,77
	DPR (%)	8,892	6,885	6,522
	Exatidão (%)	93,997	94,877	100,435

Tabela 7. Precisão e exatidão intra e inter-corridas do NFOH. DPR - desvio padrão relativo.

Nitrofurais				
Dia	Estatística	Concentrações teóricas		
		500	2500	5000
1	Média intra-corrida	498,26	2663,67	4524,99
	DPR (%)	0,018235	0,331136	0,890747
	Exatidão (%)	100,3466	93,4532	112,1014
2	Média intra-corrida	522,9337	2661,688	4522,607
	DPR (%)	0,007386	0,238468	0,173505
	Exatidão (%)	95,41325	102,1325	103,1479
3	Média intra-corrida	509,318	2675,71	4521,307
	DPR (%)	0,012577	0,036269	0,10715
	Exatidão (%)	98,1364	98,17159	100,5739
Total	Média inter-corrida	510,1728	2667,023	4522,968
	DPR (%)	12,35567	7,588556	1,868141
	Exatidão (%)	102,0346	106,6809	90,45936

Tabela 8. Precisão e exatidão intra e inter-corridas do NF. DPR - desvio padrão relativo.

6.1.4 Limite de detecção

O limite de detecção foi determinado pela relação de 3 vezes o ruído existente na linha de base na amostra sem adição dos compostos NF e NFOH. Para o NFOH, o limite de detecção foi de 10 ng/mL e para o NF, 8ng/mL.

6.1.5 Supressão de Ionização

O teste de supressão de ionização demonstrou que não há interferência significativa da matriz biológica na ionização dos compostos que foram determinados no detector de massas.

Nas figuras 4, 5 e 6 estão representados os cromatogramas para cada transição de m/z dos compostos NF, NFOH e diclofenaco (PI).

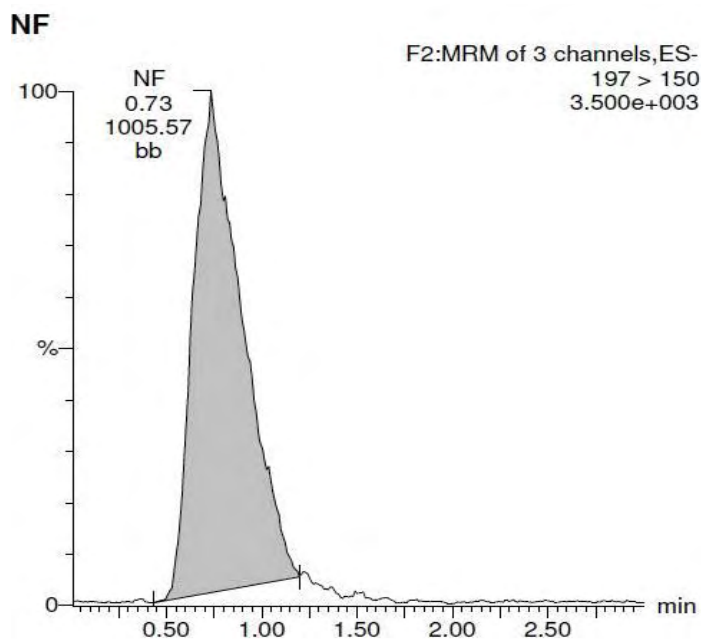


Figura 4. Cromatograma do nitrofural na transição m/z 197 > 150

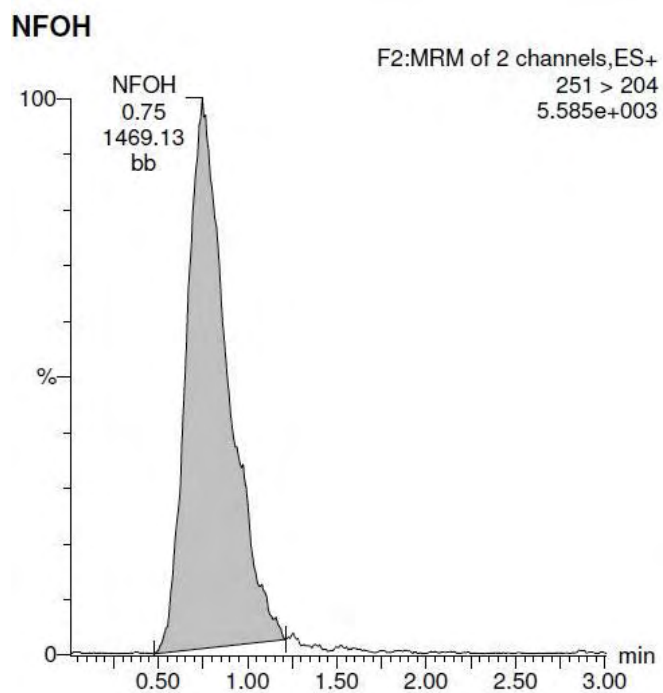


Figura 5.Cromatograma do hidroximetilnitrofural na transição m/z 251 > 204

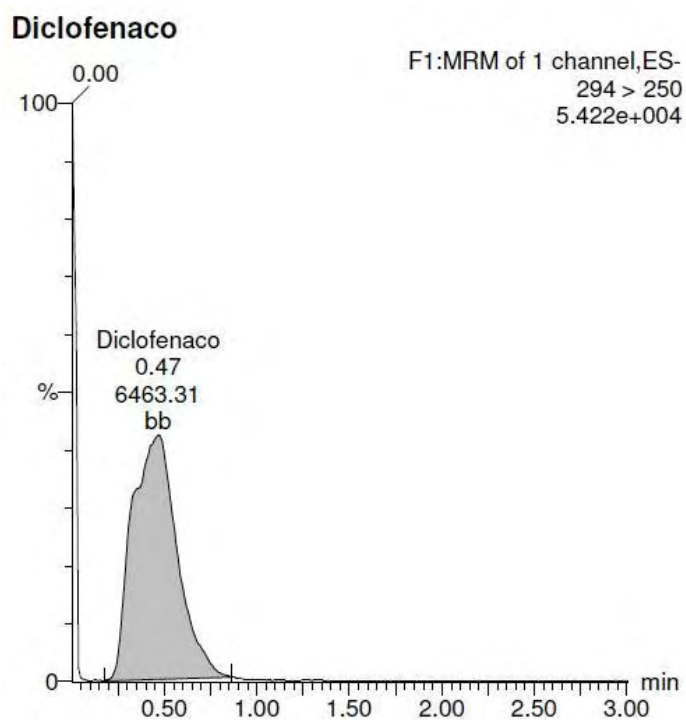


Figura 6. Cromatograma do diclofenaco na transição m/z 294> 250

6.1.6 Estabilidade

Os resultados dos ensaios de estabilidade para NF e NFOH estão demonstrados nas tabelas 9 e 10.

CQs	Estatística	CD 6h	PP 6h (4°C)	CCD (-20°C)	LD 120 dias (-20°C)
CQB	n	3	3	3	3
	DPR (%)	0,01	0,02	0,03	0,21
	Exatidão (%)	87,65	89,59	91,90	103,58
CQA	n	3	3	3	3
	DPR (%)	0,21	0,21	0,08	0,13
	Exatidão (%)	108,64	97,12	88,20	99,13

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

DPR desvio padrão relativo; CQB controle de qualidade baixo, CQA controle de qualidade alto

CQ's	Estatística	CD 24h	PP 6h (4°C)	CCD (-20°C)	LD 120 dias (-20°C)
CQB	n	3	3	3	3
	DPR (%)	0,10	0,02	0,03	0,34
	Exatidão (%)	102,70	86,45	FC (49,90)	87,21
CQA	n	3	3	3	3
	DPR (%)	0,43	0,10	0,04	0,28
	Exatidão (%)	104,12	95,59	FC (55,68)	90,46

Tabela 10. Estabilidade do NFOH (n=3). CD = curta duração a temperatura da sala de processamento; PP= pós-processamento; CCD após 3 ciclos de congelamento e descongelamento; e LD= longa duração. FC= falhou no critério de aceitação

DPR desvio padrão relativo; CQB controle de qualidade baixo, CQA controle de qualidade alto

A estabilidade dos compostos é confirmada se não houver desvio maior que 15% do valor obtido nas amostras recém-preparadas. O NF foi estável em todas as condições avaliadas nos diferentes períodos, o que não ocorreu para o NFOH, que não se manteve estável no experimento de ciclo de congelamento e descongelamento. Dessa forma, a amostra foi coletada e devidamente separada e congelada por um curto período de tempo até a leitura no espectrômetro de massas, sendo descongelada uma só vez, momentos antes da extração.

Os limites de confiança obtidos no processo de validação para o método bioanalítico desenvolvido foram considerados adequados para a sua aplicação no estudo de farmacocinética proposto.

6.2 Análise Farmacocinética

Para o NF foram realizadas as administrações endovenosa e oral nas doses de 6,35 e 63,5 mg/kg, respectivamente. A partir dos resultados obtidos nas análises por LC-MS/MS foram construídas as curvas de concentração plasmática *versus* tempo representadas nas figuras 7 e 8.

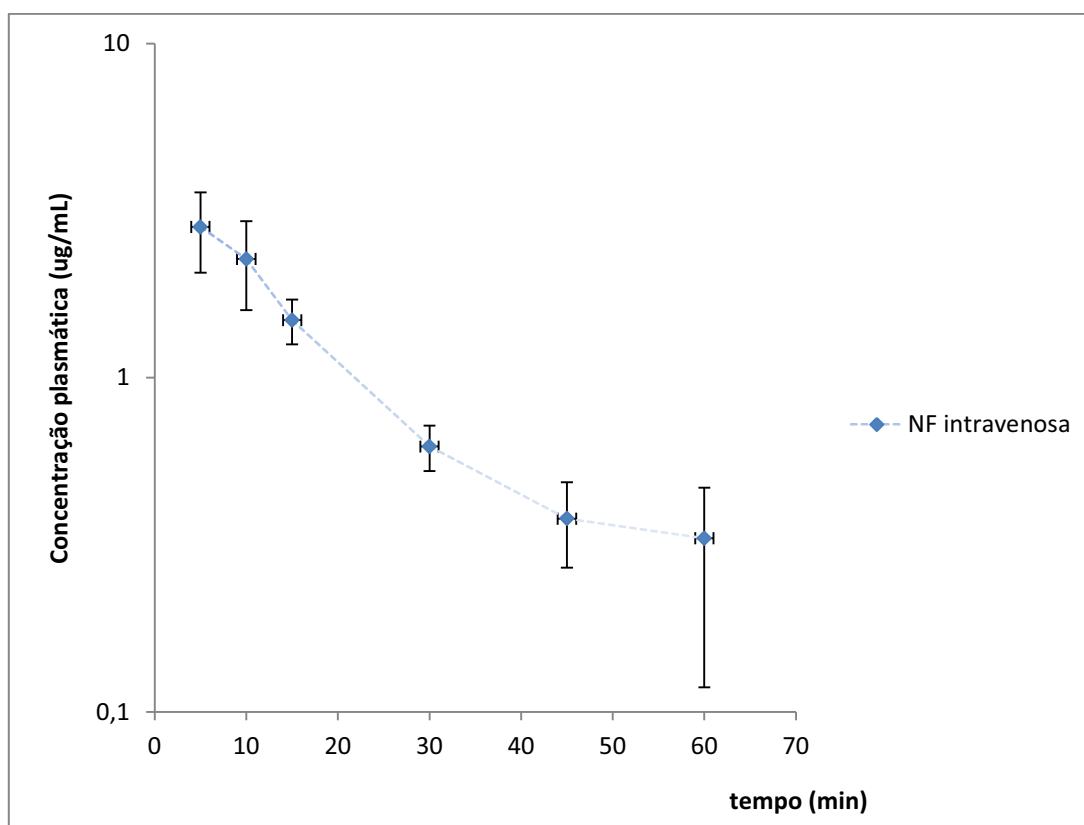


Figura 7. Curva média (IC95) de concentração plasmática *versus* tempo após a administração de NF via endovenosa 6,35 mg/kg.

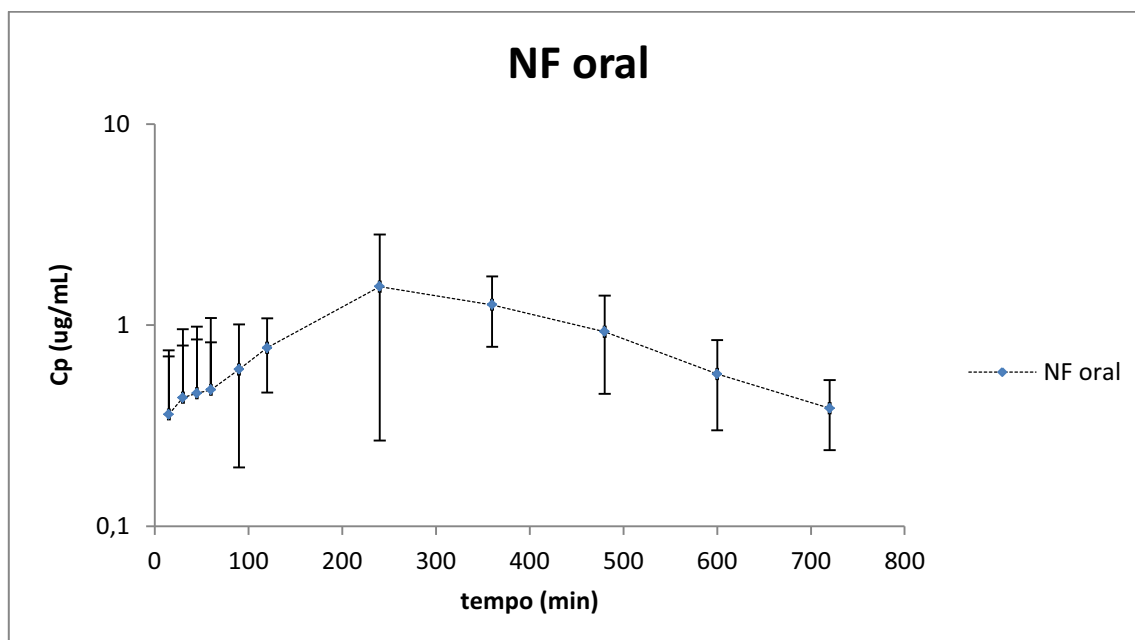


Figura 8. Curva média (IC95) de concentração plasmática *versus* tempo após a administração de NF via oral 63,5 mg/kg.

Ambas as curvas de perfil concentração plasmática *versus* tempo para NF demonstraram uma só velocidade de decaimento, sugerindo a aplicação do modelo monocompartimental para análise farmacocinética. Os parâmetros farmacocinéticos foram calculados por análise não compartimental, através do software Phoenix Winonlin® e estes resultados foram confirmados através da aplicação das equações de modelo monocompartimental.

As médias dos parâmetros farmacocinéticos do NF a partir das duas curvas de concentração plasmática *versus* tempo estão apresentadas na Tabela 11.

Parâmetros	Via de administração	
	NF IV (n = 5)	NF oral (n = 5)
kel (min ⁻¹)	0,0400	0,0025*
	(0,03 - 0,05)	(-0,00986 - 0,03102)
Meia vida eliminação (min)	17,32	276,09*
	(13,58 - 18,29)	(56,91–301,10)
ASC 0-45 (ug/ml.min)	65,20	726,90
	(43,54 - 82,26)	(198,26–1053,60)
ASC 0-∞ (ug/ml.min)	73,47	844,79
	(51,32 - 90,04)	(232,89–1179,80)
R áreas (%)	88,74	86,04
	(84,23 - 93,01)	(85,53 - 91,25)
Cl (ml/min.kg)	86,42	96,10
	(68,92 - 117,64)	(54,25 - 137,94)
Vd (ml/kg)	2160,56	35206,89
	(1518,60 - 2713,58)	(15268,00–55146,00)
Foral (%)	-----	114,97

Tabela 11. Média (IC95) dos parâmetros farmacocinéticos do NF administrado por via oral (63,5 mg/kg) e intravenosa (6,35mg/kg) em coelhos albinos (n=10). ondekel - constante de eliminação; ASC - área sob a curva; R áreas - relação das áreas sob a curva; Cl – clearance; Vd – volume de distribuição; Foral – Biodisponibilidade oral. * - Diferença estatística (p < 0,05, teste de Mann-Whitney).

Tem sido demonstrado que o DMSO pode inibir CYP1A2, 2C8/9, 2C19, 2D6, 2E1 e 3A4. Os efeitos do DMSO sobre a absorção oral foram avaliados por Passananti e colaboradores em 1975 para o ácido salicílico, sulfanilamida e warfarin e não foram observadas diferenças para os dois primeiros na dose de 200 mg/Kg de DMSO. No entanto, na dose de 500 mg/kg observou-se modificações no perfil de warfarina, como resultado do aumento do pH gástrico e alteração no esvaziamento. Pestel *et al.*(2006) afirmam que o DMSO pode diminuir o transito intestinal a partir de doses superiores a 2000 mg/kg porém sem afetar a velocidade do esvaziamento

gástrico. Além disso, o DMSO provoca mudanças ligeiras e transientes em parâmetros bioquímicos como glicose, lactato, triglicerídeos, ácidos graxos livres, creatinina e osmolaridade.

Apesar dessas possíveis alterações decorrentes da veiculação do produto em DMSO em nosso experimento, o comportamento do NF administrado pela via oral em coelhos muito se assemelhou ao perfil do produto observado por Nouws em bezerros pré-ruminantes via oral, veiculado em leite (1987). Assim, consideramos que a dose de DMSO utilizada (0,5 mg/kg) não alterou significativamente os processos fisiológicos para afetar o perfil farmacocinético do fármaco em estudo.

O NF administrado pela via endovenosa apresenta meia vida menor quando comparado à administração oral do mesmo fármaco. A meia vida de eliminação, em geral, é um parâmetro independente da via de administração. No entanto, particularmente nas administrações orais, isto se aplica a fármacos de alta solubilidade e permeabilidade e, então, particularmente aos fármacos de classe I (WATERBEEMD, 1998). O NF apresenta baixa solubilidade - portanto não pode ser considerado como fármaco de classe I - e essa característica tem impacto significativo sobre o perfil de absorção ao longo do tempo após administração oral. A baixa solubilidade do NF não favorece a formação de dispersões moleculares que proporcionam o seu contato com as membranas do trato digestório para a ocorrência da absorção e este pode ser um fator importante nas diferenças observadas nos parâmetros k_{el} e meia vida de eliminação entre a via endovenosa e oral. A meia vida de eliminação é maior na administração oral devido à necessidade de maior tempo para a ocorrência da formação de dispersões moleculares e o contato com as membranas biológicas para absorção. Desta forma, pode-se afirmar que na administração oral de NF o processo de absorção é fator limitante de sua excreção.

Os parâmetros Cl e V_d não apresentaram diferença estatística significativa entre os grupos, e as áreas sob a curva foram proporcionais às doses administradas. Este achado demonstra que a capacidade de eliminação e distribuição do produto independente da via, embora a absorção pela via oral prolongue a meia vida de eliminação do composto.

Foi observada alta biodisponibilidade oral do NF, o que demonstra que a exposição do animal por essa via é semelhante à observada na administração intravenosa. No entanto, é possível também observar que há grande variabilidade no parâmetro ASC para o grupo de administração oral.

O modelo animal utilizado no experimento possui uma alta taxa de fluxo biliar, cerca de 6 vezes superior ao fluxo humano (KARARLI, 1995). A bile tem grande importância na solubilização de compostos lipofílicos devido à ação dos sais biliares. Esses sais melhoram a taxa de dissolução e solubilidade por facilitarem a formação de micelas devido à sua característica anfifílica. É esperado que essa situação fisiológica do animal tenha impacto positivo na solubilização dos compostos estudados - NF e NFOH - após a administração oral, que possui solubilidade reduzida em água e, consequentemente em fluidos biológicos.

Como citado anteriormente, as propriedades físico químicas de um composto possuem grande influência sobre a sua absorção oral. A baixa solubilidade do NF, aliada à sua efetiva absorção são características de fármaco de classe II, segundo o Sistema de Classificação Biofarmacêutica proposto por Amidon (1995). A absorção de fármacos dessa classe possui como fator limitante a taxa de dissolução e a viscosidade da solução presente no fluido do trato gastrointestinal e secreção de bile, entre outros fatores. A alta viscosidade da solução administrada pode estar relacionada com a lenta velocidade de absorção - observada pelo prolongamento da meia vida - e com a grande variabilidade no parâmetro ASC, devido às diferenças de movimento do trato digestório, ou consumo de alimentos por estes animais após a administração por gavagem.

As administrações do NFOH resultaram em perfis farmacocinéticos apresentados nas figuras 9 e 10.

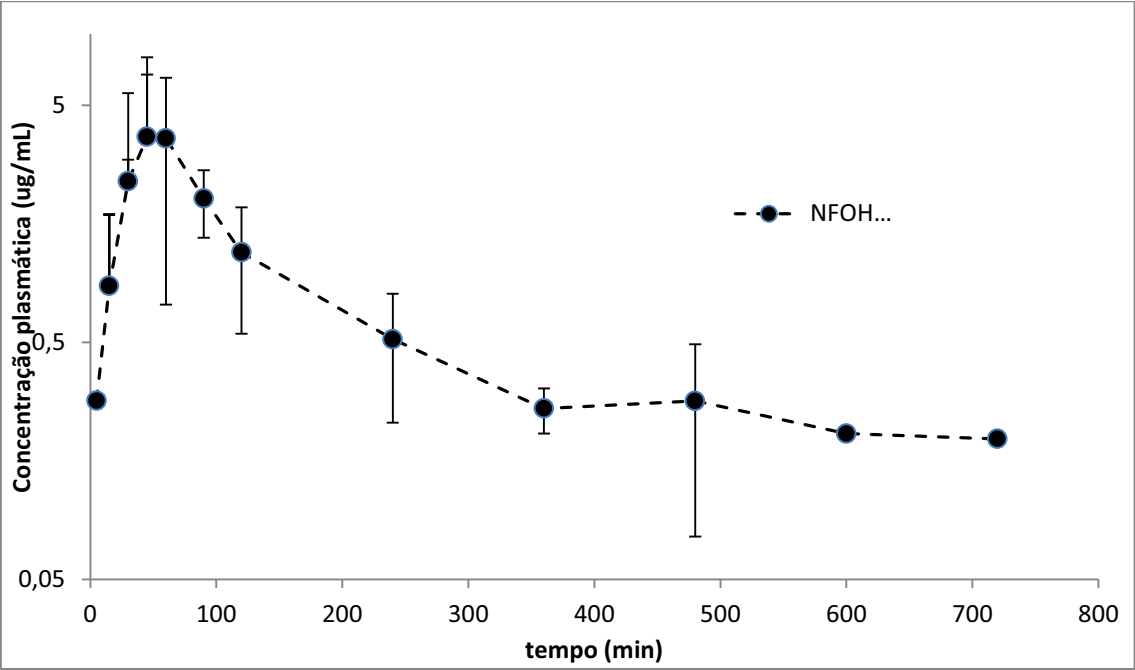


Figura 9. Perfil farmacocinético médio (IC95) do NFOH após administração oral(n=5) 80,5 mg/kg.

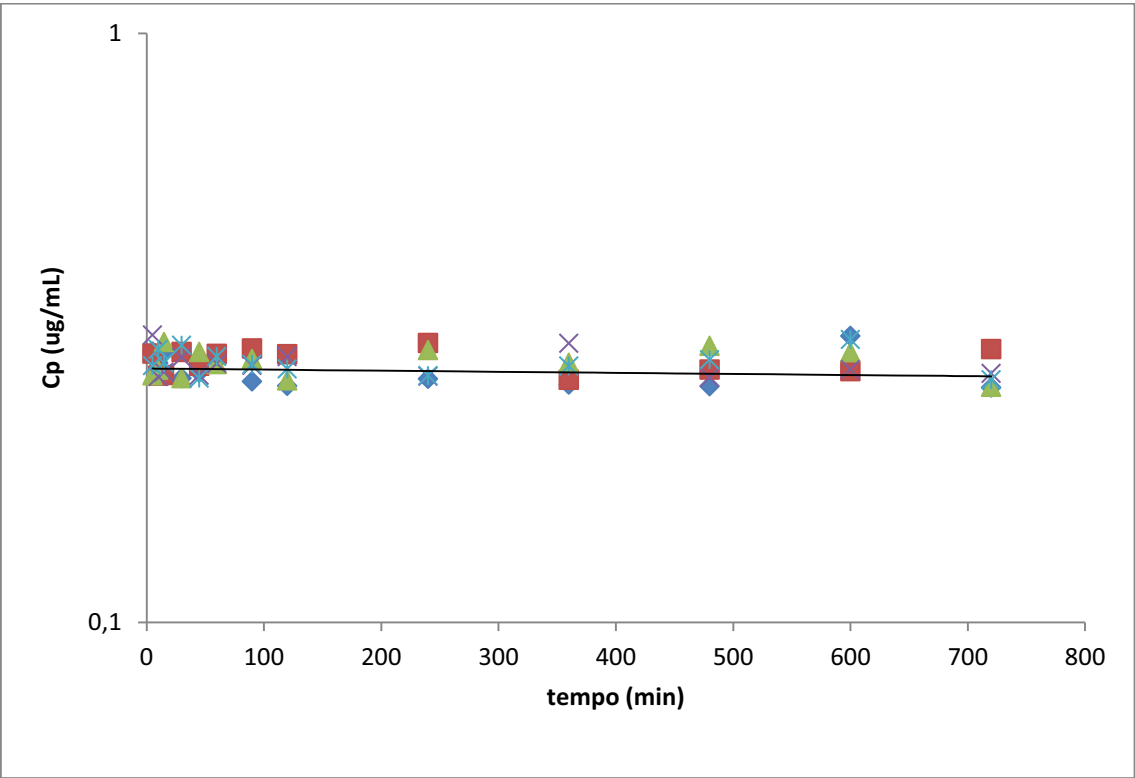


Figura 10. Perfil farmacocinético de todos os animais (n = 5) do grupo NFOH por administração endovenosa 8,05 mg/kg.

O perfil farmacocinético obtido na administração intravenosa do NFOH apresentou características que inviabilizaram os cálculos de parâmetros farmacocinéticos. Com os resultados obtidos, porém, foi possível descartar erros analíticos e de extração, já que o padrão interno diclofenaco foi quantificado de forma correta. Além dessa quantificação, o sistema de detecção foi utilizado no mesmo período para a quantificação do nitrofural do grupo i.v., resultando em dados compatíveis com a administração i.v. de um fármaco. Uma extensa busca foi realizada na literatura por comportamentos similares em outros estudos de grupos de pesquisa, porém sem encontrar quaisquer novos ou produtos já utilizados na terapêutica que possuem o mesmo comportamento, ou até mesmo próximo ao apresentado pelo NFOH em sua administração intravenosa. Aventamos a possibilidade de que o volume de DMSO administrado pela via intravenosa (cerca de 0,3 mL) presente nas amostras tenha influenciado no processo de ionização necessária para a quantificação do produto no detector de massas. Existe ainda, a possibilidade de recirculação hepática do fármaco, impedindo que o mesmo atinja altas concentrações e seja rapidamente eliminado, mantendo a concentração estável. Os resultados do grupo NFOH intravenoso não viabilizaram a determinação da biodisponibilidade oral do composto, no entanto, os parâmetros farmacocinéticos do NFOH não são indispensáveis para o planejamento do estudo pré-clínico subsequente, uma vez que neste estudo foi possível determinar a biodisponibilidade de NF a partir de NFOH administrado oralmente, conforme descrito e discutido adiante.

A partir da curva do perfil farmacocinético obtida na administração oral do NFOH foram calculados os seus parâmetros farmacocinéticos, que estão apresentados na tabela 12.

Hidroximetilnitrofural Oral	
Parâmetros farmacocinéticos	
kel (min^{-1})	0,00444 (0,005 - 0,010)
Meia vida eliminação (min)	156,08 (57,12 - 128,57)
ASC 0-45 ($\mu\text{g/ml.min}$)	494,77 (170,44 - 708,81)
ASC 0-inf ($\mu\text{g/ml.min}$)	538,91 (202,11 - 734,77)
R áreas (%)	91,809 (88,53 - 96,89)
Cl/f (ml/min.kg)	149,37 (100,74 - 315,46)
Vd/f (ml/kg)	33642,84 (9157,8 - 44571,1)

Tabela 12. Parâmetros farmacocinéticos médios (IC95) do NFOH 80,5 mg/kg onde kel - constante de eliminação; ASC - área sob a curva; R áreas - relação das áreas sob a curva; Cl – clearance; Vd – volume de distribuição.

A partir da mesma administração do pró-fármaco hidroximetilnitrofural, foram realizadas as quantificações da liberação do nitrofural, seu fármaco matriz. Na figura 11 estão comparados os perfis de nitrofural administrado oralmente e de nitrofural advindo da administração de hidroximetilnitrofural via oral. Na tabela 13 se encontram os parâmetros farmacocinéticos dessas duas situações para comparação estatística.

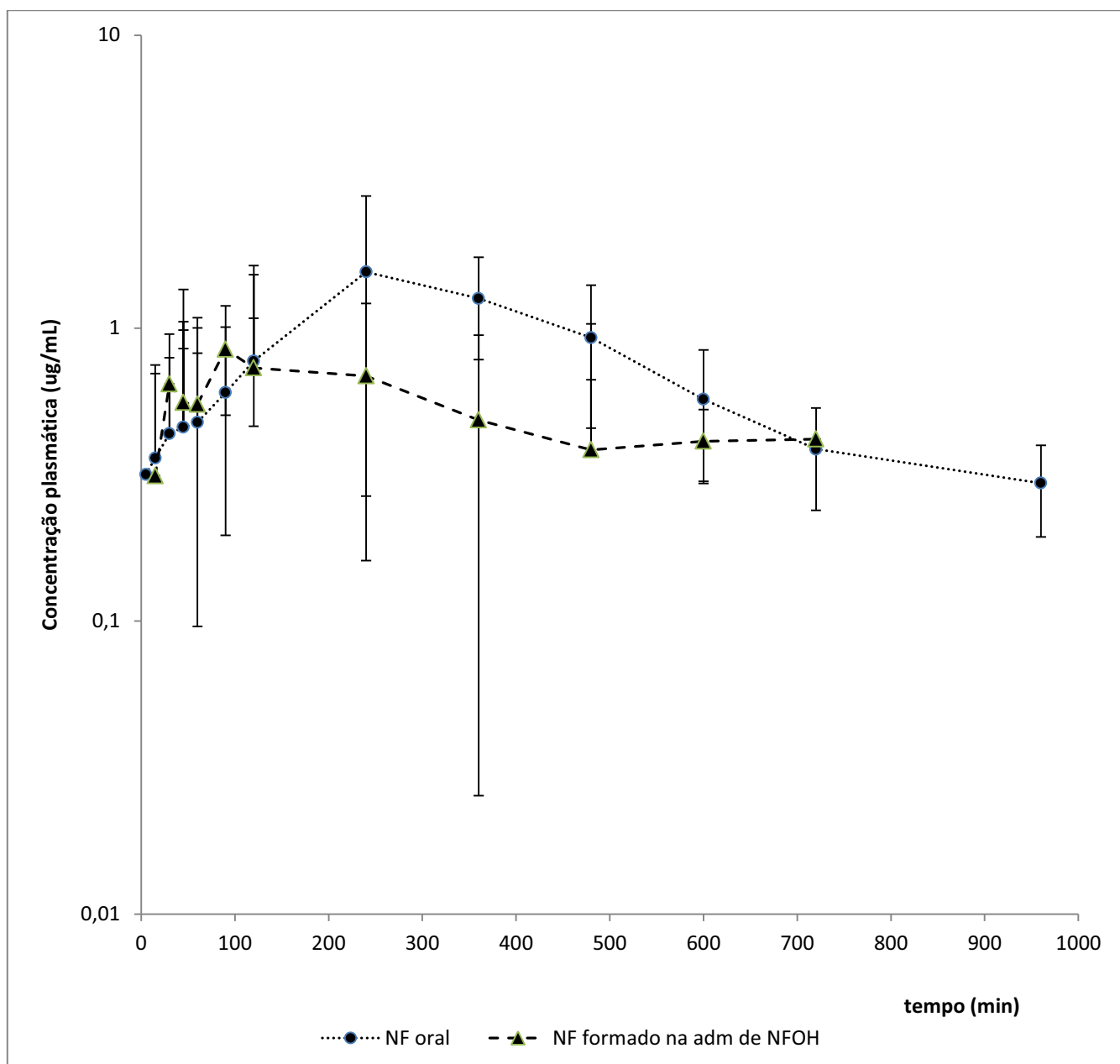


Figura 11. Perfil farmacocinético médio (IC95) das administrações de NF oral 63,5 mg/kg (n=5) e NF formado de NFOH 80,5 mg/kg (n=5).

Parâmetros	Via de administração	
	NF oral (n = 5)	NF de NFOH oral (n = 5)
kel (min ⁻¹)	0,0025 (-0,00986 - 0,03102)	0,0025 (-0,00001 - 0,0052)
Meia vida eliminação (min)	276,09 (56,91–301,10)	562,87 (-49,29 - 1175,10)
ASC 0-45 (ug/ml.min)	726,90 (198,26–1053,60)	243,87 (110,88 - 376,86)
ASC 0-∞ (ug/ml.min)	844,79 (232,89–1179,80)	566,44 (254,33 - 955,08)
R áreas (%)	86,04 (85,53 - 91,25)	50,56 (15,79–85,35)
Cl (ml/min.kg)	96,10 (54,25 - 137,94)	79,01 (40,13 - 117,90)
Vd (ml/kg)	35206,89 (15268,00–55146,00)	48602,90 (12987,00 - 84218,00)
Foral (%)	114,97	60,1

Tabela 13. Média (IC95) dos parâmetros farmacocinéticos do nitrofural obtido do pró-fármaco NFOH onde kel - constante de eliminação; ASC - área sob a curva; R áreas - relação das áreas sob a curva; Cl – clearance; Vd – volume de distribuição. Diferença estatística ($p < 0,05$) é representada por *.

Não observamos diferenças estatísticas significativas entre os perfis do NF administrado pela via oral e do NF proveniente da administração do NFOH pela mesma via. Uma importante informação obtida neste estudo foi a biodisponibilidade oral (Foral) de NF a partir da administração do NFOH, que é de cerca de 60%. Este valor significa que cerca de 60% do pró-fármaco administrado é convertido à NF e isto deve ser considerado no planejamento do próximo estudo a ser realizado.

A biodisponibilidade oral do NF a partir da administração do NFOH é dependente de vários processos que ocorrem simultaneamente: absorção do NFOH no trato digestório, conversão do NFOH a NF nesse local, absorção do NF formado na luz intestinal e conversão do NFOH no sistema porta-hepático.

O parâmetro clearance relaciona-se não somente aos processos de excreção de um fármaco, mas também a todos os mecanismos que contribuem para a sua retirada do organismo, o que inclui a biotransformação, gerando outros produtos. Embora o NF proveniente do NFOH esteja submetido aos processos de depuração enzimática do próprio pró-fármaco - que poderiam contribuir significativamente para eliminação do produto - os valores de clearance entre os grupos não apresentaram diferenças estatísticas significativas. Na verdade, estes processos de depuração apenas contribuíram para reduzir significativamente a biodisponibilidade oral de NF após administração oral de NFOH.

A meia-vida de eliminação de um composto é um dos parâmetros utilizados para o planejamento de regimes de dose. Não observamos diferenças estatísticas significativas nesse parâmetro entre os grupos estudados. A meia-vida de eliminação é um parâmetro híbrido que depende de dois processos fisiológicos primários: distribuição e eliminação. A meia-vida é inversamente proporcional à distribuição de um composto, pois quanto maior a amplitude de distribuição menor o acesso do fármaco aos sítios de depuração. A meia-vida, no entanto, é diretamente proporcional ao clearance, pois quanto mais rápido o processo de eliminação ocorrer, menor será a meia-vida de eliminação.

Observamos ainda que a exposição dos animais ao NF, seja administrado diretamente ou formado a partir do NFOH, foi a mesma. Este fato nos permite inferir que a administração do NFOH proporcionará níveis plasmáticos de NF satisfatórios.

Os parâmetros farmacocinéticos resultantes da administração oral de NFOH desse estudo em coelhos estão apresentados juntamente com os resultados obtidos da administração no estudo realizado por Serafim (2008), em ratos wistar, na tabela 14.

Parâmetros	Via de administração	
	NFOH oral coelhos (n = 5) Dose: 80,5 mg/kg	NFOH oral ratos* (n = 50) Dose: 200 mg/kg
kel (h ⁻¹)	0,264	0,099
Meia vida eliminação (h)	2,63	7
Cl/f (L/h/kg)	8,96	33,41
Vd/f (L/kg)	33,64	337,5
Tmax (h)	0,75	1
Cmax (ug/mL)	3,68	0,99

Tabela 14. Parâmetros farmacocinéticos do hidroximetilnitrofural em coelhos albinos e ratos wistar (Serafim, 2008) onde: kel - constante de eliminação; Cl – clearance; Vd – volume de distribuição Cmax – máxima concentração atingida; Tmax – tempo de cmax. *Serafim (2008).

Embora não seja possível a realização de comparações estatísticas entre o experimento realizado no presente projeto e o trabalho realizado por Serafim (2008), podemos evidenciar uma série de diferenças com relação ao perfil farmacocinético do NFOH entre os dois modelos animais.

Entre as principais evidências, destacamos a grande diferença nos níveis de Cmax observados – 3,68 e 0,99 ug/mL - entre coelhos e ratos, respectivamente; que pode ser resultante de maior absorção ou menor capacidade de degradação do composto no trato digestório de coelhos. Ressalte-se, estes níveis plasmáticos foram alcançados após administração oral de NFOH em diferentes doses – 80,5 mg/kg e 200 mg/kg - em coelhos e ratos, respectivamente. Com base nestes achados pode-se aventar uma série de hipóteses relacionadas às diferenças fisiológicas desses modelos.

As características de baixa solubilidade e alta absorção oral do composto NFOH apresentam grande similaridade com as observadas para o composto NF, sugerindo que o pró-fármaco possa ser da classe II, segundo o Sistema de Classificação Biofarmacêutica.

Como discutido anteriormente, esta classe de fármacos sofre grande interferência, por exemplo, dos níveis de secreção biliar, que em geral incrementa sua absorção por aumento de solubilidade do composto na luz do trato intestinal. O fluxo biliar de ratos é cerca de $\frac{1}{2}$ à $\frac{1}{3}$ do fluxo biliar de coelhos e, embora a concentração de sais biliares encontradas nas duas espécies seja relativamente similar, o maior fluxo pode contribuir no aumento da absorção do composto em coelhos (KARARLI, 1995).

Outro aspecto igualmente interessante é que a microflora de ratos é bastante ativa, e se encontra em grande quantidade em toda extensão do trato digestório. Essa grande quantidade está presente, inclusive, na principal porção onde ocorre absorção de fármacos, o intestino delgado. A microflora intestinal de ratos se concentra massivamente na parte distal do intestino delgado e a atividade de β -glicuronidase é alta em ambas as porções do intestino, tanto proximal quanto distal. Diferentemente do rato, os coelhos possuem uma baixa atividade de β -glicuronidase nas duas porções, embora haja grande concentração na porção distal do intestino delgado (ZWART, 1999). Esses fatores podem, em ratos, contribuir para maior ocorrência de degradação do composto NFOH anteriormente à sua absorção, determinando níveis plasmáticos menores em ratos do que aqueles observados em coelhos.

Na tabela 15 estão apresentados os parâmetros farmacocinéticos resultantes da administração oral de NF desse estudo em coelhos e os obtidos da administração no estudo realizado por Serafim, em ratos wistar.

Parâmetros	Via de administração	
	NF oral coelhos (n = 5) Dose: 63,5 mg/kg	NF oral ratos* (n = 50) Dose: 200 mg/kg
kel (h ⁻¹)	0,1506	0,178
Meia vida eliminação (h)	4,6	3,9
Cl/f (L/h/kg)	5,1	3,14
Vd/f (L/kg)	33,86	17,36
Tmax (h)	1	4
Cmax (ug/mL)	0,263	2,78

Tabela 15. Parâmetros farmacocinéticos do nitrofural em coelhos albinos e ratos wistar (Serafim, 2008) onde: kel - constante de eliminação; Cl – clearance; Vd – volume de distribuição Cmax – máxima concentração atingida; Tmax – tempo de cmax. *Serafim (2008).

Pode-se observar que, no caso do NF, Cmax é superior em ratos. Importante observar que a dose utilizada administrada em ratos é cerca de 2,5 vezes superior, mas Cmax é cerca de dez vezes superior. Esses achados, ao contrário do que ocorre com o composto NFOH, o NF apresenta maior absorção e/ou menor degradação quando administrado em ratos. Conforme citado anteriormente, o rato apresenta maior atividade de β -glicuronidase intestinal, e é possível que neste modelo animal exista grande eficiência na reabsorção do composto após secreção biliar na forma conjugada (ZWART, 1999).

Segundo Kararli (1995), o coelho albino possui a microflora intestinal muito semelhante aos humanos. A porção superior do trato gastrointestinal do humano e do coelho albino apresentam organismos em pequenos números, diferente de outras espécies. Enquanto bacteróides e bifidobactérias são as mais prevalentes nessas regiões do trato gastrointestinal de coelhos e humanos, outras espécies de bactérias são muito comuns em outros animais (GOLDMAN, 1978). Conforme ressaltado anteriormente, a microflora bacteriana exerce um importante papel de metabolização de entidades químicas presentes no organismo e podem reduzir a absorção de

fármacos no intestino. Dessa forma é possível que a administração oral de NF em humanos apresente um perfil de absorção muito semelhante ao modelo coelho albino, o que o torna mais adequado para produzir parâmetros farmacocinéticos mais adequados ao planejamento de futuros ensaios clínicos.

Os parâmetros farmacocinéticos do NF proveniente da administração oral de NFOH desse estudo em coelhos estão apresentados juntamente com os resultados obtidos da mesma administração no estudo realizado por Serafim (2008), em ratos wistar, na tabela 16.

Parâmetros	Via de administração	
	NF/NFOH oral coelhos (n = 5) Dose: 80,5 mg/kg	NF/NFOH oral ratos* (n = 50) Dose: 200 mg/kg
kel (h⁻¹)	0,15	0,231
Meia vida eliminação (h)	9,4	3
Cl/f (L/h/kg)	7,8	14,06
Vd/f (L/kg)	79,7	60,8
Tmax (h)	1,5	4
Cmax (ug/mL)	0,84	0,83

Tabela 16. Parâmetros farmacocinéticos do nitrofural obtido de NFOH em coelhos albinos e ratos wistar (Serafim, 2008) onde: kel - constante de eliminação; Cl – clearance; Vd – volume de distribuição Cmax – máxima concentração atingida; Tmax – tempo de cmax. *Serafim (2008).

Podemos observar que os valores de Cmax para o NF proveniente do NFOH são semelhantes em ambos os modelos animais. Este resultado permite hipotetizar que o NFOH é prontamente absorvido em coelhos para converter-se em NF e que é provável que o pró-fármaco seja convertido em quantidades significativas de NF na

luz intestinal, com consequentes concentrações plasmáticas de NF semelhantes nos dois modelos.

Pode-se evidenciar, ainda, que a meia vida de eliminação do NF proveniente de NFOH em coelhos apresenta valor cerca de 3 vezes superior àquela observada em ratos (9,4 vs 3 h). Esta diferença pode estar relacionada com o tempo necessário para que ocorra conversão do pró-fármaco ao fármaco matriz em coelhos, ou seja, a conversão seria fator limitante da eliminação. É importante ressaltar que a meia vida de eliminação do NF administrado por via oral foi semelhante em ambos os modelos (4,6 vs 3,9 h) e também muito próxima àquela observada para o NF proveniente de NFOH em ratos (3,0 h). Tais fatos corroboram a hipótese que a conversão de NFOH em NF ocorra mais precocemente em ratos, diminuindo a permanência do fármaco matriz no organismo.

A meia vida de eliminação é um parâmetro importante na seleção do intervalo de doses de um regime posológico de doses múltiplas. Considerando a maior similaridade de coelhos com humanos, uma meia vida de eliminação superior suporta um regime posológico com administrações menos frequentes, o que certamente é desejável para seu uso terapêutico.

Ressalte-se, neste trabalho, foi possível calcular a biodisponibilidade relativa de NF proveniente da administração oral de NFOH, parâmetro não determinado no estudo de Serafim devido à inexistência do grupo de administração de NF intravenoso. Este parâmetro farmacocinético e os outros determinados neste estudo são fundamentais para o planejamento do novo estudo pré-clínico com este pró-fármaco promissor, preferencialmente em coelhos albinos infectados por *T. cruzi* para a avaliação de eficácia e confirmação do regime posológico que agora pode ser proposto.

7. Conclusões

- O método bioanalítico validado demonstrou limites de confiança adequados a sua aplicação no estudo de farmacocinética e permitiu a determinação tanto do NF, quanto do NFOH.
- Na via de administração oral de NF, observa-se maior meia-vida de eliminação, sugerindo influência da baixa solubilidade do produto como fator limitante da absorção
- A biodisponibilidade oral do NF a partir do NFOH é de 60%, valor que deve ser considerado nos cálculos de planejamento do regime posológico que será adotado em estudos futuros.

8. BIBLIOGRAFIA

1. AMIDON, G.L.; LENNERNAES, H.; SHAH, V.P.; CRISON, J.R. **A theoretical basis for a biopharmaceutic drug classification: the correlation of in vitro drug product dissolution and in vivo bioavailability.** Pharm. Res. v.12 p.413-420, 1995.
2. AMORE, B.M.; GIBBS, J. P.; EMERY, M. G. **Application of *in vivo* animal models to characterize the pharmacokinetic and pharmacodynamic properties of drug candidates in discovery settings.** Comb Chem High T Scr v.13 p. 207-218, 2010.
3. ANANDAN, J. V. **Parasitic disease.** In: DIPIRO, J. T. S (Ed.). **Pharmacotherapy: a pathophysiologic approach.** 3rd ed. London: Appleton & Lange, p. 2161-2172, 1997.
4. ANDRADE, Z. A.; Z. A.; BRENNER, Z. **Ação da nitrofurazona(5-nitro-2 furaldeidos-semicarbazona) sobre as formas intracelulares do *Trypanosoma cruzi* na doença de Chagas experimental.** Rev Inst Med Trop Sao Paulo, v. 11, p 222-228, 1969.
5. ARMER, R.E., MORRIS, I.D. **Trends in early drug safety.** Drug News Perspect. v.17 n.2, 143-148, 2004.
6. BANKER, G.S.; RHODES, C.T. **Modern Pharmaceutics.** 4^a ed. M.Dekker Michigan University, 825p. 2002.
7. BARBOSA, C. F.; OKUDA, É. S.; CHUNG, M. C.; FERREIRA, E. I.; CICARELLI, R. G.B.; BARBOSA, C.F. **Rapid test for the evaluation of the activity of the prodrug hydroxymethylnitrofurazone in the processing of *Trypanosoma cruzi* messenger RNAs.** Braz J MedBiol Res., v. 40, n.1, p.33-39, jan. 2007.
8. BUGGINS, T.R.; DICKINSON, P.A.; TAYLOR, G. **The effects of pharmaceutical excipients on drug disposition.** Adv. Drug Deliv Rev. v.59 n.15 p. 1482-1503, 2007.

9. CASTRO, J.A.; DIAS DE TORANZO, E.G., **Toxic effects of nifurtimox and benznidazole, two drugs used against American trypanosomiasis (Chagas' disease).** Biomed Environ Sci. v.1 n.1 p.19-33, 1988.
10. CAZZULLO, J. J. **Proteinases of *Trypanosomacruzi*:potential targets for the chemotherapy of Chagas disease.** Curr Topics in Med Chem, v. 2, n. 11, p. 1261-1271, 2002.
11. CHUNG, M. C. **Planejamento e síntese de pró-fármacos recíprocos de nitrofurais e primaquina potencialmente antichagásicos.** São Paulo 196 p. [Tese de doutorado. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Universidade de São Paulo], 1996.
12. CHUNG, M.C. **O processo de latência no planejamento de fármacos.** Quim Nova, v. 22, n. 1, p. 75-84, 1999.
13. CHUNG, M.C. **Synthesis and in Vitro Evaluation of Potential Antichagasic Hydroxymethylnitrofurazone (NFOH-121): A New Nitrofurazone Prodrug.** Bioorg. Med. Chem. v.11 p.4779–4783, 2003.
14. CHUNG, M.C et.al **Latentiation and advanced drug transport forms.** Rev. Bras. Cienc. Farm. v.41 n.2 p.155-180, 2006.
15. COURA, J. R.; CASTRO, S. L. **A critical review on Chagas disease chemotherapy.** Mem Inst Oswaldo Cruz, v. 97, n.1, p. 3-24, 2002.
16. COURA, J.R.; DIAS, J.C.P.; **Epidemiology, control and surveillance of Chagas disease: 100 years after its discovery.** Mem Inst Oswaldo Cruz, v.104, p.31-40, 2010.
17. CRENSHAW, C. A; GLANGES, E.; STUART, B.H. **Nitrofurazone therapy in middle burns – review.** Curr Ther Res Clin Exp., v. 19, n.4 p. 487 – 492, 1976.

18. da Silva, F. C. **Ciclodextrinas como veículos para a administração de fármacos.** Rio de Janeiro: Portal dos Fármacos (http://www.portaldosfarmacos.ccs.ufrj.br/resenhas_ciclodextrinas.html), (Resenha Científica), 2008.
19. DIAS, L.R.S.; SANTOS, M.B. *et al.* **Synthesis, in vitro evaluation, and SAR studies of a potential antichagasic 1H-pyrazolo[3,4-b]pyridine series.** Bioorg Med Chem. v.15. p.211-219, 2007.
20. DIXIT, R.; BOELSTERLI, A. **Healthy animals and animal models of human disease(s) in safety assessment of human pharmaceuticals, including therapeutic antibodies.** Drug Discovery Today. v.12 n. 7/8 p.336-342, 2007.
21. FDA Guidance Document: **Guidance for Industry: M3 Nonclinical Safety Studies for the Conduct of Human Clinical Trials for Pharmaceuticals.** Washington: FDA, 1997.
22. FERREIRA, H. de O. **Forma aguda da doença de chagas tratada pela nitrofurazona.** Rev Inst Med Trop Sao Paulo p.287-289, 1961.
23. GALLERANO, R.H.; MAR, J.J.; SOSA, R.R. **Therapeutic efficacy of allupurinol in patients with chronic Chagas disease.** Am. J. Trop. Med.Hyg. v.43 159-166, 1990.
24. GIGANTE, F.; KAISER, M.;BRUN, R.; GILBERT, I.H. **SAR studies on azasterols as potential anti-trypanosomal and anti-leishmanialagents.** Bioorg Med Chem v.17 p. 5950-5961, 2009.
25. GOLDMAN, P. **Biochemical pharmacology of the intestinal flora.** Ann Rev Pharmacol Toxicol, v.18 p. 523-539, 1978.
26. GONÇALVES, M.F.; CHUNG, M.C.; COLLI, W.; MIRANDA, M.T.M.; FERREIRA **Efeito da associação da nitrofurazona e primaquina em células LLC-MK2 infectadas com formas tripomastigotas de Trypanossomacruzi.** E.I.. Rev. Soc. Bras. Med. Trop. 27, p.164-169, 1994.
27. GOOLE, J. *et al.* **The effects of excipientes on transporter mediated absorption.**Int. Journal of Pharm. v.393 n. 1-2 p.17-31, 2010.

28. GUIDO, R.V.C et al. **Hydroxymethylnitrofurazone, a potential antichagasic prodrug with decreased mutagenicity activity related to nitrofurazone.** Rev Ciênc Farm. v.22 p.319-333, 2001.
29. HUCKE, O. *et al*: **The protein farnesyltransferase inhibitor tipifarnib as a new lead for the development of drugs against Chagas disease.** J. Med. Chem, v.48 n.17 p.5415–5418, 2005.
30. HENDERSON, G. B.; ULRICH, P.; FAIRLAMB, A. H. ROSENBERG. I.; PEREIRA, M.; SELA, M.; CERAMI, A. **Subversive substrates for the enzyme trypanothione disulfide reductase: alternative approach to chemotherapy of Chagas disease.** Proc. Natl. Acad. Sci. USA, v. 85. n.15 p.141 – 150, 2004.
31. KARARLI, T.T. **Comparison of the gastrointestinal anatomy, physiology, and biochemistry of humans and commonly used laboratory animals.** Biopharm Drug Disp n.16 p.351 – 380, 1995.
32. LIN, H.J; LU, Y.H. **Role of pharmacokinetics and metabolism in drug discovery and development.** Pharm. Rev. v.40 4 p.403-449, 1997.
33. MAYER, M.; ROCHA LIMA, H. **Zur Entwicklung von *Schizotrypanum cruzi* in Saenetieren.** Archff Schisffs u Tropen Hyg v.16 p.90-94, 1912.
34. NEERVANAN, S. **Preclinical formulations for discovery and toxicology: physicochemical challenges.** Expert Opin. Drug Metab. Toxicol. v.2 n.5 p.715-731, 2006.
35. NOUWS, J. F. M.; VREE, T. B.; AERTS, M. M. L.; DEGEN, M.; DRIESSENS, F. **Some pharmacokinetic data about furaltadone and nitrofurazone administered orally to preruminant calves.** Veterinary Quarterly, v.9 n.3 p.208-214, 1987.
36. O'DRISCOLL, C.M.; GRIFFIN, B.T. **Biopharmaceutical challenges associated with drugs with low aqueous solubility – The potential impact of lipid-based formulations.** Adv. Drug Deliv Rev. v.60 p.617–624, 2008.
37. OTERO, L. *et al*. **Novel antitrypanosomal agents based on the Palladium Nitrofurylthiosemicarbazone complexes: DNA and redox metabolism as potential therapeutic targets.** J Med Chem., v.49, n.11, p.3322-3331, 2006.

38. PACHANGNULA, R.; THOMAS, N.S. **Biopharmaceutics and pharmacokinetics in drug research.** Int J Pharm., v.201 n.2 p.131-50, 2000.
39. PASSANANTI, G.T.; SHIVELY, C.A.; VESELL, E.S. **Orally administered dimethyl sulfoxide: its effects on blood concentrations of salicylic acid, sulfanilamide, and warfarin.** Ann N Y Acad Sci. v.243 p.311-316, 1975.
40. PATE, P. G., WOLFSON, J. S., MCHUGH, G. L., PAN, S. C. & SWARTZ, M. N. **Novobiocin antagonism of amastigotes of *Trypanosoma cruzi* growing in cell-free medium.** Antimicrob Agents and Ch v.29 p.426–431, 1986.
41. PESTEL, S.; MARTIN, H.J.; MAIER, G.M., GUTH, B. **Effect of commonly used vehicles on gastrointestinal, renal and liver function in rats.** J Pharmacol Toxicol Methods v.54 n.2 p.200-214, 2006.
42. RAETHER, W.; HÄNEL, H. **Nitroheterocyclic drugs with broad spectrum activity.** Parasitol Res. v.90 n.1 p.19-39, 2003.
43. RAMIREZ, L.E.; BRENER, Z. **Evaluation as a model for Chagas' disease. I. Parasitological studies.** Mem. Inst. Oswaldo Cruz, v.84, n.4 p.531-536, 1987.
44. REITHINGER, R. ; TARLETON, R.L.; URBINA, J.A.; KITRON, U.; GÜRTLER, R.E. **Eliminating Chagas disease: Challenge and a roadmap.** BMJ. v.14 p.338-345, 2009.
45. RIVAROLA, H.W.; PAGLINI-OLIVA, P.A. ***Trypanosoma cruzi* Trypanothione Reductase Inhibitors: Phenothiazines and Related Compounds Modify Experimental Chagas' Disease Evolution.** Curr Drug Targets Cardiovasc Haematol Disord, v.2, n.10 p. 43-52, 2002.
46. SERAFIM, **Conversão in vitro e ex vivo do pró-fármaco hidroximetilnitrofural, candidato a fármaco antichagásico.** Tese de Doutorado 133 p. Universidade Estadual Paulista Júlio De Mesquita Filho UNESP, 2008.
47. SINGH, **Preclinical Pharmacokinetics: An Approach Towards Safer and Efficacious Drugs.** Curr Drug Metab v.7 p.165-182, 2006.

48. TEKIEL, V. *et al.* **Identification of novel vaccine candidates for Chagas' disease by immunization with sequential fractions of a trypomastigote cDNA expression library.** *Vaccine* v.27 p.1323–1332, 2009.
49. TOUTAIN, P. L., BOUSQUET-ME'LOU, A. **Volumes of distribution.** *J. vet. Pharmacol. Therap.* v.27 p.441–453, 2004.
50. TRACY, J.W.; WEBSTER JR., T. **Chemoterapy of parasitic infections.** In: HARDMAN, J. G.; LIMBIRD, L. E.; GILMAN, A. G. (4 Ed.) *Goodman & Gilman's the pharmacological basics of therapeutics.* p.1059-1069, 2001.
51. Van de WATERBEEMD, H. **The fundamental variables of the biopharmaceutics classification system (BCS): a commentary.** *Eur J Pharm Sci.* v.7 n.1: p.1-3, 1998.
52. van de WATERBEEMD, H.; GIFFORD, E. **ADMET *in silico* modelling: towards prediction paradise?** *Nature Reviews Drug Discovery* v.2, p.192-204, 2003.
53. ZWART, L.L. *et al.* **Anatomical and physiological differences between various species used in studies on the pharmacokinetics and toxicology of xenobiotics, a review of literature.** RIVM report, 101 p, 1999.

9 . ANEXOS

Anexo 1 – Aprovação do Comitê de Ética



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



Protocolo CEP/FCF/CAr nº 02/2011

Interessado: MARCO ANTONIO FERRAZ NOGUEIRA FILHO

Orientador: Profa. Dra. Rosângela Gonçalves Peccinini

Projeto: Farmacocinética pré-clínica e hepatotoxicidade do hidroximetilnitrofural (NFOH) – potencial pró-fármaco antichagásico.

Parecer nº 07/2011 – Comitê de Ética em Pesquisa

O Comitê de Ética em Pesquisa desta Faculdade considerou o protocolo para uso de animais na pesquisa "Farmacocinética pré-clínica e hepatotoxicidade do hidroximetilnitrofural (NFOH) – potencial pró-fármaco antichagásico" estruturado dentro dos princípios éticos na experimentação animal do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal – COBEA, manifestando-se FAVORÁVEL à sua execução.

O relatório final do protocolo de pesquisa, com no máximo três folhas (espaço 1,5 e letra 12) deverá ser entregue em janeiro de 2014.

Araraquara, 10 de março de 2011.

Prof. Dr. HENRIQUE FERREIRA
Coordenador do CEP

Concentrações plasmáticas em administração oral de NF em coelhos albinos							
Tempo	A1	A2	A3	A4	A5	MEDIA	IC - IC +
5	0,083	0,066	0,317	0,149	0,042	0,317	0,000 0,000
15	0,201	0,195	0,330	0,715	0,043	0,360	-0,020 0,749
30	0,239	0,234	0,355	0,917	0,069	0,436	-0,080 0,954
45	0,240	0,254	0,398	0,943	0,128	0,459	-0,067 0,985
60	0,262	0,274	0,322	1,049	0,136	0,477	-0,131 1,085
90	0,499	0,488	0,607	1,147	0,272	0,603	0,196 1,009
120	0,627	0,536	0,676	1,167	0,854	0,772	0,463 1,082
240	3,392	0,909	1,289	1,013	1,172	1,555	0,267 2,824
360	1,514	1,710	1,366	0,788	0,941	1,264	0,782 1,746
480	1,478	0,934	1,075	0,651	0,504	0,928	0,456 1,401
600	0,800	0,742	0,399	0,625	0,292	0,572	0,300 0,843
720	0,358	0,354	0,374	0,584	0,263	0,386	0,239 0,534
960	0,304	0,288	0,041	0,176	0,158	0,296	0,194 0,398

Concentrações plasmáticas em administração oral de NFOH em coelhos albinos								
Tempo	A1	A2	A3	A4	A5	MÉDIA	ic-	ic +
5,000	0,284	0,107	0,187	0,284	0,104	0,284	0,282	0,287
15,000	0,320	2,088	0,637	0,491	0,792	0,866	-0,010	1,741
30,000	1,088	8,497	0,763	0,642	0,990	2,396	-1,844	5,636
45,000	1,741	8,851	1,354	0,813	5,650	3,682	-0,619	7,983
60,000	2,493	7,615	2,395	1,827	3,829	3,632	0,721	6,542
90,000	1,730	2,852	1,829	1,539	2,164	2,023	1,382	2,663
120,000	0,992	1,758	0,823	0,657	1,768	1,200	0,544	1,855
240,000	0,347	0,670	0,464	0,271	0,830	0,516	0,229	0,803
360,000	0,279	0,254	0,322	0,196	0,264	0,263	0,206	0,320
480,000	0,300	0,166	0,267	0,190	0,098	0,283	0,076	0,491
600,000	0,206	0,093	0,167	0,093	0,091	0,206	0,000	0,000
720,000	0,196	0,091	0,093	0,094	0,091	0,196	0,000	0,000
960,000	0,094	0,092	0,090	0,090	0,090			

Concentrações plasmáticas de NF obtido da administração oral de NFOH em coelhos albinos								
Tempo	A1	A2	A3	A4	A5	MÉDIA	IC -	IC +
5,000	0,167	0,050	0,154	0,042	0,043			
15,000	0,100	0,232	0,396	0,044	0,113	0,314	0,000	0,000
30,000	0,046	0,721	0,922	0,077	0,294	0,646	-0,151	1,442
45,000	0,237	0,700	0,418	0,104	0,875	0,557	0,104	1,011
60,000	0,334	0,877	0,633	0,201	0,702	0,549	0,206	0,893
90,000	0,371	0,799	0,785	0,215	2,067	0,847	-0,057	1,751
120,000	0,364	0,438	1,099	0,479	1,278	0,732	0,206	1,258
240,000	0,276	1,108	0,952	0,330	0,769	0,687	0,227	1,148
360,000	0,254	0,261	1,136	0,293	0,169	0,486	-0,204	1,136
480,000	0,434	0,041	0,341	0,377	0,045	0,384	0,268	0,500
600,000	0,411	0,048	0,089	0,114	0,051	0,411	0,000	0,000
720,000	0,418	0,043	0,043	0,058	0,045	0,418	0,000	0,000

Concentrações plasmáticas em administração intravenosa de NF em coelhos albinos								
Tempo	A1	A2	A3	A4	A5	MÉDIA	ic-	ic+
5	2,251955	2,314935	2,28639	3,159472	4,10657	2,823864	2,062	3,586
10	1,374312	2,27004	1,75067	2,878127	3,051446	2,264919	1,592	2,937
15	1,486598	1,304807	1,222471	1,841981	1,572348	1,485641	1,257	1,714
30	0,529026	0,540371	0,573744	0,732833	0,734787	0,622152	0,5252	0,7191
45	0,341363	0,398247	0,271121	0,567087	0,313834	0,37833	0,2702	0,4864
60	0,127062	0,226025	0,077908	0,358212	0,303092	0,330652	0,1184	0,4681

Concentrações plasmáticas em administração intravenosa de NFOH em coelhos albinos					
Tempo	A1	A2	A3	A4	A5
					MÉDIA
5,000	0,288	0,228	0,302	0,220	0,272
10,000	0,275	0,210	0,308	0,222	0,290
15,000	0,288	0,213	0,299	0,220	0,275
30,000	0,239	0,287	0,259	0,211	0,295
45,000	0,265	0,272	0,288	0,223	0,259
60,000	0,248	0,285	0,274	0,225	0,282
90,000	0,256	0,291	0,230	0,228	0,244
120,000	0,252	0,285	0,227	0,225	0,269
240,000	0,259	0,298	0,210	0,218	0,262
360,000	0,253	0,258	0,226	0,223	0,272
480,000	0,251	0,269	0,234	0,214	0,279
600,000	0,306	0,267	0,217	0,268	0,302
720,000	0,230	0,291	0,201	0,264	0,258
					0,249

Parâmetros	NF oral 1	NF oral 2	NF oral 3	NF oral 4	NF oral 5	média
kel (min-1)	0,00344	0,00302	0,00406	0,00121	0,00347	0,00251
meia vida eliminação (min)	201,4535	229,4702	170,6897	572,7273	199,7118	276,0956175
asc0-45 (ug/ml.min)	811,3848	960,6807	565,5186	515,8675	410,4729	726,9075992
asc0-inf (ug/ml.min)	899,7353	1056,004	657,63	998,4437	486,1214	844,7963695
r areas	0,901804	0,909732	0,859934	0,516672	0,844384	0,860453034
cl (ml/min.kg)	80,45699	68,55089	110,0771	72,50283	148,9134	85,6892887
vd (ml/kg)	23388,66	22698,97	27112,59	59919,7	42914,53	34139,15884
foral (%)	122,4525	143,7204	89,50239	135,8866	66,16035	114,9754425

Parâmetros	NFOH oral 1	NFOH oral 2	NFOH oral 3	NFOH oral 4	NFOH oral 5	media
kel (min-1)	0,007	0,011	0,005	0,008	0,009	0,00444
meia vida eliminação (min)	99	63	138,6	86,625	77	156,0811
asc0-45 (ug/ml.min)	378,5756009	776,0213738	322,0463603	210,9116176	510,5586406	494,7767
asc0-inf (ug/ml.min)	406,5718478	799,1235443	361,2205739	235,3955011	539,8969331	538,9149
r areas	0,931140715	0,971090615	0,891550436	0,895988312	0,945659457	0,918098
cl (ml/min.kg)	197,9969849	100,7353626	222,8555232	341,9776488	149,1025325	149,3742
vd (ml/kg)	28285,28355	9157,760236	44571,10465	42747,2061	16566,94805	33642,84

Parâmetros	NF de NFOH oral 1	NF de NFOH oral 2	NF de NFOH oral 3	NF de NFOH oral 4	NF de NFOH oral 5	media
kel (min-1)	0,0006	0,0027	0,0028	0,0007	0,0059	0,0025
meia vida eliminação (min)	1194,8276	260,5263	249,2806	992,6945	117,0608	562,8779
asc0-45 (ug/ml.min)	233,5931	241,2792	407,3177	106,3816	230,7919	243,8727
asc0-inf (ug/ml.min)	955,0792	339,2960	530,0598	647,1331	360,6549	566,4446
r areas	0,2446	0,7111	0,7684	0,1644	0,6399	0,5057
cl (ml/min.kg)	40,556	114,16	73,07	59,85	107,40	79,01
vd (ml/kg)	69925,59	42918,37	26286,57	85741,20	18142,20	48602,93

Parâmetros	NF IV 1	NF IV 2	NF IV 3	NF IV 4	NF IV 5	média
kel (min-1)	0,04	0,04	0,05	0,04	0,05	0,04
meia vida eliminação (min)	17,325	17,325	13,86	17,325	13,86	17,325
asc0-45 (ug/ml.min)	49,96792	54,51537	50,28207	79,80818	79,93605	65,20995
asc0-inf (ug/ml.min)	58,50199	64,47156	55,70449	88,76348	85,99789	73,47624
r areas	0,854123	0,845572	0,902658	0,899111	0,929512	0,887497
cl (ml/min.kg)	108,5433	98,49305	113,9944	71,53843	73,83902	86,42249
vd (ml/kg)	2713,583	2462,326	2279,888	1788,461	1476,78	2160,562