



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas



Eduardo Henrique Vivêncio

Farmacocinética pré-clínica do praziquantel carreado por micropartículas inorgânicas

Orientadora: Prof^a Dr^a Rosângela Gonçalves Peccinini

Araraquara - SP

2022



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas



Eduardo Henrique Vivêncio

Farmacocinética pré-clínica do praziquantel carreado por micropartículas inorgânicas

Dissertação de Mestrado 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.

Orientadora: Prof^a Dr^a Rosângela Gonçalves Peccinini

Araraquara - SP

2022

V857f

Vivêncio, Eduardo Henrique.
Farmacocinética pré-clínica do praziquantel carregado por
micropartículas inorgânicas / Eduardo Henrique Vivêncio. –
Araraquara: [S.n.], 2022.
85 f. : il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista. "Júlio de
Mesquita Filho". Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de
Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas. Área de Pesquisa e
Desenvolvimento de Fármacos e Medicamentos.

Orientadora: Rosângela Gonçalves Peccinini.

1. Praziquantel. 2. Farmacocinética. 3. Hidróxidos duplos
lamelares. 4. HPLC. I. Peccinini, Rosângela Gonçalves, orient. II. Título.

Diretoria do Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - Faculdade de Ciências Farmacêuticas
UNESP - Campus de Araraquara

CAPES: 33004030078P6
Esta ficha não pode ser modificada



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Araraquara



CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: Farmacocinética pré-clínica do praziquantel carreado por micropartículas inorgânicas

AUTOR: EDUARDO HENRIQUE VIVÊNCIO

ORIENTADORA: ROSANGELA GONCALVES PECCININI

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Mestre em Ciências Farmacêuticas, área: Pesquisa e Desenvolvimento de Fármacos e Medicamentos pela Comissão Examinadora:

Profa. Dra. ROSANGELA GONCALVES PECCININI (Participação Virtual)
Departamento de Farmacos e Medicamentos / Faculdade de Ciências Farmacêuticas UNESP Araraquara

Prof. Dr. PEDRO JOSÉ ROLIM NETO (Participação Virtual)
Departamento de Ciências Farmacêuticas / Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Dr. MARLUS CHORILLI (Participação Virtual)
Departamento de Farmacos e Medicamentos / Faculdade de Ciências Farmacêuticas UNESP Araraquara

Araraquara, 16 de dezembro de 2021

DEDICATÓRIA

Poderia dedicar esse trabalho para várias pessoas que estiveram comigo todo esse tempo de mestrado, me apoiando e se disponibilizando de alguma forma para me proporcionar conforto e dedicação ao compromisso que firmei com a Unesp. Infelizmente, a vida não é como planejamos e as coisas podem tomar rumos inesperados e algumas vezes dolorosos. Por isso, dedico esse trabalho exclusivamente ao meu pai, Paulo Henrique Vivencio, que nos deixou nesse meio tempo, trazendo muita saudade e lembranças maravilhosas. Pai, eu te amo!

AGRADECIMENTOS

Agradeço à toda minha família pelo suporte que foi proporcionado nos momentos de maior dificuldade, em especial à minha mãe, pai e irmão, que mais estiveram presentes em todo esse tempo de pós graduação.

Agradeço à minha namorada, Rafaela Baldassari, também pós graduanda da FcFar e que me auxiliou em diversas fases do mestrado.

Agradeço à professora e orientadora Dra. Rosângela Gonçalves Peccinini, pessoa que mais me auxiliou nesse tempo de mestrado, sempre tentando me ajudar nas dificuldades e orientando da melhor forma para que mesmo longe da faculdade, pudesse formar um profissional capacitado, sua energia e vontade de ensinar sempre será exemplo para mim, muito obrigado! Não se esqueça do seu aluno, Eduardo Socorro!!!

Aos amigos que formei nesse tempo, Lucas Gomes, Willian Costa, Ricardo Benini, Lucas Barreto, Jonata Oliveira, Igor Gouvea e Evelin Martins. Vocês fazem parte da construção desse trabalho, muito obrigado pelo auxílio e aprendizado.

À Unesp pela estrutura proporcionada, UFPE pelos insumos fornecidos.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

RESUMO

O praziquantel (PZQ) é fármaco de escolha no tratamento da esquistossomose, porém, sua baixa solubilidade em água pode ser um problema nas administrações orais. O PZQ, ainda, sofre extenso metabolismo pré-sistêmico, o que leva à expectativa de que os níveis plasmáticos atingidos na administração oral apresentem alta variabilidade, com reflexos significativos sobre o desfecho clínico. Formulações com hidróxidos duplos lamelares (HDL) como excipientes funcionais em micropartículas inorgânicas têm sido desenvolvidas com a finalidade de melhorar o perfil de dissolução e a biodisponibilidade oral de fármacos. Neste estudo, o objetivo foi avaliar o impacto de uma nova formulação desenvolvida como sistema PZQ-HDL, pelo Laboratório de Tecnologia de Medicamentos da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), sobre o perfil farmacocinético do PZQ em ratos wistar. Foi desenvolvido e validado um método bioanalítico para a determinação de PZQ em plasma de ratos por HPLC/UV. O fármaco foi administrado em quatro grupos de animais: por via intravenosa (IFA, 20 mg/kg) e por via oral (IFA dispersão sem adjuvantes funcionais, suspensão oral comercial - SO e PZQ carregado por HDL; 200 mg/kg), com coleta seriada de sangue para a quantificação do PZQ no período de até 360 e 480 minutos, respectivamente. Não foram observados níveis quantificáveis de PZQ no grupo de que recebeu IFA dispersão pela via oral. Os parâmetros farmacocinéticos principais estimados para o grupo IV, PZQ-HDL e Suspensão comercial foram: K_{el} (min^{-1}) – 0,038, 0,006 e 0,005; $t_{1/2}$ (min) – 18,2, 115,50 e 136,6; ASC_0-t ($\mu\text{g/mL}\cdot\text{min}$) – 329,99, 1278,50 e 522,7; $ASC_0-\text{inf}$ ($\mu\text{g/mL}\cdot\text{min}$) – 379,6, 1346,74 e 585,4; Cl ($\text{mL}/\text{min}/\text{Kg}$) – 12,64, 52,69 e 52,7; V_d (mL/Kg) – 332,78, 8780,94 e 10537,1; MRT (min) – 28, 153,07 e 196,7. Observou-se que, a partir dos 10 minutos iniciais, o grupo que recebeu a formulação HDL apresentou concentrações plasmáticas de PZQ sempre superiores, demonstrando que o processo de absorção foi incrementado quando comparado com a administração da formulação SO. A biodisponibilidade oral ($F\%$) foi de 36,2 e 16,1 para HDL e SO, respectivamente. Este resultado nos permite inferir que as partículas inorgânicas aumentaram a quantidade de fármaco absorvida, o que representa êxito na proposta da formulação. Ensaio com outros modelos animais devem ser realizados para o avanço do desenvolvimento do produto farmacêutico com perspectivas promissoras.

Palavras Chave: praziquantel; farmacocinética; hidróxidos duplos lamelares; HPLC.

ABSTRACT

Praziquantel (PZQ) is the drug of choice in the treatment of schistosomiasis, however, its low water solubility can be limiting for its oral administration. PZQ also undergoes extensive pre-systemic metabolism, which leads to the expectation that the plasma levels reached after oral administration will show high variability, with significant effects on the clinical outcome. Formulations with lamellar double hydroxides (HDL) as functional excipients in inorganic microparticles have been developed with the aim of improving the dissolution profile and oral bioavailability of drugs. In this study, the objective was to evaluate the impact of a new formulation developed as a PZQ-HDL system, developed by the Medicinal Technology Laboratory of the Federal University of Pernambuco (UFPE), on the pharmacokinetic profile of PZQ in Wistar rats. A bioanalytical method for the determination of PZQ in rat plasma was developed and validated by HPLC/UV. The drug was administered in four groups of animals: intravenously (IFA, 20 mg/kg) and orally (IFA suspension without functional adjuvants, commercial oral suspension - SO and PZQ carried by HDL; 200 mg/kg), with serial blood collection for PZQ quantification within 360 and 480 minutes, respectively. No quantifiable levels of PZQ were observed in the group that received IFA suspension orally. The main pharmacokinetic parameters estimated for group IV, PZQ-HDL and commercial suspension were: K_{el} (min^{-1}) – 0.038, 0.006 and 0.005; $t_{1/2}$ (min) - 18.2, 115.50 and 136.6; AUC_{0-t} ($\mu\text{g/ml.min}$) - 329.99, 1278.50 and 522.7; $AUC_{0-\infty}$ ($\mu\text{g/ml.min}$) - 379.6, 1346.74 and 585.4; Cl (mL/min/Kg) - 12.64, 52.69 and 52.7; V_d (mL/Kg) - 332.78, 8780.94 and 10537.1; MRT (min) - 28, 153.07 and 196.7. It was observed that, during the initial 10 minutes, the group that received the HDL formulation had always higher plasma concentrations of PZQ, demonstrating that the absorption process was increased when compared to the administration of the SO formulation. The oral bioavailability (%F) was 36.2 and 16.1 for HDL and SO, respectively. This result allows us to infer that the inorganic particles increased the amount of drug absorbed, which represents the success of the formulation proposed. Assays with other animal models should be carried out to advance the development of the pharmaceutical product with promising perspectives.

Keywords: praziquantel; pharmacokinetics; double lamellar hydroxides; HPLC

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

ADME – Fenômenos farmacocinéticos: absorção, distribuição, metabolismo e excreção

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

AS0-∞ – Área sob a curva de zero extrapolado ao infinito

ASC0-t – Área sob a curva de zero ao último tempo quantificável

ASMC0-∞ – Área sob o momento da curva de zero extrapolado ao infinito

ASMC0-t – Área sob o momento da curva de zero ao último tempo quantificável

CQA – Controle de qualidade alto

CQB – Controle de qualidade baixo

CQM – Controle de qualidade alto

DIC – Diclofenaco

F oral – Biodisponibilidade absoluta

FDA – Food drug administration

H – Hora

HPLC – High performance liquid chromatography

IFA – Insumo farmacêutico ativo

K_a – Constante de absorção

K_{el} – Constante de eliminação

kg – Quilograma

L – Litros

LAFEPE (Laboratório Farmacêutico do Estado de Pernambuco)

LIQ – Limite inferior de quantificação

LTM – Laboratório de Tecnologia de Medicamentos

MAT (tempos médios de residência, trânsito e de absorção)

MIN – Minutos

MN – Nanômetros

PI – Padrão interno

Pka – constante de ionização

PZQ – Praziquantel

RBA – relative bioavailability (em português, biodisponibilidade relativa)

T1/2 – Meia vida de eliminação

T1/2a – Meia vida de absorção

UFPE – Universidade Federal de Pernambuco

VC – Volume de distribuição central

VS – Volume de distribuição

Vd_{area} – Volume de distribuição de pseudo-equilíbrio

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

LISTA DE TABELAS E QUADROS

Tabela 1 – Planejamento das coletas no dia do experimento.

Tabela 2 – Parâmetros farmacocinéticos e sua forma de obtenção.

Tabela 3 – Precisão e exatidão das curvas intradia e interdia do método bioanalítico (0,625 ug/mL, 2,5 ug/mL e 8 ug/mL, respectivamente).

Tabela 4 – Porcentagem da recuperação dos controles baixo, médio e alto (0,625 ug/mL, 2,5 ug/mL e 8 ug/mL, respectivamente).

Tabela 5 – Resultado do efeito residual, razão entre PZQ/DIC.

Tabela 6 – Precisão e exatidão das estabilidades realizadas na validação do método bioanalítico.

Tabela 7 – Parâmetros farmacocinéticos (Grupo IV n= 8; 20 mg/kg; grupo SO (n= 20; 200 mg/kg). Valores expressos como média

Tabela 8 – Parâmetros farmacocinéticos (Grupo IV n= 8; 20 mg/kg; grupo PZQ-HDL (n= 20; 200 mg/kg). Valores expressos como média

Tabela 9 – Concentrações plasmáticas versus tempo dos grupos PZQ-HDL (n= 20; 200 mg/kg) e SO (n= 20; 200 mg/kg). Valores expressos como mediana, média (IC95).

Tabela 10 – Parâmetros farmacocinéticos (Grupo PZQ-HDL n= 20; 200 mg/kg; grupo SO (n= 20; 200 mg/kg). Valores expressos como mediana, média (IC95)

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Estrutura química e formas enantioméricas do Praziquantel.

Figura 2 – Cromatograma do PZQ e P.I na concentração de 100 ug/mL e 25 ug/mL respectivamente.

Figura 3 – Curva de calibração do método bioanalítico.

Figura 4 – Concentração plasmática em função do tempo – grupo intravenoso (n= 8; 20 mg/kg).

Figura 5 – Perfil farmacocinético do PZQ administrado em ratos wistar, por gavagem, da suspensão oral (n= 20; 200 mg/kg).

Figura 6 – Perfil farmacocinético do PZQ administrado em ratos wistar, por gavagem, da formulação PZQ-HDL (n= 20; 200 mg/kg).

Figura 7 – Perfil farmacocinético do PZQ administrado em ratos wistar, por gavagem, da formulação PZQ-HDL (n= 20; 200 mg/kg) e da suspensão oral comercial (SO).

Figura 8 - Comparação das formulações (IFA, Suspensão comercial e HDL), respectivamente.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 REVISÃO DA LITERATURA	18
2.1 Esquistossomose: a doença e o tratamento	18
2.2 Praziquantel: aspectos biofarmacêuticos, farmacológicos e toxicológicos.....	20
2.3 Farmacocinética e suas relações com a fase biofarmacêutica e os efeitos farmacológicos.....	26
3 OBJETIVOS	33
3.1 Objetivo geral	33
3.2 Objetivos específicos	33
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	34
4.1 Desenvolvimento e validação do método bioanalítico para a determinação do PZQ em amostras de plasma.....	37
4.2 Avaliação do perfil farmacocinético do PZQ em ratos Wistar	42
4.3 Análise estatística	49
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	50
5.1 Desenvolvimento e validação do método analítico	50
5.2 Avaliação do perfil farmacocinético do PZQ em ratos Wistar	56
6 CONCLUSÕES	72
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	73
ANEXO A (COMITE DE ETICA NO USO DE ANIMAIS)	79

1 INTRODUÇÃO

A esquistossomose é uma doença que acomete cerca de 78 países no mundo, cerca de 250 milhões de pessoas, além disso, quase o triplo dessa população vive juntamente em regiões de grande foco de contaminação. No Brasil estima-se que existam, em média cerca de 1,5 milhões de infectados. No estado de Alagoas e Minas Gerais ocorrem os maiores índices de contaminação pela doença, seguidos pelo estado de Pernambuco. Existem diversos fatores relacionados à prevalência da doença nessas regiões como, por exemplo, a precariedade na higiene pessoal e do saneamento básico além do hábito de uso recreacional de lagoas e represas (Brasil. Ministério da saúde, 2018). Ainda, a migração da população para regiões centrais, em busca de emprego e melhores condições de vida incrementa a disseminação nas grandes cidades.

O estado de Pernambuco vem se aprimorando no combate e na prevenção da doença através de estudos com base de dados estatísticos. O programa denominado SISPCE (Sistema de informação do Programa de Controle da Esquistossomose) e o programa Sanar (Plano para Redução e Eliminação das Doenças Negligenciadas no Estado de Pernambuco) realizam coleta de dados para as regiões de maior índice da doença e orienta as organizações de saúde para o seu combate (Araújo Soares *et al.*, 2019).

Entre 2007 e 2015 o percentual de casos positivados de esquistossomose caíram de maneira significativa, visto que em 2007 era de 10,3% e 2015 houve uma regressão para 3%. Esse resultado mostra a importância desses programas na participação direta com a população afetada e busca imediata pelo tratamento, para que não ocorra disseminação de casos (Araújo Soares, 2019)

A esquistossomose, no homem, é causada por trematódeos do gênero *Schistosoma* cujos principais agentes etiológicos são as espécies *S. mansoni*, *S. haematobium* e *S. japonicum* (Pordeus, 2008). O tratamento da esquistossomose consiste na redução ou diminuição da carga parasitária do hospedeiro, impedindo a evolução para as formas

graves da doença, além de minimizar a produção e a eliminação dos ovos para impedir a sua transmissão.

O primeiro fármaco empregado no tratamento da esquistossomose foi o tártaro emético (tartarato de antimônio e potássio), administrado por via endovenosa. Efeitos adversos como náuseas, vômitos, diarreia, anorexia, alterações cardíacas e hepáticas e distúrbios dermatológicos foram observados. Ainda, foram relatados episódios letais devidos à síncope cardíaca ou choque anafilático com a administração do fármaco (Rath *et al.*, 2003). O dimercaptossuccinato de sódio e o di-(pirocatecol-2,4-dissulfonato) de sódio, conhecido como estibofeno, surgiram posteriormente como alternativas ao tratamento da esquistossomose, mas os inúmeros efeitos adversos, principalmente relacionados às discrasias sanguíneas, resultaram no abandono do uso terapêutico desses produtos. Na década de 60, produtos como o niridazol, hicantona, oxamniquina e metrifonato foram introduzidos no mercado. No entanto efeitos adversos como lesões hepáticas e renais e efeitos centrais levaram à inutilização desses produtos, com exceção da oxamniquina. Na década de 70 foram descobertos o amoscanato, o oltipraz e o praziquantel (Mourão, 2001; Novaes; Souza; Araújo, 1999).

O praziquantel (PZQ) e oxamniquina consistem o atual arsenal terapêutico anti-helmíntico disponível, com administração das doses de 50 mg/kg e 15 mg/kg em dose única, respectivamente (Vitorino *et al.*, 2012). A oxamniquina possui atividade somente contra *S. mansoni* e apresenta efeitos adversos centrais, efeitos mutagênicos e carcinogênicos (Ferrari *et al.*, 2003; Mourão, 2001; Shaohong *et al.*, 2006).

O PZQ é o fármaco de escolha no tratamento (Katz e Almeida 2003) e é efetivo contra todas as espécies de Schistossomas patogênicos ao homem (Matsumoto, 2002; Gryseels *et al.* 2006). Ainda, o fármaco é eficaz contra todos os estágios da infecção pelo Schistossoma, tanto na fase aguda como na fase crônica, que pode estar associada ao envolvimento hepatoesplênico (Olliaro; Delgado-Romero; Keiser, 2014).

No mercado há três apresentações do fármaco: Cestox® (Merck Sharp and Dohme; 150 mg), Cistid® (Merck Sharp and Dohme; 500 mg) e

Praziquantel - Farmanguinhos (Fiocruz- Laboratório Farmacêutico Federal Farmanguinhos, Laboratório Oficial do Ministério da Saúde; 600 mg). A dose usual para adultos é de 50 mg/kg via oral, um ou duas vezes ao dia e, para crianças, 60mg/kg. (Malhado *et al.*, 2016).

A literatura mostra associações do PZQ com a cimetidina e o omeprazol, tornando mais lento o metabolismo do fármaco com consequente aumento da concentração plasmática e efeito sinérgico (Diekmann *et al.* 1989). O mesmo efeito sobre o metabolismo do praziquantel foi observado quando administrado concomitantemente ao cetoconazol e miconazol (Diekmann *et al.* 1989).

Existem alguns problemas relacionados ao PZQ, como o fato de que o fármaco não é capaz de agir sobre os ovos nem as formas jovens do *Schistosoma mansoni* e, assim, inepto para a eliminação total do parasita do organismo. Outro problema relevante recentemente relatado é o surgimento de casos de resistência de algumas cepas de *Schistosomas*.

Ainda, a natureza estrutural do fármaco permite a existência de enantiômeros e os medicamentos disponíveis no mercado consistem de misturas racêmicas (Novaes *et al.*, 1999). O estereoisômero R apresenta efeito contra a esquistossomose, já o isômero S é inativo, sendo que a mistura racêmica apresenta gosto extremamente amargo, o que representa um problema na administração oral do fármaco. A separação dos estereoisômeros não é realizada em decorrência do impacto do processo sobre o custo do produto final; os comprimidos são grandes e de difícil deglutição, principalmente para crianças, significativamente afetadas pela doença (Pimenta, 2018).

O PZQ sofre extenso metabolismo de primeira passagem hepática e apresenta baixa biodisponibilidade oral, trazendo expectativa de alta variabilidade nas concentrações plasmáticas quando o fármaco é administrado por esta via. O fármaco apresenta baixa solubilidade e alta permeabilidade, características de classe II, segundo o Sistema de Classificação Biofarmacêutica (SCB). A baixa solubilidade em água pode ser um problema nas administrações orais de medicamentos, se houver significativa influência sobre o processo de absorção, com a obtenção de níveis plasmáticos insuficientes para o efeito terapêutico pleno.

Uma das estratégias que permite otimizar a dissolução e aumentar a biodisponibilidade oral é a utilização de sistemas contendo hidróxidos duplos lamelares (HDL) como excipientes funcionais em micropartículas inorgânicas. O Laboratório de Tecnologia dos Medicamentos (LTM) do Departamento de Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), tem trabalhado com o desenvolvimento de novas formulações utilizando HDL, por exemplo, para a terapia anti-HIV. (Vieira, 2011)

Considerando a expectativa de melhorar o perfil de absorção do PZQ, este trabalho teve a finalidade de avaliar a farmacocinética do fármaco veiculado por micropartícula inorgânica (PZQ-HDL), e comparar com a farmacocinética do ativo livre disperso em água (IFA) e com uma formulação na forma de suspensão, disponível no mercado. Para realizar este estudo de farmacocinética, foi desenvolvido e validado um método analítico para a determinação de PZQ em plasma de ratos por HPLC.

O método analítico desenvolvido e validado no presente estudo pode ser utilizado em outros estudos de farmacocinética do PZQ neste modelo animal ou em outros modelos, ou matrizes biológicas, com as devidas adaptações.

A informação obtida neste trabalho, ainda, tem como objetivo, fundamentar a continuidade do desenvolvimento desta nova formulação de PZQ e o planejamento de futuros ensaios pré-clínicos e clínicos, com base nos parâmetros farmacocinéticos obtidos no modelo animal deste estudo extrapolados a outros modelos animais.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Esquistossomose: a doença e o tratamento

A esquistossomose, no homem, é causada por trematódeos do gênero *Schistossoma* cujos principais agentes etiológicos são as espécies *S. mansoni*, *S. haematobium* e *S. japonicum* (Pordeus, 2008). A transmissão da doença envolve moluscos de água doce e, particularmente no Brasil, três espécies do gênero *Biomphalaria*: *B. glabrata*; *B. tenagophila* *B. straminea*. O homem infectado elimina os ovos do *Schistossoma* pelas fezes que, ao alcançar reservatórios de água doce, eclodem e liberam o miracídio – larva ciliada – que é responsável por infectar o hospedeiro intermediário, o caramujo. Após algumas semanas, as larvas atingem a forma de cercaria que, livres no ambiente aquático, são capazes de penetrar pela pele e mucosas do homem (Silva *et al.*, 2011). Após infecção no hospedeiro definitivo, em algumas semanas, o homem infectado passa a eliminar, pelas fezes, os ovos do parasita, que novamente podem atingir o ambiente aquático.

As manifestações clínicas da doença envolvem processos inflamatórios no tecido hepático e outros órgãos, que se relacionam à deposição dos ovos do *Schistossoma* nestes locais.

Embora em muitos casos a doença possa permanecer assintomática (Cantanhede, 2011), os achados clínicos mais frequentes possuem relação com as fases do desenvolvimento do parasito no organismo humano, e a enfermidade pode ser dividida em duas fases. A fase aguda, manifestada nos primeiros dias por dermatite cercariana decorrente da penetração das cercária na pele e posteriormente manifestações como febre, anorexia, dor abdominal e cefaleia (Queiroz, 2012). Nesta fase é possível detectar hepatoesplenomegalia no exame físico. Após alguns meses, a manifestação crônica da doença demonstra o acometimento de vários órgãos nas formas intestinal, hepatointestinal, hepatoesplênica e neurológica. A doença tem seu período de incubação entre 1 a 2 meses após o dia da infecção, que corresponde à penetração da cercaria, desde

de seu desenvolvimento até a formação de vermes adultos (WorldHealth Organization *et al.*, 2009).

O período de transmissão é extremamente longo, visto que o homem, após estar infectado, pode eliminar ovos de *S. mansoni* durante anos, cerca de 5 a 10, e dessa forma, após a eliminação de miracídios, eles penetram nos tecidos dos caramujos e seus esporócitos são multiplicados por gerações. As cercarias são eliminadas pelo caramujo e caem novamente na água, penetrando na pele do ser humano, perdem a cauda, e as schistosomulas entram na corrente sanguínea, migram para o fígado e se tornam adultas. Alguns adultos vão para as veias mesentéricas do intestino e são eliminados nas fezes, outras são eliminados na urina, pois vão para o plexo venoso da bexiga urinária. (Vitorino, 2012).

Os sintomas de hospedeiros infectados sucessivamente tendem a ser cada vez mais brandos, mesmo que a carga parasitária seja elevada. Isso não significa que há um grupo específico de pessoas que possui quadro assintomático, e sim que um grupo variado de pessoas, sem distinção étnica, de idade, peso, entre outras características, portador sem manifestações clínicas, acarretando um problema maior de disseminação da doença (Vitorino, 2012).

A doença pode ser confundida com dermatites exantemáticas, visto que a esquistossomose causa dermatite. No caso da esquistossomose aguda, o quadro em relação a doenças como malária, hepatite e febre tifoide deve ser atentamente comparado. Na fase crônica, os sintomas de desconforto intestinal possuem semelhanças com doenças como amebíase, giardíase, bem como a hepatoesplenomegalia, que no caso de leucemia, linfomas e calazar também geram esse processo.

Existem testes diretos e indiretos utilizados para a diferenciação dos sintomas e diagnóstico da doença. Os testes diretos são feitos para identificar os ovos, partes do parasito e até mesmo o próprio parasito, com coleta de fezes, PCR e biópsia retal. Os exames de detecção indireta são dependentes de testes bioquímicos, imunológicos e ultrassonográficos. O teste de PCR auxilia no diagnóstico de pacientes com baixa carga parasitária e possui sensibilidade relativamente alta para a doença. A ultrassonografia é muito utilizada devido a eficiência, no entanto só é feita

após o exame de fezes na pesquisa dos ovos de *S. mansoni* resultar negativo (Vitorino, 2012)

O tratamento da esquistossomose consiste na redução ou diminuição da carga parasitária do hospedeiro, impedindo a evolução para as formas graves da doença, além de minimizar a produção e a eliminação dos ovos para impedir a sua transmissão, e o fármaco de escolha para este tratamento é o praziquantel (Katz e Almeida 2003), efetivo contra todas as espécies de *Schistossomas* patogênicos ao homem (Matsumoto, 2002; Gryseels *et al.*, 2006).

O PZQ e oxamiquina consistem o atual arsenal terapêutico anti-helmíntico disponível, com administração das doses de 50 mg/kg e 15 mg/kg em dose única, respectivamente (Vitorino *et al.*, 2012).

A oxamiquina possui atividade somente contra *S. mansoni* e apresenta efeitos adversos centrais, efeitos mutagênicos e carcinogênicos (Ferrari *et al.*, 2003; Mourão, 2001; Shaohong *et al.*, 2006).

A literatura mostra associações do PZQ com a cimetidina e o omeprazol, tornando mais lento o metabolismo do fármaco com consequente aumento da concentração plasmática e efeito sinérgico (Diekmann *et al.* 1989). O mesmo efeito sobre o metabolismo do praziquantel foi observado quando administrado concomitantemente ao cetoconazol e miconazol (Diekmann *et al.*, 1989).

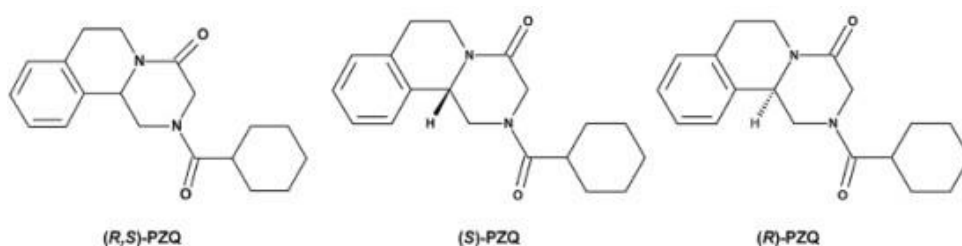
2.2. Praziquantel: aspectos biofarmacêuticos, farmacológicos e toxicológicos

O praziquantel ((RS)-2-(Ciclohexilcarbonil) -1,2,3,6,7,11b-hexahidro-4H-pirazino (2,1-alfa) isoquinolin-4-ona), CAS 55268-74-1 (Figura 1) é um fármaco que pertence à classe dos compostos orgânicos tetrahydroquinolinas, com fórmula química $C_{19}H_{24}N_2O_2$ e massa molar de 312.4 g mol⁻¹. O ponto de fusão da molécula está na faixa de 136-142° C, apresenta baixa solubilidade em água (0,4 mg.mL⁻¹) (Lindenberg; Kopp; Dressman, 2004), alta solubilidade em etanol (96%) e diclorometano (Farmacopéia Brasileira 6ª. Ed, 2019) e LogP 2,5. O fármaco apresenta baixa solubilidade e alta permeabilidade, características

de classe II segundo o Sistema de Classificação Biofarmacêutica e, sendo assim, possui uma baixa taxa de dissolução, o que é um fator limitante para sua aplicação terapêutica.

A molécula praziquantel contém um carbono quiral com duas formas enantioméricas, apresentando os enantiômeros R-PZQ e S-PZQ.

Figura 1 - Estrutura química e formas enantioméricas do Praziquantel.



Extraído de Mattos, 2017

Segundo (Ribeiro da Silva *et al.*, 2017), a biodisponibilidade oral do PZQ em humanos é de 80% e sua concentração plasmática máxima é atingida entre 1 a 3 horas após administração. No entanto o fármaco não pode ser administrado de forma intravenosa em seres humanos e, dessa forma, a determinação dos valores de F% (biodisponibilidade absoluta) é complexa, envolvendo a análise do produto em sangue e urina, sem a garantia de resultados precisos, uma vez que a excreção do fármaco na forma inalterada na urina é menor do que 10% (Toutain, 2004).

No trabalho de (Zdesenko e Mutapi, 2020) realizaram meta-análise de revisão sistemática com estudos experimentais publicados até 2019 (n=40) para avaliar três fatores que poderiam influenciar os níveis plasmáticos de PZQ, com consequências sobre a eficácia do tratamento: a farmacocinética, a farmacogenética e as interações com outros fármacos. Os autores utilizaram as plataformas *Web of Science*, *PubMed* e *EMBASE*, com os termos ([praziquantel ou PZQ] ([esquistosoma ou bilharzia] e [fármaco])), incluindo modelos animais e experimentais, exclusivamente com roedores (camundongos, ratos e hamsters). Os parâmetros farmacocinéticos elucidados nestes trabalhos para a comparação da exposição após administração de

diversas doses foram: meia vida de eliminação ($t_{1/2}$), concentração plasmática máxima (C_{max}), tempo de ocorrência de C_{max} (T_{max}) e áreas sob a curva da concentração plasmática pelo tempo (ASC). A biodisponibilidade oral não foi determinada em qualquer um desses estudos, mas somente a biodisponibilidade relativa. Nestes estudos, observaram-se concentrações plasmáticas de PZQ mais elevadas em modelos animais infectados e atribui-se este fato à redução da capacidade metabólica hepática. Doses orais de 10 mg/kg de PZQ em ratos não infectados atingem C_{max} entre 168 e 377 ng/ml, enquanto em animais infectados apontam-se valores em torno de 900 ng/ml. Na dose de 500 mg/kg, os valores de C_{max} obtidos foram na faixa de 10 a 14 ug/ml e 18 a 33 ug/ml, para animais não infectados e infectados, respectivamente (Zdesenko e Mutapi, 2020). Ainda, nesta revisão, os autores afirmam que o PZQ apresenta baixa biodisponibilidade e solubilidade, apontam que há extenso metabolismo de primeira passagem e que o fármaco possui uma ligação a proteínas plasmáticas de 85%.

A solubilidade do PZQ é de 400 mg/L (<https://www.drugbank.ca>, acesso entre os dias 01 de janeiro a 24 de fevereiro 2021) e, de acordo com a classificação de solubilidade da Farmacopeia Brasileira, o PZQ pode ser considerado como um fármaco de baixa solubilidade (muito pouco solúvel – 1 g solúvel em 1.000 a 10.000 ml) (Cruz, 2010).

A solubilidade avaliada a partir do Sistema de Classificação Biofarmacêutica (SCB) considera que o fármaco de “alta solubilidade” é aquele cuja maior dose disponível no mercado é solúvel em 250 ml de água. A maior dosagem de PZQ no mercado é a de 600 mg, quantidade que, sob a forma de Insumo Farmacêutico Ativo (IFA) sem adjuvantes para incrementar a solubilização, não é solúvel no volume de 250 ml. Assim sob esta classificação, também podemos considerar a solubilidade do PZQ um fator crítico à sua dissolução, com consequências sobre o processo de absorção, particularmente pela via oral. Ainda, é possível constatar publicações científicas em período recente cujos esforços estão centrados no desenvolvimento de formulações capazes de melhorar o perfil de absorção do PZQ, seja em extensão, ou em reprodutibilidade, o que reforça que este processo farmacocinético é uma das etapas críticas para o desfecho favorável no uso terapêutico deste produto (Zdesenko e Mutapi, 2020).

Outro aspecto relevante à absorção oral do PZQ é a influência da presença e da qualidade do alimento na luz do trato digestório no momento da administração do medicamento. (Castro *et al.*, 2000) avaliaram a exposição ao PZQ após administração oral de 1,8 g em 9 voluntários sadios jovens (média de 33 anos) com índice de massa corporal normal, com dietas hiperlipídicas e rica em carboidratos, e verificaram aumento nos níveis plasmáticos em 243 e 515 %, respectivamente, e aumento na área sob a curva (ASC), no período de 8 horas, em 180 e 271 %, respectivamente. Os autores atribuem o aumento da exposição à melhora da desintegração do comprimido e da dissolução, e consideraram que este efeito pode ser principalmente atribuído aos carboidratos (Castro *et al.*, 2000).

Na revisão de (Zdesenko e Mutapi, 2020) são apontados dezessete metabólitos do PZQ elucidados a partir de quatro publicações: 8 metabólitos mono-oxidados, 2 desidrogenados mono-oxidados, 3 metabólitos di-oxidados e 4 metabólitos de glicuronídeo, sendo 4-OH-PZQ o principal metabólito, dotado de atividade farmacológica. Estudos *in vitro* apontam que o fármaco é substrato das isoformas CYP3A4, CYP1A2, CYP2C9, CYP219 e CYP2D6. Considerando que algumas dessas isoformas são polimórficas, há possibilidade da existência de metabolizadores lentos ou extensivos. Alguns alimentos inibidores da CYP 450 e suas isoenzimas interferem na capacidade de metabolismo e podem ocasionar aumento na biodisponibilidade do fármaco (Ribeiro Da Silva *et al.*, 2017).

A meia vida de eliminação em humanos é de 2,5 horas e de seus metabólitos é de 4 horas.

Os principais metabólitos na excreção do PZQ, que ocorre pela via renal em até 80%, são derivados hidroxilados, outra parte desses compostos são eliminados pela bile.

Parâmetros farmacocinéticos do PZQ em camundongos, na administração oral de 500 mg/kg, foram obtidos por Botros *et al.* A meia vida de eliminação, neste modelo, foi de cerca de 1 hora e a média da concentração plasmática máxima foi de cerca de 14 ug/ml (Botros *et al.*, 2011).

(Sun *et al.*, 2016) e (Tang *et al.*, 2012), obtiveram valores de meia vida do PZQ em bovinos e suínos, respectivamente, de cerca de 26 horas, após a administração intramuscular de 30 mg/kg. (Sun *et al.*, 2016) obtiveram valores de

meia vida de eliminação do PZQ em bovinos de cerca de 7 horas, após administração oral da dose de 150 mg/kg.

O praziquantel é um fármaco usado em larga escala por ter relativo baixo custo quando comparado à oxaminiquina, e amplo espectro no tratamento da doença (Cioli *et al.*, 2014).

Uma das características do fármaco é o gosto amargo, caracterizado pelo enantiomero S, inefetivo farmacologicamente e principalmente relacionado aos efeitos adversos. A dificuldade de deglutição do medicamento é retratada no uso animal em experimentos com ratos sob forma de suspensão oral, visto que o animal muitas vezes tende a regurgitar o produto (Cugovcan *et al.*, 2017).

O PZQ está disponível em doses de 150, 500 e 600 mg no mercado e o esquema posológico deve ser ajustado com o peso do paciente e suas comorbidades, além de uso concomitante de outros fármacos (Ribeiro Da Silva *et al.*, 2017).

O Praziquantel, em comprimidos de 600 mg, é administrado por via oral (em dose única de 50 mg/kg de peso para adultos e de 60 mg/kg de peso para crianças), após a refeição, com índice de cura aproximado de 80% para os adultos e de 70% para as crianças (Farmacopéia Brasileira 6^a. Ed., 2019). Efeitos adversos como gosto metálico, dor abdominal, diarreia, cefaléia e vertigens são relativamente frequentes, porém o fármaco é considerado relativamente seguro e de baixa expectativa de resistência de cepas dos parasitas (Cruz, 2016). Com relação ao sistema nervoso, relatou-se sonolência e reações secundárias como erupções cutâneas, febre, fadiga são menos frequentes (Ribeiro da Silva *et al.*, 2017).

O mecanismo de ação do PZQ ainda não é totalmente elucidado e alguns estudos apontam que o fármaco causa contrações no parasita devido ao influxo de cálcio, inibição da bomba de sódio e potássio dos esquistossomas (Cioli *et al.*, 2014; Da Paixão Siqueira, 2017). Algumas pesquisas mostram o aumento da permeabilidade de membrana do helminto, envolvendo principalmente o cálcio, e isso gera aumento da atividade do fármaco e contração muscular, resultando numa paralisia espástica (Zheng *et al.*, 2014). A despolarização da membrana tegumentar pode levar a atividade da ATPase

e captura da glicose, além disso, as produções de ovos pelas fêmeas também são reduzidos. (Santos, 2011).

Os hidróxidos duplos lamelares (HDL) são produtos também conhecidos como argilas aniônicas e se organizam de maneira bidimensional em estruturas lamelares. Também são conhecidos como compostos hidrotalcita, e tem capacidade multifuncional, pois existem trabalhos mostrados sua ação como moduladores de liberação de fármacos, removedor de poluentes em indústrias, substâncias ativas, e carreadores de fármaco.

No presente trabalho, o principal interesse é sua ação como carreador de fármaco pois, incorporado ao praziquantel em uma proporção de 4:1, o objetivo é aumentar a dissolução do PZQ, solucionando a questão do uso de doses elevadas para que se tenha efeitos desejado.

A obtenção do sistema HDL ocorre de forma relativamente simples (Ferencz *et al.*, 2015; Meng *et al.*, 2017; Sipos; Pálinkó, 2016). Uma grande vantagem do HDL é apresentar grande capacidade de sorção, além de biocompatibilidade, baixa toxicidade e estabilidade.

Outro fator que viabiliza o uso do HDL para melhorar formulações é que sua estrutura aniônica pode ser alterada e, assim, pode aumentar sua capacidade de modificar as partículas físico-químicas do HDL.

O uso do HDL nas novas formulações possibilita um avanço na farmacologia, visto que promove um aumento na dissolução de fármacos e sucessivamente uma melhor biodisponibilidade.

Em um estudo realizado por Tian e colaboradores (2015), houve êxito na aplicação do desse sistema em formulações contendo metotrexato, através da observação do grau de supressão tumoral (Tian *et al.*, 2015).

O desenvolvimento de novas técnicas para melhorar a solubilidade, a taxa de dissolução e a biodisponibilidade de fármacos pouco solúveis em água é de grande importância no desenvolvimento de produtos farmacêuticos, em especial para aqueles administrados por via oral (Emara *et al.*, 2002; Sethia; Squillante, 2003).

Na área farmacêutica e da toxicologia, com ênfase na cinética, esses materiais apresentam grande relevância, e o seu uso pode aumentar a solubilidade dos fármacos e sucessivamente sua biodisponibilidade, principalmente dos que pertencem a classe II, como o PZQ (Pagano *et*

al., 2018).

Diante do exposto, o Laboratório de Tecnologia de Medicamentos (LTM) da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE) vem se empenhando nos estudos de formulações para o PZQ, o que resultou no desenvolvimento de um sistema HDL para carregamento do PZQ com a principal finalidade de melhorar seu perfil de dissolução e com expectativas de aumento de sua biodisponibilidade oral.

Estudos preliminares *in vitro* (dados não publicados) mostraram que esse novo sistema (HDL: PZQ) foi capaz de gerar uma desorganização na estrutura cristalina do PZQ, levando o fármaco à sua forma amorfa, interferindo positivamente na sua taxa de dissolução quando comparado ao insumo farmacêutico ativo (IFA).

A redução do tamanho de partícula é outro relevante fator que propicia o aumento da área superficial do fármaco, possibilitando o aumento de sua absorção. Com relação ao processo de dissolução, os resultados se mostraram promissores, uma vez que os sistemas HDL apresentam boa solubilidade em meios ácidos favorecendo a liberação imediata da forma mais solúvel (amorfa) do PZQ.

A grande importância desse presente trabalho é avaliar a disposição cinética do PZQ carregado pelo HDL e compará-la com a disposição observada na administração do insumo farmacêutico ativo (IFA) em modelo animal por via intravenosa e oral, e na administração do produto comercial em suspensão por via oral. As informações obtidas são úteis ao planejamento de outros ensaios para a continuidade do desenvolvimento deste produto com potencial aplicação terapêutica no tratamento da esquistossomose.

2.3. Farmacocinética e suas relações com a fase biofarmacêutica e os efeitos farmacológicos

A farmacocinética envolve várias etapas desde a administração do fármaco até que seja completamente eliminado. Assim, para que o fármaco atinja o local de ação desejado, existem etapas que ocorrem

simultaneamente e que influenciam os níveis sanguíneos do fármaco no decorrer do tempo após sua administração. As etapas que constituem esse movimento do fármaco no organismo são a absorção, distribuição, metabolismo e excreção - ADME (Huisinga *et al.*, 2006).

Após a administração extravascular do fármaco, ocorre o processo de absorção, no qual ocorre elevação progressiva do nível de concentração plasmática do fármaco. Já os processos de distribuição, metabolismo e excreção trazem o decaimento das concentrações plasmáticas do fármaco, uma vez que esses processos estão relacionados à dispersão extravascular do fármaco, às reações químicas que podem ocorrer e alterar sua estrutura original para formar metabólitos ou à sua retirada irreversível da circulação sanguínea por diferentes vias, como a renal, intestinal, pulmonar ou por secreções.

A administração direciona o fármaco para a circulação sistêmica e a mais usual é a oral, devido à facilidade e segurança. No entanto essa via pode acarretar absorção inadequada de determinados fármacos, visto a possível influência de fatores relacionados ao trato gastrointestinal e da passagem pelo sistema porta-hepático (Shoenwald, 2002).

Fatores como a presença ou ausência de alimentos, bebidas, de outros fármacos, inibição ou ativação de enzimas/isoenzimas, microbiota e esvaziamento gástrico podem influenciar de maneira direta na absorção dos fármacos. Alguns fármacos podem ter uma melhor absorção com o indivíduo alimentado frente ao jejum, ou a absorção pode ser favorável em jejum (Winter, 2012).

Existem alguns parâmetros que podem ser determinados para avaliar o processo da absorção, obtidos através da curva de concentração plasmática *versus* tempo, como $C_{m\acute{a}x}$ (concentração máxima) e $T_{m\acute{a}x}$ (tempo de ocorrência de $C_{m\acute{a}x}$), além da meia vida de absorção ($t_{1/2\ a}$), área sob a curva (ASC), constante de absorção (k_a), tempo médio de absorção (MAT) e biodisponibilidade absoluta (F) e relativa (RBA) e TLAG (Winter, 2012).

O $C_{m\acute{a}x}$ é o pico plasmático, momento no qual ocorre maior concentração do fármaco na corrente sanguínea do fármaco administrado. A $C_{m\acute{a}x}$ do fármaco é estimada a partir da curva de concentração pelo

tempo e varia de acordo com a via de administração, dose utilizada, tempo decorrido do início da exposição, sua distribuição e eliminação. Isso ocorre juntamente com o T_{max} , momento no qual ocorre o C_{max} (Tozer e Rowland, 2009).

A área sob a curva, expressa por ASC é a medida da exposição sistêmica total. De modo geral, a ASC, possui uma unidade convencional em $mg.h/L$, é obtida por meio do método dos trapezóides, no qual a concentração total do fármaco é dividida em partes de acordo com os tempos avaliados. Cada área dividida é calculada a partir da concentração média multiplicada pelo seu intervalo de tempo e a somatória de todas as áreas individuais determina a ASC total sendo medida a partir do tempo zero ao infinito (Tozer e Rowland, 2009).

A constante de absorção mostra a fração do fármaco presente no organismo que é absorvida a cada momento (Tozer e Rowland, 2009)

O tempo de absorção médio (MAT), representa o tempo médio para que ocorra a absorção, recurso utilizado para avaliação da absorção de um fármaco a partir de diferentes formulações.

RBA é definida como biodisponibilidade relativa que ocorre quando se compara as ASC de uma formulação referência com uma formulação teste, podendo haver necessidade de aplicar correções quando há doses diferentes (Toutain e Bousquet-Mélou, 2004)

A $F(oral)$, biodisponibilidade absoluta, é utilizada para representar a extensão de absorção de uma determinada formulação, quando há a ASC da administração intravenosa representando 100% (Federico *et al.*, 2017).

T_{lag} é o tempo médio entre administração e surgimento de concentrações plasmáticas é denominado tempo de latência, ou simplesmente t_0 . Esse parâmetro sofre influência de alimentos, bem como a motilidade gástrica, podendo atrasar ou estender a absorção do fármaco no organismo (Federico *et al.*, 2017).

O fármaco, após ser absorvido, pode ser distribuído inicialmente nos tecidos e órgãos de alta perfusão sanguínea, uma vez que a entrega do fármaco neste tecido é mais prontamente realizada. O coração, pulmões e fígado são órgãos que recebem grande perfusão sanguínea e rapidamente

atingidos (Oga, 2003; Storpirtis *et al.*, 2009). Pode ocorrer também a distribuição para tecidos de baixa perfusão com características favoráveis à captação do fármaco em questão. Esse processo de distribuição é dependente das características das moléculas, como por exemplo solubilidade, lipofilicidade, tamanho de molécula e PKA, sendo que todos esses fatores são intrínsecos e não podem ser alterados.

O fármaco absorvido pode sofrer alteração na distribuição devido ao pH do meio, ligação a proteínas plasmáticas e outras características.

O processo de distribuição pode ser avaliado pelo parâmetro volume de distribuição (VDC, VDSS, Vd_{área}), a partir do qual se pode evidenciar a tendência de acúmulo extravascular e a velocidade de chegada nos diferentes compartimentos do organismo. O VDC é o volume de distribuição inicial do fármaco, que é atingido rapidamente após sua administração, VDSS é o volume de distribuição no estado de equilíbrio de todas as fases da farmacocinética, obtido a partir da administração do fármaco por infusão intravenosa contínua até o estado de equilíbrio, e Vd_{área} é o volume de distribuição em pseudoequilíbrio, considerado como o valor mais próximo do VDSS mas calculado a partir da área sob a curva da concentração plasmática *versus* tempo (ASC) por administrações intravenosas ou extravasculares em dose única ou dose múltipla. O parâmetro farmacocinético VD pode ser utilizado na clínica para o cálculo da dose de ataque para que o fármaco tenha efeito desejado logo na primeira administração (Bjornsson, 1997)

O metabolismo e excreção estão diretamente ligados aos processos de saída do fármaco do organismo (eliminação) e parâmetros como meia vida de eliminação, constante de eliminação e clearance estão relacionados a esses processos (Ruiz-Garcia *et al.*, 2007). O metabolismo do fármaco ocorre com a ação de diversas enzimas, principalmente àquelas capazes de transformar uma estrutura química inicial em outra. Nesta alteração estrutural, a molécula obtida pode ter efeito inferior ou superior ao fármaco principal, assim como efeito tóxico (metabólito ativo ou tóxico). As enzimas do citocromo P450 são as mais importantes nesse processo de metabolismo, principalmente aquelas localizadas no tecido hepático (Winter, 2012). No entanto ainda pode ocorrer metabolismo em outros

órgãos como rins, pulmões e trato gastrointestinal.

Os metabolismos de fármacos envolvem as reações de fase I, que são catalisadas por enzimas através de mecanismos de oxidação, hidrólise ou redução, e reações de fase II, através de mecanismos de síntese e conjugação para gerar conjugados hidrossolúveis, que em geral facilitam a eliminação (Winter, 2012).

O metabolismo pré-sistêmico, ou de primeira passagem, pode ocorrer principalmente na administração oral de fármacos, e se caracteriza pela entrega do fármaco ao sistema porta (veia porta) antes que ele seja entregue a circulação arterial sistêmica e possa atingir os órgãos alvo, com ocorrência de metabolismo significativo neste momento (Winter, 2012).

O clearance é um parâmetro que pode ser definido como a quantidade de sangue que fica livre do fármaco, de forma irreversível, por unidade de tempo. Três tipos de clearance podem ser determinados em um estudo farmacocinético: o hepático, o renal e o total (ou plasmático) (Toutain e Bousquet-Mélou, 2004). A determinação destes clearances, separadamente, auxilia na avaliação da contribuição de cada processo (metabolismo ou excreção inalterada) para a eliminação do fármaco do organismo, e a definição de populações suscetíveis ao ajuste de dose.

O clearance é considerado um parâmetro muito importante na farmacocinética, visto que o mesmo pode ser usado como referência para determinar uma dose de administração a fim de manter uma concentração plasmática desejada do fármaco, corrigir problemas de dose e posologia em pacientes com problemas hepáticos ou renais, principalmente, além de outras patologias que necessitam de atenção especial no controle da terapia medicamentosa (Davanço, 2015). É um parâmetro muito robusto, de baixa variabilidade e influenciado por fatores como débito cardíaco e aspectos funcionais do órgão eliminador. O clearance, embora guarde íntima relação, é um parâmetro independente do VD pois é um parâmetro farmacocinético primário.

A meia vida de eliminação expressa o tempo necessário para que a concentração plasmática do fármaco absorvido caia pela metade. Este parâmetro auxilia na análise da administração de fármacos e na construção

de regimes posológicos, para avaliar a ocorrência do estado de equilíbrio do fármaco no sangue, intervalo de doses corretas e grau de flutuação da concentração entre as administrações (Bjornsson, 1997).

A constante de eliminação é considerada a velocidade de transferência do fármaco da circulação para fora do sistema biológico através do processo de eliminação (Ruiz-Garcia *et al.*, 2007).

O tempo de residência médio, MRT é o tempo médio em que o fármaco reside no organismo, sendo assim, um parâmetro que sofre influência da via de administração e forma farmacêutica pré-selecionadas, levando em consideração todos os processos farmacocinéticos envolvidos, com exceção da absorção.

No caso do MTT, tempo de trânsito médio, é o tempo após a administração de fármaco em qualquer via. Assim, ele representa o tempo médio que uma molécula gasta no corpo desde o início da absorção até a conclusão de sua eliminação.

Os modelos farmacocinéticos são expressados por equações matemáticas que conseguem prever a concentração plasmática do fármaco no organismo após ser administrado (Fan *et al.*, 2014). Modelos denominados compartimentais são modelos simples e homogêneos em sua distribuição, frequentemente utilizados para avaliar a farmacocinética de compostos (Gallo Neto, 2012)

O modelo monocompartimental presume que o fármaco administrado seja absorvido e distribuído de forma homogênea em termos de velocidade e, assim, quando se observa um gráfico traçado através de uma curva nesse tipo de compartimento, observa-se uma reta com inclinação única (Valle, 1988).

O modelo bicompartimental expressa duas velocidades de decaimento em suas concentrações plasmáticas e, dessa forma, o organismo possui dois compartimentos no qual o fármaco se distribui com velocidades diferentes. Quando o fármaco é introduzido no organismo, ocorre a distribuição do compartimento central para regiões periféricas e, em determinado momento, ocorre equilíbrio entre os dois compartimentos (Frezza, 2012). Após o equilíbrio da distribuição, o decaimento das concentrações plasmáticas ocorre mais lentamente. (Delucia *et al.*, 2014)

O desenvolvimento de novos fármacos e compostos, bem como a

modificação dos produtos acabados disponíveis no mercado tem como principal objetivo melhorar suas características terapêuticas. A tecnologia e inovação são de fundamental importância, visto que muitos fármacos, usados em larga escala e com efeitos terapêuticos comprovados, muitas vezes medicamentos de primeira escolha no tratamento de doenças, porém com aplicação restrita por propriedades farmacocinéticas inadequadas ou toxicológicas inaceitáveis (Lima, 2006). Assim, os estudos pré-clínicos são utilizados para avaliar novas formulações e suas características *in vivo* e *in vitro*. No entanto esse desenvolvimento demanda tempo e são necessárias diversas etapas para que se obtenha um produto compatível com os requisitos de qualidade e segurança exigidos pelas agências regulatórias de cada país.

A inovação radical, nesse processo de desenvolvimento, consiste em começar uma pesquisa inovadora com moléculas inexistentes no mercado e nos fármacos de tratamento. Normalmente são compostos descobertos e sintetizados com grande investimento financeiro.

Outra forma de inovação é a incremental, sendo essa a mais usual nos dias de hoje, visto que a mesma se baseia no melhoramento de uma formulação pré-existente no mercado, como o caso do PZQ+HDL, sendo que o PZQ é um fármaco de escolha no tratamento da esquistossomose e o HDL um complemento com objetivo de melhorar a dissolução do fármaco (Khanna, 2012; Petrova, 2014).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Comparação do perfil farmacocinético do PZQ carregado por micropartículas inorgânicas (HDL) com o PZQ livre em ratos wistar.

3.2 Objetivos específicos

- Desenvolvimento e validação de método bioanalítico para a quantificação do PZQ por UHPLC.
- Avaliação do perfil farmacocinético do PZQ em ratos Wistar após administração intravenosa do IFA, em dose única (20mg/kg).
- Avaliação do perfil farmacocinético, em ratos Wistar, do PZQ administrado por gavagem, na forma de Insumo Farmacêutico Ativo (IFA) na forma de suspensão em água sem adjuvantes, em dose única (200 mg/kg);
- Avaliação do perfil farmacocinético, em ratos Wistar, do PZQ administrado por gavagem, na forma de suspensão oral com adjuvantes, disponível no mercado para uso veterinário, em dose única (200 mg/kg).
- Avaliação do perfil farmacocinético, em ratos Wistar, do PZQ carregado por HDL (nova formulação produzida pelo LTM/UFPE) após administração por gavagem, em dose única (200 mg/kg);

4 MATERIAIS E MÉTODOS

Compostos utilizados nas formulações administradas nos animais

Os grupos de fármacos usados nos experimentos animais foram praziquantel – insumo farmacêutico ativo (PZQ IFA) para administração intravenosa e administração oral em dispersão sem adjuvantes em água, e administração oral em sistema com o HDL (disponibilizados pelo Laboratório de Tecnologia de Medicamentos da Universidade Federal de Pernambuco - LTM em parceria com o Laboratório Farmacêutico do Estado de Pernambuco (LAFEPE). Foi utilizada uma suspensão oral comercial de PZQ adquirida em farmácia de manipulação e com adição de adjuvantes (CMC, Sorbato de potássio, Nipagin, Benzoato de sódio, Nipasol e água q.s.p), para do fármaco. Foi utilizado o PZQ do lote AT00N147001.

Obtenção e caracterização do sistema PZQ-HDL

O sistema PZQ-HDL foi obtido pelo laboratório de Tecnologia de Medicamentos da UFPE da seguinte forma: O fármaco foi completamente dissolvido em acetona e posteriormente adicionado o CaAl-HDL.

O sistema formado foi colocado em recipientes abertos e submetido à agitação em mesa agitadora por 1 hora, para evaporação do solvente, a 60 rpm. Após a evaporação do solvente, o resíduo passou pelo processo de secagem em estufa a 60 °C para evaporação total desse solvente. -

No trabalho realizado por Timóteo (T.R.R, 2018), a obtenção do sistema e mistura física (MF) envolveu a adição dos componentes, inicialmente, em diferentes proporções molares HDL:PZQ (1:1, 2:1, 4:1), pela técnica de co-solubilização e homogeneização utilizando almofariz e pistilo. Os materiais obtidos foram caracterizados pelas técnicas de difração de raios-X (DRX), termogravimetria (TG), calorimetria exploratória diferencial (DSC), espectroscopia no infravermelho (FTIR), análise elementar, tamanho de partícula, área superficial e cinética de degradação, sendo realizado, também, ensaio de liberação in vitro. Os resultados obtidos apontaram que a síntese do

CaAl-HDL foi obtida com êxito e a área superficial obtida proporcionou uma alta capacidade de adsorção do fármaco ao CaAl-HDL, demonstrando sua aplicabilidade como carreador de fármacos. O estudo de cinética de degradação térmica do sistema 4 apresentou resultados promissores, evidenciando a ausência de incompatibilidade entre o HDL e o PZQ. Os resultados dos ensaios de dissolução *in vitro*, sob condições sink e non-sink, demonstram que os hidróxidos duplos lamelares são bastante promissores, promovendo o incremento de solubilidade quando comparado ao PZQ isolado. Com grande potencial para a aplicação em medicamentos, inclusive para o desenvolvimento de formas farmacêuticas, com o intuito de otimizar a terapial atual.

Diante dos resultados obtidos, o sistema 4:1 foi selecionado para a realização dos estudos de farmacocinética pré-clínica.

Soluções padrões, solventes e reagentes

O padrão de PZQ, fornecido pela LAFEPE, para desenvolvimento do método analítico, foi solubilizado em metanol, com preparo das soluções estoque na concentração de 100 µg/mL. O padrão interno (PI) diclofenaco foi fornecido pela Universidade Estadual de São Paulo (UNESP) e as soluções estoques foram preparadas utilizando metanol como solvente para atingir a concentração final de 25 µg/mL. Outros solventes e reagentes utilizados:

- Água deionizada obtida a partir de sistema Mili Q com condutividade 18,2 µS.cm⁻¹;
- Acetonitrila grau HPLC, J. T. Baker- México; lote 17120498, validade 09/2021
- Ácido fórmico 98%, Scharlab, S.L. – Espanha;
- Metanol grau HPLC, J. T. Baker- México; lote 17120502, validade 02/2023
- Éter-metil terc-butílico (Merck KGaA – Alemanha); lote 19992, validade 06/2021.

Equipamentos, produtos de laboratório e materiais para canulação femoral

- HPLC®Acquity Waters modelo 2965 acoplado com detector UV-Visível modelo 2487;
- Banho ultrassônico, Ultrasonic Cleaner 2840DA, Odontobrás®;
- Vórtex AP56, Phoenix®
- Sistema Mili Q®; Millipore®;
- Ultracentrífuga marca Hermele®, modelo Z326K;
- Balança digital analítica modelo AY220, marca Shimadzu®;
- Centrífuga 5810 R, Eppendorf®;
- Coluna cromatográfica: Sunfire C18 5 µm, 4,6x 250mm com pré coluna Waters® C8 5 µm, 2,1 x 5mm;
- Filtros descartáveis para seringas PTFE, porosidade 0,22 µm, Analítica®;
- Seringas descartáveis, B D®;
- Evaporador a vácuo (miVac Duo Concentrador, Genevac®), modelo MST-12060-C00;
- Refrigerador marca Sanyo®, modelo Medicoool;
- Pipetas marca Rainin®, modelo Pipet-Lite XLS;
- Eppendorfs 1,5 mL marca Kasvi®;
- Ponteiras marca Olen®;
- Éter-metil terc-butílico (Merck KGaA – Alemanha);
- Freezer -20°C marca Sanyo®, modelo MDF-U333
- Tesoura íris reta >> IC-010;
- Tesoura íris curva >> IC-011;
- Pinça íris dente de rato >> IC-480;
- Pinça íris lisa curva >> IC-481;
- Pinça íris c/ serrilha ponta romba >> IC-492;
- Porta agulha Mayo Heger >> IC-600;
- Tesoura oftálmica >> IC-150;
- Pinça Adson c/ serrilha >> IC-450;
- Tesoura Cirurgica Oftálmica Castrovejo Westcott 11,5 cm curva;
- Cânula PE 50 E PE 10;

- Arame inoxidável rolo de 10 metros, bitola de 0,20 mm marca fishtex;
- Seringas de insulina de 1 ml;
OBS seringas: Corta-se a ponta da agulha com um motor de dentista e um pequeno disco de corte;
- Anestésico Isoflurano, medicamento inalatório, solução, 1ml/ml, frasco 240 ml (referência: Isoforine);
- Alfinete, para tampar a canula durante a coleta. Cortar a cabeça do alfinete com alicate. Vende de caixa em loja de costura;
- Heparina – Hepamax. Heparina no eppendorf, volume de 15ul na coleta do sangue do animal. Heparina 2% em salina para injetar logo após as coletas;

Softwares

- Software Waters MassLynx MS®
- Graphpad Prism® 5.0
- Graphpad InStat® 3.0
- Minitab 19® Statistical Software
- Office® versão 2019.

4.1 Desenvolvimento e validação do método bioanalítico para a determinação do PZQ em amostras de plasma

Sistema cromatográfico

A determinação do PZQ foi realizada em sistema de cromatografia líquida HPLC®Acquity Waters modelo 2965 acoplado a um detector UV-Visível modelo 2487, operando a 210 nm.

A separação do analito foi feita em coluna Sunfire C18 5 µm, 4,6 x 250mm Waters®, com pré-coluna Sunfire C8 5 µm, 2,1x5mm Waters®.

A fase móvel utilizada foi composta de acetonitrila e ácido fórmico 65:35, em modo isocrático, com fluxo de 1 mL/min e tempo de corrida de 15 minutos. O PZQ é um fármaco fotossensível e hidrofóbico, sua

concentração na solução estoque em geladeira foi de 100 ug/mL, em metanol sob proteção da luz.

Validação do método bioanalítico

O método foi validado segundo o Guia para Validação de Métodos Analíticos e Bioanalíticos da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) de acordo com a resolução RDC nº27, de 17 de maio de 2012; e do Food and Drug Administration (FDA), Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation. Os limites de confiança avaliados na Validação do método foram:

Linearidade

Na validação, o primeiro ensaio realizado foi o de linearidade, no qual foi avaliada a resposta do fármaco de interesse (analito) submetido ao sistema cromatográfico nas mais variadas concentrações obtidas por diluição seriada. A partir das soluções padrões foram realizadas diluições seriadas para obter diferentes níveis de concentrações no intervalo de 0,3125 ug/mL a 10 ug/ml. A curva foi realizada em quintuplicata, com 6 níveis de concentração. Para avaliar se as respostas analíticas são, de fato, proporcionais às concentrações dos analitos, os dados de concentração e resposta analítica foram avaliados por regressão linear, com obtenção da equação da reta, coeficiente de correlação e com representação gráfica. Como critérios de aceitação da linearidade, a curva deve apresentar coeficiente de correlação acima de 0,98, exatidão variando entre 85 e 115%, podendo apenas o limite inferior de quantificação variar entre 80 e 120% do valor nominal. Os 6 níveis de concentração foram 0,3125 ug/mL; 0,625 ug/mL; 1,25 ug/mL; 2,5 ug/mL; 5 ug/mL e 10 ug/mL. Os controles de qualidade adotados para o método foram - controle de qualidade baixo (CQB – 0,625 ug/mL), médio (CQM – 2,5 ug/mL) e controle de qualidade alto (CQA - 8 ug/mL).

Limite inferior de quantificação (LIQ)

O limite inferior de quantificação (LIQ), é a menor concentração do analito que pode ser quantificada com precisão de 80-120%, devendo apresentar uma resposta no mínimo cinco vezes superior a qualquer ruído da amostra branca no tempo de retenção do fármaco. A determinação do LIQ foi realizada em quintuplicata, no qual a precisão pode ter uma variação de precisão de 80% a 120% e exatidão de 0% a 20%. Esse valor deve ser obrigatoriamente superior a qualquer valor da amostra branca no tempo de retenção do fármaco de interesse, nesse caso, o PZQ.

Precisão e Exatidão intra e interdias

A precisão é a avaliação da variabilidade dos resultados obtidos e a exatidão é a avaliação da proximidade do resultado analítico com o valor nominal (valor teórico de referência). A precisão e a exatidão foram avaliadas através da análise de cinco replicatas (FDA, 2018). Ambos os ensaios foram realizados utilizando o LIQ (0,3125 ug/mL), os controles de qualidade baixo (CQB – 0,625 ug/mL), médio (CQM – 2,5 ug/mL), alto (CQA – 8 ug/mL). Para aprovação, os valores de precisão devem se encontrar entre 0 e 15% e os de exatidão entre 85 e 115%. O ensaio interdia foi realizado em uma única corrida analítica, os ensaios inter-dia foram realizados em três dias diferentes e não consecutivos.

Recuperação

A recuperação expressa a eficiência do procedimento de extração da amostra em relação ao analito no extrato final do procedimento de preparo, extraído e não extraído (solução). A recuperação foi calculada pelo percentual da área da amostra extraída de CQA (8 ug/mL) e CQB (0,625 ug/mL) em relação à amostra não extraída das mesmas concentrações. É desejável que a recuperação esteja o mais próximo possível de 100%, embora resultados

significativamente inferiores não sejam proibitivos para a aplicação do método em estudos farmacocinéticos, desde que haja sensibilidade e reprodutibilidade de resultados. O estudo de recuperação foi realizado em três replicatas.

Efeito residual

O ensaio de efeito residual analisa a possibilidade de ocorrência de contaminações de uma injeção de amostra para outra e consiste em analisar uma amostra branco seguida de uma amostra do maior ponto da linearidade (10 ug/ml, neste caso) e, novamente, análise da amostra branco por mais duas vezes subsequentes. Deve ser observado se há picos interferentes no tempo de retenção do analito, que seja superior a 20% da resposta do analito, e do padrão interno, que seja 5% superior a resposta do padrão interno.

Estabilidade de armazenamento

A estabilidade foi avaliada em função da necessidade de armazenamento das amostras após cada coleta e processamento (tempo em que amostra permanece dentro do equipamento). Foi realizada uma análise inicial, em triplicata, de CQB (0,625 ug/mL) e CQA (8 ug/mL) recém- preparados. Após o armazenamento, o analito foi considerado estável quando não houve desvio maior que 15% do valor obtido nas amostras recém- preparadas. O tempo previsto de cada amostra mantida no interior do equipamento foi de sete horas.

Estabilidade curta duração

A estabilidade de curta duração foi verificada após as amostras permanecerem em temperatura ambiente por tempo superior ao que as

amostras em estudo serão mantidas nessas condições no decorrer do estudo, sendo então, processadas e analisadas. As amostras nas concentrações de 0,625 ug/ml e 8 ug/ml, em 3 replicatas, permaneceram em cima da bancada por um período de sete horas à temperatura ambiente, e posteriormente foram analisadas. O analito foi considerado estável quando não houve desvio maior que 15% do valor obtido nas amostras recém-preparadas.

Estabilidade longa duração

A estabilidade de longa duração foi avaliada após as amostras serem armazenadas por tempo superior ao intervalo compreendido entre a coleta da primeira amostra e análise da última, por conseguinte, processadas e analisadas. A temperatura utilizada para o ensaio foi a mesma temperatura de armazenamento das amostras do estudo, - 80°C, por período de cinco meses e após isso foram processadas para avaliar se houve alteração no analito. Foram avaliadas amostras nas concentrações de 0,625 ug/ml e 8 ug/ml em 3 replicatas. O analito foi considerado estável quando não houve desvio maior que 15% do valor obtido nas amostras recém-preparadas.

Estabilidade pós processamento

O equipamento de cromatografia líquida foi usado para fazer as análises, dessa forma o mesmo possui o modo auto sampler que manter a amostra em temperatura de 10°C, assim, foi processada uma curva de calibração juntamente com os controles. O tempo de corrida das amostras deve ser calculado e multiplicado pelo número de amostras que serão injetadas, afim de determinar o tempo total da corrida para assim, esperar esse tempo e novamente reanalisar as amostras controle, injetando-as novamente.

Os resultados das análises foram positivos, no entanto, nos experimentos feitos com animais, as amostras são injetadas de dois animais por vez, sucessivamente CQA (8 ug/mL), CQB (0,625 mg/mL) e CMQ (2,5 mg/mL) e assim por diante, para garantir a estabilidade das amostras.

Estabilidade após ciclos de congelamento e descongelamento

A estabilidade após ciclos de congelamento e descongelamento foi determinada após as amostras serem descongeladas e mantidas a 10°C por 3 horas e serem congeladas a -20°C mais duas vezes e processadas sucessivamente. As amostras avaliadas nesse teste de estabilidade ocorreram com os controles pré-determinados, CQA e CQB, que são os controles de qualidade alto e baixo dos pontos da curva de calibração do analito. No caso do PZQ os controles escolhidos como baixo e alto foram os valores 0,625 ug/ml como baixo e 8 ug/ml como alto. O analito foi considerado estável quando não houve desvio maior que 15% do valor obtido nas amostras recém-preparadas.

Processamento das amostras

O processamento das amostras envolveu 200 ul de plasma e adição de 50 ul do padrão interno P.I (diclofenaco 25 ug/ml em água). A mistura foi colocada em microtubos de 1,5 ml, adicionando-se 1 ml de solvente extrator (metil terc butil eter). Após agitação em vortex durante 30 segundos, as amostras foram centrifugadas por 10 minutos à 12.000 rpm. Após a centrifugação, as amostras foram filtradas e levadas ao evaporador por volta de uma hora e meia para sucessiva evaporação, ressuspensão em 100 ul de fase móvel (acetonitrila e ácido fórmico 0,1%) na proporção 65:35, respectivamente, no vial, e injeção de 20 ul no HPLC. Foram realizadas corridas analíticas de 15 minutos.

As análises das amostras de animais foram intercaladas com controles branco, CQA, CQB e CQM, de forma a verificar possíveis desvios analíticos durante a avaliação da farmacocinética, com maior garantia na qualidade dos resultados das amostras.

4.2 Avaliação do perfil farmacocinético do PZQ em ratos Wistar

Animais, Manipulação e Preparo

Foram utilizados ratos Wistar (20 por grupo; 80 animais no total), com peso aproximado de 250g provenientes do biotério central da

Universidade Estadual Paulista-UNESP de Botucatu e transferidos para o biotério do DFM (Departamento de fármacos e Medicamentos) da FCFAR.

A escolha deste modelo animal se deu devido à facilidade de administração e a disponibilidade de infraestrutura para os estudos em farmacocinética com este modelo, além da quantidade reduzida de fármaco e formulações requeridos para estudo, e obtenção de resultados significativamente relevantes ao objetivo do estudo proposto.

Os animais foram transferidos para o biotério do Departamento de Fármacos e Medicamentos (DFM) da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP de Araraquara, onde foram mantidos em condições controladas de temperatura ($23 \pm 1^\circ \text{C}$), umidade ($55 \pm 5\%$) e luz (ciclo 12/12h, luzes acesas às 07h) e tiveram alimento e água a vontade. Os experimentos iniciaram na fase claro e os animais foram privados de alimento por 6 horas anteriores à administração dos compostos e por 4 horas após a administração. Ao final dos experimentos, os animais foram expostos à sobredose anestésica de ketamina e xilazina para eutanásia, conforme recomendação do anexo I da Resolução nº 1000/2012 do Conselho Federal de Medicina Veterinária.

Os animais foram mantidos com água, alimento à vontade até a realização dos experimentos, acomodados em caixas, em grupos de 5 ratos cada, em salas com ciclo de luz de 12 em 12 horas e temperatura em 23°C . Os experimentos sempre foram delineados e ocorreram em 10 animais por vez, sempre que possível. No dia posterior à chegada do Biotério Central esses animais, após se alimentarem e hidratarem, foram pesados e ficaram por volta de 6 dias ganhando peso até passarem pela cirurgia de canulação da artéria femoral. No caso do grupo de administração intravenosa, a veia femoral também recebeu a cânula.

A canulação femoral ocorreu um dia antes da administração dos 4 grupos. Nesse dia, após a canulação, os animais ficaram em caixas individuais, para não ocorrer a roedura da cânula.

O procedimento da canulação é invasivo e deve ser procedido com cautela, visto que nesse momento pode haver o rompimento da artéria femoral do animal ou até mesmo a parada respiratória decorrente da anestesia.

A tricotomia é o primeiro passo do procedimento da canulação, é o momento no qual os animais são depilados na região da virilha e cabeça para que haja espaço para o procedimento cirúrgico e espaço para utilização da cânula. Após a tricotomia, os animais são anestesiados para iniciar a incisão da pele, com um pequeno corte na região femoral do rato, localizando-se a artéria femoral (e veia, quando for o caso), que se encontra muito próxima da região denominada NAV (nervo-artéria-veia). Após a separação dessas três estruturas, é feito o isolamento e elevação da artéria (e veia, quando for o caso) com uma linha, fazendo-se uma perfuração superficial, sem rompimento da artéria, e se inicia a inserção da cânula na artéria, que será fixada através de amarração com linha. Após fixação da cânula arterial, é feito o fechamento da incisão da região femoral. Com um pequeno corte na região posterior da cabeça do animal a cânula é transposta ao longo do comprimento do corpo do animal, com nova fixação na parte posterior da cabeça por amarração com fios. Nesta posição, a cânula ficará inacessível para a roedura pelo próprio animal. Os animais são mantidos em isolamento e caixas após este procedimento. O procedimento anestésico envolve a administração de isoflurano 1 ml/ml.

Protocolo experimental

O protocolo experimental (09/2019) foi previamente submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP/Araraquara e aprovado (anexo).

Foram planejados quatro grupos de animais, sendo um grupo de PZQ pela via intravenosa, e os outros três grupos de PZQ via gavagem.

Administração intravenosa (I.V.): Os animais passaram por implantação de cânulas na veia femoral para administração do fármaco e na artéria femoral para coleta de sangue no dia anterior ao experimento e, após 24h de recuperação, ocorreu administração intravenosa de PZQ (20 mg/kg, extrapolação alométrica considerando a dose de 5 mg/kg no homem).

Administração via gavagem do insumo farmacêutico ativo (IFA): Os animais passaram por implantação de cânulas na artéria femoral para

coleta de sangue no dia anterior ao experimento e, após 24h de recuperação, ocorreu administração por gavagem de PZQ (200 mg/kg, extrapolação alométrica considerando a dose de 50mg/kg no homem).

Administração via gavagem da suspensão oral 25 mg/ml (SO): Os animais passaram por implantação de cânulas na artéria femoral para coleta de sangue no dia anterior ao experimento e, após 24h de recuperação, ocorreu administração por gavagem de PZQ (200 mg/kg, extrapolação alométrica considerando a dose de 50mg/kg no homem).

Administração via gavagem da formulação com micropartículas inorgânicas (HDL 4:1): Os animais passaram por implantação de cânulas na artéria femoral para coleta de sangue no dia anterior ao experimento e, após 24h de recuperação, ocorre administração por gavagem de PZQ (200 mg/kg, extrapolação alométrica considerando a dose de 50mg/kg no homem).

Após a administração do fármaco, em todos os grupos, foi realizada a coleta seriada de sangue para a determinação do PZQ pelo método bioanalítico previamente validado. Os tempos e períodos de coleta foram determinados após realização de ensaio piloto.

As amostras de sangue foram coletadas nos tempos 5, 10, 20, 30, 45, 60, 180 e 360 minutos para os animais IV e nos tempos 10, 20, 30, 45, 60, 180, 360 e 480 minutos para os animais que receberam administração via oral. Abaixo, na tabela 1 está demonstrado o planejamento das coletas de sangue.

Tabela 1 - Planejamento das coletas sanguíneas no dia do experimento

Tempo e forma farm x ou y	10'	20'	30'	45'	60'	180'	360'	480'
Rato 1	•		•		•		•	
Rato 2		•		•		•		•
Rato 3	•		•		•		•	
Rato 4		•		•		•		•
Rato 5	•		•		•		•	
Rato 6		•		•		•		•
Rato 7	•		•		•		•	
Rato 8		•		•		•		•
Rato 9	•		•		•		•	
Rato 10		•		•		•		•

Fonte: Elaborada pelo autor

Cálculo Amostral

Para o cálculo do tamanho da amostra adotamos aquele estabelecido pela regulamentação da ANVISA (RE 898/2003); que se baseia na publicação de (Chow e Wang, 2001). Tal procedimento considera o nível de significância, o poder do teste e coeficiente de variação do parâmetro a ser estudado. Calculou-se o tamanho amostral mínimo com um intervalo de confiança de 95% e 80% de poder do teste para detectar uma diferença superior a 20% entre os grupos de animais.

O coeficiente de variação (CV) considerado foi de 15,97%, considerando a variabilidade dos parâmetros farmacocinéticos do PZQ apresentados no estudo de Mandour et. al (1990). Iniciou-se o cálculo com a proposta inicial de 5 replicatas para a obtenção do valor de n:

$$n \geq [t(\alpha, 2.n-2) + t((1 - \beta)/2, 2.n-2)]^2 \times (CV/20)^2$$

$$n \geq [t(0,05,8) + t(0,1,8)]^2 \times CV^2 / 20^2$$

$$n \geq [2,31+1,86]^2 \times (15,97/20)^2$$

$$n \geq 17,3889 \times 0,6376$$

$$n \geq 11,09 \quad n=12$$

em que: α = nível de significância; β = poder do teste; e CV = coeficiente de variação.

Utilizou-se o resultado obtido para a iteração:

$$n \geq [t(0,05,22) + t(0,1,22)]^2 \times (15,97/20)^2$$

$$n \geq [2,074+1,717]^2 \times 0,7081$$

$$n \geq 14,3717 \times 0,6376$$

$$n \geq 9,16 \quad n=10$$

Nova iteração:

$$n \geq [t(0,05,18) + t(0,1,18)]^2 \times (15,97/20)^2$$

$$n \geq [2,101+1,734]^2 \times 0,6376$$

$$n \geq 14,7072 \times 0,6376$$

$$n \geq 9,38$$

$$\mathbf{n=10.}$$

Desta forma, consideramos o número mínimo de 10 replicatas por tempo como necessárias para que tenhamos resultados de qualidade sob o ponto de vista estatístico.

Considerando a limitação do volume sanguíneo para o modelo animal utilizado (máximo de 1,7 mL) (Diehl, 2001), o número de animais utilizados no estudo para compor 10 curvas de concentração plasmática por tempo foi 80 (20 animais por curva; 4 grupos).

Análise farmacocinética

O perfil de concentração plasmática vs tempo dos compostos foi avaliado segundo o modelo monocompartimental, que melhor se adaptou aos resultados. A área sob a curva da concentração plasmática pelo tempo (ASC_{0-T}) foi obtida usando a regra dos trapezóides e a área sob a curva da concentração plasmática pelo tempo extrapolada ao infinito (ASC_{0-∞}) foi obtida pela soma da ASC_{0-T} adicionando-se a extrapolação ao infinito por meio da divisão da última concentração plasmática pela constante de eliminação (C_{pn}/kel). A relação entre as áreas (r) foi calculada

para avaliar o período de determinação das concentrações plasmáticas, sendo desejável que r seja maior ou igual a 0,8. A constante de eliminação (k_{el}) foi calculada como a inclinação da regressão log-linear da fase terminal da curva de concentração-tempo. A meia vida de eliminação ($t_{1/2}$) foi calculada dividindo o logaritmo natural de 2 por k_{el} . O clearance (Cl) foi calculado dividindo a dose por $AUC_{0-\infty}$, e o volume de distribuição (V_d) foi calculado dividindo Cl por k_{el} . Para a administração extravascular foi calculada a biodisponibilidade (F), através da relação das $AUC_{0-\infty}$ obtida com a administração intravenosa. Foram calculados os parâmetros MRT, MTT e MAT (tempos médios de residência, trânsito e de absorção), utilizando estatística dos momentos. Tlag (lag time) foi calculado para a via extravascular, utilizando a relação dos catetos para obter C_{p0} . A RBA ou biodisponibilidade relativa foi calculada entre os grupos que receberam PZQ pela via oral, comparando-se as $ASC_{0-\infty}$.

Os parâmetros farmacocinéticos foram calculados através da utilização do software Excel®. Os valores de C_{max} e T_{max} foram obtidos diretamente dos dados experimentais. Os parâmetros farmacocinéticos calculados e sua forma de obtenção estão relacionados na tabela 2.

Tabela 2 - Parâmetros farmacocinéticos e sua forma de obtenção.

Parâmetro	Un	Descrição	Equação
$C_{m\acute{a}x}$	$\mu\text{g/mL}$	concentração plasmática máxima	experimental
$T_{m\acute{a}x}$	min	tempo para atingir $C_{m\acute{a}x}$	experimental
K_{el}	min^{-1}	constante de eliminação	gráfico log da concentração plasmática vs tempo
$t_{1/2}$	min	meia vida de eliminação	$\frac{0,693}{K_{el}}$
ASC_{0-t}	$\mu\text{g/mL.min}$	área sob a curva de zero ao último tempo quantificável	método dos trapezoides
$ASC_{0-\infty}$	$\mu\text{g/mL.min}$	área sob a curva de zero extrapolada ao infinito	$ASC_{0-t} + \left(\frac{C_{p_n}}{K_{el}}\right)$
		área sob o momento da curva	
$ASMC_{0-t}$	$\mu\text{g/mL.min}$	de zero ao último tempo quantificável	método da estatística dos momentos
$ASMC_{0-\infty}$	$\mu\text{g/mL.min}$	área sob o momento da curva de zero extrapolada ao infinito	$ASMC_{0-t} + \left(\frac{C_{p_n} \times t_n}{K_{el}}\right) + \left(\frac{C_{p_n}}{K_{el} \times K_{el}}\right)$
Cl	mL/min/kg	<i>Clearance</i>	$\frac{Dose \times F}{ASC_{0-\infty}}$
$V_{d\acute{a}rea}$	mL/kg	volume de distribuição	$\frac{Cl}{K_{el}}$
Vc	mL/kg	volume de distribuição central	$\frac{Dose \times F}{A \text{ ou } B}$
F_{oral}		biodisponibilidade absoluta	$\frac{ASC_{oral} \times Dose_{iv}}{ASC_{iv} \times Dose_{oral}} \times 100$
RBA		biodisponibilidade relativa	$\frac{ASC_{0-\infty}(\text{teste}) \times Dose_{refer\acute{e}ncia}}{ASC_{0-\infty}(\text{refer\acute{e}ncia}) \times Dose_{teste}} \times 100$
MTT	min	Tempo de trânsito médio	$\frac{ASMC}{ASC_{0-\infty}}$
MRT	min	Tempo de residência médio	MTT - MAT
ka	min^{-1}	constante de absorção	método dos resíduos
$t_{1/2abs}$	min	meia vida de absorção	$\frac{0,693}{Ka}$
Ráreas		relação entre as áreas	$\frac{ASC_{0-t}}{ASC_{0-\infty}}$

MAT	min	tempo médio de absorção	1/Ka
T lag	min	tempo para o início da absorção	$\frac{\ln (\text{fase absorção/fase de eliminação})}{\text{fase absorção} - \text{fase de eliminação}}$

Fonte: Elaborada pelo autor

4.3 Análise estatística

Os resultados dos parâmetros farmacocinéticos obtidos estão apresentados através das médias e medianas com intervalo de confiança de 95%. A distribuição dos resultados foi avaliada por teste de normalidade para determinar o uso de um teste t paramétrico ou não paramétrico (Mann-Whitney), sendo que em ambos os casos foram considerados um nível de significância de 0,05 para avaliar as diferenças obtidas nos parâmetros farmacocinéticos do PZQ entre os grupos. Para análise estatística foi empregado o programa GraphPadInstat[®]. O programa GraphPadPrism[®] 5.0 foi utilizado para produção de gráficos.

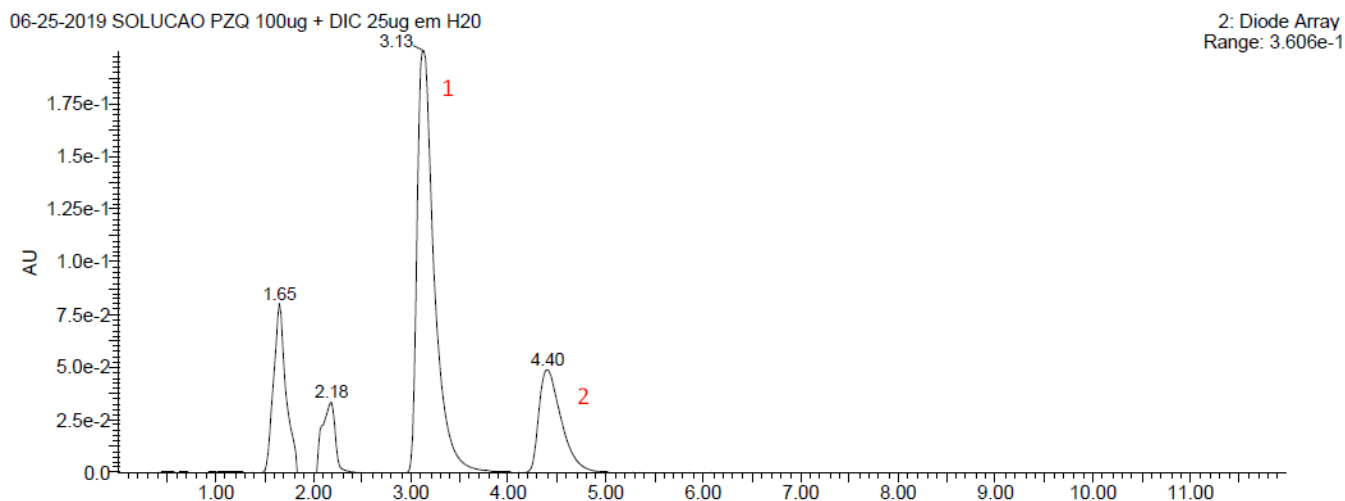
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Desenvolvimento e validação do método analítico

Sistema cromatográfico

O sistema cromatográfico desenvolvido foi capaz de separar adequadamente os analitos de interesse. Na figura 2 está representado o cromatograma obtido a partir do *software Masslynx MS®*, demonstrando os tempos de retenção e intensidade do sinal gerado para PZQ (na concentração de 10 ug/ml) e Padrão interno (diclofenaco 25 ug/ml). É possível verificar que o tempo de retenção para os compostos foram: PZQ: 3,30 min; PI: 4,30 min; apresentando boa resolução e separação entre os picos. Importante ressaltar que os dois primeiros picos do cromatograma são desconsiderados por serem resíduos do plasma.

Figura 2 - Cromatograma do PZQ e PI na concentração de 100 µg/mL e 25 µg/mL respectivamente.



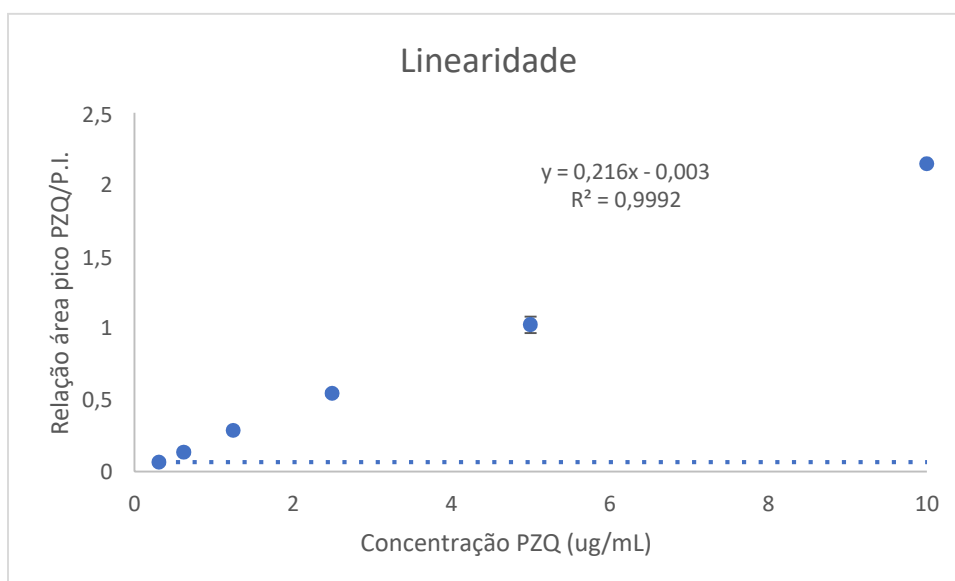
Legenda: pico 1 – PZQ 100 ug/mL pico 2 diclofenaco 25 ug/mL

Fonte: Elaborada pelo autor

Curva de calibração e parâmetros da validação do método bioanalítico

A curva analítica do composto foi construída em quintuplicata, compreendendo o intervalo de 0,3125 µg/mL a 10 µg/mL. Para avaliar se as respostas analíticas são, de fato, proporcionais as concentrações dos analitos, primeiramente os dados de concentração e resposta analítica foram plotados, com obtenção de uma reta como representação gráfica mostrada abaixo na figura 3.

Figura 3 – Curva de calibração do método bioanalítico



Fonte: Elaborada pelo autor

A linearidade foi avaliada a partir da construção de uma curva analítica plotando os resultados das relações de áreas dos picos do fármaco PZQ com o padrão interno e as concentrações de PZQ, através de regressão pelo método dos mínimos quadrados. Obteve-se a equação da reta com coeficiente de determinação de 0,9992. A curva apresentou exatidão média de 96%, valores aceitáveis, uma vez que o critério de aceitação é de 85 a 115%, exceto para o LIQ, que pode apresentar exatidão entre 80 e 120%.

A curva foi construída resultando em coeficiente de correlação de 0,9992 e a equação da reta: $y = 0.216x - 0.003$.

O LIQ, ou menor concentração do analito que pode ser quantificada com precisão e exatidão aceitáveis, foi de 0,3125 µg/mL.

Precisão e exatidão interdia e intradia

Os ensaios de exatidão e precisão intra e interdia foram realizados através da análise de cinco replicatas, utilizando o LIQ (0,3125 ug/ml), controle baixo (CQB – 0,625 ug/ml), médio (CQM – 2,5 ug/ml) e alto (CQA – 8 ug/ml). O ensaio intradia foi realizado com uma corrida analítica, e o interdias envolveu análise em três dias consecutivos, com n final de 15 replicatas. Os resultados foram avaliados e, de acordo com os resultados apresentados na tabela 3, a exatidão e precisão das amostras estão de acordo com os valores preconizados.

Tabela 3 - Precisão e exatidão das curvas intradia e interdia do método bioanalítico

		LIQ	CQB	CQM	CQA
Concentração nominal PZQ(µg/mL)		0,3125	0,625	2,5	8
Intradia	n	5	5	5	5
	Precisão (%)	4,157	2,932	2,255	3,622
	Exatidão (%)	113,487	96,067	114,85	103,303
Interdia	n	15	15	15	15
	Precisão (%)	1,116	0,269	2,162	1,766
	Exatidão (%)	113,621	95,643	112,743	104,16

Fonte: Elaborada pelo autor

Recuperação

O ensaio de recuperação foi realizado por meio da análise, em triplicata, do PZQ em plasma nos controles baixo, médio e alto e sucessiva extração. Após isso, foram feitas análises nas mesmas concentrações, porém somente extração com fase móvel.

Os resultados obtidos mostraram alta recuperação no procedimento de extração, tanto do analito (PZQ), quanto do padrão interno (Diclofenaco) e, mesmo não sendo uma recuperação de 100%, os níveis de exatidão e precisão

estão dentro dos valores de referência aceitáveis para a aplicação do método nos estudos de farmacocinética.

Abaixo, na tabela 4, estão apresentados os resultados em porcentagem dos controles baixo e médio e alto com suas respectivas recuperações.

Tabela 4 - Porcentagem das recuperações dos controles baixo, médio e alto (0,625 ug/mL, 2,5 ug/mL e 8 ug/mL, respectivamente).

Controles de qualidade	Recuperação %
CQB	86,08
CQM	90,79
CQA	88,67

Fonte: Elaborada pelo autor

Efeito residual

Nesse experimento foram feitas três injeções da mesma amostra contendo plasma branco, isento de PZQ e diclofenaco (P.I). Duas dessas três amostras foram injetadas previamente, depois, foi feita uma injeção do limite superior de quantificação (LSQ – 10 ug/ml), e sucessivamente outra injeção da amostra branco. A resposta de picos interferentes no tempo de retenção do analito foram inferiores a 20% da resposta do LIQ e as respostas de picos interferentes no tempo de retenção do P.I foram inferiores a 5% da resposta do diclofenaco. Assim, devido à baixa porcentagem de interferentes, pode-se verificar que não há interferência significativa de amostras de injeções anteriores nas análises sucessivas e, portanto, não há efeito residual.

As injeções das amostras que ocorreram no teste de efeito residual estão na tabela 5 abaixo.

Tabela 5 - Resultado do efeito residual, razão entre PZQ/DIC

Amostras	Razão entre PZQ/DIC
BRANCO 1	0.12896
BRANCO 2	0.1533
LSQ (10 ug/mL)	2.040
BRANCO 3	0.120

Fonte: Elaborada pelo autor

Ensaio de Estabilidade

Estabilidade de armazenamento

Os ensaios de estabilidade são realizados para avaliar as mais adversas condições nas quais podem ser submetidas as amostras contendo fármaco e plasma. Dessa forma, são realizados diferentes experimentos cujo objetivo é mimetizar essas condições adversas, e avaliar se os resultados de análise dessas amostras são válidos para o estudo. Os ensaios seguiram as regulamentações da RDC27/2012 e os valores dos resultados se mostraram inferiores a 15% referente ao desvio padrão.

Estabilidade de curta duração (ECD)

As amostras permaneceram a temperatura ambiente no período de tempo que normalmente ficam durante o período de extração e análise. O período foi de sete horas, no qual o plasma com fármaco incorporado ficou sob a bancada aguardando processamento. Após esse período, foi adicionado o padrão interno, solvente extrator, e todo restante do processamento normal da amostra até o momento da injeção.

O resultado obtido apresentou coeficiente de variação abaixo de 15%, o que evidencia estabilidade adequada nessas condições.

Estabilidade pós processamento (EPP)

O equipamento de cromatografia líquida utilizado possui amostrador (autosampler), que pode manter a amostra em temperatura de 10°C, assim, foi processada uma curva de calibração juntamente com os controles e o tempo de corrida das amostras foi calculado. Após primeira análise e o tempo total de corrida, foram realizadas novas análises para as mesmas amostras. Os resultados garantiram que seria possível a análise de amostras de dois animais por vez, com análise sucessiva de CQA (8 ug/mL), CQB (0,625 mg/mL) e CMQ (2,5 mg/mL).

Estabilidade de longa duração (ELD)

As amostras preparadas de CQA (8 ug/mL) e CQB (0,625 ug/mL) foram diluídas em plasma e armazenadas em freezer em temperatura de -80°C, por um período de cinco meses. Após esse tempo, foram descongeladas e submetidas ao processamento normal.

O resultado da extração mostrou que as amostras se mantiveram estáveis nesse período de tempo, visto que seus valores de precisão e exatidão corresponderam dentro do valor preconizado.

Estabilidade após ciclo de congelamento e descongelamento (ECCD)

Nessa situação foi avaliada a estabilidade da amostra contendo plasma e fármaco após três ciclos de congelamento e descongelamento. As mesmas contendo CQB (0,625 ug/mL) e CQA (8 ug/mL) passaram por congelamento a -20°C e foram descongeladas, isso tudo em período de 24 horas. Após esses três ciclos as amostras foram processadas e injetadas. O resultado desse experimento mostrou que a precisão e exatidão obtiveram valores inferiores a 15%, indicando estabilidade.

Adiante, na tabela 6, estão apresentados os resultados dos estudos de estabilidade supracitados.

Tabela 6 - Precisão e exatidão das estabilidades avaliadas na validação do método bioanalítico

		Estabilidade de armazenamento			
		ECD	ELD	EPP	ECCD
CQB (0,625 µg/mL)	n=3				
	Exatidão (%)	101,681	106,836	105,229	103,706
	Precisão(%)	3,259	2,464	3,940	2,039
CQA (8 µg/mL)	n=3				
	Exatidão (%)	96,038	99,230	105,742	108,21
	Precisão(%)	4,766	2,343	,908	2,396

Fonte: Elaborada pelo autor

Legenda das estabilidades:

ECD – Estabilidade de curta duração (7 horas)

ELD – Estabilidade de longa duração (5 meses)

EPP – Estabilidade pós-processamento (4,5 horas)

ECCD – Estabilidade ciclo de congelamento e descongelamento (3 dias)

Com base nos resultados dos limites de confiança obtidos para o método bioanalítico desenvolvido, foi possível sua aplicação nos estudos de farmacocinética pré-clínica pretendidos. Com isso, podemos definir que todos os ensaios de estabilidade realizados ocorreram de forma positiva, mostrando além de valores dentro do preconizado, uma facilidade de manuseio desse fármaco em bancada a ponto de não sofrer degradações frente à vários ambientes e condições distintas e específicas.

5.2 Avaliação do perfil farmacocinético do PZQ em ratos Wistar

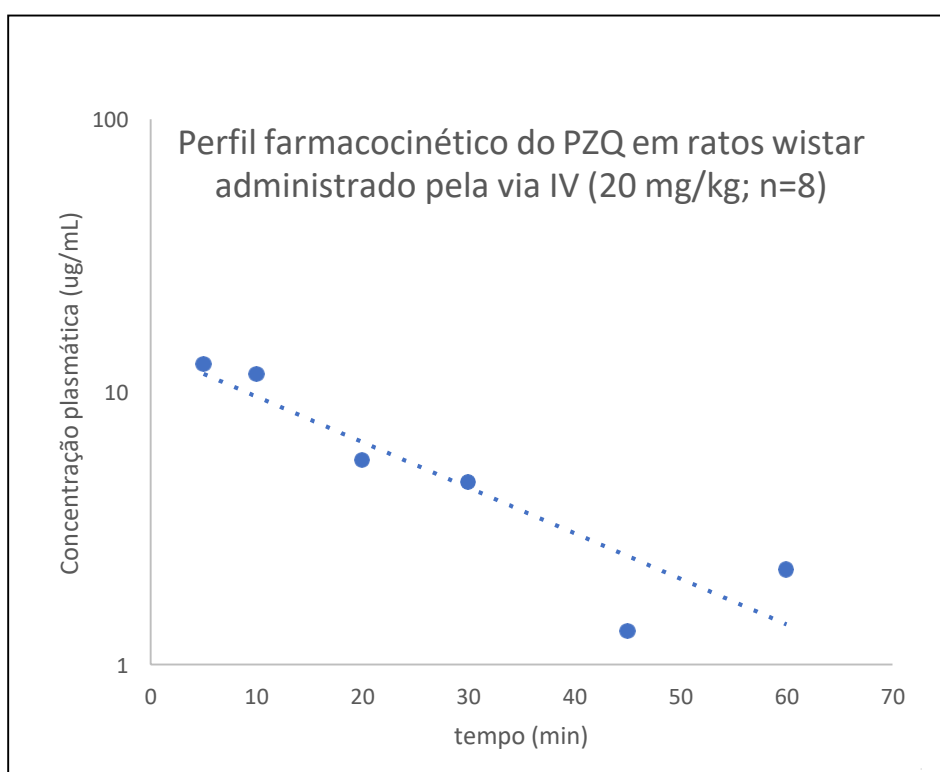
No grupo intravenoso (IV), os animais receberam a dose de 20 mg/kg de PZQ IFA, dissolvido em DMSO puro, na concentração de 120 mg/mL. O volume do produto administrado na veia dos animais foi de 40 microlitros, adequado ao modelo e ao tipo de solvente utilizado, de acordo com (Diehl, 2001) e (Neervannan, 2006). Foi possível realizar a coleta e quantificar o PZQ

em amostras de plasma de oito animais e, assim, obter uma curva média de concentrações plasmáticas pelo tempo, *estimando* os valores dos parâmetros farmacocinéticos com base nesta curva. Representamos o perfil de concentração plasmática do PZQ pelo tempo no grupo IV na figura 4.

Na tabela 7 estão demonstrados os valores dos parâmetros farmacocinéticos estimados para o PZQ com base nos resultados da análise em 8 animais que receberam o IFA pela via intravenosa. Não foi possível completar os estudos neste grupo, tendo em vista a grande ocorrência de mortalidade dos animais, de forma que os parâmetros foram apenas “estimados”.

A grade mortalidade dos animais ocorreu pela precipitação do praziquantel na veia do animal, mesmo que solubilizado em DMSO, ao entrar em contato com a corrente sanguínea retorna à sua fase dispersa e mata o animal.

Figura 4 - Concentração plasmática em função do tempo – grupo intravenoso (n= 8; 20 mg/kg).



Fonte: Elaborada pelo autor

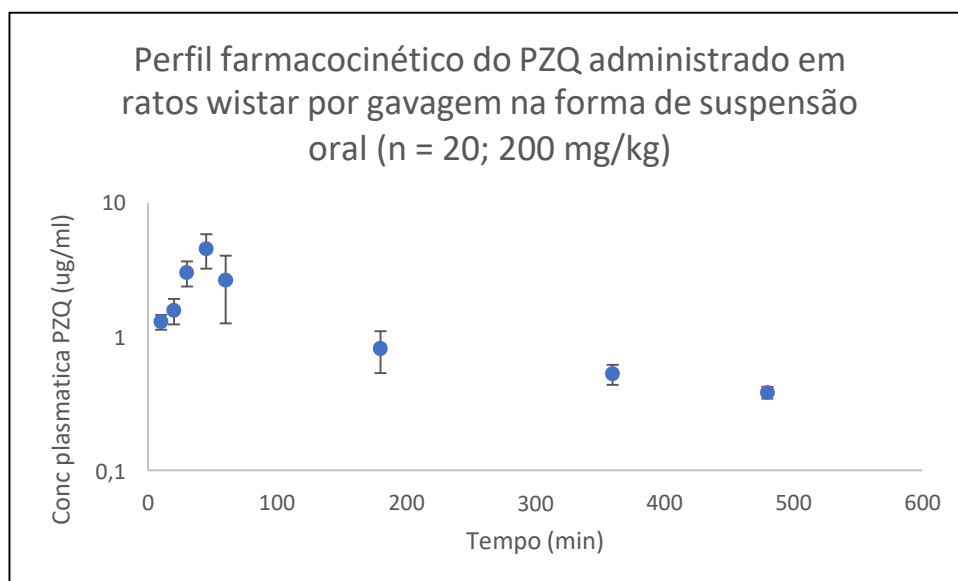
Como apontado anteriormente, a administração do PZQ no grupo dos animais pela via intravenosa resultou em alta mortalidade e, desta

forma, optamos pela descontinuidade da avaliação do grupo e realizamos a estimativa dos parâmetros farmacocinéticos finais (n=8).

No grupo que recebeu a administração oral do insumo farmacêutico (IFA) PZQ, não foram observados níveis quantificáveis de PZQ nas amostras de sangue coletadas no período, levando à conclusão de que a absorção oral do composto sem adjuvantes é insignificante. Optamos também pela descontinuação da administração oral do IFA. No grupo que recebeu o PZQ na forma de suspensão oral comercial (n=20) foi possível calcular os parâmetros farmacocinéticos.

Na figura 5 apresentamos o perfil do grupo da suspensão oral (SO), apresentação comercial de uso veterinário.

Figura 5 - Perfil farmacocinético do PZQ administrado em ratos wistar, por gavagem, da suspensão oral (n = 20 ; 200 mg/kg).



Fonte: Elaborada pelo autor

Foi possível observar níveis plasmáticos de PZQ dentro das concentrações quantificáveis pelo método desenvolvido durante oito horas após a administração. A partir deste período, os níveis plasmáticos não apresentaram valores abaixo do limite de quantificação (0,3125ug/ml).

Observou-se decaimento de concentrações plasmáticas com apenas uma velocidade, caracterizando modelo monocompartimental. A partir destes resultados, foi possível calcular os parâmetros farmacocinéticos do

PZQ da administração oral.

Na tabela 7, a seguir, apresentamos os parâmetros farmacocinéticos estimados para o grupo de animais que recebeu o PZQ pela via intravenosa (n=8, 20 mg/kg) e os parâmetros farmacocinéticos calculados para o grupo de animais que recebeu o PZQ por gavagem da suspensão oral (SO) (n=20, 200 mg/kg).

Tabela 7 - Parâmetros farmacocinéticos (Grupo IV n= 8 ; 20 mg/kg; grupo SO (n= 20; 200 mg/kg). Valores expressos como média.

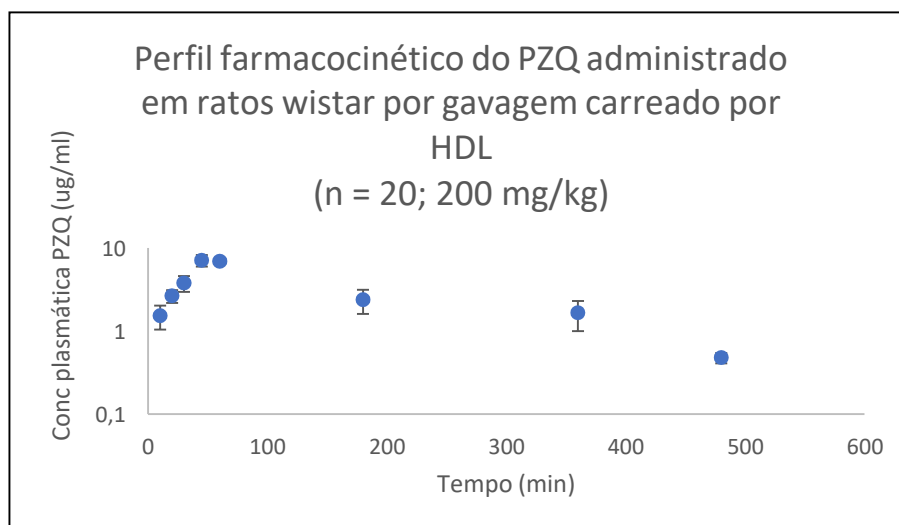
Parâmetro farmacocinético	Grupo SO (200 mg/Kg; n=20)	Grupo IV* (20 mg/Kg; n=8)
Kel (min⁻¹)	0,0051	0,038
t 1/2 (min)	138,6	18,2
ASC 0-t (ug/mL.min)	537,11	320,99
ASC 0-inf (ug/mL.min)	614,05	379,60
r áreas	0,87	0,85
Cl (mL/min/Kg)	52,69	52,69
Vd (mL/Kg)	10537,13	1386,50
ASMC 0-t (ug/mL.min)	79214,17	5958,82
ASMC 0-inf (ug/mL.min)	131916,4	11017,99
MTT (min)	220,35	29,02
F %	16,1	-
Cmax (ug/ml)	4,37	12,67
tmax (min)	46,5	-
Ka (min⁻¹)	0,0697	-
t 1/2 a (min)	15,19	-
MAT (min)	21,91	-
MRT (min)	199,52	29,02

*Valores estimados

Fonte: Elaborada pelo autor

Na figura 6 apresentamos o perfil do PZQ no grupo que recebeu a formulação PZQ-HDL (HDL).

Figura 6 - Perfil farmacocinético do PZQ administrado em ratos wistar, por gavagem, da formulação PZQ-HDL (n= 20 ; 200 mg/kg).



Fonte: Elaborada pelo autor

Foi possível observar níveis plasmáticos de PZQ dentro das concentrações quantificáveis pelo método desenvolvido também durante oito horas após a administração. A partir deste período, os níveis plasmáticos não apresentaram valores abaixo do limite de quantificação (0,3125ug/ml). Ainda, como ocorreu no grupo SO, também se observou decaimento de concentrações plasmáticas com apenas uma velocidade, caracterizando modelo monocompartimental. A partir destes resultados, foi possível calcular os parâmetros farmacocinéticos do PZQ após administração oral do PZQ carregado por partículas inorgânicas.

Na tabela 8, a seguir, apresentamos os parâmetros farmacocinéticos estimados para o grupo de animais que recebeu o PZQ pela via intravenosa (n=8, 20 mg/kg) e os parâmetros farmacocinéticos calculados para o grupo de animais que recebeu o PZQ por gavagem da formulação PZQ-HDL (n=20, 200 mg/kg).

Tabela 8 - Parâmetros farmacocinéticos (Grupo IV n= 8 ; 20 mg/kg; grupo PZQ-HDL (n= 20; 200 mg/kg). Valores expressos como média.

Parâmetro farmacocinético	Grupo PZQ-HDL (200 mg/Kg; n=20)	Grupo IV* (20 mg/Kg; n=8)
Kel (min⁻¹)	0,0061	0,038
t 1/2 (min)	115,17	18,2
ASC 0-t (ug/mL.min)	1293,074	320,99
ASC 0-inf (ug/mL.min)	1373,39	379,60
r áreas	0,94	0,85
Cl (mL/min/Kg)	52,69	52,69
Vd (mL/Kg)	8755,85	1386,50
ASMC 0-t (ug/mL.min)	202022,68	5958,82
ASMC 0-inf (ug/mL.min)	254279,55	11017,99
MTT (min)	183,3714	29,02
F %	36,20	-
Cmax (ug/ml)	7,33	12,67
tmax (min)	54	
Ka (min⁻¹)	0,0306	-
t 1/2 a (min)	23,67	-
MAT (min)	34,16	-
MRT (min)	151,73	29,02

*Valores estimados

Fonte: Elaborada pelo autor

Importante ressaltar que os parâmetros farmacocinéticos do grupo IV foram estimados a partir da construção de uma curva de concentrações plasmáticas versus tempo com 8 animais que, sob o ponto de vista estatístico, não é satisfatório para estudos comparativos. No entanto, em decorrência da grande mortalidade de animais que recebem PZQ por esta via, optamos pela descontinuidade deste grupo, tomando os valores apenas como referências.

Também é importante ressaltar que o grupo de animais que recebeu PZQ (IFA) disperso em água sem adjuvantes por gavagem não apresentou níveis plasmáticos quantificáveis, o que inviabilizou a construção de curvas de concentrações plasmáticas versus tempo e o cálculo de parâmetros farmacocinéticos. É possível afirmar, portanto, que sob essas condições, a absorção do PZQ pela via oral é insuficiente; e este fato ressalta a importância da utilização de recursos farmacotécnicos para promover o processo de absorção e melhorar os níveis plasmáticos do fármaco para a

administração por esta via.

Os valores dos parâmetros farmacocinéticos são importantes para a construção do regime posológico e do controle terapêutico, e a interpretação desses parâmetros é de suma importância durante o desenvolvimento de novos produtos, uma vez que estas interpretações auxiliam a identificação de populações susceptíveis ao fármaco, a verificação da necessidade de ajuste de dose em diferentes situações, entre outros.

Para interpretar os parâmetros farmacocinéticos, devemos utilizar referências apropriadas, de acordo com a abordagem conceitual de cada um deles.

Além do número de animais estatisticamente relevante e da obtenção de níveis sanguíneos adequados para a quantificação de parâmetros, o cálculo de parâmetros farmacocinéticos exige que, num planejamento de estudo em farmacocinética, o período de coleta e a obtenção de valores experimentais de concentrações plasmáticas ocorram em tempo suficiente para a cobertura de, pelo menos, 80% da área sob a curva de concentração plasmática pelo tempo extrapolada ao infinito ($ASC_0\text{-inf}$). Em termos práticos, é possível verificar se o planejamento experimental está adequado através da relação entre as áreas (r áreas) da concentração plasmática versus tempo até o último t experimental ($ASCC_0\text{-T}$) e a área sob a curva de concentração plasmática pelo tempo extrapolada ao infinito ($ASC_0\text{-inf}$). Esta relação (r áreas) deve apresentar o valor mínimo de 0,8. Os grupos IV, SO e HDL apresentam r áreas de 0,85, 0,87 e 0,94; respectivamente, o que demonstra que o período de análise farmacocinética está adequado para a realização dos cálculos e assumpção dos parâmetros para continuidade dos estudos. Ressalte-se que, no entanto, o grupo IV apresenta número de animais inferior ao necessário para as comparações estatísticas e por esta razão consideramos os parâmetros farmacocinéticos como “valores estimados”, e não “valores determinados”.

O clearance (ou depuração) é um termo usado para indicar a remoção completa de um fármaco de um volume específico de sangue na unidade de tempo. O clearance é expresso em volume por unidade de tempo (ml/min ou l/h), e compreende todos os processos que resultem na eliminação do fármaco do organismo (Toutain e Bousquet-Mélou, 2004). Dois principais fatores fisiológicos interferem significativamente na capacidade de Cl: a perfusão

sanguínea do órgão eliminador e a capacidade intrínseca deste órgão para efetivar a eliminação do fármaco. A perfusão sanguínea está intimamente ligada ao débito cardíaco - quantidade de sangue bombeada pelo coração em litros/minuto – que se expressa pela relação entre o volume sistólico e frequência cardíaca, fatores intimamente relacionados às características anatômicas e funcionais de um organismo. O débito cardíaco pode ser o fator limitante ao CI e, em condições fisiológicas ideais de eliminação, o valor numérico máximo de CI será aproximadamente o valor do débito cardíaco (Toutain e Bousquet-Mélou, 2004)

O cálculo do débito cardíaco (DC) pode ser realizado através da equação:

$$DC \text{ (ml/min.Kg)} = 180 \times \text{massa corpórea}^{-0,19}$$

O débito cardíaco (DC) de um rato Wistar de 0,250 g é de 234,24 ml/min.kg. Ocorre que apenas cerca de 50% do fluxo sanguíneo será destinado aos principais órgãos eliminadores – fígado e rins – e, desta forma, podemos considerar que valores de CI, neste modelo animal, próximos de 117 ml/min.kg (DC/2) podem ser considerados elevados. O valor de CI do PZQ encontrado neste trabalho foi de 52,7 ml/min.kg, cerca de 1/2 do débito dos órgãos eliminadores. Consideramos que valores de CI acima de 35% do DC/2 são considerados elevados, o que é o caso do PZQ em ratos Wistar.

O processo de distribuição de um fármaco pode ser avaliado através do parâmetro volume de distribuição (Vd), que descreve a relação entre a quantidade do fármaco existente em todo o organismo e a quantidade existente no plasma e, conceitualmente, se define como o volume no qual o fármaco deve estar contido para que a sua concentração se iguale a do plasma (Toutain e Bousquet-Mélou, 2004). Quando Vd é pequeno a captação pelos tecidos é limitada, enquanto que altos valores de Vd indicam uma ampla distribuição para os tecidos. É importante ressaltar que através do volume de distribuição não é possível determinar os sítios anatômicos de distribuição, que somente podem ser determinados por análises diretas das concentrações nos tecidos. Quando temos altos valores de Vd, podemos apenas inferir que há tendência de acúmulo extravascular do fármaco. Em farmacocinética clínica, o Vd é um importante parâmetro empregado na construção do regime de dose que será

utilizado no paciente. Em conjunto com a concentração alvo no estado de equilíbrio pode ser utilizado para calcular a dose de ataque.

A interpretação dos valores de V_d deve ser feita a partir do volume sanguíneo previsto para o modelo animal que assumimos como cerca de 7% do seu peso corporal. Consideramos como volume de distribuição baixo, um valor de V_d igual ou menor que 0,07 L/kg; consideramos V_d intermediário, valores entre 0,07 e 0,5 L/kg. Valores de V_d acima de 0,5 L/kg demonstram tendência de acúmulo extravascular do fármaco. Encontramos, para o PZQ, no modelo animal estudado, um valor de V_d de 0,3 a 10,5 L/kg (IV e oral, respectivamente). Estes valores nos permitem afirmar que há tendência do fármaco se distribuir para o organismo a despeito de sua permanência na circulação sanguínea, ou acúmulo extravascular.

A meia-vida ($t_{1/2}$) de eliminação é um parâmetro híbrido do clearance e do volume de distribuição e representa o tempo necessário para que a concentração plasmática do fármaco decline para a metade (Toutain e Bousquet-Mélou, 2004). Consideramos fármaco de meia vida longa, aqueles que apresentam valores deste parâmetro superiores a 24 horas. O PZQ apresentou meia vida de eliminação de curta, de 18 minutos para a via IV e 2 horas, aproximadamente, para a via oral. Em estudo realizado por (Botros *et al.*, 2011), a meia vida de eliminação do PZQ em camundongos foi de cerca de 60 minutos. Este valor também caracteriza o fármaco como de curta meia vida de eliminação (Botros *et al.*, 2011).

No estudo feito por (Sun *et al.*, 2016) foram obtidos valores de meia vida de eliminação do PZQ, em bovinos, de cerca de 26 horas, após a administração intramuscular (30 mg/kg) e de 7 horas após administração oral (150 mg/kg). A composição oleosa da formulação utilizada para administração IM teve impacto sobre a meia vida de eliminação do fármaco, tornando-se um reservatório de liberação lenta, com consequências sobre o perfil de declínio das concentrações plasmáticas. Na administração oral, no entanto, ainda observamos meia vida curta, uma vez utilizada a formulação comercial de liberação imediata. Estes aspectos ressaltam a influência das características da formulação e do modelo animal no perfil farmacocinético do PZQ.

O tempo de trânsito médio de um fármaco (MTT) é o tempo médio dispendido para que todos os processos em farmacocinética ocorram, após

sua administração a partir de dada apresentação farmacêutica, por determinada via. Este parâmetro compreende o tempo médio para que ocorra desde a fase da absorção até a fase de eliminação do fármaco ($MTT=MAT+MRT$).

Na administração oral, por exemplo, há processo de absorção e, então, MTT é maior na administração oral do que o MTT observado na administração IV. No presente estudo, o valor de MTT para a via IV foi de cerca de 30 minutos, enquanto que para a via oral, o MTT foi de cerca de 3 horas.

Já o tempo de residência médio (MRT) compreende o tempo médio necessário para que o fármaco, após sua absorção, se distribua e seja eliminado ($MRT= MTT- MAT$). Na administração intravenosa, o MRT e o MTT apresentam os mesmos valores porque não há processo de absorção. Os valores de MRT representam o tempo médio em que há níveis sanguíneos do fármaco significativos. Para o PZQ, encontramos valores de MRT de cerca de 2,5 horas na administração oral, e de cerca de 30 minutos para a via IV.

O tempo médio de absorção (MAT) compreende o tempo médio necessário para que o fármaco seja absorvido. Quanto maior o MRT, maior a permanência do fármaco no organismo, quanto maior o MAT, menor a velocidade de absorção.

Os parâmetros MTT, MRT e MAT são influenciados pelas características do fármaco, do modelo animal estudado, da via de administração e das características da formulação administrada. Calculados a partir da estatística dos momentos, esses parâmetros valorizam o tempo de permanência do fármaco no organismo, diferenciando formulações com velocidades de liberação do ativo diferentes, embora, muitas vezes essas formulações liberem a mesma quantidade do fármaco. Formas de liberação sustentada aumentam o MRT e o MAT, quando comparadas com formas de liberação imediata.

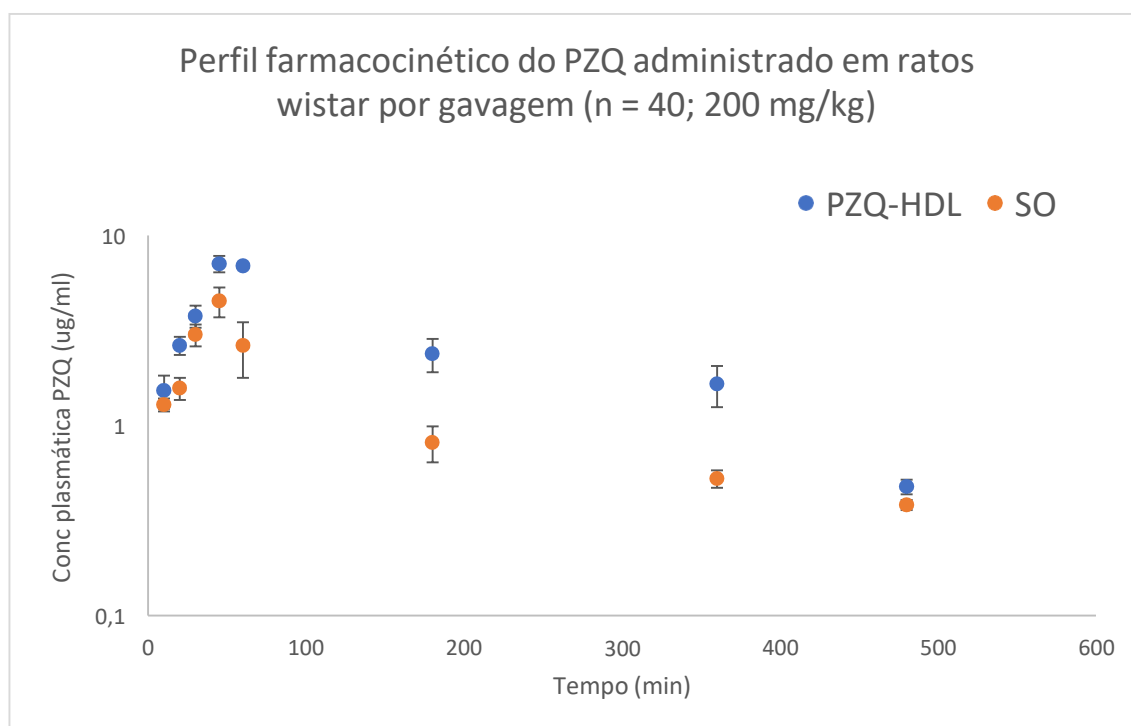
O principal objetivo deste trabalho foi avaliar se a proposta de carreamento do PZQ por partículas inorgânicas traz impactos sobre o perfil de absorção do fármaco administrado pela via oral, por todas as razões anteriormente apresentadas. Para atingir tal objetivo, comparamos o perfil farmacocinético do PZQ administrado por gavagem, no mesmo modelo animal e na mesma dose, a partir de uma formulação comercial (suspensão manipulada de uso veterinário) com a formulação PZQ-HDL.

Na figura 7, apresentamos os perfis farmacocinéticos dos dois grupos que receberam PZQ pela via oral (SO e PZQ-HDL).

Foram calculados os tempos de início de ocorrência da absorção (Tlags) para as formulações administradas pela via oral, através do método dos catetos, utilizando os valores dos interceptos da reta de eliminação e de absorção (A e B).

Os valores de Tlag encontrados foram todos inferiores a 1 minuto, o que significa que o PZQ apresentou rápida absorção após administração das duas formulações. Este comportamento é esperado para apresentações líquidas. Tlags significativos são esperados para formassólidas e formas de liberação lenta.

Figura 7 - Perfil farmacocinético do PZQ administrado em ratos wistar, por gavagem, da formulação PZQ-HDL (n= 20 ; 200 mg/kg) e da suspensão oral comercial (SO).



Fonte: Elaborada pelo autor

Na tabela 9 apresentamos as concentrações plasmáticas a cada tempo para o grupo de animais que recebeu o PZQ por gavagem do sistema PZQ-HDL (n=20, 200 mg/kg) e da suspensão oral comercial (SO) (n=20, 200 mg/kg) e as comparações estatísticas entre os grupos.

Tabela 9 - Concentrações plasmáticas versus tempo dos grupos PZQ-HDL (n= 20 ; 200 mg/kg) e SO (n= 20; 200 mg/kg). Valores expressos como mediana, média (IC95).

Tempo (min)	PZQ-HDL	SO	valor de P
	Mediana	Mediana	
	Média (IC95)	Média (IC95)	
10	1,70 1,53 (1,22-1,83)	1,24 1,29 (1,29-1,39)	0,0892
20	2,48 2,64 (2,35-2,93)	1,60 1,58 (1,37-1,79)	< 0,0001*
30	3,82 3,77 (3,27-4,27)	2,80 3,01 (2,62-3,41)	0,0433*
45	6,68 7,10 (6,39-7,81)	4,54 4,53 (3,72-5,34)	0,0001*
60	6,86 6,92 (6,71-7,12)	2,32 2,64 (1,78-3,5)	< 0,0001*
180	2,55 2,39 (1,91-2,86)	0,69 0,82 (0,64-0,99)	< 0,0001*
360	1,81 1,66 (1,25-2,06)	0,54 0,53 (0,47-0,58)	< 0,0001*
480	0,48 0,48 (0,43 - 0,52)	0,37 0,38 (0,36-0,41)	0,0015*

Teste de Mann-Whitney $p < 0,005$ – diferença estatística significativa.

Fonte: Elaborada pelo autor

É possível observar, a partir dos 10 minutos iniciais, no grupo que recebeu a formulação HDL, concentrações plasmáticas de PZQ sempre superiores, sugerindo que o processo de absorção foi incrementado, quando comparado com a administração da formulação SO.

Na tabela 10 apresentamos os parâmetros farmacocinéticos calculados para o grupo de animais que recebeu o PZQ por gavagem da formulação PZQ-HDL (n=20, 200 mg/kg) e da suspensão oral comercial (SO) (n=20, 200 mg/kg); assim como as comparações estatísticas entre os grupos.

Tabela 10 - Parâmetros farmacocinéticos (Grupo PZQ-HDL n= 20 ; 200 mg/kg; grupo SO (n= 20; 200 mg/kg). Valores expressos como mediana, média (IC95).

Parâmetros	PZQ-HDL Mediana Média (IC95)	SO Mediana Média (IC95)	valor de P
kel (min⁻¹)	0,0060 0,0061 (0,0056-0,0066)	0,0050 0,0052 (0,0048-0,0056)	00,0181*
t_{1/2} (min)	115,50 115,17 (106,21-124,13)	138,6 135,135 (124,44-145,83)	00,0181*
ASC 0-t (ug/mL.min)	1278,50 1293,07 (1163,15-1422,99)	522,7 531,87 (461,24-602,48)	< 0,0001*
ASC 0-inf (ug/mL.min)	1346,74 1373,39 (1238,88-1507,90)	585,4 605,60 (538,29-672,91)	< 0,0001*
r áreas	0,94 0,94 (0,93-0,95)	0,87 0,87 (0,85-0,89)	-
Cl (mL/min/Kg)	52,69 52,69 (52,9-52,69)	52,7 52,68 (52,68-52,68)	-
Vd (mL/Kg)	8780,94 8755,85 (8074,30-9437,40)	10537,1 10273,70 (9460,37-11087,03)	00,0181*
ASMC 0-t (ug/mL.min)	207317,26 202022,68 (170580,62-233464,73)	74198,1 77994,16 (70639,40-85348,92)	< 0,0001*
ASMC 0-inf (ug/mL.min)	250643,14 254279,55 (218408,21-290150,89)	125207,1 127974,94 (118022,30-137927,60)	< 0,0001*
MTT (min)	182,24 183,37 (173,35-193,39)	215,7 216,48 (190,63-242,33)	0,063
F (%)	35 36 (33-40)	20 16 (14-18)	< 0,0001*
Cmax (ug/ml)	6,86 7,33 (6,71-7,95)	4,1 4,44 (3,61-5,27)	< 0,0001*
tmax (min)	60,00 54 (49,20-58,80)	45,0 46,5 (43,56-49,44)	0,0572
Ka (min⁻¹)	0,0310 0,0306 (0,0264-0,0348)	0,044 0,049 (0,039-0,058)	0,017*
t_{1/2 a} (min)	22,35 23,67 (20,35-27,00)	13,5 14,99 (12,29-17,89)	0,017*
MAT (min)	32,26 34,16 (29,36-38,97)	23,4 22,41 (18,47-26,34)	0,017*
MRT (min)	153,07 151,73 (139,36-164,10)	196,7 198,30 (167,66-228,94)	0,0208 *

Teste de Mann-Whitney p<0,005 – diferença estatística significativa.

Fonte: Elaborada pelo autor

Conforme ressaltado anteriormente, para realizar análise farmacocinética é importante que relação entre as áreas (r áreas) da concentração plasmática versus tempo até o último t experimental (ASCC0-T) e a área sob a curva de concentração plasmática pelo tempo extrapolada ao infinito (ASC0-inf) apresente o valor mínimo de 0,8; o que ocorre em ambos os grupos. Este resultado traz evidências de que os parâmetros farmacocinéticos calculados a partir desses grupos de animais apresentam valores robustos.

Os valores de k_{el} e meia vida de eliminação ($t_{1/2}$), embora tenham apresentado diferenças estatísticas entre os grupos, indicam, em ambos os casos, que o PZQ apresenta meia vida curta neste modelo animal, conforme discutido anteriormente. As diferenças obtidas, portanto, não apresentam relevância clínica.

Os valores de Cl não apresentaram diferenças estatísticas significativas entre os grupos. Cl é um parâmetro farmacocinético primário, que sofre influência dos fatores fisiológicos relacionados à fase da eliminação e, portanto, diferenças nos valores de Cl são pouco esperadas na administração de diferentes formulações ou utilização de diferentes vias.

Os valores de V_d apresentaram diferenças estatísticas significativas entre os grupos. Este parâmetro, embora também seja primário, apresenta menor robustez quando comparado ao Cl e o processo de distribuição apresenta uma dinâmica particular na sua relação com as concentrações sanguíneas e C_{max} , assim como com o processo de absorção.

Importante ressaltar, no entanto, que tanto para o parâmetro Cl como para o parâmetro V_d , as interpretações anteriormente colocadas são válidas: o PZQ apresentou, no modelo animal estudado, valores elevados de Cl e tendência de acúmulo extravascular.

As áreas sob a curva das concentrações plasmáticas *versus* tempo (ASC0-t e ASC0-inf) apresentaram diferenças estatísticas significativas, e são maiores para o grupo que recebeu o PZQ-HDL. Este resultado demonstra que a quantidade de PZQ disponível na circulação sanguínea, neste grupo, é maior. Em (Botros *et al.*, 2011) foi avaliada a eficácia e o perfil farmacocinético de diferentes apresentações comerciais de PZQ administradas em camundongos (500 mg/kg; via oral) e observadas diferenças na eficácia entre as

apresentações, que se relacionam diretamente à ASC. A área sob a curva é um parâmetro diretamente relacionado às concentrações plasmáticas e, como visto anteriormente na tabela 9, as concentrações plasmáticas na administração do PZQ-HDL são superiores ao longo do período após a administração.

As concentrações plasmáticas máximas (C_{max}) atingidas também são superiores na administração do PZQ-HDL. C_{max} é um parâmetro que está relacionado tanto com a quantidade do fármaco absorvida, quanto com a velocidade de absorção. No entanto, não ocorre diferença estatística significativa entre os tempos de ocorrência de C_{max} (T_{max}). Este resultado é um forte indicativo de que C_{max} é superior no grupo PZQ-HDL em decorrência da maior quantidade de fármaco absorvida, e não porque há maior velocidade de absorção.

Embora possamos observar diferenças estatísticas significativas entre os grupos nos parâmetros k_a , meia vida de absorção e tempo médio de absorção (MAT), o processo de absorção ocorre, em média, para os dois grupos, no período de 20 a 30 minutos, com tendência à maior velocidade para o grupo da SO.

A biodisponibilidade (F) é quantidade da dose administrada de um fármaco que efetivamente atinge a circulação sistêmica (Toutain e Bousquet-Mélou, 2004). Este parâmetro é significativamente influenciado pelas características de solubilidade e permeabilidade de um fármaco. O PZQ é um fármaco de baixa solubilidade e alta permeabilidade (classe II pelo Sistema de Classificação Biofarmacêutica) e a forma farmacêutica, com seus adjuvantes na formulação, possui alto impacto sobre a biodisponibilidade na administração oral deste fármaco. Existe uma correlação proporcional entre menores valores de F e maior variabilidade nas concentrações plasmáticas inter sujeito, o que aumenta o risco no uso terapêutico.

Na administração oral do PZQ, na forma de IFA, não observamos concentrações plasmáticas quantificáveis e este resultado é compatível com as características do ativo citadas.

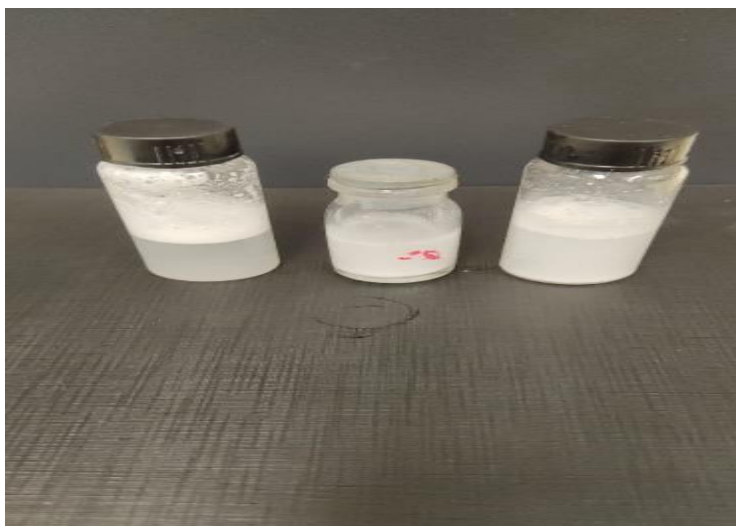
No grupo da suspensão oral comercial (SO), em que há emprego de adjuvantes para incrementar a solubilidade do PZQ, observamos níveis plasmáticos quantificáveis, com o valor médio de F obtido de 20%. O

incremento de F aponta para o aumento da reprodutibilidade nas concentrações plasmáticas após administração de determinada dose.

Na administração da formulação PZQ-HDL observamos elevação significativa de F, com valor médio de 36%. Este resultado nos permite inferir que as partículas inorgânicas aumentaram a quantidade de fármaco absorvida, o que representa êxito na proposta da formulação com expectativa de maior segurança no seu uso terapêutico.

Na figura 8, temos a comparação das três formulações, dispersão contendo IFA, Suspensão comercial e sistema HDL.

Figura 8 - Comparação das formulações (IFA, Suspensão comercial e HDL), respectivamente.



Fonte: Elaborada pelo autor

6 CONCLUSÕES

- O método bioanalítico desenvolvido e validado apresentou limites de confiança adequados para sua aplicação nos estudos em farmacocinética
- O PZQ apresentou absorção pobre pela via oral quando administrado em formulações sem adjuvantes, que favoreçam a sua dispersão em água.
- O PZQ apresentou CI elevado e meia vida curta em ratos Wistar e o volume de distribuição, neste modelo animal, mostrou tendência de acúmulo extravascular do fármaco.
- A biodisponibilidade oral do PZQ, quando carregado por partículas inorgânicas foi significativamente incrementada (em cerca de 2 vezes) , mostrando que esta abordagem é promissora para o desenvolvimento de uma nova formulação para uso terapêutico.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BJORNSSON, T. D. Practical uses of individual pharmacokinetic parameters in drug development and clinical practice: examples and simulations. **European journal of drug metabolism and pharmacokinetics**, v. 22, n. 1, p. 1-14, 1997.
- BOTROS *et al.* Comparative efficacy and bioavailability of different praziquantel brands. **Experimental parasitology**, v. 127, n. 2, p. 515-521, 2011.
- BRASIL. Agência Nacional De Vigilância Sanitária. **Farmacopeia brasileira**. 6. ed. Brasília, 2019. v.1
- CASTRO, N. *et al.* Bioavailability of praziquantel increases with concomitant administration of food. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 44, n. 10, p. 2903- 2904, 2000.
- CATANHEDE, S.P.D *et al.* Schistosomiasis mansoni in Maranhão State, Brazil, 1997-2003. **Cad. Saúde Pública**, v. 27, n. 4, p. 881-816, 2011
- CIOLI, C. *et al.* Schistosomiasis control: praziquantel forever? **Molecular and biochemical parasitology**, v. 195, n. 1, p. 23-29, 2014.
- CRUZ, F. O. *et al.* Isoblograma E Índice De Combinação. 2010. CRUZ, F. O. **Farmanguinhos praziquantel**. p. 1–8, 2016.
- CUGOVČAN, M. *et al.* Biopharmaceutical characterization of praziquantel cocrystals and cyclodextrin complexes prepared by grinding. **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis**, v. 137, p. 42-53, 2017.
- DA SILVA, V. B. R. *et al.* Medicinal chemistry of antischistosomal drugs: Praziquantel and oxamniquine. **Bioorganic e Medicinal Chemistry**, v.25, p. 3259-3277, 2017.
- DAVANÇO, M. **Farmacocinética do Benznidazol administrado em coelhos na forma de comprimidos de liberação imediata e comprimidos de liberação prolongada**. 2015. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP, 2015.
- DELUCIA, R. *et al.* **Farmacologia Integrada: uso racional de medicamentos**. 5.ed. São Paulo: Clube dos Autores, 2014.
- DIEHL, K. *et al.* A good practice guide to the administration of substances and removal of blood, including routes and volumes. **Journal of Applied Toxicology: An International Journal**, v. 21, n. 1, p. 15-23, 2001.
- DIEKMANN, H.W. *et al.* Inhibitory effects of cimetidine, ketoconazole and miconazole on the metabolism of praziquantel. **Acta Leiden**. v. 57, p. 217-228, 1989.
- EMARA, L. H. *et al.* Improving the dissolution and bioavailability of nifedipina using solid dispersions and solubilizers. **Drug Dev. Ind. Pharm.** v. 28, n. 7, p. 795-807, 2002.

FAN, J. I.A. Pharmacokinetics. **Biochem Pharmacol** v. 87, n. 1, p. 93- 120, 2014.

F.D.A, U. S. *et al.* US Department of Health and Human Services Food and DrugAdministration Center for Drug Evaluation and Research and Center for Veterinary Medicine. **Bioanalytical method validation guidance for industry**. Rockville, MD: FDA, 2018.

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

FEDERICO, M. Noções sobre parâmetros farmacocinéticos/farmacodinâmicos e sua utilização na prática médica. **Revistada Sociedade Brasileira de Clínica Médica**, v. 15, n. 3, p. 201-205, 2017.

FERENCZ, Z. *et al.* Optimisation of the synthesis parameters of mechanochemically prepared CaAl-layered double hydroxide. **Applied Clay Science**, v. 112-113, p. 94-99, 2015.

FERRARI, M. L. A. *et al.* Efficacy of oxamniquine and praziquantel in the treatment of *Schistosoma mansoni* infection: a controlled trial. **Bull. World Health Org.**, v. 81, n. 3, p. 190-195, 2003.

FREZZA, T. F. **Ação de Cordiaverbenacea sobre *Schistosoma mansoni***. 2012. Tese (Doutorado em Parasitologia) - Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, 2012

GALLO N. M. **Modelagem farmacocinética e análise de sistemas lineares para a predição da concentração de medicamentos no corpohumano**. 2012. Dissertação (Mestrado em Engenharia Mecânica). Escola Politécnica, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

GRYSEELS, B. *et al.* Human schistosomiasis. **The Lancet**, v. 368, n. 9541, p. 1106-1118, 2006.

HUGHES, J. P. *et al.* Principles of Early Drug Discovery. **Br J Pharmacol**, v. 162, n. 6, p. 1239-1249, 2011

HUISINGA, W. *et al.* The virtual laboratory approach to pharmacokinetics: design principles and concepts. **Drug Discov Today**. v.11, n.17-18, p.800-805, 2006.

KATZ, *et al.* Esquistossomose, xistosa, barrigad'água. **Ciência e Cultura**, v. 55, n. 1, p. 38-43, 2003.

KHANNA, I. Drug discovery in pharmaceutical industry: productivity challenges and trends. **Drug Discov Today**, v. 17, n. 19-20, p. 1088-1102, 2012

LIMA, A. C. **Obtenção e caracterização de dispersões sólidas de praziquantel**. 83 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2006.

LINDENBERG, M. *et al.* Classification of orally administered drugs on the World Health Organization Model list of Essential Medicines according to the biopharmaceutics classification system. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 58, n. 2, p. 265-278, 2004.

MALHADO, M. *et al.* Preclinical pharmacokinetic evaluation of praziquantel loaded in poly (methyl methacrylate) nanoparticle using a HPLC–MS/MS. **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis**, v. 117, p. 405- 412, 2016.

MANDOUR, M. *et al.* Pharmacokinetics of praziquantel in healthy volunteers and patients with schistosomiasis. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 84, n. 3, p. 389-393, 1990.

MATSUMOTO, J. Adverse effects of praziquantel treatment of *Schistosoma japonicum* infection: involvement of host anaphylactic reactions induced by parasite antigen release. **Int J Parasitol.** v. 32, n. 4, p. 461-71, 2002.

MATTOS A. *et al.* **Proposta de estudo de degradação forçada e desenvolvimento de método indicativo de estabilidade para o insumo farmacêutico ativo praziquantel e produto acabado.** 2017. 49 p. Trabalho de Conclusão de Curso (Especialização) - Instituto de Tecnologia em Fármacos, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2017.

MENG, Z. *et al.* Novel synthesis of layered double hydroxides (LDHs) from zinc hydroxide. **Applied Surface Science**, v. 396, p. 799-803, 2017.

MOURÃO, S. C. **Preparação e caracterização de lipossomas contendo praziquantel.** 124f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2001.

NEERVANNAN, S. Preclinical formulations for discovery and toxicology: physicochemical challenges. **Expert opinion on drug metabolism e toxicology**, v. 2, n. 5, p. 715-731, 2006.

NOVAES, M. *et al.* Síntese do anti-helmíntico praziquantel, a partir da glicina. **Química Nova**, v. 22, n. 1, p. 05-10, 1999.

OGA, S. **Fundamentos de Toxicologia.** São Paulo: Atheneu, 2003.

OLLIARO, P. *et al.* The little we know about the pharmacokinetics and pharmacodynamics of praziquantel (racemate and R-enantiomer). **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 69, n. 4, p. 863–870, 2014.

PAGANO, C. *et al.* Effects of different milling techniques on the layered double hydroxides final properties. **Applied Clay Science.** n. 151, p. 124-133, 2018.

PETROVA, E. Innovation in the Pharmaceutical Industry: The Process of Drug Discovery and Development. **Innovation and Marketing in the Pharmaceutical Industry.** New York: Springer, 2013. p. 19-81.

PIMENTA, D. *et al.* **Controle e tratamento da esquistossomose no Brasil. Estudo de caso-praziquantel.** 2018. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação). Faculdade de Engenharia Química, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, MG, 2018.

PORDEUS, L.C. *et al.* A ocorrência das formas aguda e crônica da esquistossomose mansônica no Brasil no período de 1997 a 2006: uma revisão de literatura. **Epidemiol. Serv. Saúde, Brasília**, v. 17, n. 3, p. 163-175, jul-set 2008.

QIAN, C.; GONG, F. Praziquantel for schistosomiasis in pregnancy. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 16, n. 5, p. 525-526, 2016.

QUEIROZ, R. F. G. E. **Desenvolvimento e padronização de novas metodologias aplicadas ao diagnóstico e monitoração de cura da esquistossomose mansoni na fase inicial (aguda) e crônica.** 2012. Tese (Doutorado em Ciências na área de Doenças Infecciosas e Parasitárias)-Centro de Pesquisa René Rachou, Fundação Oswaldo Cruz, Belo Horizonte, 2012.

RATH, *et al.* Antimoniais empregados no tratamento da leishmaniose: estado da arte. **Química Nova**, v. 26, n. 4, p. 550-555, 2003.

RUIZ-GARCIA, A. *et al.* Pharmacokinetics in drug discovery. **J Pharma Sci**, v. 97, n. 8, p. 654-90, Mar. 2007.

SANTOS *et al.* Pharmacokinetic-pharmacodynamic correlation for meropenem applied to a burn child using a bioanalytical liquid chromatographic method. **Revista Portuguesa de Farmacoterapia**, v. 3, n. 4, p. 4-12, 2011.

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

SETHIA, S. Solid dispersions: revival with greater possibilities and applications in oral drug delivery. **Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.** v. 20, n. 2 e 3, p. 215-247, 2003.

SHAOHONG, L *et al.* Evaluation of the antihelmintic effects of artesunate against experimental *Schistosoma mansoni* infection in mice using different treatment protocols. **Parasitol. Int.**, v. 55, p. 63-68, 2006.

SILVA, L. I. M. M. *et al.* O cuidado farmacêutico em pediatria. **Rev. Saúde Criança e Adolesc.**, v. 3, n.1, p. 66-69, 2011.

SIQUEIRA, L.P. *et al.* Schistosomiasis: Drugs used and treatment strategies. **Acta tropica**, v. 176, p. 179-187, 2017.

SIPOS, P.; PÁLINKÓ, I. As-prepared and intercalated layered double hydroxides of the hydrocalumite type as efficient catalysts in various reactions. **Catalysis Today**, v. 306, p. 32-41, 2018.

SOARES, D.A. *et al.* Avaliação epidemiológica da esquistossomose no estado de Pernambuco através de um modelo de regressão beta. **Arquivos de Ciências da Saúde**, v. 26, n. 2, p. 116-120, 2019.

STORPIRTIS, *et al.*, **Biofarmacotécnica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2009. 321 p.

SUN, *et al.* The cytotoxicity study of praziquantel enantiomers. **Drug design, development and therapy**, v. 10, p. 2061, 2016.

TANG, S. *et al.* Pharmacokinetics of a new ivermectin/praziquantel oil suspension after intramuscular administration in pigs. **Veterinary Parasitology**, v. 185, p. 229–235, 2012.

TANG, S. *et al.* Pharmacokinetics of a new ivermectin/praziquantel suspension after intramuscular administration in sheep. **Veterinary Parasitology**, v. 221, p. 54–58, 2016.

TIAN, D.Y. *et al.* Synthesis of methotrexatum intercalated layered double hydroxides by different methods: Biodegradation process and bioassay explore. **Applied Clay Science**, v. 118, p. 87-98, 2015.

TOUTAIN, P.L.; BOUSQUET-MÉLOU, A. Bioavailability and its assessment. **Journal of veterinary pharmacology and therapeutics**, v. 27, n.6, p. 455-466. 2004.a

TOUTAIN, P.; BOUSQUET-MÉLOU, A. Plasma clearance. **Journal of veterinary pharmacology and therapeutics**, v. 27, n. 6, 2004, p. 415-425.b

TOUTAIN, P.; BOUSQUET-MÉLOU, A. Plasma terminal half-life. **Journal of veterinary pharmacology and therapeutics**, v. 27, n. 6, 2004, p. 427-439.c

TOUTAIN, P.; BOUSQUET-MÉLOU, A. Volumes of distribution. **Journal of veterinary pharmacology and therapeutics**, v. 27, n. 6, p. 441-453, 2004.d

TOZER, T. M. *et al.* **Introdução a farmacocinética e farmacodinâmica**: as bases quantitativas da terapia farmacológica. Porto Alegre: Artmed, 2009. 336

VALLE, L.B.S. *et al.* **Farmacologia integrada**. 1988.

VIEIRA, A. C. C. **Obtenção e caracterização de complexo de inclusão e sistema multicomponentes no incremento da solubilidade do efavirenz na terapia anti-HIV**. Dissertação (Mestrado em Inovação Terapêutica) – UFPE, Recife, 2011

VITORINO, R. *et al.* Esquistossomose mansônica: diagnóstico, tratamento, epidemiologia, profilaxia e controle. **Rev Soc Bras Clin Med**, v. 10, n. 1, 2012, p. 39-45.

WINTER, M. E. **Farmacocinética clínica básica**. S. Paulo: Pharmabooks Editora. 2012, p. 525.

WORLD HEALTH ORGANIZATION *et al.* Elimination of neglected diseases and other poverty related infections. The 49th Directing Council at the 61st Session of The Regional Committee. Provisional Agenda Item 4.5. **World Health Organization**, Geneva, Switzerland, 2009.

ZDESENKO *et al.* Drug metabolism and pharmacokinetics of praziquantel: A review of variable drug exposure during schistosomiasis treatment in human hosts and experimental models. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 14, n. 9, p. e0008649, 2020.

ZHENG, Y. *et al.* Development of chiral praziquantel analogues as potential drug candidates with activity to juvenile *Schistosoma japonicum*. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 24, p. 4223-4226, 2014.

ANEXO A (COMITE DE ETICA NO USO DE ANIMAIS)



CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Farmacocinética pré-clínica do praziquantel carregado por micropartículas inorgânicas", registrada com o Protocolo CEUA/FCF/CAR: 09/2019, sob a responsabilidade do pesquisador Eduardo Henrique Vivêncio que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), sendo aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS da Faculdade de Ciências Farmacêuticas do Campus de Araraquara da UNESP em 23 de Outubro de 2019.

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	Janeiro 2020
Espécie/linhagem/raça	Rato heterogêneo Wistar
Nº de animais	40
Peso/Idade	(150 g) - (3 a 4 semanas)
Sexo	Macho
Origem	Biotério Central da Unesp/Botucatu
Registro CIAEP	02.00082.2019

Araraquara, 24 de Outubro de 2019.


Prof Dr Marcelo Tadeu Marin
Coordenador da CEUA