UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
CAMPUS DE ARARAQUARA

FARMACOCINÉTICA DO BENZNIDAZOL ADMINISTRADO EM COELHOS NA FORMA DE COMPRIMIDOS DE LIBERAÇÃO IMEDIATA E COMPRIMIDOS DE LIBERAÇÃO PROLONGADA

MARCELO GOMES DAVANÇO

Orientadora: Profa. Dra. Rosângela Gonçalves Peccinini

ARARAQUARA-SP
2015

Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”

Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Campus de Araraquara

Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas

FARMACOCINÉTICA DO BENZNIDAZOL ADMINISTRADO EM COELHOS NA FORMA DE COMPRIMIDOS DE LIBERAÇÃO IMEDIATA E COMPRIMIDOS DE LIBERAÇÃO PROLONGADA

MARCELO GOMES DAVANÇO

Orientadora: Profa. Dra. Rosângela Gonçalves Peccinini

Araraquara-SP

2015

Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”

Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Campus de Araraquara

FARMACOCINÉTICA DO BENZNIDAZOL ADMINISTRADO EM COELHOS NA FORMA DE COMPRIMIDOS DE LIBERAÇÃO IMEDIATA E COMPRIMIDOS DE LIBERAÇÃO PROLONGADA

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

MARCELO GOMES DAVANÇO

Orientadora: Profa. Dra. Rosângela Gonçalves Peccinini

Araraquara-SP

2015

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

D245 f

Davanço, Marcelo Gomes
Farmacocinética do benznidazol administrado em coelhos na forma de comprimidos de liberação imediata e comprimidos de liberação prolongada / Marcelo Gomes Davanço — Araraquara, 2015
151 f.

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

Orientador: Rosângela Gonçalves Peccinini

1. Benznidazol. 2. Farmacocinética. 3. Biodisponibilidade absoluta. 4. Biodisponibilidade relativa. 5. Doença de Chagas. I. Peccinini, Rosângela Gonçalves, orient. II. Título.

CAPES: 40300005

Dissertação de Mestrado:

FARMACOCINÉTICA DO BENZNIDAZOL ADMINISTRADO EM COELHOS NA FORMA DE COMPRIMIDOS DE LIBERAÇÃO IMEDIATA E COMPRIMIDOS DE LIBERAÇÃO PROLONGADA

Candidato:

MARCELO GOMES DAVANÇO

Dissertação de Mestrado apresentada e aprovada pela Comissão Examinadora em sessão pública realizada aos dezesseis dias do mês de outubro do ano de dois mil e quinze no Anfiteatro da Biblioteca da Faculdade de Ciências Farmacêuticas do Campus de Araraquara da UNESP.

COMISSÃO EXAMINADORA

Profa Dra Rosângela Gonçalves Peccinini – Presidente
Faculdade de Ciências Farmacêuticas – UNESP/Araraquara

Prof. Dr. Pedro José Rolim Neto
Centro de Ciências da Saúde - Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Dr. Daniel Rossi de Campos
Medley Indústria Farmacêutica Ltda

DEDICATÓRIA

Este trabalho é dedicado aos meus pais, Ademir e Guiomar, por tudo que fizeram por mim, principalmente pela oportunidade que me deram de poder estudar.

AGRADECIMENTOS

A Deus pela vida.

À minha namorada, **Larissa N. da Silva Morselli**, pelo apoio, incentivo, amor e carinho em todos os momentos.

À minha orientadora, **Profa Dra Rosângela Gonçalves Peccinini**, exemplo de ser humano e profissional, pela confiança e incentivo ao meu trabalho desde o primeiro ano de graduação. Ao seu carinho materno e amizade durante esses anos. Meus sinceros e eternos agradecimentos por tudo que fez por mim.

Aos meus amigos e parceiros de laboratório, **Michel Leandro de Campos**, **Elias Carvalho Padilha** e **Manuel Alejandro Henao Alzate** pela colaboração no desenvolvimento deste trabalho, compartilhamento de conhecimento e momentos de descontração.

Ao **Prof. Dr. Pedro José Rolim Neto** (Laboratório de Tecnologia dos Medicamentos – LTM) e sua aluna, **Talita Atanazio Rosa,** pela colaboração e concessão dos comprimidos de liberação prolongada avaliados neste trabalho.

Ao **Prof. Dr. Daniel Rossi de Campos** pela contribuição na correção da versão final dessa dissertação como membro da banca avaliadora.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (**FAPESP**), pela concessão de bolsa de Mestrado (convênio FAPESP/CAPES) no período 08/2014 a 05/2015 (Processo nº 2013/25882-6) e Auxílio à Pesquisa – Regular (Processo nº 2014/13192-8), fundamentais para realização deste trabalho.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (**CNPq**) pela concessão de bolsa de Mestrado nos demais meses do curso.

Ao **PADC - Programa de Apoio ao Desenvolvimento Científico da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP** pelo apoio financeiro na realização do projeto.

Aos **integrantes** e **ex-integrantes** do **Laboratório de Toxicologia** e **Laboratório de Bioequivalência** da FCF-UNESP, pela colaboração nos projetos realizados e amizade.

Aos meus **irmãos**, **tios**, **tias**, **primos**, **primas, sobrinha** e **família Morselli** pelo carinho, atenção e apoio.

Aos **moradores** e **ex-moradores** da **República Caverna,** pelos ensinamentos da vida, apoio e momentos de lazer.

Ao periódico ***Biomedical Chromatography*** pela publicação de parte dos resultados deste trabalho na forma de artigo científico.

Aos **professores** e **ex-professores** da FCF – UNESP/Araraquara pelos ensinamentos durante o curso de graduação em Farmácia-Bioquímica e pós-graduação em Ciências Farmacêuticas.

Aos **servidores** técnicos e administrativos da FCF – UNESP/Araraquara que contribuíram direta ou indiretamente na realização deste trabalho.

Eu sou parte de uma equipe. Então, quando venço, não sou eu apenas quem vence. De certa forma termino o trabalho de um grupo enorme de pessoas.

Ayrton Senna da Silva

RESUMO

O benznidazol (BNZ) é o fármaco de primeira escolha para o tratamento da doença de Chagas. No Brasil, este fármaco está disponível na forma de comprimidos de liberação imediata de 100 mg (adulto) e 12,5 mg (pediátrico) e é administrado duas ou três vezes ao dia, durante 60 dias. A alta frequência diária de administrações e o longo período de tratamento são fatores que contribuem significativamente para o abandono da terapia, com consequências sobre o sucesso terapêutico. Diante deste cenário, pesquisadores do Laboratório de Tecnologia de Medicamentos (Universidade Federal de Pernambuco) desenvolveram comprimidos de liberação prolongada de BNZ (LPK4M e LPK100M). Este estudo teve como objetivo avaliar a farmacocinética pré-clínica do BNZ administrado na forma farmacêutica de comprimidos de liberação prolongada (200 mg), comparando-a aos comprimidos atualmente disponíveis. Os estudos foram conduzidos em coelhos e a quantificação de BNZ foi realizada no plasma e urina através de métodos de cromatografia líquida de ultra eficiência previamente validados. O tempo de residência médio (MRT) foi duas vezes maior para o comprimido LPK100M em comparação ao de liberação imediata adulto. O tempo para atingir a concentração plasmática máxima ($t_{máx}$) foi três vezes maior para o comprimido LPK100M em relação ao de liberação imediata adulto. Na concentração plasmática máxima ($C_{máx}$) não se observou diferença estatística entre os diferentes tipos de comprimido (100 mg e 200 mg), demonstrando que mesmo administrando o dobro da dose (comprimidos de liberação prolongada), as concentrações plasmáticas não superam as do comprimido de liberação imediata adulto (100 mg). A biodisponibilidade do BNZ foi adequada na administração dos comprimidos de liberação prolongada e no de liberação imediata adulto, no entanto, no pediátrico foi inferior aos demais. Os parâmetros farmacocinéticos mencionados demonstram que a tecnologia farmacêutica empregada no comprimido LPK100M foi adequada, pois houve prolongamento da liberação do fármaco a partir da matriz polimérica e aumento da permanência do fármaco *in vivo.* Assim, os resultados obtidos fundamentaram uma proposta de ensaio de biodisponibilidade relativa em humanos visando à implementação do produto na terapêutica.

Palavras-chave: benznidazol, farmacocinética, biodisponibilidade absoluta, biodisponibilidade relativa, doença de Chagas.

ABSTRACT

Benznidazole (BNZ) is the first-line drug for the treatment of Chagas disease. In Brazil, the drug is available in the form of immediate-release tablets, 100-mg (adult) and 12.5-mg (pediatric); the drug is administered twice or thrice daily for 60 days. The high frequency of daily administrations and the long period of treatment are factors that significantly contribute to the abandonment of therapy, affecting therapeutic success. In this scenario, researchers from Laboratory of Medicine Technology (Federal University of Pernambuco) developed BNZ extended-release tablets (ERK4M and ERK100M). This study aimed to evaluate the preclinical pharmacokinetics of BNZ administered as extended-release tablets (200-mg dose) compared to the tablets currently available. The studies were conducted in rabbits and BNZ quantification was performed in plasma and urine by ultra performance liquid chromatography methods previously validated. The mean residence time (MRT) was twice as high for the tablet ERK100M when compared to the immediate-release adult. The time to maximum plasma concentration (t_{max}) was three times higher for the tablet ERK100M when compared to immediate-release adult. The maximum plasma concentration (C_{max}) there no was no statistical difference between the different types of tablet (100-mg and 200-mg), demonstrating that even administering a double dose (extended-release tablets), plasma concentrations do not exceed the immediate-release adult tablet (100-mg). The bioavailability of BNZ was adequate in the administration of extended-release tablets and immediate-release adult tablet; however, with the administration of the pediatric tablet, bioavailability was lower than with other tablets. The pharmacokinetic parameters demonstrated that the ERK100M tablet prolonged drug release from the polymer matrix and provided an increase in the maintenance of the drug concentration in vivo. Thus, a relative bioavailability study in humans will be planned for implementation of a new product in the treatment of Chagas disease.

Keywords: benznidazole, pharmacokinetics, absolute bioavailability, relative bioavailability, Chagas disease.

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

ADU – grupo que recebeu comprimido adulto

ASC_{0-t} – área sob a curva de zero ao último tempo de quantificação

$ASC_{0-\infty}$ - área sob a curva de zero extrapolada ao infinito

ASMC – área sob o momento da curva

BDR – estudo de biodisponibilidade relativa

BE – estudo de bioequivalência

BNZ – benznidazol

Cl – *clearance* total ou plasmático

Cl_r – *clearance* renal

$C_{máx}$ - concentração plasmática máxima

DND*i* – *Drugs for Neglected Diseases initiative* (em Português, Iniciativa de Medicamentos para Doenças Negligenciadas)

fe – fração excretada inalterada na urina

F_{oral} – biodisponibilidade absoluta

HPMC - hidroxipropilmetilcelulose

IV – intravenosa

k_a – constante de absorção

k_{el} – constante de eliminação para modelo monocompartimental

LP – liberação prolongada

LPK100M – comprimido de liberação prolongada K100M

LPK4M – comprimido de liberação prolongada K4M

MAT – *mean absorption time* (em português, tempo de absorção médio)

MRT – *mean residence time* (em português, tempo de residência médio)

PED – grupo que recebeu o comprimido pediátrico

RBA – *relative bioavailability* (em português, biodisponibilidade relativa)

$t_{máx}$ – tempo para atingir a concentração plasmática máxima

$t_{1/2}$ – meia-vida de eliminação

$t_{1/2a}$ – meia-vida de absorção

V_d – volume de distribuição

WHO – *World Health Organization* (em português, Organização Mundial da Saúde)

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Fotomicrografia de esfragaço sanguíneo evidenciando formas tripomastigotas (setas) de *Trypanosoma cruzi*. 22
Figura 2 - Diferentes espécies de triatomíneos encontradas no Brasil. 23
Figura 3 - Ciclo de transmissão vetorial do *Trypanosoma cruzi.* 24
Figura 4 - Casa típica da região rural do semiárido nordestino, PB. 27
Figura 5 - Dinâmica da resposta humoral (IgG) ao parasita na doença de Chagas..29
Figura 6 - Representação estrutural dos fármacos antichagásicos nifurtimox e benznidazol. 31
Figura 7 - Possíveis mecanismos de ação do BNZ na atividade anti-T.cruzi. 35
Figura 8 - Perfil de dissolução dos comprimidos de liberação prolongada do tipo K4M (A) e K100M (B). 39
Figura 9 - Relação simplificada entre a farmacocinética e a farmacodinâmica. 40
Figura 10 - Ilustração esquemática das etapas de entrada do fármaco na circulação após administração oral de comprimido. 43
Figura 11 - Representação esquemática geral da distribuição de um fármaco entre o plasma e tecido e sua interação com proteínas. 45
Figura 12 - Representação gráfica e esquemática dos modelos monocompartimental (A) e bicompartimental (B) na administração extravascular. 51
Figura 13 - Representação gráfica dos processos de cinética linear e não linear.....53
Figura 14 - Gaiolas metabólicas para coelhos. 64
Figura 15 - Cartelas de comprimidos adultos na dosagem de 100 mg (à esquerda) e pediátricos na dosagem de 12,5 mg (à direita). 65
Figura 16 - Esquema de obtenção dos comprimidos de liberação prolongada K4M e K100M. 67
Figura 17 - Orelha tricotomizada de coelho com identificação da veia auricular marginal e artéria auricular central. 70
Figura 18 - Dispositivo *pill dispenser* utilizado para administração de comprimidos em coelhos. 71
Figura 19 - Sobreposição de cromatogramas do método bioanalítico para quantificação de BNZ em plasma de coelhos. 76
Figura 20 - Curva analítica para quantificação de BNZ em plasma. 78

Figura 21 - Sobreposição de cromatogramas do método bioanalítico para quantificação de BNZ em urina de coelhos. 82
Figura 22 - Curva analítica para quantificação de BNZ em urina. 84
Figura 23 - Perfil farmacocinético de BNZ na administração de comprimidos de liberação imediata de 100 mg. 90
Figura 24 - Perfil farmacocinético de BNZ na administração de comprimidos pediátricos de liberação imediata de 12,5 mg. 95
Figura 25 - Perfil farmacocinético de BNZ na administração de comprimidos de liberação prolongada de BNZ em coelhos. 98
Figura 26 - Perfil farmacocinético de BNZ na administração intravenosa em dose única de 10 mg em coelhos..... 101
Figura 27 - Perfis farmacocinéticos de todos os grupos de animais. 102
Figura 28 – Desenho de estudo cruzado 2x2 (jejum/alimentado) de BDR do comprimido LPK100M. 116

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Casos de doença de Chagas por tipo de transmissão no Brasil de 2005 a 2010. 26
Tabela 2 - Formulação dos comprimidos adulto (100 mg) e pediátrico (12,5 mg) de BNZ produzidos pelo LAFEPE. 66
Tabela 3 - Formulação dos comprimidos de liberação prolongada de BNZ. 67
Tabela 4 - Parâmetros farmacocinéticos calculados para os comprimidos de BNZ em coelhos. 73
Tabela 5 - Valores dos pontos da curva analítica para quantificação de BNZ em plasma 77
Tabela 6 - Precisão e exatidão dos controles de qualidade para o método bioanalítico de BNZ em plasma. 79
Tabela 7 - Estudo de recuperação dos controles de qualidade baixo, médio e alto do método bioanalítico para quantificação de BNZ em plasma. 80
Tabela 8 - Estabilidade de BNZ sob condições de armazenagem em plasma. 81
Tabela 9 - Valores dos pontos da curva analítica para quantificação de BNZ em urina 83
Tabela 10 - Precisão e exatidão dos controles de qualidade para o método bioanalítico de BNZ em urina. 85
Tabela 11 - Estudo de recuperação dos controles de qualidade baixo, médio e alto do método bioanalítico para quantificação de BNZ em urina. 86
Tabela 12 - Estabilidade de BNZ sob condições de armazenagem em urina. 87
Tabela 13 - Valores de concentração plasmática de BNZ *versus* tempo na administração de comprimidos de liberação imediata de 100 mg em coelhos 88
Tabela 14 - Parâmetros farmacocinéticos de BNZ administrado em comprimidos de liberação imediata de 100 mg em coelhos 89
Tabela 15 - Estudos pré-clínicos de farmacocinética do BNZ publicados na literatura. 91
Tabela 16 - Valores de concentração plasmática de BNZ versus tempo na administração de comprimidos de liberação imediata de 12,5 mg em coelhos. 93
Tabela 17 - Parâmetros farmacocinéticos de BNZ administrado em comprimidos de liberação imediata de 12,5 mg em coelhos. 94

Tabela 18 - Valores de concentração plasmática de BNZ versus tempo na administração dos comprimidos de liberação prolongada K4M e K100M em coelhos. 96
Tabela 19 - Parâmetros farmacocinéticos de BNZ administrado em comprimidos de liberação prolongada K4M e K100M de 200 mg em coelhos. 97
Tabela 20 - Valores de concentração plasmática de BNZ versus tempo na administração IV de BNZ em dose única de 10 mg. 99
Tabela 21 - Parâmetros farmacocinéticos da administração IV de BNZ em dose única de 10 mg em coelhos.....100
Tabela 22 - Parâmetros farmacocinéticos de todos os grupos e comparação estatística. 103
Tabela 23 - Estudo de biodisponibilidade absoluta (F_{oral}) e relativa (RBA) de comprimidos de BNZ. 112

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO 18
2. REVISÃO DE LITERATURA 21
2.1. Doença de Chagas 21
2.2. Agente etiológico, vetor e vias de transmissão 21
2.3. Epidemiologia e medidas de controle da doença 24
2.4. Manifestações clínicas e diagnóstico 27
2.5. Tratamento 30
2.5.1. Benznidazol 32
2.5.2. Novas formulações de benznidazol 37
2.6. A farmacocinética 40
2.6.1. Processos fisiológicos em farmacocinética 41
2.6.2. Modelos farmacocinéticos 49
2.6.3. Ordem cinética 52
2.6.4. A farmacocinética pré-clínica no desenvolvimento de novos medicamentos. 53
3. JUSTIFICATIVA 57
4. OBJETIVOS 58
4.1. Objetivo geral 58
4.2. Objetivos específicos 58
5. MATERIAL E MÉTODOS 59
5.1. Métodos bioanalíticos para quantificação de BNZ em plasma e urina 59
5.1.1. Soluções padrão, solventes e reagentes 59
5.1.2. Condições cromatográficas 59
5.1.3. Processamento da amostra 60
5.1.4. Validação 60
5.2. Estudo farmacocinético 63
5.2.1. Modelo Animal 63
5.2.2. Comprimidos de BNZ 64
5.2.3. Delineamento Experimental 68
5.2.4. Parâmetros farmacocinéticos 72
5.3. Tratamento de dados e análise estatística 74
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO 75
6.1. Validação dos métodos bioanalíticos para plasma e urina 75

6.1.1. Plasma 75
6.1.2. Urina 82
6.2. Avaliação farmacocinética 88
6.2.1. Comprimido adulto de liberação imediata (Grupo ADU – 100 mg) 88
6.2.2. Comprimido pediátrico de liberação imediata (Grupo PED – 12,5 mg) 92
6.2.3. Comprimidos de liberação prolongada K4M e K100M (LPK4M e LPK100M - 200 mg) 95
6.2.4. Administração intravenosa de BNZ (Grupo IV – 10 mg) 98
6.3. Comparação estatística e interpretação dos resultados 102
6.3.1. Meia-vida de eliminação ($t_{1/2}$) e constante de eliminação (k_{el} ou β) 104
6.3.2. Meia-vida de absorção ($t_{1/2\ a}$) e constante de absorção (k_a) 105
6.3.3. Tempo de residência médio (MRT) e tempo de absorção médio (MAT) 106
6.3.4. Concentração plasmática máxima ($C_{máx}$) e tempo para atingir $C_{máx}$ ($t_{máx}$) 107
6.3.5. Clearance total (Cl) e volume de distribuição (V_d) 109
6.3.6. Clerance renal (Cl_r) e fração excretada inalterada na urina (fe) 111
6.4. Avaliação da biodisponibilidade absoluta e relativa dos comprimidos de BNZ 112
6.5. Proposta de estudo clínico para comprimido de liberação prolongada de BNZ 114
7. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS 120
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS 121
APÊNDICES 136
ANEXO 151

1. INTRODUÇÃO

As doenças negligenciadas são devastadoras para a humanidade e de pouco interesse para as indústrias farmacêuticas multinacionais em decorrência do seu inexpressivo retorno econômico. As pesquisas para a busca de medicamentos para essas doenças centram-se em países em desenvolvimento (países subdesenvolvidos), os quais são os mais afetados por essas moléstias. No Brasil diversos grupos de pesquisadores focam suas investigações na busca por novas terapias para doenças negligenciadas (COURA, 2009; GIAROLLA; FERREIRA, 2015; SOARES-SOBRINHO *et al*., 2007).

A doença de Chagas merece destaque neste cenário. É causada pelo parasita hemoflagelado *Trypanosoma cruzi*, transmitida vetorialmente por insetos triatomíneos e acomete principalmente indivíduos com baixa condição sócio-econômica. O tratamento desta parasitemia conta com somente duas substâncias, o nifurtimox e o benznidazol, sendo que ambas foram descobertas na década de 70. Desde então, nenhum outro tratamento chegou a ser disponibilizado aos pacientes. Além disso, os tratamentos atuais tem eficácia limitada nas diferentes fases da doença, longo período de duração, alta frequência de administração e efeitos adversos que podem levar a interrupção da terapia (COURA; BORGES-PEREIRA, 2012).

Nos últimos anos, pesquisadores do Laboratório de Tecnologia de Medicamentos (LTM) da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE) têm centrado suas pesquisas no desenvolvimento de novas formulações (inovações incrementais) com o fármaco benznidazol (BNZ) para o tratamento da doença de Chagas, principalmente diante ao repasse da patente e transferência da tecnologia de produção do BNZ pela empresa Roche ao governo brasileiro entre os anos de 2004 a 2006 (ROSA, 2015; SANTOS, 2011). O BNZ é o fármaco de primeira escolha e é disponível mundialmente para o tratamento da fase aguda da doença de Chagas. No Brasil, existem apenas duas apresentações comerciais, ambas de liberação imediata: comprimidos de uso adulto de 100 mg e comprimidos de uso pediátrico de 12,5 mg (DND*i*, 2012).

O tratamento de adultos e crianças requer duas ou três administrações ao

dia, durante 60 dias. O longo período de tratamento, a frequência de administração e a série de efeitos adversos causados contribuem significativamente para o abandono da terapia. Além disso, a resistência de algumas cepas ao fármaco e a baixa eficácia na fase crônica tornam ainda mais difícil o tratamento desta parasitemia (CANÇADO, 1997; CASTRO; MECCA; BARTEL, 2006; DIAS, 2009).

Diante deste cenário, pesquisadores do LTM desenvolveram e caracterizaram novas formulações de BNZ para possibilitar melhorias no uso deste fármaco no tratamento da doença de Chagas. Estes laboratórios utilizaram tecnologias farmacêuticas para o desenvolvimento de comprimidos de liberação prolongada de BNZ.

Foram preparadas dispersões sólidas de BNZ com polivinilpirrolidona (PVP) e incorporadas em matriz polimérica de hidroxipropilmetilcelulose (HPMC) visando prolongar a liberação do fármaco e manter concentrações plasmáticas constantes. Estas novas apresentações foram avaliadas em testes de controle de qualidade e o perfil de dissolução demonstrou vantagens significativas na liberação do fármaco, quando comparados aos sistemas de liberação imediata disponíveis no mercado. Nestes ensaios foi possível observar o prolongamento da liberação do fármaco quando contido em matriz polimérica de HPMC (ROSA, 2015).

O comportamento desses novos comprimidos *in vivo* pode proporcionar melhorias no tratamento com BNZ, visto que o perfil de liberação prolongada pode levar a redução da frequência de administração e contribuir para a adesão do paciente a terapia (ANSEL; POPOVICH; ALLEN, 2005; ISHA *et al*., 2012). Considerando o longo período de tratamento da doença de Chagas (60 dias), a redução na frequência de administração proporciona também maior conforto ao paciente. Ainda, deve-se considerar que esta redução diminui a oscilação da concentração plasmática do fármaco, podendo gerar níveis plasmáticos mais constantes e perfil farmacocinético mais seguro (ANSEL; POPOVICH; ALLEN, 2005).

Diante dos resultados promissores obtidos *in vitro*, tornou-se necessária a avaliação *in vivo* destes comprimidos de liberação prolongada de BNZ através de ensaios farmacocinéticos pré-clínicos.

Neste estudo, inicialmente, foram validados métodos bioanalíticos para quantificação de BNZ em plasma e urina de coelhos (modelo animal utilizado). Após

a validação dos métodos bioanalíticos, foram iniciados os ensaios farmacocinéticos com os comprimidos de liberação prolongada, fazendo uma comparação com o perfil farmacocinético do BNZ quando administrado a partir das apresentações comerciais (comprimido adulto e pediátrico). Estas avaliações permitiram comparações dos parâmetros farmacocinéticos entre as formulações de liberação imediata e de liberação prolongada, evidenciando vantagens e desvantagens do uso destas formulações *in vivo*. Também foi possível apontar perspectivas sobre o uso dos comprimidos de liberação prolongada em ensaios clínicos e propor o estudo de biodisponibilidade relativa em humanos que será realizado futuramente.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Doença de Chagas

A doença de Chagas é uma parasitemia causada pelo flagelado *Trypanosoma cruzi* e transmitida vetorialmente por triatomíneos, conhecidos popularmente como “barbeiros”. A doença foi denominada “doença de Chagas” em homenagem ao cientista que a descobriu e caracterizou seu ciclo evolutivo em 1909, o médico sanitarista brasileiro Carlos Ribeiro Justiniano Chagas, iniciando a investigação da doença no norte do estado de Minas Gerais numa campanha anti-palúdica na construção da Estrada de Ferro Central do Brasil (CHAGAS, 1909). Por seu grandioso feito pela Ciência, Carlos Chagas recebeu o prêmio de doutor *honoris causa* pela Universidade de Harvard e Universidade de Paris. Ainda, no mesmo ano, foi indicado ao Prêmio Nobel de Medicina (MALAFAIA; RODRIGUES, 2010).

2.2. Agente etiológico, vetor e vias de transmissão

O *Trypanosoma cruzi* é um flagelado da classe Zoomastigophorea, ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae e gênero Trypanosoma. Ainda, a espécie *cruzi* é subdivida em seis linhagens (I – VI), sendo as cepas diferentes entre si em relação ao grau de virulência, comportamento, tropismo e variações na sensibilidade a fármacos para modelos animais e humanos (MACÊDO, 2000; ZINGALES *et al*., 2009).

O parasita possui mitocôndria grande e única contendo o cinetoplasto (compartimento de DNA (k-DNA) localizado dentro da mitocôndria) localizado na base do flagelo (TELLERIA *et al*., 2006). Além do núcleo e cinetoplasto, possui outras organelas que exercem funções importantes, como glicossoma, que exerce papel no metabolismo de peróxido de oxigênio e oxidação de aminoácidos; o complexo de Golgi (localizado entre o núcleo e o cinetoplasto) participando do processo de glicosilação; e uma estrutura conhecida como acidocalcissoma, envolvida no acúmulo de cálcio da célula e presente em maior quantidade em formas amastigotas (BRENER; ANDRADE; BARRAL-NETO, 2000; SCOTT *et al*.,

1997; SOUTO-PADRÓN *et al*., 1980).

As formas evolutivas presentes em seu ciclo são classificadas pela posição do cinetoplasto em relação ao núcleo e flagelo. Na forma tripomastigota (Figura 1), o cinetoplasto localiza-se na parte posterior, em posição terminal, e o flagelo emerge da chamada bolsa flagelar. Nas formas epimastigotas, o cinetoplasto e a bolsa flagelar estão em posição anterior ao núcleo. As formas amastigotas (fase intracelular) são organismos arredondados que apresentam flagelo inconspícuo e cinetoplasto ao lado do núcleo (TYLER; ENGMAN, 2001).

Figura 1 - Fotomicrografia de esfragaço sanguíneo evidenciando formas tripomastigotas (setas) de *Trypanosoma cruzi* encontradas no sangue periférico de camundongo (Giemsa, 100x).

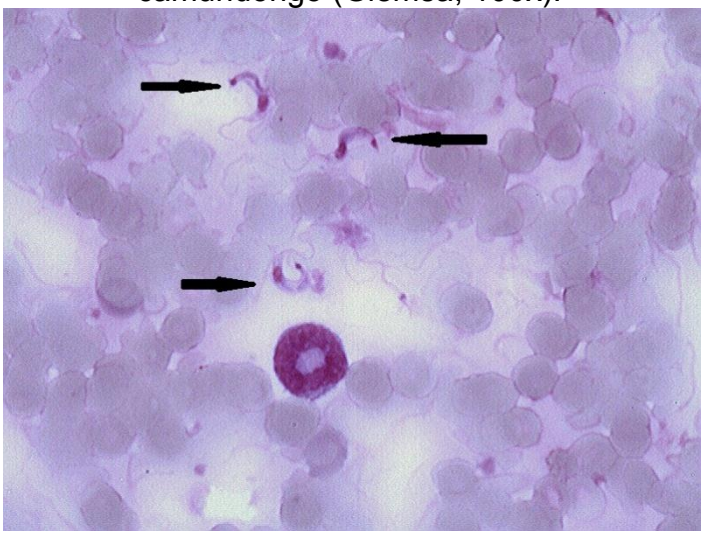


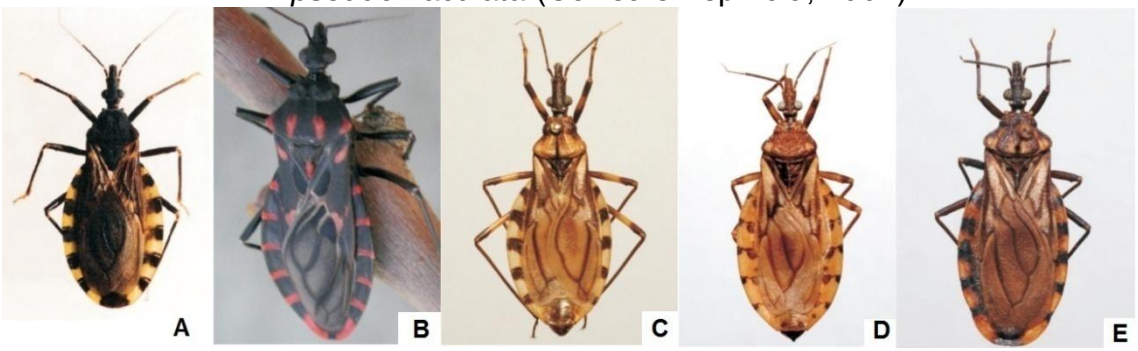
Foto: Aline R. Ribeiro e Marcelo G. Davanço/FCF-UNESP.

Em relação ao vetor de transmissão, o triatomíneo tem várias denominações populares dependendo da região, dentre elas: barbeiro, chupões, procotós (sertão da Paraíba), vum-vum (Bahia), chupança (Mato Grosso), vinchucas (países andinos), chincha voladora (México), *kissing bugs* (EUA). A denominação “barbeiro” é devido ao fato do inseto sugar sangue geralmente na região da face, área mais propensa a ficar descoberta (MARCONDES *et al*., 1999).

Os triatomíneos são pertencentes à ordem Hemiptera, sendo essa subdividida em hemípteros fitófagos, hemípteros predadores ou entomófagos e hemípteros hematófagos (os triatomíneos) (ARGOLO *et al*., 2008). Existem cerca de 150 diferentes espécies de triatomíneos conhecidas da subfamília Triatominae,

sendo elas subdivididas em 15 gêneros (COSTA; FELIX, 2007; GALVÃO *et al*., 2003). Os gêneros considerados mais importantes são: Panstrongylus, Rhodnius e Triatoma, os quais podem ser anatomicamente diferenciados através da posição onde as patas se inserem (ARGOLO *et al*., 2008; SCHOFIEL, 1979). No Brasil, as espécies mais importantes na transmissão da doença de Chagas são: *Triatoma infestans*, *Panstrongylus megistus*, *Triatoma brasiliensis*, *Triatoma sordida* e *Triatoma pseudomaculata* (Figura 2) (COSTA; PETERSON; BEARD, 2002).

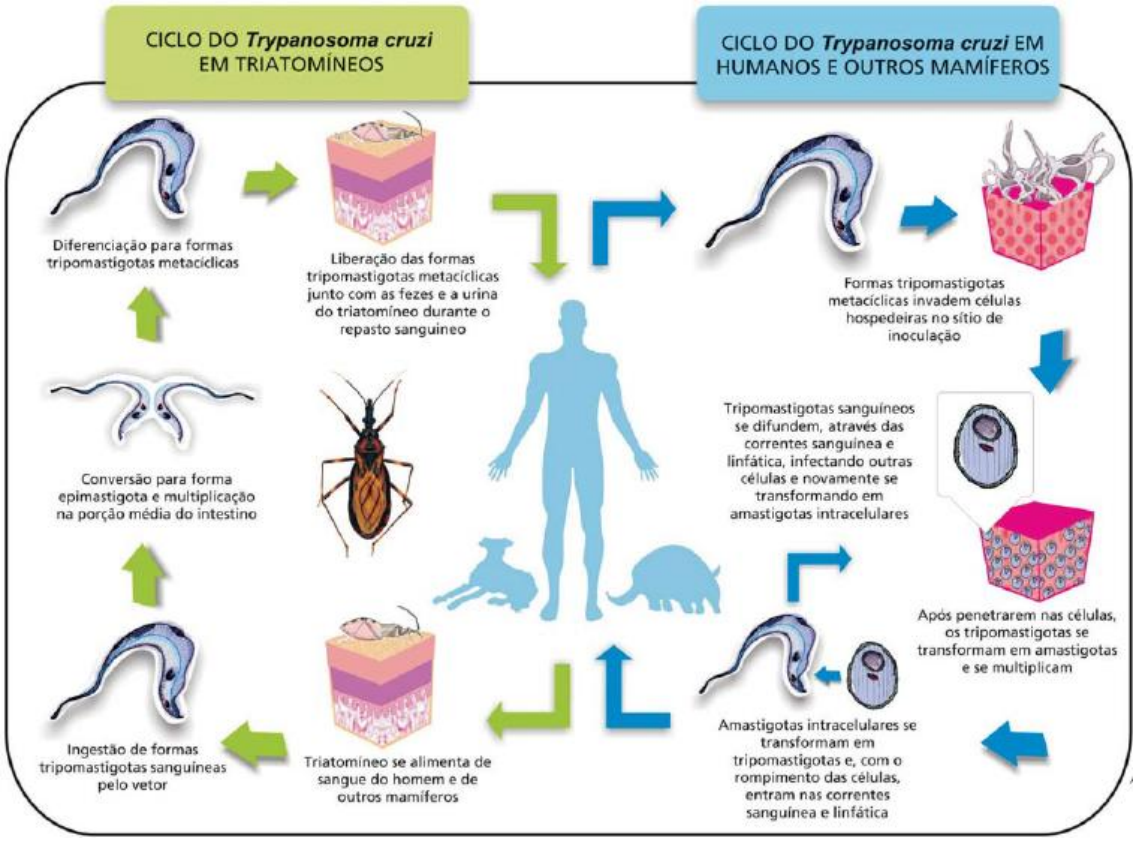
Figura 2 - Diferentes espécies de triatomíneos encontradas no Brasil. A: *Triatoma infestans* (Klug, 1834), B: *Panstrongylus megistus* (Burmeister, 1835), C: *Triatoma brasiliensis* (Neiva, 1911), D: *Triatoma sordida* (Stål, 1859), E: *Triatoma pseudomaculata* (Correa e Espínola, 1964).



Fonte: adaptado de Gonçalves *et al*., 2012 (Guia de Triatomíneos da Bahia).

O ciclo do parasita se inicia quando o triatomíneo se alimenta do sangue de vertebrados e ingere formas tripomastigotas sanguíneas. No inseto, na região do intestino médio, os parasitas se transformam na forma epimastigota, sendo essa forma exclusiva do hospedeiro invertebrado (triatomíneo), e se multiplicam. No intestino posterior dos triatomíneos, as formas epimastigotas se transformam em tripomastigotas metacíclicas. Essa forma é eliminada com fezes e urina durante o repasto sanguíneo, penetrando no organismo do hospedeiro (homem e outros mamíferos) através da picada ou de mucosas e, então, renovando o ciclo de transmissão da doença (BRENER; ANDRADE; BARRAL-NETO, 2000). Na figura 3 é apresentado um esquema simplificado do ciclo de transmissão.

Figura 3 - Ciclo de transmissão vetorial do *Trypanosoma cruzi.*



Fonte: Venício Ribeiro, ICICT/Fiocruz. Extraído de Argolo *et al*., 2008.

Além da transmissão vetorial, a doença de Chagas também apresenta outros tipos e também importantes modos de transmissão, como: transmissão por via oral (DIAS *et al*., 2008; SHIKANAI-YASUDA; CARVALHO, 2012), transfusão sanguínea (FEARON *et al*., 2013), transmissão congênita (CEVALLOS; HERNÁNDEZ, 2014), transmissão por transplante de órgãos (CHIN-HONG *et al*., 2011) e contaminação por acidentes laboratoriais (HERWALDT, 2001). A transmissão oral ganhou destaque nos últimos anos, principalmente no Brasil, devido a surtos da doença envolvendo alimentos contaminados por triatomíneos infectados, como açaí (NÓBREGA *et al*., 2009) e caldo de cana (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2005).

2.3. Epidemiologia e medidas de controle da doença

Em março de 2015, a Organização Mundial de Saúde (OMS) atualizou os dados epidemiológicos da doença de Chagas. A partir dos dados epidemiológicos

de 2010 de 21 países da América Latina e suas respectivas instituições científicas, acadêmicas e governamentais, essa atualização foi realizada com base nos seguintes dados epidemiológicas e demográficos (WHO, 2015):

- população do país;
- número anual de nascimentos;
- número estimado de pessoas infectadas;
- número anual estimado de novos casos por transmissão vetorial;
- estimativa de mulheres com idade entre 15 e 44 anos infectadas;
- número anual de casos de infecção por transmissão congênita;
- prevalência estimada de infecção por 100 habitantes;
- incidência estimada de infecção devido à transmissão por via congênita por 100 nascidos vivos;
- estimativa da população em risco de infecção devido à infestação do vetor em domicílios;
- número estimado de pessoas com cardiopatia chagásica;
- e prevalência estimada de infectados entre doadores de sangue.

Os resultados desse levantamento apontam que mais de 5,5 milhões de pessoas foram infectadas com *T. cruzi* nos 21 países da América Latina. Os países que lideram a lista são Argentina, Brasil e México, com números estimados em 1.505.235, 1.156.821 e 876.458 pessoas infectadas, respectivamente (WHO, 2015).

Além da extensa região endêmica da América Latina, países como Japão, Austrália, Nova Zelândia, Espanha, Canadá e EUA também registram casos da doença devido ao elevado número de imigrantes infectados (JACKSON; PINTO; PETT, 2014; HOTEZ *et al*., 2013; CARLIER, 2011; BERN *et al*., 2011).

No Brasil, a Secretaria de Vigilância Sanitária (SVS) do Ministério da Saúde realizou um levantamento dos casos de doença de Chagas no período de 2005 a 2010 em relação ao tipo de transmissão (Tabela 1).

Tabela 1 - Casos de doença de Chagas por tipo de transmissão no Brasil de 2005 a 2010.

Ano	Caso	Oral	%	Vetor	%	Ignorada	%
2005	33	27	82	0	0	6	18
2006	118	107	91	3	3	8	7
2007	161	119	74	3	2	39	24
2008	131	74	56	4	3	53	40
2009	256	165	64	6	2	85	33
2010*	28	21	75	1	4	6	21
Total	**727**	**513**	**71**	**17**	**2**	**197**	**27**

* até 30/05/2010. Fonte: Ministério da Saúde, 2010.

Este levantamento aponta que, nos últimos anos, grande parte dos casos da doença se deu devido à transmissão por via oral (alimentos contaminados). O pequeno número de casos de transmissão vetorial se deve ao fato do Brasil reduzir enormemente a transmissão através do *Triatoma infestans* (um dos principais vetores da doença no país) por medidas de aplicação de inseticida em domicílios com presença ou potencial para abrigar triatomíneos. Em 2006, o Brasil recebeu a Certificação Internacional de Eliminação da Transmissão da doença de Chagas pelo *Triatoma infestans* (FERREIRA; SILVA, 2006).

Apesar do controle vetorial por meio de inseticidas ter reduzido a transmissão da doença por triatomíneos no país, segundo Dias (1998), a melhor e mais importante estratégia para o controle definitivo é a melhoria habitacional, haja vista domicílios rurais de pau-a-pique (barro e madeira) (Figura 4) ainda são uma realidade na região norte e nordeste do país.

Figura 4 - Casa típica da região rural do semiárido nordestino, PB.

Foto: Gleidson Esperança, extraído de Argolo *et al.*, 2008.

Em 2013, por iniciativa da Fundação Nacional da Saúde (Funasa), foi lançado um programa de Melhorias Habitacionais para o Controle da doença de Chagas (MHCDCh) com o objetivo de controlar a doença em municípios localizados em áreas endêmicas (FUNASA, 2013). Atualmente este programa encontra-se em andamento.

Além dessas medidas, o Brasil por meio da ANVISA possui legislação (RDC 153/2004) que regulamenta a triagem obrigatória de doadores de sangue em todas as regiões do país, evitando que pacientes infectados doem sangue e contaminem outros indivíduos via transfusão sanguínea.

2.4. Manifestações clínicas e diagnóstico

A doença de Chagas pode ser dividida em duas fases: aguda e crônica. A fase aguda é o momento em que o parasita, na sua forma tripomastigota, está presente no sangue em quantidade expressiva. A parasitemia sanguínea torna-se ativa entre o 8º e 12º dia após a inoculação e dura cerca de um mês. Neste momento, o paciente tem febre, mal-estar, falta de apetite, infartamento de gânglios, aumento de baço e fígado, distúrbios cardíacos e inflamação no local da picada do triatomíneo (chagoma). O chagoma e o sinal de Romaña (inchaço das pálpebras) são os sinais mais comuns da fase aguda. Em alguns casos de transmissão por via oral são observados

sangramentos digestivos (hematoquezia). A taxa de mortalidade na fase aguda é de 2 a 8% e atinge principalmente crianças (DIAS; COURA, 1997; REY, 2013).

Após a fase aguda, com ou sem sintomas aparentes, a doença desenvolve-se de maneira assintomática, com aparecimento de manifestações clínicas após um longo período de tempo, em geral alguns anos (REY, 2013).

Na fase crônica existem raros parasitas na circulação sanguínea do paciente. No início esta fase não apresenta sinais de comprometimento cardíaco e/ou digestivo, sendo conhecida como indeterminada (RIBEIRO; ROCHA, 1998). Esse quadro pode-se prolongar por toda a vida do paciente ou progredir para a forma cardíaca, digestiva ou associada (cardiodigestiva) (DIAS; COURA, 1997).

A forma cardíaca é caracterizada por quadros de miocardiopatia (BARRETTO *et al*., 1989; RIBEIRO *et al*., 2012) e insuficiência cardíaca congestiva. As formas amastigotas do parasita formam “ninhos” ao se multiplicarem no interior de fibras musculares levando ao comprometimento do órgão como um todo (REY, 2013). Essa forma atinge cerca de 30% dos pacientes em fase crônica da doença e é a maior responsável por mortes (HIGUCHI *et al*., 2003; RASSI-JR; RASSI; MARIN-NETO, 2009). Segundo estimativa da Organização Mundial da Saúde, Argentina e Brasil representam mais da metade dos indivíduos com cardiopatia chagásica da América Latina (WHO, 2015).

A forma digestiva é caracterizada por quadros de megacólon e megaêsofago, causando complicações digestivas ao paciente. Esses quadros são encontrados em 10% dos pacientes em fase crônica (DIAS; COURA, 1997; REZENDE; MOREIRA, 2000).

A forma associada ou cardiodigestiva é quando o paciente apresenta complicações tanto cardíacas quanto digestivas (REZENDE; MOREIRA, 2000).

Nas últimas décadas a doença de Chagas em imunodeprimidos ganhou grande importância médica devido à reativação da parasitemia e consequente multiplicação do parasita. No caso da síndrome de imunodeficiência adquirida (HIV/AIDS), a resposta linfocitária T está comprometida pela ação seletiva do retrovírus HIV, provocando assim a reativação da parasitemia e o agravamento dos focos de miocardite crônica (SANTOS *et al*., 2002; REY, 2013).

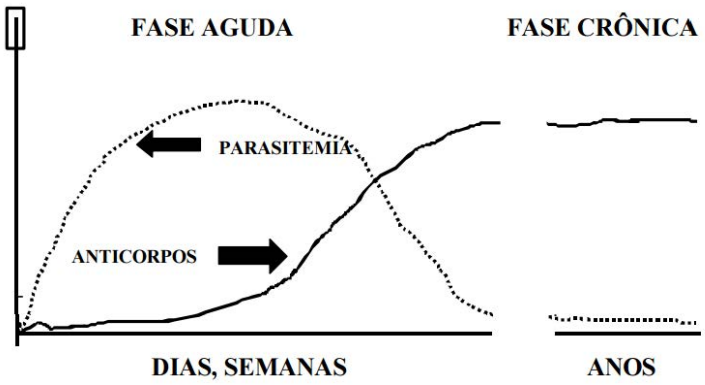
O diagnóstico da doença de Chagas pode ser realizado através de métodos parasitológicos diretos (gota fresca) e indiretos (xenodiagnóstico), métodos

sorológicos, exames histopatológicos e exames complementares de apoio (hemograma, enzimas hepáticas, proteínas séricas, entre outros). Dentre as técnicas parasitológicas, o método mais simples é o de microscopia direta da gota fresca de sangue periférico, examinada entre lâmina e lamínula em ocular de 10 e objetiva de 40x. Neste método é possível observar o parasita em movimentação entre hemácias e leucócitos (forma tripomastigota) (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2005).

Os métodos sorológicos de diagnóstico da doença de Chagas se baseiam em geral na detecção de anticorpos anti-*T.cruzi* da classe IgG, sendo característica da fase crônica. Os anticorpos da classe IgM são características da fase aguda, porém, esporadicamente podem ser detectados na fase crônica de alguns pacientes (BRASIL *et al*., 2010).

Na figura 5 é possível observar a resposta humoral e parasitêmica entre as fases aguda e crônica.

Figura 5 - Dinâmica da resposta humoral (IgG) ao parasita na doença de Chagas.



Fonte: Sistema de Notificação de Agravos de Notificação (SINAN), SVS, MS.

Os testes sorológicos são úteis na ausência de exames parasitológicos positivo para avaliar o estágio em que a doença se encontra. São realizados através de testes imunoenzimáticos ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*) e em casos de exames sorológicos inconclusivos, recomenda-se o diagnóstico molecular da doença através de reação em cadeia de polimerase PCR (*polymerase chain reaction*) (BRASIL *et al*., 2010; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2005).

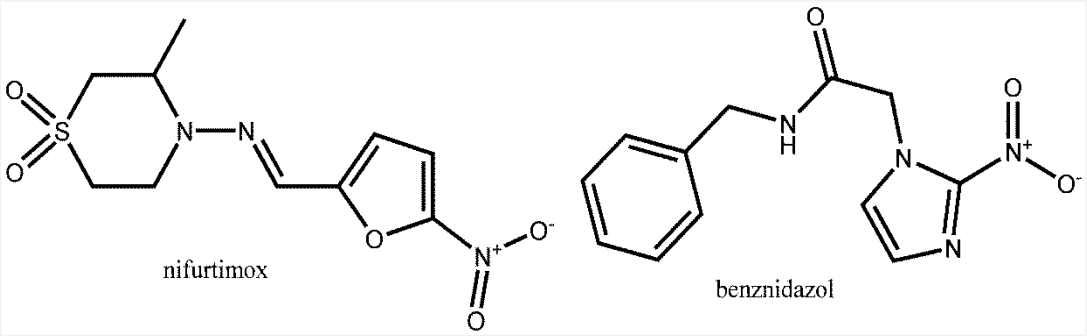
2.5. Tratamento

O tratamento da doença de Chagas pode ser cronologicamente dividido em três longos períodos. O primeiro se dá de 1909 a 1935 com dois trabalhos publicados sobre testes experimentais para o tratamento da doença. Mayer e Rocha Lima, entre 1912 e 1914, testaram as substâncias arsênico, fucsina, tártaro emético e cloreto de mercúrio e não obtiveram resultados satisfatórios. Este período é marcado pela morte de Carlos Chagas e o lançamento do "Manual de Doenças Tropicais e Infecciosas" (COURA; CASTRO; 2002; DIAS *et al*., 2009).

O segundo período abrange de 1936 a 1960, sendo marcado por testes de mais de 20 quimioterápicos e 30 antibióticos. Mazza e colaboradores, no ano de 1936, apresentaram o efeito tripanomissida do Bayer 7602 (derivado quinoleínico) na fase aguda humana (MAZZA; COSSIO; ZUCARDI, 1937). Em 1957, os compostos nitrofurazona, furaltadona e furazolidona foram testados por Packchanian na infecção experimental em camundongos e apresentaram ação supressiva na infecção (PACKCHANIAN, 1957). Ainda, neste período, merece destaque a violeta genciana, que também apresentou efeito supressivo na infecção causada pelo *T. cruzi* (BOAINAIM; RASSI, 1979; DIAS *et al*., 2009).

O terceiro período compreende de 1961 aos dias atuais e é marcado como o período em que mais se estudou e avaliou substâncias em modelos experimentais (DIAS *et al*., 2009). Este período se inicia com a demonstração da atividade anti-*T. cruzi* da nitrofurazona na dose de 100 mg/kg/dia, com duração de tratamento de 53 dias e taxa de cura de 95,4% em camundongos. Ainda, esta substância foi utilizada no tratamento de 10 pacientes apresentando bons resultados de eficácia, porém após certo período o parasita foi detectado em ensaios de xenodiagnóstico na metade deles (RASSI; FERREIRA, 1971; COURA; CASTRO, 2002). Por volta de 1971, surgem dois novos fármacos com promissora atividade antichagásica na fase aguda e tolerância considerável: nifurtimox (Lampit®, da Bayer), de nome químico 3-metil-4-(5-nitrofurfurilideno-amino)-tetra-hidro-4H-1,4-tiazina-1,1-dióxido, e o benznidazol (Rochagan®, da Roche), de nome químico N-benzil-2-(2-nitroimidazol) acetamida (Figura 6).

Figura 6 - Representação estrutural dos fármacos antichagásicos nifurtimox e benznidazol.



Fonte: autoria própria

O nifurtimox foi testado em diversos estudos desde o seu descobrimento. Em muitos destes estudos, foram obtidos resultados promissores com relação à atividade anti-*T.cruzi* quando tratados na fase aguda. Na fase crônica, os resultados com este fármaco são controversos, pois variam entre resultados positivos e negativos (SCHENONE *et al*., 1969; PRATA *et al*., 1975; RASSI; LUQUETTI, 1992). Além disso, existem trabalhos que demonstram que algumas cepas são resistentes ao nifurtimox (ANDRADE; ANDRADE; FIGUEIRA, 1977). Apesar disso, ele vem sendo usado nos dias atuais em comprimidos de 120 mg (8-10 mg/kg/dia), com duração de tratamento de 60 a 90 dias, para doença de Chagas principalmente nos países da América Central e para o tratamento da doença do sono (tripanossomíase africana) no continente africano (CANÇADO, 1997; COURA, 2009; WILKINSON *et al*., 2011). No Brasil, Argentina, Chile, Uruguai e EUA ele foi retirado do mercado devido a sua genotoxicidade (ALEJANDRO-DURÁN *et al*., 1988; MORAGA; GRAF, 1989), seus efeitos adversos gastrointestinas e no sistema nervoso central (COURA; CASTRO, 2002; COURA, 2009; WILKINSON *et al*., 2011).

Recentemente dois fármacos antifúngicos, posaconazol e um pró-fármaco de ravuconazol, foram testados *in vitro* e em modelo animal para avaliação de atividade anti-T.cruzi. Ambos tiveram resultados igual ou superior a 80% de cura (supressão da parasitemia) na fase aguda da doença (BUCKNER; URBINA, 2012; BUSTAMANTE et al., 2014; DINIZ et al., 2013;). Apesar dos promissores resultados pré-clínicos, nos ensaios de fase clínica II, os fármacos não tiveram supressão duradoura da parasitemia quando comparados ao tratamento com benznidazol (CHATELAIN, 2015; URBINA, 2015).

2.5.1. Benznidazol

O benznidazol (BNZ) é o único fármaco mundialmente disponível para o tratamento da doença de Chagas e seu uso imediato é recomendado em todos os casos de infecção pelo *T. cruzi* (transmissão vetorial, congênita, oral, transfusão e por acidentes laboratoriais). Os primeiros ensaios de atividade publicados com este fármaco datam do ano de 1973, por Richle. Neste estudo ele avaliou a atividade antichagásica do BNZ *in vitro* e em camundongos infectados pelo *T. cruzi*, obtendo resultados expressivos com relação à supressão da parasitemia. Daí em diante, muitos pesquisadores avaliaram a eficácia do BNZ em modelos animais experimentais, clinicamente na fase aguda e crônica e associado a outros fármacos (BOAINAIM; RASSI, 1979; COURA, 2009; DIAS *et al*. 2009).

O BNZ foi inicialmente fabricado e registrado pela empresa Roche, intitulado comercialmente como Rochagan®. Em 2003, a empresa cedeu a patente e a tecnologia de fabricação do medicamento ao governo brasileiro, passando a ser produzido e distribuído exclusivamente pelo Laboratório Farmacêutico do Estado de Pernambuco (LAFEPE), segundo maior laboratório farmacêutico público do Brasil. Até o ano de 2012, a única apresentação disponível do fármaco era em comprimidos de liberação imediata na dosagem de 100 mg (LAFEPE) para o tratamento de adultos e crianças. O tratamento em crianças era realizado através do fracionamento e maceração dos comprimidos de 100 mg e administrado uma solução extemporânea do fármaco. Esse tipo de administração causava variações na dose administrada em crianças e possivelmente falhas na terapia (DND*i*, 2012; MEDEIROS, 2010; SOARES-SOBRINHO, 2007).

Por iniciativa e esforços da *Drugs for Neglected Diseases initiative* (DND*i*) e o LAFEPE, em 2012, foi registrado na ANVISA o primeiro comprimido pediátrico de BNZ na dosagem de 12,5 mg. O novo comprimido é composto qualitativamente pelos mesmos adjuvantes do comprimido adulto e classificado também como um sistema de liberação imediata de BNZ. Assim, com a inserção desta nova apresentação na terapêutica da doença de Chagas, proporcionou-se um tratamento mais preciso e seguro aos pacientes pediátricos (MEDEIROS, 2010; DND*i*, 2012). Essa nova apresentação foi a primeira mudança significativa no tratamento com BNZ desde o seu descobrimento na década de 70.

No mesmo ano, foi anunciado pelo governo da Argentina como uma medida de melhoria na disponibilidade do tratamento, o registro de duas apresentações de um novo produto contendo BNZ, o Abarax, junto a *Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnologia Médica* (ANMAT) – agência regulatória argentina. As apresentações são comprimidos de 50 e 100 mg. O comprimido de 50 mg pode ser fracionado em 4 para administração em crianças e jovens até 40 kg. Os comprimidos de 100 mg são para jovens e adultos com mais de 40 kg. A produção dessas novas apresentações se deu através de uma parceria público-privada entre os laboratórios privados Maprimed e ELEA e a *Fundación Mundo Sano*. Atualmente o produto é acessível a todos os países da América através da Organização Panamericana de Saúde (DIAS; COURA; YASUDA, 2014).

2.5.1.1. Indicação, contraindicação e posologia

O BNZ é indicado no tratamento da fase aguda para supressão da parasitemia e a taxa de cura é de 80%. O uso do fármaco na fase crônica ainda é controverso, com alguns estudos favoráveis. Garcia e colaboradores (2005) apresentaram resultados favoráveis em relação ao uso de BNZ em modelo animal na fase crônica. Segundo os autores, em animais tratados houve redução da parasitemia no tecido cardíaco, diminuição da cardiopatia e redução nos níveis de anticorpos associados à infecção pelo *T. cruzi* em relação ao grupo controle (GARCIA *et al*., 2005). Pérez-Molina e colaboradores (2009) afirmaram em um estudo de revisão que o tratamento com BNZ na fase crônica da doença de Chagas ainda é duvidoso, porque, apesar de alguns estudos apontarem vantagem clínica no uso do fármaco na fase crônica, os estudos até então realizados variam no período de acompanhamento, população avaliada e boa parte deles não são randomizados (PÉREZ-MOLINA *et al*., 2009).

A dose de BNZ indicada para adultos é de 5-7 mg/kg/dia, via oral, durante 60 dias em duas ou três administrações diárias. O tratamento recomendado para crianças é 5-10 mg/kg/dia, via oral, também em duas ou três administrações diárias (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2005). No Brasil, o tratamento em adultos é realizado através do comprimido de liberação imediata de 100 mg e em crianças com o comprimido de 12,5 mg de BNZ, ambos produzidos pelo LAFEPE e disponibilizados

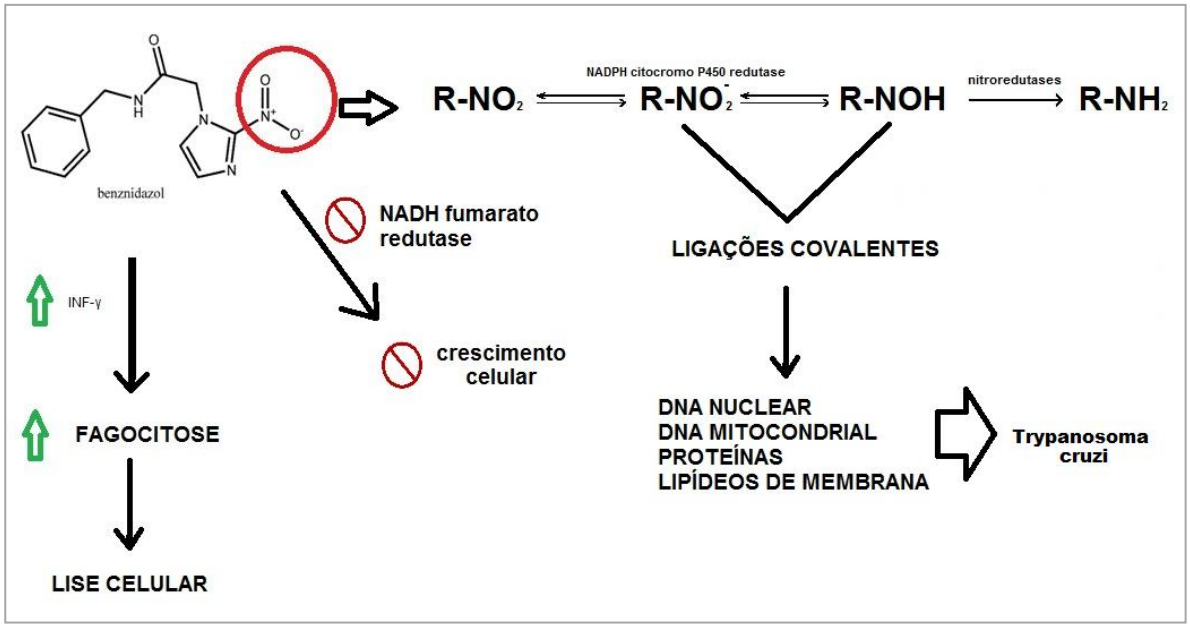
pelo Sistema Único de Saúde/Ministério da Saúde. Apesar do comprimido pediátrico (12,5 mg) de BNZ estar disponível aos pacientes, ainda não há estudos farmacodinâmicos e farmacocinéticos sobre essa apresentação farmacêutica na literatura.

É recomendado que o fármaco não seja utilizado juntamente ao uso de álcool (acúmulo de acetaldeído), anticoagulantes (efeitos potencializados devido a inibição do metabolismo enzimático) e aspirina (possibilidade de sangramento) (VIOTTI *et al*, 1994).

2.5.1.2. Mecanismo de ação

De acordo com estudos já conduzidos sobre o mecanismo de ação do BNZ, a atividade do fármaco se dá através de intermediários radicalares e/ou metabólitos nucleofílicos. O grupo nitro (NO_2) presente na molécula de BNZ é reduzido ao grupo amino (NH_2) através da ação de enzimas do tipo nitroredutases que atuam especificamente em sistemas moleculares R-NO_2. Após isso, através de reação catalisada pela NADPH P450 redutase (citocromo) há a formação de um intermediário radicalar (R-NO_2^-) e na sequência a formação de hidroxilamina (R-NHOH). O radical nitro formado neste processo estaria atuando no efeito tripanocida do BNZ através de ligações covalentes com macromoléculas do parasita: DNA nuclear e mitocondrial, lipídeos e proteínas (CASTRO; DIAZ DE TORANZO, 1988; URBINA, 2002). Rajão e colaboradores (2014), recentemente reforçaram esta ideia, evidenciando que no nível molecular há quebra na dupla fita de DNA e danos ao DNA mitocondrial em testes realizados em células geneticamente modificadas expostas ao BNZ. Outro mecanismo de ação do BNZ seria através do aumento da fagocitose atuando na elevação da produção da citocina interferon gama (INF-γ), causando lise celular. Ainda, há evidência de que o fármaco atue na inibição enzima NADH-fumarase redutase bloqueando o crescimento do *T. cruzi* (RAJÃO *et al*., 2014; ROMANHA *et al*., 2002). Na figura 7 foram esquematizados os possíveis mecanismos de ação do BNZ na atividade anti-T.cruzi evidenciados até o momento.

Figura 7 – Esquema simplificado dos possíveis mecanismos de ação do BNZ na atividade anti-T.cruzi.



Fonte: autoria própria

Sabe-se também que os metabólitos de BNZ formados atuam em outros sistemas, inclusive do hospedeiro, devido à alta reatividade, provocando efeitos adversos. Os efeitos adversos do BNZ em humanos podem ser agrupados em manifestações de hipersensibilidade (20% dos casos): dermatite, edema periorbital, linfoadenopatia, dores musculares e febre; depressão da medula óssea (casos raros): neutropenia, agranulociotese e púrpura trombocitopênica; e polineuropatia periférica (7% dos casos): parestesias e polineurite (CASTRO; MECCA; BARTEL, 2006).

2.5.1.3. Farmacocinética do benznidazol

Apesar de o fármaco BNZ ter sido descoberto há mais de 40 anos, a farmacocinética em humanos foi pouco estudada até o momento, com literatura científica bem restrita.

Os primeiros ensaios farmacocinéticos com BNZ foram publicados por Raaflaub e Ziegler (1979). Segundo esses autores, o BNZ é rapidamente absorvido a partir do trato gastro intestinal, com picos de concentração plasmática de 2,2 a 2,8 µg/mL entre 3 a 4 horas após a administração por via oral na dose de 100 mg (RAAFLAUB; ZIEGLER, 1979). O fármaco é rapidamente e uniformemente distribuído

no plasma com valor de volume de distribuição (Vd/F) igual a 0,56 L/kg. A meia-vida de eliminação ($t_{1/2}$) é de 12 horas e a taxa de ligação a proteínas plasmáticas é de cerca de 40%. A eliminação do fármaco é de 60 a 67% por via renal (metabólitos) e de 22 a 28% por via fecal (RAAFLAUB, 1980).

Roberts e colaboradores (1984) encontraram correlação linear entre a dose administrada (4 – 30 mg/kg) e os valores de concentração plasmática máxima ($C_{máx}$) e área sob a curva do tempo zero extrapolada ao infinito ($ASC_{0-\infty}$). A $t_{1/2}$ não sofreu alteração com a variação de dose, ficando na média de 12,8 ± 0,5 h. O tempo para atingir a concentração plasmática máxima ($t_{máx}$) foi de 4,25 h, ligação a proteínas plasmáticas de 60% e a excreção inalterada do fármaco na urina foi de 6% (ROBERTS *et al*., 1984).

Em 2014, Altchen e colaboradores publicaram um estudo avaliando a farmacocinética populacional do BNZ em crianças de 2 a 8 anos de idade, com uma dose diária de 5-8 mg/kg, no período de 60 dias. Neste estudo observou-se que as concentrações plasmáticas em crianças foram estatisticamente menores quando comparadas às concentrações em adultos, usando dados de concentração plasmática no estado de equilíbrio (Css) e fazendo as devidas correções entre dose e peso (C_{ss} = 3,61 mg/L em crianças de 2 – 7 anos; C_{ss} 6,88 mg/L em crianças de 7 – 12 anos; e C_{ss} = 9,69 mg/L em adultos) . Segundo os autores, tal fato se deu devido ao alto clearance (Cl/F) do BNZ encontrado em crianças nesta faixa de idade. Os dados também apontam variação nos valores de $t_{1/2}$ por idade (3,04 h em crianças de 2 - 7 anos; 9,41 h em crianças de 7 – 12 anos; 12,77 h em adultos). No entanto, apesar de as concentrações plasmáticas serem menores em relação às concentrações de adultos, o estudo afirma que a resposta terapêutica foi alta. Além disso, abordou-se que em crianças a incidência de efeitos adversos foi menor do que em adultos e isso indica uma relação direta entre concentração plasmática e incidência de efeitos adversos no uso do BNZ (ALTCHEN *et al*., 2014).

Em 2015, Soy e colaboradores publicaram resultados do estudo de avaliação da farmacocinética populacional do BNZ em pacientes adultos em fase crônica. Dois regimes posológicos foram testados neste estudo, administração de 2,5 mg/kg/12h e 2,5 mg/kg/24h, num total de 37 pacientes. O estudo concluiu que o regime de 2,5 mg/kg/12h pode levar a exposição excessiva dos pacientes e o regime de 2,5

mg/kg/24h seria suficiente para atingir as concentrações plasmáticas da faixa terapêutica admitidas pelos autores (3 – 6 mg/L) (SOY *et al*., 2015).

A farmacocinética do BNZ também foi avaliada em alguns modelos animais, como rato (DAVANÇO; CAMPOS; PECCININI, 2014; LEONARDI; BOMBARDIERE; SALOMON, 2013; MORILLA; PRIETO; ROMERO, 2005), cão, ovelha e camundongos (MOREIRA DA SILVA *et al*., 2012; WORKMAN *et al*., 1984). Até a finalização deste levantamento bibliográfico nenhum estudo farmacocinético de BNZ em coelhos havia sido publicado.

2.5.2. Novas formulações de benznidazol

O BNZ tem sido objeto de trabalho de alguns grupos de pesquisa, principalmente em países endêmicos da doença de Chagas. Tentativas de desenvolvimento de novas formulações do fármaco estão sendo realizadas baseadas no aperfeiçoamento das características biofarmacêuticas do fármaco, redução da toxicidade e aumento de eficácia na fase crônica (MAXIMIANO *et al*., 2011; MORILLA *et al*, 2002, 2003, 2004; MORILLA; PRIETO; ROMERO, 2005; SALOMON, 2012).

Nos últimos anos, pesquisadores do Laboratório de Tecnologia de Medicamentos (LTM) da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE) têm centrado suas pesquisas no desenvolvimento de novas formulações com o fármaco BNZ para o tratamento da doença de Chagas. Como citado anteriormente, o BNZ é o único fármaco disponível no país para o tratamento da fase aguda da doença e conta apenas com duas apresentações comerciais (comprimidos de 100 e 12,5 mg), ambas de liberação imediata.

Segundo relatado anteriormente, o tratamento em adultos é realizado através da administração por via oral de comprimidos de liberação imediata de BNZ (100 mg), que requer duas ou três administrações ao dia, durante 60 dias. O longo período de tratamento, a frequência de administrações e a série de efeitos adversos causados contribuem significativamente para o abandono da terapia pelo paciente (CASTRO; MECCA; BARTEL, 2006). Além disso, a resistência de algumas cepas ao fármaco e baixa eficácia na fase crônica tornam ainda mais difícil o tratamento da doença de Chagas (DIAS, 2009).

Diante deste cenário, pesquisadores do LTM desenvolveram e caracterizaram novas formulações de BNZ para possibilitar melhorias no uso deste fármaco no tratamento da doença de Chagas. Foram utilizadas tecnologias farmacêuticas para o desenvolvimento de comprimidos de liberação prolongada.

2.5.2.1. Comprimidos de liberação prolongada de benznidazol

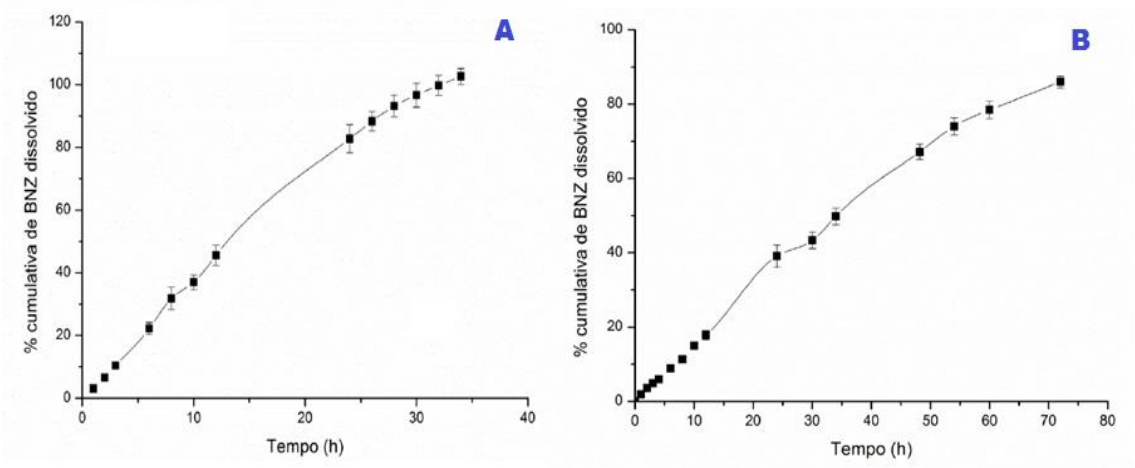
Os sistemas de liberação prolongada tem sido amplamente utilizados para melhoramento do tratamento de diversas doenças. As formas farmacêuticas sólidas orais de liberação prolongada caracterizam-se pela liberação gradual do fármaco, além da manutenção da sua concentração plasmática durante um longo período de tempo (PEZZINI; SILVA; FERRAZ, 2007). Nesse contexto, as dispersões sólidas (sistemas estruturados de sólidos em que o fármaco está disperso em uma matriz biologicamente inócua) têm sido utilizadas para aumentar a solubilidade de fármaco com baixa solubilidade, como é o caso do BNZ, classificado como Classe II (baixa solubilidade e alta permeabilidade) (LIMA *et al.*, 2009) no Sistema de Classificação Biofarmacêutica (AMIDON *et al*., 1995). Polímeros hidrofílicos, como a polivinilpirrolidona (PVP), têm sido amplamente utilizados como carreadores por apresentar baixo custo e alta solubilidade. Além disso, estes polímeros atuam como agentes moduladores de liberação no preparo de comprimidos (SANTOS, 2011).

Diante disso, foram desenvolvidos comprimidos de liberação prolongada (200 mg) partindo de uma mistura de BNZ com o polímero hidroxipropilmetilcelulose (HPMC) e lactose, sendo, em seguida, realizada a malaxagem utilizando solução hidroetanólica 1:1 (v/v) contendo PVP dissolvido. O polímero HPMC é um derivado de celulose amplamente utilizado para prolongar a liberação de fármacos devido à existência de grande variedade deste polímero. A classificação desse polímero se dá de acordo com o grau de viscosidade e a proporção entre os grupos substituintes (metoxila e hidroxipropila). A principal característica destes polímeros, com relação à aplicação em sistemas de liberação prolongada, é a capacidade de relaxamento/intumescimento, fator este que exerce efeito direto na cinética de liberação do fármaco por meio da formação de uma camada gelatinosa na superfície do comprimido, controlando a penetração de água e a liberação do fármaco. Outras

características que possibilitam a ampla aplicação deste tipo de polímero são: boa compressão, baixa toxicidade, característica não-iônica, capacidade de incorporar elevadas quantidades de substâncias ativas e facilidade de uso (GAO *et al*., 1996; LOPES; LOBO; COSTA, 2005).

Após a obtenção dos comprimidos de liberação prolongada, os mesmos foram avaliados quanto ao peso médio, dureza, friabilidade, teor, uniformidade de doses unitárias e ensaio de dissolução. No ensaio do perfil de dissolução utilizando meios biorrelevantes (estômago e intestino) foi possível observar que os comprimidos de liberação prolongada modificam a liberação do fármaco quando comparados aos comprimidos de liberação imediata disponíveis pelo Ministério da Saúde. A taxa de dissolução do fármaco nos comprimidos de liberação prolongada atingiu 85% de liberação nos tempos 25 e 72 h, dependendo do grau de viscosidade do polímero HPMC utilizado na formulação (K4M e K100M) (ROSA, 2015) (figura 8).

Figura 8 - Perfil de dissolução dos comprimidos de liberação prolongada do tipo K4M (A) e K100M (B).



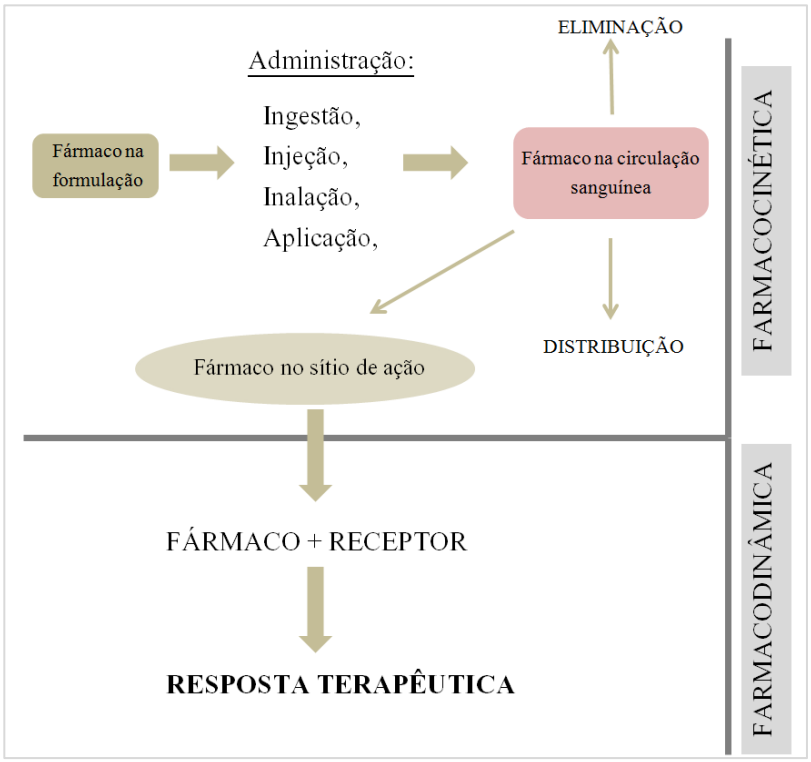
Condições: aparato II (Varian VK 7010), a 75 rpm, 37 ± 0,5°C, Tampão HCl/NaCl pH 1,2; volume de 900 mL. Fonte: adaptado de Rosa, 2015.

Nos comprimidos de liberação imediata disponíveis no mercado (comprimidos de 100 e 12,5 mg), a taxa dissolução de 85% foi atingida em 60 minutos (ROSA, 2015). Diante destes resultados, os comprimidos de liberação prolongada foram considerados promissores para o prosseguimento na cadeia de desenvolvimento de uma nova formulação de BNZ.

2.6. A farmacocinética

De forma simplificada, a interação de um fármaco com o seu receptor e sua resposta farmacológica está quase sempre associada a uma concentração da substância no sítio de ação. Em geral, estes receptores-alvo são macromoléculas, como proteínas, RNA e DNA; e a interação fármaco-receptor ocorre, na maioria dos casos, no interior das células do corpo. Por esta razão, a relação entre a concentração do fármaco no sangue e nos tecidos pode proporcionar uma resposta direta da ocorrência do efeito farmacodinâmico desejado (FUCHS; WANNMACHER, 1998; SCHELLACK, 2005). O sangue é um fluido que liga todos os tecidos do corpo e serve como um canal através do qual os fármacos podem ser introduzidos diretamente, no caso da administração intravenosa, ou absorvidos a partir de tecidos intestinas (via oral), pele (via transdérmica) e por depósitos (via intramuscular ou subcutânea) (RANG; DALE; RITTER, 1997; SHELLACK, 2005). O processo geral de movimento de um fármaco no organismo e sua relação com a resposta terapêutica (farmacodinâmica) pode ser representado pela figura 9.

Figura 9 - Relação simplificada entre a farmacocinética e a farmacodinâmica.



Fonte: adaptado de Brocks, 2010.

Os fenômenos que determinam a magnitude das concentrações plasmáticas em resposta a uma dada dose do fármaco englobam os processos farmacocinéticos. Os quatro processos gerais da farmacocinética são absorção (*input*), distribuição, metabolismo (biotransformação) e excreção; geralmente representados juntos pela sigla “ADME”. Geralmente o termo biotransformação é utilizado no caso de moléculas exógenas (xenobióticos) e o termo metabolismo para substâncias endógenas (BROCKS, 2010; SHARGEL; WU-PONG; YU, 2005).

A farmacocinética engloba um amplo conhecimento interdisciplinar envolvendo as áreas de bioquímica, matemática, fisiologia, física e química; requerendo que profissionais da área estejam aptos a interpretarem os resultados partindo de um conhecimento prévio das características da entidade química avaliada e os processos *in vivo* ocorridos a partir da administração da substância (STORPIRTIS *et al*., 2011). Os processos relacionados ao movimento do fármaco no organismo podem ajudar na seleção de compostos mais promissores para seguir na cadeia de desenvolvimento de um novo medicamento e, de forma mais racional, chegar a novos produtos em menor tempo e a custos relativamente menores. Segundo levantamento de Waterbeend e Gifford (2003), a farmacocinética não adequada foi responsável por 39% dos casos de falha no desenvolvimento de novas entidades terapêuticas nas últimas décadas, devendo ser um dos principais fatores a ser considerado no *screening* de moléculas com atividade terapêutica já no início do desenvolvimento (WATERBEEND; GIFFORD, 2003).

2.6.1. Processos fisiológicos em farmacocinética

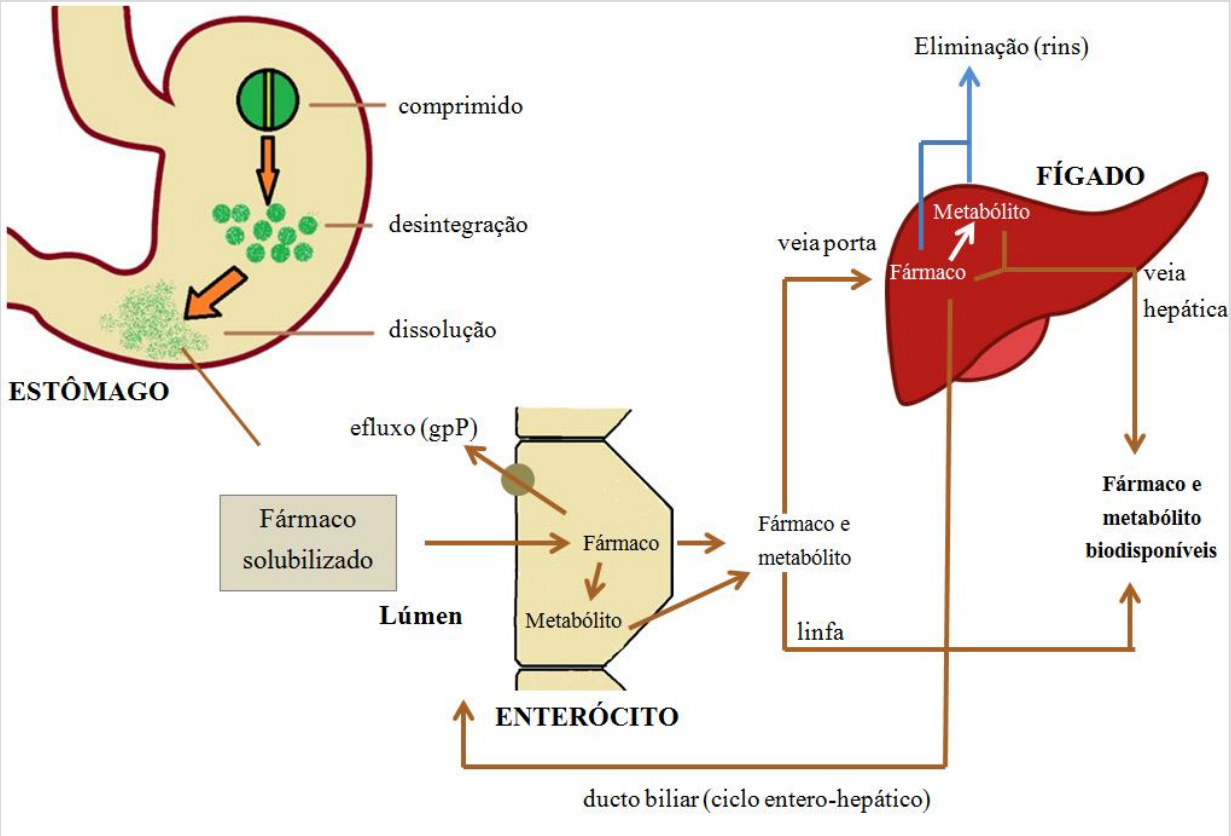
Absorção

Com exceção das vias intravenosa e intra-arterial, todas as outras vias de administração envolvem a etapa de absorção. Estas incluem as administrações subcutânea, intramuscular, intraperitoneal, inalação, transdermal e a via oral. A administração por via oral é considerada a mais importante delas diante ao seu frequente uso, facilidade e segurança. Apesar da sua facilidade de administração, a via oral envolve um processo de absorção complexo o qual engloba várias etapas.

Neste tipo de administração, anteriormente à absorção do fármaco através das células da mucosa que reveste o trato gastrointestinal (TGI), o mesmo deve ser solubilizado no fluido do TGI. Se o fármaco for administrado na forma de comprimido, este deve se desintegrar em pedaços menores, proporcionando maior superfície de contato com os fluidos do TGI, estes por sua vez aumentam o processo de desintegração e a capacidade de dissolução do fármaco no meio. A velocidade de desintegração é dependente do tipo e quantidade de adjuvantes utilizada na formulação do comprimido, bem como por fatores fisiológicos como motilidade do TGI e peristaltismo (BROCKS, 2010; MARTINEZ; AMIDON, 2002; TOZER; ROWLAND, 2009).

Após a dissolução, o fármaco pode ser absorvido por células da mucosa do estômago, intestinos e do cólon. A absorção do fármaco é dependente de várias características físico-químicas da molécula, como tamanho, carga, lipofilicidade e sua forma em sal (STORPIRTIS *et al*., 2009). Os segmentos intestinais duodeno, jejuno e íleo são os principais locais de absorção de fármacos, pois possuem uma enorme superfície e grande quantidade de sítios de absorção. Após a entrada da molécula na célula, é possível que o fármaco seja metabolizado por enzimas intracelulares (isoformas CYP3A), limitando a sua absorção. Ainda, devido à presença em várias regiões intestinais da glicoproteína-P (gp-P, proteína expressa na superfície de células da mucosa intestinal), alguns fármacos são lançados de volta ao lúmen intestinal (efluxo). Outros fármacos, quando passam pelo sistema hepático, são lançados novamente no lúmen intestinal junto à bile através do ducto biliar, este caminho é denominado ciclo entero-hepático. O fármaco pode ser considerado absorvido pela via oral quando a molécula atinge a circulação mesentérica. Na figura 10 foram esquematicamente ilustrados os processos envolvidos desde a liberação do fármaco da sua forma farmacêutica até a chegada a circulação sistêmica (BROCKS, 2010; FUCHS; WANNMACHER, 1998; RANG; DALE; RITTER, 1997; SHARGEL; WU-PONG; YU, 2005).

Figura 10 - Ilustração esquemática das etapas de entrada do fármaco na circulação após administração oral de comprimido.



Fonte: autoria própria

Em geral, a velocidade de absorção é mais elevada para fármacos em solução, seguido por fármacos contidos em cápsulas e, por fim, fármacos contidos em comprimidos. Os parâmetros farmacocinéticos relacionados à velocidade e extensão de absorção são a concentração plasmática máxima ($C_{máx}$), tempo para atingir a $C_{máx}$ ($t_{máx}$) e a área sob a curva (ASC). A biodisponibilidade oral é utilizada também para representar a extensão de absorção de uma determinada formulação, ela pode ser expressa como biodisponibilidade absoluta (F_{oral}), quando há a ASC da administração intravenosa representando 100%, e também, como biodisponibilidade relativa (RBA), quando se compara as ASC de uma formulação referência com uma formulação teste, fazendo as devidas correções quando há doses diferentes (SHARGEL; KANFER, 2005; STORPIRTIS *et al*, 2009, 2011; TOUTAIN; BOUSQUET-MÉLOU, 2004d). Outro parâmetro farmacocinético utilizado para representar a absorção, no entanto menos frequente é o tempo de absorção médio (MAT). O MAT representa o

tempo médio transcorrido para um fármaco ser absorvido e alcançar a circulação sistêmica (RIEGELMAN; COLLIER, 1980).

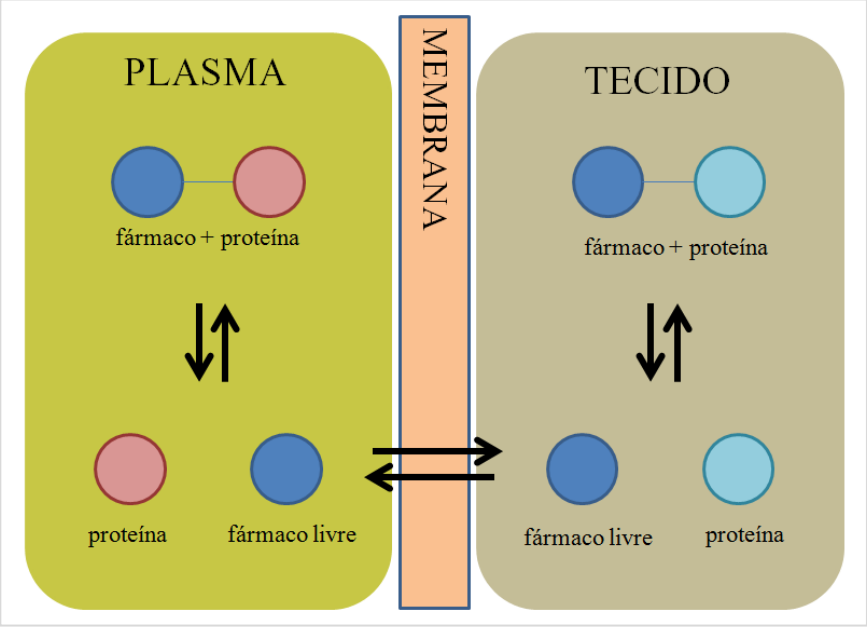
Alguns fatores podem influenciar a absorção de fármacos, como o tempo de esvaziamento gástrico, trânsito intestinal, presença de alimentos, microbiota e atividade enzimática. Estes aspectos podem gerar variabilidade interindividual e interespécie com relação aos parâmetros farmacocinéticos mencionados (FUCHS; WANNMACHER, 1998; RANG; DALE; RITTER, 1997).

Distribuição

Após a entrada do fármaco na circulação sistêmica, o mesmo será distribuído ou não aos tecidos (alguns fármacos permanecem no sangue e são eliminados). Essa distribuição dependerá das características intrínsecas da molécula (lipofilicidade, tamanho molecular e pKa), do grau de ligação do fármaco às proteínas plasmáticas e de fatores fisiológicos dos tecidos, como perfusão sanguínea, pH e características de membrana. Essas características também definirão a afinidade do fármaco em se distribuir em determinado tipo tecidual. Essa afinidade pode contribuir para o direcionamento do fármaco para o seu local de ação, bem como provocar efeitos adversos devido a sua distribuição a órgãos sensíveis a ele (OGA, 2003). Nos órgãos que recebem grande fluxo sanguíneo (coração, fígado, pulmão) o equilíbrio de distribuição torna-se mais rápido quando comparado aos outros pouco irrigados. Em farmacocinética, os tecidos são denominados compartimentos periféricos e o sangue, compartimento central. Muitos fármacos, quando atingem a circulação sistêmica, tendem a estar em equilíbrio entre os compartimentos central e periférico. A ligação a proteínas plasmáticas é uma característica essencial para a distribuição de um fármaco nos tecidos. Uma grande variedade de fármacos que variam de ácido fraco, compostos neutros e bases fracas se ligam a proteínas plasmáticas. Fármacos ácidos ou neutros geralmente ligam-se a albumina e fármacos básicos a α_1-glicoproteína ácida (SCHELLACK, 2005). As ligações fármaco-proteína são reversíveis e há um equilibro tanto no plasma, quanto nos tecidos. Para que o fármaco transponha a membrana dos tecidos, geralmente, é necessário que ele esteja na sua forma livre, ou seja, não ligado a proteínas (GIBALDI, 1991). Na figura 11 é representado

esquematicamente o processo de distribuição de um fármaco após sua chegada a circulação sistêmica e sua interação com proteínas plasmáticas e teciduais.

Figura 11 - Representação esquemática geral da distribuição de um fármaco entre o plasma e tecido e sua interação com proteínas.



Fonte: autoria própria

A extensão de distribuição de um fármaco é caracterizada pelo parâmetro volume de distribuição (V_d). Através dos dados de concentração plasmática *versus* tempo podem ser calculados diversos tipos de V_d. O V_c representa o volume do compartimento central, representando a distribuição de um fármaco no sangue e em tecidos com alta perfusão sanguínea. Para estimar a distribuição de fármacos em tecidos por todo corpo é determinado outro tipo de V_d, o V_{area}. Este parâmetro é dependente tanto da distribuição tecidual quanto do processo de eliminação do fármaco. O V_{ss} é o volume de distribuição no estado de equilíbrio (*steady state*), sendo um parâmetro diretamente relacionado à distribuição do fármaco, pois representa a transferência do fármaco de dentro e fora dos tecidos. Os valores de cada V_d podem ser diferentes dependendo do número de compartimentos ocupados por determinado fármaco. No caso de fármacos que ocupam somente o compartimento central (monocompartimental), os valores de V_c, V_{area} e V_{ss} são aproximadamente o mesmo. Os demais fármacos que ocupam mais de um

compartimento, geralmente seguem a ordem $V_{area} > V_{ss} > V_c$. O conceito de V_d pode ser entendido como uma constante de proporcionalidade entre dose administrada e concentração plasmática, quanto maior o valor de V_d, maior é a quantidade de fármaco nos tecidos em comparação com a quantidade de fármaco na circulação. O menor V_d possível para um fármaco é o volume plasmático, indicando que o fármaco tem distribuição limitada ao plasma. Na prática clínica, o V_d é frequentemente utilizado para cálculo de dose de ataque para se atingir concentrações terapêuticas logo na primeira administração do fármaco (BROCKS, 2010; TOUTAIN; BOESQUET-MELÓU, 2004c)

Metabolismo ou Biotransformação

Fármacos, toxinas de plantas, produtos químicos ambientais, aditivos alimentares, inseticidas e outras substâncias exógenas ao corpo sofrem transformações por meio da atividade de enzimas. Essas transformações podem modificar o modo de ação destas substâncias, tornando-as inativas ou potencializando seus efeitos farmacológicos ou tóxicos. O termo biotransformação é utilizado para designar as transformações ocorridas por um fármaco (substância exógena) no organismo, sendo elas essencialmente ocorridas por meio de sucessivas reações químicas mediada por enzimas (OGA, 2003; RANG; DALE; RITTER, 1997). Geralmente, as reações químicas ocorridas são subdivididas em fases, sendo elas:
Fase I: reações não sintéticas catalisadas por enzimas microssômicas envolvendo oxidação, redução e hidrólise.
Fase II: reações sintéticas por intermédio de enzimas citosólicas envolvendo conjugação ou síntese.

Nas reações de Fase I, os fármacos são transformados em moléculas mais polares, enquanto que nas reações de Fase II, há conjugação da glutationa com o fármaco ou com as moléculas formadas nas reações de Fase I. O objetivo dessas reações é tornar as substâncias mais polares (hidrossolúveis) e facilitar sua eliminação. Embora as reações de biotransformação possam ocorrer em diversos tecidos, o fígado é considerado o principal órgão responsável por essas reações por apresentar várias enzimas ou complexos enzimáticos especializados. Dentre elas, destacam-se as monoxigenases do complexo enzimático citocromo P450 (CYP), as

redutases, as esterases e as transferases (STRECK; COSTA, 1999; NELSON; KAMATAKI; WEXDAN, 1993). O CYP está presente no retículo endoplasmático liso dos hepatócitos (frações microssomais), sendo uma proteína que contém um grupo prostético heme (grupo ferro-porfirina). Este complexo enzimático apresenta várias isoformas com afinidade por diversos fármacos e diferente distribuição nas células do organismo. Cada isoforma do CYP possui atividade catalítica para uma grande quantidade de substratos. Essa grande capacidade de biotransformar diversos fármacos é responsável por interações medicamentosas associadas com a inibição ou indução de enzimas do CYP. A inibição de enzimas do CYP pode resultar na elevação da concentração de um fármaco que seja administrando concomitante ao inibidor, podendo provocar efeitos tóxicos ao paciente. Já a indução de enzimas do CYP pode levar a falha terapêutica, visto que o aumento da biotransformação de um fármaco levará a menores concentrações plasmáticas as quais podem estar fora do intervalo terapêutico. Ainda, a indução pode levar a efeitos tóxicos, já que a formação de um metabólito tóxico pode ser aumentada. Além desses fatores, a atividade das isoformas do CYP também pode sofrer alterações devido ao polimorfismo genético, ocorrendo alta variabilidade interindividual nos processos de biotransformação de um fármaco (OGA, 2003).

Outro local importante de biotransformação de fármacos, especialmente para aqueles administrados por via oral, é a mucosa intestinal, onde está presente a isoenzima CYP3A4 e a glicoproteína-P (responsável por efluxo) (AMIN, 2013). Além desses tecidos, merecem destaque também os pulmões, rins e pele como locais de extensa biotransformação de fármacos (BROCKS, 2010).

Excreção

A excreção é o termo designado para caracterizar o processo de remoção irreversível do fármaco no organismo. A principal via de excreção de fármacos é a urinária, no entanto, outras formas de excreção também são consideradas relevantes clinicamente, como pelas fezes, bile, leite, suor e pelo ar exalado pelos pulmões. A excreção de um fármaco pode ocorrer na sua forma inalterada ou modificada quimicamente (metabólitos) (OGA, 2003).

O rim é o principal órgão de excreção de fármacos. A excreção por via renal envolve três importantes processos fisiológicos, a filtração glomerular, a secreção tubular ativa e a reabsorção tubular passiva. Fatores relacionados com as características do fármaco podem determinar a excreção, como grau de ionização, lipofilidade, tamanho molecular e ligação a proteínas. Além disso, fatores relacionados ao órgão também são determinantes para o processo de excreção, como fluxo sanguíneo renal e pH urinário. Para que o fármaco seja filtrado pelo glomérulo é necessário que ele esteja na sua forma livre (não ligado a proteína), assim, a taxa de ligação a proteínas determinará a velocidade do processo. Na secreção tubular ativa o fármaco é lançado no túbulo renal proximal mediante um carreador. Na reabsorção tubular passiva o grau de ionização e a lipofilidade da molécula determinarão se o fármaco será reabsorvido a partir do néfron e retornará a circulação sanguínea. A alcalinização ou acidificação da urina pode modificar a excreção de fármacos de acordo com as suas características físico-químicas (ácido ou base) (RANG; DALE; RITTER, 1997; VAN DE GRAFF, 2003).

O *clearance* (Cl) (ou depuração) é uma denominação utilizada para o processo de remoção irreversível de determinada substância de um volume específico de sangue por unidade de tempo (por exemplo, L/h). É considerado um parâmetro farmacocinético, sendo subdividido e nomeado de acordo com o órgão eliminador, por exemplo, *clearance* hepático (Cl_h), *clearance* renal (Cl_r) e outros. A somatória de todos eles é o *clearance* total (Cl_T). O Cl é um dos parâmetros mais importantes no estabelecimento de um regime terapêutico, pois através dele será possível prever a dose necessária para manter as concentrações plasmáticas do fármaco em níveis terapêuticos (TOUTAIN; BOUSQUET-MÉLOU, 2004a). O Cl pode estar alterado em indivíduos com insuficiência hepática e/ou renal, promovendo mudanças significativas também no parâmetro meia-vida de eliminação ($t_{1/2}$). Desta forma, para fármacos com estreita margem terapêutica, é necessário que haja ajuste de dose e, em casos de fármacos nefrotóxicos ou hepatotóxicos, o monitoramento de marcadores renais e hepáticos (OGA, 2003; RANG; DALE; RITTER, 1997).

2.6.2. Modelos farmacocinéticos

Para simular os processos de absorção, distribuição e eliminação são utilizados diferentes tipos de modelos matemáticos e através deles são desenvolvidas equações que permitem descrever a evolução temporal das concentrações plasmáticas do fármaco no organismo. Em termos práticos, essa correlação entre concentração plasmática *versus* tempo pressupõe que depois de atingido o equilíbrio, a concentração no plasma reflete a concentração no sítio de ação (FUCHS; WANNMACHER, 1998; LARA, 2004).

Os modelos matemáticos descritos na literatura são os modelos compartimentais e os modelos não compartimentais, sendo o primeiro o mais abordado e aplicado. Estes modelos auxiliam na interpretação dos caminhos percorridos pelo fármaco no organismo, possibilitando os cálculos dos parâmetros farmacocinéticos (SHARGEL; WU-PONG; YU, 2005).

Modelos compartimentais

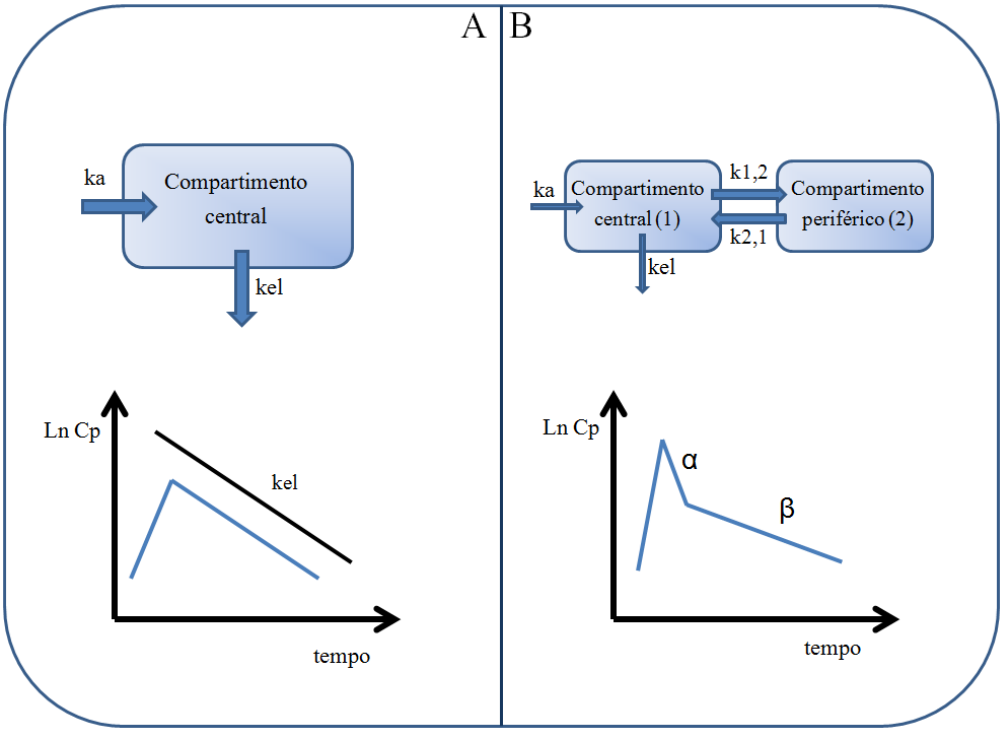
Na abordagem utilizada pelos modelos compartimentais, o organismo é tratado como compartimentos, subdividido em monocompartimental (um compartimento) ou multicompartimentais (a partir de dois compartimentos). A adoção da subdivisão do modelo vai depender da cinética do fármaco no organismo (BROCKS, 2010; SCHOENWALD, 2002).

O modelo de compartimento único ou monocompartimental é o mais simples e assume que o fármaco é distribuído de forma instantânea e homogênea pelo sangue e tecidos do organismo. Este modelo presume que qualquer alteração na quantidade do fármaco em qualquer tecido do organismo provocará modificações imediatas na concentração plasmática. Na prática, quando se realiza um experimento objetivando obter um perfil farmacocinético de determinado fármaco, são analisados os valores de concentração plasmática *versus* tempo transformado-os em logaritmo natural ou neperiano (Ln), e, se o gráfico apresentado possuir apenas uma inclinação, pode-se inferir que a disposição cinética é monocompartimental. Apesar da simplicidade deste modelo, ele é amplamente aplicado para os cálculos de parâmetros farmacocinéticos de diversos fármacos (LARA, 2004; STORPIRTIS *et al*., 2011).

Os modelos multicompartimentais são os que mais condizem com a realidade, pois é mais adequado entender o organismo como um sistema de vários compartimentos, em que o fármaco pode se distribuir por diversos tecidos com velocidades diferentes. Da mesma forma que o modelo monocompartimental, o modelo de vários compartimentos são avaliados pelos valores de concentração plasmática *versus* tempo transformados em Ln. Neste caso, o número de retas apresentadas na fase de eliminação indicará o número de compartimentos. O modelo de ocorrência mais frequente é o bicompartimental (dois compartimentos), seguido dos modelos tricompartimentais (três compartimentos). Nos modelos com mais de três compartimentos os cálculos tornam-se muito complexos (BROCKS, 2010; SCHOENWALD, 2002; STORPIRTIS *et al*., 2011).

O modelo bicompartimental é caracterizado por duas velocidades na reta de decaimento: a fase de distribuição ou fase α e a fase de eliminação ou fase β. As constantes de velocidade de distribuição e de eliminação são representadas por α e β, respectivamente. No modelo monocompartimental, como há somente uma velocidade de decaimento, a constante de eliminação é denominada k_{el} (MORENO; DOMÉNECH, 2001). Na figura 12 são representados esquematicamente os modelos mono (A) e bicompartimental (B), bem como os gráficos típicos de cada perfil na administração extravascular de um fármaco.

Figura 12 - Representação gráfica e esquemática dos modelos monocompartimental (A) e bicompartimental (B) na administração extravascular.



Fonte: autoria própria

Modelos não compartimentais

Os modelos não compartimentais levam em conta aspectos fisiológicos para promover a interpretação da disposição do fármaco no organismo. Estes métodos foram desenvolvidos baseados na teoria dos momentos estatísticos, a qual considera a permanência da molécula no organismo, denominada “residência”. Em termos práticos, a permanência do fármaco no organismo é expressa pela área sob a curva (ASC) das concentrações plasmáticas *versus* tempo relacionada com área sob o momento da curva (ASMC). Através da razão ASMC/ASC é estimado o tempo de residência médio (MRT, em inglês *mean residence time*), sendo este parâmetro definido como o tempo necessário para que 63,2% da dose administrada sejam eliminados (GIBALDI, 1991; YAMAOKA; NAKAGAWA; UNO, 1978).

O parâmetro tempo de absorção médio (MAT,em inglês *mean absorption time*) também é abordado nestes modelos não compartimentais. Este parâmetro estima o tempo médio necessário para a ocorrência da absorção de um fármaco administrado

por via oral ou por outras vias extravasculares (CUTLER, 1978; STORPIRTIS *et al*., 2011).

Nestes modelos, a eliminação é estimada pelo parâmetro Cl, sendo este dependente da habilidade intrínseca dos órgãos responsáveis pelo processo de eliminação (geralmente fígado e rins) e pelo fluxo sanguíneo local. A distribuição é abordada de modo independente ao processo de eliminação através do cálculo do volume de distribuição no estado de equilíbrio (V_{ss}) (BENET; GALEAZZI, 1979).

2.6.3. Ordem cinética

Por definição a ordem cinética é o modelo pelo qual a concentração do fármaco no organismo se relaciona com a velocidade de transferência dele através dos processos fisiológicos. Os processos fisiológicos ADME estão, principalmente, relacionados às cinéticas de primeira ordem e ordem zero (BROCKS, 2010).

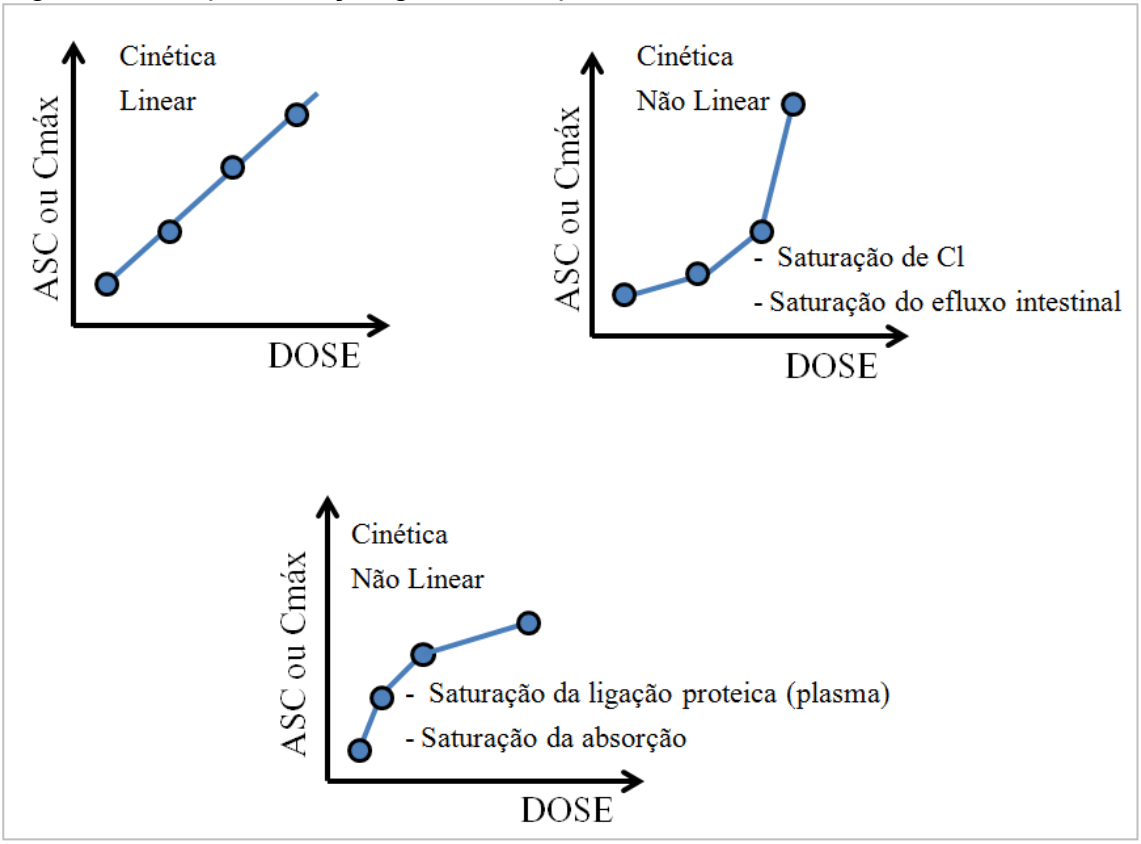
A cinética de primeira ordem ou cinética linear é quando os sistemas biológicos responsáveis pelo processo não são saturáveis e as concentrações plasmáticas máximas e a ASC são diretamente proporcionais à dose administrada. Nestes casos, a administração de diferentes doses não determina modificações nos valores de meia-vida de eliminação, Cl ou V_d (SHARGEL; WU-PONG; YU, 2005).

A cinética de ordem zero ou não linear é também entendida como cinética dose dependente. Esse comportamento pode ocorrer ao serem envolvidos processos enzimáticos (cinética de Michaelis-Menten). Quando a concentração do fármaco é baixa, a cinética aparenta ser linear, no entanto, quando o sistema enzimático é saturado, a cinética torna-se de ordem zero. Situações fisiológicas (gravidez, hipotermina, acidose metabólica, entre outras) também podem ser responsáveis por cinética não linear para determinados fármacos. Nos casos de cinética de saturação, a meia-vida de eliminação, por exemplo, tende a ser maior quando a dose administrada é maior (BROCKS, 2010; SHARGEL; WU-PONG; YU, 2005).

Vale ressaltar que, em geral, os processos ADME ocorrem seguindo a cinética de primeira ordem nas doses empregadas usualmente na terapêutica. No caso de um grande aumento da dose (fora do intervalo geralmente empregado), a disposição do fármaco no organismo pode mudar de cinética de primeira ordem para cinética de

ordem zero (BROCKS, 2010). Através da figura 13 é possível entender graficamente os eventos de cinética de primeira ordem e ordem zero relacionados à saturação dos processos ADME.

Figura 13 - Representação gráfica dos processos de cinética linear e não linear.



Fonte: adaptado de Brocks, 2010.

2.6.4. A farmacocinética pré-clínica no desenvolvimento de novos medicamentos

A busca por novos medicamentos é constante nas companhias farmacêuticas e no ambiente acadêmico. Embora os recursos sejam escassos neste último, os esforços de pesquisadores (docentes e alunos) mantem as pesquisas ainda em atividade.

Para que um novo medicamento chegue até a prateleira de uma farmácia são necessários muitos anos de pesquisas e um montante financeiro na casa dos bilhões de dólares. Este processo se inicia com a descoberta de uma nova entidade

terapêutica ou com o desenvolvimento de uma nova formulação farmacêutica. Na indústria farmacêutica, o setor de Pesquisa e Desenvolvimento (P&D) (às vezes chamado de Pesquisa, Desenvolvimento e Inovação) é responsável pela busca de novos tratamentos que possam renovar o portfólio da empresa. No ambiente acadêmico este processo envolve diversos laboratórios de uma mesma universidade ou de instituições colaboradoras, contemplando disciplinas que vão da pesquisa básica a aplicada (HUGHES *et al*., 2011; KHANNA, 2012)

O processo de inovação na área farmacêutica pode ser dividido em dois tipos, a inovação radical e a inovação incremental.

Os medicamentos inovadores são oriundos da pesquisa e desenvolvimento de moléculas inéditas, sendo elas de origem sintética, derivadas de processos biotecnológicos ou de substâncias naturais. Esse tipo de inovação demanda longo tempo de pesquisa (10 a 15 anos) e recursos extremos para o setor produtivo. Além disso, o alto grau de incerteza exige que esse caminho seja muito bem analisado para evitar investimentos em moléculas que não terão aplicação clínica (PETROVA, 2014).

O aperfeiçoamento de substâncias que já estão no mercado constitui o campo de atuação da inovação incremental. Isso ocorre com novas formulações desenvolvidas para melhorar as características biofarmacêuticas de um fármaco, visando um aprimoramento da eficácia, segurança e adesão à terapia. As principais vantagens deste modelo de inovação se baseiam no menor tempo de desenvolvimento e na maior probabilidade de sucesso, pelo fato de se trabalhar com moléculas que já tiveram estudos concluídos das etapas pré-clínica e clínica. Embora as inovações incrementais demandem menor tempo de desenvolvimento, na área farmacêutica, o desenvolvimento de uma nova formulação exige testes complexos e custosos que também podem levar alguns anos até que se encontre um produto viável para os testes clínicos (KHANNA, 2012; PETROVA, 2014).

Os ensaios farmacocinéticos estão contidos nas etapas de desenvolvimento de um novo medicamento. A disposição do fármaco no organismo é avaliada tanto na fase pré-clínica (modelos animais), quanto na clínica (humanos) (BROCKS, 2010; WATERBEEMD; GIFFORD, 2003). Quando se trata do desenvolvimento de novas formulações, os estudos farmacocinéticos pré-clínicos são antecedidos por estudos *in vitro* que geram uma triagem das melhores proporções de adjuvantes, baseando-se nas características físico-químicas (estabilidade, desintegração, friabilidade entre

outros) e, principalmente, nos testes de dissolução que avaliam a cinética de liberação do fármaco da matriz farmacêutica (ANSEL; POPOVICH; ALLEN, 2005; ARAÚJO *et al*., 2010; HUGHES *et al*., 2011). Após esses ensaios, os estudos farmacocinéticos poderão ser planejados e conduzidos.

Os estudos pré-clínicos de farmacocinética são decisivos na escolha da melhor formulação para se avançar no desenvolvimento de um novo medicamento. Estes testes selecionarão o produto com o melhor aprimoramento das características biofarmacêuticas e cinéticas do fármaco, como por exemplo, melhora na solubilidade e biodisponibilidade do fármaco, aumento da permanência do fármaco no organismo, redução da frequência de administração, maior segurança no tratamento mediante a diminuição da oscilação da concentração plasmática, entre outros. Todos estes fatores serão decisivos para o prosseguimento de um novo produto para os testes clínicos, tornando assim os testes pré-clínicos essenciais na cadeia de desenvolvimento (SINGH, 2006).

Diversos trabalhos publicados recentemente na literatura demonstram a aplicação dos estudos farmacocinéticos pré-clínicos como sendo decisivos para seleção de formulações com melhores características para seguir na cadeia de desenvolvimento.

Aljimaee e colaboradores (2015) apresentaram resultados de melhoria na solubilidade do fármaco carvedilol (bloqueador beta adrenérgico utilizado no tratamento insuficiência cardíaca congestiva severa e hipertensão arterial) através da complexação com hidroxipropil-β-ciclodextrina para preparação de comprimidos orodispersíveis. Este fármaco tem baixa solubilidade e alto metabolismo pré-sistémico, o que diminui sua biodisponibilidade oral (F_{oral} = 30%). Os ensaios farmacocinéticos conduzidos em coelhos demonstraram aumento significativo de $C_{máx}$ e a redução de $t_{máx}$ para a nova formulação comparada aos resultados encontrados para a formulação comercial. Essas alterações de parâmetros demonstram a melhora na absorção do fármaco e são consideradas extremamente importantes para aumentar a eficácia deste fármaco na clínica (ALJIMAEE *et al*., 2015).

Hosny e colaboradores (2015) realizaram estudos farmacocinéticos pré-clínicos em coelhos para avaliar a biodisponibilidade oral (F_{oral}) do ferro incorporado a nanopartículas lipídicas sólidas para o tratamento da anemia. Estes pesquisadores encontraram aumento de quatro vezes na F_{oral} do íon comparado às formulações

comerciais disponíveis (sulfato ferroso). Estes achados são de grande interesse clínico, pois a absorção deste íon é baixa e as formulações atuais possuem efeitos adversos sobre o sistema digestivo (HOSNY *et al.*, 2015).

Sharma e Lewis (2013) utilizaram uma avaliação do perfil farmacocinético do fármaco hipoglicemiante nateglinida em coelhos para demonstrar maior segurança quando administrado sob a forma de comprimidos de liberação prolongada produzidos com o polímero hidroxipropilmetilcelulose (HPMC). A nova formulação possibilitou um aumento significativo do tempo de residência médio (MRT) e do parâmetro $t_{máx}$, evidenciando que a formulação proporcionou maior permanência do fármaco no organismo. Ainda, através da avaliação da ASC foi possível verificar aumento da F_{oral} do fármaco comparado à formulação convencional. Os autores consideraram esses resultados de grande impacto clínico, pois o tratamento atual com o fármaco leva a um efeito muito rápido de hipoglicemia, potencialmente fatal. Assim, uma formulação com liberação lenta do fármaco permitirá um tratamento mais seguro (SHARMA; LEWIS, 2013).

Nesta mesma linha, Huang e colaboradores (2007), em um estudo de farmacocinética em coelhos, demonstraram aumento de $t_{máx}$ e ASC na administração de comprimidos de liberação prolongada de brometo de piridostigmina contendo HPMC, quando comparados aos comprimidos de liberação imediata convencionais. Segundo os autores, as mudanças nos parâmetros farmacocinéticos poderão reduzir a frequência de administração do fármaco e melhorar a eficácia do tratamento (HUANG *et al*., 2007).

Inúmeros estudos nessa área apontam formulações potenciais que incrementam melhorias nos atuais tratamentos de diversas doenças. Os estudos *in vivo* de disposição cinética, bem como os ensaios prévios de liberação *in vitro* demonstram ser fundamentais na triagem de novos produtos e redução dos riscos de insucesso nas etapas clínicas.

3. JUSTIFICATIVA

A doença de Chagas é uma enfermidade que afeta milhões de pessoas em grandes áreas do continente americano e ameaça outros povos devido as suas características de transmissão. Apesar de seu descobrimento ser centenário, o seu tratamento ainda é pobre em alternativas e disponibilidade. O BNZ é o fármaco de primeira escolha no tratamento da doença e está disponível sob a forma de comprimidos liberação imediata (adulto e pediátrico).

Pesquisadores do Laboratório de Tecnologia de Medicamentos (LTM) da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE) desenvolveram e caracterizaram comprimidos de liberação prolongada de BNZ visando gerar melhorias no uso deste fármaco no tratamento da doença. Em ensaios *in vitro* estas formulações mostraram resultados potenciais para prosseguimento na cadeia de desenvolvimento de medicamentos. A aplicação dessas novas formulações na clínica, no entanto, requer avaliação prévia do perfil farmacocinético em modelo animal.

Diante da necessidade urgente de inovações para o tratamento da doença de Chagas, este estudo se justifica por estar contido na cadeia de desenvolvimento de medicamentos e com potencial para gerar resultados de grande impacto com a introdução de uma inovação incremental no tratamento da doença.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo geral

O objetivo geral deste estudo foi avaliar a farmacocinética pré-clínica de BNZ administrado a partir de comprimidos de liberação prolongada e comparar com a administração de comprimidos de liberação imediata (adulto e pediátrico) disponíveis para o tratamento da doença de Chagas.

4.2. Objetivos específicos

- Validação de métodos bioanalíticos para quantificação de BNZ em plasma e urina segundo a legislação nacional;

- Avaliação pré-clínica da farmacocinética do BNZ administrado em comprimidos adulto e pediátrico disponibilizados pelo Ministério da Saúde para o tratamento da doença de Chagas no Brasil;

- Avaliação pré-clinica da farmacocinética do BNZ administrado em comprimidos de liberação prolongada;

- Avaliação pré-clínica da farmacocinética do BNZ administrado pela via intravenosa visando o cálculo de biodisponibilidade absoluta e relativa do BNZ administrado na forma dos comprimidos anteriormente citados;

- Comparação estatística entre os grupos e interpretação dos parâmetros farmacocinéticos;

- Construção de proposta de ensaios clínicos com as novas formulações.

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1. Métodos bioanalíticos para quantificação de BNZ em plasma e urina

5.1.1. Soluções padrão, solventes e reagentes

O padrão de BNZ (para preparação da solução estoque) e benzocaína (padrão interno, PI) utilizados na validação do método foram obtidos da Sigma Aldrich® (EUA, Lote: MKBL3727V e P500158, respectivamente). A solução estoque de BNZ foi preparada em metanol na concentração de 100 µg/mL. Os solventes acetonitrila, metanol e acetato de etila, usados no procedimento de extração do fármaco e na fase móvel do sistema cromatográfico, foram obtidos da J.T.Baker® (Irlanda). A água utilizada como fase móvel foi obtida do sistema de purificação Milli-Q® fornecido pela Millipore Corporation. As soluções do PI foram preparadas em acetonitrila (5 µg/mL) para extração de plasma e em acetato de etila (50 µg/mL) para extração de urina.

As soluções-padrão de BNZ e PI foram mantidas a 8°C (±1°C) durante a validação, sendo esta condição testada anteriormente e considerada adequada para não degradação das substâncias.

5.1.2. Condições cromatográficas

As condições cromatográficas utilizadas para análise de BNZ em plasma e urina de coelhos foram estabelecidas semelhantes àquelas utilizadas para análise de BNZ em plasma de ratos contidas no trabalho de Davanço, Campos e Peccinini (2014) (APÊNDICE VI). A análise de BNZ foi realizada num sistema de cromatografia líquida Acquity UHPLC (Waters) equipado com detector UV-Vis, operando a 324 nm, coluna Acquity UHPLC HSS SB C_{18} (2,1 x 100 mm; 1,8 µm) e pré-coluna Acquity UHPLC HSS SB C_{18} VanGuard® (2,1 x 5 mm; 1,8 µm). A fase móvel foi constituída dos solventes água ultrapura e acetonitrila grau HPLC (65:35), operando em modo isocrático. O fluxo utilizado foi de 0,55 mL/min. O volume de injeção foi de 1 µL e o tempo de corrida de 2 minutos. As amostras foram mantidas a 25°C até a injeção e a coluna a 45°C durante a separação cromatográfica. A aquisição de dados do sistema cromatográfico foi realizada através do programa Empower® 3.0.

5.1.3. Processamento da amostra

5.1.3.1. Plasma

O processamento das amostras de plasma compreendeu um processo de extração simples e rápido por precipitação de proteínas por solvente orgânico. Amostras de plasma (50 µL) foram acrescidas de 50 µL acetonitrila (contendo benzocaína como PI na concentração de 5 µg/mL). A mistura foi agitada por 60 segundos em agitador e os tubos foram centrifugados a 13.000x*g* em ultracentrifuga por 10 minutos. Foram retirados 50 µL do sobrenadante e filtrados em filtro de seringa de PTFE (0,22 µm, 4 mm) em *vials maximum recovery* (Waters). Ao final, foi injetado 1 µL da amostra no sistema cromatográfico.

5.1.3.2. Urina

Para extração do fármaco na urina, foi aplicado um método de extração líquido-líquido utilizando acetato de etila como solvente orgânico. Amostras de urina (500 µL) foram acrescidas de 1,5 mL de acetato de etila (contendo benzocaína como PI na concentração de 50 µg/mL). A mistura foi então agitada por 30 segundos e centrifugada a 5000x*g* por 5 minutos. Após a separação das fases, foram retirados 1,2 mL do sobrenadante e secado sob rotaevaporação à vácuo. Os resíduos foram ressuspendidos com 50 µL de acetonitrila e filtrados em filtro de seringa de PTFE (0,22 µm, 4 mm) em *vials maximum recovery* (Waters). Ao final, foi injetado 1 µL da amostra no sistema cromatográfico.

5.1.4. Validação

O processo de validação atendeu aos procedimentos necessários para a determinação dos limites de confiança dos métodos, de acordo com as normas estabelecidas pela ANVISA (RDC 27/2012). O objetivo desses procedimentos foi avaliar se os métodos bioanalíticos poderiam ser aplicados na quantificação de BNZ em plasma e urina de coelhos. De acordo com a legislação vigente, foram avaliados os parâmetros seletividade, efeito residual, linearidade, precisão, exatidão e

condições de armazenagem (estudo de estabilidade). A seguir são detalhados os parâmetros avaliados na validação dos métodos.

Seletividade

A seletividade é a capacidade do método de analisar o analito e o padrão interno (PI) na presença dos componentes endógenos comuns a matriz biológica de interesse. Assim, não deve haver picos interferentes no tempo de retenção do analito ou do PI. Para aceitação da seletividade dos métodos bioanalíticos analisou-se as respostas de picos interferentes próximo ao tempo de retenção do analito, sendo elas necessariamente inferiores a 20% da resposta do analito nas amostras do limite inferior de quantificação (LIQ). Em relação ao PI, as respostas de picos interferentes próximo a tempo de retenção foram necessariamente inferiores a 5% da resposta do PI.

Efeito residual

O ensaio de efeito residual tem por objetivo avaliar se há ocorrência de contaminações de uma injeção de amostra para outra. Consiste de analisar uma amostra branco seguida de uma amostra do maior ponto da linearidade e novamente se analisa a amostra branco mais duas vezes. Deve ser observado se há picos interferentes no tempo de retenção do analito, que seja superior a 20% da resposta do analito, e do PI, que seja 5% superior à resposta do padrão interno.

Linearidade

A curva de calibração (curva analítica) foi construída a partir da razão da área do pico do analito e do PI (área do analito/área do PI) contra a concentração nominal do analito. Foram construídas e avaliadas três curvas de calibração incluindo a análise da amostra branco, da amostra zero e dez amostras de diferentes concentrações do padrão do analito adicionadas de PI. Os critérios de aceitação da linearidade incluíram um coeficiente de correlação ≥ 0,98 e exatidão de 85% a 115%,

exceto para o limite inferior de quantificação (LIQ), para o qual a exatidão deve estar entre 80% e 120%.

Limite inferior de quantificação (LIQ)

É expresso como a menor concentração do analito que pode ser quantificada com exatidão de 80-120% e precisão de 0-20%, com no mínimo 5 replicatas. O LIQ foi considerado como a concentração, no mínimo, cinco vezes superior a qualquer interferência da amostra branco no tempo de retenção ao do analito.

Precisão e Exatidão

A precisão e a exatidão do método foram avaliadas intracorridas e intercorridas. Os resultados intracorridas foram determinados por 5 análises dos controles de qualidade diluído (CQD), alto (CQA), médio (CQM) e baixo (CQB) em um mesmo dia, já para os resultados de precisão e exatidão intercorridas as determinações foram feitas em três dias consecutivos. A precisão foi expressa como coeficiente de variação (CV%), não se admitindo valores superiores a 15%, exceto para o LIQ, para o qual se admitiu valores menores ou iguais a 20%. A exatidão foi expressa pelo Erro Padrão Relativo (EPR), não se admitindo valores fora da faixa de ± 15% do valor nominal, exceto para o LIQ, para o qual não se admitiu valores fora da faixa de ± 20% do valor nominal.

Estabilidade de armazenamento

A estabilidade foi avaliada em função da necessidade de armazenamento das amostras após cada coleta e após o processamento (tempo em que amostra permanece dentro do equipamento).

Os ensaios de estabilidade realizados foram: estabilidade pós-processamento (25°C), curta duração (temperatura ambiente), ciclos de congelamento e descongelamento (durante 3 dias) e longa duração (-20°C).

O ensaio foi realizado nas concentrações do CQB e CQA em triplicatas. O analito foi considerado estável quando não houve desvio maior que 15% do valor obtido nas amostras recém-preparadas.

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. As soluções não extraídas foram preparadas por adição ao extrato final do processamento da amostra (branco) de concentrações conhecidas do analito. A recuperação foi calculada pelo percentual da área da amostra extraída de CQA e CQB em relação à amostra não extraída das mesmas concentrações.

5.2. Estudo farmacocinético

5.2.1. Modelo Animal

Foram utilizados coelhos machos albinos sadios da raça Nova Zelândia, com peso de 2,5 - 3,5 kg, provenientes do Biotério Central da UNESP/Botucatu. Os animais foram transferidos para o biotério do Departamento de Princípios Ativos Naturais e Toxicologia (PANT) da FCF-UNESP/Araraquara, onde foram mantidos em condições controladas de temperatura (23±1ºC), umidade (55±5%) e luz (ciclo 12/12h, luzes acesas as 07h) e tiveram alimento e água a vontade. Os animais foram privados de alimento por 12 horas anteriores à administração do fármaco. Durante os experimentos os animais foram mantidos em gaiolas metabólicas equipadas com aparatos metálicos para coleta de urina (Figura 14).

A escolha deste modelo animal se deu devido à facilidade de administração da forma comprimido e o uso desta espécie em diversos outros estudos de farmacocinética pré-clínica de fármacos administrados na forma de comprimido (SINGH, 2012; VIDYADHARA; SASIDHAR; NAGARAJU, 2013).

Figura 14 - Gaiolas metabólicas para coelhos.

Fonte: autoria própria.

Ao final dos experimentos, os animais foram sacrificados por exposição a gás carbônico (CO_2), conforme recomendação do anexo I da Resolução nº 1000/2012 do Conselho Federal de Medicina Veterinária.

Todos os procedimentos realizados envolvendo animais foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da FCF-UNESP/Araraquara através do parecer nº 01/2014 (ANEXO I).

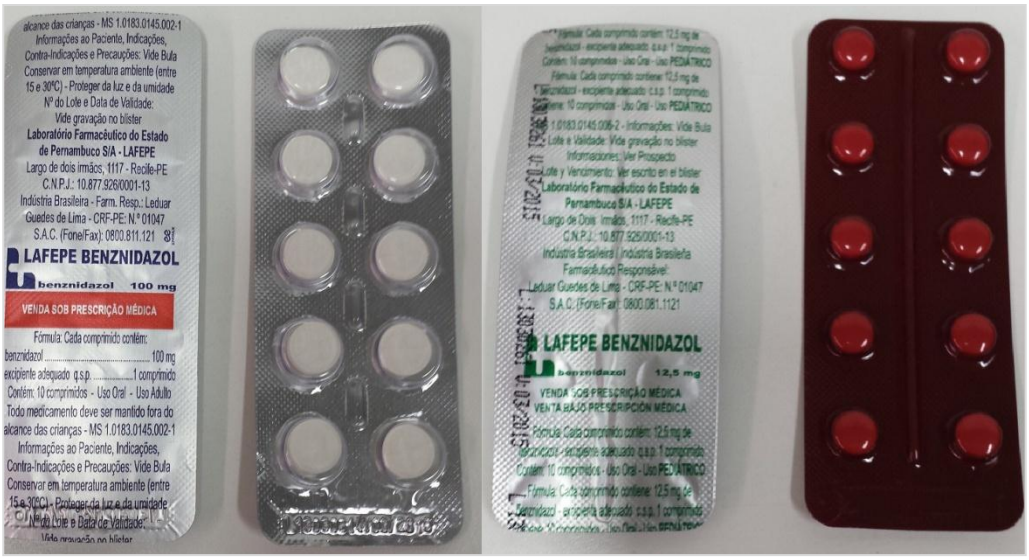
5.2.2. Comprimidos de BNZ

Neste estudo foram utilizados quatro tipos diferentes de comprimidos de BNZ, um pediátrico e três adultos (um de liberação imediata e dois de liberação prolongada).

5.2.2.1. Comprimidos adulto e pediátrico de liberação imediata

O comprimido adulto (100 mg, Lote: 13030214, Validade: 03/2016) e o comprimido pediátrico (12,5 mg, Lote: 13030261, Validade: 03/2015), ambos de liberação imediata, foram produzidos e cedidos pelo Laboratório Farmacêutico do Estado de Pernambuco (LAFEPE). Estes comprimidos estão disponíveis no Sistema Único de Saúde (SUS) em cartelas (*blister*) contendo 10 comprimidos (figura 15). Todos os comprimidos foram administrados dentro do prazo de validade contido na embalagem do produto.

Figura 15 - Cartelas de comprimidos adultos na dosagem de 100 mg (à esquerda) e pediátricos na dosagem de 12,5 mg (à direita).



Fonte: autoria própria.

Além da diferença na dosagem, os comprimidos adulto e pediátrico possuem proporções de adjuvantes também diferentes entre si conforme descritos na tabela 2.

Tabela 2 - Formulação dos comprimidos adulto (100 mg) e pediátrico (12,5 mg) de BNZ produzidos pelo LAFEPE.

	Adulto (%) 100 mg	**Pediátrico (%) 12,5 mg**
Formulação		
BNZ	40,00	10,00
Amido	31,20	51,20
Lactose 200	26,80	36,80
Estereato de magnésio	0,40	0,40
Talco	1,60	1,60
Peso médio dos comprimidos (mg)	250,00	125,00

Fonte: adaptado de DND*i*, 2012.

5.2.2.2. Comprimidos de liberação prolongada

Os dois tipos de comprimidos de liberação prolongada (200 mg) foram produzidos pelo método de granulação por via úmida e cedidos pelo Laboratório de Tecnologia dos Medicamentos (LTM) da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), sob colaboração do Prof. Dr. Pedro José Rolim Neto. Os comprimidos de liberação prolongada diferem no grau de viscosidade do polímero (HPMC), sendo denominados K4M (4.000 mPa.s em 2% de solução aquosa a 20°C) e K100M (100.000 mPa.s em 2% de solução aquosa a 20°C). Na tabela 3 estão descritas as proporções de adjuvantes utilizadas na produção de cada comprimido.

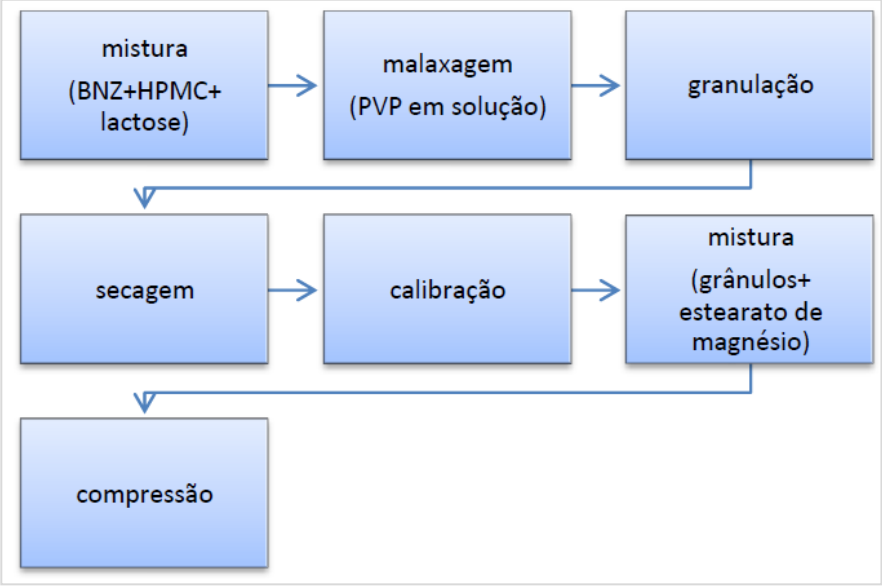
Tabela 3 - Formulação dos comprimidos de liberação prolongada de BNZ.

	LPK4M (%) 200 mg	**LPK100M (%) 200 mg**
Composição		
BNZ	40,00	40,00
PVP K-30	1,00	1,00
Methocel® HPMC K4M	25,00	-
Methocel® HPMC K100M	-	25,00
Lactose *spray-dried*	33,00	33,00
Estearato de magnésio	1,00	1,00
Peso médio dos comprimidos (mg)	500,00	500,00

Legenda: PVP= polivinilpirrolidona, HPMC= hidroxipropilmetilcelulose.
Fonte: adaptado de ROSA, 2015.

A seguir é detalhado o processo de obtenção (figura 16) dos comprimidos de liberação prolongada K4M e K100M, segundo ROSA, 2015.

Figura 16 - Esquema de obtenção dos comprimidos de liberação prolongada K4M e K100M.



Fonte: Rosa, 2015.

Estes comprimidos foram previamente caracterizados (SANTOS, 2011) e testados em ensaios de controle de qualidade e dissolução (ROSA, 2015) em estudos realizados no Laboratório de Tecnologia de Medicamentos (LTM) da Universidade

Federal de Pernambuco.

5.2.3. Delineamento Experimental

5.2.3.1. 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 poder de 80% para detectar uma diferença superior a 20% entre os grupos de animais que serão utilizados. O coeficiente de variação (CV) considerado foi de 12,14%, considerando a variabilidade dos parâmetros farmacocinéticos de BNZ apresentados no estudo de Morilla e colaboradores (2005).

Iniciou-se o cálculo com a proposta inicial de 5 replicatas e assim calculou-se a iteração para a obtenção do valor de n:

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

$$n \geq [t\ (0{,}05;8) + t(0{,}1;8)]^2 \times (12{,}14/20)^2$$

$$n \geq 7$$

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

Utilizou-se agora o resultado obtido para a iteração 2:

$$n \geq [t\ (0{,}05;12) + t(0{,}1;12)]^2 \times (12{,}14/20)^2$$

$$n \geq 6$$

Utilizou-se agora o resultado obtido para a iteração 3:

$$n \geq [t\ (0{,}05;10) + t(0{,}1;10)]^2 \times (12{,}14/20)^2$$

$$n \geq 7$$

Utilizamos agora o resultado obtido para a iteração 4:

$$n \geq [t\ (0{,}05;12) + t(0{,}1;12)]^2 \times (12{,}14/20)^2$$

$$n \geq 6$$

Neste caso, como os resultados das iterações são diferentes, opta pelo maior valor encontrado de n. Dessa forma, consideramos o número mínimo de 7 replicatas

por tempo como um dos itens necessários para que tenhamos resultados de qualidade sob o ponto de vista estatístico.

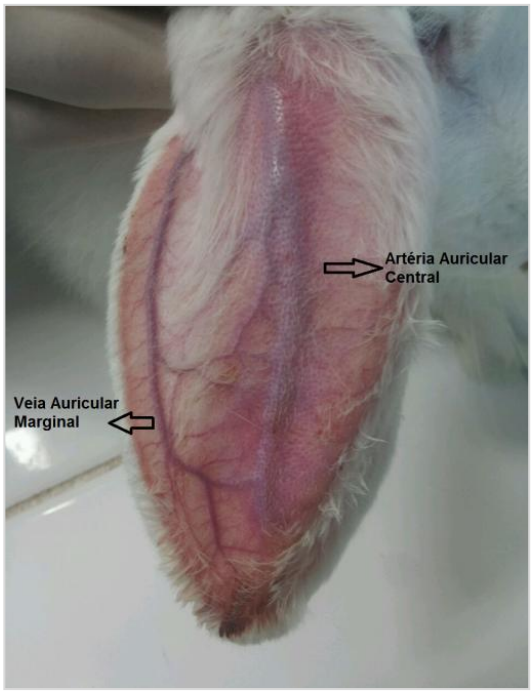
5.2.3.2. Grupos experimentais

Foram utilizados 35 animais no estudo, sendo eles aleatoriamente divididos em 5 grupos.

- **Grupo ADU**: animais que receberam comprimidos de liberação imediata na dosagem de 100 mg (dose única, n=7);
- **Grupo PED**: animais que receberam comprimidos pediátricos na dosagem de 12,5 mg (dose única, n=7);
- **Grupo IV**: animais que receberam BNZ por via intravenosa na dose de 10 mg (dose única, n=7);
- **Grupo LPK4M**: animais que receberam comprimidos de liberação prolongada do tipo K4M na dosagem de 200 mg (dose única, n=7);
- **Grupo LPK100M**: animais que receberam os comprimidos de liberação prolongada do tipo K100M na dosagem de 200 mg (dose única, n=7).

O grupo IV foi acrescido ao estudo para o cálculo de biodisponibilidade absoluta (F_{oral}) e relativa (RBA) do BNZ administrado na forma de comprimidos. Como veículo para administração IV, utilizou-se dimetilsulfóxido (DMSO) devido à baixa solubilidade aquosa de BNZ. O volume utilizado foi de 0,3 mL, não ultrapassando o limite recomendado por Neervanan (2006) para evitar a ocorrência de efeitos tóxicos. A administração de BNZ foi realizada na veia auricular marginal dos animais (figura 17).

Figura 17 - Orelha tricotomizada de coelho com identificação da veia auricular marginal e artéria auricular central.



Fonte: autoria própria.

Os comprimidos de BNZ foram administrados em dose única na porção inicial do esôfago dos coelhos utilizando um *pill dispenser* (Figura 18) (dispositivo utilizado na clínica veterinária para administração de comprimidos em gatos) juntamente com um volume fixo de 10 mL de água filtrada. Este procedimento permitiu a administração de comprimidos na sua forma íntegra (não houve quebra devido à mastigação do animal), mantendo assim a forma farmacêutica intacta para que não houvesse alterações nos processos de desintegração e dissolução dos comprimidos e, consequentemente, na absorção do fármaco.

Figura 18 - Dispositivo *pill dispenser* utilizado para administração de comprimidos em coelhos.

Fonte: autoria própria.

5.2.3.3. Coletas de sangue e urina

A coleta de sangue se deu em tubos heparinizados (5 µL de heparina 50% Liquemine® 5000 UI Roche) através da artéria auricular central (Figura 17) utilizando seringas de 1 mL com agulha 29G ½ (13 mm x 0,33 mm). Alíquotas de 100 µL de sangue foram coletadas em cada tempo pré-estabelecidos através de estudos pilotos para cada tipo de comprimido. A seguir são descritos os tempos de coleta para grupo.

- **Grupo ADU** (comp. liberação imediata – 100 mg): 0,25; 0,50; 0,75; 1,0; 2,0; 4,0; 6,0; 8,0; 12; 18 e 24 horas.
- **Grupo PED** (comp. pediátrico – 12,5 mg): 0,25; 0,50; 0,75; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5; 3,0; 3,5; 4,0; 5,0 e 6,0 horas.
- **Grupo IV** (adm. intravenosa – 10 mg): 0,25; 0,50; 0,75; 1,0; 2,0; 4,0; 6,0 e 8,0 horas.
- **Grupo LPK4M** (comp. liberação prolongada K4M – 200 mg): 0,50; 1,0; 2,0; 4,0; 6,0; 8,0; 12; 24; 30 e 36 horas.
- **Grupo LPK100M** (comp. liberação prolongada K100M – 200 mg): 0,50; 1,0; 2,0; 4,0; 6,0; 8,0; 12; 24; 30 e 36 horas.

As alíquotas de sangue foram centrifugadas a 5.000x*g* por 10 minutos e 50 µL de plasma foram retirados e imediatamente estocados a -20°C por período previamente testado nos estudos de estabilidade da validação bioanalítica. O volume de sangue

coletado de cada animal não ultrapassou o volume máximo recomendado (10% do volume total) (DIEHL *et al*., 2001), permitindo assim, que os animais ficassem em condições hematológicas e fisiológicas normais durante todo o experimento.

Para análise urinária, foi coletado a urina dos animais através de aparatos metálicos das gaiolas metabólicas a cada 6 horas após administração do BNZ e o volume total urinário medido em proveta. Alíquotas de 500 µL para cada período foram filtradas em papel de celulose para retirada de substâncias sólidas e então congeladas a -20°C até a análise conforme os estudos de estabilidade previamente realizados na validação bioanalítica.

5.2.4. Parâmetros farmacocinéticos

Para avaliação farmacocinética do BNZ na administração dos comprimidos e por via intravenosa foram calculados os parâmetros farmacocinéticos descritos na tabela 4.

Tabela 4 - Parâmetros farmacocinéticos calculados para os comprimidos de BNZ em coelhos.

Parâmetros	Descrição	Equação ou método de cálculo
ASC_{0-t}	Área sob a curva de zero ao último tempo quantificável	Métodos dos Trapezóides
$ASC_{0-\infty}$	Área sob a curva de zero extrapolado ao infinito	$ASC_{0-t} + C_n/k_{el}$, C_n é a última concentração quantificável
$ASMC_{0-t}$	Área sob o momento da curva de zero ao último tempo quantificável	Método da Estatística dos Momentos
$ASMC_{0-\infty}$	Área sob o momento da curva de zero extrapolada ao infinito	$ASMC_{0-\infty} + ((C_n x\ t_n)/k_{el}) + (C_n/k_{el}^2)$, onde t_n é o tempo de ocorrência da C_n
k_{el}	Constante de eliminação	Gráfico log da concentração plasmática *vs* tempo
MRT	Tempo de residência médio	$ASMC_{0-\infty}/ASC_{0-\infty}$
$t_{1/2}$	Meia-vida de eliminação	Ln (2) / k_{el}
k_a	Constante de absorção	Gráfico *log* da concentração plasmática *vs* tempo
MAT	Tempo de absorção médio	1 / k_a
$t_{1/2\ a}$	Meia-vida de absorção	*Ln* (2) / k_a
Cl	*Clearance* total	DOSE x F / $ASC_{0-\infty}$
V_d	Volume de distribuição	Cl / k_{el}
$C_{máx}$	Concentração plasmática máxima	Método gráfico
$t_{máx}$	Tempo para ocorrência da $C_{máx}$	Método gráfico
Cl_r	*Clearance* renal	(Q / ASC_{0-t})/PESO, onde Q é a quantidade total de fármaco excretada na forma inalterada na urina
fe	Fração excretada na forma inalterada na urina	Q / ASC_{0-t}
F_{oral}	Biodisponibilidade absoluta	$ASC_{0-\infty(comprimido)}xDOSE_{(i.v.)}$/ $ASC_{0-\infty(i.v.)}xDOSE_{(comprimido)}$
RBA	Biodisponibilidade relativa	$ASC_{0-\infty(teste)}xDOSE_{(referência)}$/ $ASC_{0-\infty(referência)}xDOSE_{(teste)}$

Para calcular a quantidade total de fármaco excretada inalterada na urina (Q) foi determinada a concentração do fármaco na urina e multiplicado pelo volume urinário obtido no respectivo intervalo de tempo. Após isso, somou-se todas as quantidades obtidas para cada tempo para se totalizar o volume do período experimental. O período de coleta de urina coincidiu com o período de coleta de sangue para que fosse possível calcular o clearance renal (Cl_r) e a fração excretada inalterada na urina (fe).

5.3. Tratamento de dados e análise estatística

Os resultados dos parâmetros farmacocinéticos de cada grupo foram apresentados através das médias e intervalo de confiança 95% (IC 95). O teste t não pareado e não paramétrico (*Mann-Whitney test)* foi empregado para avaliar razões diferentes da unidade, com nível de significância fixado em 5% ($\alpha = 0,05$) para a comparação entre os grupos. Para análise estatística foi empregado o programa GraphPad Instat® 3. Para os cálculos dos parâmetros farmacocinéticos, as equações descritas no tópico 5.2.4. foram plotadas no programa Excel® e devidamente calculadas para cada grupo. O programa GraphPad Prism® 5.0 foi utilizado para produção de gráficos e figuras.

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1. Validação dos métodos bioanalíticos para plasma e urina

Embora o método bioanalítico já tenha sido validado para plasma de ratos em estudos anteriores, conforme descrito por Davanço, Campos e Peccinini (2014), optou-se por realizar uma covalidação, pois, no atual estudo, o plasma utilizado foi de outro modelo animal (coelho). O método bioanalítico para quantificação de BNZ em urina também foi validado seguindo os mesmos critérios.

6.1.1. Plasma

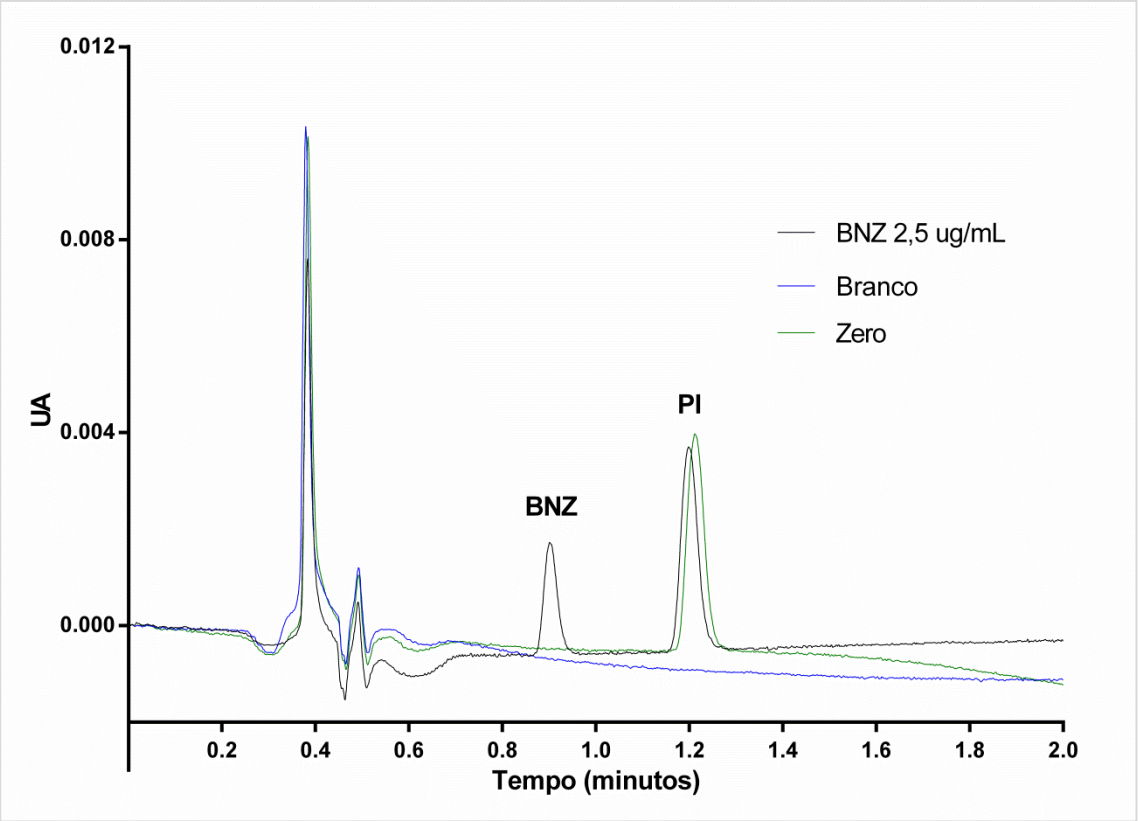
A seguir são detalhados todos os parâmetros, de acordo com a legislação vigente (ANVISA), avaliados para validação do método bioanalítico proposto para quantificação de BNZ em estudos de farmacocinética pré-clínica de comprimidos de BNZ.

Seletividade

Segundo a RDC nº 27/2012, as respostas de picos interferentes próximas ao tempo de retenção do analito devem ser inferiores a 20% da resposta do analito nas amostras do LIQ e as respostas de picos interferentes próximo ao tempo de retenção do PI devem ser inferiores a 5 % da resposta do PI.

Na figura 19 são apresentados cromatogramas obtidos por cromatografia líquida de ultra eficiência (CLUE ou UHPLC) evidenciando os tempos de retenção, a separação dos picos de interesse em relação aos interferentes do plasma e a intensidade do sinal gerado pelo analito e PI.

Figura 19 - Sobreposição de cromatogramas do método bioanalítico para quantificação de BNZ em plasma de coelhos (λ = 324 nm).



Analisando a sobreposição de cromatogramas pode se observar que no tempo de retenção do BNZ (0,93 min) não há interferências do plasma branco (em azul) em comparação ao cromatograma da análise da amostra de BNZ na concentração de 2,5 µg/mL (em preto). Isso também é possível de ser observado no tempo de retenção do PI (1,21 min), sendo que no plasma branco não se observa interferentes neste tempo de retenção. Assim, a avaliação da seletividade do método foi considerada satisfatória, pois, o plasma branco não apresentou área superior a 20% da área do LIQ (0,1562 µg/mL) no tempo de retenção do BNZ e no tempo de retenção do PI a área do branco não foi superior a 5% da área do PI. Outro fator importante deste método é o tempo de corrida, em que cada amostra foi analisada em apenas 2 minutos, tornando-o um método rápido e prático para analisar um grande número de amostras de estudos farmacocinéticos.

Linearidade

Devido à inexistência de estudos farmacocinéticos de BNZ em coelhos, para estabelecer os pontos da curva analítica, foram levantados estudos de farmacocinética pré-clínica em outros modelos da literatura (DAVANÇO; CAMPOS; PECCININI, 2014; MOREIRA DA SILVA *et al*., 2012; MORILLA *et al*., 2003, 2004) e escolhido um intervalo de concentração plasmática possível de se obter no modelo animal que será utilizado nos estudos de farmacocinética pré-clínica dos comprimidos de BNZ. Ainda, os estudos piloto confirmaram que a faixa de concentração pré-estabelecida seria adequada para os estudos farmacocinéticos.

A curva analítica foi construída a partir da relação entre as áreas dos picos de BNZ e PI *versus* as concentrações nominais do analito. Foram utilizadas dez concentrações diferentes de BNZ e cada uma delas foi analisada em triplicata.

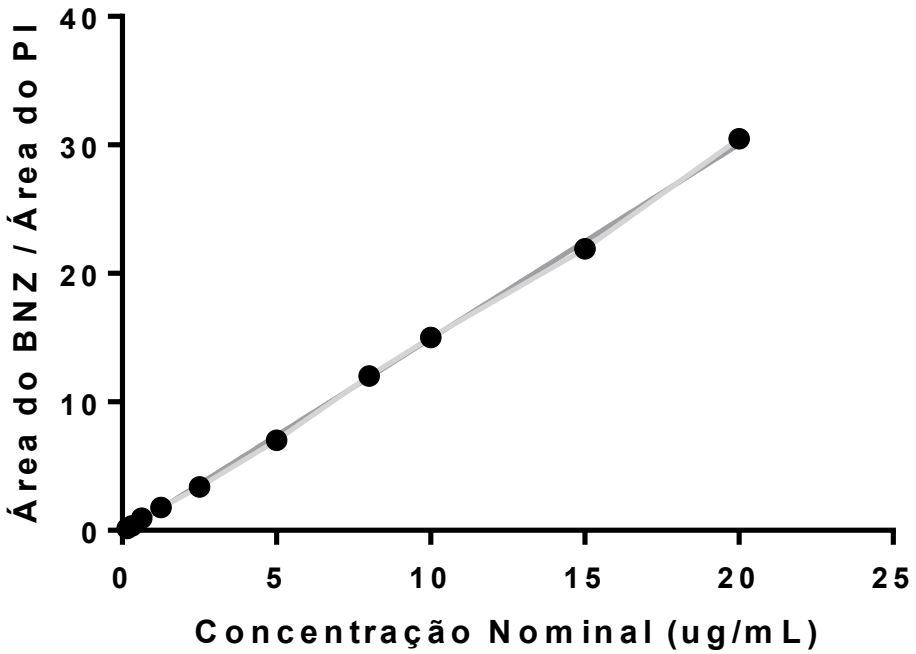
Na tabela 5 são apresentados os pontos da curva de calibração e os valores de precisão e exatidão.

Tabela 5 - Valores dos pontos da curva analítica para quantificação de BNZ em plasma (CV = coeficiente de variação; EPR = erro padrão relativo).

Concentração nominal (μg/mL)	**Precisão** CV (%)	**Exatidão** EPR (%)
0,1562	10,7	111,3
0,3125	13,1	105,1
0,625	12,2	101,6
1,25	4,3	91,4
2,5	1,4	97,3
5	2,8	96,1
8	4,3	98,2
10	3,6	90,3
15	3,4	87,2
20	1,3	100,2

A seguir, na figura 20, está representada a curva analítica construída a partir da interpolação das concentrações nominais *versus* a relação da área dos picos de BNZ e PI (área de BNZ / área do PI).

Figura 20 - Curva analítica para quantificação de BNZ em plasma (média das triplicatas; n = 10; equação da reta: y=1,5126x – 0,1988; r = 0,9995).



Avaliando a variabilidade entre as replicatas (precisão), a correspondência dos valores experimentais com os valores nominais (exatidão) e o valor do coeficiente de correlação (r=0,9995), considera-se que, de acordo com a legislação vigente, a linearidade do método é adequada para o intervalo proposto para quantificação de BNZ em plasma.

Precisão e Exatidão

O estudo de precisão e exatidão do método foi realizado com as concentrações 0,1562 (LIQ), 0,3125 (CQB), 8 (CQM), 15 (CQA) e 30 (CQD) µg/mL em cinco replicatas para cada concentração nos ensaios intracorrida e em 15 replicatas para os ensaios intercorridas em dias distintos de análise. Na tabela 6 foram apresentados os valores do estudo de precisão intracorrida e intercorridas para cada concentração citada.

Tabela 6 - Precisão e exatidão dos controles de qualidade para o método bioanalítico de BNZ em plasma.

		Concentração nominal (µg/mL)				
		0,1562	0,3125	8	15	30
		LIQ	**CQB**	**CQM**	**CQA**	**CQD**
Intracorrida	n	5	5	5	5	5
	Precisão CV (%)	8,9	6,7	5,5	9,4	10,4
	Exatidão EPR (%)	82,1	98,7	91,1	97,1	100,1
Intercorrida	n	15	15	15	15	15
	Precisão CV (%)	10,2	10,4	9,3	11,3	10,3
	Exatidão EPR (%)	102,1	95,2	100,4	109,1	101,1

De acordo com os resultados apresentados, os estudos de precisão e exatidão intracorrida e intercorridas foram considerados satisfatórios considerando os limites de aceitação da legislação vigente.

Efeito residual

Na avaliação de efeito residual foram analisadas três amostras de plasma branco (ausentes de BNZ e PI), sendo uma antes e duas logo após a injeção de uma amostra do limite superior de quantificação (LSQ = 20 µg/mL). Os resultados foram comparados com os obtidos de amostras processadas do limite inferior de quantificação (LIQ = 0,1562 µg/mL). As respostas de picos interferentes no tempo de retenção do analito foram inferiores a 20% da resposta do analito nas amostras processadas do LIQ e as respostas de picos interferentes no tempo de retenção do PI foram inferiores a 5 % da resposta do PI. Assim, não foi evidenciado aumento do sinal do analito ou PI causado por contaminação proveniente de amostras analisadas anteriormente, descartando a possibilidade de efeito residual para o método em questão.

Recuperação

Para medir a eficiência do método de extração, foram comparados os resultados obtidos de amostras de CQB, CQM e CQA com amostras de plasma

branco fortificadas (*spiked*) com a solução padrão do analito após o processamento, que representaram 100% de recuperação.

Na tabela 7 são apresentados os resultados de recuperação para cada controle de qualidade citado acima e seus respectivos valores de precisão (CV%) e exatidão (EPR%).

Tabela 7 - Estudo de recuperação dos controles de qualidade baixo, médio e alto do método bioanalítico para quantificação de BNZ em plasma.

Controle de Qualidade	Recuperação	CV (%)*
CQB	64,9	10,2 / 2,8
CQM	61,4	13,3 / 10,1
CQA	70,1	3,4 / 6,0
Total	65,5	

*CV (coeficiente de variação): CV das três replicatas dos CQ´s processados / CV de três replicatas dos CQ´s contaminados após o processamento das amostras de plasma branco.

Segundo a legislação, valores ideais de recuperação são próximos a 100%, porém valores inferiores são considerados caso haja precisão e exatidão adequadas e a faixa de concentração proposta atenda as necessidades do estudo. No caso deste método para plasma, a recuperação foi aproximadamente 65,5% e os valores de precisão e exatidão ficaram dentro dos limites aceitáveis. Dessa forma, pode se considerar que o processamento da amostra é adequado e eficaz para extração do BNZ em amostras de plasma.

Estabilidade de armazenamento

Os ensaios de estabilidade foram realizados com amostras de CQB e CQA em três replicatas para cada concentração. As amostras processadas imediatamente

após o preparo da amostra foram consideradas como “amostras zero” ou 100%. Na tabela 8 foram dispostos os resultados dos testes de estabilidade para o método em questão.

Tabela 8 - Estabilidade de BNZ sob condições de armazenagem em plasma.

	CQB	CQA
Curta duração (24 h a temperatura ambiente)		
n = 3		
CV(%)	6,9	0,8
EPR (%)	98,4	89,9
Longa duração, 30 dias a -20°C		
n = 3		
CV (%)	6,9	4,1
EPR (%)	112,3	102,3
Ciclo de congelamento/descongelamento a -20°C		
n = 3		
CV (%)	10,3	9,8
EPR (%)	100,9	112,9
Pós-processamento, 24 h a 25°C no cromatógrafo		
n = 3		
CV (%)	4,7	2,2
EPR (%)	88,4	96,4

O CV e EPR de cada CQ foram obtidos a partir da relação entre os valores obtidos entre as amostras armazenadas e aquelas processadas imediatamente após o preparo (amostras zero ou 100%).

De acordo com os resultados da tabela 8, os ensaios de estabilidade tiveram resultados dentro dos limites aceitáveis considerando a legislação vigente e, assim, as condições de armazenagem testadas foram consideradas adequadas para evitar a degradação do analito.

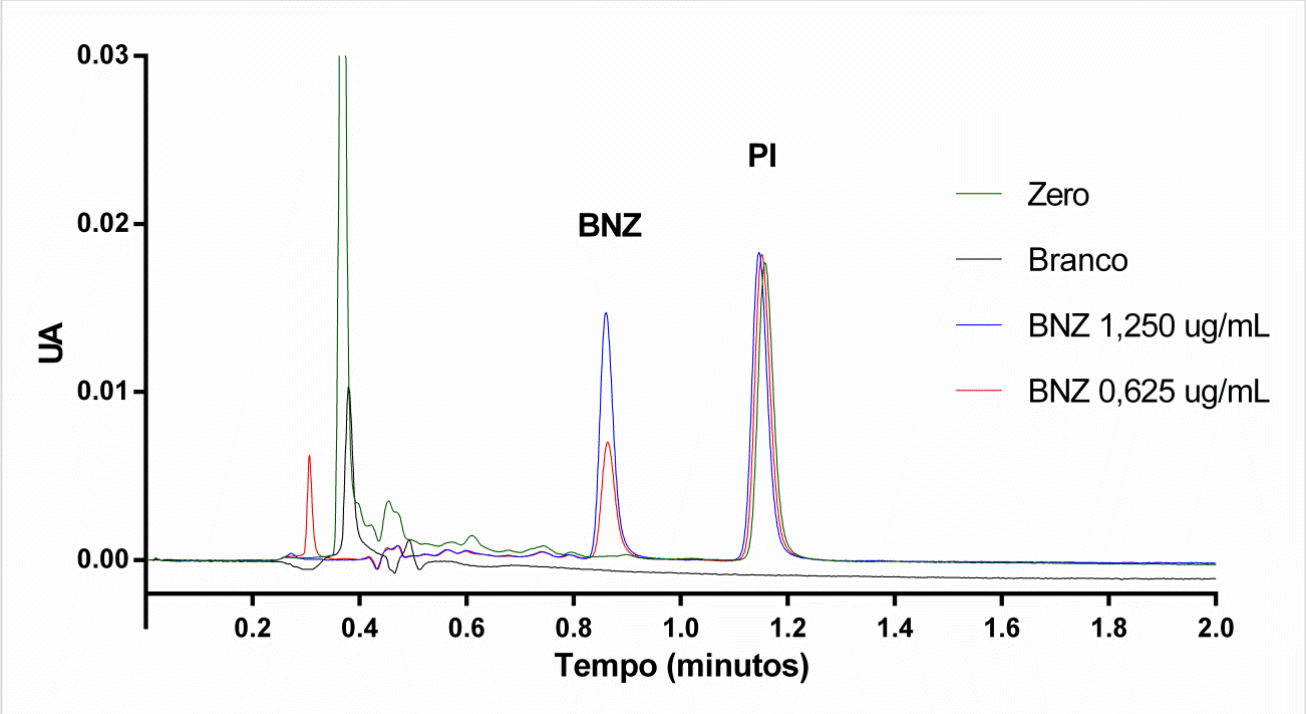
6.1.2. Urina

Seletividade

Assim como nas amostras de plasma, as amostras de urina não apresentaram picos interferentes próximos ao tempo de retenção do analito superiores a 20% da resposta do analito nas amostras do LIQ e as respostas de picos interferentes próximos ao tempo de retenção do PI foram inferiores a 5 % da resposta do PI.

Na figura 21 são apresentados cromatogramas obtidos por cromatografia líquida de ultra eficiência (CLUE ou UHPLC) evidenciando os tempos de retenção, a separação dos picos de interesse em relação aos interferentes da urina e a intensidade e proporcionalidade do sinal gerado pelo analito e PI.

Figura 21 - Sobreposição de cromatogramas do método bioanalítico para quantificação de BNZ em urina de coelhos (λ = 324 nm).



A avaliação da seletividade do método para urina também foi considerada satisfatória, pois, no tempo de retenção do BNZ, as amostras de urina branco não apresentaram área superior a 20% da área do LIQ (0,039 µg/mL) e no tempo de retenção do PI as áreas não foram superiores a 5% da área do PI. Ainda, é possível

observar na figura a proporcionalidade do sinal gerado pelo BNZ analisando os cromatogramas das concentrações de 0,625 (em vermelho) e 1,250 µg/mL (em azul). Assim como na análise de plasma, o tempo de corrida foi de 2 minutos, tornando este método rápido e prático para análise de urina em estudos farmacocinéticos de BNZ.

Linearidade

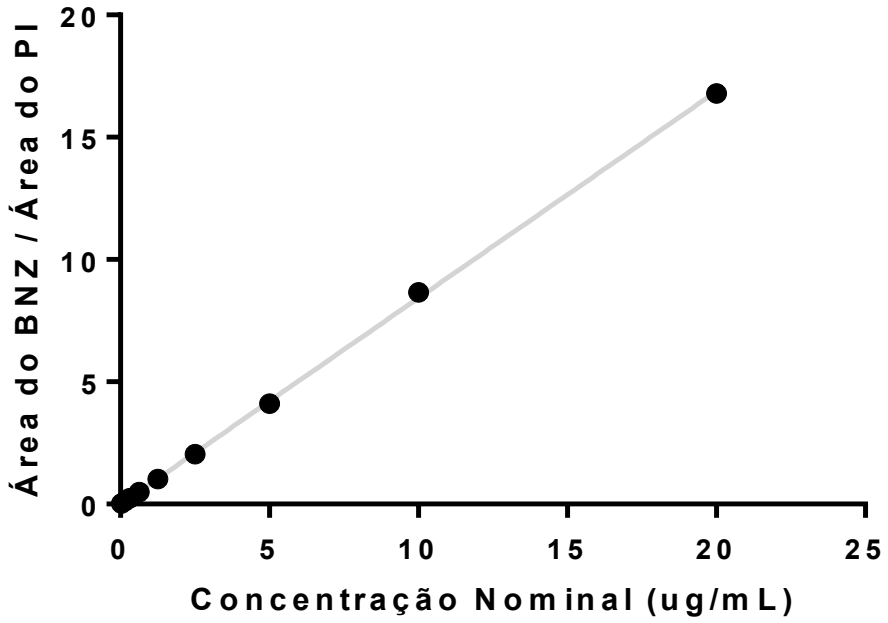
Devido à inexistência de publicações científicas sobre quantificação de BNZ em urina de coelhos, para escolha dos pontos da curva analítica, foi necessária a realização de estudos pilotos. Neste estudo estabeleceram-se as dez concentrações que constam na tabela 9.

Tabela 9 - Valores dos pontos da curva analítica para quantificação de BNZ em urina (CV = coeficiente de variação; EPR = erro padrão relativo).

Concentração nominal (µg/mL)	**Precisão** CV (%)	**Exatidão** EPR (%)
0,0390	3,1	93,3
0,0781	0,9	95,1
0,1562	7,6	99,0
0,3125	8,7	109,4
0,625	5,1	111,3
1,25	7,6	104,1
2,5	12,7	108,2
5	7,0	98,3
10	10,2	107,2
20	5,8	109,2

A seguir, na figura 22, está representada a curva analítica construída a partir da interpolação das concentrações nominais *versus* a relação da área dos picos de BNZ e PI (área de BNZ / área do PI).

Figura 22 - Curva analítica para quantificação de BNZ em urina (média das triplicatas; n = 10; equação da reta: y=0,8445x – 0,0174; r = 0,9998).



Avaliando a variabilidade entre as replicatas (precisão), a correspondência dos valores experimentais com os valores nominais (exatidão) e o valor de coeficiente de correlação (r = 0,9998), considera-se que, de acordo com legislação vigente, a linearidade do método é adequada para o intervalo proposto para quantificação de BNZ em urina.

Precisão e Exatidão

O estudo de precisão e exatidão do método foi realizado com as concentrações 0,0390 (LIQ), 0,0781 (CQB), 5 (CQM), 15 (CQA) e 30 (CQD) µg/mL em cinco replicatas para cada concentração nos ensaios intra-corrida e em 15 replicatas para os ensaios inter-corridas em dias distintos de análise. Na tabela 10 foram apresentados os valores do estudo de precisão intracorrida para cada concentração citada.

Tabela 10 - Precisão e exatidão dos controles de qualidade para o método bioanalítico de BNZ em urina.

		Concentração nominal (µg/mL)				
		0,0390	0,0781	5	15	50
		LIQ	**CQB**	**CQM**	**CQA**	**CQD**
Intracorrida	n	5	5	5	5	5
	Precisão CV (%)	11,0	2,9	12,5	12,4	11,4
	Exatidão EPR (%)	89,1	99,1	90,1	99,1	109,1
Intercorrida	n	15	15	15	15	15
	Precisão CV (%)	13,1	9,9	10,3	10,3	9,3
	Exatidão EPR (%)	101,1	96,1	90,4	101,1	112,1

De acordo com os resultados apresentados, os estudos de precisão e exatidão intra e intercorridas foram considerados satisfatórios considerando os limites de aceitação da legislação vigente.

Efeito residual

Na avaliação de efeito residual foram analisadas três amostras de urina branco (ausentes de BNZ e PI), sendo uma antes e duas logo após a injeção de uma amostra do limite superior de quantificação (LSQ = 20 µg/mL). Os resultados foram comparados com os obtidos de amostras processadas do limite inferior de quantificação (LIQ = 0,0390 µg/mL). As respostas de picos interferentes no tempo de retenção do analito foram inferiores a 20% da resposta do analito nas amostras processadas do LIQ e as respostas de picos interferentes no tempo de retenção do PI foram inferiores a 5 % da resposta do PI. Assim, não foi evidenciado aumento do sinal do analito ou PI causado por contaminação proveniente de amostras analisadas anteriormente, descartando a possibilidade de efeito residual também para o método em urina.

Recuperação

Para medir a eficiência do método de extração, foram comparados os resultados obtidos de amostras de CQB, CQM e CQA com amostras de urina branco fortificadas (*spiked*) com a solução padrão do analito após o processamento, que representaram 100% de recuperação.

Na tabela 11 são apresentados os resultados de recuperação para cada controle de qualidade citado acima e seus respectivos valores de precisão (CV%) e exatidão (EPR%).

Tabela 11 - Estudo de recuperação dos controles de qualidade baixo, médio e alto do método bioanalítico para quantificação de BNZ em urina.

Controle de Qualidade	Recuperação (%)	CV (%)*
CQB	80,9	9,2 / 5,8
CQM	79,1	10,3 / 8,1
CQA	85,9	3,4 / 9,0
Total	82,0	

*CV (coeficiente de variação): CV das três replicatas dos CQ´s processados / CV de três replicatas dos CQ´s contaminados após o processamento das amostras de plasma branco.

A eficiência de recuperação do BNZ em urina foi superior ao do plasma, isso se justifica por ser uma matriz biológica mais simples (menor quantidade de proteínas) e facilitar a ação do solvente orgânico em solubilizar o analito e extraí-lo da matriz biológica. Apesar da taxa de recuperação não estar próxima a 100% (82%), a sensibilidade atingida para o método atendeu ao propósito do estudo.

Estabilidade de armazenamento

Os ensaios de estabilidade foram realizados com amostras de CQB e CQA em três replicatas para cada concentração. As amostras processadas imediatamente após o preparo da amostra foram consideradas como “amostras zero” ou 100%. Estes ensaios se justificaram principalmente devido ao tempo entre as coletas de urina (6h), que poderia expor o fármaco a condições que levariam a degradação. Na tabela 12 estão dispostos os resultados dos testes de estabilidade para o método em questão.

Tabela 12 - Estabilidade de BNZ sob condições de armazenagem em urina.

	CQB	CQA
Curta duração (24 h a temperatura ambiente)		
n = 3		
CV(%)	9,1	3,9
EPR (%)	100,1	92,9
Longa duração, 30 dias a -20°C		
n = 3		
CV (%)	9,9	10,1
EPR (%)	102,3	100,3
Ciclo de congelamento/descongelamento a -20°C		
n = 3		
CV (%)	10,3	9,8
EPR (%)	100,9	112,9
Pós-processamento, 24 h a 25°C no cromatógrafo		
n = 3		
CV (%)	6,9	7,8
EPR (%)	100,4	106,4

De acordo com a tabela 12, os ensaios de estabilidade tiveram resultados dentro dos limites aceitáveis considerando a legislação vigente e, assim, as condições de armazenagem testadas foram consideradas adequadas para evitar a degradação do analito em urina.

6.2. Avaliação farmacocinética

6.2.1. Comprimido adulto de liberação imediata (Grupo ADU – 100 mg)

A partir da administração dos comprimidos de liberação imediata adulto (100 mg), foram construídas as curvas de concentração plasmática *versus* tempo e, assim, calculados os parâmetros farmacocinéticos para o grupo. Na tabela 13 são apresentados os valores médios de concentração plasmática *versus* tempo obtidos para este grupo.

Tabela 13 - Valores de concentração plasmática de BNZ *versus* tempo na administração de comprimidos de liberação imediata de 100 mg em coelhos (média, n = 7).

Tempo (h)	Concentração plasmática (±DP) µg/mL
0,25	0,401 (0,248)
0,50	0,795 (0,440)
0,75	1,023 (0,455)
1,00	1,300 (0,585)
2,00	2,887 (1,243)
4,00	7,100 (2,335)
6,00	6,436 (2,676)
8,00	5,417 (2,379)
12,00	4,896 (3,162)
18,00	1,720 (0,929)
24,00	0,313 (0,241)

DP = desvio padrão

Os resultados de concentração plasmática obtidos permitiram a utilização do modelo monocompartimental para o cálculo dos parâmetros. A seguir são apresentados os parâmetros farmacocinéticos calculados para o grupo de animais que receberam o comprimido de liberação imediata de 100 mg (Tabela 14).

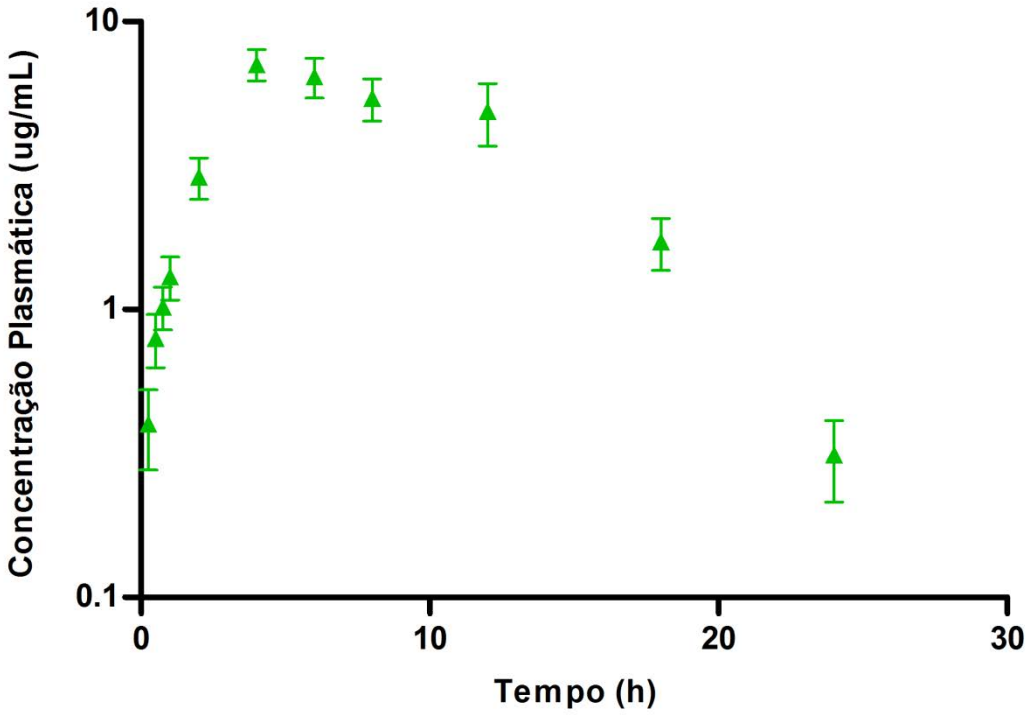
Tabela 14 - Parâmetros farmacocinéticos de BNZ administrado em comprimidos de liberação imediata de 100 mg em coelhos (média ± IC 95, n = 7).

	Unidade	**ADU** (100 mg)
k_{el}	h^{-1}	0,1955 (0,1283 - 0,2628)
$t_{1/2}$	h	4,02 (2,50 - 5,53)
k_a	h^{-1}	0,3476 (0,2971 - 0,3982)
$t_{1/2\ a}$	h	2,03 (1,73 - 2,35)
MRT	h	9,64 (7,88 - 11,42)
MAT	h	2,94 (2,49 - 3,39)
$t_{máx}$	h	6,0 (3,4 - 8,6)
$C_{máx}$	µg/mL	8,39 (6,11 - 10,67)
V_d	mL/kg	3165 (1394 - 4936)
Cl	mL/h.kg	515 (406 - 624)
Cl_r	mL/h.kg	9,88 (5,63 - 14,14)
fe	%	1,83 (0,96 - 2,71)
$ASC_{0-\infty}$	µg/mL.h	86,6 (62,4 - 110,8)

k_{el}: constante de eliminação, $t_{1/2}$: meia-vida de eliminação, k_a: constant de absorção, $t_{1/2\ a}$: meia-vida de absorção, MRT: tempo de residência médio, MAT: tempo de absorção médio, C_{max}: concentração plasmática máxima, t_{max}: tempo de ocorrência da C_{max}, V_d: volume de distribuição, Cl: clearance total, Cl_r: clearance renal, fe: fração excretada na forma inalterada na urina, $ASC_{0-\infty}$: área sob a curva de zero extrapolada ao infinito.

Na figura 23 foi representado graficamente o perfil farmacocinético do BNZ administrado em comprimidos de liberação imediata de 100 mg em coelhos.

Figura 23 - Perfil farmacocinético de BNZ na administração de comprimidos de liberação imediata de 100 mg (média ± DP, n = 7).



Através dos estudos de Raaflaub e Ziegler (1979) é possível comparar alguns parâmetros farmacocinéticos obtidos em humanos, após a administração do comprimido (Radanil) de BNZ de 100 mg, com os resultados obtidos em coelhos neste estudo. A $C_{máx}$ obtida em humanos foi de 2,2 a 2,8 µg/mL e em coelhos foi de 6,1 a 10,7 µg/mL. Essa diferença pode ser explicada diretamente pelos diferentes volumes sanguíneo de humanos (aprox. 5L para indivíduo de 70 kg) e coelhos (aprox. 170 mL para animal de 3 kg). O $t_{máx}$ foi de 3 a 4 h para humanos e de 3 a 9 h em coelhos. Apesar das diferenças anatômicas e fisiológicas dos modelos em comparação, os valores de $t_{máx}$ estão próximos. Nos dois estudos o BNZ foi administrado na forma de comprimidos. Assim, como o $t_{máx}$ é essencialmente dependente da forma de administração do fármaco, os valores para este parâmetro foram próximos. Outro parâmetro que pode ser comparado entre os estudos é a $t_{1/2}$, em humanos o valor médio foi de 12 h, enquanto que em coelhos foi de 4 h. Essa diferença se dá devido ao metabolismo mais acelerado de coelhos em relação aos humanos (KARARLI, 1995).

Alguns trabalhos publicados na literatura científica apresentam a farmacocinética do BNZ em animais após administração por via oral, intraperitonial (i.p.) e intravenosa (i.v.) em diferentes doses, veículos e modelos animais. Na tabela 15 foram agrupados os parâmetros farmacocinéticos descritos nestes trabalhos.

Tabela 15 - Estudos pré-clínicos de farmacocinética do BNZ publicados na literatura.

Referência	Via de administração	Dose/veículo	$C_{máx}$	$t_{máx}$	$t_{1/2}$	MRT	V_d/F	Cl/F	Modelo animal
Davanço; Campos; Peccinini, 2014	oral	5 mg/kg em suspensão de goma arábica	11,0 µg /mL	1,1 h	2,7 h	6,3 h	1014 mL/kg	263,6 mL/h.kg	rato
Moreira da Silva *et al*., 2012	oral	100 mg/kg em suspensão de goma arábica	151,28 µg/mL	2,2 h	1,64 h	5,05 h	2212,33 mL/kg	416,74 mL/h.kg	camundongo
	intraperitoneal	26, 78 e 650 mg/kg em polietilenoglicol	18, 36 e 105 µg/mL	15, 30 e 60 min	1,5 h (todas as doses)	-	-	-	camundongo
Workman *et al*., 1984	intravenosa	4 mg/kg em DMSO	3,1 µg/mL	-	4,5 h	-	-	-	ovelha
	intravenosa	5 mg/kg em DMSO	12,7 µg/mL	-	7,6 h	-	-	-	cão
	oral	25 mg/kg em cápsulas tam. 00	46,5 µg/mL	4 h	10 h	-	-	-	cão
	oral	50 mg/kg em cápsulas tam. 00	57,3 µg/mL	4 h	6,25 h	-	-	-	cão

Através da tabela é possível verificar a diferença numérica entre alguns parâmetros farmacocinéticos. Essas diferenças podem ter relação com o modelo animal, a dose administrada em cada espécie, o veículo utilizado na administração do fármaco e a via de administração usada. Ainda, é possível verificar a diferença na eliminação do fármaco em animais de pequeno porte com animais de médio e grande porte. A $t_{1/2}$ pela via oral em camundongos (1,64 h) é consideravelmente menor quando comparada a do cão (10 h em 25 mg/kg; 6,25 h em 50 mg/kg). Outro fato a ser interpretado é a não proporcionalidade do parâmetro $C_{máx}$ com a duplicação da dose na administração por via oral em cães. Quando se administra 25 mg/kg a $C_{máx}$ é de 46,5 µg/mL, enquanto que na administração de 50 mg/kg a $C_{máx}$ é

de 57,3 µg/mL. Em camundongos, na administração intraperitoneal também é possível observar tal fato, sendo que na administração das doses 26, 78 e 650 mg/kg, os valores da $C_{máx}$ são 18, 36 e 105 ug/mL. Esta ausência de proporcionalidade caracteriza cinética não linear nestes modelos animais para o BNZ (cinética de ordem zero). Além da saturação do sistema de eliminação, a falta de linearidade pode estar relacionada ao processo de absorção, mediante a saturação dos sítios de absorção.

Outro fato a ser analisado nessa compilação de trabalhos é a diferença encontrada por Workman e colaboradores (1984) na administração intravenosa em ovelha e cão. Considerando que as doses administradas são próximas (4 *vs.* 5 mg/kg), há alta diferença nos parâmetros $C_{máx}$ (3,1 *vs*. 12,7 µg/mL) e $t_{1/2}$ (4,5 *vs.* 7,6 h). Tal fato tem relação com aspectos fisiológicos de cada modelo animal, como volemia, metabolismo, entre outros.

Com relação à excreção urinária do BNZ, no presente estudo em coelhos, a fração excretada inalterada na urina (fe) foi de 1,83 % para o grupo de animais que recebeu o comprimido de liberação imediata de 100 mg (tabela 14). No trabalho de Workman e colaboradores (1984) é relatado que a excreção do BNZ foi de 5% em modelos animais. Roberts e colaboradores (1984) encontraram uma taxa de excreção urinária de 6% em humanos. Perdomo e colaboradores (2013), em estudos realizados em ratos, encontraram excreção urinária do BNZ em 1,55%. Todos estes achados sustentam a afirmativa de que o BNZ é extensamente metabolizado e sua excreção na forma inalterada na urina é pequena.

6.2.2. Comprimido pediátrico de liberação imediata (Grupo PED – 12,5 mg)

A partir da administração dos comprimidos de liberação imediata pediátrico (12,5 mg), foram construídas as curvas de concentração plasmática *versus* tempo e, assim, calculado os parâmetros farmacocinéticos para o grupo. Na tabela 16 são apresentados os valores médios de concentração plasmática *versus* tempo para este grupo.

Tabela 16 - Valores de concentração plasmática de BNZ versus tempo na administração de comprimidos de liberação imediata de 12,5 mg em coelhos (média, n = 7, DP).

Tempo (h)	Concentração plasmática (±DP) µg/mL
0,25	0,388 (0,220)
0,50	0,474 (0,214)
0,75	0,590 (0,249)
1,00	0,696 (0,306)
1,50	0,751 (0,284)
2,00	0,817 (0,252)
2,50	0,745 (0,247)
3,00	0,653 (0,268)
3,50	0,623 (0,233)
4,00	0,485 (0,232)
5,00	0,305 (0,192)
6,00	0,235 (0,111)

DP = desvio padrão

Os resultados de concentração plasmática obtidos permitiram a utilização do modelo monocompartimental para o cálculo dos parâmetros. A seguir são apresentados os parâmetros farmacocinéticos calculados para o grupo de animais que receberam o comprimido de liberação imediata de 12,5 mg (Tabela 17).

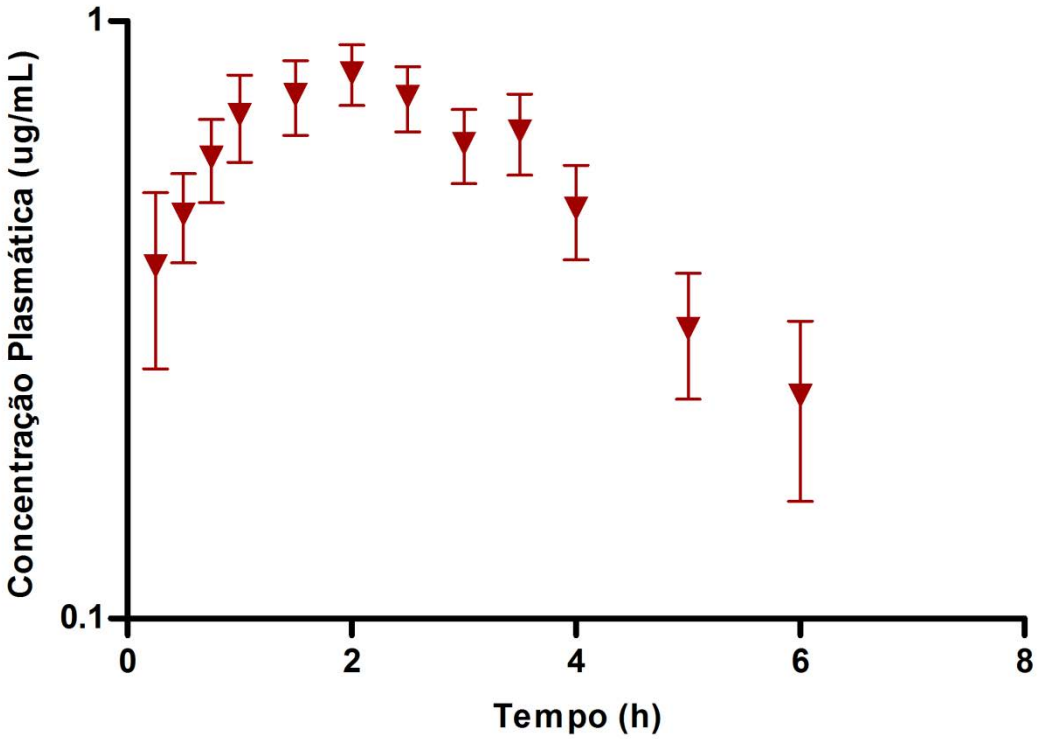
Tabela 17 - Parâmetros farmacocinéticos de BNZ administrado em comprimidos de liberação imediata de 12,5 mg em coelhos (média ± IC 95, n = 7).

	Unidade	**PED** (12,5 mg)
k_{el}	h^{-1}	0,4351 (0,3366 - 0,5335)
$t_{1/2}$	H	1,66 (1,34 – 1,99)
k_a	h^{-1}	1,1472 (0,8660 - 1,4280)
$t_{1/2\ a}$	H	0,63 (0,51 – 0,75)
MRT	H	3,41 (3,03- 3,80)
MAT	H	0,91 (0,74 – 1,09)
$t_{máx}$	H	2,3 (1,6 – 2,9)
$C_{máx}$	µg/mL	0,84 (0,62 – 1,07)
V_d	mL/kg	1295 (870 - 1721)
Cl	mL/h.kg	555 (336 - 775)
Cl_r	mL/h.kg	0,46 (0 – 0,95)
fe	%	0,08 (0 – 0,18)
$ASC_{0-\infty}$	µg/mL.h	3,6 (2,3 - 4,8)

k_{el}: constante de eliminação, $t_{1/2}$: meia-vida de eliminação, k_a: constant de absorção, $t_{1/2\ a}$: meia-vida de absorção, MRT: tempo de residência médio, MAT: tempo de absorção médio, C_{max}: concentração plasmática máxima, t_{max}: tempo de ocorrência da C_{max}, V_d: volume de distribuição, Cl: clearance total, Cl_r: clearance renal, fe: fração excretada na forma inalterada na urina, $ASC_{0-\infty}$: área sob a curva de zero extrapolada ao infinito.

Na figura 24 foi representado graficamente o perfil farmacocinético do BNZ administrado em comprimidos de liberação imediata de 12,5 mg em coelhos.

Figura 24 - Perfil farmacocinético de BNZ na administração de comprimidos pediátricos de liberação imediata de 12,5 mg (média ± DP, n = 7).



Este estudo de avaliação da farmacocinética do BNZ administrado na forma de comprimidos pediátricos de 12,5 mg foi o primeiro realizado até o momento com esta apresentação farmacêutica. Dessa forma, não houve como comparar os parâmetros farmacocinéticos obtidos com outros estudos ou até mesmo com outras espécies. A comparação que foi realizada se deu somente através dos parâmetros farmacocinéticos obtidos neste mesmo trabalho (seção 6.3.).

6.2.3. Comprimidos de liberação prolongada K4M e K100M (LPK4M e LPK100M - 200 mg)

A partir da administração dos comprimidos de liberação prolongada K4M e K100M (200 mg), foram construídas as curvas de concentração plasmática *versus* tempo e, assim, calculado os parâmetros farmacocinéticos para cada grupo. Na tabela 18 são apresentados os valores médios de concentração plasmática versus

tempo para os dois grupos de animais que receberam os comprimidos de liberação prolongada.

Tabela 18 - Valores de concentração plasmática de BNZ versus tempo na administração dos comprimidos de liberação prolongada K4M e K100M em coelhos (média, n = 7).

Tempo (h)	Concentração plasmática (±DP) µg/mL	
	LPK4M (200 mg)	**LPK100M** (200 mg)
0,5	1,141 (1,202)	1,029 (0)
1,0	1,715 (1,548)	0,913 (1,016)
2,0	2,919 (1,865)	0,813 (1,000)
4,0	7,490 (4,859)	0,794 (1,236)
6,0	8,843 (6,580)	1,069 (1,501)
8,0	7,478 (5,738)	1,768 (1,504)
12,0	7,037 (3,553)	4,256 (2,861)
24,0	3,499 (3,172)	6,638 (2,842)
30,0	0,732 (0,706)	0,867 (0,888)
36,0	0,173 (0,003)	0,204 (0,038)

DP = desvio padrão

Os resultados de concentração plasmática obtidos permitiram a utilização do modelo monocompartimental para o cálculo dos parâmetros em ambos os grupos. A seguir são apresentados os parâmetros farmacocinéticos calculados para os dois grupos de animais que receberam os comprimidos de liberação prolongada (tabela 19).

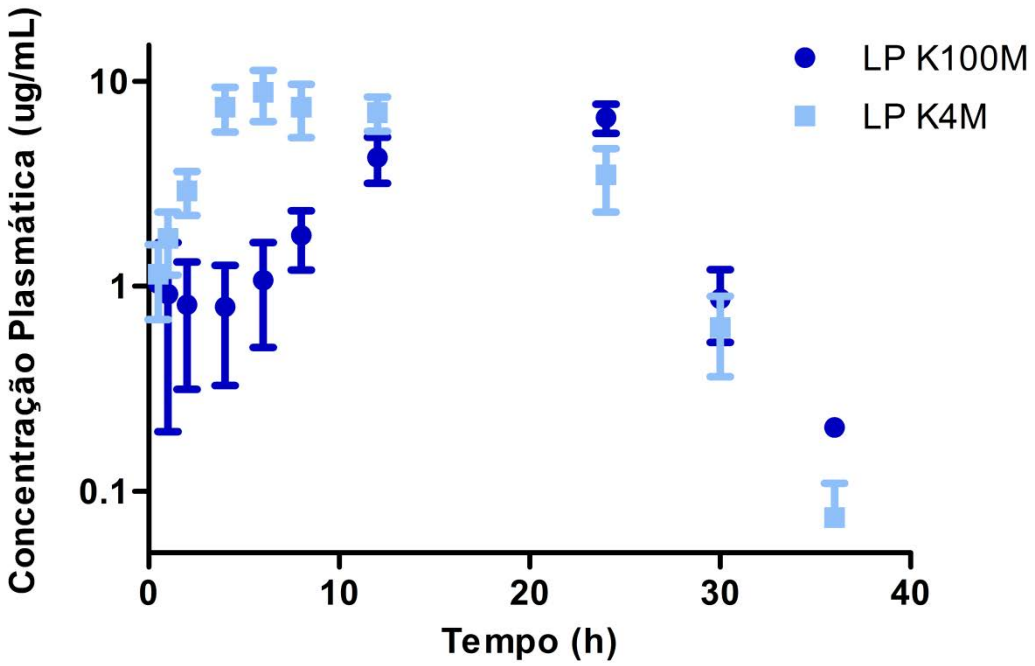
Tabela 19 - Parâmetros farmacocinéticos de BNZ administrado em comprimidos de liberação prolongada K4M e K100M de 200 mg em coelhos (média ± IC 95, n = 7).

	Unidade	**LPK4M**	**LPK100M**
k_{el}	h^{-1}	0,2076 (0,1231 – 0,2921)	0,2309 (0,1464 – 0,3155)
$t_{1/2}$	h	3,92 (2,45 – 5,41)	3,56 (1,96 – 5,17)
k_a	h^{-1}	0,3277 (0,2463 – 0,4091)	0,2468 (0,1736 – 0,3201)
$t_{1/2\ a}$	h	2,24 (1,70 – 2,79)	3,19 (1,83 – 4,54)
MRT	h	12,8 (9,25 – 16,34)	19,1 (16,0 – 22,3)
MAT	h	3,24 (2,45 – 5,41)	4,60 (2,64 – 6,56)
$t_{máx}$	h	11,1 (2,9 – 19,4)	18,8 (12,9 – 24,8)
$C_{máx}$	µg/mL	10,26 (6,81 – 13,7)	7,15 (5,00 – 9,31)
Vd	mL/kg	2985 (516 - 5454)	3190 (2078 - 4303)
Cl	mL/h.kg	483 (246 - 720)	668 (497 - 838)
Cl_r	mL/h.kg	8,28 (0 – 17,01)	15,68 (10,62 – 20,74)
fe	%	1,45 (0,27 – 2,64)	2,43 (1,64 – 3,23)
$ASC_{0-\infty}$	µg/mL.h	153,9 (102,5 – 205,2)	111,0 (77,3 – 144,7)

k_{el}: constante de eliminação, $t_{1/2}$: meia vida de eliminação, k_a: constant de absorção, $t_{1/2\ a}$: media vida de absorção, MRT: tempo de residência médio, MAT: tempo de absorção médio, C_{max}: concentração plasmática máxima, t_{max}: tempo de ocorrência da C_{max}, V_d: volume de distribuição, Cl: clearance total, Cl_r: clearance renal, fe: fração excretada na forma inalterada na urina, $ASC_{0-\infty}$: área sob a curva de zero extrapolada ao infinito.

Na figura 25 foi representado graficamente o perfil farmacocinético do BNZ administrado em comprimidos de liberação prolongada em coelhos.

Figura 25 - Perfil farmacocinético de BNZ na administração de comprimidos de liberação prolongada de BNZ em coelhos (média ± DP, n = 7,).



É possível perceber visualmente a diferença do perfil farmacocinético do BNZ entre os comprimidos de liberação prolongada. O LPK4M tem uma liberação mais rápida do fármaco, enquanto o LPK100M prolonga a liberação promovendo concentrações máximas no plasma em aproximadamente 20 h após a administração. Essas diferenças se justificam pelo grau de viscosidade do polímero HPMC utilizado em cada formulação. O polímero HPMC K100M possui maior viscosidade em relação ao K4M, provocando o prolongamento da liberação do fármaco neste tipo de comprimido e consequentemente alterações nos parâmetros farmacocinéticos.

O prolongamento da liberação do fármaco nestes grupos condiz com estudos da literatura, os quais utilizaram o mesmo polímero na composição de comprimidos com outros ativos (HUANG *et al*., 2007; SHARMA; LEWIS, 2013).

6.2.4. Administração intravenosa de BNZ (Grupo IV – 10 mg)

Este grupo foi realizado principalmente para calcular a biodisponibilidade absoluta (F_{oral}) do BNZ a partir da administração oral dos comprimidos de BNZ

avaliados neste estudo. Além disso, a partir dos cálculos dos parâmetros farmacocinéticos, é possível discutir diferenças entre as vias administradas, bem como, para os sistemas de liberação testados. A partir da administração IV de 10 mg, em dose única, foram construídas as curvas de concentração plasmática *versus* tempo e, assim, calculado os parâmetros farmacocinéticos. Na tabela 20 são apresentados os valores médios de concentração plasmática *versus* tempo para os animais deste grupo.

Tabela 20 - Valores de concentração plasmática de BNZ versus tempo na administração IV de BNZ em dose única de 10 mg (média, n = 7, DP).

Tempo (h)	**Concentração plasmática (±DP) µg/mL**
0,00*	3,427 (1,814)
0,25	2,520 (0,983)
0,50	2,144 (0,827)
0,75	1,756 (0,567)
1,00	1,537 (0,509)
2,00	0,864 (0,225)
4,00	0,367 (0,084)
6,00	0,200 (0,024)
8,00	0,155 (0,012)

* O tempo “0,00” foi obtido a partir da extrapolação da reta β ao eixo y. DP = desvio padrão

Os resultados de concentração plasmática obtidos permitiram a utilização do modelo de dois compartimentos (bicompartimental) para a análise farmacocinética do grupo, diferentemente dos grupos anteriores onde se aplicou o modelo de um compartimento (monocompartimental). A seguir são apresentados os parâmetros farmacocinéticos calculados para o grupo IV (Tabela 21).

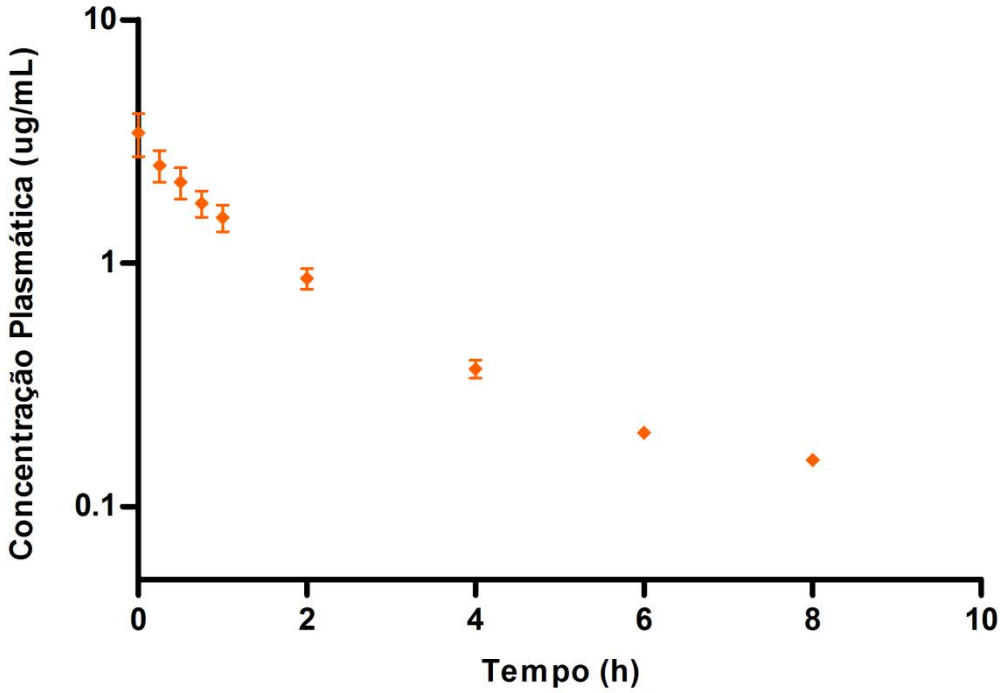
Tabela 21 - Parâmetros farmacocinéticos da administração IV de BNZ em dose única de 10 mg em coelhos (média ± IC 95, n = 7,).

	Unidade	GRUPO IV 10 mg
β*	h^{-1}	0,2792 (0,1562 - 0,4023)
$t_{1/2}$	H	3,07 (1,65 - 4,50)
MRT	H	3,3 (2,20 - 4,40)
V_d	mL/kg	2338 (1110 - 3567)
Cl	mL/h.kg	511 (390 - 632)
Cl_r	mL/h.kg	1,22 (0,05 - 2,39)
fe	%	0,21 (0 - 0,42)
$ASC_{0-\infty}$	µg/mL.h	6,3 (5,0 - 7,6)

*β: constante de eliminação – modelo bicompartimental, $t_{1/2}$: meia vida de eliminação, MRT: tempo de residência médio, V_d: volume de distribuição, Cl: clearance total, Cl_r: clearance renal, fe: fração excretada na forma inalterada na urina, $ASC_{0-\infty}$: área sob a curva de zero extrapolada ao infinito.

Na figura 26 foi representado graficamente o perfil farmacocinético do BNZ na admnistração intravenosa de 10 mg em coelhos.

Figura 26 - Perfil farmacocinético de BNZ na administração intravenosa em dose única de 10 mg em coelhos (média ± DP, n = 7,).



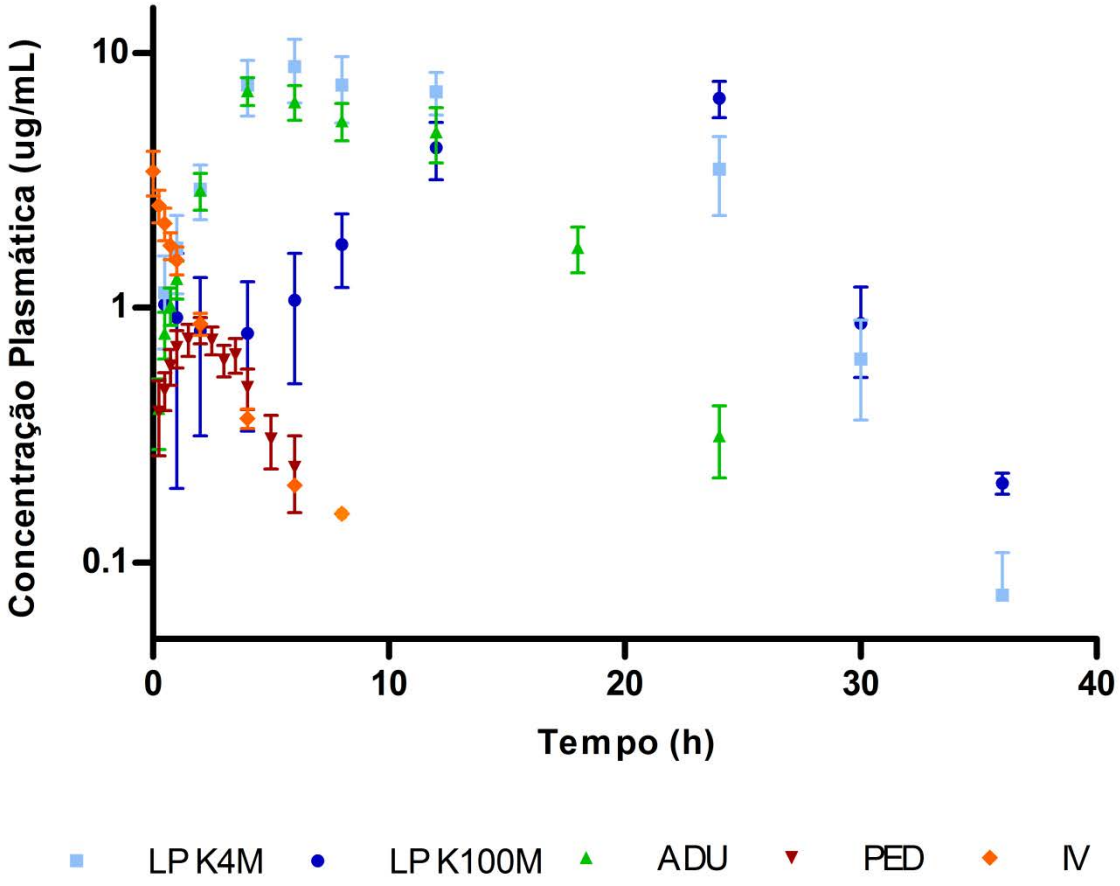
Observando a figura 26 é possível perceber que o perfil farmacocinético do BNZ na administração IV apresenta duas velocidades de decaimento (eliminação), a primeira do tempo 0 a 4 h após administração e a outra do tempo 4h a 8h. Dessa forma, o modelo de dois compartimentos (bicompartimental) foi o mais adequado para o cálculo dos parâmetros farmacocinéticos.

A avalição da farmacocinética do BNZ na administração IV foi necessária para o cálculo da biodisponibilidade absoluta (F_{oral}) do BNZ dos comprimidos avaliados neste estudo. Não é possível comparar os parâmetros obtidos neste grupo com resultados em humanos devido à inexistência de formulações de BNZ para uso intravenoso.

6.3. Comparação estatística e interpretação dos resultados

Na figura 27 foram plotados graficamente todos os perfis farmacocinéticos de todos os grupos avaliados neste estudo.

Figura 27 - Perfis farmacocinéticos de todos os grupos de animais (média ± DP, n = 35; n = 7 por grupo).



Na tabela 22 foram alinhados os parâmetros farmacocinéticos de todos os grupos e aplicado os símbolos correspondentes às comparações estatísticas entre eles. Nos apêndices I, II, III, IV, e V estão dispostos os resultados individuais para todos os grupos de animais avaliadados neste estudo.

Tabela 22 - Parâmetros farmacocinéticos de todos os grupos e comparação estatística (média ± IC95, n=35, n=7 por grupo).

	Unidade	ADU 100 mg	PED 12,5 mg	IV 10 mg	LPK4M 200 mg	LPK100M 200 mg
k_{el} ou β	h^{-1}	0,1955 (0,1283 – 0,2628)	0,4351 [a] (0,3366 – 0,5335)	0,2792 (0,1562 – 0,4023)	0,2076 [b] (0,1231 – 0,2921)	0,2309 [b] (0,1464 – 0,3155)
$t_{1/2}$	h	4,02 (2,50 – 5,53)	1,66 [a] (1,34 – 1,99)	3,07 (1,65 – 4,50)	3,92 [b] (2,45 – 5,41)	3,56 [b] (1,96 – 5,17)
k_a	h^{-1}	0,3476 (0,2971 – 0,3982)	1,1472 [a] (0,8660 – 1,4280)	-	0,3277 [b] (0,2463 – 0,4091)	0,2468 [a,b] (0,1736 – 0,3201)
$t_{1/2\ a}$	h	2,03 (1,73 – 2,35)	0,63 [a] (0,51 – 0,75)	-	2,24 [b] (1,70 – 2,79)	3,19 [a,b] (1,83 – 4,54)
MRT	h	9,64 (7,88 – 11,42)	3,41 [a] (3,03 – 3,80)	3,30 [a] (2,20 – 4,40)	12,8 [b,c] (9,25 – 16,34)	19,1 [a,b,c,d] (16,0 – 22,3)
MAT	h	2,94 (2,49 – 3,39)	0,91 [a] (0,74 – 1,09)	-	3,24 [b] (2,45 – 5,41)	4,60 [a,b] (2,64 – 6,56)
$t_{máx}$	h	6,0 (3,4 – 8,6)	2,3 [a] (1,6 – 2,9)	-	11,1 [b] (2,9 – 19,4)	18,8 [a,b] (12,9 – 24,8)
$C_{máx}$	µg/mL	8,39 (6,11 – 10,67)	0,84 [a] (0,62 – 1,07)	-	10,26 [b] (6,81 – 13,7)	7,15 [b] (5,00 – 9,31)
V_d	mL/kg	3165 (1394 - 4936)	1295 [a] (870 - 1721)	2338 (1110 - 3567)	2985 (516 - 5454)	3190 [b] (2078 - 4303)
Cl	mL/h.kg	515 (406 -624)	555 (336 - 775)	511 (390 - 632)	483 (246 - 720)	668 (497 - 838)
Cl_r	mL/h.kg	9,88 (5,63 – 14,14)	0,46 [a] (0 – 0,95)	1,22 [a] (0,05 – 2,39)	8,28 [b] (0 – 17,01)	15,68 [b,c] (10,62 – 20,74)
fe	%	1,83 (0,96 – 2,71)	0,08 [a] (0 – 0,18)	0,21 [a] (0 – 0,42)	1,45 [b] (0,27 – 2,64)	2,43 [b,c] (1,64 – 3,23)

Legenda de parâmetros: k_{el} ou β: constante de eliminação, $t_{1/2}$: meia-vida de eliminação, k_a: constante de absorção, $t_{1/2\ a}$: meia-vida de absorção, MRT: tempo de residência médio, MAT: tempo de absorção médio, $C_{máx}$: concentração plasmática máxima, t_{max}: tempo de ocorrência da $C_{máx}$, Vd: volume de distribuição, Cl: clearance total, Cl_r: clearance renal, fe: fração excretada inalterada na urina.
- : não aplicável.
Estatística (*Mann-Whitney test*):
a: p<0,05 comparado ao ADU; b: p<0,05 comparado ao PED; c: p<0,05 comparado ao IV; d: p<0,05 comparado ao LPK4M.

6.3.1. Meia-vida de eliminação ($t_{1/2}$) e constante de eliminação (k_{el} ou β)

A meia-vida de eliminação ($t_{1/2}$) é um parâmetro farmacocinético útil para selecionar o intervalo de dose de um regime posológico, para prever o grau de flutuação da concentração plasmática durante o intervalo de dose, prever quanto será necessário para atingir-se o estado de equilíbrio, para prever quanto tempo será necessário para que uma dada concentração decline a outra concentração específica uma vez que não seja administrada nova dose ou para determinar o tempo necessário para que o fármaco seja eliminado do organismo (BJORNSSON, 1997). É importante compreender a diferença entre *clearance* (Cl) e $t_{1/2}$. O Cl expressa a capacidade do organismo de eliminar o fármaco e a $t_{1/2}$ expressa a taxa total de eliminação do fármaco na fase terminal da curva de concentração plasmática *versus* tempo; e este processo envolve tanto o *clearance* quanto a extensão de distribuição. Assim, é possível inferir que a $t_{1/2}$ é um parâmetro híbrido do Cl e do Vd (TOUTAIN; BOUSQUET-MELÓU, 2004b).

Já a constante de eliminação (k_{el} ou β) caracteriza a velocidade com que ocorrem os processos de eliminação (metabolização e excreção).

A comparação destes dois parâmetros entre os grupos apontou diferença estatística dos grupos ADU, IV, LPK4M e LPK100M em relação ao grupo PED. A $t_{1/2}$ para o grupo PED (1,66 h) é numericamente e estatisticamente inferior aos demais grupos, caracterizando que a eliminação do fármaco é mais rápida na administração deste tipo de formulação. Em teoria, a $t_{1/2}$ deveria ser semelhante em todos os grupos, pois todos os animais receberam o mesmo fármaco e as condições de biotransformação e eliminação deveriam ser homogêneas ou próximas entre eles. As diferenças entre os grupos é o tipo de formulação e a dosagem administrada. O tipo de formulação deve alterar parâmetros relacionados à fase de absorção, já que mudanças ocorrerão no processo de desintegração e dissolução quando se trata de sistemas de liberação imediata e de liberação prolongada. A dosagem diferente entre os grupos pode ser um fator a ser considerado, já que pode haver saturação do sistema de biotransformação em doses elevadas para este modelo animal. Assim, é possível que a quantidade

superior de BNZ disponibilizada *in vivo* a partir da administração do comprimido adulto, comprimidos de liberação prolongada (LP) e IV esteja relacionada com um menor desempenho na eliminação do fármaco, sugerindo saturação em alguma fase farmacocinética nesses níveis de dose.

6.3.2. Meia-vida de absorção ($t_{1/2\ a}$) e constante de absorção (k_a)

A cinética de absorção descreve o processo de entrada do fármaco ao compartimento central (circulação sistêmica). A absorção é determinada por vários processos diferentes, e é comumente descrito por fatores tempo dependente (k_a e $t_{1/2\ a}$) e tempo independente (extensão de absorção ou F). A $t_{1/2a}$ é um parâmetro farmacocinético que expressa o tempo necessário para que a metade de uma determinada concentração seja absorvida e pode ser utilizada para estimar o tempo para atingir a concentração plasmática máxima ($t_{máx}$), sendo que $t_{máx}$ é aproximadamente três vezes a $t_{1/2a}$. A constante de absorção (k_a) representa a velocidade em que o processo de absorção ocorre (CUTLER, 1978, MARTINEZ; AMIDON, 2002).

Comparando todos os grupos é possível observar diferenças estatísticas significativas no processo de absorção entre os sistemas de liberação imediata e os sistemas de liberação prolongada. O grupo LPK100M, comprimido de polímero com maior grau de viscosidade, apresentou $t_{1/2a}$ (3,19 h) superior numericamente a todos os grupos e com diferença estatística diante dos grupos ADU e PED. Tal diferença pode ser basicamente explicada pela diferença entre os sistemas de liberação do fármaco presentes em cada formulação. O grupo LPK4M é diferente estatisticamente somente em relação ao grupo PED, e não tem diferença estatística em relação ao grupo ADU (2,03 *vs* 2,24 h). Essa proximidade entre estes grupos, ADU e LPK4M, evidencia que, apesar do LPK4M ser considerado um sistema de liberação prolongada, o grau de viscosidade (menor em relação ao LPK100M) deste tipo de polímero não foi suficiente para que este sistema se comportasse diferentemente do sistema de liberação imediata (ADU) no processo de absorção. Há também diferença estatística entre os grupos ADU e PED, ambos de liberação imediata. Essa diferença entre comprimidos do mesmo tipo

de sistemas de liberação podem ser explicadas pelas diferenças na quantidade de adjuvantes (tabela 2), tamanho do comprimido, peso, dureza e dose (solubilidade). Apesar de ambos os comprimidos serem obtidos pelo mesmo modo de produção e com os mesmos adjuvantes, existem diferenças quantitativas entre eles que proporcionam diferenças nas características físico-químicas e, consequentemente, na liberação do fármaco.

6.3.3. Tempo de residência médio (MRT) e tempo de absorção médio (MAT)

O parâmetro tempo de residência médio (MRT) é o tempo de permanência do fármaco no organismo, antes de ser excretado através de processos de eliminação. Quando se trata de uma administração intravenosa em modelo monocompartimental, o MRT é o tempo necessário para que 63,2% da dose seja eliminada do organismo. Os valores de MRT após administração em outras vias diferentes da via intravenosa sempre serão maiores, pois nestas administrações se tem o processo de absorção (TOZER; ROWLAND, 2009). Em outras abordagens, esse parâmetro é utilizado para prever o tempo em que o fármaco estará no organismo para agir sobre determinado processo patológico.

Na comparação entre os grupos, o valor de MRT do grupo LPK100M (19,1 h) foi superior estatisticamente de todos os demais (ADU = 9,64 h; PED = 3,41 h; LPK4M = 12,8 h), demonstrando que o sistema de liberação prolongada com esse tipo de polímero promove manutenção da concentração plasmática superior aos outros sistemas testados. Tal fato pode ser considerado vantajoso do ponto de vista clínico, pois neste tipo de administração o fármaco ficará por mais tempo no organismo podendo contribuir com a atividade antiparasitária. Vale ressaltar que o maior tempo de permanência do fármaco no organismo deve estar associado a concentrações plasmáticas na faixa terapêutica. Do contrário, em concentrações sub ou acima da faixa terapêutica, um aumento de MRT não trará vantagem clínica. Os grupos LPK4M (12,8 h) e ADU (9,64 h) não apresentaram diferença estatística para MRT, mais uma vez corroborando que estes sistemas possuem características de liberação do fármaco próximas. Os grupos ADU (9,64 h) e PED (3,41 h) tiveram diferença estatística entre eles, apesar de ambos serem de

liberação imediata, o comportamento do comprimido pediátrico é de ter liberação mais rápida em relação ao comprimido adulto, e isso, fez com que o fármaco fosse absorvido e excretado em menor tempo. Quando se compara os grupos PED (3,41 h) e IV (3,30 h) não há diferença estatística, reforçando a ideia de que o processo de absorção do fármaco na administração do comprimido pediátrico é muito rápido em relação aos demais sistemas testados.

O tempo de absorção médio (MAT) é um parâmetro que representa o tempo médio necessário para que um fármaco seja absorvido e atinja a circulação sistêmica (compartimento central) (RIEGELMAN; COLLIER, 1980).

Na comparação entre os grupos, os valores de MAT do grupo LPK100M foram superiores estatisticamente em relação aos grupos PED e ADU, fato explicado pela diferença nas formulações. O polímero HPMC prolonga a liberação do fármaco, provocando maior tempo de absorção. O comprimido LPK4M não apresentou diferença com o grupo ADU, evidenciando que a viscosidade do polímero não permitiu um aumento significativo do MAT em relação ao comprimido de liberação imediata. O grupo PED teve valores de MAT significativamente menores com relação aos demais grupos, demonstrando a alta de taxa de liberação do fármaco da matriz, levando a rápida absorção.

6.3.4. Concentração plasmática máxima ($C_{máx}$) e tempo para atingir $C_{máx}$ ($t_{máx}$)

A concentração plasmática máxima ($C_{máx}$) é um parâmetro farmacocinético importante para observação dos níveis plasmáticos do fármaco e assim prever efeitos tóxicos em determinadas posologias. A $C_{máx}$ é atingida quando há equilíbrio entre a velocidade de absorção e a velocidade de eliminação. Comparando este parâmetro entre os grupos é possível verificar que para ADU ($C_{máx}$ = 8,39 µg/mL), LPK4M ($C_{máx}$ = 10,26 µg/mL) e LPK100M ($C_{máx}$ = 7,15 µg/mL) não existe diferença estatística, embora a dose do comprimido adulto de liberação imediata seja 100 mg e os de liberação prolongada seja de 200 mg. Tal similaridade pode ser explicada pelo fato dos comprimidos com 200 mg de BNZ liberarem o fármaco de forma gradual, fazendo com que picos de concentração plasmática sejam inferiores ao de sistema de liberação imediata se estivesse na

mesma dosagem. É importante considerar esse fator na clínica, pois embora o dobro da dose tenha sido administrada, os níveis de concentração plasmática máxima foram próximos em relação ao comprimido de liberação imediata que já está no mercado. Segundo dados da literatura, concentrações plasmáticas iguais ou superiores a 20 µg/mL em humanos elevam o risco de incidência de efeitos adversos, principalmente manifestações dérmicas (PINAZO *et al*., 2013; RAAFLAUB, 1980). Embora não haja nenhum estudo publicado de eficácia e toxicidade do BNZ em coelhos, é possível prever, usando o comprimido adulto (ADU) como referência, que as concentrações plasmáticas atingidas de BNZ, quando administrado os comprimidos de liberação prolongada, serão próximas aos de referência, e isso, gerar perspectiva de que a eficácia e o perfil toxicológico poderão ser semelhantes entre as formulações, embora elas estejam em dosagens diferentes.

Os grupos ADU, LPK4M e LPK100, ainda com relação à $C_{máx}$, apresentaram diferente estatística quando comparados ao grupo PED. Tal diferença é simplesmente justificada pelo fato do comprimido pediátrico ser de dose inferior aos demais (12,5 mg).

O tempo para atingir a $C_{máx}$ ($t_{máx}$) é o intervalo necessário para que haja equilíbrio entre a fase de absorção e a fase de eliminação. O $t_{máx}$ é dependente da constante de absorção, se o fármaco for absorvido rapidamente os valores de $t_{máx}$ serão menores, ao contrário de um fármaco de absorção lenta, em que os valores de $t_{máx}$ são maiores. Além disso, o parâmetro $t_{máx}$ é dependente da formulação administrada, no caso da forma farmacêutica comprimido, se o sistema for de liberação imediata este parâmetro será menor quando comparado a um sistema de liberação prolongada. Na comparação deste parâmetro entre os grupos, foi possível evidenciar diferenças significativas entre os sistemas de liberação prolongada e os sistemas de liberação imediata. O grupo LPK100M teve o valor de $t_{máx}$ (18,8 h) superior aos demais grupos e diferente estatisticamente dos grupos ADU (6,0 h) e PED (2,3 h). A comparação entre LPK4M (11,1 h) e ADU (6,0 h), apesar de diferença numérica, os valores não apresentaram diferença estatística. Tal fato corrobora a hipótese levantada anteriormente de que o grau de viscosidade do polímero HPMC utilizado no comprimido LPK4M não foi suficiente para que este sistema tivesse diferença em relação à liberação

do fármaco quando comparado ao sistema de liberação imediata (ADU). Outra análise a ser considerada com este parâmetro é o pareamento entre ADU (6,0 h) e PED (2,3 h), que demonstra diferença estatística mesmo ambos sendo de liberação imediata. Esse fato pode ter relação com as características físico-químicas (tamanho, peso, dureza e outros) dos comprimidos e a proporção de adjuvantes de cada formulação (tabela 2), levando a intervalos diferentes de desintegração e dissolução *in vivo*, embora estas características tenham sido semelhantes entre as formulações em ensaios *in vitro* (ensaios de dissolução) (ROSA, 2015).

6.3.5. Clearance total (Cl) e volume de distribuição (V_d)

Clearance ou depuração é um termo utilizado para indicar a remoção completa e irreversível do fármaco de um volume específico de fluido biológico por unidade de tempo. Assim, o Cl 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. A biotransformação hepática somada à excreção renal e outras vias de excreção de um fármaco constituem a depuração sistêmica total ou Cl total ($Cl = Cl_{renal}+Cl_{hepático}+Cl_{outros}$). Basicamente dois fatores fisiológicos interferem significativamente na capacidade de Cl: a perfusão sanguínea do órgão eliminador e a capacidade intrínseca deste órgão para efetivar a eliminação do fármaco (TOUTAIN; BOUSQUET-MELÓU, 2004a).

Nos grupos avaliados não há expectativa de ocorrência de diferenças neste parâmetro, pois todos os animais estavam, em teoria, nas mesmas condições fisiológicas e os valores encontrados de Cl para os grupos não apresentaram diferenças estatísticas entre eles. Assim, pode-se inferir que não houve diferença na capacidade de eliminação do fármaco do organismo entre os grupos.

Para interpretação dos valores encontrados para Cl, pode-se fazer a seguinte análise. A perfusão sanguínea está intimamente ligada ao débito cardíaco (DC, quantidade de sangue bombeada pelo coração em L/min), sendo este a relação entre o volume sistólico e frequência cardíaca, fatores intimamente relacionados às características anatômicas e funcionais de um organismo.

O DC pode ser o fator limitante ao Cl e em condições fisiológicas ideais de eliminação o valor numérico máximo de Cl será aproximadamente o valor do DC. O cálculo de DC pode ser realizado através da equação (TOUTAIN; BOUSQUET-MÉLOU, 2004a):

$$DC\ (mL/kg/min) = 180 \times massa\ corporal\ (kg)^{-0,19}$$

Assim, para um coelho de 3 kg, calculou-se o DC:

$$DC\ (mL/kg/min) = 180 \times massa\ corpórea^{-0,19}$$
$$DC = 180 \times 3^{-0,19}$$
$$DC = 146,1\ mL/kg/min\ ou\ 8.766\ mL/h.kg$$

A interpretação fisiológica do valor numérico de Cl deve considerar como referência o sistema biológico em questão uma vez que o fluxo sanguíneo local e a taxa de extração do fármaco naquele órgão é essencialmente uma característica anatômica e funcional de cada organismo. Considerando que 50% do DC são destinados ao tecido hepático e renal (TOUTAIN; BOUSQUET-MÉLOU, 2004a), pode-se dizer que o valor máximo de Cl plasmático para um fármaco administrado em coelho é de 4.383 mL/h.kg. No entanto, a média dos valores encontrados para os grupos foi de 546 mL/h.kg (483 – 668 mL/h.kg), assim, o valor de Cl é considerado baixo baseado no DC do modelo animal.

O volume de distribuição (V_d) de um fármaco 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; BOUSQUET-MELÓU, 2004c). Os valores encontrados para o grupo PED foram numericamente menores em relação aos demais e com diferença estatística em relação aos grupos ADU e LPK100M. Tal ocorrência justifica o menor valor de $t_{1/2}$ encontrado para o grupo PED. Essa diferença de V_d entre os grupos pode estar relacionada à maior dose administrada nos grupos ADU e LPK100M e eventual saturação da ligação proteica, proporcionando maior quantidade de fármaco na forma livre para ser distribuído fora da circulação sistêmica.

Considerando a média global de V_d deste estudo (aproximadamente 2.600 mL) e o volume sanguíneo para coelhos (aproximadamente 170 mL para coelho de 3 kg) é possível inferir que o fármaco BNZ tem alta distribuição tecidual. Em recente estudo em camundongos, foi verificada que a distribuição de BNZ se dá em ordem decrescente de concentração nos seguintes órgãos: pulmão, coração, intestino (cólon), baço, duodeno, cérebro, rins e fígado (PERIN, 2015).

6.3.6. Clerance renal (Cl_r) e fração excretada inalterada na urina (fe)

A comparação dos valores de clerance renal (Cl_r) e da fração excretada inalterada na urina (fe) dos grupos apontou diferença entre os grupos PED (12,5 mg) e IV (10 mg) com os de maiores dosagem, ADU (100 mg), LPK4M (200 mg) e LPK100M (200 mg). Como a comparação dos valores de Cl total não apontou diferença entre eles, é possível inferir que a diferença no parâmetro Cl_r e fe tem relação com uma possível saturação no sistema de biotransformação e consequente aumento da excreção renal e eliminação do fármaco na forma inalterada na urina nos grupos que receberam maior dosagem (100 e 200 mg). Sabe-se que o BNZ é majoritariamente biotransformado pelas enzimas do CYP450 hepático (PERDOMO *et al.*, 2013). Diante dos achados deste estudo, levanta-se a hipótese de que neste modelo animal (coelhos), doses semelhantes as dos grupos ADU, LPK4M e LPK100M podem gerar saturação do sistema de biotransformação do fármaco e aumentar a excreção renal do BNZ na forma inalterada. Para confirmação dessa hipótese são necessários estudos específicos com este modelo animal para identificar as enzimas responsáveis pelo processo de saturação.

Em estudos em camundongos também se observou que a partir da dose de 78 mg/kg há saturação do sistema de biotransformação e consequentes alterações nos parâmetros farmacocinéticos (WORKMAN *et al*., 1984). Em humanos, é relatado que há linearidade nos parâmetros farmacocinéticos no intervalo de dose 4 - 30 mg/kg (ROBERTS *et al*., 1984).

Diante disso, é possível afirmar que a saturação do sistema de biotransformação pelo BNZ é dependente do modelo utilizado e que em humanos

essas alterações em Cl_r e fe poderão não ocorrer na dosagem dos comprimidos avaliados devido as diferenças anatômicas e fisiológicas entre os modelos.

6.4. Avaliação da biodisponibilidade absoluta e relativa dos comprimidos de BNZ

Para avaliação da biodisponibilidade absoluta (F_{oral}) e relativa (RBA) foram utilizados os valores de área sob a curva de zero extrapolada ao infinito (ASC_0-∞) e as doses corrigidas pelo peso (µg/kg), visto que não houve fracionamento dos comprimidos para ajustar a dose para cada animal. Para aplicação na fórmula foram utilizados valores médios dos parâmetros para cada grupo. Assim, estes valores foram aplicados nas seguintes fórmulas:

$$F = \frac{\mathbf{ASC0-(COMPRIMIDO)} \times \mathbf{DOSE\ (IV)}}{\mathbf{ASC0-(IV)} \times \mathbf{DOSE\ (COMPRIMIDO)}}$$

$$RBA = \frac{\mathbf{ASC0-(TESTE)} \times \mathbf{DOSE\ (REFER\ \ NCIA)}}{\mathbf{ASC0-(REFER\ \ NCIA)} \times \mathbf{DOSE\ (TESTE)}}$$

Na tabela 23 são apresentados os valores médios de F e RBA para cada comprimido. No cálculo de RBA foi considerado o comprimido adulto de 100 mg (ADU), disponível pelo Ministério da Saúde, como referência para os cálculos.

Tabela 23 - Estudo de biodisponibilidade absoluta (F_{oral}) e relativa (RBA) de comprimidos de BNZ (média ± IC95, n = 7).

	Unidade	**ADU***	**PED**	**IV**	**LPK4M**	**LPK100M**
Dose	µg/kg	42253 (36125 – 48381)	4603 (4324 – 4882)	3073 (2962 – 3177)	62994 (58194 – 67794)	68677 (63534 – 73822)
$ASC_{0-\infty}$	µg/mL.h	86,6 (62,4 – 110,8)	3,6 (2,3 – 4,8)	6,3 (5,0 – 7,6)	153,9 (102,5 – 205,2)	111,0 (77,3 – 144,7)
F_{oral}	%	99,8	37,7	-	118,9	78,8
RBA	%	-	37,8	-	119,2	78,9

*Usado como referência no cálculo de RBA.

Os resultados apresentados no estudo de biodisponibilidade demonstram que o comprimido liberação imediata de 100 mg (ADU) disponível para o tratamento apresenta excelente biodisponibilidade oral, com valor próximo a 100%. Estes resultados coincidem aos encontrados em humanos, onde Raaflaub e Ziegler (1979) demonstraram que a absorção do fármaco se dá completamente após a administração de comprimidos de 100 mg (RAAFLAUB; ZIEGLER, 1979). Oposto aos resultados dos comprimidos adulto, os comprimidos pediátricos (12,5 mg) não apresentaram valores próximos a 100%. A F_{oral} foi de 37,7% e RBA de 37,8%, demonstrando que um pouco mais do que um terço da dose administrada chegou à circulação sistêmica do animal. Como este estudo é o primeiro a ser realizado para avaliação farmacocinética desta apresentação farmacêutica, não foi possível comparar estes resultados com a literatura. Analisando as proporções de adjuvantes dos comprimidos de liberação imediata (adulto e pediátrico - tabela 2), nota-se a maior porcentagem de amido na formulação pediátrica em comparação com a formulação de uso adulto (51,2 *vs.* 31,2). Altas concentrações de amido podem influenciar no processo de desintegração por proporcionar efeito aglutinante, resultando em baixa dissolução do fármaco e, consequentemente, baixa biodisponibilidade. É recomendável para uma rápida desintegração da matriz farmacêutica proporções de amido no intervalo de 10 a 15% (ANSEL; POPOVICH; ALLEN, 2005; BHOWMIK *et al.*, 2010; CASTRO *et al.*, 2003). Uma possível alteração na proporção de amido para a formulação pediátrica pode ser testada para verificar se há aumento na F_{oral} do BNZ. Vale ressaltar que esse comprimido já se encontra disponível para tratamento da doença em crianças, por isso, devem ser realizados estudos farmacocinéticos nos pacientes para avaliar a F_{oral}, levando em consideração que neste estudo pré-clínico o valor foi inferior aos demais comprimidos.

Para os comprimidos de liberação prolongada K4M e K100M, os valores de F_{oral} foram 118,9 e 78,8%, respectivamente, enquanto que a RBA foi de 119,2% para o comprimido LPK4M e de 78,9% para o comprimido LPK100M. Esses valores podem ser considerados bons segundo a legislação de bioequivalência, que regulamenta que a RBA deve estar no intervalo entre 80 a 125%. Apesar do comprimido LPK100M estar fora deste intervalo, o valor é próximo a 80% de RBA. Pode-se justificar esse menor valor de biodisponibilidade do comprimido

LPK100M, em relação ao LPK4M, a partir da hipótese de que este tipo de comprimido prolonga por longo tempo a liberação do fármaco e, assim, uma parte da dose administrada pode ter sido excretada via trato digestório (fezes) sem ter sido absorvida. Sabe-se que a motilidade gastro intestinal e o transito intestinal de coelhos é diferente do que em humanos (KARARLI, 1995) e, dessa forma, pode haver diferença na biodisponibilidade deste tipo de comprimido quando for administrado na clínica (humanos), pois sua permanência no trato gastro intestinal será maior e possibilitará maior tempo de liberação do fármaco.

6.5. Proposta de estudo clínico para comprimido de liberação prolongada de BNZ

Para elaboração da proposta de estudo clínico foi escolhida a formulação LPK100M, pois os parâmetros farmacocinéticos encontrados para este tipo de comprimido foram considerados mais adequados aos objetivos iniciais deste estudo, os quais admitiam a busca por uma formulação que elevasse o tempo de permanência do fármaco no organismo e possivelmente a redução da frequência de administrações mediante a liberação prolongada do fármaco.

Para condução de um estudo clínico de um novo comprimido é necessário definir se o mesmo será um estudo de bioequivalência (BE) ou um estudo de biodisponibilidade relativa (BDR). O termo BE e BDR são sinôminos, no entanto, o termo BE é usado quando se trata de estudos de medicamentos genéricos, enquanto que o BDR é usado para estudos com inovações incrementais ou medicamentos similares. Segundo a legislação vigente de BE (RDC 60/2014), os comprimidos teste e referência deverão ser equivalentes farmacêuticos e conter a mesma concentração do princípio ativo, dessa forma, o comprimido LPK100M não se enquadra nesse critério, pois o mesmo contém 200 mg, enquanto que o comprimido referência (comprimido adulto) contém 100 mg. Diante disso, o comprimido LPK100M é considerado uma inovação incremental e a nomenclatura do estudo deve ser BDR.

Para orientação na elaboração da proposta do estudo de BDR do comprimido LPK100M foi utilizado o Manual de Bioequivalência, publicado por Vieira e

Campos (2011), e as legislações da ANVISA RE 898/2003, RE 1170/2006 e RDC 60/2014.

Desenho do Estudo

Número de voluntários

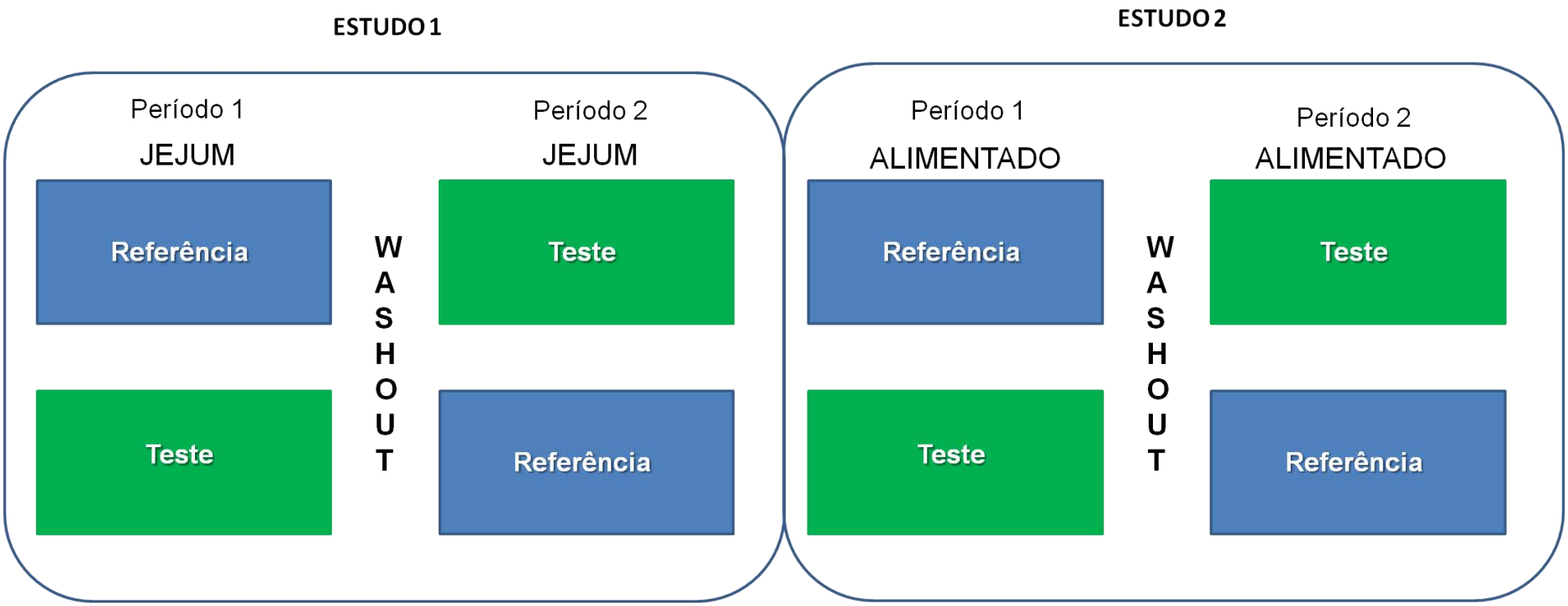
Para o cálculo do tamanho da amostra será adotado aquele estabelecido pela regulamentação da ANVISA (RE 898/2003) já citado anteriormente (tópico 5.2.3.1). O coeficiente de variação (CV) a ser considerado no cálculo será obtido de estudos pilotos (número pequeno de voluntários). A seguir é detalhada a equação para o cálculo do número de voluntários nos estudos em humanos.

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

Onde: α = nível de significância (5%); β = poder do teste (80%); e CV = coeficiente de variação.

Como se trata de uma formulação de liberação prolongada serão necessários dois estudos. No primeiro momento os voluntários estarão em jejum (estudo 1) e no segundo momento alimentados (estudo 2) (RE 1170/2006). Em ambos as formulações serão administradas em dose única. Na figura 28 foi apresentado o desenho do estudo cruzado de BDR do comprimido LPK100M.

Figura 28 – Desenho de estudo cruzado 2x2 (jejum/alimentado) de BDR do comprimido LPK100M.



Referência = comprimido de liberação imediata 100 mg (ADU)
Teste = comprimido de liberação prolongada 200 mg (LPK100M)

O *washout* é o intervalo entre a administração da formulação referência e teste ou vice-versa. É recomendado que o período de *washout* seja no mínimo sete meias-vida de eliminação ($t_{1/2}$). Assim, como a $t_{1/2}$ do BNZ em humanos é de 12 h, o *washout* será de no mínimo 4 dias entre os períodos (recomendável de 7 a 10 meias-vida).

Etapa clínica

- Administração: os comprimidos serão administrados em dose única acompanhados de 200 mL de água. Os voluntários em jejum (8 h) serão alimentados 4 h após a administração. Os voluntários no estado alimentado receberão refeição padronizada uma hora antes da administração.
- Tempos de coleta: os tempos de coleta de sangue deverão contemplar de 3 - 5 $t_{1/2}$, assim, as coletas deverão ocorrer apróximadamente por 48 h após administração. Baseado nos estudos pré-clínicos e na $t_{1/2}$ em humanos, os tempos de coleta serão 0,5; 1; 2; 4; 8; 12; 18; 24; 36 e 48 h para ambos os produtos. Após a coleta, o sangue será centrifugado e o plasma armazenado a -20°C.
- Voluntários: serão selecionados indivíduos sadios do sexo masculino e feminino de 18 a 50 anos com peso ± 15% do peso considerado normal levando em consideração altura e estrutura física. Os voluntários serão cadastrados no Sistema de Informações de Estudos de Equivalência Farmacêutica e Bioequivalência (SINEB) (RDC 34/2008) e passarão por testes prévios mediante normas do centro que promoverá a etapa clínica.
- Critérios de exclusão: fumantes, abuso em álcool e/ou drogas, uso crônico de algum medicamento.
- Ética: o protocolo do estudo será submetido à aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa local credenciado na Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP) previamente ao início do estudo.
- Centro Clínico: o estudo será conduzido na Unidade de Pesquisa Clínica da Faculdade de Medicina de Botucatu (UNESP), instituição credenciada pela ANVISA para realização de estudos clínicos.

- Material biológico: o transporte das amostras ao local das análises (FCF-UNESP/Araraquara) ocorrerá conforme os padrões de segurança a fim de se preservar as características do material.

Etapa Analítica

- Método bioanalítico: as análises das amostras poderão ser realizadas através do método bioanalítico já validado e publicado (DAVANÇO; CAMPOS; PECCININI, 2014) para quantificação de BNZ em plasma por cromatografia de ultra eficiência (CLUE). O mesmo será parcialmente validado anteriormente ao estudo, pois o método publicado foi validado em plasma de ratos e, para fins de estudos clínicos, será revalidado parcialmente em plasma de humanos.
- Amostras: todas as amostras de um voluntário serão analisadas na mesma corrida. O número de controles de qualidade (CQ´s) não será inferior a 5% do número de amostras, conforme a legislação vigente.
- Reanálise: caso haja necessidade, serão reanalizadas até 20% das amostras, conforme critérios estabelecidos na legislação.
- LIQ: as concentrações menores que o limite inferior de quantificação (LIQ) serão consideradas como zero. O valor do LIQ dependerá do $C_{máx}$, sendo no mínimo 1% e máximo de 10% do valor de $C_{máx}$.

Etapa Estatística

- Parâmetros farmacocinéticos: serão calculados os parâmetros ASC_{0-t}, $ASC_{0-\infty}$, $C_{máx}$, $t_{máx}$ e $t_{1/2}$, utilizando modelos não compartimentais. Os métodos de cálculo para estes parâmetros seguirão os descritos na tabela 4.
- Tratamento de dados: considerando um desenho de estudo adequado, a ASC_{0-t} deverá corresponder a 80% ou mais da $ASC_{0-\infty}$ para que os parâmetros obtidos através da curva de concentração plasmática *vs* tempo sejam confiáveis. Serão tabelados todos os resultados individuais dos voluntários e calculado média aritmética e geométrica, desvio padrão (DP),

coeficiente de variação (CV) e intervalo de confiança (IC90) para cada conjunto de dados. Os valores de ASC e $C_{máx}$ serão transformados em logaritmo natural (Ln) para tratamento estatístico. O parâmetro $t_{máx}$ será considerado para verificar a diferença na liberação e absorção do fármaco entre as duas formulações e entre os estados de jejum e alimentado. Na ocorrência de *outliers* (valores atípicos), os mesmos serão justificados e os resultados globais serão apresentados com e sem os valores individuais.

- Análise estatística: a comparação entre as formulações será feita através de análise de variância (ANOVA) e para interpretação dos resultados serão comparados os seguintes pares: referência-jejum *vs* teste-jejum, referência-alimentado *vs* teste-alimentado, referência-jejum *vs* referência-alimentado, teste-jejum *vs* teste-alimentado. Para fins de comparação, os valores de ASC serão corrigidos pela dose devido à diferença na quantidade do fármaco em cada comprimido.

Esta proposta servirá de suporte para elaboração do protocolo do estudo clínico que será submetido ao CEP local para aprovação. Em um segundo momento será planejado o estudo em doses múltiplas para comparação das duas formulações com relação à ocorrência de efeitos adversos.

7. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Os métodos bioanalíticos para quantificação de BNZ em plasma e urina foram validados com êxito e permitiram a realização dos estudos farmacocinéticos.

Os estudos farmacocinéticos do BNZ administrado na forma de comprimidos de liberação imediata (adulto e pediátrico), comprimidos de liberação prolongada (K4M e K100M) e na administração IV proporcionaram a interpretação de aspectos relacionados à liberação do fármaco da matriz farmacêutica e com relação à biodisponibilidade das formulações.

A biodisponibilidade dos comprimidos de liberação prolongada foi considerada adequada para o prosseguimento dos estudos com estas formulações. No entanto, a biodisponibilidade do comprimido pediátrico foi considerada baixa diante as demais formulações.

O perfil farmacocinético do BNZ na administração dos comprimidos de liberação prolongada permitiu selecionar a formulação mais vantajosa para o prosseguimento na cadeia de desenvolvimento de uma inovação incremental. O comprimido LPK100M foi considerado mais promissor e uma proposta de estudo clínico foi elaborada para que futuramente sejam realizados estudos em humanos.

Por fim, este estudo gerou resultados que poderão contribuir significativamente na terapêutica da doença de Chagas, proporcionando melhorias no uso do principal fármaco atualmente disponível para tratar a doença.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALEJANDRO-DURÁN, E. *et al*. Study on the mutagenicity of nifurtimox and eight derivatives with the L-arabinose resistance test of Salmonella typhimurium. Mutat. Res, v. 206, n. 2, p. 193-200, 1988.
- ALJIMAEE, Y. H. *et al*. Development and optimization of carvedilol orodispersible tablets: enhancement of pharmacokinetic parameters in rabbits. Drug Des Devel Ther, v. 9, p. 1379-1392, 2015.
- ALTCHEN, J. *et al*. Population Pharmacokinetic Study of Benznidazole in Pediatric Chagas Disease Suggests Efficacy despite Lower Plasma Concentrations than in Adults. PLoS Negl Trop Dis, v. 8, n. 5, p. e2907, 2014.
- AMIDON, G. L. *et al*. A theoretical basis for a biopharmaceutic drug classification: the correlation of in vitro drug product dissolution and in vivo bioavailability. Pharm Res, v. 12, p. 413-420, 1995.
- AMIN, M. L. P-glycoprotein Inhibition for Optimal Drug Delivery. Drug Target Insights, v. 7, p. 27-34, 2013.
- ANDRADE, S. G.; ANDRADE, Z. A.; FIGUEIRA, R. M. Estudo experimental sobre a resistência de uma cepa ao Bay 2502. Rev Inst Med Trop, v. 19, p. 124-129, 1977.
- ANSEL, H.C.; POPOVICH, N. G.; ALLEN, L. V. Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems. New York, Lippincott Williams & Wilkins, Eight Edition, 2005.
- ARAÚJO, L. U. *et al*. Medicamentos genéricos no Brasil: panorama histórico e legislação. Rev Panam Salud Publica, v. 28, n. 6, p.480-492, 2010.
- ARGOLO, A. M. *et al*. Doença de Chagas e seus principais vetores no Brasil. Fundação Oswaldo Cruz, Programa Integrado de Doença de Chagas e Instituto Oswaldo Cruz. Ação comemorativa do centenário de descoberta da doença de Chagas. Rio de Janeiro, 2008.
- BARRETTO, A. C. *et al*. Comparison of histologic changes in Chagas' cardiomyopathy and dilated cardiomyopathy. Arq Bras Cardiol, v. 52, n. 2, p. 79-83, 1989.

- BENET, L. Z.; GALEAZZI, R. L. Noncompartmental determination of the steady-state volume of distribution. J Pharm Sci, v. 68, p. 1071, 1979.
- BERN, C. *et al*. Trypanosoma cruzi and Chagas' disease in the United States. Clin Microbiol Rev, v. 24, n. 4, p. 655–681, 2011.
- BHOWMIK, D. *et al*. Emerging Trends of Disintegrants used in Formulation of Solid Dosage Form. Der Pharmacia Lettre, v. 2, n. 4, p. 495-504, 2010.
- BJORNSSON, T. D. Practical uses of individual pharmacokinetic parameters in drug development and clinical practice: examples and simulations. Eur J Drug Metab Pharmacokinet, v. 22, n. 1, p. 1-14, 1997.
- BOAINAIM, E.; RASSI, A. Terapêutica etiológica da doença de Chagas. Arq Bras Cardiol, v. 32, p. 395-399, 1979.
- BRASIL. Conselho Federal de Medicina Veterinária. Resolução n° 1000, de 11 de maio de 2012. Dispõe sobre procedimentos e métodos de eutanásia em animais e dá outras providências. Disponível em: www.cfmv.org.br. Acesso em: 10 jan 2013.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RE n° 1170, de 19 de abril de 2006. Determina a publicação do Guia para provas de Biodisponibilidade Relativa/Bioequivalência de medicamentos. Disponível em: www.anvisa.com.br. Acesso em: 10 abr 2015.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RE n° 898, de 29 de maio de 2003. Determina a publicação do Guia para planejamento e realização da estapa estatística de estudos de Biodisponibilidade Relativa/Bioequivalência. Disponível em: www.anvisa.com.br. Acesso em: 19 abr 2015.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC n° 27, de 27 de maio de 2012. Dispõe sobre os requisitos mínimos para a validação de métodos bioanalíticos empregados em estudos com fins de registro e pós-registro de medicamentos. Disponível em: www.anvisa.com.br. Acesso em: 11 mai 2014.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC n° 34, de 03 de junho de 2008. Institui o Sistema de Informações de Estudos de Equivalência Farmacêutica e Bioequivalência

(SINEB) e o Cadastro Nacional de Voluntários em Estudos de Bioequivalência (CNVB). Disponível em: www.anvisa.com.br. Acesso em: 10 abr 2015.

- BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RDC nº 60, de 10 de outubro de 2014. Dispõe sobre os critérios para a concessão renovação do registro de medicamentos com princípios ativos sintéticos e semissintéticos, classificados como novos, genéricos e similares, e dá outras providências. Disponível em: www.anvisa.com.br. Acesso em 10 abr 2015.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC n° 153, de 14 de junho de 2004. Determinar o Regulamento Técnico para os procedimentos hemoterápicos, incluindo a coleta, processamento, a testagem, o armazenamento, o transporte, o controle de qualidade e o uso humano de sangue, e seus componentes, obtidos do sangue venoso, do cordão umbilical, da placenta e da medula óssea. Disponível em: www.anvisa.com.br. Acesso em: 20 fev 2015.
- BRASIL, P. E. *et al*. ELISA versus PCR for diagnosis of chronic Chagas disease: systematic review and meta-analysis. BMC Infect Dis, v. 10, p. 337, 2010.
- BRENER, Z.; ANDRADE, Z. A.; BARRAL–NETO, M. Trypanosoma cruzi e Doença de Chagas. 2ª ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 2000, 431 p.
- BROCKS, D. Pharmacokinetics in preclinical drug development: an overview. In CHAO *et al*., Evaluation of drug candidates for preclinical development: pharmacokinetics, metabolism, pharmaceutics, and toxicology. New Jersey, John Wyley & Sons, 2010, p. 11-38.
- BUCKNER, F. S.; URBINA, J. A. Recent developments in sterol 14-demethylase inhibitors for Chagas disease. Int J Parasitol Drugs Drug Resist, v. 2, p. 236–242, 2012.
- BUSTAMANTE, J. M. et al. New, combined, and reduced dosing treatment protocols cure Trypanosoma cruzi infection in mice. J Infect Dis, v. 209 (1), p. 150-62, 2014.
- CANÇADO, J. R. Terapêutica Específica. Em: DIAS, J. C. P.; COURA, J. R. Clínica e terapêutica da doença de Chagas: uma abordagem prática para o clínico geral. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ, 1997. 486 p.

- CARLIER, Y. Globalization of Chagas disease (American trypanosomiasis): the situation in Europe and Belgium. Bull Mem Acad R Med Belg, v. 166, n. 10-12, p. 347-55, 2011.
- CASTRO, J. A.; DIAZ DE TORANZO, E. G. Toxic effects of nifurtimox and benznidazole, two drugs used against American trypanosomiasis (Chagas'disease). Biomed Environ Sci, v. 1, n. 1, p. 19-33, 1988.
- CASTRO, J. A.; MECCA, M. M.; BARTEL, L. C. Toxic side effects of drugs used to treat Chagas´ disease (American trypanosomiasis). Human Exp Toxicol, v. 25, n. 8, p. 471-479, 2006.
- CEVALLOS, A. M.; HERNÁNDEZ, R. Chagas' Disease: Pregnancy and Congenital Transmission. Bio Med Research International, vol. 2014, n. 401864, 10 páginas, 2014.
- CHAGAS, C. Nova tripanozomiaze humana: estudos sobre morfologia e o ciclo evolutivo de Schizotrypanum cruzi n gen., n. sp., agente etiologico de nova entidade mórbida do homem. Mem Inst Oswaldo Cruz, v. 1, n. 2, p. 159-218, 1909.
- CHATELAIN, E. Chagas disease drug discovery: toward a new era. J Biomol Screen, v. 20(1), p. 22-35, 2015.
- CHIN-HONG, P. V. *et al*. Screening and Treatment of Chagas Disease in Organ Transplant Recipients in the United States: Recommendations from the Chagas in Transplant Working Group. Am J Transplant, v. 11, n. 4, p. 672-680, 2011.
- CHOW, S. C.; WANG, H. On sample size calculation in bioequivalence trials. J Pharmacokinet Pharmacodyn, v. 28, n. 2, p. 155-169, 2001.
- COSTA, J.; FELIX, M. Triatoma juazeirensis sp. nov. from the state of Bahia, Northeastern Brazil (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae). Mem Inst Oswaldo Cruz, v. 102, n. 1, p. 87-90, 2007.
- COSTA, J.; PETERSON, A. T.; BEARD, C. B. Ecologic niche modeling and differentiation of populations of Triatoma brasiliensis Neiva, 1911, the most important Chagas disease vector in northeastern Brazil (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae). Am J Trop Med Hyg, v. 67, n.5, p. 516-520, 2002.

- COURA, J. R. Present situation and new strategies for Chagas disease chemotherapy - a proposal. Mem Inst Oswaldo Cruz, v. 104, n. 4, p. 549-554 2009.
- COURA, J. R.; BORGES-PEREIRA, J. Chagas disease. What is known and what should be improved: a systemic review. Rev Soc Med Trop, v. 45, n. 3, p. 286-296, 2012.
- COURA, J.; CASTRO, S. L. A. Review on Chagas Disease Chemotherapy. Mem Inst Oswaldo Cruz, v. 97, n. 1, p. 3-24, 2002.
- CUTLER, D. J. Theory of the mean absorption time, and adjunct to convetional bioavailability studies. J Pharm Pharmacol, v. 30, p. 476, 1978.
- DAVANÇO, M. G.; CAMPOS, M. L.; PECCININI, R. G. Rapid and sensitive ultra-high-pressure liquid chromatography method for quantification of antichagasic benznidazole in plasma: application in a preclinical pharmacokinetic study. Biomed Chromatogr, v. 29, n. 7, p. 1008-1015, 2014.
- DIAS, J. C. P. Problemas e possibilidades de participação comunitária no controle das grandes endemias no Brasil. Cadernos de Saúde Pública, v. 14, n. 2, p. 19-37, 1998.
- DIAS, J. P. *et al*. Acute Chagas disease outbreak associated with oral transmission. Rev Soc Bras Med Trop, v. 41, n. 3, p. 296-300, 2008.
- DIAS, J. C. P.; COURA, J. R., Epidemiologia. In: Clínica e Terapêutica da Doença de Chagas. Uma Abordagem Prática para o Clínico Geral, Editora Fiocru, p. 33-66, Rio de Janeiro, 1997.
- DIAS, J. C. P.; COURA, J. R.; YASUDA, M. A. S. The present situation, challenges, and perspectives regarding the production and utilization of effective drugs against human Chagas disease. Rev Soc Bras Med Trop, v. 47, n. 1, p. 123-125, 2014.
- DIAS, L. C. *et al*. Quimioterapia da doença de Chagas: estado da arte e perspectivas no desenvolvimento de novos fármacos. Quím Nova, v. 32, n. 9, p. 2444-2457, 2009.
- DIEHL, K. H. *et al*. A good practice guide to the administration of substances and removal of blood, including routes and volumes. J Appl Toxicol, v. 21, n. 1, p. 15-23, 2001.

- DINIZ, L. F. et al. Benznidazole and posaconazole in experimental Chagas disease: positive interaction in concomitant and sequential treatments. PLoS Negl Trop Dis, v. 7(8), p.e2367, 2013.
- DNDi – Drugs for Neglected Disease initiative. Proposal for the inclusion of benznidazol pediatric dosage form as treatment for Chagas disease in children younger than 2 years old in the World Health Organization model list of essential medicines for children. Rio de Janeiro, 2012. Disponível em: http://www.who.int/selection_medicines/committees/expert/19/applications/Benznidazole_6552_C_NF.pdf. Acesso em: 10 mar. 2015.
- FEARON, M. A. *et al*. A case of vertical transmission of Chagas disease contracted via blood transfusion in Canada. Can J Infect Dis Med Microbiol, v. 24, n. 1, p. 32-34, 2013.
- FERREIRA, I. L. M.; SILVA, T. P. T. Eliminação da transmissão da doença de Chagas pelo Triatoma infestans no Brasil: um fato histórico. Rev Soc Bras Med Trop, v. 39, n. 5, p. 507-509, 2006.
- FUCHS, F. D.; WANNMACHER, L. Farmacologia Clínica. Fundamentos da Terapêutica Racional. 2ª ed., Rio de Janeiro: Guarnabara Koogan, 1998.
- FUNASA – Fundação Nacional da Saúde, Ministério da Saúde, 2013. Disponível em: http://www.brasil.gov.br/saude/2013/09/iniciativa-vai-selecionar-propostas-de-melhorias-habitacionais-para-controlar-doenca-de-chagas. Acesso em: 20 mai. 2015.
- GALVÃO, C. *et al*. A checklist of the current valid species of subfamily Triatominae Jeannel, 1919 (Hemiptera, Reduviidae) and their geographical distribuition, with nomenclatural and taxonomic notes. Zootaxa, v. 202, p. 1-36, 2003.
- GAO, P. *et al*. Swelling of hydroxypropyl methylcellulose matrix tablets. 2. Mechanistic study of the influence of formulation variables on matrix performance and drug release. J Pharm Sci, v. 85, n. 7, p. 732-740, 1996.
- GARCIA, S. *et al*. Treatment with Benznidazole during the Chronic Phase of Experimental Chagas' Disease Decreases Cardiac Alterations. Antimicrob Agents Chemother, v. 49, n. 4, p. 1521-1528, 2005.

- GIAROLLA, J.; FERREIRA, E. I. Drug design for neglected disease in Brazil. Mini Rev Med Chem, v. 15, n. 3, p. 220-242, 2015.
- GIBALDI, M. Biopharmaceutics and clinical pharmacokinetics. 4ª ed., Pennsylvania: Lea & Febiger, 1991.
- GONÇALVES, R. G. *et al*. Guia de triatomíneos da Bahia. Feira de Santana: UEFS Editora, 2012. 112 p.
- HERWALDT, B. L. Laboratory-acquired parasitic infections from accidental exposures. Clin Microbiol Rev, v. 14, n. 4, p. 659–688, 2001.
- HIGUCHI, M. L. *et al*. Pathophysiology of the heart in Chagas' disease: current status and new developments. Cardiovasc Res, v. 15, n. 60(1), p. 96-107, 2003.
- HOSNY, K. M. *et al*. Solid lipid nanoparticles loaded with iron to overcome barriers for treatment of iron deficiency anemia. Drug Des Devel and Ther, v. 9, p. 313-320, 2015.
- HOTEZ, P. J. *et al*. An Unfolding Tragedy of Chagas Disease in North America. PLoS Negl Trop Dis, v. 7, n. 10, p. e2300, 2013.
- HUANG, Y. T. *et al*. Formulation design of an HPMC-based sustained release tablet for pyridostigmine bromide as a highly hygroscopic model drug and its in vivo/in vitro dissolution properties. Drug Dev Ind Pharm, v. 33, n. 11, p. 1183-1191, 2007.
- HUGHES, J. P. *et al*. Principles of Early Drug Discovery. Br J Pharmacol, v. 162, n. 6, p. 1239-1249, 2011.
- ISHA, C.; NIMRATA, S.; RANA, A. C.; SURBHI, G. Oral sustained release drug delivery system: an overview. Int Res J Pharm, v. 3, n. 5, p. 57-62, 2012.
- JACKSON, Y.; PINTO, A.; PETT, S. Chagas disease in Australia and New Zealand: risks and needs for public health interventions. Trop Med Int Health, v. 19, n. 2, p. 212-218, 2014.
- KARARLI, T. T. Comparison of the gastrointestinal anatomy, physiology, and biochemistry of humans and commonly used laboratory animals. Biopharm Drug Disp, v. 16, p. 351-380, 1995.
- KHANNA, I. Drug discovery in pharmaceutical industry: productivity challenges and trends. Drug Discov Today, v. 17, n. 19-20, p. 1088-1102, 2012.

- LARA, P. F. Modelos farmacocinéticos. In: DeLUCIA, R.; OLIVEIRA-FILHO, R. M. Farmacologia integrada. 2ª ed., Rio de Janeiro: Revinter, p. 81-90, 2004.
- LEONARDI, D.; BOMBARDIERE, M. E.; SALOMON, C. J. Effects of benznidazole: cyclodextrin complexes on the drug bioavailability upon oral administration to rats. Int J Biol Macromol, v. 62, p. 543-548, 2013.
- LIMA, A. A. N. et al . Development of dissolution method for benznidazole tablets. Quím. Nova, v. 32, n. 8, p. 2196-2199, 2009
- LOPES, C. M.; LOBO, J. M. S.; COSTA, P. Formas farmacêuticas de liberação modificada: polímeros hidrifílicos. Rev Bras Cienc Farm, v. 41, n. 2, p. 143-154, 2005.
- MACÊDO, V. O. Diagnóstico Clínico da Doença de Chagas. Rev Pat Trop, v. 29, p. 141- 144, 2000.
- MALAFAIA, G.; RODRIGUES, A. S. L. Centenário do descobrimento da doença de Chagas: desafios e perspectivas. Rev Soc Bras Med Trop, v. 43, n. 5, p. 483-485, 2010.
- MARCONDES, C. B. Entomologia Médica e Veterinária. São Paulo: Atheneu, 1999. 433 p.
- MARTINEZ, M. N.; AMIDON, G. L. A mechanistic approach to understanding the factors affecting drug absorption: a review of fundamentals. J Clin Pharmacol, v. 42, n. 6, p. 620-643, 2002.
- MAXIMIANO, F. P. et al. Development of effervescent tablets containing benzonidazole complexed with cyclodextrin. J Pharm Pharmacol, v. 63(6), p. 786-793, 2011.
- MAZZA, S.; COSSIO, R.; ZUCARDI, E. - Primer caso agudo de enfermedad de Chagas comprobado en Tucuman y en tratamiento con Bayer 7602. Mis Estudios Patolog Reg, v 32, p.3-18, 1937.
- MEDEIROS, F. P. M. Potenciais formulações com o benznidazol para tratamento de crianças com a doença de Chagas. 2010. 186 f. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas). Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2010.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE. Consenso Brasileiro em Doença de Chagas. Revista da Sociedade Brasileira de Medicinal Tropical. v. 38, n. 3, 2005.

- MINISTÉRIO DA SAÚDE. Doença de Chagas: situação epidemiológica atual. Secretaria de Vigilância em Saúde, Brasília, 2010. Disponível em: http://www.fiocruz.br/pidc/media/Doenca%20de%20Chagas%202010.pdf. Acesso em: 20 mai. 2015.
- MORAGA, A. A.; GRAF, U. Genotoxicity testing of antiparasitic nitrofurans in the Drosophila wing somatic mutation and recombination test. Mutagenesis, v. 4, n. 2, p. 105-110, 1989.
- MOREIRA DA SILVA, R. *et al*. Preclinical monitoring of drug association in experimental chemotherapy of Chagas' disease by a new HPLC-UV method. Antimicrob Agents Chemother, v. 56, n. 6, p. 3344-3348, 2012.
- MORENO, J.; DOMÉNECH, J. Administración extravasal. Modelo bicompartimental. In: DOMÉNECH BERROZPE, J. D.; MARTÍNEZ LANAO, J. M. PLÁ DELFINA, J. M. Biofarmacia y Farmacocinética. Volumen I: Farmacocinética. Madrid: Editorial Síntesis S.A, p. 167-200, 2001.
- MORILLA, M. J.; PRIETO, M. J.; ROMERO, E. L. Benznidazole vs benznidazole in multilamellar liposomes: how different they interact with blood components? Mem Inst Oswaldo Cruz, v. 100, n. 2, p. 213-219, 2005.
- MORILLA, M. J. et al. Development and in vitro characterisation of a benznidazole liposomal formulation. Int J Pharm, v. 249(1-2), p. 89-99, 2002.
- MORILLA, M. J. *et al*. Liposomal beznidazole: A high-performance liquid chromatographic determination for biodistribution studies. J Chromatographic Science, v. 41, p. 1-5, 2003.
- MORILLA, M. J. *et al*. Intravenous liposomal benznidazole as trypanocidal agent: increasing drug delivery to liver is not enough. Int J Pharm, v. 278, n. 2, p. 311-318, 2004.
- NEERVANAN, S. Preclinical formulations for discovery and toxicology: physicochemical challenges. Expert Opin Drug Metab Toxicol, v. 2, n. 5, p. 715-731, 2006.
- NELSON, D. R.; KAMATAKI, T.; WEXMAN, D. J. The P-450 superfamily: update on new sequences, gene maping, accession numbers, early trivial names of enzymes, and nomenclature. DNA Cell, v. 12, n. 1, p. 1-51, 1993.

- OGA, S. Fundamentos de Toxicologia. 2ª ed., São Paulo: Atheneu, 2003.
- NÓBREGA, A. A. *et al*. Oral transmission of Chagas disease by consumption of açaí palm fruit, Brazil. Emerg Infect Dis, v. 15, n. 4, p. 653-655, 2009.
- PACKCHANIAN, A. Chemotherapy of experimental Chagas disease with nitrofuran compounds. Antibiotics & Chemotherapy, v. 7, p. 13-23, 1957.
- PERDOMO, V. G. *et al*. Modulation of Biotransformation Systems and ABC Transporters by Benznidazole in Rats. Antimicrob Agents and Chemother, v. 57, n. 10, p. 4894-4902, 2013.
- PERIN, L. H. M. Desenvolvimento e validação de um método bioanalítico para estudos de farmacocinética e biodistribuição do fármaco anti-chagásico benznidazol em modelo murino. 67f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Universidade Federal de Ouro Preto. Ouro Preto. 2015.
- PÉREZ-MOLINA, J. A. *et al*. Use of benznidazole to treat chronic Chagas' disease: a systematic review with a meta-analysis. Antimicrob Chemother, v. 64, n. 6, p. 1139-1147, 2009.
- PETROVA, E. Innovation in the Pharmaceutical Industry: The Process of Drug Discovery and Development. In DING, M. *et al*. (eds.), Innovation and Marketing in the Pharmaceutical Industry, International Series in Quantitative Marketing, Springer, 2014, p. 19-81.
- PEZZINI, B. R.; SILVA, M. A. S.; FERRAZ, H. G. Formas farmacêuticas sólidas orais de liberação prolongada: sistemas monolíticos e multiparticulados. Rev Bras Cien Farm, v. 43, n.4, p. 491-502, 2007.
- PINAZO, M. J. *et al*. Benznidazole-related adverse drug reactions and their relationship to serum drug concentrations in patients with chronic chagas disease. Antimicrob Agents Chemother, v. 57, n. 1, p. 390-395, 2013.
- PRATA, A. *et al*. Tratamento da doença de Chagas pelo nifurtimox (Bayer 2502). Rev Soc Bras Med Trop, v. 9, p. 297-307, 1975.
- RAAFLAUB, J. Multiple-dose kinetics of the trypanosomide benznidazole in man. Arzneimittelforschung, v. 30, n. 12, p. 2192-2194, 1980.
- RAAFLAUB, J.; ZIEGLER, W. H. Single-dose pharmacokinetics of the trypanosomide benznidazole in man. Arzneimittelforschung, v. 29, p. 1611-1614, 1979.

- RAJÃO, M. A. *et al*. Unveiling Benznidazole's mechanism of action through overexpression of DNA repair proteins in Trypanosoma cruzi. Environ Mol Mutagen, v. 55, n. 4, p. 309–321, 2014.
- RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M. Absorção, distribuição e destino de fármacos. In RANG *et al*., Farmacologia. 3ª ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koonan, p. 51-75, 1997.
- RASSI, A.; LUQUETTI, A. O. Therapy of Chagas disease. In: S Wendel, Z Brener, ME Camargo, A Rassi (eds), Chagas disease (American trypanosomiasis): its impact on transfusion and clinical medicine, ISBT, São Paulo, p. 237-247, 1992.
- RASSI JR, A.; RASSI, A.; MARIN-NETO, J. A. Chagas heart disease: pathophysiologic mechanisms, prognostic factors and risk stratification. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, v. 104, n. 1, p. 152-158, 2009.
- RASSI, A.; FERREIRA, H. O. Tentativa de tratamento específico da fase aguda da doença de Chagas com nitrofuranos em esquema de duração prolongada. Rev Soc Bras Med Trop, v. 5, n. 5, p. 235-262, 1971.
- REY, L. Parasitologia: parasitos e doenças parasitárias do homem nos trópicos ocidentais. – 4ed. – [Reimp.] – Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 2013.
- REZENDE, J. M.; MOREIRA, H. Forma digestiva da doença de Chagas. In Brener Z, Andrade Z & Barral-Netto (orgs.) Trypanosoma cruzi e doença de Chagas, Segunda Edição, Guanabara Koogan Editora, Rio de Janeiro, 2000. p. 297-343.
- RIEGELMAN, S.; COOLIER, P. The application of statistical moment theory to the evaluation of in vivo dissolution time and absorption time. J Pharmacokinet Biopharm, v. 8, p. 509, 1980.
- RIBEIRO, A. L. P.; ROCHA, M. O. C. Forma indeterminada da doença de Chagas: considerações acerca do diagnóstico e do prognóstico. Rev. Soc. Bras. Med. Trop., v. 31, n. 3, p. 301-314, 1998.
- RIBEIRO, A. L. *et al*. Diagnosis and management of Chagas disease and cardiomyopathy. Nat Rev Cardiol, v. 9, n. 10, p. 576-589, 2012.
- ROBERTS, J. T. *et al*. A phase I study of the combination of benznidazole and CCNU in man. Int J Radiat Oncol Biol Phys, v. 10, n. 9, p. 1745-1748, 1984.

- ROMANHA, A. J. *et al*. Experimental Chemotherapy against Trypanosoma cruzi Infection: Essential Role of Endogenous Interferon-g in Mediating Parasitologic Cure. J Infect Dis, v. 186, n. 6, p. 823-828, 2002.
- ROSA, T. A. Desenvolvimento farmacotécnico e estudos de dissolução de diferentes comprimidos de benznidazol para o tratamento da doença de Chagas. 2015. 89 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2015.
- SALOMON, C. J. First century of Chagas' disease: an overview on novel approaches to nifurtimox and benzonidazole delivery systems. J Pharm Sci, v. 101(3), p. 888-894, 2012.
- SANTOS, E. *et al*. Reactivation of Chagas' disease leading to the diagnosis of acquired immunodeficiency syndrome. Braz J Infect Dis, v. 6, n. 6, p. 317-321, 2002.
- SANTOS, F. L. A. Desenvolvimento de comprimido de liberação prolongada de benznidazol. 2011. 122 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2011.
- SCHELLACK, G. Farmacologia. Uma abordagem didática. São Paulo: Fundamento Educacional, 2005.
- SCHENONE, H. *et al*. Experiência terapêutica com Bay 2502 en la infección chagásica crônica del adulto. Importância del uso adequado del xenodiagnóstico. Bol Chil Parasitol, v. 24, p. 66-69, 1969.
- SCHOENWALD, R. D. Pharmacokinetics in drug Discovery and development. Florida: CRC Press, 2002.
- SCHOFIEL, C. J. The behaviour of Triatominae (Hemiptera: Reduviidae): a review. Bulletin of Entomological Research, v. 69, p. 363-379, 1979.
- SCOTT, D. A. *et al*. In situ compositional analysis of acidocalcisomes in Trypanosoma cruzi. J Biol Chem, v. 272, n. 44, p. 28020-28029, 1997.
- SHARGEL, L.; KANFER, I. Generic drug product development. Solid oral dosage forms. New York: Marcel Dekker, 2005.
- SHARGEL, L.; WU-PONG, S.; YU, A. B. C. Applied biopharmaceutics & pharmacokinetics. 5ª ed., New Baskerville: McGraw Hill, 2005.

- SHARMA, P. R.; LEWIS, S. A. Design and in vitro/in vivo evaluation of extended release matrix tablets of nateglinide. J Young Pharm, v. 5, n. 4, p. 167-172, 2013.
- SHIKANAI-YASUDA, M. A.; CARVALHO, M. A. Oral Transmission of Chagas Disease, Clin Infect Dis, v. 54, n. 6, p. 845-852, 2012.
- SINGH, B. *et al*. Formulation development of gastroretentive tablets of lamivudine using the floating-bioadhesive potential of optimized polymer blends. J Pharm Pharmacol, v. 64, n. 5, p. 654-669, 2012.
- SINGH, S. S. Preclinical Pharmacokinetics: An Approach Towards Safer and Efficacious Drugs. Curr Drug Metab, v. 7, n. 2, p.165-182, 2006.
- SOARES-SOBRINHO, J. L. *et al*. Delineamento de alternativas terapêuticas para o tratamento da doença de Chagas. Rev Patol Trop, v. 36, n.2, p. 103-118, 2007.
- SOUTO-PADRÓN, T. An electron microscopic and cytochemical study of Leptomonas samueli. Z Parasitenkd, v. 62, p. 127-143, 1980.
- SOY, D. *et al*. Population pharmacokinetics of benznidazole in adult patients with chagas disease. Antimicrob Agents Chemother, v. 59, n. 6, p. 3342-3349, 2015.
- STORPIRTIS, S. *et al*. Biofarmacotécnica. Rio de Janeiro: Guanabara Koonan, 2009.
- STORPIRTIS, S. *et al*. Farmacocinética Básica e Aplicada. Rio de Janeiro: Guanabara Koonan, 2011.
- STRECK, E. L.; COSTA, T. D. Isoformas do citocromo P450 e outros fatores que alteram a biotransformação de fármacos. Pharmacia Brasileira, v. 11, p. 36-40, 1999.
- TELLERIA, J. *et al*. Trypanosoma cruzi: sequence analysis of the variable region of kinetoplast minicircles. Exp Parasitol, v. 114, n. 4, p. 279-288, 2006.
- TOUTAIN, P. L.; BOUESQUET-MÉLOU, A. Plasma Clearance. J Vet Pharmacol Ther, v. 27, n. 6, p. 415-425, 2004a.
- TOUTAIN, P. L.; BOUESQUET-MÉLOU, A. Plasma terminal half-life. J Vet Pharmacol Ther, v. 27, n. 6, p. 427-439, 2004b.
- TOUTAIN, P. L.; BOUESQUET-MÉLOU, A. Volumes of distribution. J Vet Pharmacol Ther, v. 27, n. 6, p. 441-453, 2004c.
- TOUTAIN, P. L.; BOUESQUET-MÉLOU, A. Bioavailability and its assessment. J Vet Pharmacol Ther, v. 27, n. 6, p. 455-466, 2004d.

- TOZER, T. N.; ROWLAND, M. Introdução à farmacocinética e à farmacodinâmica: as bases quantitativas da terapia farmacológica. Porto Alegre: Artmed, 2009.
- TYLER, K. M.; ENGMAN, D. M. The life cycle of Trypanosoma cruzi revisited. Int J for Parasitol, v. 31, p. 472-481, 2001.
- URBINA, J. A. Chemotherapy of Chagas disease. Curr Pharm Des, v. 8, n. 4, p. 287–295, 2002.
- URBINA, J. A. Recent clinical trials for the etiological treatment of chronic chagas disease: advances, challenges and perspectives. J Eukaryot Microbiol, v. 62(1), p. 149-156, 2015.
- VAN DE GRAFF, K. M. Anatomia humana. 6ª ed., São Paulo: Manole, 2003.
- VIDYADHARA, R. L.; SASIDHAR, R. L. C.; NAGARAJU, R. Design and development of polyethylene oxide based matrix tablets for verapamil hydrochloride. Indian J Pharm Sci, v. 75, n. 2, p. 185-190, 2013.
- VIEIRA, N. R.; CAMPOS, D. R. Manuel de Bioequivalência. São Paulo: Dendrix (Série Pesquisa Clínica), 2011, 208 p.
- VIOTTI, R. Treatment of chronic Chagas' disease with benznidazole: clinical and serologic evolution of patients with long-term follow-up. Am Heart J, v. 127, n. 1, p. 151-162, 1994.
- WATERBEEND, H.; GIFFORD, E. ADMET in silico modeling: towards prediction paradise? Nat Rev Drug Discov, v. 2, n. 3, p. 192-204, 2003.
- WHO – World Health Organization. Weekly epidemiological Record. v. 90, n. 6, p. 33-44, 2015. Disponível em: http://www.who.int/wer/2015/wer9006.pdf?ua=1. Acesso em: 20 mai. 2015.
- WILKINSON, R. *et al*. Trypanocidal Activity of Nitroaromatic Prodrugs: Current Treatments and Future Perspectives. Curr Top Med Chem, v. 11, n. 16, p. 2072-2084, 2011.
- WORKMAN, P. *et al*. Preclinical pharmacokinetics of benznidazole. Br J Cancer, v. 50, n. 3, p. 291-303, 1984.
- YAMAOKA, K.; NAKAGAWA, T.; UNO, T. Statistical moments in pharmacokinetics. J. Pharmacokinet Biopharm, v. 6, p. 547, 1978.

- ZINGALES, B. *et al*. A new consensus for Trypanosoma cruzi intraspecific nomenclature: second revision meeting recommendes TcI to TcVI. Mem Inst Osw Cruz, v. 10, n. 7, p. 1051-1054, 2009.

APÊNDICES

APÊNDICE I – RESULTADOS INDIVIDUAIS DO GRUPO ADU.

COMPRIMIDOS DE LIBERAÇÃO IMEDIATA (100 mg) - GRUPO ADU													
	C1	**C2**	**C3**	**C4**	**C5**	**C6**	**C7**	**MEDIA**	**DP**	**CV%**	**Mediana**	**IC -**	**IC +**
ASC_{0-T} (ug/mL.h)	123,862	103,136	100,9394	62,22494	46,70492	88,44428	65,99779	**84,47276**	27,23188	32,23747	88,44428	59,287	109,66
ASC_{0-INF} (ug/mL.h)	124,5424	104,1238	102,0607	70,63863	47,73967	89,61221	67,5317	**86,60703**	26,21486	30,26874	89,61221	62,361	110,85
$ASMC_{0-T}$ (ug/mL.h^2)	1266,921	805,1572	895,3251	653,1817	338,41	869,7091	567,7543	**770,9227**	292,8677	37,98924	805,1572	500,06	1041,8
$ASMC_{0-INF}$ (ug/mL.h^2)	1285,332	833,4914	927,8973	942,9358	361,6445	905,1127	614,6863	**838,7285**	288,8203	34,43549	905,1127	571,6	1105,9
k_{el} (h^{-1})	0,327	0,2136	0,1981	0,0958	0,2245	0,1584	0,1516	**0,195571**	0,072699	37,17286	0,1981	0,1283	0,2628
relação das áreas	0,994537	0,990512	0,989013	0,880891	0,978325	0,986967	0,977286	**0,971076**	0,040263	4,146272	0,986967	0,9338	1,008
MRT (h)	10,32043	8,004809	9,091619	13,34873	7,575346	10,10033	9,102189	**9,649064**	1,91292	19,82493	9,102189	7,88	11,418
k_a (h^{-1})	0,3492	0,4218	0,3387	0,3675	0,286	0,2725	0,3976	**0,347614**	0,054647	15,72068	0,3492	0,2971	0,3982
$t_{1/2abs}$ (h)	1,984536	1,642959	2,046058	1,885714	2,423077	2,543119	1,742958	**2,038346**	0,334826	16,42636	1,984536	1,729	2,348
Cl (mL/h.kg)	368,8283	396,2025	421,2419	665,2519	616,8122	553,8062	585,291	**515,3477**	118,0797	22,91262	553,8062	406,14	624,56
Vd (mL/kg)	1127,915	1854,881	2126,411	6944,174	2747,493	3496,251	3860,758	**3165,412**	1914,64	60,48627	2747,493	1394,6	4936,2
$t_{1/2}$ (h)	2,119266	3,244382	3,498233	7,23382	3,08686	4,375	4,57124	**4,0184**	1,638896	40,78479	3,498233	2,503	5,534
t_{max} (h)	12	6	6	6	4	4	4	**6**	2,828427	47,14045	6	3,384	8,616
C_{max} (h)	11,2529	11,65	8,43	4,94	5,98099	8,2906	8,1838	**8,389756**	2,469265	29,43191	8,2906	6,106	10,674
MAT (h)	2,863688	2,370792	2,952465	2,721088	3,496503	3,669725	2,515091	**2,941336**	0,483154	16,42636	2,863688	2,494	3,388
DOSE (ug/kg)	45934,77	41254,13	42992,26	46992,48	29446,41	49627,79	39525,69	**42253,36**	6625,669	15,68081	42992,26	36125	48381
Cl_{renal} (mL/h.kg)	0,277875	8,830185	13,86032	12,69056	11,04347	9,710703	12,80419	**9,888187**	4,600324	46,52343	11,04347	5,633	14,143
Fe_u	0,074928	2,20756	3,254196	1,680417	1,751604	1,730595	2,137972	**1,833896**	0,947304	51,65525	1,751604	0,9578	2,71

APÊNDICE II – RESULTADOS INDIVIDUAIS DO GRUPO PED.

COMPRIMIDOS DE LIBERAÇÃO IMEDIATA (12,5 mg) - GRUPO PED													
	C1	**C2**	**C3**	**C4**	**C5**	**C6**	**C7**	**MEDIA**	**DP**	**CV%**	**Mediana**	**IC -**	**IC +**
ASC_{0-T} (ug/mL.h)	3,617931	1,47123	2,529963	3,053857	2,135993	5,362682	2,71268	**2,983477**	1,248481	41,84651	2,713	1,829	4,138
ASC_{0-INF} (ug/mL.h)	3,915756	1,777353	3,429297	3,900102	2,704757	6,092783	3,148794	**3,566977**	1,338676	37,52972	3,429	2,329	4,805
$ASMC_{0-T}$ (ug/mL.h^2)	7,935362	4,039034	6,259213	7,340296	5,360033	15,31426	6,868353	**7,588078**	3,64508	48,03693	6,868	4,217	10,959
$ASMC_{0-INF}$ (ug/mL.h^2)	9,949291	6,076978	13,29207	13,91633	9,749407	21,38923	10,69579	**12,15273**	4,81992	39,66122	10,696	7,695	16,611
k_{el} (h^{-1})	0,5675	0,6034	0,3546	0,3609	0,368	0,4309	0,3602	**0,435071**	0,106435	24,46382	0,368	0,3366	0,5335
relação das áreas	0,923942	0,827765	0,73775	0,78302	0,789717	0,88017	0,861498	**0,829123**	0,064127	7,734327	0,8278	0,7698	0,8884
MRT (h)	2,540835	3,419118	3,876034	3,568198	3,604541	3,510584	3,39679	**3,416586**	0,417448	12,21829	3,511	3,03	3,803
k_a (h^{-1})	1,2258	0,9905	1,1426	0,9737	1,0362	0,876	1,7859	**1,147243**	0,304046	26,50234	1,036	0,866	1,428
$t_{1/2abs}$ (h)	0,565345	0,699647	0,606511	0,711718	0,66879	0,791096	0,38804	**0,633021**	0,130511	20,61709	0,6688	0,5123	0,7537
Cl (mL/kg.h)	450,2645	1010,884	541,6649	388,4856	667,8333	273,8258	557,4373	**555,7707**	237,5206	42,73716	541,66	336,09	775,45
Vd (mL/kg)	793,4177	1675,312	1527,538	1076,436	1814,764	635,4741	1547,577	**1295,788**	459,5264	35,46307	1527,5	870,78	1720,8
$t_{1/2}$ (h)	1,221145	1,148492	1,954315	1,9202	1,883152	1,608262	1,923931	**1,665642**	0,34892	20,94805	1,883	1,343	1,988
t_{max} (h)	2	3,5	2	2	2	3	1,5	**2,285714**	0,698638	30,56542	2	1,64	2,932
C_{max} (h)	1,06946	0,478433	0,8094	0,903051	0,697649	1,21075	0,759813	**0,846937**	0,242249	28,60293	0,8094	0,6229	1,071
MAT (h)	0,815794	1,009591	0,875197	1,02701	0,965065	1,141553	0,559942	**0,91345**	0,188327	20,61709	0,9651	0,7393	1,088
Dose (ug/kg)	4671,151	4760,091	4921,26	4014,13	4785,605	4420,085	4650,298	**4603,231**	301,7778	6,555781	4671,2	4324,1	4882,3
Cl_{renal} (mL/h.kg)	1,532616	0,41402	0,085826	0,393244	0,671434	0,087909	0,07423	**0,465611**	0,52103	111,9025	0,3932	0	0,9475
Fe_u	0,314493	0,033902	0,01169	0,079261	0,079397	0,028257	0,011472	**0,079782**	0,107356	134,5625	0,0339	0	0,1791

APÊNDICE III – RESULTADOS INDIVIDUAIS DO GRUPO IV.

Administração intravenosa de BNZ (10 mg) - GRUPO IV													
	C1	**C2**	**C3**	**C4**	**C5**	**C6**	**C7**	**MEDIA**	**DP**	**CV%**	**Mediana**	**IC (-)**	**IC (+)**
ASC_{0-T} (ug/mL.h)	5,532533	3,672008	3,47704	6,753489	6,466553	5,335857	6,57743	**5,40213**	1,535373	28,42162	5,533	4,146	6,658
ASC_{0-INF} (ug/mL.h)	6,344849	4,422146	4,317	7,244501	6,919947	7,359694	7,554844	**6,308997**	1,389528	22,02455	6,92	5,032	7,586
$ASMC_{0-T}$ (ug/mL.h^2)	11,07055	8,444455	9,342015	10,1738	10,83839	7,782814	10,64822	**9,757178**	1,087248	11,14306	10,174	8,58	10,93
$ASMC_{0-INF}$ (ug/mL.h^2)	21,56866	18,40825	20,50358	14,29737	14,58827	32,82822	17,02298	**19,88819**	3,33313	16,75934	18,408	14,034	25,742
alfa (h^{-1})	0,8923	0,6356	1,5533	1,967	0,9927	0,9927	2,5219	**1,365071**	0,540596	39,60202	0,9927	0,7368	1,993
beta (h^{-1})	0,2031	0,1893	0,1891	0,417	0,4404	0,1194	0,3965	**0,279257**	0,129032	46,20558	0,2031	0,1562	0,4023
relação de áreas	0,871972	0,830368	0,80543	0,932223	0,93448	0,725011	0,870624	**0,852873**	0,058424	6,850269	0,8706	0,7846	0,9212
MRT (h)	3,399398	4,162742	4,749497	1,973547	2,108147	4,460541	2,253253	**3,301018**	1,228104	37,20381	3,399	2,202	4,4
Cl (mL/h.kg)	462,194	681,9498	718,0482	448,7507	434,2241	432,9994	399,8955	**511,1517**	138,7549	27,14554	448,75	390,17	632,14
Vd (mL/kg)	2275,697	3602,482	3797,188	1076,141	985,9766	3626,461	1008,564	**2338,93**	1337,145	57,16911	2275,7	1110,8	3567,1
$t_{1/2\ beta}$ (h)	3,412112	3,660856	3,664728	1,661871	1,573569	5,80402	1,747793	**3,074993**	1,07968	35,11162	3,412	1,649	4,501
Dose (ug/kg)	2932,551	3015,682	3099,814	3250,975	3004,808	3186,743	3021,148	**3073,103**	121,7654	3,962295	3021,1	2962,2	3177
Cl_{renal} (mL/h.kg)	3,00465	0,359988	0,722182	0,203441	0,603361	3,115824	0,561982	**1,22449**	1,150542	93,96092	0,6034	0,05381	2,395
Fe_u	0,566855	0,043833	0,081007	0,042262	0,129848	0,521711	0,122351	**0,21541**	0,223172	103,6036	0,1224	0,004911	0,4259

APÊNDICE IV – RESULTADOS INDIVIDUAIS DO GRUPO LPK4M.

COMPRIMIDOS DE LIBERAÇÃO PROLONGADA (200 mg) - GRUPO LPK4M													
	C1	**C2**	**C3**	**C4**	**C5**	**C6**	**C7**	**MEDIA**	**DP**	**CV%**	**Mediana**	**IC -**	**IC +**
ASC_{0-T} (ug/mL.h)	193,4062	166,5814	145,783	55,604	147,8711	233,8196	126,3218	**152,7696**	55,71453	36,46965	147,87	101,24	204,3
ASC_{0-INF} (ug/mL.h)	194,6552	167,1125	148,2726	56,9804	148,8759	234,4203	126,8738	**153,8844**	55,52747	36,08389	148,88	102,53	205,24
$ASMC_{0-T}$ (ug/mL.h^2)	2271,19	2959,306	1427,546	545,3146	1689,792	2061,249	2334,69	**1898,441**	772,164	40,67358	2061,2	1184,3	2612,6
$ASMC_{0-INF}$ (ug/mL.h^2)	2324,995	2980,049	1521,563	598,3107	1726,366	2077,843	2356,362	**1940,784**	757,533	39,03231	2077,8	1240,2	2641,4
kel (h^{-1})	0,1413	0,3271	0,1288	0,1176	0,1563	0,2756	0,3068	**0,207643**	0,091362	43,99941	0,1563	0,1231	0,2921
relação de áreas	0,993583	0,996822	0,983209	0,975844	0,99325	0,997438	0,995649	**0,990828**	0,008153	0,82289	0,9936	0,9833	0,9984
MRT (h)	11,94417	17,83259	10,26193	10,50029	11,59601	8,863754	18,57249	**12,79589**	3,830906	29,93857	11,596	9,253	16,339
ka (h-1)	0,2129	0,3277	0,3246	0,4875	0,2567	0,3758	0,3086	**0,327686**	0,087981	26,84925	0,3246	0,2463	0,4091
$t_{1/2\ abs}$ (h)	3,255049	2,114739	2,134935	1,421538	2,699649	1,844066	2,245625	**2,245086**	0,590879	26,31875	2,135	1,699	2,792
Cl (mL/h.kg)	314,3996	419,0471	453,2484	1025,111	393,4976	246,2958	534,3625	**483,7088**	256,2419	52,97441	419,05	246,72	720,7
Vd (mL/kg)	2225,05	1281,098	3519,009	8716,928	2517,579	893,6712	1741,729	**2985,009**	2669,545	89,43173	2225	516	5454
$t_{1/2}$ (h)	4,904459	2,118618	5,380435	5,892857	4,433781	2,514514	2,258801	**3,929066**	1,593609	40,55949	4,434	2,455	5,406
$t_{máx}$ (h)	6	24	4	4	8	8	24	**11,14286**	8,933618	80,17349	8	2,88	19,405
$C_{máx}$ (ug/mL)	15,02699	8,797649	11,17364	6,685863	7,931914	15,50323	6,722829	**10,26316**	3,739316	36,43435	8,798	6,805	13,722
MAT (h)	4,697041	3,051572	3,080715	2,051282	3,895598	2,66099	3,240441	**3,239663**	0,852639	26,31875	3,081	2,451	4,028
Cl_{renal} (mL/h.kg)	8,593486	0,007317	13,9969	26,42364	1,90684	0,52935	6,546227	**8,286251**	9,434913	113,8623	6,546	-0,4399	17,012
Fe_u	2,715762	0,001741	3,036279	2,515373	0,481317	0,214374	1,219723	**1,454938**	1,282503	88,14828	1,22	0,2688	2,641
DOSE (ug/kg)	61199,51	70028,01	67204,3	58411,21	58582,31	57736,72	67796,61	**62994,1**	5189,623	8,238269	61200	58194	67794

APÊNDICE V – RESULTADOS INDIVIDUAIS DO GRUPO LPK100M.

COMPRIMIDOS DE LIBERAÇÃO PROLONGADA (200 mg) - GRUPO LPK100M													
	C1	**C2**	**C3**	**C4**	**C5**	**C6**	**C7**	**MEDIA**	**DP**	**CV%**	**Mediana**	**IC -**	**IC +**
ASC_{0-T} (ug/mL.h)	104,633	174,2785	88,35517	78,48095	129,2562	90,96292	94,84908	**108,688**	33,09882	30,45306	94,849	78,076	139,3
ASC_{0-INF} (ug/mL.h)	106,3338	185,2715	89,31914	79,479	129,759	91,64345	95,48273	**111,0412**	36,44407	32,8203	95,483	77,335	144,75
$ASMC_{0-T}$ (ug/mL.h^2)	1495,392	3147,728	1800,348	1139,568	2958,326	2059,547	1781,146	**2054,579**	741,7424	36,10191	1800,3	1368,6	2740,6
$ASMC_{0-INF}$ (ug/mL.h^2)	1558,505	3583,223	1838,657	1175,364	2977,901	2086,272	1806,159	**2146,583**	842,4636	39,24673	1838,7	1367,4	2925,8
kel (h^{-1})	0,1407	0,104	0,2673	0,1705	0,3407	0,3058	0,2878	**0,230971**	0,091393	39,56909	0,2673	0,1464	0,3155
relação de áreas	0,984005	0,940665	0,989208	0,987443	0,996125	0,992574	0,993364	**0,98334**	0,019244	1,957033	0,9892	0,9655	1,001
MRT (h)	14,65672	19,34038	20,58526	14,78835	22,94947	22,76509	18,91608	**19,14305**	3,387944	17,69804	19,34	16,01	22,276
ka (h^{-1})	0,1939	0,1105	0,2694	0,2135	0,3411	0,3082	0,2912	**0,246829**	0,079193	32,08437	0,2694	0,1736	0,3201
$t_{1/2\ abs}$ (h)	3,574007	6,271493	2,572383	3,245902	2,031662	2,24854	2,379808	**3,189114**	1,466977	45,99954	2,572	1,832	4,546
Cl (mL/h.kg)	606,7318	329,3156	714,0184	894,8748	575,9786	771,1558	784,5018	**668,0824**	184,7216	27,64953	714,2	497,24	838,93
Vd (mL/kg)	4312,237	3166,496	2671,225	5248,533	1690,574	2521,765	2725,857	**3190,955**	1202,559	37,68649	2725,9	2078,7	4303,2
$t_{1/2}$ (h)	4,925373	6,663462	2,592593	4,064516	2,034048	2,266187	2,407922	**3,564871**	1,732807	48,60785	2,593	1,962	5,168
$t_{máx}$ (h)	12	12	24	12	24	24	24	**18,85714**	6,41427	34,01507	24	12,925	24,79
$C_{máx}$ (ug/mL)	4,471522	10,02025	6,36788	5,084595	10,21651	8,168673	5,764712	**7,156306**	2,332741	32,597	6,368	4,999	9,314
MAT (h)	5,157298	9,049774	3,711952	4,683841	2,931692	3,244646	3,434066	**4,601895**	2,116851	45,99954	3,712	2,644	6,56
Cl_{renal} (mL/h.kg)	19,52742	10,82783	26,21443	11,44454	12,46809	14,70659	14,60078	**15,68424**	5,472476	34,89156	14,601	10,623	20,746
Fe_u	3,16698	3,092888	3,631771	1,262838	2,156293	1,892922	1,848802	**2,436071**	0,865061	35,51049	2,156	1,636	3,236
DOSE (ug/kg)	64516,13	61012,81	63775,51	71123,76	74738,42	70671,38	74906,37	**68677,77**	5561,582	8,098082	61200	58194	67794

APÊNDICE VI – PUBLICAÇÃO CIENTÍFICA DO MÉTODO BIOANALÍTICO PARA QUANTIFICAÇÃO DE BNZ EM PLASMA.

Research article

Biomedical Chromatography

Received: 9 June 2014, Revised: 25 September 2014, Accepted: 13 October 2014 Published online in Wiley Online Library: 26 November 2014

(wileyonlinelibrary.com) DOI 10.1002/bmc.3386

Rapid and sensitive ultra-high-pressure liquid chromatography method for quantification of antichagasic benznidazole in plasma: application in a preclinical pharmacokinetic study

Marcelo Gomes Davanço, Michel Leandro de Campos and Rosângela Gonçalves Peccinini*

ABSTRACT: Benznidazole (BNZ) and nifurtimox are the only drugs available for treating Chagas disease. In this work, we validated a bioanalytical method for the quantification of BNZ in plasma aimed at improving sensitivity and time of analysis compared with the assays already published. Furthermore, we demonstrated the application of the method in a preclinical pharmacokinetic study after administration of a single oral dose of BNZ in Wistar rats. A Waters® Acquity UHPLC system equipped with a UV–vis detector was employed. The method was established using an Acquity® UHPLC HSS SB C_{18} protected by an Acquity® UHPLC HSS SB C_{18} VanGuard guard column and detection at 324 nm. The mobile phase consisted of ultrapure water–acetonitrile (65:35), and elution was isocratic. The mobile phase flow rate was 0.55 mL/min, the volume of injection was 1 μL, and the run time was just 2 min. The samples were kept at 25°C until injection and the column at 45°C for the chromatographic separation. The sample preparation was performed by a rapid protein precipitation with acetonitrile. The linear concentration range was 0.15–20 μg/mL. The pharmacokinetic parameters of BNZ in rats were determined and the method was considered sensitive, fast and suitable for application in pharmacokinetic studies. Copyright © 2014 John Wiley & Sons, Ltd.

Keywords: benznidazole; Chagas disease; pharmacokinetic parameters; ultra-high pressure liquid chromatography; validation method; bioanalytical method

Introduction

Chagas disease is caused by the protozoan hemoflagellate *Trypanosoma cruzi* and is considered a neglected tropical disease (Gascon *et al.*, 2014; World Health Organization, 2010). It is endemic in Latin America and Caribbean (18 countries), with 8–9 million people infected worldwide and 15,000 deaths per year. Because of the immigration of infected persons, cases of the disease have been registered in North America (Hotez *et al.*, 2013), Australia, New Zealand (Jackson *et al.*, 2014), Japan and European countries (Carlier, 2011), in addition to the endemic areas of the disease.

Two drugs are available for Chagas disease treatment: nifurtimox and benznidazole (BNZ). Only the latter is widely available (Pinazo *et al.*, 2010). Despite its high activity in the acute phase, nifurtimox treatment shows common adverse effects such as psychic alterations, loss of weight, anorexia, excitability, sleepiness and digestive manifestations such as nausea or vomiting (Castro *et al.*, 2006; Murcia *et al.*, 2012). Moreover, in some countries, the available of nifurtimox treatment is low.

BNZ is used in the acute phase of the disease, and its use in the given time and proper dose eliminates the parasite from the blood of the host in approximately 80% of cases. In the chronic phase the effectiveness of the drug is controversial and the results are not conclusive (Viotti *et al.*, 2014; Garcia *et al.*, 2005). BNZ treatment for adults is available in tablets of 100 mg (LAFEPE, Pernambuco, Brazil), and a dose of two or three tablets per day is recommended for 30–60 days (World Health Organization, 2010). Children below 20 kg are treated with fractions of these tablets through extemporaneous formulations, causing imprecision in drug dosing. Recently, the Drugs for Neglected Diseases Initiative (Switzerland) and the Laboratório Farmacêutico do Estado de Pernambuco (Brazil) proposed a new 12.5 mg tablet adapted for babies and children up to 2 years of age (20 kg body weight). Treatment is designed to use one, two or three tablets, depending on weight (5–10 mg/kg bodyweight/day; Drugs for Neglected Diseases Initiative, 2012).

* Correspondence to: R. G. Peccinini, Department of Natural Active Principles and Toxicology, School of Pharmaceutical Sciences, São Paulo State University, Araraquara, São Paulo, Brazil. Email: peccinin@fcfar.unesp.br

Department of Natural Active Principles and Toxicology, School of Pharmaceutical Sciences, São Paulo State University, Araraquara, São Paulo, Brazil

Abbreviations used: BNZ, benznidazole.

 Copyright © 2014 John Wiley & Sons, Ltd.

The limitations of current treatment with BNZ are the long period of treatment, drug toxicity and adverse effects. These limitations cause a high rate of abandonment of therapy by patients.

In the search for new formulations of BNZ, some authors have reported new pharmaceutical technologies to improve the pharmacokinetics, bioavailability and dissolution of BNZ (Salomon, 2012; Maximiano *et al*., 2011; Morilla *et al*., 2002). In some of these studies, bioanalytical methods were developed for the quantification of BNZ in plasma with application *in vivo* studies to evaluate the pharmacokinetics of the drug. These methods were developed using high-performance liquid chromatography (HPLC) systems with differences in solvent proportions of mobile phase, sample volume, run time, linearity, sensitivity, injection volume and sample preparation, among other factors (Morilla *et al*., 2002; Moreira da Silva *et al*., 2012; Leonardi *et al*., 2013; Marsón *et al*., 2013; Padró *et al*., 2013; Guerrero *et al*., 2011; Pinazo *et al*., 2013; Workman *et al*., 1984; White *et al*., 1982).

The use of ultra-high-pressure liquid chromatography (UHPLC) in bioanalytical methods has major advantages over the methods utilizing HPLC. The use of a small sample volume (especially in pre-clinical studies in small animals), short run time, low mobile phase flow rate and increased sensitivity, for example, are advantages of using UHPLC for bioanalytical methods. Owing to the lack of bioanalytical methods for quantification of plasma BNZ using UHPLC, the aim of this study was to develop and validate such a method for quantification of BNZ in plasma. Furthermore, we demonstrated the application of the method in a preclinical pharmacokinetic study of BNZ in rats and compared the parameters obtained for the bioanalytical method with previously published data using other methods, showing the advantages of our method.

Material and methods

Chemicals and solutions

BNZ (98% purity, lot 15772) was purchased from Roche (São Paulo, Brazil). Benzocaine (99.5%) (internal standard, IS) was obtained from Sigma Aldrich® (New Jersey, USA). HPLC-grade methanol and acetonitrile were purchased from Merck (Darmstadt, Germany). The ultrapure water was obtained from a Millipore Milli-Q system and used throughout the analysis.

A stock BNZ solution was prepared in methanol at a concentration of 100 μg/mL and stored at 8°C ±2. It was used to prepare dilutions in plasma for the calibration curve. The benzocaine solution (IS) was prepared in acetonitrile at 5 μg/mL and stored at 8°C ±2. The stock BNZ solution and benzocaine solution were stable throughout the study.

UHPLC conditions and instrumentation

A Waters® Acquity UHPLC system equipped with a UV–vis detector was employed. The chromatographic separation was performed on an Acquity® UHPLC HSS SB C_{18} (2.1 ×100 mm; 1.8 μm) column preceded by an Acquity UHPLC HSS VanGuard® (2.1 ×5 mm; 1.8 μm) guard column at 45°C. The mobile phase was a water–acetonitrile (65:35, v/v) mixture, and elution was in the isocratic mode, with detection at 324 nm. A flow rate of 0.55 mL/min was used and 1 μL of sample was injected into the chromatographic system. The run time was just 2 min. The ratio of peak area of the analyte to the IS was used for the quantification of plasma samples.

Sample preparation

Prior to the chromatographic analysis, all samples, quality controls or calibration standards were treated according to the following procedure: 50 μL plasma samples were deproteinized by the addition of 50 μL acetonitrile (containing IS; 5 μg/mL), vortexed for 1 min and centrifuged at 13,000***g*** for 10 min. A 50 μL volume of supernatant was withdrawn and filtered with PTFE syringe filters (0.22 μm; 4 mm) in a maximum recovery vial (Waters). The final extract was stored at 25°C in the sample manager compartment until chromatographic analysis.

Bioanalytical method validation

The validation procedure was based on the US Food and Drug Administration (2001) *Guidance for Industry* and (Brazilian) ANVISA resolutions 899/2003 and 27/2012 (Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2003, 2012). To assess the linearity, analyses of calibration standards at 10 concentrations were conducted using three replicates. The calibration curves were generated from the BNZ to IS peak area ratios, by least-squares linear regression. The concentration levels (prepared as serial dilutions) of the calibration curves in plasma were 0.1562, 0.3125, 0.625, 1.25, 2.50, 5.00, 8.00, 10, 15 and 20 μg/mL. The concentration level of the IS was 2.5 μg/mL in calibration curves. ANOVA ($p < 0.05$) was used to test the linearity of the calibration curve.

Precision and accuracy were assessed for five different concentrations or quality control (QC), namely the lower limit of quantification (LLOQ) QC, low QC, mid QC and high QC, where the chosen levels were 0.1562, 0.3125, 8.00 and 15 μg/mL, respectively. Accuracy was defined as the deviation of the mean analytical result from the theoretical value, while precision was represented by the relative standard deviation (RSD) of measurements at each level. Intra-run precision and accuracy were calculated for five replicates on the same day. Inter-run precision and accuracy were calculated for 15 replicate determinations at each QC level, analyzed over three nonconsecutive days. The QC plasma samples were prepared daily. The data acceptance criterion for precision was RSD <15%, except for LLOQ, where it should not exceed 20%. For accuracy, acceptable values were 85–115% of the theoretical value, except at LLOQ, where 80–v120% was permissible. The method selectivity was demonstrated by the absence of interfering peaks on the chromatogram at the retention times of BNZ, when either plasma blank or a blank spiked with IS were analyzed.

The stability of BNZ was evaluated under several conditions, including short-term room temperature, long-term frozen and post-preparative. All stability tests were performed at the low (0.3125 μg/mL) and high (15 μg/mL) QC levels. BNZ was considered stable if the measured analyte concentration of stored samples was 85–115% of the measured analyte concentration of fresh samples.

Preclinical pharmacokinetic study

Animals and experimental protocol. The preclinical pharmacokinetic study was carried out in five male Wistar rats (weighing 200–210 g). They were housed in wire cages with free access to food and water. The preclinical study protocol was approved by the Research Ethics Committee of the School of Pharmaceutical Sciences, UNESP, Araraquara (process 05/2014).

 Copyright © 2014 John Wiley & Sons, Ltd.

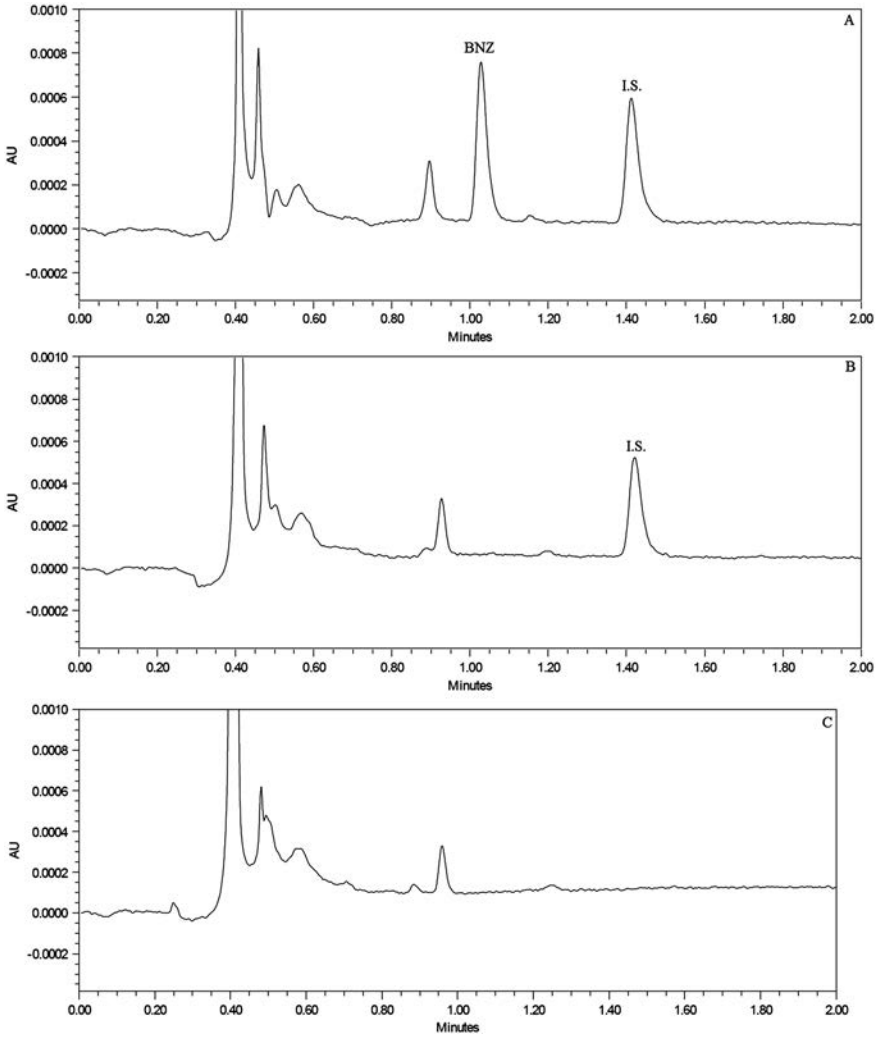


Figure 1. Chromatograms of plasma spiked with 2.5 μg/mL benznidazole (BNZ) (A), zero sample (B) and blank sample (C).

Twenty-four hours before drug administration, the animals were anesthetized with ketamine (73 mg/kg) and xylazine (5.5 mg/kg) given by intraperitoneal injection. Subsequently, a catheter (Intramedic polyethylene tubing, i.d. 0.28 mm/o.d. 0.61 mm; Becton, Dickinson and Company, Sparks, MD, USA) was implanted in the femoral artery to collect blood. That catheter was connected to PE-50 polyethylene tubing (CPL Medical's, São Paulo, Brazil), which was exteriorized through the dorsal skin (de Campos *et al.*, 2012). The collection was performed in the conscious animal. Twelve hours before drug administration, the animals were deprived of food.

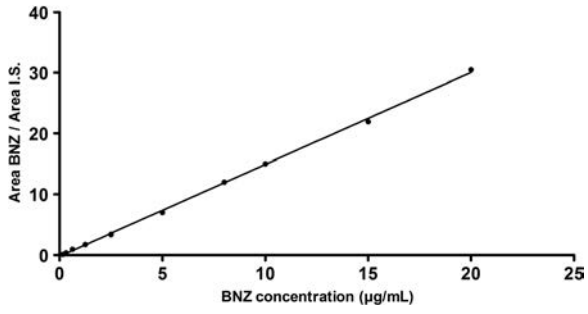


Figure 2. Calibration curve of BNZ in rat plasma (mean of three replicates at 10 concentration levels).

The animals received a single oral dose of 20 mg/kg BNZ in 4% gum arabic suspension. The dose was calculated by interspecific allometric scaling based on the 5 mg/kg from daily human dose of BNZ in Chagas disease treatment (Coura, 2009).

The blood samples (100 μL) were collected in heparinized tubes at predetermined intervals of 0.25, 0.50, 0.75, 1.0, 1.5, 2.0,

Table 1. Precision and accuracy of calibration curve of benznidazole (BNZ) in rat plasma (n =3)

BNZ concentration (μg/mL)	Precision (%)	Accuracy (%)
0.1562	10.6	112.3
0.3125	14.1	104.2
0.625	13.1	100.5
1.25	3.12	91.4
2.5	1.37	98.2
5	2.73	95.6
8	4.26	99.1
10	3.59	91.4
15	3.30	89.7
20	1.23	104.2

Copyright © 2014 John Wiley & Sons, Ltd.

Table 2. Precision (expressed as RSD) and accuracy of calibration standards of BNZ in rat plasma

Statistics		Theoretical BNZ concentration, μg/mL			
		0.1562	0.3125	8	15
		LLOQ	Low QC	Mid QC	High QC
Intra-run	*N*	5	5	5	5
	Precision (%)	8.9	6.7	5.5	9.4
	Accuracy (%)	82.1	98.7	91.1	97.1
Inter-run	*N*	15	15	15	15
	Precision (%)	10.2	10.4	9.3	11.3
	Accuracy (%)	102.1	95.2	100.4	109.1

RSD, Relative standard deviation; LLOQ, lower limit of quantitation; QC, quality control.

Table 3. Recoveries at low, mid and high QC levels for BNZ

QC level	Statistics	BNZ
Low QC	Recovery (%)	64.9
	RSD (%)[a]	10.2/2.8
Mid QC	Recovery (%)	61.4
	RSD (%)	13.3/10.1
High QC	Recovery (%)	70.1
	RSD (%)	3.36/6.0
Total	Recovery (%)	65.5

[a]RSD of three replicates of processed QC samples/RSD of three replicates of unprocessed QC samples.

Table 4. Stability of BNZ in rat plasma under various conditions and time intervals

Statistics	Low QC	High QC
Short-term stability, 24 h at room temperature		
N	3	3
RSD (%)	6.2	0.7
Accuracy (%)	97.6	86.4
Long-term stability, 14 days at −20°C		
N	3	3
RSD (%)	5.6	3.6
Accuracy (%)	112.3	102.3
Post-preparative stability, 24 h at 25°C		
N	3	3
RSD (%)	4.7	2.2
Accuracy (%)	88.4	96.4

4.0, 6.0, 8.0, 10, 12, 14, 16 and 18 h post-dose. The plasma was separated by centrifugation at 6000***g*** for 5 min and stored until analysis according to the stability test.

Pharmacokinetic parameters. The pharmacokinetic parameters were calculated on the basis of the profiles of the plasma concentration vs time curves, and a one-compartment model was applied. The elimination ($t_{1/2}$) and absorption ($t_{1/2abs}$) half-lives were determined by the graphical method. The elimination (k_{el}) and absorption (k_a) constants were calculated by the formula $0.693/t_{1/2}$. The area under the curve at 0 to 18 h (AUC_{0-18}) was calculated by the trapezoidal method and the area under the curve 0 to ∞ ($AUC_{0-\infty}$) was calculated by the formula $AUC_{0-18} + C_n/k_{el}$, where C_n was the last quantifiable plasma BNZ concentration. The area under the moment curve (AUMC) was calculated by the method of statistical moments and used in the equation mean residence time (MRT) $=AUMC/AUC_{0-\infty}$. The clearance (*Cl*) and the distribution volume (V_d) were determined by the equations $Cl = dose/AUC_{0-\infty}$ and $V_d = Cl/k_{el}$. The maximum plasma concentration (C_{max}) was obtained directly from the experimental data as well as the time of the occurrence of C_{max} (t_{max}).

The formulas described were applied in Excel software for the calculation of pharmacokinetic parameters and values were confirmed by Phoenix® WinNonlin® software. The plasma concentrations and pharmacokinetic parameters were expressed as means and confidence intervals (CI).

Results and discussion

Method validation

The bioanalytical method for quantification of BNZ in plasma by UHPLC was validated according to the guidelines mentioned above. The method selectivity was proved adequate by showing that substances in the plasma blank did not interfere at the retention times of BNZ (1.16 min) and IS (1.54 min). Figure 1 illustrates the chromatograms of plasma spiked with BNZ 2.5 μg/mL (A), zero sample (B) and blank sample (C).

The calibration curves were linear from 0.1562 to 20 μg/mL (Fig. 2; $y = 0.5126x - 0.1988$, $r = 0.9996$). The linearity tests met the acceptance criteria, with precision and accuracy being in accordance with the established limits (Table 1). Furthermore, the linear range of the method was close to that found by other researchers and covered the range of therapeutic levels of BNZ.

The results for precision and accuracy were adequate according to the aforementioned acceptance criteria in analyses of quality controls: low QC, mid QC and high QC (Table 2). The LLOQ was established as 0.15 μg/mL, given the criteria of precision and accuracy (Table 2). This LLOQ was lower compared with other published methods, demonstrating that the proposed method was more sensitive for the quantification of plasma BNZ (Salomon, 2012; Maximiano *et al*., 2011; Morilla *et al*., 2002; Moreira da Silva *et al*., 2012; Leonardi *et al*., 2013; Marsón *et al*., 2013; Morilla *et al*., 2003). The recovery test also showed the acceptance criteria for precision and accuracy (Table 3), demonstrating that the method of processing the sample was suitable for the analysis of BNZ in plasma.

The BNZ stability assay showed that the drug in the final extract was stable for 24 h in the sample manager at 25°C, stable in plasma at room temperature for 24 h, and stable when frozen at −20°C for 14 days. These tests are of fundamental importance for the samples to be properly stored until the analysis, ensuring the determination of reliable drug concentrations (Table 4).

 Copyright © 2014 John Wiley & Sons, Ltd.

Table 5. Methods for quantification of BNZ in plasma available in the literature

Author	System	Column	Limit of quantification	Linearity	Flow	Injection volume	Sample preparation	Sample volume	Run time	Validation criteria
Moreira da Silva *et al.* (2012)	HPLC-UV	C_{18} (4 µm; 150 ×4.6mm) and precolumn C_{18} (3 µm; 2 ×4.6 mm)	0.5 µg/mL	0.5–100 µg/mL	1.0 mL/min	25 µL	Liquid–liquid extraction by ethyl ether	270 µL plasma	—	FDA
Leonardi *et al.* (2013)	HPLC-UV	C_{18} (5 µm; 250 ×4.6 mm)	—	—	1.0 mL/min	20 µL	Liquid–liquid extraction by acetonitrile–DMSO (1:1) and incubation with 10% TCA	200 µL plasma	—	—
Marsón *et al.* (2013)	HPLC-UV	C_{18}(5 µm, 100 ×4.6 mm)	0.32 µg/mL	0.14–20 µg/mL	1.0 mL/min	20 µL	Ethyl acetate extraction and deproteinization with 30% TCA	2 mL lyophilized plasma	8 min	—
Morilla *et al.* (2003)	HPLC-UV	C_{18} (5 µm; 250 ×4.0 mm)	0.75 µg/mL	0.75–25 µg/mL	0.9 mL/min	20 µL	Liquid–liquid extraction by acetonitrile–DMSO (1:1) and incubation with 10% TCA	200 µL plasma	8 min	—
Padró *et al.* (2013)	HPLC-UV	C_{18} (5 µm; 250 ×4.6 mm)	0.3058 µg/mL	0.3–500 µg/mL	1.0 mL/min	5 µL	Dispersive ionic liquid–liquid microextraction	1 mL plasma	6.5 min	—
Guerrero *et al.* (2011) and Pinazo *et al.* (2013)	HPLC-UV	C_{18} (5 µm; 250 ×4.0mm)	1.6 µg/mL	1.6–100 µg/mL	0.9 mL/min	100 µL	Precipitation with 10% TCA	150 µL plasma	10 min	FDA and European Agency for the Evaluation of Medicinal Products
Workman *et al.* (1984) and White *et al.* (1982)	HPLC-UV	C_{18} (10 µm; 8.0mm)	0.20 µg/mL	0.20–1000 µg/mL	4.0 mL/min	20 µL	Precipitation with methanol	—	3 min	—
Our method	UHPLC-UV	C_{18} (1.8 µm; 2.1 ×100 mm) and precolumn C_{18} (1.8 µm; 2.1 ×5 mm)	0.156 µg/mL	0.156–20 µg/mL	0.55 mL/min	1 µL	Precipitation with acetonitrile	50 µL plasma	2 min	FDA and National Agency for Sanitary Vigilance (Brazil)

FDA, US Food and Drug Administration; TCA, trichloroacetic acid.
—, Not shown or not reported.

Copyright © 2014 John Wiley & Sons, Ltd.

Advantages of the bioanalytical method for quantification of BNZ by UHPLC

Table 5 shows the parameters of the published methods in the literature for BNZ in plasma together with the parameters of our method. Compared with HPLC methods, UHPLC methods had advantages with regard to run time, sample volume, flow rate of mobile phase, sensitivity (LLOQ), injection volume, among others. The parameters sample volume and injection volume are decisive factors for a method to be applied to studies in small animal models such as rats or mice. The run time and mobile phase flow rate parameters are crucial for reducing the cost of solvents and amount chemical waste to be disposed. Comparing the linearity ranges showed that all methods developed covered the BNZ therapeutic concentrations.

The guidelines containing the validation criteria used in the studies published by Leonardi *et al*. (2013), Marsón *et al*. (2014), Morilla *et al*. (2003), Padró *et al*. (2013), Workman *et al*. (1984) and White *et al*. (1982) are not shown, since it was not possible to know the validation criteria used in each study. *The Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation* of the US Food and Drug Administration (2001) was used by Moreira da Silva *et al*. (2012), Guerrero *et al*. (2011), Pinazo *et al*. (2013) and us in the present work. Furthermore, Guerrero *et al*. and Pinazo *et al*. also used the criteria validation of the European Agency for the Evaluation of Medicinal Products.

In recent work, Marsón *et al*. (2014) reported the use of a UHPLC/MS/MS method only for identification (not for quantification) of BNZ and its metabolite, different from the present method where we quantified the drug in plasma by UHPLC. Thus, our method is the first published method for quantification of BNZ in plasma using UHPLC system.

Compared with the previously published studied, our method showed an LLOQ of 0.15 μg/mL, indicating a higher sensitivity of the bioanalytical method developed using UHPLC compared with HPLC systems.

Application of method in a pharmacokinetic study of BNZ in rats

Figure 3 shows the plasma concentration–time curves for BNZ administration in rats. The pharmacokinetic parameters of BNZ are described in Table 6.

In pharmacokinetic studies, through the analyses of samples of rats given oral BNZ, it was possible to construct the plasma concentration vs time curve, from which the pharmacokinetic parameters were calculated. Thus, the applicability of the bioanalytical method was confirmed for the quantification of BNZ in plasma samples.

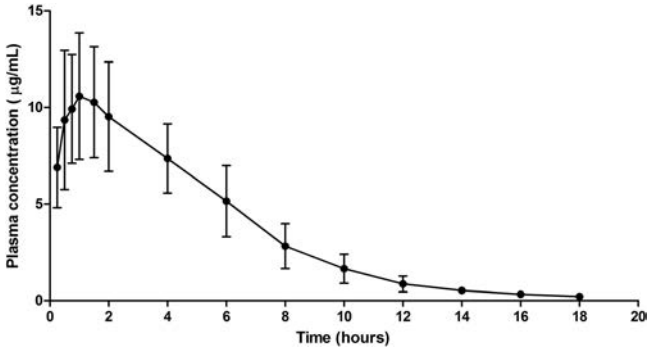


Figure 3. Pharmacokinetic profile after single oral dose of BNZ in rats (n =5, mean ±95% confidence interval; dose =20 mg/kg).

Table 6. Pharmacokinetic parameters of BNZ in rats after single oral dose of 20 mg/kg (n =5)

Pharmacokinetic parameter	Mean (±95% confidence interval)
k_{el} (1/h)	0.259 (0.214–0.304)
$t_{1/2}$ (h)	2.7 (2.3–3.1)
AUC_{0-18} (μg/mL h)	64.8 (48.5–81.1)
$AUC_{0-\infty}$ (μg/mL h)	65.6 (49.2–82.0)
C_{max} (μg/mL)	11.0 (7.8–14.2)
t_{max} (h)	1.1 (0.5–1.7)
$AUMC_{0-\infty}$ (μg/mL h^2)	421.1 (289.8–552.4)
MRT (h)	6.3 (5.4–7.2)
k_a (1/h)	2.273 (1.255–3.291)
$t_{1/2abs}$ (h)	0.36 (0.16–0.57)
Cl/F (mL/h)	65.9 (46.6–85.3)
V_d/F (mL)	253.5 (204.3–302.6)

k_{el}, Elimination constant; $t_{1/2}$, elimination half-life; AUC_{0-18}, area under the concentration-time curve from 0 to 18 h after dosing; $AUC_{0-\infty}$, area under the concentration–time curve extrapolated to infinity; C_{max}, maximal concentration in plasma; t_{max}, time to occurrence of C_{max}; AUMC, area under the moment curve; MRT, mean residence time; k_a, absorption constant; $t_{1/2abs}$, absorption half-life; Cl, clearance; V_d, distribution volume; F, oral bioavailability.

In this study, the absorption of the BNZ administered orally in rats was rapid (t_{max} =1.1 h); this value is close to those found by Workman *et al*. (1984) performed in mice by intraperitoneal administration (t_{max} =15–30 min low dose and 60 min high dose) and dogs orally (1–5 h). In the study by Leonardi *et al*. (2013), the t_{max} of BNZ administered orally in the same animal model as used in this work was 2 h. In the study of Moreira da Silva *et al*. (2012), the value of t_{max} was 2.2 h in the oral administration of BNZ tablets in mice; C_{max} values vary across studies owing to the use of different doses.

In our results, the elimination half-life was 2.7 h, while Workman *et al*. (1984) found in mice, sheep and dog elimination half-lives of 90 min, 4–5 h and 9–11 h, respectively. In the study by Moreira da Silva *et al*. (2012), the elimination half-life was 1.64 h upon oral administration of BNZ tablets in mice. In the study by Morilla *et al*. (2005), the elimination half-life in the intravenous administration in Wistar rats was 3.5 h. In the latter, the results are not consistent with those obtained in this study, since the oral elimination half-life values should be higher than the intravenous administration owing to the absorption process.

Small variations in pharmacokinetic parameters relate to the different routes of drug administration, vehicles used for administration and the different animal models used in each study. Despite the existence of pharmacokinetic studies of BNZ in some animal species, the preclinical pharmacokinetics of BNZ is still little studied and with poor results. Several pre-clinical studies are being conducted to evaluate the antichagasic activity of the association of BNZ with other drugs (Diniz *et al*., 2013; Strauss *et al*., 2013) and the pharmacokinetic evaluation of the association between drugs should be performed. In addition, several studies of new formulations of BNZ (for improved solubility and absorption; Palmeiro-Roldán *et al*., 2014; Streck *et al*., 2014; Sobrinho

 Copyright © 2014 John Wiley & Sons, Ltd.

et al., 2011) should use pharmacokinetic data for planning pharmacodynamic and toxicity assays.

Conclusion

In this work, we developed and validated a UHPLC bioanalytical method for the quantification of plasma BNZ. The method was applied in a pharmacokinetic study of BNZ in rats, demonstrating adequate sensitivity and linearity in the concentration range found in the animals. Moreover, compared with the published methods in the literature, our method showed advantages with regard to sensitivity, run time, sample volume, mobile phase flow rate and injection volume. The pharmacokinetic parameters obtained may be used for future preclinical trials of BNZ in association with others antichagasic drugs and pharmacokinetic studies of new formulations of BNZ.

Acknowledgments

The authors thank São Paulo Research Foundation – FAPESP (process 09/51075-5 and process 11/11239-9) and the National Institute of Science and Technology – Pharmaceutical Innovation (INCT-if) for providing financial support during the course of this study. Dr A. Leyva helped with English editing of the manuscript.

Conflict of interest

There is no conflict of interest.

References

Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolution no. 899. Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos, 29 May 2003. Available from: http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/2003/re/899_03re.htm (accessed 10 January 2014).

Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolution RDC no. 27. Guia para validação de método bioanalíticos, 17 May 2012. Available from: http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/564310004b60537e891f9baf8fded4db/RDC+27+12+-Valida%C3%A7%C3%A3o+de+M%C3%A9todos+Bioanal%C3%ADticos.pdf?MOD=AJPERES (accessed 10 January 2014).

Carlier Y. Globalization of Chagas disease (American trypanosomiasis): the situation in Europe and Belgium. *Bulletin et Mémoires de l'Académie Royale de Médecine de Belgique* 2011; **166**(10–12): 347–355.

Castro JA, de Mecca MM and Bartel LC. Toxic side effects of drugs used to treat Chagas' disease (American trypanosomiasis). *Human Experimental Toxicology* 2006; **25**(8): 471–479.

Coura JR. Present situation and new strategies for Chagas disease chemotherapy: a proposal. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 2009; **104**(4): 549–554.

de Campos ML, Baldan-Cimatti HM, Davanco MG, Nogueira MA, Padilha EC, Candido CD, Dos Santos JL and Peccinini RG. Pharmacokinetic profile of a new diclofenac prodrug without gastroulcerogenic effect. *Drug Metabolism Letters* 2012; **6**(4): 235–241.

Diniz LdeF, Urbina JA, de Andrade IM, Mazzeti AL, Martins TA, Caldas IS, Talvani A, Ribeiro I and Bahia MT. Benznidazole and posaconazole in experimental Chagas disease: positive interaction in concomitant and sequential treatments. *PLoS Neglected Tropical Diseases* 2013; **7**: e2367.

Drugs for Neglected Diseases Initiative. Rio de Janeiro, 2012. Available from: http://www.who.int/selection_medicines/committees/expert/19/applications/Benznidazole_6552_C_NF.pdf (accessed 10 January 2014).

Garcia S, Ramos CO, Senra JF, Vilas-Boas F, Rodrigues MM, Campos-de-Carvalho AC, Ribeiro-Dos-Santos R and Soares MB. Treatment with benznidazole during the chronic phase of experimental Chagas' disease decreases cardiac alterations. *Antimicrobial Agents Chemotherapy* 2005; **49**(4): 1521–1528.

Gascon J, Vilasanjuan R and Lucas A. The need for global collaboration to tackle hidden public health crisis of Chagas disease. *Expert Review of Anti-Infective Therapy* 2014; **12**(4): 393–395.

Guerrero L, Pinazo MJ, Posada E, Gascón J, Ribas J and Soy D. A high-performance liquid chromatographic method for benznidazole quantitation in plasma of patients with Chagas disease. *Clinical Chemistry Laboratory Medicine* 2011; **49**(1): 77–82.

Hotez PJ, Dumonteil E, Cravioto MB, Bottazzi ME, Conyer RT, Meymandi S, Karunakara U, Ribeiro I, Cohen RM and Pecoul B. An unfolding tragedy of Chagas disease in North America. *PLoS Neglected Tropical Diseases* 2013; **7**(10): e2300.

Jackson Y, Pinto A and Pett S. Chagas disease in Australia and New Zealand: risks and needs for public health interventions. *Tropical Medicine and International Health* 2014; **19**(2): 212–218.

Leonardi D, Bombardiere ME and Salomon CJ. Effects of benznidazole: cyclodextrin complexes on the drug bioavailability upon oral administration to rats. *International Journal of Biology and Macromolecules* 2013; **62**: 543–548.

Marsón ME, Dana DD, Altcheh J, García-Bournissen F and Mastrantonio G. Development of UV/HPLC methods for quantitative analysis of benznidazole in human plasma and urine for application in pediatric clinical studies. *Journal of Clinical Laboratory Analysis* 2013; **27**(5): 384–390.

Marsón ME, Altcheh J, Moscatelli G, Moroni S, García-Bournissen F and Mastrantonio GE. Identification of *N*-benzylacetamide as a major component of human plasmatic metabolic profiling of benznidazole. *European Journal of Drug Metabolism Pharmacokinetics* 2014; doi: 10.1007/s13318-014-0195-8

Maximiano FP, de Paula LV, Figueiredo VP, de Andrade IM, Talvani A, S´a-Barreto LC, Bahia MT and Cunha-Filho MSS. Benznidazole microcrystal preparation by solvent change precipitation and in vivo evaluation in the treatment of Chagas' disease. *European Journal of Pharmacy and Biopharmacy* 2011; **78**: 377–384.

Moreira da Silva R, Oliveira LT, Silva Barcellos NM, de Souza J and de Lana M. Preclinical monitoring of drug association in experimental chemotherapy of Chagas' disease by a new HPLC-UV method. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2012; **56**(6): 3344–3348.

Morilla MJ, Benavidez P, Lopez MO, Bakas L and Romero EL. Development and in vitro characterisation of a benznidazole liposomal formulation. *International Journal of Pharmacy* 2002; **249**: 89–99.

Morilla MJ, Benavidez PE, Lopez MO and Romero EL. Liposomal benznidazole: a high-performance liquid chromatographic determination for biodistribution studies. *Journal of Chromatographic Science* 2003; **41**(8): 405–409.

Morilla MJ, Prieto MJ and Romero EL. Benznidazole vs benznidazole in multilamellar liposomes: how different they interact with blood components? *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 2005; **100**(2): 213–219.

Murcia L, Carrilero B, Albajar Viñas P and Segovia M. Nifurtimox chemotherapy: collateral effects in treated Trypanosoma cruzi infected patients. *Revista Española de Quimioterapia* 2012; **25**(1): 74–75.

Padró JM, Marsón ME, Mastrantonio GE, Altcheh J, García-Bournissen F and Reta M. Development of an ionic liquid-based dispersive liquid–liquid microextraction method for the determination of nifurtimox and benznidazole in human plasma. *Talanta* 2013; **107**: 95–102.

Palmeiro-Roldán R, Fonseca-Berzal C, Gómez-Barrio A, Arán VJ, Escario JA, Torrado-Durán S and Torrado-Santiago S. Development of novel benznidazole formulations: physicochemical characterization and in vivo evaluation on parasitemia reduction in Chagas disease. *International Journal of Pharmacy* 2014; **472**(1–2): 110–117.

Pinazo MJ, Muñoz J, Posada E, López-Chejade P, Gállego M, Ayala E, del Cacho E, Soy D and Gascon J. Tolerance of benznidazole in treatment of Chagas' disease in adults. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2010; **54**(11): 4896–4899.

Pinazo MJ, Guerrero L, Posada E, Rodríguez E, Soy D and Gascon J. Benznidazole-related adverse drug reactions and their relationship to serum drug concentrations in patients with chronic chagas disease. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2013; **57**(1): 390–395.

Salomon CJ. First century of Chagas' disease: an overview on novel approaches to nifurtimox and benznidazole delivery systems. *Journal of Pharmaceutical Science* 2012; **101**(3): 888–894.

Sobrinho JLS, Soares MFL, Labandeira JJT, Alves LDS and Rolim Neto PJ. Improving the solubility of the antichagasic drug benznidazole through formation of inclusion complexes with cyclodextrines. *Quimica Nova* 2011; **34**(9): 1534–1538.

Strauss M, Lo Presti MS, Bazán PC, Baez A, Fauro R, Esteves B, Sanchez Negrete O, Cremonezzi D, Paglini-Oliva PA and Rivarola HW. Clomipramine and benznidazole association for the treatment of acute experimental *Trypanosoma cruzi* infection. *Parasitology International* 2013; **62**(3): 293–299.

Streck L, Araujo MM, Souza I, Fernandes-Pedrosa MF, Egito EST, Oliveira AG and da Silva-Junior AA. Surfactant-cosurfactant interactions and process parameters involved in the formulation of stable and small

Copyright © 2014 John Wiley & Sons, Ltd.

droplet-sized benznidazole-loaded soybean O/W emulsions. *Journal of Molecular Liquids* 2014; **196**: 178–186.

US Food and Drug Administration. Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation. Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research, May 2001.

Viotti R, Alarcón de Noya B, Araujo-Jorge T, Grijalva MJ, Guhl F, López MC, Ramsey JM, Ribeiro I, Schijman AG, Sosa-Estani S, Torrico F and Gascon J. Towards a paradigm shift in the treatment of chronic Chagas disease. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2014; **58**(2): 635–639.

White R, Workman P and Owen L. The pharmacokinetics in mice and dogs of nitroimidazole radiosesitizers and chemosensitizers more lipophilic than misonidazole. *International Journal of Radiatation: Oncology Biology and Physics* 1982; **8**(3–4): 473–476.

Workman P, White RA, Walton MI, Owen LN and Twentyman PR. Preclinical pharmacokinetics of benznidazole. *British Journal of Cancer* 1984; **50**(3): 291–303.

World Health Organization. Chagas disease: control and elimination. A63/17. 63nd World Health Assembly. Geneva, 22 April 2010 (accessed 31 March 2014). Available from: http://apps.who.int/gb/ebwha/pdf_files/WHA63/A63_17-en.pdf

 Copyright © 2014 John Wiley & Sons, Ltd.

ANEXO

ANEXO I – PARECER DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Protocolo CEUA/FCF/CAr nº 46/2013
Interessado: MARCELO GOMES DAVANÇO
Supervisor: Profª Drª Rosângela Gonçalves Peccnini
Projeto: Farmacocinética pré-clínica de novas formulações de Benznidazol para o tratamento da Doença de Chagas

Parecer nº 01/2014 – Comissão de Ética no Uso de Animais

O Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais, desta Faculdade, aprovou **ad-referendum** as adequações feitas no protocolo do projeto de pesquisa "Farmacocinética pré-clínica de novas formulações de Benznidazol para o tratamento da Doença de Chagas", apresentado pelo Pós-graduando MARCELO GOMES DAVANÇO, sob orientação da Professora Doutora Rosângela Gonçalves Peccnini, do Departamento de Princípios Ativos Naturais e Toxicologia desta Faculdade.

Um relatório parcial deverá ser entregue em MARÇO de 2015 e o relatório final deverá ser entregue em MARÇO de 2016, ambos em formulário para este fim.

Araraquara, 30 de janeiro de 2013.

Prof. Dr. CARLOS CÉSAR CRESTANI
Coordenador da CEUA