

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

CAMPUS DE ARARAQUARA



**Farmacocinética pré-clínica e hematotoxicidade
de Phe-Ala-PQ – pró-fármaco de primaquina**

MARCELO GOMES DAVANÇO

Orientadora: Profa. Dra. Rosângela Gonçalves Peccinini

Co-orientador: Prof. Dr. Luiz Marcos da Fonseca

ARARAQUARA-SP

2013



Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Campus de Araraquara



**Farmacocinética pré-clínica e hematotoxicidade de Phe-Ala-PQ –
pró-fármaco de primaquina**

Marcelo Gomes Davanço

Orientadora: Profa. Dra. Rosângela Gonçalves Peccinini

Co-orientador: Prof. Dr. Luiz Marcos da Fonseca

Araraquara-SP

2013

Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”

Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Campus de Araraquara

**Farmacocinética pré-clínica e hematotoxicidade de Phe-Ala-PQ – pró-fármaco
de primaquina**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Curso de Graduação
em Farmácia-Bioquímica da Faculdade
de Ciências Farmacêuticas, da
Universidade Estadual Paulista para
obtenção do grau de Farmacêutico-
Bioquímico.

Marcelo Gomes Davanço

Orientadora: Profa. Dra. Rosângela Gonçalves Peccinini

Co-orientador: Prof. Dr. Luiz Marcos da Fonseca

Araraquara-SP

2013

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.

“A mente que se abre a uma nova ideia jamais voltará ao seu tamanho original”.

Albert Einstein

Agradecimentos

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 agradecimentos por tudo que já fez e faz por mim.

Ao meu co-orientador e amigo, **Prof. Dr. Luiz Marcos da Fonseca**, pelos ensinamentos na área de Hematologia e pelas discussões dos resultados deste trabalho.

Ao meu amigo e parceiro de laboratório, **Michel Leandro de Campos**, pelos ensinamentos, ajuda na construção e desenvolvimento deste projeto e momentos de descontração.

Ao meu amigo, parceiro de laboratório e de República, **Elias Carvalho Padilha**, por me apresentar e conceder a oportunidade de trabalhar no Laboratório de Toxicologia.

Ao **Prof. Dr. Jean Leandro dos Santos** e **Profa Dra Chung Man Chin**, do Laboratório de Pesquisa e Desenvolvimento de Fármacos (Lapdesf), pela colaboração e concessão da molécula de estudo deste trabalho.

À **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)**, pela concessão de bolsa de Iniciação Científica (Processo nº 2009/51075-5) no período de 2009 a 2013, fundamental para realização deste trabalho.

Ao **Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia para Inovação Farmacêutica (INCT-if)**, nas figuras do **Prof. Dr. Ivan da Rocha Pitta** e **Profa Dra Suely Lins Galdino (IN MEMORIAM)**, pela concessão de recursos financeiros para o desenvolvimento deste projeto.

Marcelo Gomes Davanço

Ao **Prof. Dr. Cleverton Roberto de Andrade e Leandro Alves dos Santos** pela colaboração e continuidade dos estudos histopatológicos com essa molécula.

Ao **Prof. Dr. João Aristeu da Rosa e Aline Rimoldi Ribeiro** pela colaboração e continuidade dos estudos de atividade antichagásica *in vivo* dessa molécula.

À **Pró-Reitoria de Extensão Universitária (PROEX)** pela concessão de Bolsa de Apoio ao Estudante I (BAE I) no primeiro ano de Graduação.

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

Aos **funcionários e ex-funcionários do Laboratório de Bioequivalência Farmacêutica** da FCF – UNESP.

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

À minha namorada, **Larissa Nemézio da Silva Morselli**, e sua família, pelo carinho, atenção e apoio.

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

Ao **Comitê de Ética em Pesquisa em Animais** da FCF – UNESP pela permissão de utilização de animais neste trabalho.

Ao periódico ***Biopharmaceutics & Drug Disposition*** pela publicação dos resultados deste trabalho na forma de artigo científico.

Aos **servidores da FCF – UNESP** que contribuíram direta ou indiretamente na realização deste trabalho.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	
LISTA DE TABELAS	
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	
RESUMO	
ABSTRACT	
1. INTRODUÇÃO.....	14
1.1. Doença de Chagas.....	14
1.2. Quimioterapia da doença de Chagas.....	16
1.3. Planejamento e desenvolvimento do pró-fármaco de PQ	17
2. OBJETIVOS.....	22
2.1. Objetivo geral	22
2.2. Objetivos específicos	22
3. MATERIAIS E MÉTODOS	23
3.1. Soluções padrão, solventes e reagentes	23
3.2. Determinação de PQ em plasma por CLAE.....	24
3.3. Validação do método bioanalítico	26
3.4. Estudo da farmacocinética em ratos	28
3.5. Protocolo Experimental	30
3.5.1. Procedimento cirúrgico em animais	30
3.5.2. Administração intravenosa.....	30
3.5.3. Administração por gavagem	31
3.6. Análise farmacocinética	32
3.6.1 Administração intravenosa.....	32
3.6.2 Administração por gavagem	32
3.7. Avaliação hematológica	35

3.7.1. Modelo animal e protocolo experimental	35
3.7.2. Dosagem de hemoglobina	36
3.7.3. Dosagem de metemoglobina	37
3.7.4. Contagem total e diferencial de leucócitos	38
3.7.5. Avaliação da fragilidade osmótica de eritrócitos	38
3.7.6. Hematócrito	39
3.8. Análise Estatística.....	40
4. RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	41
4.1. Validação do método bioanalítico	41
4.2. Análise farmacocinética	46
4.2.1. Administração intravenosa de difosfato de PQ	46
4.2.2 Administração por gavagem de difosfato de PQ.....	49
4.2.3 Administração intravenosa de Phe-Ala-PQ.....	52
4.2.4 Administração por gavagem de Phe-Ala-PQ	55
4.3. Comparação Estatística da Farmacocinética	58
4.4. Avaliação hematológica	71
4.4.1. Teste de Fragilidade Osmótica de Eritrócitos	71
4.4.2. Hematócrito, hemoglobina e metemoglobina.....	75
4.4.3. Contagem total e diferencial de leucócitos	76
5. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS	80
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	82
7. ANEXOS.....	88

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representação estrutural de PQ (1) e Phe-Ala-PQ (2).	19
Figura 2. Processamento de amostra para determinação de PQ em plasma de rato.	25
Figura 3. Representação dos cromatogramas do método desenvolvido: (A) PQ 0,75 µg/mL e PI 50 µg/mL; (B) PI 50 µg/mL; (C) PQ 1,50 µg/mL e PI 50 µg/mL; (D) plasma branco.....	42
Figura 4. Curva analítica para determinação de PQ em plasma.	43
Figura 5. Perfil farmacocinético de difosfato de PQ em ratos Wistar administrado por via intravenosa em dose única (2,44 mg/kg, n = 15, média ± IC 95).....	48
Figura 6. Perfil farmacocinético de difosfato de PQ em ratos Wistar administrado por gavagem em dose única. (2,44 mg/kg, n = 15, média ± IC 95).	50
Figura 7. Comparação dos níveis plasmáticos médios das duas vias de administração para difosfato de PQ (ratos Wistar, n = 30).	52
Figura 8. Perfil farmacocinético de PQ proveniente de Phe-Ala-PQ administrado em ratos Wistar por via intravenosa (4,38 mg/kg, n = 15, média ± IC 95).	54
Figura 9. Perfil farmacocinético de PQ proveniente de Phe-Ala-PQ administrado em ratos Wistar por gavagem (4,38 mg/kg, n = 15, média ± IC 95).	56
Figura 10. Comparação dos níveis plasmáticos médios das duas vias de administração para PQ proveniente de Phe-Ala-PQ (ratos Wistar, n = 30).	58
Figura 11. Curva de fragilidade osmótica de eritrócitos em ratos do grupo controle (n=10; média ± CV%).	73
Figura 12. Curva de fragilidade osmótica de eritrócitos em ratos do grupo difosfato de PQ (n=10; média ± CV%).	73

Figura 13. Curva de fragilidade osmótica de eritrócitos em ratos do grupo Phe-Ala-PQ (n=10; média $\pm$ CV%).....	74
Figura 14. Curvas de fragilidade osmótica de eritrócitos dos três grupos de animais (n=30; média $\pm$ CV%) * = $p < 0,05$	74

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Parâmetros farmacocinéticos avaliados no estudo.	34
Tabela 2. Coeficiente de variação (CV) e erro padrão relativo (EPR) obtidos para os limites de detecção e quantificação do método bioanalítico de PQ.....	44
Tabela 3. Estudo de estabilidade de PQ em plasma de ratos.....	45
Tabela 4. Estudo de precisão e exatidão para o método bioanalítico de PQ.	45
Tabela 5. Níveis plasmáticos de PQ em ratos Wistar após administração intravenosa em dose única de difosfato de PQ (2,44 mg/kg, n = 15, média $\pm$ IC 95).	47
Tabela 6. Parâmetros farmacocinéticos calculados através da administração intravenosa de difosfato de PQ em dose única (2,44 mg/kg, ratos Wistar, n = 15)...	49
Tabela 7. Níveis plasmáticos de PQ em ratos Wistar após administração por gavagem de difosfato de PQ em dose única (2,44 mg/kg, n=15, média $\pm$ IC 95).	50
Tabela 8. Parâmetros farmacocinéticos calculados através da administração por gavagem de difosfato de PQ em dose única (2,44 mg/kg, ratos Wistar, n = 15).....	51
Tabela 9. Níveis plasmáticos de PQ em ratos Wistar após administração intravenosa de Phe-Ala-PQ em dose única (4,38 mg/kg, n = 15, média $\pm$ IC 95).....	53
Tabela 10. Parâmetros farmacocinéticos calculados através da administração intravenosa de Phe-Ala-PQ em dose única (4,38 mg/kg, ratos Wistar, n = 15).	54
Tabela 11. Níveis plasmáticos de PQ em ratos Wistar após administração por gavagem de Phe-Ala-PQ em dose única (4,38 mg/kg, n = 15, média $\pm$ IC 95).	55
Tabela 12. Parâmetros farmacocinéticos calculados através da administração por gavagem de Phe-Ala-PQ em dose única (4,38 mg/kg, ratos Wistar, n = 15).	57

Tabela 13. Parâmetros farmacocinéticos de difosfato de PQ e PQ proveniente de Phe-Ala-PQ administrado por via intravenosa e gavagem em ratos Wistar (média $\pm$ IC 95, n = 60).	60
Tabela 14. Resultados do teste de fragilidade osmótica de eritrócitos em ratos (média (CV%), n = 30).....	72
Tabela 15. Parâmetros hematológicos dos ratos dos grupos controle, difosfato de PQ e Phe-Ala-PQ em ratos (n = 30; média $\pm$ IC 95).....	75
Tabela 16. Valores obtidos da contagem total e diferencial leucocitária dos animais em estudo (n=30; média $\pm$ IC 95).....	77

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

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

ASC_{0-t} – área sob a curva de zero a t

CLAE – cromatografia líquida de alta eficiência

CLUE – cromatografia líquida de ultra eficiência

CV – coeficiente de variação

DP – desvio padrão

EPR – erro padrão relativo

EV – Extravasular

F_{oral} – biodisponibilidade oral

F_{rel} – biodisponibilidade relativa

g – força gravitacional

HPLC – high performance liquid chromatography (cromatografia líquida de alta eficiência).

IV – intravenosa

K_a – constante de absorção

K_{el} – constante de eliminação

Lys-Arg – lisina-arginina

min – minutos

mL- mililitro

MRT – tempo de residência médio

PE – polietileno

Phe-Ala – fenilalanina-alanina

Phe-Ala-PQ – fenilalanina-alanina-primaquina

Phe-Arg – fenilalanina-arginina

PQ – primaquina

r^2 – coeficiente de determinação

r – coeficiente de correlação

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

$t_{1/2a}$ – meia vida de absorção

TFA – ácido trifluoracético

μg – microgramas

vs - versus

WHO – World Health Organization (Organização Mundial da Saúde)

RESUMO

Pesquisas na área farmacêutica têm sido realizadas com a finalidade de desenvolvimento de fármacos aplicáveis ao tratamento da doença de Chagas que possuam maior eficácia – supressão dos sintomas causados pela doença, potencialização do efeito tripanocida, menor incidência e gravidade de efeitos adversos. O pró-fármaco Phe-Ala-PQ foi planejado e sintetizado para liberação de primaquina (PQ) mediante ação enzimática da cruzaina, protease específica do *Trypanosoma cruzi*. Em estudos de atividade antichagásica *in vitro*, Phe-Ala-PQ demonstrou atividade tripanocida superior ao fármaco matriz (PQ), tornando-o uma alternativa promissora para o tratamento da doença. Neste trabalho foi investigado o perfil farmacocinético de PQ quando administrado por via intravenosa e gavagem na forma de difosfato de PQ e na forma de pró-fármaco (Phe-Ala-PQ) em ratos Wistar. Além disso, foi avaliada a hematotoxicidade da administração em doses múltiplas por gavagem de difosfato de PQ e Phe-Ala-PQ no mesmo modelo animal. Os resultados deste trabalho evidenciaram que a administração do pró-fármaco Phe-Ala-PQ reduz a oscilação da concentração plasmática de PQ e diminui a fragilidade osmótica de eritrócitos quando comparado à administração em doses múltiplas da forma comercial (difosfato de PQ). Assim, o pró-fármaco Phe-Ala-PQ apresenta algumas vantagens em relação ao uso de PQ na forma difosfatada. Ensaio adicionais de toxicidade e atividade antichagásica *in vivo* são necessários para que sejam estabelecidos os riscos *versus* benefícios desta alternativa terapêutica.

Palavras-chave: latenciação, CLAE, ratos Wistar, leucócitos, parâmetros farmacocinéticos, fragilidade osmótica de eritrócitos, doença de Chagas.

ABSTRACT

Research in the pharmaceutical field has been conducted with the aim of developing of drugs applicable to the treatment of Chagas disease having greater efficacy - the suppression of symptoms caused by the disease, potentiation of the trypanocidal effect, the lower incidence and severity of adverse events. The prodrug Phe-Ala-PQ was designed and synthesized for release of primaquine (PQ) by enzymatic action of cruzain, specific protease of *Trypanosoma cruzi*. In studies of *in vitro* antichagasic activity, the Phe-Ala-PQ showed higher trypanocidal activity compared with the drug matrix (PQ), making it a promising alternative for the treatment of disease. In this study we investigated the pharmacokinetic profile of PQ when administered intravenously and by gavage in the diphosphate form and PQ in the form of prodrug (Phe-Ala-PQ) to Wistar rats. Furthermore, we evaluated the hematotoxicity of multiple doses administration by gavage of PQ diphosphate and Phe-Ala-PQ in the same animal model. The results of this study showed that administration of the prodrug Phe-Ala-PQ reduces the oscillation of the plasma concentration of PQ and decreases the erythrocyte osmotic fragility when compared to the administration of multiple doses of the commercial form (PQ diphosphate). Thus, the prodrug Phe-Ala-PQ has some advantages over the use of PQ in diphosphate form. Additional toxicity testing and antichagasic activity *in vivo* are needed for evaluation of risks *versus* benefits of this alternative treatment.

Keywords: latention, HPLC, Wistar rats, leukocytes, pharmacokinetic parameters, erythrocyte osmotic fragility, Chagas disease.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Doença de Chagas

A doença de Chagas, também conhecida como tripanossomíase americana, é causada através da infecção pelo *Trypanosoma cruzi* (WHO, 2013; CHAGAS, 1909), protozoário cujo vetor é um inseto popularmente conhecido como barbeiro, sendo os gêneros *Panstrongylus*, *Rhodnius* e *Triatoma*, os principais agentes de transmissão (WHO, 2013; CHAGAS, 1935).

A transmissão vetorial ocorre exclusivamente no continente americano, onde existem cerca de 12 milhões de infectados; no Brasil, existem cerca de 3 milhões de chagásicos. As medidas de controle vetorial proporcionaram a eliminação da transmissão pela principal espécie (*Triatoma infestans*). A transmissão transfusional também sofreu redução importante, com o rigoroso controle de doadores de sangue e hemoderivados. Nos últimos anos, as formas de transmissão congênita e oral ganharam importância epidemiológica, sendo responsáveis por grande parte dos casos identificados (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2008).

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

Os movimentos da população das zonas rurais para as zonas urbanas da América Latina e em outras regiões do mundo têm aumentado a distribuição

geográfica e mudou a epidemiologia da doença de Chagas. Países como Espanha, Suíça, França, Japão, Austrália, Canadá e Estados Unidos, que até então não apresentavam casos de pacientes chagásicos, registram pacientes infectados. Nestes países a doença não é endêmica, porém estratégias devem centrar-se sobre a prevenção da transmissão por transfusão sanguínea, transplante de órgãos e transmissão congênita (WHO, 2013).

Na fase aguda da doença de Chagas observa-se miocardite, febre, mal-estar geral, cefaleia, astenia, edema, hipertrofia de linfonodos, hepato-esplenomegalia e meningoencefalite. Quando a infecção pelos tripanossomas se dá pela conjuntiva ocular pode ocorrer o edema bipalpebral unilateral - denominado sinal de Romanã - ou lesões em outros locais do hospedeiro - chagoma de inoculação - lesão cutânea semelhante a um furúnculo (SILVA; NAI; ROSA, 2006; RASSI; RASSI; LITTLE, 2000).

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 (SILVA; NAI; ROSA, 2006).

Na fase crônica da doença os efeitos sobre o coração - arritmias, perda da capacidade de bombeamento e hipertrofia – têm sido a principal causa de morte (RASSI; RASSI; LITTLE, 2000).

Ao longo do trato digestivo podem ocorrer lesões dos plexos nervosos e como consequência alterações da motilidade e forma dos órgãos afetados. O megaesôfago e o megacólon são as manifestações mais comuns e que determinam dificuldades de deglutição, engasgos e pneumonias por aspiração, constipação crônica e dor abdominal (MAEGAWA *et al.*, 2003).

Quando a infecção é congênita observa-se hepatomegalia, esplenomegalia, icterícia, equimoses e convulsões decorrentes da hipoglicemia (MORETTI *et al.*, 2005).

1.2. Quimioterapia da doença de Chagas

Na década de 40, o composto quinoleínico “Bayer 7.602” foi utilizado contra a tripanossomíase em modelos experimentais e em casos agudos em humanos. Na década seguinte um novo composto de arsênico e enxofre, “Spirotrypan”, foi bastante utilizado. Ambos os compostos possuem capacidade de reduzir o número, mas não extinguir os parasitas na fase aguda e, além disso, são ineficazes na fase crônica e dotados de toxicidade considerável. A doença, assim, passou a ser vista como incurável (DIAS *et al.*, 2009).

Nos anos 60, os compostos nitrofuranos foram introduzidos na terapêutica da doença de Chagas, entre esses, o nifurtimox (*Lampit®*, Bayer) foi considerado o mais eficaz por agir na fase aguda e em até alguns casos na fase crônica. Entre os efeitos adversos observados no uso de nifurtimox têm-se: anorexia, perda de peso, alterações psíquicas, excitabilidade, sonolência, náusea ou vômito e ocasionalmente cólica intestinal (DIAS *et al.*, 2009).

Com o desenvolvimento das pesquisas científicas o benznidazol (*Rochagan®*, Roche), derivado imidazólico, foi introduzido no mercado e considerado mais seletivo que o nifurtimox. Apesar da elevada toxicidade, estes medicamentos são considerados eficazes na fase aguda uma vez que possuem capacidade de eliminação dos parasitas presentes no sangue e nos tecidos, quando administrados na dose e no tempo adequado (DIAS *et al.*, 2009).

No caso do benznidazol, as reações adversas são manifestações dérmicas como reações de hipersensibilidade, dermatite com erupções cutâneas e edema generalizado. Outras manifestações frequentes são: febre, linfadenopatia, dor articular e muscular, depressão da medula óssea e, nos casos mais severos, agranulocitose. Em alguns pacientes, as reações adversas são intensas levando à necessidade de suspensão do tratamento (CASTRO *et al*, 2006).

O benznidazol na dose 5 mg/kg/dia, em duas tomadas diárias, durante 60 dias, é o tratamento específico adotado no Brasil para suprimir a parasitemia e seus efeitos patogênicos ao organismo. Este tratamento apenas não está indicado para casos crônicos, visto que nesta fase a parasitemia não tem importância significativa na evolução da doença (DIAS *et al.*, 2009).

Estudos recentes com alopurinol – análogo da hipoxantina utilizado para o tratamento da hiperuricemia -, agentes antifúngicos como cetoconazol (derivado imidazol), itraconazol, fluconazol (derivados tiazóis) e posaconazol tem mostrado ser ativos *in vitro* contra *T. cruzi*. Porém há relatos controversos na literatura em relação a resultados experimentais e clínicos (COURA, 2009).

Diante da inexistência de fármacos que atuem na fase crônica da doença e que sejam menos tóxicos ao hospedeiro, as pesquisas na área farmacêutica tem sido de extrema importância e emergenciais na busca por novas opções terapêuticas para doença de Chagas.

1.3. Planejamento e desenvolvimento do pró-fármaco de PQ

Os processos de modificação molecular merecem destaque no planejamento e desenvolvimento de novas moléculas com potencial terapêutico, entre eles, a

latenciação - transformação do fármaco em transporte inativo, que *in vivo*, mediante reação química ou enzimática, libera a porção ativa no local de ação ou próximo dele. Este processo tem sido bastante utilizado nos últimos anos, tornando-se uma das principais ferramentas na parte de planejamento de quimioterápicos específicos. Dessa forma a latenciação permite, mediante escolha de transportadores adequados, via de regra desprovidos de atividade biológica, o melhoramento das propriedades do fármaco (CHUNG; FERREIRA, 1999).

Chung (1996) e Chung e colaboradores (1997) iniciaram estudos de pró-fármacos derivados de PQ potencialmente eficazes contra a doença de Chagas. Estes pesquisadores sintetizaram, mediante emprego de latenciação, pró-fármacos dipeptídicos de PQ, aproveitando a especificidade primária da cruzaina, protease encontrada apenas no tripanossoma, e o potencial tripanocida de PQ através da formação de espécies reativas de oxigênio. Os dipeptídeos empregados foram Phe-Arg, Phe-Ala e Lys-Arg.

O fármaco matriz, PQ (Figura 1:1), foi descoberto em 1946 e tem sido objeto de inúmeras pesquisas na área farmacêutica devido à sua ampla atividade contra diferentes patógenos. A PQ é utilizada como um importante recurso terapêutico para a profilaxia e tratamento da malária. Além disso, tem uma aplicação no tratamento de pneumonia pneumocística, apresenta atividade *in vitro* leishmanicida e antichagásica (VALE *et al.*, 2009).

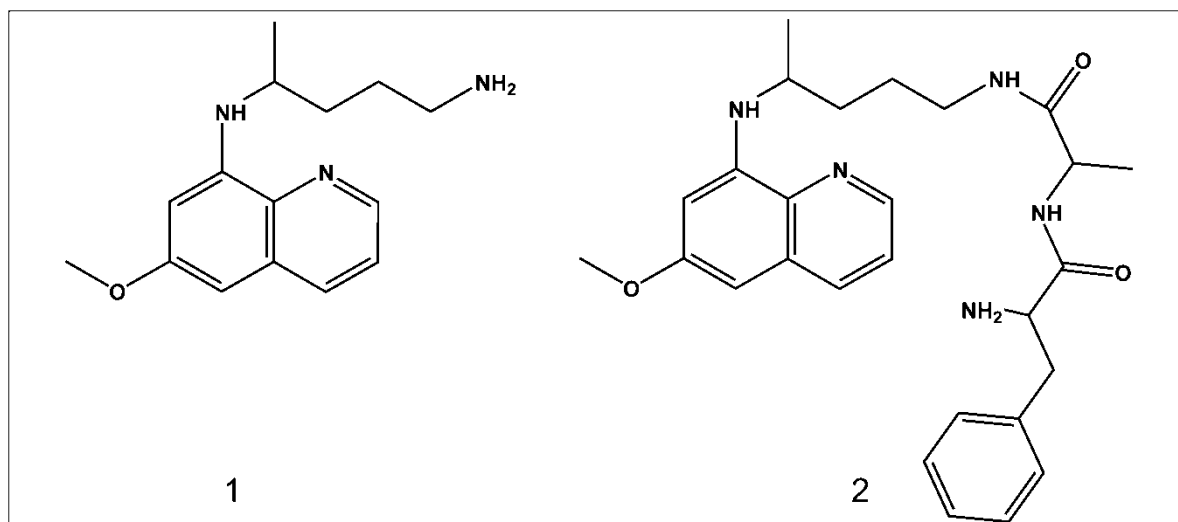


Figura 1. Representação estrutural de PQ (1) e Phe-Ala-PQ (2).

A toxicidade hematológica de PQ é um dos principais problemas para o seu uso terapêutico, este efeito é caracterizado por metemoglobinemia primária seguido por anemia hemolítica. Esta situação ocorre especialmente em indivíduos deficientes em glicose 6-fosfato desidrogenase (CHUNG *et al.*, 1997; VALE *et al.*, 2009). De acordo com Ginsburg e Krugliak (1988), o efeito hemolítico dos antimaláricos contendo grupamento quinolínico pode resultar de inchaço osmótico e este efeito é dependente da concentração. Em altas concentrações dessas substâncias é observado desestabilização da membrana celular eritrocitária (GINSBURG *et al.*, 1988), indicando assim que a concentração sanguínea destas substâncias são limitantes para o efeito hemolítico e a metemoglobinemia (GINSBURG; KRUGLIAK, 1988; BOLCHOZ *et al.*, 2001). Ainda, sabe-se que o efeito hematotóxico de PQ é agravado pelo uso repetido em doses elevadas (VALE *et al.*, 2009) e alta oscilação das concentrações plasmáticas após administração oral de difosfato de PQ. A farmacocinética de difosfato de PQ (disponível comercialmente) é caracterizada por

absorção rápida e extensa que resulta em elevados valores de concentração plasmática máxima ($C_{m\acute{a}x}$).

Sabe-se que a disposição cinética de fármacos pode ser modificada através da utilização de pró-fármacos que consiste em transportadores, tais como aminoácidos e peptídeos (CHUNG; FERREIRA, 1999). Esta abordagem tem consequências na oscilação da concentração plasmática, nas propriedades farmacológicas e toxicológicas e no regime de dose. Vários pesquisadores têm tido sucesso com esta abordagem, utilizando peptídeos para diferentes classes de fármacos, tais como antineoplásicos (TSUME *et al.*, 2008), anti-virais (ANAND *et al.*, 2004) e antiparasitários (BUNDGAARD; LARSEN; THORBECK, 1984).

Os testes iniciais de atividade antichagásica *in vitro* com estes pró-fármacos de PQ, realizados em cultura de células LLC-MK₂ infectadas com formas tripomastigotas de *T. cruzi*, demonstraram atividade antichagásica superior dos dipeptídeos de PQ em relação ao fármaco matriz PQ. Os resultados obtidos nesses estudos apontaram o fenilalanina-alanina-primaquina (Figura 1:2, Phe-Ala-PQ) como um dos mais promissores diante dos pró-fármacos avaliados (CHUNG *et al.*, 1997).

Através de estudos de estabilidade de Phe-Ala-PQ em condições que simulavam o pH gástrico e intestinal evidenciou-se que a molécula é estável nessas condições por período superior a 24 horas. Também foi avaliada a estabilidade da molécula em plasma (*ex vivo*) de ratos, onde foi observada uma rápida conversão (8 horas) de Phe-Ala-PQ a PQ, provavelmente por ação de enzimas inespecíficas do plasma (DAVANÇO *et al.*, 2012). Esse estudo levantou a hipótese de que a cinética *in vivo* de PQ derivada de Phe-Ala-PQ poderia ser diferente com relação à forma comercial (difosfato de PQ) e, assim, poderia alterar parâmetros farmacocinéticos e toxicológicos. Diante disso, neste trabalho avaliamos o perfil farmacocinético pré-

clínico (ratos Wistar) da PQ a partir das administrações do pró-fármaco Phe-Ala-PQ e também de PQ comercial (difosfato de PQ), em dose única por gavagem e pela via intravenosa, comparando-os estatisticamente. Além disso, avaliamos a hematotoxicidade de Phe-Ala-PQ e de PQ comercial em doses múltiplas via gavagem. Os parâmetros de hematotoxicidade avaliados foram hemoglobina, metemoglobina, contagem total e diferencial leucocitária, hematócrito e fragilidade osmótica de eritrócitos.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Este trabalho objetivou as avaliações da farmacocinética em dose única e hematotoxicidade em doses múltiplas de Phe-Ala-PQ - candidato a pró-fármaco de PQ para o tratamento da doença de Chagas.

2.2. Objetivos específicos

- 1- Investigação do perfil farmacocinético de difosfato de PQ administrado em dose única por gavagem e via intravenosa em ratos Wistar;
- 2- Investigação do perfil farmacocinético de PQ proveniente da administração dose única de Phe-Ala-PQ por gavagem e via intravenosa em ratos Wistar;
- 3- Comparação estatística dos parâmetros farmacocinéticos de PQ na forma de pró-fármaco e difosfatada;
- 4- Avaliação de hematotoxicidade da administração doses múltiplas (a cada 6 horas durante 4 dias) de difosfato de PQ e Phe-Ala-PQ em ratos Wistar;
- 5- Comparação dos parâmetros hematológicos entre os grupos difosfato de PQ, Phe-Ala-PQ e controle;

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Soluções padrão, solventes e reagentes

O padrão de difosfato de PQ (99,5%) para preparação da solução estoque do método bioanalítico e para administração nos animais foi adquirido da Sigma Aldrich® (New Jersey, USA). A solução estoque de PQ foi preparada em água na concentração de 100 µg/mL. A partir desta solução, foram preparadas as soluções diluídas em plasma de rato nas concentrações 0,15; 0,30; 0,60; 0,75; 1,50 e 1,80 µg/mL para a construção da curva analítica. O padrão de difenidramina (99,5%) foi utilizado como padrão interno (PI) solubilizado em metanol na concentração de 50 µg/mL e adquirido da Sigma Aldrich® (New Jersey, USA). O solvente acetonitrila empregado na fase móvel do sistema cromatográfico e metanol utilizado no procedimento analítico foram obtidos da Merck (Darmstadt, Germany), grau HPLC. O ácido trifluoracético (TFA) foi obtido da Mallinckrodt (New Jersey, USA) e empregado como solvente da fase móvel do sistema cromatográfico. As soluções de difosfato de PQ e Phe-Ala-PQ para administração por via intravenosa e gavagem nos animais foram preparadas em solução fisiológica (0,85%).

3.2. Determinação de PQ em plasma por CLAE

Sistema cromatográfico

A análise de PQ em plasma foi desenvolvida em sistema de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) Alliance[®] Waters equipado com detector UV-VS 2487, operando a 256 nm, coluna Symmetry[®] C₁₈ (4,6 x 250 mm, 5 µm) com injetor automático e utilização de pré-coluna Symmetry[®] C₁₈ (3,9 x 20 mm, 5 µm). A fase móvel foi constituída de água ultrapura (A), acetonitrila (B) e TFA 0,01% (C), operando em modo isocrático nas proporções de 45% de A; 30% de B e 25% de C, com fluxo de 0,8 mL/min. O volume de cada injeção foi de 100µL e a corrida analítica foi de aproximadamente 14 minutos.

Processamento da amostra

Na figura 2 está representado o esquema de processamento de amostra para determinação de PQ em plasma de rato.

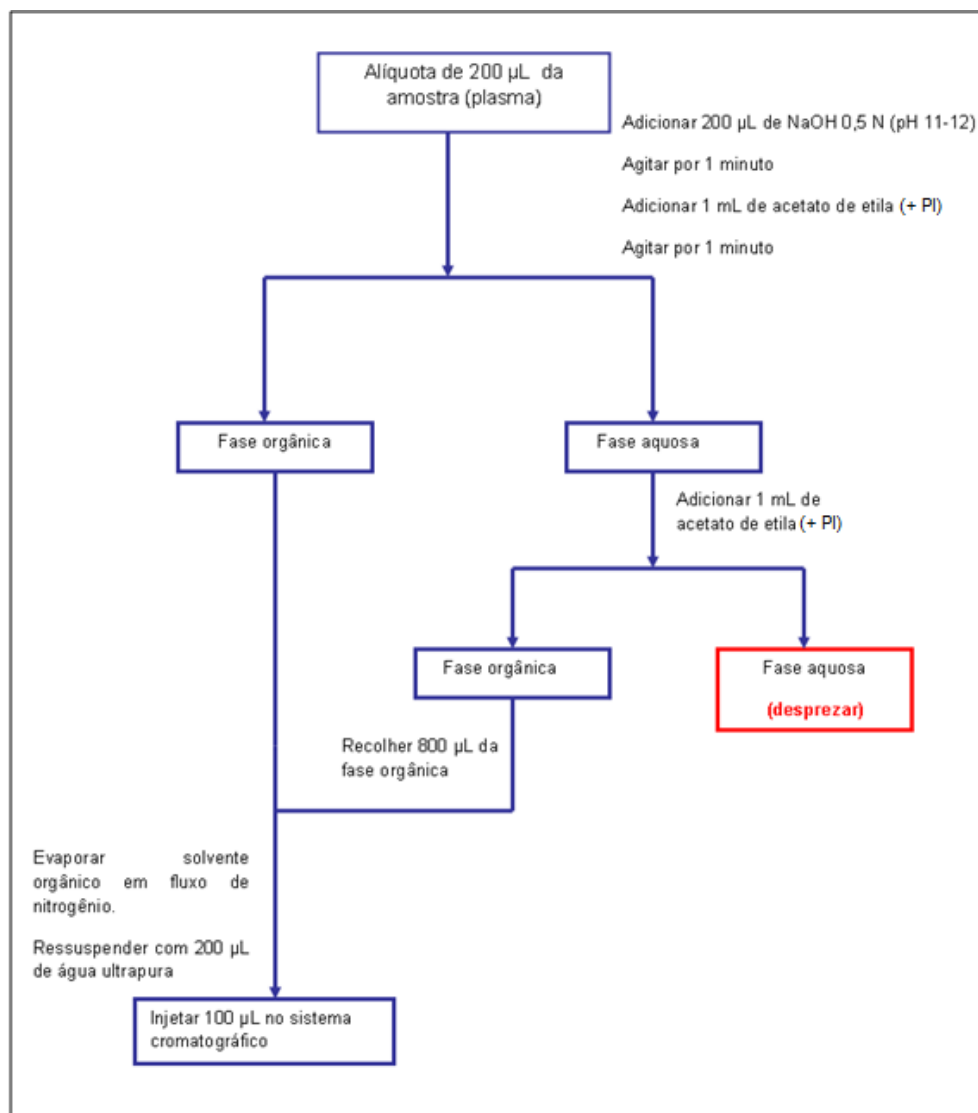


Figura 2. Processamento de amostra para determinação de PQ em plasma de rato.

3.3. Validação do método bioanalítico

O processo de validação incluiu os procedimentos necessários para a determinação dos limites de confiança do método, de acordo com as normas estabelecidas pelo *Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation* (FDA, USA) e RESOLUÇÃO-RE nº 899, de 29 de maio de 2003 (ANVISA, Brasil). O objetivo desses procedimentos foi avaliar se o método analítico desenvolvido pode ser aplicado em estudos de farmacocinética da PQ. Foram determinados, para o método desenvolvido, os parâmetros linearidade, precisão e exatidão intraensaios, precisão e exatidão interensaios, estabilidade de curta e média duração, estabilidade pós-processamento, limite de quantificação e limite de detecção.

Estudo da Linearidade - Curva analítica

A partir da determinação das condições cromatográficas, iniciou-se a padronização do método bioanalítico com a construção da curva analítica. A curva analítica foi construída para PQ plotando-se a razão da área dos picos do analito e do PI (área do analito / área do PI) *versus* a concentração nominal do analito. A curva analítica em plasma adicionado de PQ foi construída utilizando-se o procedimento de processamento da amostra (Figura 2) nas concentrações de 0,15; 0,30; 0,60; 0,75; 1,50; 1,80 µg/mL.

As amostras foram analisadas em triplicata e o método foi considerado linear na faixa de concentração cujas replicatas apresentaram coeficiente de correlação maior que 0,98 e exatidão entre 85 e 115%, exceto para o menor ponto, em que o limite foi de 80 a 120%.

Precisão e exatidão intra e interensaios

A precisão foi avaliada através dos coeficientes de variação obtidos pela análise de brancos de plasma adicionados de três concentrações diferentes de PQ 0,15 µg/mL (baixa), 0,75 µg/mL (média) e 1,50 µg/mL (alta), 5 replicatas durante 5 dias consecutivos (interensaios) e em 10 replicatas num mesmo ensaio (intraensaio), com coeficiente de variação menor que 15%. A exatidão (% erro sistemático) foi obtida através da avaliação da concordância dos resultados obtidos experimentalmente com os valores reais dos analitos na amostra, com variação menor que 15%.

Estabilidade

O ensaio de estabilidade tem como finalidade verificar se a concentração da substância sofre alterações após um período específico de armazenamento pré e pós-processamento laboratorial.

As estabilidades dos analitos foram determinadas em curta, média duração a -20°C e pós-processamento. Alíquotas foram preparadas em três concentrações diferentes, baixa, média e alta (0,15; 0,75 e 1,50 µg/mL).

Estabilidade de curta duração

A estabilidade de curta duração foi determinada após a manutenção da amostra biológica por 24 horas a temperatura ambiente, comparando-se os

resultados obtidos com as alíquotas processadas imediatamente após a diluição da amostra.

Estabilidade de média duração

A estabilidade de média duração foi analisada em três ciclos de congelamento, a -20°C , e descongelamento a temperatura ambiente, nos tempos um, dois e três dias de armazenamento, comparando-se os resultados obtidos com as determinações realizadas imediatamente após o processamento das amostras.

Estabilidade pós-processamento

Foi realizado o procedimento de extração em plasma nas três concentrações anteriormente descritas, as amostras processadas foram mantidas à temperatura ambiente e analisadas após 24 horas do processamento. A estabilidade pós-processamento foi analisada comparando-se os resultados obtidos com as determinações realizadas imediatamente após o processamento das amostras.

3.4. Estudo da farmacocinética em ratos

Foram utilizados como modelo animal ratos Wistar machos (250-300g), provenientes do biotério central de Universidade Estadual Paulista - UNESP. Os animais foram transferidos para o biotério do departamento de Princípios Ativos Naturais e Toxicologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP campus Araraquara, onde foram mantidos em condições controladas de temperatura ($23 \pm 1^{\circ}$

C), umidade ($55 \pm 5\%$) e luz (ciclo 12/12h, luzes acesas as 07h) e com acesso a alimento e água à vontade. Os experimentos foram realizados na fase de claro e os animais ficaram privados de alimento por 12 horas anteriores às administrações dos fármacos.

Foram utilizados neste estudo 60 ratos Wistar (Parecer - Comitê de Ética em Pesquisa/FCF/Car nº 21/2009 – ANEXO I) distribuídos nos seguintes grupos:

Grupo I: animais tratados com difosfato de PQ por gavagem (n=15; dose de PQ base livre = 2,44 mg/kg);

Grupo II: animais tratados com difosfato de PQ por via intravenosa (n=15; dose de PQ base livre = 2,44 mg/kg);

Grupo III: animais tratados com Phe-Ala-PQ por gavagem (n = 15; dose de Phe-Ala-PQ = 4,38 mg/kg);

Grupo IV: animais tratados com Phe-Ala-PQ por via intravenosa (n = 15; dose de Phe-Ala-PQ = 4,38 mg/kg);

A dose de PQ base livre (2,44 mg/kg) utilizada neste estudo foi calculada através da seguinte relação: 79,5 mg de difosfato de PQ são equivalentes a 45 mg de PQ base livre (RODRIGUES *et al.*, 2008) e, assim, a dose encontrada foi convertida para os animais modelo (ratos Wistar) por extrapolação alométrica considerando a dose utilizada em humanos de 45 mg (FLETCHER *et al.*, 1981). Para o pró-fármaco Phe-Ala-PQ, foi considerado o peso molecular do pró-fármaco Phe-Ala-PQ para a liberação da mesma dose de PQ no sistema biológico.

3.5. Protocolo Experimental

3.5.1. Procedimento cirúrgico em animais

Um dia antes dos experimentos os ratos foram anestesiados com uma associação de ketamina (80mg/kg de peso corporal) + xilazina (7mg/kg de peso corporal). Uma incisão foi feita na porção interna do membro posterior na sua porção mais proximal para a localização da artéria e veia femoral que foram canuladas com tubos de polietileno (PE 10 + PE 50). Esses tubos foram exteriorizados pelo dorso do animal onde foram fixados com uma linha de sutura. A incisão foi suturada e os animais monitorados até a recuperação da anestesia. Após o período de recuperação (24 horas), os animais receberam as respectivas doses de difosfato de PQ ou Phe-Ala-PQ para avaliação farmacocinética.

3.5.2. Administração intravenosa

Os animais foram mantidos em jejum 12 horas anteriores à administração. Cada substância foi administrada em dose única através da veia femoral previamente canulada. Após a administração foram realizadas coletas seriadas de sangue pela artéria femoral do animal para a construção da curva de concentração plasmática *versus* tempo. Foram colhidos 500 µL de sangue em tubos heparinizados (20 µL de heparina 50% Liquevine® 5000 UI, Roche) nos tempos 5, 15, 20, 30, 40, 60, 80, 90, 120 e 180 minutos após a administração. Para cada animal realizou-se 3

coletas (total de 1,5 mL de sangue), utilizando um total de 15 animais para cada via de administração, sendo obtidas 5 replicatas para cada tempo de coleta.

As amostras de sangue foram centrifugadas por 15 minutos a 1.600xg e os plasmas armazenados (de acordo com as condições validadas para o método bioanalítico) até o processamento da amostra para análise por CLAE.

3.5.3. Administração por gavagem

Os animais receberam difosfato de PQ ou Phe-Ala-PQ por gavagem, em dose única após jejum de 12 horas. Após a administração foram realizadas coletas seriadas de sangue pela artéria femoral anteriormente canulada para a construção da curva de concentração plasmática *versus* tempo. Foram colhidos 500 µL de sangue em tubos heparinizados (20 µL de heparina 50% Liquemine® 5000 UI, Roche) nos tempos 5, 15, 20, 30, 40, 60, 80, 90, 120 e 180 minutos após a administração. Para cada animal realizou-se 3 coletas (total de 1,5 mL de sangue), utilizando um total de 15 animais para cada via de administração, sendo utilizadas 5 replicatas para cada tempo de coleta.

As amostras de sangue foram centrifugadas por 15 minutos a 1.600xg e os plasmas armazenados (de acordo com as condições validadas no método bioanalítico) até o processamento da amostra para análise por CLAE.

3.6. Análise farmacocinética

3.6.1 Administração intravenosa

Na administração intravenosa, os parâmetros farmacocinéticos foram calculados com base nas curvas concentração plasmática *versus* tempo que assumiram perfil de modelo bicompartimental para difosfato de PQ e monocompartimental para PQ de Phe-Ala-PQ. O parâmetro meia-vida ($t_{1/2}$) foi obtido pelo método gráfico. As constantes de velocidade (α e β) foram calculadas através da equação $0.693/t_{1/2}$. A área sob a curva de zero ao tempo 180 minutos (ASC_{0-180}) foi calculada pelo método dos trapezoides e área sob a curva de zero ao infinito ($ASC_{0-\infty}$) foi calculada através da equação: $ASC_{0-\infty} = ASC_{0-180} + (Cp_n/\beta)$; onde Cp_n foi a última concentração plasmática quantificada – neste caso o tempo 180 minutos. A $ASC_{0-\infty}$ foi empregada nos cálculos do *clearance* total ($Cl_t = \text{dose} / ASC$) e o volume de distribuição foi calculado através da fórmula $Vd = Cl / \beta$. O parâmetro tempo de residência médio (MRT) foi calculado através da estatística de momentos, onde o valor de cada concentração plasmática é multiplicado pelo tempo de ocorrência para calcular a área sob o momento da curva (ASMC). A relação ASMC/ASC foi então utilizada para calcular MRT.

3.6.2 Administração por gavagem

Na administração por gavagem os parâmetros farmacocinéticos da PQ foram calculados pelos métodos acima descritos e a concentração plasmática máxima ($C_{\text{máx}}$) e o tempo para atingir $C_{\text{máx}}$ ($t_{\text{máx}}$) foram obtidos diretamente dos resultados

experimentais. Foi calculada a biodisponibilidade oral ($F_{\text{oral}}\%$) através da comparação da $ASC_{0-\infty}$ obtida na administração intravenosa e a $ASC_{0-\infty}$ obtida na administração por gavagem. Este parâmetro foi utilizado para o cálculo do CI ($CL = (\text{dose} \times F)/ASC$) para o grupo gavagem. O parâmetro tempo de residência médio (MRT) foi calculado através da estatística de momentos, onde o valor de cada concentração plasmática é multiplicado pelo tempo de ocorrência para calcular a área sob o momento da curva (ASMC). A relação $ASMC/ASC$ foi então utilizada para calcular MRT. Na tabela 1 são apresentados todos os parâmetros farmacocinéticos avaliados e suas respectivas equações.

PARÂMETRO	DESCRIÇÃO	EQUAÇÃO
$C_{\text{máx}}$	concentração plasmática máxima	método gráfico
$t_{\text{máx}}$	tempo para atingir $C_{\text{máx}}$	método gráfico
$t_{1/2} \beta$	meia vida de eliminação	gráfico log C_p vs t
β	constante de eliminação	$0,693 / t_{1/2}$
ASC_{0-t}	área sob a curva de 0 a t	método dos trapezoides
$ASC_{0-\infty}$	área sob a curva de 0 a ∞	$ASC_{0-t} + (C_{p_n}/\beta)$
Cl^*	clearance	dose x $F / ASC_{0-\infty}$
V_d^*	volume de distribuição	Cl / β
F_{oral}	biodisponibilidade oral	$(ASC_{\text{oral}}/ASC_{\text{IV}}) \times 100$
MRT	tempo de residência médio	$ASMC/ASC_{0-\infty}$
K_a	constante de absorção	método dos resíduos
$t_{1/2} \text{ abs}$	meia vida de absorção	$0,693 / K_a$

* Cl / F e V_d/F para os grupos que receberam as substâncias por gavagem e Phe-Ala-PQ IV.

Tabela 1. Parâmetros farmacocinéticos avaliados no estudo.

3.7. Avaliação hematológica

3.7.1. Modelo animal e protocolo experimental

Para avaliação hematológica, os animais foram condicionados segundo o item 3.4. Foram utilizados 30 ratos Wistar divididos em três grupos: controle, difosfato de PQ e Phe-Ala-PQ. Estes animais receberam 2 mL de solução (salina ou difosfato de PQ ou Phe-Ala-PQ) a cada 6 horas durante 4 dias. A dose de Phe-Ala-PQ foi calculada baseando-se na biodisponibilidade oral da molécula e da liberação de mesma quantidade do metabólito ativo (PQ) do grupo que recebeu PQ na forma difosfatada (Parecer - Comitê de Ética em Pesquisa/FCF/Car nº 21/2009 – ANEXO I).

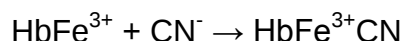
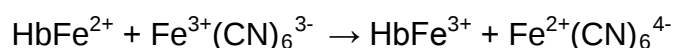
O regime posológico foi baseado no tratamento da malária em humanos por extrapolação alométrica. As extrapolações do período de administração e dose de cada fármaco para o modelo animal (ratos Wistar) estão esquematizadas no quadro a seguir.

Espécie	Período	Dose/Fármaco/Dia	Frequência
Humano	14 dias	0,64 mg/kg – primaquina*	1 dose por dia
Rato	4 dias	2,44 mg/kg – primaquina* 9,00 mg/kg – Phe-Ala-PQ**	1 dose a cada 6h

* base livre, **considerando a $F_{\text{oral}}\%$ e a bioconversão do pró-fármaco.

3.7.2. Dosagem de hemoglobina

A dosagem de hemoglobina é normalmente realizada através do método da cianometemoglobina. Neste método os compostos de hemoglobina, com exceção à sulfahemoglobina, são rapidamente convertidos a cianometemoglobina sob ação do cianeto de potássio (KCN). Basicamente, o princípio da técnica está relacionado à ação oxidante do ferricianeto sobre o Fe^{2+} da hemoglobina, para originar a metemoglobina (Fe^{3+}). Posteriormente, a metemoglobina é convertida em cianometemoglobina pela adição de cianeto de potássio (BAIN, 2006). Na reação a seguir estão representados os compostos formados:



O monômero de cianometemoglobina, $\text{HbFe}^{3+}\text{CN}$, é medido a 540 nm para o cálculo da concentração de hemoglobina.

O cálculo da concentração de hemoglobina no sangue foi estabelecido a partir da determinação da densidade óptica do padrão *Labtest*[®] em 540 nm e posteriormente multiplicando o fator pela densidade óptica da solução teste. As equações a seguir foram utilizadas para as análises de cada animal:

$$\text{Fator} = \frac{\text{Concentração do Padrão (mg/dL)}}{\text{Absorbância do Padrão}}$$

$$\text{Concentração de Hemoglobina (mg/dL)} = \text{Fator} \times \text{Absorbância do Teste}$$

3.7.3. Dosagem de metemoglobina

A determinação de metemoglobina no sangue dos animais foi realizada através do método reduzido de Naoum *et al.* (2004). Esta técnica baseia-se na avaliação da solução de hemoglobina, anteriormente estabilizada em tampão fosfato 60 M, em dois comprimentos de onda específicos para metemoglobina (630 nm) e oxiemoglobina (540 nm).

Foram preparados dois tubos (A e B). No tubo A, foi adicionada uma alíquota de sangue juntamente com solução de saponina. A solução foi agitada para ocorrer hemólise. Após isso, foi adicionado tampão fosfato 60 M e homogeneizado por inversão. No tubo B, foi adicionado 1 mL da solução do tubo A juntamente com tampão fosfato 60 M.

O tubo A foi lido no comprimento de onda de 630 nm, acertando-se o zero do espectrofotômetro com tampão fosfato 60 M. O tubo B foi lido em 540 nm, sendo zerado o aparelho como descrito anteriormente.

Para o cálculo da concentração em porcentagem de metemoglobina, utilizou-se a fórmula a seguir:

$$\% \text{ de metemoglobina} = [A] \text{ Tubo A} \times 100 / [A] \text{ Tubo A} + ([A] \text{ Tubo B} \times 10)$$

Os valores de metemoglobina foram comparados entre todos os grupos, e o valor encontrado para o grupo controle como a concentração basal (normal).

3.7.4. Contagem total e diferencial de leucócitos

Contagem total

Para contagem total de leucócitos aplicou-se o líquido de Turk. Este reagente é composto de ácido acético 2% (lisar eritrócitos) e violeta genciana (corar o núcleo dos leucócitos). Após aplicação do corante, a solução foi inserida na câmara de Neubauer para contagem dos leucócitos em microscópio.

Foram contadas todas as células dos quadrantes externos do retículo da câmara e aplicada a fórmula:

$$\text{n}^\circ \text{ de leucócitos contados nos 4 quadrados} \times 50 = \text{número de leucócitos/mm}^3$$

Contagem diferencial

Realizou-se a contagem diferencial de leucócitos para obtenção da quantidade relativa e absoluta dos diferentes tipos de leucócitos no sangue periférico dos animais dos três grupos em estudo.

Foi utilizado um esfregaço sanguíneo em lâmina, corado pelo método panótico rápido e quantificado em microscópio com uma objetiva de imersão (100x).

3.7.5. Avaliação da fragilidade osmótica de eritrócitos

Para a execução do teste, foi preparada uma solução estoque de cloreto de sódio tamponada, osmoticamente equivalente a NaCl a 100 g/L. Desta

solução, foi preparada outra na concentração de 10 g/L, desta última partiu-se as diluições de 1,0; 2,0; 3,0; 3,5; 4,0; 4,5; 5,0; 5,5; 6,5; 7,0; 7,5 e 8,5 g/L em tubos cônicos numerados de 1 a 12. No 13º tubo foi adicionado somente água. Posteriormente, adicionou-se 20 µL de sangue total heparinizado obtido a partir da decapitação de cada animal. Os tubos ficaram em repouso por 30 minutos a temperatura ambiente e, então, submetidos à centrifugação a 1.600xg por 5 minutos. Após este procedimento, determinou-se a densidade óptica (D.O.) do sobrenadante em espectrofotômetro a 540 nm, zerando-se o equipamento com o sobrenadante do tubo nº 1, representativo do branco ou 0% de hemólise. O sobrenadante do tubo nº13 representou o padrão de hemólise ou 100% de hemólise.

Para o cálculo da porcentagem de hemólise de cada sobrenadante, aplicou-se a equação a seguir:

$$\text{Porcentagem de hemólise (\%)} = \frac{\text{D.O. do sobrenadante}}{\text{D.O. do padrão (tubo nº13)}} \times 100$$

3.7.6. Hematócrito

A técnica do micro-hematócrito baseia-se na fração ocupada de eritrócitos em uma coluna de sangue centrifugado presente em um capilar.

O sangue heparinizado é aspirado por capilaridade e, através de centrifugação a 13.000xg por aproximadamente 5 minutos, são separados os

elementos sólidos da fase líquida constituinte do sangue total. Os eritrócitos são os principais constituintes da fase sólida sanguínea. Ainda, na fase sólida encontra-se uma pequena camada de leucócitos e plaquetas posicionada na interface sólido/líquido do sangue centrifugado.

A determinação da fração de eritrócitos é dada em porcentagem através da análise do capilar em um cartão de leitura.

3.8. Análise Estatística

Os resultados dos parâmetros farmacocinéticos e hematológicos de cada grupo estão apresentados através das médias e intervalo de confiança 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% para a comparação entre os grupos. Foram empregados os programas GraphPad InStat® e Origin®.

4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1. Validação do método bioanalítico

O estudo da disposição cinética de fármacos e seus metabólitos requer disponibilidade de métodos bioanalíticos com sensibilidade e seletividade compatíveis com as suas concentrações plasmáticas observadas na administração de doses únicas ou múltiplas.

A determinação de PQ em formulações e plasma de animais de experimentação tem sido descrita por vários autores (DUA *et al.*, 1996; DWIVEDI *et al.*, 2003; DONGRE *et al.*, 2008), que utilizam CLAE ou cromatografia líquida de ultra eficiência (CLUE), detectores *Photo Diode Array* (PDA) ou UV, colunas com fase estacionária apolar (C₁₈ ou C₈) e fases móveis compostas por soluções tampões com pH's na faixa do neutro à ácido.

O sistema cromatográfico desenvolvido neste trabalho resultou na separação da PQ e PI (padrão interno, difenidramina) com formação de picos proporcionais à concentração e sem interferência de componentes presentes no plasma de animais como representado na figura 3.

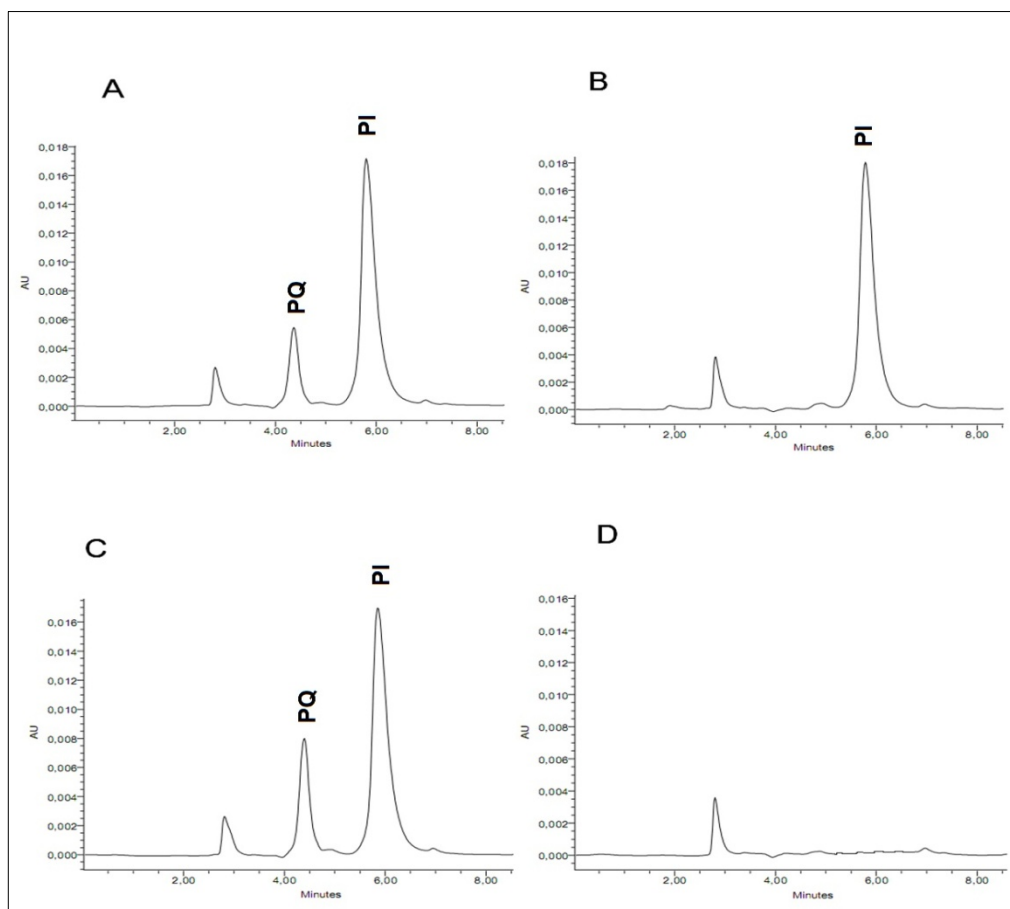


Figura 3. Representação dos cromatogramas do método desenvolvido: (A) PQ 0,75 $\mu\text{g/mL}$ e PI 50 $\mu\text{g/mL}$; (B) PI 50 $\mu\text{g/mL}$; (C) PQ 1,50 $\mu\text{g/mL}$ e PI 50 $\mu\text{g/mL}$; (D) plasma branco.

Linearidade

A curva analítica em plasma (Figura 4) foi construída no intervalo de 0,15 – 1,80 $\mu\text{g/mL}$, com coeficiente de correlação (r) de 0,9973. Avaliou-se que a porcentagem de desvio das concentrações calculadas foi sempre inferior a 15%, inferindo que as curva obtida possuem a exatidão necessária para a validação do método em questão. O método foi, então, considerado linear na faixa de concentração de 0,15 a 1,80 $\mu\text{g/mL}$.

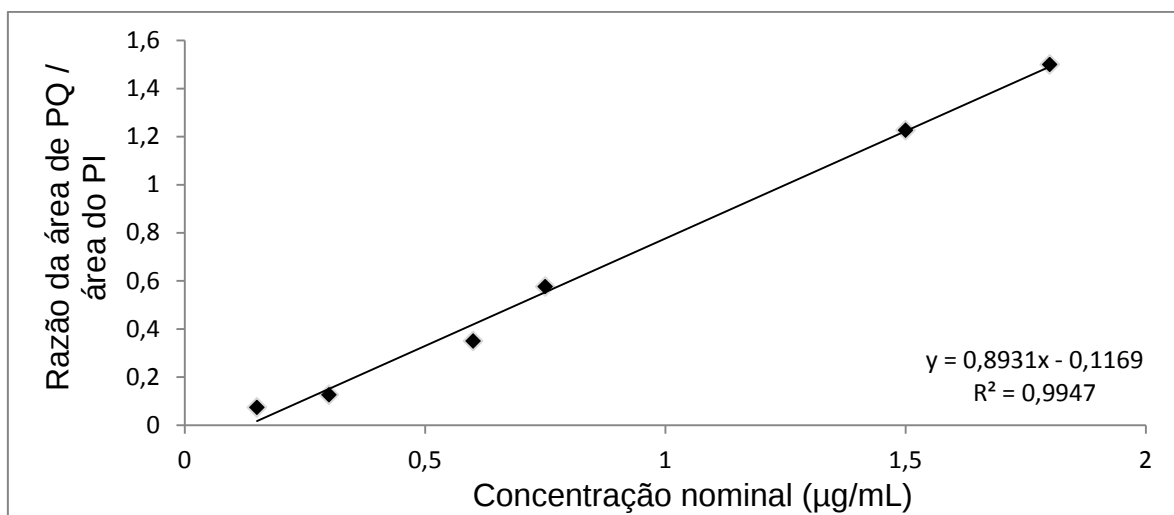


Figura 4. Curva analítica para determinação de PQ em plasma.

Limite de quantificação e detecção

Os limites de quantificação (LQ) e detecção (LD) foram definidos em 0,15 e 0,10 µg/mL, respectivamente. Para o limite de detecção foi atendido a recomendação de ser superior a três vezes ao ruído da linha de base do cromatograma. Para o limite de quantificação seguiu-se a recomendação da área do analito ser cinco vezes superior ao ruído da linha de base. Na tabela 2 são apresentados os valores médios (triplicata) de precisão e exatidão para cada limite estabelecido.

	Concentração µg/mL	Precisão CV(%)	Exatidão EPR (%)
LD	0,10	15,1	17,6
LQ	0,15	13,1	14,3

Tabela 2. Coeficiente de variação (CV) e erro padrão relativo (EPR) obtidos para os limites de detecção e quantificação do método bioanalítico de PQ.

Estudo de estabilidade

Os desvios dos valores de concentração obtidos nos estudos de estabilidade de curta duração, média duração e pós-processamento foram inferiores a 15% em relação à concentração obtida na amostra processada seguidamente ao preparo. Esses resultados apontam que as amostras foram estáveis nas condições e período de armazenamento avaliados. Na tabela 3 são apresentados os valores médios obtidos no estudo de estabilidade para o método bioanalítico de PQ.

	Concentração (µg/mL)	Desvio em relação ao valor inicial (%)		
Curta duração	0,15	6,5		
	0,75	3,8		
	1,50	4,3		
Média duração		Dia 1	Dia 2	Dia 3
	0,15	9,6	3,8	5,6
	0,75	13,9	1,6	2,6
	1,50	11,9	0,9	1,6
Pós-processamento	0,15	12,4		
	0,75	0,2		
	1,50	10,1		

Tabela 3. Estudo de estabilidade de PQ em plasma de ratos.

Precisão e Exatidão

Os coeficientes de variação obtidos nos estudos de precisão intraensaio e interensaios em plasma foram inferiores a 15%, conforme os valores médios apresentados na tabela 4.

Concentração (µg/mL)	Precisão intraensaio CV (%)	Exatidão intraensaio EPR (%)	Precisão interensaio CV (%)	Exatidão interensaio EPR (%)
0,15	1,2	9,9	4,0	10,9
0,75	1,4	4,2	5,6	-2,1
1,50	2,2	-4,8	7,3	-6,1

Tabela 4. Estudo de precisão e exatidão para o método bioanalítico de PQ.

Diante dos parâmetros de validação avaliados e seus resultados em conformidade com a regulação seguida (FDA, USA; ANVISA, BRASIL), o método bioanalítico desenvolvido foi considerado adequado para avaliação farmacocinética de PQ em plasma de ratos.

4.2. Análise farmacocinética

A seguir são apresentados os resultados da avaliação farmacocinética de cada grupo deste trabalho através da média dos valores e seus respectivos intervalos de confiança (IC 95). Os valores de todos os animais e grupos são apresentados nos ANEXOS II, III, IV e V.

4.2.1. Administração intravenosa de difosfato de PQ

Na tabela 5 estão demonstrados os valores médios das concentrações plasmáticas de PQ com seus respectivos intervalos de confiança a cada tempo de coleta. O perfil farmacocinético para este grupo está graficamente representado na figura 5.

Tempo (min)	Concentração plasmática (µg/mL)
5	1,69 (1,36 – 2,02)
15	1,44 (0,91 – 1,97)
20	1,34 (1,19 – 1,49)
30	0,79 (0,5 – 1,16)
40	0,82 (0,6 – 1,01)
60	0,69 (0,4 – 0,99)
80	0,38 (0,18 – 0,58)
90	0,3 (0,17 – 0,42)
120	0,25 (0,20 – 0,29)
180	ND*

* ND = não detectado.

Tabela 5. Níveis plasmáticos de PQ em ratos Wistar após administração intravenosa em dose única de difosfato de PQ (2,44 mg/kg, n = 15, média ± IC 95).

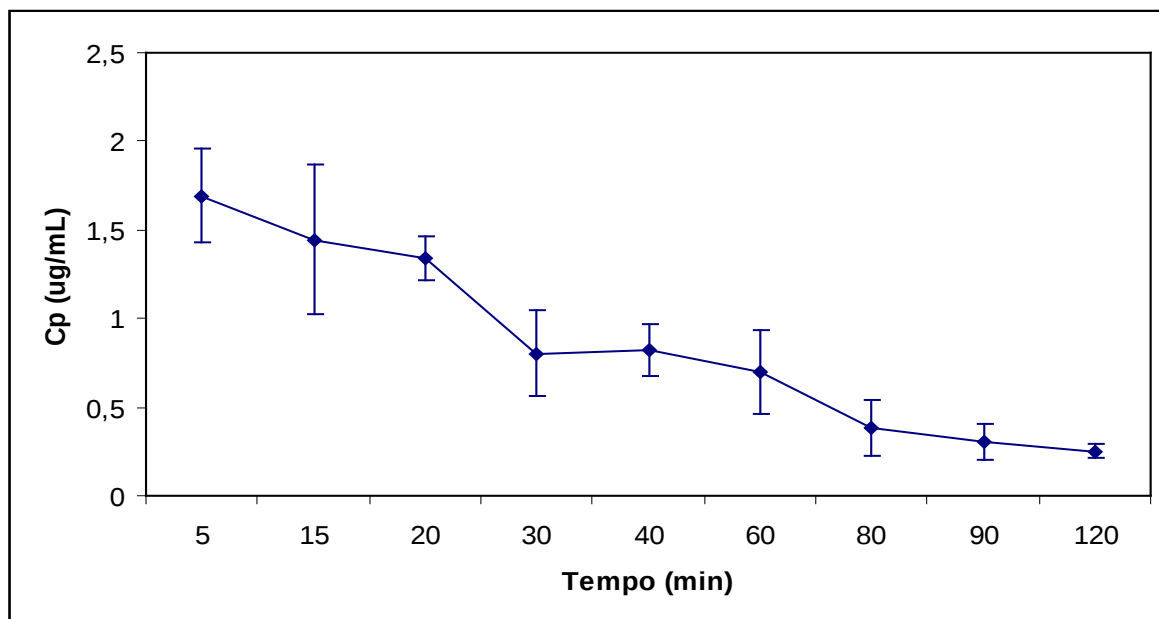


Figura 5. Perfil farmacocinético de difosfato de PQ em ratos Wistar administrado por via intravenosa em dose única (2,44 mg/kg, n = 15, média $\pm$ IC 95).

Os resultados de concentração plasmática obtidos permitiram a utilização do modelo bicompartimental para a análise farmacocinética. Os parâmetros farmacocinéticos calculados para este grupo são apresentados na tabela 6.

Parâmetro	Média	DP	CV %	IC 95 (-)	IC 95 (+)
β (min^{-1})	0,0066	0,0013	20,32	0,0049	0,0082
$t_{1/2\beta}$ (min)	107,80	17,21	15,97	86,42	129,18
ASC _{0-t} ($\mu\text{g/mL}\cdot\text{min}$)	97,48	21,50	21,49	73,34	126,73
ASC _{0-∞} ($\mu\text{g/mL}\cdot\text{min}$)	139,90	26,26	18,77	107,34	172,56
Relação das areas	0,71	0,07	9,93	0,62	0,80
Cl ($\text{mL}\cdot\text{min}/\text{Kg}$)	17,89	3,08	17,21	14,06	21,71
Vd (L/kg)	2,74	0,43	15,79	2,20	3,28
MRT (min)	55,50	7,61	13,71	46,05	64,95
α (min^{-1})	0,0507	0,0160	31,63	0,0307	0,0704
$t_{1/2\alpha}$ (min)	14,34	4,17	28,35	9,53	19,90

Tabela 6. Parâmetros farmacocinéticos da PQ calculados através da administração intravenosa de difosfato de PQ em dose única (2,44 mg/kg, ratos Wistar, n = 15).

4.2.2 Administração por gavagem de difosfato de PQ

Os animais deste grupo receberam dose única (n = 15; 2,44 mg/Kg) de difosfato de PQ por gavagem após jejum de 12 horas. As coletas de sangue foram realizadas nos tempos 5; 15; 20; 30; 40; 60; 80; 90; 120; 180 minutos em diferentes animais para a construção da curva de concentração plasmática vs tempo. Na tabela 7 estão demonstrados os valores médios das concentrações plasmáticas de PQ com seus respectivos intervalos de confiança a cada tempo de coleta. O perfil farmacocinético para este grupo está graficamente representado na figura 6.

Tempo (min)	Concentração plasmática ($\mu\text{g/mL}$)
5	0,27 (0,16 – 0,40)
15	0,85 (0,40 – 1,3)
20	1,24 (0,72 – 1,77)
30	0,75 (0,53 – 0,99)
40	0,6 (0,36 – 0,84)
60	0,41 (0,17 – 0,66)
80	0,45 (0,40 – 0,49)
90	0,32 (0,21 – 0,44)
120	0,32 (0,24 – 0,41)
180	0,21 (0,14 – 0,29)

Tabela 7. Níveis plasmáticos de PQ em ratos Wistar após administração por gavagem de difosfato de PQ em dose única (2,44 mg/kg, n=15, média $\pm$ IC 95).

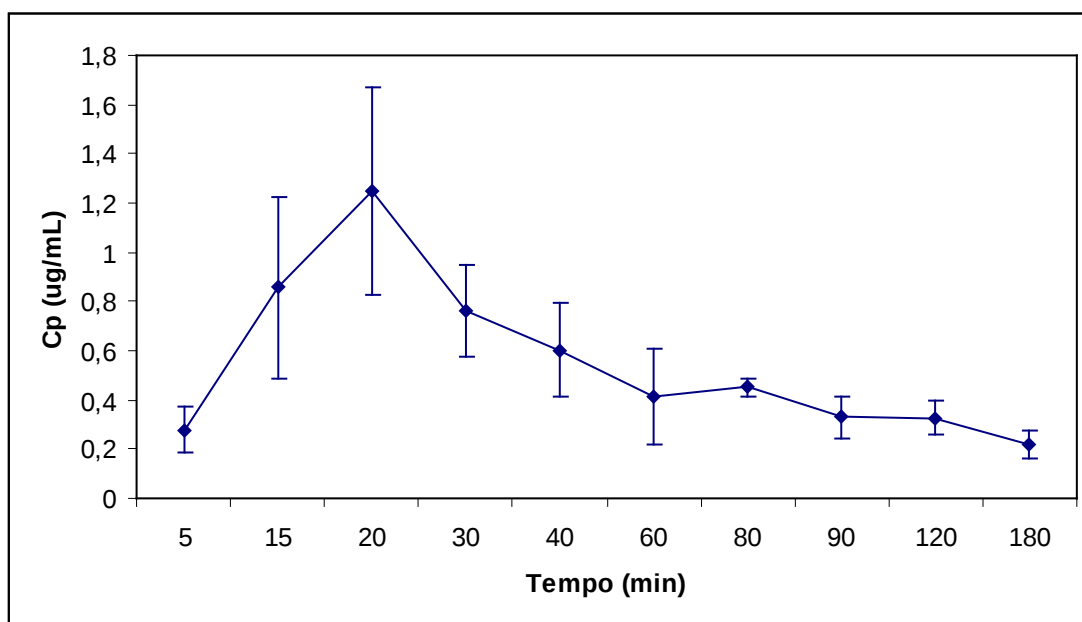


Figura 6. Perfil farmacocinético de difosfato de PQ em ratos Wistar administrado por gavagem em dose única. (2,44 mg/kg, n = 15, média $\pm$ IC 95).

Os resultados de concentração plasmática obtidos permitiram a utilização do modelo bicompartimental para a análise farmacocinética. Os parâmetros farmacocinéticos calculados estão apresentados na tabela 8.

Parâmetros	Média	DP	CV %	IC 95 (-)	IC 95 (+)
β (min ⁻¹)	0,0054	0,0005	10,14	0,0047	0,0068
$t_{1/2}\beta$ (min)	129,36	12,65	9,78	113,65	145,07
ASC _{0-t} (µg/mL.min)	76,84	21,11	27,47	50,63	103,06
ASC _{0-∞} (µg/mL.min)	117,64	31,86	27,08	78,08	157,20
Relação das areas	0,65	0,01	2,69	0,63	0,67
Cl / F (mL/min.kg)	22,06	6,33	28,69	14,20	29,92
Vd / F (L/kg)	4,13	1,39	33,81	2,40	5,87
C _{máx} (µg/mL)	1,2484	0,42	33,68	0,77	1,77
T _{máx} (min)	20	0	0	20	20
α (min ⁻¹)	0,0918	0,0267	29,18	0,0585	0,1251
$t_{1/2}\alpha$ (min)	8,25	3,07	37,27	4,43	12,07
Ka (min ⁻¹)	0,2011	0,0276	13,72	0,1669	0,2354
$t_{1/2} a$ (min)	3,49	0,49	14,04	2,88	4,11
F _{oral} (%)	83,73	14,45	17,26	65,78	101,68
MRT (min)	71,60	2,39	3,34	68,632	74,57

Tabela 8. Parâmetros farmacocinéticos da PQ calculados através da administração por gavagem de difosfato de PQ em dose única (2,44 mg/kg, ratos Wistar, n = 15).

A comparação entre os perfis farmacocinéticos obtidos para a PQ após a administração do difosfato de PQ pelas vias intravenosa e gavagem possibilitou o cálculo de biodisponibilidade oral (F_{oral}) – tabela 8.

Na figura 7 está apresentado graficamente a sobreposição do perfil farmacocinético obtido para as duas vias de administração de difosfato de PQ avaliadas neste trabalho.

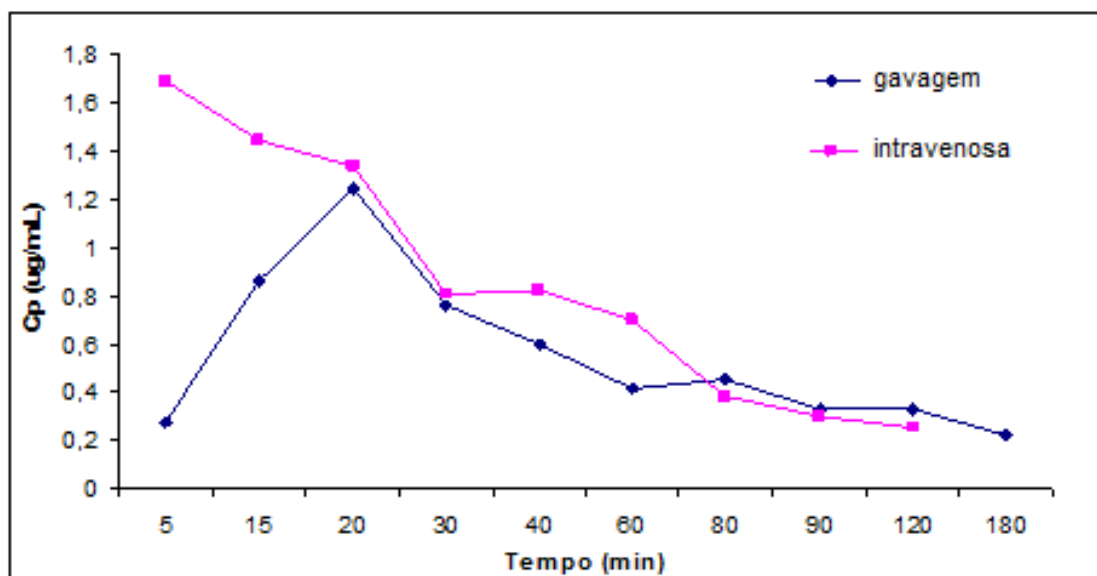


Figura 7. Comparação dos níveis plasmáticos médios das duas vias de administração para difosfato de PQ (ratos Wistar, n = 30).

4.2.3 Administração intravenosa de Phe-Ala-PQ

Os animais deste grupo receberam dose única (n = 15; 4,38 mg/Kg) de Phe-Ala-PQ pela veia femoral após jejum de 12 horas. As coletas de sangue foram realizadas nos tempos 5; 15; 20; 30; 40; 60; 80; 90; 120; 180 minutos em diferentes animais para a construção da curva de concentração plasmática vs tempo a partir da liberação da porção ativa (PQ) do pró-fármaco. Na tabela 9 estão demonstrados os valores médios das concentrações plasmáticas da PQ proveniente da administração intravenosa de Phe-Ala-PQ com seus respectivos intervalos de confiança a cada tempo de coleta. O perfil farmacocinético de PQ proveniente de Phe-Ala-PQ está graficamente representado na figura 8.

Tempo (min)	Concentração plasmática (µg/mL)
5	0,66 (0,42 – 0,98)
15	0,52 (0,32 – 0,75)
20	0,54 (0,31 – 0,71)
30	0,38 (0,28 – 0,57)
40	0,42 (0,35 – 0,52)
60	0,39 (0,33 – 0,49)
80	0,38 (0,16 – 0,62)
90	0,31 (0,16 – 0,48)
120	0,23 (0,20 – 0,24)
180	0,14 (0,13 – 0,15)

Tabela 9. Níveis plasmáticos de PQ em ratos Wistar após administração intravenosa de Phe-Ala-PQ em dose única (4,38 mg/kg, n = 15, média ± IC 95).

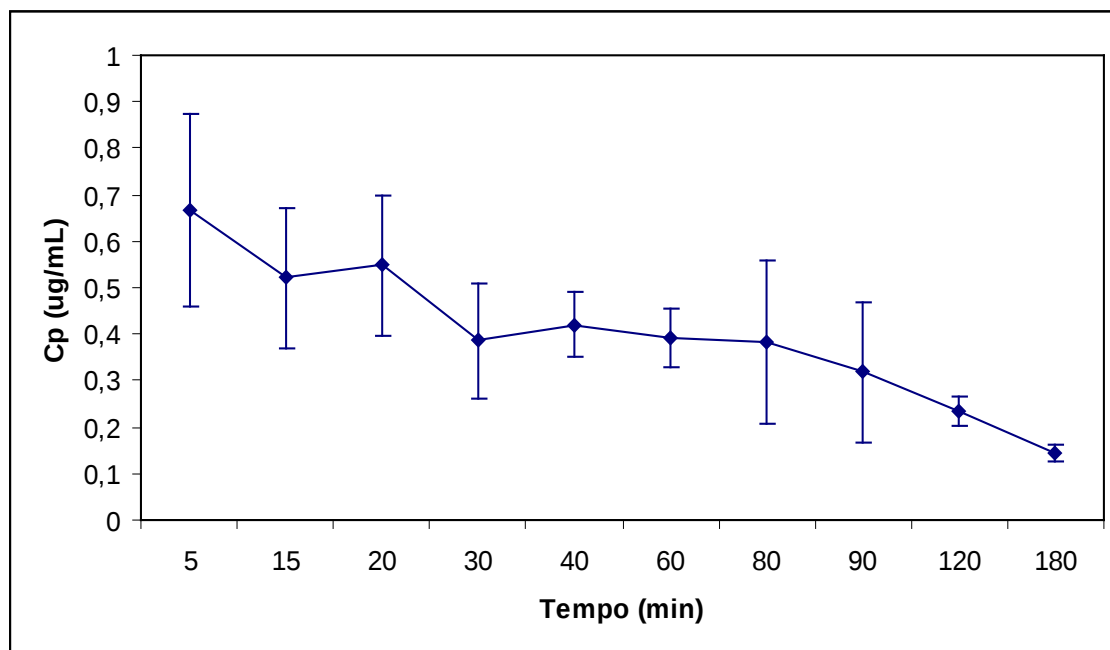


Figura 8. Perfil farmacocinético de PQ proveniente de Phe-Ala-PQ administrado em ratos Wistar por via intravenosa (4,38 mg/kg, n = 15, média ± IC 95).

Os resultados de concentração plasmática obtidos permitiram a utilização do modelo monocompartimental para a análise farmacocinética. Os parâmetros farmacocinéticos calculados estão apresentados na tabela 10.

Parâmetro	Média	DP	CV %	IC 95 (-)	IC 95 (+)
k_{el} (min^{-1})	0,0076	0,0011	15,00	0,0062	0,009
$t_{1/2elim.}$ (min)	92,95	14,828	15,95	74,54	111,36
ASC_{0-t} ($\mu\text{g/mL}\cdot\text{min}$)	58,05	15,364	26,46	38,97	77,12
$ASC_{0-\infty}$ ($\mu\text{g/mL}\cdot\text{min}$)	77,63	14,202	18,29	60,00	95,27
Relação das áreas	0,74	0,07	10,13	0,64	0,83
MRT (min)	70,22	2,5148	3,58	67,10	73,344

Tabela 10. Parâmetros farmacocinéticos de PQ calculados através da administração intravenosa de Phe-Ala-PQ em dose única (4,38 mg/kg, ratos Wistar, n = 15).

4.2.4 Administração por gavagem de Phe-Ala-PQ

Os animais deste grupo receberam dose única ($n = 15$; 4,38 mg/Kg) de Phe-Ala-PQ por gavagem após jejum de 12 horas. As coletas de sangue foram realizadas nos tempos 5; 15; 20; 30; 40; 60; 80; 90; 120 e 180 minutos em diferentes animais para a construção da curva de concentração plasmática vs tempo. Na tabela 11 estão demonstrados os valores médios das concentrações plasmáticas da PQ proveniente de Phe-Ala-PQ com seus respectivos intervalos de confiança a cada tempo de coleta. O perfil farmacocinético para este grupo está graficamente representado na figura 9.

Tempo (min)	Concentração plasmática ($\mu\text{g/mL}$)
5	0,18 (0,11 – 0,25)
15	0,20 (0,15 – 0,25)
20	0,20 (0,15 – 0,24)
30	0,19 (0,16 – 0,22)
40	0,20 (0,15 – 0,26)
60	0,27 (0,19 – 0,35)
80	0,28 (0,21 – 0,35)
90	0,20 (0,15 – 0,26)
120	0,18 (0,15 – 0,22)
180	0,11 (0,09 – 0,13)

Tabela 11. Níveis plasmáticos de PQ em ratos Wistar após administração por gavagem de Phe-Ala-PQ em dose única (4,38 mg/kg, $n = 15$, média $\pm$ IC 95).

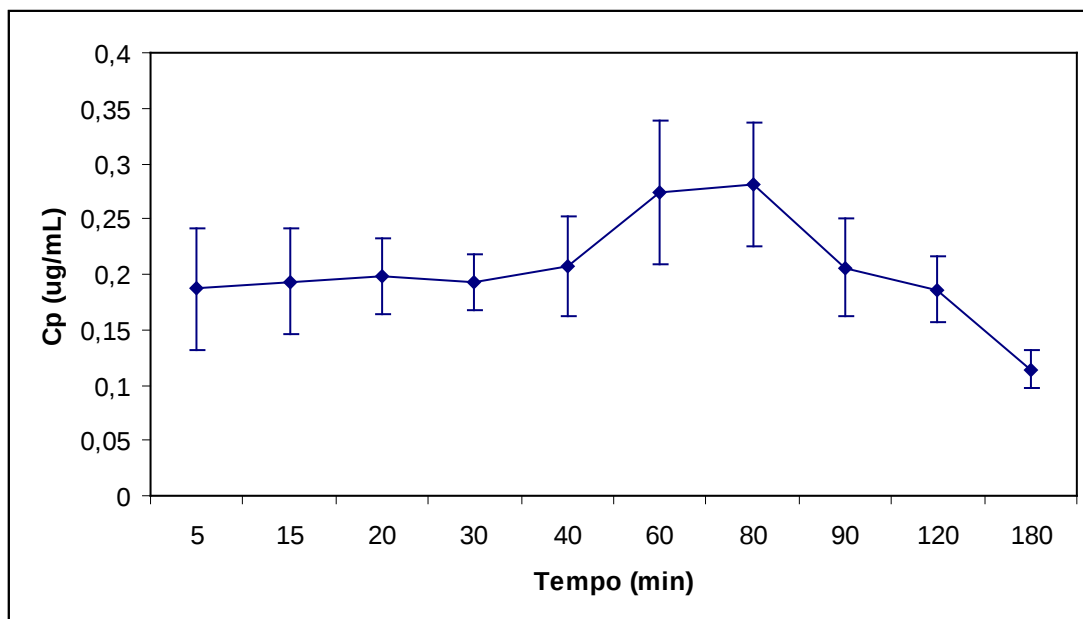


Figura 9. Perfil farmacocinético de PQ proveniente de Phe-Ala-PQ administrado em ratos Wistar por gavagem (4,38 mg/kg, n = 15, média $\pm$ IC 95).

Os resultados de concentração plasmática obtidos permitiram a utilização do modelo monocompartimental para a análise farmacocinética. Os parâmetros farmacocinéticos calculados estão apresentados na tabela 12.

Parâmetro	Média	DP	CV %	IC 95 (-)	IC 95 (+)
k_{el} (min ⁻¹)	0,0082	0,0015	18,088	0,0064	0,0100
$t_{1/2elim.}$ (min)	87,01	17,50	20,12	65,27	108,75
ASC _{0-t} (µg/mL.min)	34,62	6,24	18,03	26,87	42,37
ASC _{0-∞} (µg/mL.min)	48,88	6,49	13,29	40,81	56,95
Relação das areas	0,70	0,06	9,05	0,62	0,78
C _{máx} (ug/mL)	0,29	0,06	21,486	0,21	0,37
T _{máx} (min)	72	10,95	15,21	58,40	85,60
MRT (min)	83,87	2,1315	2,5412	81,23	86,52
Ka (min ⁻¹)	0,0030	0,0012	39,55	0,0015	0,0045
$t_{1/2}$ abs (min)	261,92	106,19	40,543	130,09	393,76

Tabela 12. Parâmetros farmacocinéticos de PQ calculados através da administração por gavagem de Phe-Ala-PQ em dose única (4,38 mg/kg, ratos Wistar, n = 15).

A comparação entre os perfis farmacocinéticos obtidos para a PQ após a administração de Phe-Ala-PQ pelas vias intravenosa e gavagem possibilitou o cálculo de biodisponibilidade oral (F_{oral}) – tabela 12.

Na figura 10 está apresentado graficamente a sobreposição do perfil farmacocinético de PQ obtido para as duas vias de administração de Phe-Ala-PQ avaliadas neste trabalho.

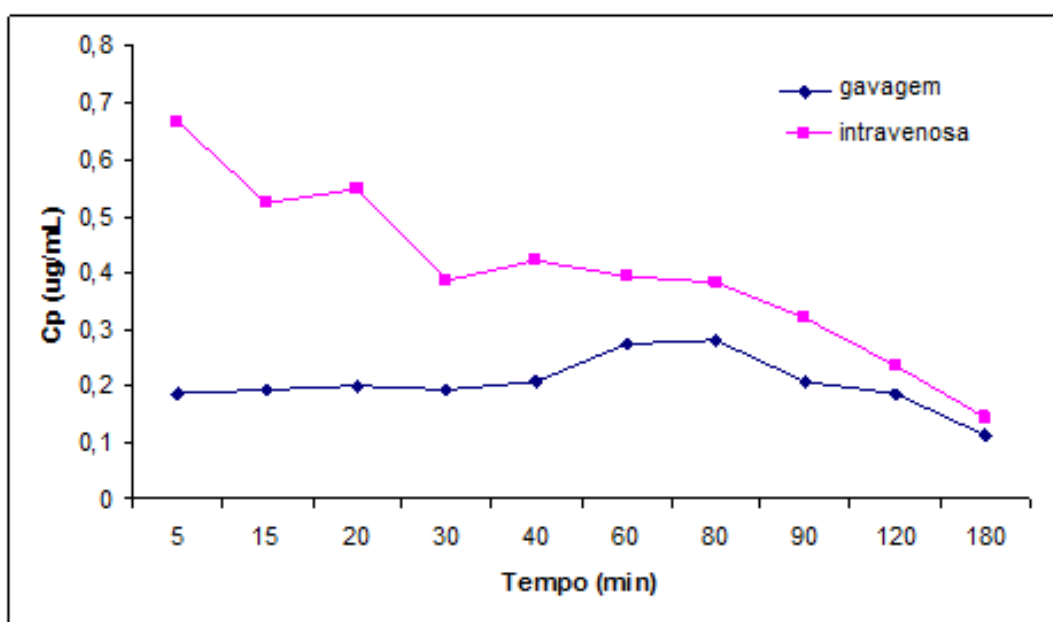


Figura 10. Comparação dos níveis plasmáticos médios das duas vias de administração para PQ proveniente de Phe-Ala-PQ (ratos Wistar, n = 30).

4.3. Comparação Estatística da Farmacocinética

A análise estatística foi realizada utilizando-se a versão 5.0 do programa Graphpad Prism® para *Windows*. O intervalo de confiança estabelecido foi de 95% e considerado significativo um valor de $p < 0,05$.

Primeiramente analisou-se a distribuição entre os parâmetros farmacocinéticos das cinco curvas dentro de cada grupo (Kolmogorov-Smirnov), todos os parâmetros apresentaram distribuição normal dentro de cada grupo indicando uma distribuição normal dos resultados e a possibilidade de utilização de testes paramétricos para fins comparativos entre os grupos. No entanto, considerando o pequeno numero de resultados (n=5), optou-se pela utilização de um teste não paramétrico para a comparação entre os grupos (*Mann-Whitney test*).

Na tabela 13 foram apresentados todos os resultados de parâmetros farmacocinéticos de todos os grupos em estudos e as devidas comparações entre os grupos.

O resultado destas comparações estatísticas permitiu discutir algumas questões relacionadas ao comportamento do pró-fármaco no sistema biológico e compará-lo a administração de difosfato de PQ.

	Gavagem		Intravenosa	
	difosfato de PQ	PQ de Phe-Ala-PQ	difosfato de PQ	PQ de Phe-Ala-PQ
k_{el} (min^{-1})	0,0054 ^{a*} (0,0047 – 0,0068)	0,0082 (0,0063 – 0,0100)	-	0,0076 (0,0061 – 0,0090)
β (min^{-1})	-	-	0,0066 (0,0049 – 0,0082)	-
$t_{1/2\beta}$ (min)	129,3 ^{a*} (113,6 – 145,1)	87,01 (65,27 – 108,7)	107,8 (86,42 – 129,2)	92,95 (74,54 – 111,3)
ASC _{0-∞} ($\mu\text{g/mL}\cdot\text{min}$)	117,6 ^{a*} (78,08 – 157,2)	48,88 ^{b**} (40,81 – 56,95)	139,9 (107,3 – 172,5)	77,63 (60,01 – 95,27)
CI ($\text{mL}/\text{min}\cdot\text{kg}$)	22,06 ^{a**} (14,20 – 29,92)	-	17,89 (14,06 – 21,71)	18,69 (14,07 – 23,32)
CI/F ($\text{mL}/\text{min}\cdot\text{kg}$)	-	50,54 ^{b**} (43,26 – 57,82)	-	-
Vd (L/kg)	4,14 ^{a*} (2,40 – 5,88)	-	2,74 (2,20 – 3,28)	2,51 (1,74 – 3,27)
Vd/F (L/kg)	-	6,34 ^{b**} (4,39 – 8,33)	-	-
C _{máx} ($\mu\text{g/mL}$)	1,24 ^{a**} (0,77 – 1,77)	0,29 (0,21 – 0,37)	1,69 ^{c**} (1,36 – 2,02)	0,66 (0,40 – 0,93)
T _{máx} (min)	20 ^{a**} (20 - 20)	72 (58 - 85)	5,0 (5,0 – 5,0)	5,0 (5,0 – 5,0)
C _{min} ($\mu\text{g/mL}$)	0,21 ^{a*} (0,14 – 0,29)	0,11 (0,09 – 0,13)	0,25 ^{c**} (0,20 – 0,30)	0,14 (0,13 – 0,15)
k _a (min^{-1})	0,2011 ^{a**} (0,1669–0,2354)	0,0030 (0,0015 – 0,0045)	-	-
$t_{1/2\alpha}$ (min)	3,49 ^{a**} (2,89 – 4,11)	261 (130 - 393)	-	-
F _{oral} %	83,7 ^{a**} (65,7 - 101)	35,3 (30,5 – 40,1)	-	-
F _{rel} %	-	-	-	57,8 (36,4 – 77,5)
MRT (min)	71,6 (68,6 – 74,5)	83,8 ^{b***} (81,2 – 86,5)	55,5 (46,05 – 64,95)	70,2 (67,1 – 73,3)

^a = difosfato de PQ gavagem vs PQ de Phe-Ala-PQ gavagem; ^b = PQ de Phe-Ala-PQ gavagem vs difosfato de PQ intravenosa; ^c = difosfato de PQ intravenosa vs PQ de Phe-Ala-PQ intravenosa; * = p<0,05; ** = p<0,01; *** = p<0,001; - = não aplicado.

Tabela 13. Parâmetros farmacocinéticos de difosfato de PQ e PQ proveniente de Phe-Ala-PQ administrado por via intravenosa e gavagem em ratos Wistar (média ± IC 95, n = 60).

Área sob a curva (ASC)

A área sob a curva (ASC) da concentração plasmática vs tempo expressa a extensão de absorção do fármaco administrado por determinada via, sendo de extrema importância para o cálculo de biodisponibilidade (quantidade do fármaco administrado que efetivamente atinge a circulação sanguínea).

A comparação das ASC's ($0-\infty$) entre as duas vias de administração do difosfato de PQ não apresenta diferença estatística, essa proximidade dos valores permite-nos inferir que a absorção do fármaco pela via oral é efetiva e que o mesmo não apresenta metabolismo pré-sistêmico significativo. Resultados compatíveis aos estudos em humanos realizados por Mihaly *et al* (1985).

No caso da administração de Phe-Ala-PQ gavagem, este parâmetro foi estatisticamente diferente entre as vias de administração, proporcionando biodisponibilidade oral (F_{oral}) de 35,3%. Este resultado sugere que Phe-Ala-PQ apresenta metabolismo pré-sistêmico (gerando metabólitos que não seja a PQ) ou baixa permeabilidade para ser absorvido por esta via.

Esta característica foi considerada para ajuste de dose nos estudos de hematotoxicidade em doses múltiplas.

Tempo de Residência Médio (MRT)

Este parâmetro farmacocinético representa o tempo (minutos ou horas) em que cerca de 63% da dose administrada é eliminada do organismo.

O tempo de residência médio (MRT) é um parâmetro dependente da forma farmacêutica e sua via de administração e, considerando que a administração intravenosa não apresenta a fase de absorção, é esperado que o MRT entre as duas vias seja diferente.

Comparando as duas vias de administração para cada substância, observa-se aumento de MRT nos grupos que receberam as respectivas substâncias por gavagem, porém essa variação não foi estatisticamente significativa ($p > 0,05$). A variação entre as substâncias também não foi estatisticamente significativa, apesar do aumento de MRT para o grupo que recebeu Phe-Ala-PQ. Somente observamos variação estatisticamente significativa ($p < 0,001$) quando se compara o grupo PQ de Phe-Ala-PQ gavagem com difosfato de PQ intravenosa, isso pode ser explicado pela somatória de fenômenos ocorridos nesta via. No caso da administração de Phe-Ala-PQ por gavagem, existe o processo de absorção que pode aumentar MRT e também o fato de existir o tempo de conversão do pró-fármaco em PQ. No caso da administração de difosfato de PQ por via intravenosa, a PQ já está em sua forma livre para que seja metabolizada e excretada, enquanto que na forma de pró-fármaco exige a ação das enzimas plasmáticas como descrito em estudos anteriores.

Constante de Eliminação (β)

A constante de eliminação (β) é um parâmetro farmacocinético que caracteriza a velocidade com que ocorrem os processos de eliminação (metabolização e excreção).

Os fatores intervenientes nos processos de biotransformação e excreção são: indução/inibição enzimática, polimorfismo e função renal/hepática.

Na administração de difosfato de PQ e Phe-Ala-PQ não se observa diferença estatística entre as duas vias de administração.

No entanto, quando se compara as duas substâncias em relação a administração por gavagem, há aumento significativo de β (0,0054 vs 0,0082 min⁻¹) para o grupo que recebeu Phe-Ala-PQ. Esse fator pode estar associado ao metabolismo hepático mais acentuado de PQ quando está sob a forma de Phe-Ala-PQ, levando a uma excreção mais rápida de PQ.

Meia-vida de eliminação ($t_{1/2\beta}$)

Este parâmetro farmacocinético é útil para selecionar o intervalo de dose de um regime posológico, para prever o grau de flutuação da concentração plasmática durante o intervalo de dose, prever quanto tempo será necessário para atingir-se o estado de equilíbrio, 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* e meia vida de eliminação. O *clearance* expressa a capacidade do organismo de eliminar o fármaco e a meia vida expressa a taxa total de eliminação do fármaco na fase terminal da curva de concentração plasmática vs tempo; e este processo envolve tanto o

clearance quanto a extensão de distribuição. Assim, é possível inferir que a meia vida de eliminação é um parâmetro híbrido do *clearance* e do volume de distribuição (TOUTAIN; BOUSQUET-MELOU, 2004b).

A comparação estatística dos grupos gavagem das duas substâncias demonstra diferença estatística significativa entre elas em relação à $t_{1/2}\beta$ (129,3 vs 87,01 minutos). A PQ proveniente da administração de difosfato de PQ apresenta meia vida de eliminação superior à administração de Phe-Ala-PQ. Isso condiz com as variações encontradas em β para o grupo gavagem de PQ de Phe-Ala-PQ, visto que PQ pode ser mais metabolizada na forma de pró-fármaco do que quando é administrada na forma difosfatada e, assim, excretada mais rapidamente fazendo com que a $t_{1/2}\beta$ diminua.

Uma meia vida longa também pode estar relacionada a um alto volume de distribuição ou a um *clearance* baixo. O impacto de V_d sobre a meia vida é observado na fase terminal da curva de concentração plasmática versus tempo, que, para o fármaco ser eliminado, ele deve estar disponível para os órgãos responsáveis pela sua degradação, que em geral, estão contidos no compartimento central. Se o fármaco ficar retido no compartimento periférico, o processo de *clearance* será dificultado e a meia vida será longa (PECCININI, 2010). Porém, conforme os dados apresentados, os valores de V_d não tiveram diferença significativa entre os grupos, com isso, supõe que o a baixa $t_{1/2}\beta$ do grupo Phe-Ala-PQ esteja relacionada ao metabolismo hepático.

Clearance (Cl)

Clearance (Cl) 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 (TOUTAIN; BOUSQUET-MELOU, 2004a; HARDMAN; LIMBIRD, 2003).

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.

O valor de Cl para o difosfato de PQ não foi estatisticamente diferente para as duas vias de administração, isto porque se trata de um parâmetro mais robusto que não sofre tanta interferência da via de administração e sim depende dos processos fisiológicos puros (metabolismo e excreção).

Comparando Cl dos grupos gavagem, nota-se diferença estatística entre as substâncias. O Cl de PQ proveniente de Phe-Ala-PQ teve aumento significativo em relação à administração de difosfato de PQ. Essa alteração reforça a hipótese de que a PQ proveniente de Phe-Ala-PQ pode ser mais metabolizada hepaticamente quando comparada a forma difosfatada. Outra hipótese possível é a metabolização de Phe-Ala-PQ a outros derivados que não sejam o fármaco matriz (por exemplo, Ala-PQ).

Volume de distribuição (Vd)

O volume de distribuição (Vd) 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-MELOU, 2004c; HARDMAN; LIMBIRD, 2003).

O padrão de distribuição de um fármaco no organismo depende de suas propriedades físico-químicas e dos padrões fisiológicos do organismo em que se encontram. Assim, a distribuição de fármacos sofre influência de fatores como: perfusão sanguínea, extensão de ligação às proteínas plasmáticas, características físico-químicas do produto, grau e extensão de penetração através das membranas e barreiras biológicas e extensão de eliminação.

Comparando os grupos de animais que receberam as substâncias por gavagem, percebemos aumento (4,14 vs 6,34 L/kg) significativo em Vd para o grupo que recebeu PQ na forma de Phe-Ala-PQ. Apesar de essa característica contradizer a proposta de que uma molécula com alto CI deve ter baixo Vd, entende-se que o alto Vd do grupo PQ de Phe-Ala-PQ gavagem foi o que fez com que $t_{1/2\beta}$ não fosse muito mais baixa em relação ao grupo difosfato de PQ. O alto CI e o alto Vd fez com que houvesse um “equilíbrio” e isso não teve grande impacto sobre $t_{1/2\beta}$. O alto Vd de PQ proveniente Phe-Ala-PQ pode estar relacionado à latenciação desse fármaco matriz, o fato de Phe-Ala-PQ ser convertido a PQ com ação das enzimas plasmáticas pode ser uma explicação para o alto Vd apresentado por esse grupo.

Biodisponibilidade Oral ($F_{\text{oral}}\%$)

A biodisponibilidade é a quantidade da dose administrada que alcança a circulação sistêmica do paciente e a velocidade com que isto ocorre.

Alguns fatores podem alterar a biodisponibilidade: dissolução do fármaco, características de absorção da formulação utilizada, forma química (éster, sal), via de administração, estabilidade do princípio ativo, extensão do efeito de primeira passagem, entre outros.

Um fator interveniente na biodisponibilidade é a formulação farmacêutica. Qualquer modificação na utilização de formulações durante uma terapia requer uma reavaliação da dose utilizada, com o objetivo de manter-se a quantidade que deve ser absorvida para a manutenção da concentração plasmática.

A biodisponibilidade é avaliada através de dois parâmetros essenciais: a extensão e velocidade de absorção.

A extensão de absorção é quantificada através do cálculo da área sob a curva (ASC) construída após a administração do fármaco (curva concentração plasmática vs tempo).

A comparação estatística entre as duas formulações demonstra diferença significativa ($p < 0,05$) entre elas. A biodisponibilidade oral do difosfato de PQ foi superior a PQ de Phe-Ala-PQ (83,7 vs 35,3%), vários fatores podem ser discutidos sobre tal diferença, como: propriedades físico-químicas das moléculas, metabolismo pré-sistêmico, entre outros.

O cálculo de $F_{\text{oral}}\%$ de PQ proveniente de Phe-Ala-PQ foi essencial para estabelecer o regime posológico do tratamento dos animais nos ensaios de hematotoxicidade em doses múltiplas.

Constante de Absorção (k_a)

Este parâmetro expressa a velocidade de absorção de fármacos a partir do local de administração, estando intimamente relacionado à biodisponibilidade (F) e a concentração máxima ($C_{\text{máx}}$).

Fármacos absorvidos rapidamente atingem picos plasmáticos superiores daqueles absorvidos com menor velocidade; sendo este fator importante na compreensão da diferença de intensidade de efeitos entre fármacos.

As duas substâncias apresentaram diferença estatística ($p < 0,05$) em relação a este parâmetro, sendo o k_a do difosfato de PQ muito superior ao grupo que recebeu Phe-Ala-PQ, essa diferença prediz que o tempo para atingir a concentração máxima será menor para a formulação comercial em relação ao pró-fármaco. Essa variação de valor deste parâmetro para as formulações também pode ser esclarecida com a comparação de biodisponibilidade das duas formas, sendo que F_{oral} da formulação comercial foi superior a do grupo que recebeu Phe-Ala-PQ. Outro fator que pode ser considerado neste parâmetro é a hidrólise por enzimas plasmáticas que o pró-fármaco precisa sofrer para a liberação do fármaco matriz, isso retarda o tempo em que o fármaco livre estará disponível na circulação sistêmica.

Meia-vida de absorção ($t_{1/2abs}$)

É um parâmetro farmacocinético que expressa o tempo necessário para que a metade de uma determinada concentração seja absorvida. Se a constante de absorção for alta, conseqüente, a meia vida de absorção será baixa. Assim, para fármacos com k_a elevados, seus picos plasmáticos serão alcançados mais rapidamente.

A comparação estatística das substâncias demonstra diferença ($p < 0,01$) entre elas em relação a este parâmetro (3,49 vs 261 minutos), fator já esperado quando se tem diferença entre k_a . A meia vida de absorção de difosfato de PQ foi bem inferior a do pró-fármaco, sendo isso determinante para diferença no tempo para atingir a concentração máxima na circulação sistêmica. É necessário relatar que este aumento na meia vida de absorção é essencialmente influenciado pela hidrólise enzimática do pró-fármaco em plasma, pois a taxa de conversão do pró-fármaco em sua forma ativa somará com a taxa de absorção do pró-fármaco.

Concentração Máxima ($C_{máx}$)

É um parâmetro farmacocinético importante para observação dos níveis plasmáticos do fármaco e assim prever efeitos tóxicos em determinadas posologias. A concentração máxima é atingida quando há equilíbrio entre a velocidade de absorção e a velocidade de eliminação.

A concentração plasmática máxima das duas formulações foi comparada estatisticamente e apresentaram diferença entre elas ($p < 0,01$). O valor de $C_{\text{máx}}$ do difosfato de PQ foi superior a de PQ proveniente de Phe-Ala-PQ. Como descrito anteriormente, a biodisponibilidade de Phe-Ala-PQ é menor em comparação com a forma comercial, essa é uma das causas dessa diferença de $C_{\text{máx}}$. Outro fator que deve ser considerado é a hidrólise do pró-fármaco na circulação sistêmica, o tempo decorrido para que o pró-fármaco seja hidrolisado em plasma faz com que as concentrações plasmáticas não alcancem aquelas da PQ administrada na forma de difosfato.

O fato da administração do pró-fármaco manter concentrações plasmáticas relativamente baixas (dentro da faixa terapêutica) é uma das vantagens da molécula, pois isso mantém os níveis plasmáticos mais constantes, gerando um perfil farmacocinético mais seguro quando comparado à formulação comercial (difosfato de PQ).

Tempo para atingir a concentração máxima ($t_{\text{máx}}$)

Este parâmetro farmacocinético, como descrito anteriormente, é o tempo necessário para que haja equilíbrio entre a fase alfa (fase de absorção) e fase beta (fase de eliminação). O $T_{\text{máx}}$ é dependente da constante de absorção, se o fármaco for absorvido rapidamente os valores de $T_{\text{máx}}$ serão menores, ao contrário de um fármaco de absorção lenta, em que os valores de $T_{\text{máx}}$ são maiores.

Comparando estatisticamente as duas substâncias por este parâmetro farmacocinético encontramos diferença significativa ($p < 0,01$). A PQ proveniente de

Phe-Ala-PQ apresenta $T_{\text{máx}}$ superior à difosfato de PQ, isso condiz com as discussões feitas anteriormente, em que o tempo para a conversão do pró-fármaco em sua forma ativa determina um período maior para que as concentrações máximas sejam atingidas.

Os valores de $T_{\text{máx}}$ e $C_{\text{máx}}$ são fundamentais para o planejamento do regime posológico da molécula em estudos posteriores.

4.4. Avaliação hematológica

4.4.1. Teste de Fragilidade Osmótica de Eritrócitos

O teste de fragilidade osmótica de eritrócitos foi realizado com o sangue proveniente da decapitação de cada animal ao final do experimento. As médias dos resultados do teste de fragilidade osmótica de eritrócitos estão apresentados na tabela 14. Os dados de todos os animais dos grupos avaliados estão expostos nos ANEXOS VI, VII e VIII.

Nas figuras 11, 12 e 13 estão representados, respectivamente, os gráficos de fragilidade osmótica de eritrócitos para os grupos controle, difosfato de PQ e Phe-Ala-PQ. A sobreposição de todas as curvas de fragilidade osmótica de eritrócitos está ilustrada na figura 14.

Concentração NaCl (g/dL)	Porcentagem de hemólise (%)		
	controle	dif. de PQ	Phe-Ala-PQ
0,00	100 (0,00)	100 (0,00)	100 (0,00)
0,10	95,46 (12,66)	91,01 (17,74)	95,89 (8,30)
0,20	96,14 (7,70)	90,94 (20,22)	96,89 (8,50)
0,30	95,76 (10,77)	87,76 (18,91)	94,09 (10,00)
0,35	87,19 (16,80)	87,41 (20,12)	92,55 (13,00)
0,40	61,71 (42,10)	66,19 (30,63)	69,97 (27,00)
0,45	13,22 (64,00)	45,84 (66,00) ^a	21,37 (85,00)
0,50	0 (0,00)	21,77 (141,80) ^a	5,78 (284,00)
0,55	0 (0,00)	2,559 (316,20)	0 (0,00)
0,60	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)
0,65	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)
0,75	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)
0,85	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)

^a – $p < 0,05$ em relação ao grupo controle;

Tabela 14. Resultados do teste de fragilidade osmótica de eritrócitos em ratos (média (CV%), n = 30).

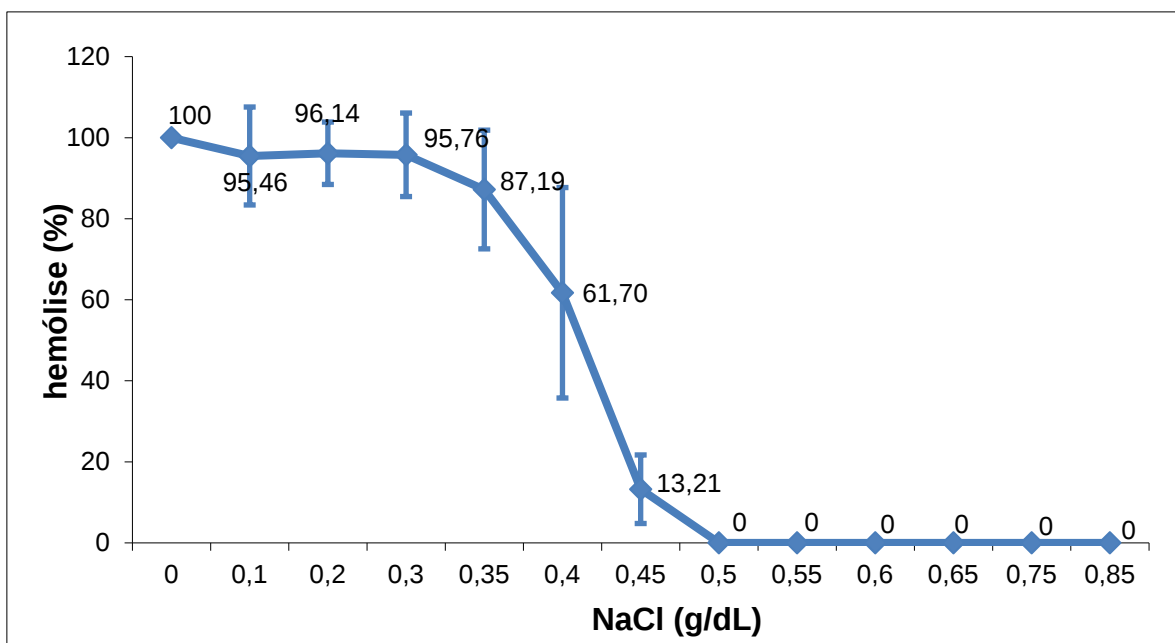


Figura 11. Curva de fragilidade osmótica de eritrócitos em ratos do grupo controle (n=10; média $\pm$ CV%).

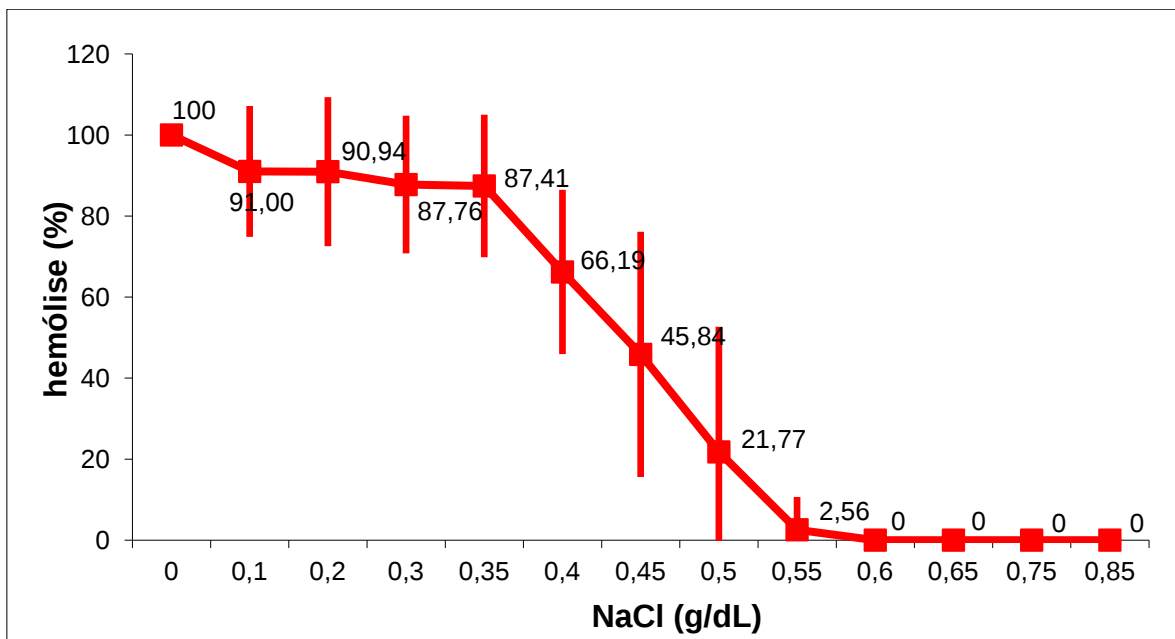


Figura 12. Curva de fragilidade osmótica de eritrócitos em ratos do grupo difosfato de PQ (n=10; média $\pm$ CV%).

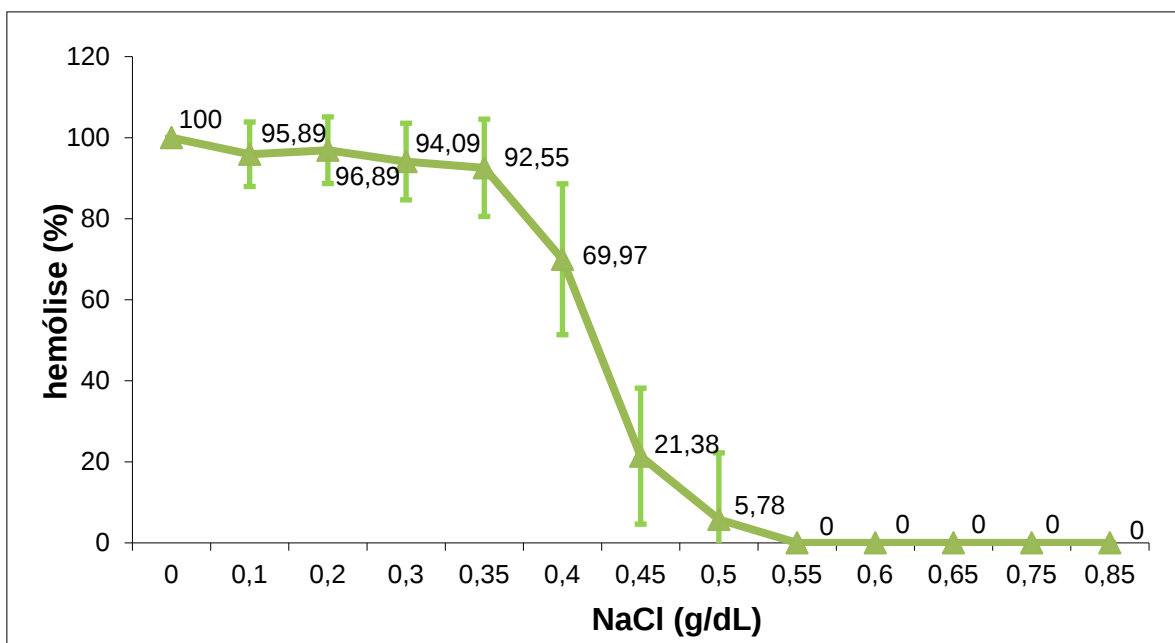


Figura 13. Curva de fragilidade osmótica de eritrócitos em ratos do grupo Phe-Ala-PQ (n=10; média $\pm$ CV%).

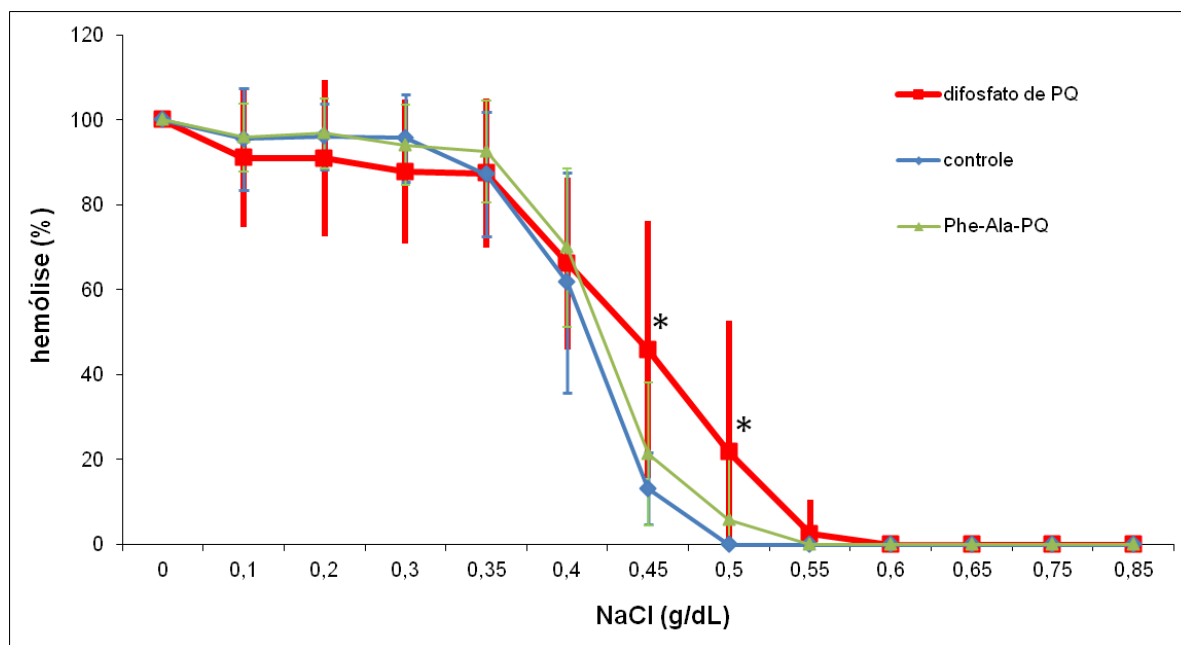


Figura 14. Curvas de fragilidade osmótica de eritrócitos dos três grupos de animais (n=30; média $\pm$ CV%) * = $p < 0,05$.

Os resultados do teste de fragilidade osmótica de eritrócitos apontam vantagem do pró-fármaco Phe-Ala-PQ em relação à administração de difosfato de PQ. Nas concentrações 0,45 e 0,50 g/dL de NaCl, há diminuição significativa no índice de hemólise para os eritrócitos dos animais do grupo exposto ao Phe-Ala-PQ. Essa alteração pode estar relacionada ao sistema de liberação lenta da forma ativa proveniente da nova molécula (conversão de Phe-Ala-PQ a PQ por ação de enzimas plasmáticas), fator importante na diminuição de um dos principais efeitos adversos no tratamento com PQ – a anemia hemolítica.

4.4.2. Hematócrito, hemoglobina e metemoglobina

A avaliação da série vermelha pode fornecer informações de possíveis anemias, a avaliação hematológica do grupo controle foi utilizada como o estado de normalidade dos animais, e assim, este grupo foi comparado aos demais. Na tabela 15 estão apresentados os parâmetros hematológicos avaliados para os três grupos de animais do estudo.

Parâmetro	Controle	difosfato de PQ	Phe-Ala-PQ
hemoglobina (mg/dL)	12,39 (11,63 - 13,16)	10,08 (8,57 - 11,59)	11,76 (11,38 - 12,14)
hematócrito (%)	45 (43 - 46)	46 (44 - 48)	47 (45 - 48)
metemoglobina (%)	4,86 (3,25 - 6,48)	3,89 (3,39 - 4,40)	3,65 (3,45 - 3,85)

Tabela 15. Parâmetros hematológicos dos ratos dos grupos controle, difosfato de PQ e Phe-Ala-PQ em ratos (n = 30; média ± IC 95).

As concentrações de hemoglobina dos animais foram determinadas através do método da cianometemoglobina já descrito anteriormente.

A partir da técnica do micro-hematócrito foram calculados as porcentagens de eritrócitos de cada animal.

A administração múltipla das substâncias em estudo não causou alterações significativas nos parâmetros avaliados quando comparado ao grupo controle (considerado normal).

4.4.3. Contagem total e diferencial de leucócitos

A avaliação da série branca foi realizada através da contagem total e diferencial de leucócitos.

Na tabela 16 está apresentado o número de leucócitos total e a contagem diferencial absoluta e relativa para cada grupo em estudo. Os valores dos animais do grupo controle foram considerados como normais para comparação estatística entre os grupos.

		controle		difosfato de PQ		Phe-Ala-PQ	
		Relativa (%)	Absoluta (nº de células)	Relativa (%)	Absoluta (nº de células)	Relativa (%)	Absoluta (nº de células)
Neutrófilos	Segmentados	22,9 (16,8 - 28,9)	1041 (807 - 1276)	11,6 ^a (8,15 - 15,0)	516 ^a (403 - 629)	9,00 ^a (2,55 - 15,4)	895 (163 - 1626)
	Bastonetes	0,20 (0,00 - 0,60)	10 (0 - 34)	0,11 (0,00 - 0,36)	6 (0 - 19)	0	0
	Eosinófilos	1,10 (0,47 - 1,72)	51 (20 - 83)	2,10 (0,77 - 3,42)	97 (43 - 151)	0,40 (0,00 - 1,51)	40 (0 - 152)
	Linfócitos	69,5 (64,6 - 74,4)	3349 (2628 - 4069)	83,9 ^a (78,9 - 88,9)	4123 (3200 - 5046)	83,0 ^a (75,8 - 90,2)	7691 ^{a,b} (5947 - 9976)
	Monócitos	6,30 (4,68 - 7,92)	305 (197 - 412)	2,30 ^a (0,86 - 3,73)	96 ^a (52 - 140)	7,60 ^b (0,06 - 15,1)	812 ^b (0 - 1728)
Leucócitos (/mm³)		4765 (3980 - 5549)		4840 (3973 - 5706)		8700 ^{a,b} (5623 - 11777)	

^a – p<0,05 em relação ao grupo controle; ^b – p<0,05 em relação ao grupo difosfato de PQ.

Tabela 16. Valores obtidos da contagem total e diferencial leucocitária dos animais em estudo (n=30; média ± IC 95).

Através dos resultados expostos na tabela 16, é possível observar alterações na concentração de alguns tipos de leucócitos nos grupos submetidos a administração múltiplas de difosfato de PQ e Phe-Ala-PQ.

Nos animais tratados com difosfato de PQ ou Phe-Ala-PQ é observado neutropenia (queda significativa de neutrófilos no sangue), característico de sensibilidade do organismo ao tratamento crônico com o fármaco matriz. É relatado que o tratamento crônico com PQ causa alterações na membrana das células sanguíneas, principalmente em eritrócitos (VALE, 2009). No entanto, vale ressaltar que não houve diferença estatística significativa entre os grupos difosfato de PQ e Phe-Ala-PQ; o que nos permite inferir que esta alteração no número de neutrófilos não é amplificada na administração do pró-fármaco, e então não há aumento de risco quando comparado à administração do fármaco matriz.

Houve aumento significativo do número de linfócitos nos dois grupos que receberam o tratamento com difosfato de PQ e Phe-Ala-PQ. No entanto, este aumento foi mais pronunciado no grupo que recebeu o pró-fármaco; e estatisticamente diferente do grupo que recebeu apenas difosfato de PQ. Este resultado pode ser devido a maior capacidade de Phe-Ala-PQ para iniciar um possível processo inflamatório no tecido hepático (principal tecido biotransformador da PQ), com aumento de risco de efeitos danosos. É possível que esta diferença esteja relacionada com a biotransformação hepática da molécula que origina, além do fármaco matriz, outros metabólitos com potencial hepatotoxicidade.

Estudos sobre a toxicidade hepática de Phe-Ala-PQ foram conduzidos em paralelo a este trabalho e mostrarão se essa hipótese é válida. Caso haja a confirmação, esta característica deve ser ressaltada e considerada como fator de risco adicional na administração de Phe-Ala-PQ em paciente que possuam processos hepáticos agudos (por exemplo, hepatite); que utilizem fármacos com as mesmas propriedades ou que apresentem quadros de imunossupressão.

5. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

A partir da comparação estatística dos parâmetros farmacocinéticos para PQ proveniente de difosfato de PQ e Phe-Ala-PQ, conclui-se que essas formulações apresentam perfis farmacocinéticos distintos; e que a administração do pró-fármaco promoveu a manutenção de níveis plasmáticos da PQ com menor oscilação das concentrações, sendo positivo do ponto de vista clínico visto que concentrações plasmáticas altas poderão atingir níveis tóxicos. A biodisponibilidade oral (F_{oral}) do pró-fármaco Phe-Ala-PQ é de cerca de 30%, sendo necessário o ajuste da dose para novos estudos comparativos com difosfato de PQ ou demonstrando a necessidade de desenvolvimento de pré-formulação para administração de Phe-Ala-PQ.

O perfil farmacocinético de Phe-Ala-PQ observado neste estudo é resultante da administração da substância dissolvida em soro fisiológico (solução oral ou de uso intravenoso). É preciso relatar que se esta substância for administrada em outro veículo, pode-se encontrar um perfil farmacocinético diferente do encontrado nesse estudo.

Os resultados encontrados neste estudo apresentam vantagem na administração do pró-fármaco em relação ao poder membranolítico da PQ. O Phe-Ala-PQ diminui significativamente a hemólise de eritrócitos causada pela administração múltipla de PQ. Este resultado é importante do ponto de vista clínico, pois a anemia hemolítica é um dos principais efeitos adversos envolvidos no tratamento com o antimalárico.

O pró-fármaco pode ser uma alternativa para a administração de PQ no tratamento da malária, com a vantagem de diminuir o poder membranolítico causado pela PQ e manter concentrações plasmáticas mais constantes durante o tratamento e possivelmente evitar concentrações tóxicas.

Estudos direcionados à toxicidade hepática de Phe-Ala-PQ deverão ser conduzidos para obtenção de informações essenciais à avaliação do risco vs benefício desta nova alternativa terapêutica, visto as alterações nos valores de leucócitos (neutrófilos e linfócitos) encontradas. Além disso, estudos de toxicidade em outros órgãos devem ser realizados para que se tenham informações adicionais sobre a segurança da molécula.

Os resultados de farmacocinética em ratos e fragilidade osmótica de eritrócitos presentes neste trabalho foram publicados na forma de artigo científico no periódico *Biopharmaceutics & Drug Disposition* (ANEXO IX).

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANAND, B. S., KATRAGADDA, S., MITRA, A. K. **Pharmacokinetics of novel dipeptide ester prodrugs of acyclovir after oral administration: intestinal absorption and liver metabolism.** J Pharmacol Exp Ther, 311: 659–667, 2004.

BAIN, B. J. **Células sanguíneas: um guia prático.** 4ª edição. Porto Alegre: Artmed, p. 304 – 322, 2007.

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

BOLCHOZ, L. J. C.; BUDINSKY, R. A.; MCMILLAN, D. C., JOLLOW, D. J. **Primaquine-induced hemolytic anemia: formation and hemotoxicity of the arylhydroxylamine metabolite 6-methoxy-8-hydroxylaminoquinoline.** J Pharmacol Exp Ther, 297: 509–515, 2001.

BUNDGAARD, H.; LARSEN, C., THORBECK, P. **Prodrugs as drug delivery systems.** Int J Pharm, 18: 67–77, 1984.

CASTRO, J. A. ; MECCA, M. M.; BARTEL, L. C. **Toxic side effects of drugs used to treat Chagas' disease (American trypanosomiasis).** Human Exp Toxicol, 25 (8): 471-479, 2006.

CHAGAS, C. Nova tripanozomase humana. **Estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do Schizotrypanum cruzi. gen. n. gen. n. sp, agente etiológico de nova entidade morbida do homem.** Mem Inst Oswaldo Cruz, 1: 159 - 218. 1909.

CHAGAS, E. **Summula dos conhecimentos actuaes sobre a Trypanosomiasis americana.** Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, 30 (3): 387 - 416, 1935.

CHUNG, M. C. **Planejamento e síntese de pró-fármacos recíprocos de nitrofural e primaquina potenacialmete antichagásicos.** 1996. 196f. Tese (Doutorado em Fármacos e Medicamentos). Departamento de Farmácia, Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, São Paulo, 1996.

CHUNG, M. C.; FERREIRA, E. I. **O processo de latenciação no planejamento de fármacos.** Quim Nova, 22: 75–84, 1999.

CHUNG, M. C.; GONÇALVES, M. F.; COLLI, W.; FERREIRA, E. I.; MIRANDA, M. T. M. **Synthesis and in vitro evaluation of potential antichagasic dipeptide prodrugs of primaquine.** J Pharm Sci, 86: 1127–1131, 1997.

COURA, J. R. **Present situation and new strategies for Chagas disease chemotherapy: a proposal.** Mem Inst Oswaldo Cruz, 104(4): 549-554, 2009.

DAVANÇO, M. G.; CAMPOS, M. L.; NOGUEIRA, M. A.; CAMPOS, S. L.; MARQUES, R. V.; DOS SANTOS, J. L.; CHIN, C. M.; DA FONSECA, L. M.; PECCININI, R. G. **In vitro and in vivo evaluation of a primaquine prodrug without red blood cell membrane destabilization property.** Biopharm Drug Dispos, 33: 437–445, 2012.

DIAS, L. C.; DESSOY, M. A.; SILVA, J. J. N.; THIEMANN, O. H.; OLIVA, G.; ANDRICOPULO, A. D. **Quimioterapia da doença de Chagas: Estado da arte e perspectivas no desenvolvimento de novos fármacos.** Quim Nova, 32(9): 2444-2457, 2009.

DONGRE, V. G.; KAMURSE, P. P.; RAO, P. P.; KUMAR, A. **Development and validation of UPLC method for determination of primaquine phosphate and its impurities.** Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 46: 236-242, 2008.

DUA, V. K.; KAR, P. K.; SARIN, R.; SHARMA, V. P. **High-performance liquid chromatographic determination of primaquine and carboxyprimaquine concentrations in plasma and blood cells in *Plasmodium vivax* malaria cases following chronic dosage with primaquine.** J Chromatogr B Biomed Appl, 675: 93-98, 1996.

DWIVEDI, A. K.; SAXENA, D.; SINGH, S. **HPLC and HPTLC assays for the antimalarial agents Chloroquine, Primaquine and Bulaquine.** J Pharm Biomed Anal, 33: 851-858, 2003.

FLETCHER, K. A.; PRICE EVANS, D. A.; GILLES, H. M.; GREAVES, J.; BUNNAG, D.; HARINASUTA, T. **Studies on the pharmacokinetics of primaquine.** Bull World Health Organ, 59 (3): 407 – 412, 1981.

GINSBURG, H.; KRUGLIAK, M. **Effects of quinolonecontaining antimalarials on the erythrocytemembrane and their significance to drug action on plasmodium falciparum.** Biochem Pharmacol, 37: 2013 – 2018, 1988.

Guia para Validação de Métodos Analíticos e Bioanalíticos. Brasília: Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA, Brasil); 2003 Fev.17 p. Resolução Nº: 899.

Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation. Rockville: U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration (FDA),

Center for Drug Evaluation and Research (CDER), Center for Veterinary Medicine (CVM); 2001 Mai.

HARDMAN, J. G.; LIMBIRD, L. E. (Ed.) **Goodman & Gilman: as bases farmacológicas da terapêutica**. 10. ed. Rio de Janeiro: McGraw Hill, 2003. cap. 48, p. 960.

MAEGAWA, F. A. B. **Autochthonous Chagas' disease in Santa Catarina State, Brazil: report of the first case of digestive tract involvement**. Rev Soc Bras Med Trop, 36: 609 - 612, 2003.

MIHALY, G. W.; WARD S. A., EDWARDS G., NICHOLL D. D., L'EORME M., BRECKENRIDGE A. M. **Pharmacokinetics of primaquine in man I. Studies of the absolute bioavailability and effects of dose size**. Br J Clin Pharmac, 19: 745 – 750, 1985.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Doenças Infecciosas e Parasitárias** – Secretaria de Vigilância em Saúde, – Guia de Bolso - 7ª edição revista, p. 106-112. Brasília, DF. 2008.

MORETTI, E.; BASSO, B.; CASTRO, I.; PAEZ, M. C.; CHAUL, M.; BARBIERI, G. **Chagas'disease: study of congenital transmission in cases of acute maternal infection**. Rev Soc Bras Med Trop, 38(1): 53-55, 2005.

NAOUM, P. C.; RADISPIEL, J.; MORAES, M. S. **Dosagem espectrométrica de metaemoglobina sem interferentes químicos ou enzimáticos**. Rev Bras Hematol Hemoter, 26(1): 19-22, 2004.

PECCININI, R. G. Fundamentos de farmacocinética clínica. In: Aizeinstein, M. **Fundamentos para o uso racional de medicamentos**. São Paulo: Ed. Artes Médicas; 2010. p. 87-114.

RASSI, A.; RASSI, A. J.; LITTLE, W.C. **Chagas' heart disease**. Clin Cardiol, 23: 883 - 889, 2000

RODRIGUES, L. N. C.; WATANABE, S. P.; FERRAZ, H. G. **Perfil de dissolução in vitro de comprimidos de primaquina disponíveis para tratamento de malária no Brasil**. Rev Soc Bras Med Trop, 41(1): 41-45, 2008.

SILVA, M. A. da.; NAI, G. A.; ROSA, J. A. da. **Caracterizacao biologica e molecular de quatro cepas de Trypanosoma cruzi isoladas de pacientes na fase cronica, forma cardiaca da Doença de Chagas**. Rev Patol Trop, 35 (3): 213 - 226, 2006.

TOUTAIN, P. L., BOUSQUET-MELOU, A. **Plasma Clearance**. J Vet Pharmacol Ther, 27(6): 415-25, 2004a.

TOUTAIN, P. L., BOUSQUET-MELOU, A. **Plasma terminal half-life**. J Vet Pharmacol Ther, 27(6): 427-39, 2004b.

TOUTAIN, P. L., BOUSQUET-MELOU, A. **Volumes of distribution**. J Vet Pharmacol Ther, 27(6): 441-53, 2004c.

TRACY, J.W., WEBSTER JR., L.T. Quimioterapia das infeccções parasitárias. In: HARDMAN, J.G. *et al*, (Eds). **GOODMAN & GILMAN'S. As bases farmacológicas da terapêutica**. 10th ed. New York: McGraw Hill, 2001 p. 797-822.

TSUME, Y.; HILFINGER, J. M.; AMIDON, G. L. **Enhanced câncer cell growth inhibition by dipeptide prodrugs of floxuridine: increased transporter affinity and metabolic stability.** Mol Pharm, 5: 717–727, 2008.

VALE, N.; MOREIRA, R.; GOMES, P. **Primaquine revisited six decades after its discovery.** Eur J Med Chem, 44: 937–953, 2009.

WHO. **Chagas disease (American trypanosomiasis).** 2013. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/en/index.html>>. Acesso em 10 jul. 2013.

7. ANEXOS

ANEXO I – Protocolo do Comitê de Ética em Pesquisa

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

Protocolo CEP/FCF/CAr nº 06/2009
Interessado: MARCELO GOMES DAVANÇO
Orientador: Profa. Dra. Rosângela Gonçalves Peccinini
Projeto: Farmacocinética pré-clínica de Phe-Ala-PQ – pró-fármaco
potencialmente anti-chagásico

Parecer nº 21/2009 – Comitê de Ética em Pesquisa

O Comitê de Ética em Pesquisa desta Faculdade, considerou o protocolo para uso de animais na pesquisa "Farmacocinética pré-clínica de Phe-Ala-PQ – pró-fármaco potencialmente anti-chagásico", estruturado dentro dos princípios éticos na experimentação animal do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal – COBEA, manifestando-se FAVORÁVEL à sua execução.

O relatório final do protocolo de pesquisa, com no máximo três folhas (espaço 1,5 e letra 12) deverá ser entregue em junho de 2010.

Araraquara, 12 de maio de 2009.


Prof. Dr. AURELUCE DEMONTE
Coordenadora do CEP

ANEXO II – Parâmetros farmacocinéticos do grupo difosfato de PQ gavagem.

difosfato de PQ gavagem										
	Curva 1	Curva 2	Curva 3	Curva 4	Curva 5	Média	Dp	CV %	IC 95 (-)	IC 95 (+)
β (min ⁻¹)	0,005	0,006	0,006	0,005	0,005	0,0054	0,000548	10,14301	0,00472	0,0068
t _{1/2} β (min)	138,6	115,5	115,5	138,6	138,6	129,36	12,65239	9,78076	113,65	145,07
ASC 0-t (ug/mL.min)	106,40425	84,67	75,877	68,22425	49,043	76,8437	21,11389	27,47641	50,632	103,06
ASC 0- ∞ (ug/mL.min)	164,12425	125,8533	113,777	108,4443	76,003	117,6404	31,86443	27,08631	78,082	157,2
Rel Areas	0,648315225	0,672767	0,666892	0,629118	0,645277	0,652474	0,017566	2,692245	0,6307	0,6743
Cl (mL/min.kg)	14,86678538	19,38765	21,44546	22,50004	32,104	22,06079	6,331211	28,69894	14,201	29,921
Vd (L/kg)	2,973357076	3,231274	3,574243	4,500008	6,420799	4,139936	1,399872	33,81386	2,402	5,878
C _{máx} (ug/mL)	1,6708	1,6699	1,209	0,9602	0,7321	1,2484	0,420494	33,68265	0,7764	1,77
α (min ⁻¹)	0,052	0,077	0,114	0,113	0,103	0,0918	0,02679	29,18292	0,05854	0,1251
t _{1/2} α (min)	13,32692308	9	6,078947	6,132743	6,728155	8,253354	3,076112	37,27105	4,434	12,072
T _{max} (min)	20	20	20	20	20	20	0	0	20	20
K _a (min ⁻¹)	0,2257	0,229	0,174	0,206	0,171	0,20114	0,027604	13,72393	0,1669	0,2354
t _{1/2} a (min)	3,070447497	3,026201	3,982759	3,364078	4,052632	3,499223	0,491409	14,04337	2,889	4,109
F (%)	90,59412909	85,24266	100,3737	81,16725	61,29921	83,73539	14,45792	17,26619	65,786	101,68
MRT (min)	68,90809108	69,3556	71,97655	73,87595	73,91098	71,60544	2,395095	3,344851	68,632	74,579

ANEXO III – Parâmetros farmacocinéticos do grupo difosfato de PQ intravenosa.

Difosfato de PQ IV										
	Curva 1	Curva 2	Curva 3	Curva 4	Curva 5	Média	dp	CV %	IC 95 (-)	IC 95 (+)
β (min ⁻¹)	0,006	0,006	0,009	0,006	0,006	0,0066	0,001342	20,32789	0,004934	0,008266
t _{1/2} β (min)	115,5	115,5	77	115,5	115,5	107,8	17,21772	15,97191	86,425	129,18
ASC 0-t (ug/mL.min)	133,831	107,1413	92,3645	88,23925	78,62025	100,0393	21,50137	21,49294	73,346	126,73
ASC 0- ∞ (ug/mL.min)	181,1643333	147,6413	113,3534	133,6059	123,9869	139,9504	26,26892	18,77017	107,34	172,56
Rel Areas	0,738727086	0,725686	0,814837	0,660444	0,634101	0,714759	0,071002	9,933713	0,6266	0,8029
Cl (mL.min/Kg)	13,46843474	16,52655	21,5256	18,26266	19,6795	17,89255	3,080909	17,21895	14,068	21,717
Vd (L/kg)	2,244739123	2,754424	2,391734	3,043777	3,279916	2,742918	0,433165	15,79213	2,205	3,281
MRT (min)	42,70165163	55,87721	56,3786	61,35624	61,22391	55,50752	7,612002	13,71346	46,057	64,958
K α (min ⁻¹)	0,039	0,035	0,076	0,051	0,052	0,0506	0,016009	31,63908	0,03072	0,07048
t _{1/2} α (min)	17,76923077	19,8	9,118421	13,58824	13,32692	14,72056	4,17443	28,35781	9,538	19,903

ANEXO IV – Parâmetros farmacocinéticos do grupo PQ de Phe-Ala-PQ gavagem.

PQ de Phe-Ala-PQ gavagem										
	Curva 1	Curva 2	Curva 3	Curva 4	Curva 5	Média	dp	CV %	IC 95 (-)	IC 95 (+)
β (min ⁻¹)	0,009	0,01	0,008	0,008	0,006	0,0082	0,001483	18,08829	0,006359	0,01004
t _{1/2} β (min)	77	69,3	86,625	86,625	115,5	87,01	17,50586	20,11937	65,277	108,75
ASC 0-t (ug/mL.min)	44,6579025	36,19686	32,67533	30,89499	28,69747	34,62451	6,244592	18,03518	26,872	42,377
ASC 0- ∞ (ug/mL.min)	60,19245806	46,95356	45,88708	43,69649	47,67597	48,88111	6,499211	13,29596	40,813	56,95
Rel Areas	0,741918572	0,770908	0,712081	0,707036	0,601927	0,706774	0,063971	9,051171	0,6274	0,7862
C _{max} (ug/mL)	0,3882	0,3136	0,2644	0,2617	0,2269	0,29096	0,062517	21,48642	0,2133	0,3686
T _{max} (min)	60	80	80	80	60	72	10,95445	15,21452	58,4	85,6
F(%)	33,22533578	31,80247	40,48143	32,7055	38,45242	35,33343	3,874525	10,96561	37,915	94,033
MRT (min)	83,10062536	81,82324	83,32597	83,65375	87,48244	83,87721	2,131509	2,541226	81,231	86,523
K _a (min ⁻¹)	0,0017	0,0029	0,0038	0,0046	0,0021	0,00302	0,001195	39,55533	0,001537	0,004503
t _{1/2} a (min)	407,6470588	238,9655	182,3684	150,6522	330	261,9266	106,1922	40,54274	130,09	393,76

ANEXO V – Parâmetros farmacocinéticos do grupo PQ de Phe-Ala-PQ intravenosa.

PQ de Phe-Ala-PQ IV										
	Curva 1	Curva 2	Curva 3	Curva 4	Curva 5	Média	dp	CV %	IC 95 (-)	IC 95 (+)
β (min ⁻¹)	0,008	0,006	0,007	0,009	0,008	0,0076	0,00114	15,00231	0,006185	0,009015
t _{1/2} β (min)	86,625	115,5	99	77	86,625	92,95	14,82834	15,95303	74,541	111,36
ASC 0-t (ug/mL.min)	39,35688175	50,23483	54,25538	67,70409	78,69321	58,04888	15,36434	26,46794	38,975	77,123
ASC 0- ∞ (ug/mL.min)	57,16076925	77,44129	74,14602	83,27056	96,1735	77,63843	14,20246	18,29309	60,007	95,27
Rel Areas	0,688529603	0,648683	0,731737	0,813062	0,818242	0,740051	0,075027	10,13808	0,6469	0,8332
MRT (min)	67,56470878	73,13997	72,00442	67,70733	70,69116	70,22152	2,514779	3,581209	67,1	73,344

ANEXO VI – Resultados do teste de fragilidade osmótica de eritrócitos do grupo Phe-Ala-PQ.

Fragilidade Osmótica de Eritrócitos - % hemólise - Grupo Phe-Ala-PQ														
Tubos	Concentração NaCl (g/dL)	R1	R2	R3	R4	R5	R6	R7	R8	R9	R10	Média	DP	CV %
13	0	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	0	0
12	0,1	97,628	104,53	92,03	102,13	95,031	103,79	83,26	94,318	103,09	83,16	95,8967	7,961964	8,302647
11	0,2	97,23	102,88	89,24	100	100	107,11	86,78	99,62	104,25	81,81	96,892	8,229701	8,493684
10	0,3	96,84	100,8	86,85	97,02	100,46	103,3	81,06	96,21	102,3	76,09	94,093	9,455565	10,04917
9	0,35	98,024	103,7	88,44	103,4	102,48	106,64	81,49	74,24	90,347	76,768	92,5529	12,00712	12,97325
8	0,4	59,68	70,37	87,65	91,06	52,8	94,79	76,65	35,61	59,07	72,05	69,973	18,62682	26,62
7	0,45	0	-	52,59	4,34	18,01	27,49	32,6	9,47	13,9	34,01	21,37889	16,78326	78,5039
6	0,5	0	52,26	0	5,532	0	0	0	0	0	0	5,7792	16,42396	0
5	0,55	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4	0,6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3	0,65	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2	0,75	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1	0,85	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

ANEXO VII – Resultados do teste de fragilidade osmótica de eritrócitos do grupo difosfato de PQ.

Fragilidade Osmótica de Eritrócitos % Hemólise - Grupo difosfato de PQ														
Tubos	Concentração NaCl (g/L)	R1	R2	R3	R4	R5	R6	R7	R8	R9	R10	Média	DP	CV %
13	0	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	0	0
12	0,1	88,89	77,35	78,102	93,7	60,73	100	94,41	109,17	116,36	91,29	91,0002	16,14754	17,74451
11	0,2	91,11	63,23	82,11	102,76	60,43	103,07	103,11	89,6	119,55	94,46	90,943	18,39196	20,22361
10	0,3	91,48	67,94	75,18	83,86	55,83	103,07	106,2	92,66	106,4	94,99	87,761	16,98962	19,35896
9	0,35	102,96	66,47	60,22	93,7	61,96	96,93	95,342	94,19	108,18	94,195	87,4147	17,58722	20,11929
8	0,4	68,15	39,71	48,54	79,13	38,96	53,35	90,06	86,85	90,91	66,23	66,189	20,27047	30,62514
7	0,45	71,11	33,82	1,825	11,02	26,7	63,41	47,2	36,39	102,3	64,64	45,8415	30,25847	66,00671
6	0,5	74,81	26,47	0	0	0	69,27	47,2	0	0	0	21,775	30,87945	141,8115
5	0,55	0	25,59	0	0	0	0	0	0	0	0	2,559	8,092269	316,2278
4	0,6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3	0,65	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2	0,75	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1	0,85	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

ANEXO VIII – Resultados do teste de fragilidade osmótica de eritrócitos do grupo controle.

		Fragilidade Osmótica de Eritrócitos - % hemólise - Grupo controle										Média	DP	CV %
Tubos	Concentração NaCl (g/L)	R1	R2	R3	R4	R5	R6	R7	R8	R9	R10			
13	0	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	0	0
12	0,1	92,92035	117,1216	95,53191	70,28825	85,47009	100,6565	102,5806	94,91194	100,6536	94,54545	95,46803	12,08724	12,66103
11	0,2	88,48558	115,6328	95,95745	99,11308	90,17094	91,24726	96,77419	97,45597	95,42484	91,16883	96,14309	7,705398	8,01451
10	0,3	94,46903	109,1811	95,74468	105,0998	89,10256	96,06127	86,88172	94,52055	76,68845	109,8701	95,76193	10,30974	10,76601
9	0,35	94,24779	102,7295	51,48936	87,13969	88,46154	74,17943	89,03226	97,45597	94,98911	92,20779	87,19324	14,64964	16,80134
8	0,4	60,61947	88,83375	8,510638	26,60754	53,84615	63,89497	75,05376	83,75734	80,61002	75,32468	61,70583	25,97556	42,09579
7	0,45	9,955752	20,84367	0	0	14,74359	20,13129	11,6129	18,19961	25,27233	11,42857	13,21877	8,460673	64,00499
6	0,5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
5	0,55	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4	0,6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3	0,65	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2	0,75	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1	0,85	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

ANEXO IX – Artigo científico publicado.

In vitro and *in vivo* evaluation of a primaquine prodrug without red blood cell membrane destabilization property

Marcelo Gomes Davanço^a, Michel Leandro Campos^a, Marco Antonio Nogueira^a, Silvio Lopes Campos^a, Ricardo Vian Marques^b, Jean Leandro dos Santos^b, Chung Man Chin^b, Luiz Marcos da Fonseca^c, and Rosângela Gonçalves Peccinini^{a,*}

^aDepartment of Natural Active Principles and Toxicology, School of Pharmaceutical Sciences, São Paulo State University, UNESP, Araraquara, SP, Brazil

^bDrug Research and Development Laboratory - Lapdesf, School of Pharmaceutical Sciences, São Paulo State University, UNESP, Araraquara, SP, Brazil

^cDepartment of Clinical Analyses, School of Pharmaceutical Sciences, São Paulo State University, UNESP, Araraquara, SP, Brazil

ABSTRACT: Primaquine is an important therapeutic resource for malaria treatment and it has wide activity against several pathogens. The haematotoxicity of primaquine is the major problem for its therapeutic application. This effect is aggravated by repeated use at high doses and by the wide fluctuation of plasma levels after administration. The primaquine prodrug (Phe-Ala-PQ) was planned in order to modify the pharmacokinetics and toxicity of primaquine. The *in vitro* conversion of Phe-Ala-PQ to primaquine, and the primaquine pharmacokinetics were evaluated in four groups of rats: two groups that received a single dose of Phe-Ala-PQ, one by intravenous and the other by gavage route, and two other groups that received primaquine diphosphate, by intravenous and gavage routes. In addition, the erythrocyte osmotic fragility was compared in two groups of rats that received multiple doses of primaquine diphosphate or Phe-Ala-PQ, as a parameter of haematotoxicity. The *in vitro* conversion of Phe-Ala-PQ to primaquine by plasma enzyme action was observed. The pharmacokinetic profile of primaquine from Phe-Ala-PQ was more favourable due to the lower fluctuation of plasma concentrations. Haematotoxicity was not evidenced in the prodrug administration. The results reinforce the need for further studies with this prodrug, promising an alternative in the therapeutic use of primaquine. Copyright © 2012 John Wiley & Sons, Ltd.

Key words: primaquine; prodrug; pharmacokinetics; preclinical pharmacokinetics; haemolysis

Introduction

Primaquine (Figure 1:1) was discovered in 1946 and has been the subject of countless research in the health area due to its wide activity against different pathogens [1].

The drug is a major therapeutic resource for the prophylaxis and treatment of malaria. In addition,

it has an application in the treatment of pneumocystic pneumonia; it presents *in vitro* activity against leishmaniasis and anti-chagasic effects [1].

The haematotoxicity of primaquine is a major problem for its therapeutic use and this effect is characterized by primary methaemoglobinaemia, followed by haemolytic anaemia. This situation occurs especially in glucose 6-phosphate dehydrogenase deficiency [1,2].

According to Ginsburg and Krugliak [3] the haemolytic effect of quinoline-containing antimalarials could result from osmotic swelling and this effect is concentration dependent. At low

*Correspondence to: Universidade Estadual Paulista 'Júlio de Mesquita Filho' – UNESP, School of Pharmaceutical Sciences, Rodovia Araraquara-Jaú Km. 01 s/n - Campus universitário, Araraquara State, São Paulo 14801-902, Brazil.
E-mail: peccinini@fcar.unesp.br

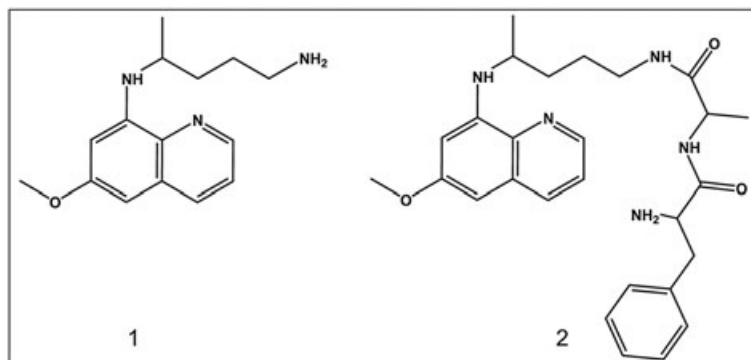


Figure 1. Chemical structures of primaquine (1) and Phe-Ala-PQ (2)

concentrations there is a 'protective effect' on erythrocytes against lysis and at high concentrations destabilization of the cell membrane is observed [3]. Anyway, the consensus is that the haemolytic anaemia and methaemoglobinaemia are dose-limiting adverse effects [3,4].

The haematotoxic effect of primaquine is aggravated by repeated use at high doses [1] and by the wide fluctuation of plasma levels after oral administration of primaquine diphosphate. The pharmacokinetic profile of this pharmaceutical form is characterized by rapid and extensive absorption that results in high values of maximum plasma concentration ($C_{\max}$).

It is known that the kinetic disposition of drugs can be modified through the use of prodrugs consisting of carriers, such as amino acids and peptides [5]. This approach has consequences on the fluctuation of plasma concentrations, on the toxic and pharmacological properties and on the dosage regimen.

Several researchers have had success with this approach, using peptides with different classes of drugs such as antineoplastic [6], antiviral [7] and antiparasitic [8], among others.

In addition, several authors have focused efforts to synthesize dipeptide prodrugs of primaquine and to evaluate their therapeutic properties [1,9–11]. In these studies, the authors only demonstrated the chemical structures of these derivatives and their potential activities.

However, knowledge of the pharmacokinetic profile and its toxic effect is crucial for evaluating the feasibility of a new drug.

Chung *et al.* [2] synthesized and characterized prodrugs of primaquine using dipeptides as spacer

agents. In that paper, the authors explored the possibilities of using primaquine prodrugs in the treatment of Chagas disease. Among these primaquine prodrugs, the phenylalanine-alanine-primaquine prodrug (Phe-Ala-PQ, Figure 1:2) demonstrated physicochemical and synthetic characteristics more favourable than the other dipeptides.

In the present study, the objective was to evaluate the *in vitro* formation of primaquine from Phe-Ala-PQ and to evaluate the fluctuation in plasma concentrations of primaquine in male Wistar rats that received a single dose of Phe-Ala-PQ by intravenous and gavage routes. A bioanalytical method to determine the primaquine by HPLC was developed and validated to perform these investigations. In addition, the erythrocyte osmotic fragility was compared in a rat group that received multiple doses of primaquine diphosphate and Phe-Ala-PQ as a parameter of haematotoxicity.

This allowed the observation of the plasma fluctuation of primaquine resulting from administration of Phe-Ala-PQ, and to determine whether the use of this prodrug can modify the haematotoxicity of primaquine.

Materials and Methods

Chemicals

The Phe-Ala-PQ (98%) was synthesized by the Laboratório de Pesquisa e Desenvolvimento de Fármacos (Lapdesf, Araraquara, São Paulo, Brazil). Primaquine diphosphate (99.5%) and diphenhydramine (internal standard) were purchased from Sigma Aldrich® (New Jersey, USA). The HPLC

grade acetonitrile and methanol were purchased from Merck (Darmstadt, Germany). Analytical grade trifluoroacetic acid and sodium hydroxide were obtained from Mallinckrodt (New Jersey, USA). The HPLC water was obtained from a Millipore Milli-Q System and used throughout the analysis.

Animals

The preclinical pharmacokinetic and haematotoxicity studies were carried out in male Wistar rats (weighing 200–250 g). They were housed in wire cages, five animals per cage, 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 06/2009).

In the pharmacokinetics study, the rats were divided into four groups ($n=60$) and treated as follows: group PQ gavage 2.44 mg/kg free base in saline ($n=15$); group PQ intravenous 2.44 mg/kg free base in saline ($n=15$); group Phe-Ala-PQ gavage 4.38 mg/kg in saline ($n=15$); group Phe-Ala-PQ intravenous 4.38 mg/kg in saline ($n=15$).

The primaquine diphosphate dose (2.44 mg/kg) was selected to deliver 45 mg primaquine base, indicated for humans [12], and calculated by allometric scaling for rats. The Phe-Ala-PQ dose (4.38 mg/kg) was calculated to deliver the same amount of primaquine in the biological system.

The i.v. access was performed by femoral vein cannulation 24 h before the administrations and the arterial blood collection was performed through the femoral artery cannula previously implanted.

The blood samples were collected at predetermined intervals of 5, 15, 20, 30, 40, 60, 80, 90, 120 and 180 min post-dose into heparinized tubes. The plasma was separated by centrifugation at 3000 rpm for 15 min and immediately analysed.

In the haematotoxicity study, the rats were divided into three groups ($n=30$) and treated as follows: group control: saline by gavage (four times a day for 4 days) ($n=10$); group PQ diphosphate: primaquine diphosphate by gavage (2.44 mg/kg free base; four times a day for 4 days) ($n=10$); group Phe-Ala-PQ: prodrug by gavage (9.00 mg/kg; four times a day for 4 days) ($n=10$).

This treatment was calculated based on the dose regimen of malaria treatment in humans by

allometric scaling and oral bioavailability (approximately 50%) of prodrug.

After treatment with the drugs, the animals were decapitated and blood was subjected to osmotic fragility testing of the erythrocytes.

Analytical protocol

An Alliance® Waters HPLC system equipped with UV-vis 2487 detector was employed. The chromatographic analysis was performed on a Symmetry® C₁₈ HPLC column (4.6 mm × 250 mm, 5 µm particle size) preceded by a guard column Symmetry® C₁₈ (3.9 mm × 20 mm, 5 µm particle size). The mobile phase was a mixture of water:acetonitrile:trifluoroacetic acid solution (0.01%) (45:30:25, v/v/v), with detection at 256 nm. A flow rate of 0.8 ml/min was used and 100 µl samples were injected into the chromatographic system. The running time was 14 min. The ratio of peak area of the analyte to the internal standard (IS) was used for the quantification of plasma samples.

Prior to the chromatographic analysis, the samples were treated according to the following procedure: 200 µl plasma samples were deproteinized by the addition of 200 µl sodium hydroxide 0.5 M and vortexed for 1 min. Then, 1 ml ethyl acetate was added and the samples were vortexed for 1 min and centrifuged at 2500 rpm, 25 °C for 10 min. The supernatants were separated and the process was repeated once again. The organic layers were evaporated to dryness in a nitrogen flow. The samples were suspended in 200 µl water and 100 µl was injected into the chromatographic system.

The method validation procedure was based on the (US) FDA Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation [13]. The confidence limits linearity, recovery, precision and accuracy, stability, lower limit of quantification (LLOQ) and limit of detection (LD) were determined. The linearity (analyses of six levels of analyte concentration conducted in triplicate) was defined over the 0.15–1.80 µg/ml range. The recovery was above 90%. The precision and accuracy studies were conducted by three determinations of three different concentration levels (0.15, 0.75 and 1.50 µg/ml) of the primaquine. The data acceptance criteria for precision was RSD < 15% and the data acceptance criteria for accuracy was the theoretical value back calculated between 85–115%. The LLOQ and LD were

defined as 0.15 and 0.10 µg/ml, respectively, and performed by analysis in triplicate. The acceptance criterion for LLOQ was precision with a coefficient of variation less than 20% and accuracy in the 80–120% range.

The analyte stability in plasma sample was confirmed at room temperature for 2 h and after freezing for 7 days at -20°C and -80°C .

In vitro studies

The *in vitro* stability test is used to simulate the conditions in the body to which the drug will be exposed and it is required to perform them when developing new drugs [14–16].

For *in vitro* hydrolysis, an appropriate amount of Phe-Ala-PQ was weighed and dissolved in sodium acetate (pH 1.2 and 7.4) at a concentration of 60 µg/ml. The samples of plasma, spiked with the stock solution of Phe-Ala-PQ, were prepared at a concentration of 60 µg/ml and subjected to constant agitation in a shaker (137 rpm) at 37°C during the entire assay. The plasma samples were obtained at the following times and determined by HPLC, the primaquine concentration formed: at pH 1.2: zero; 0.25; 0.5; 1; 2; 4; 8; 16; 24; 42; 48; 52; 72 and 120 h; at pH 7.4: zero; 0.25; 0.5; 1; 2; 4; 8; 16; 24; 42; 48; 52; 72 and 120 h; and plasma: zero; 0.25; 0.5; 1; 2; 4; 8; 16; 24 h.

All analyses were conducted in triplicate and the results are expressed as the average of the concentrations.

In vivo studies

Pharmacokinetics. The primaquine kinetic disposition was evaluated after administration of a single dose of primaquine diphosphate and Phe-Ala-PQ by gavage and intravenous routes. The pharmacokinetic parameters were calculated based on the plasma concentration vs time curves. The half-life of elimination ($t_{1/2\beta}$) was determined by graphical method and the constant of elimination (K_{el} or β) was calculated by the equation $0.693/t_{1/2\beta}$. The area under the curve at 0 to 3 h (AUC_{0-3}) was calculated by the trapezoidal method and the area under the curve 0 to ∞ ($AUC_{0-\infty}$) was calculated by the equation $AUC_{0-3} + C_n/K_{el}$, where C_n was the last quantifiable plasma concentration. The oral bioavailability (F) of the primaquine diphosphate

and primaquine from the prodrug were calculated by the relation between the AUC obtained in the gavage administration and the AUC obtained in the intravenous administration. The mean residence time (MRT) was calculated by the equation $AUMC/AUC$, where $AUMC$ is the area under the first moment curve. The maximum plasma concentration (C_{max}) was obtained direct from the experimental data as well as the time of the occurrence of C_{max} (t_{max}), as well as the minimum plasma concentration (C_{min}).

Haematotoxicity. The haematotoxicity was evaluated after the administration of multiple doses of primaquine diphosphate or Phe-Ala-PQ via gavage. The method used to evaluate haematotoxicity was to test the osmotic fragility of erythrocytes, applied in the diagnosis of effects of drugs and xenobiotics in the erythrocyte membrane [17–20].

A stock solution of buffered sodium chloride (NaCl) equivalent to 100 g/l (pH 7.4) was prepared. From this solution, other concentrations were prepared: 0.10, 0.20, 0.30, 0.35, 0.40, 0.45, 0.50, 0.55, 0.60, 0.65, 0.75 and 0.85 g/dl in tubes numbered 1–12. Tube 13 contained only water. Thereafter 20 µl of heparinized blood was added to the tubes, obtained from the decapitation of each animal. The tubes were left to stand for 30 min at room temperature and then were subjected to centrifugation at 2500 rpm for 5 min. After this procedure, the optical density (OD) of the supernatant was determined using a spectrophotometer at 540 nm. Tube 1 was considered the blank or 0% haemolysis. The supernatant from tube 13 represented standard haemolysis, or 100% haemolysis.

To calculate the percentage haemolysis of each supernatant the following equation was applied:

$$\text{Haemolysis (\%)} = (\text{OD tube X} / \text{OD standard tube 13}) \times 100$$

where X is tubes 1–12.

The curve of haemolysis vs NaCl for each animal was constructed through the calculated haemolysis in each tube.

Statistical analysis

The pharmacokinetic data were expressed as median, mean and confidence interval (IC_{95}), and analysed by the Mann-Whitney test for comparison among groups (GraphPad Instat® software, 3.06

version). The haematotoxicity data were expressed as mean and RSD, and compared by the Mann-Whitney test among groups.

The curve linearity and RSD calculations were performed through the Origin[®] software.

Results and Discussion

In vitro formation of primaquine from prodrug hydrolysis

The *in vitro* chemical hydrolysis study demonstrated no hydrolysis of the prodrug at pH 1.2 and 7.4 (data not shown) during 120 h. These results indicated the chemical stability of the prodrug throughout the experiment. These data indicate that the prodrug is stable in the pH of the gastrointestinal tract for at least 24 h, demonstrating that the prodrug could be administered orally without conversion to primaquine by chemical hydrolysis.

In addition, hydrolysis was observed in plasma (pH 7.4; 37°C) demonstrating that the prodrug is susceptible to the action of plasma enzymes, being converted into primaquine (Figure 2). After the first 15 min of incubation it was possible to observe the formation of primaquine, which reached a maximum concentration in 8 h. It is important to demonstrate the *in vivo* conversion of prodrug to primaquine.

A different pharmacokinetic profile of primaquine from prodrug administration

The pharmacokinetic profile of primaquine from prodrug was significantly more favourable due to the stability of low plasma levels.

The plasma concentrations of primaquine vs time curves obtained in the experimental groups are shown in Figures 3 and 4. The primaquine plasma concentrations of the gavage group and

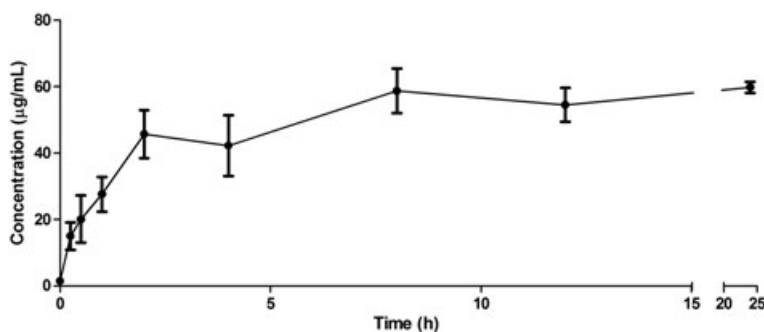


Figure 2. *In vitro* formation of primaquine from Phe-Ala-PQ by plasma enzymes ($n = 3$, mean, RSD)

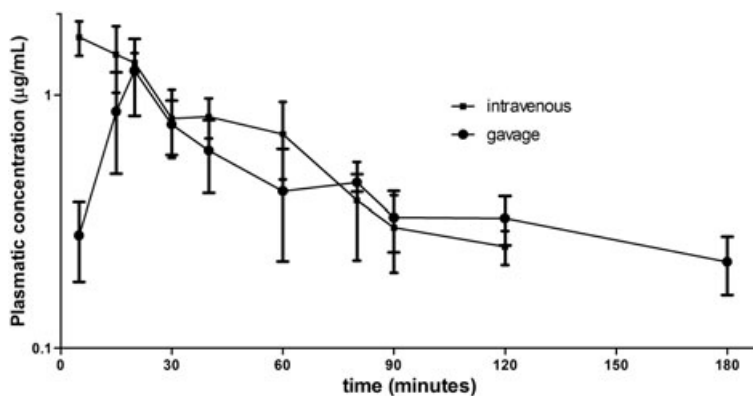


Figure 3. Pharmacokinetic profile of primaquine diphosphate after single dose by gavage and intravenous administration ($n = 30$, mean, CI_{95})

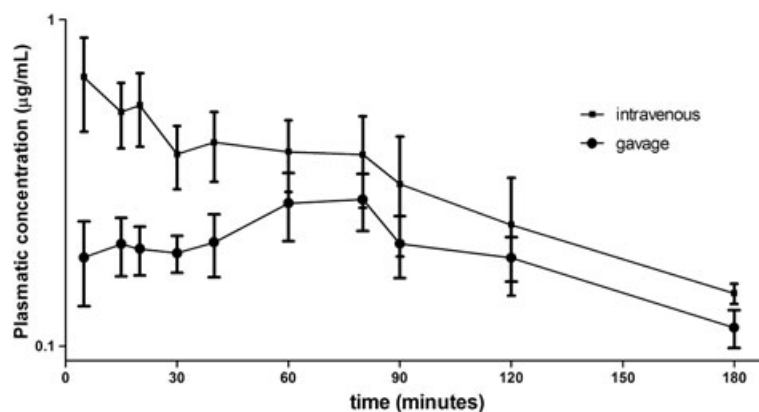


Figure 4. Pharmacokinetic profile of primaquine from prodrug after single dose by gavage and intravenous administration ($n = 30$, mean, CI_{95})

the pharmacokinetic parameters of all the groups are shown in Tables 1 and 2, respectively.

It is possible to observe that there is a statistically significant difference in the primaquine plasma concentrations between the gavage groups (Mann-Whitney test). The administration of the prodrug provides plasma levels of primaquine

lower and more stable when compared with the plasma levels after administration of primaquine diphosphate. The primaquine C_{max} and C_{min} levels obtained in the prodrug administration were significantly lower than those observed in the diphosphate administration group, and presents a lower oscillation expressed by the ρ parameter. It

Table 1. Plasma concentrations of primaquine in rats after administration of primaquine diphosphate and Phe-Ala-PQ by gavage route. Data are expressed by mean (CI_{95})

Time (min)	Gavage administration	
	PQ diphosphate Cp ($\mu\text{g/ml}$)	PQ from prodrug Cp ($\mu\text{g/ml}$)
5	0.27 (0.16–0.40)	0.18 (0.11–0.25)
15	0.85 (0.40–1.3)	0.19 ^b (0.13–0.25)
20	1.24 (0.72–1.77)	0.19 ^b (0.16–0.24)
30	0.75 (0.53–0.99)	0.19 ^b (0.16–0.22)
40	0.60 (0.36–0.84)	0.20 ^b (0.15–0.26)
60	0.41 (0.17–0.66)	0.27 (0.22–0.39)
80	0.45 (0.40–0.49)	0.28 ^b (0.20–0.35)
90	0.32 (0.21–0.44)	0.20 (0.16–0.27)
120	0.32 (0.24–0.41)	0.18 ^a (0.16–0.23)
180	0.21 (0.14–0.29)	0.11 ^a (0.10–0.14)

^a $p < 0.05$;

^b $p < 0.01$;

^c $p < 0.001$.

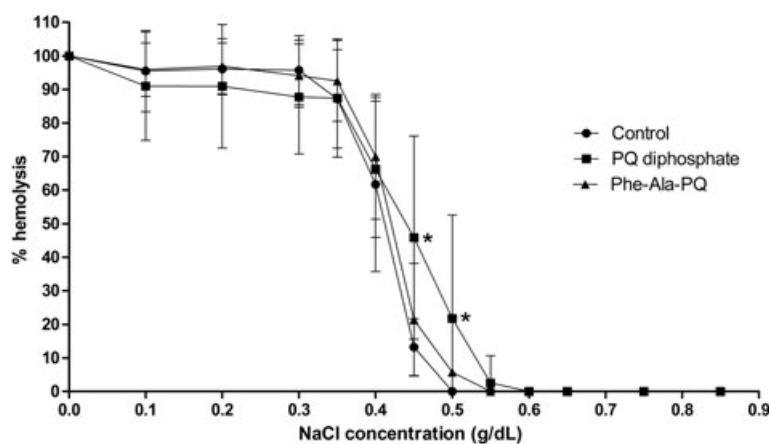
Table 2. Pharmacokinetic parameters of primaquine diphosphate and primaquine from prodrug in rats by gavage and intravenous administration (mean, CI_{95} , $n = 60$)

	Gavage		Intravenous	
	PQ diphosphate	PQ from prodrug	PQ diphosphate	PQ from prodrug
β (min^{-1})	0.0054 ^{†a} (0.0047–0.0061)	0.0082 (0.0063–0.0100)	0.0066 (0.0049–0.0082)	0.0076 (0.0061–0.0090)
$t_{1/2 \beta}$ (min)	129.3 ^{†a} (113.6–145.1)	87.01 (65.27–108.7)	107.8 (86.42–129.2)	92.95 (74.54–111.3)
$AUC_{0-\infty}$ ($\mu\text{g}/\text{ml}\cdot\text{min}$)	117.6 ^{†a} (78.08–157.2)	48.88 ^{†b} (40.81–56.95)	139.9 (107.3–172.5)	77.63 (60.01–95.27)
Cl/F ($\text{ml}/\text{min}\cdot\text{kg}$)	22.06 (14.20–29.92)	50.54 (43.26–57.82)	17.89 (14.06–21.71)	32.34 (24.34–40.34)
V_z/F (l/kg)	4.14 (2.40–5.88)	6.34 (4.39–8.33)	2.74 (2.20–3.28)	4.34 (3.01–5.66)
$C_{\max}$ ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	1.24 ^{†b} (0.77–1.77)	0.29 (0.21–0.37)	1.69 ^{†b} (1.36–2.02)	0.66 (0.40–0.93)
$t_{\max}$ (min)	20 ^{†b} (20–20)	72 (58–85)	5.0 (5.0–5.0)	5.0 (5.0–5.0)
$C_{\min}$ ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	0.21 ^{†a} (0.14–0.29)	0.11 (0.09–0.13)	0.25 ^{†b} (0.20–0.30)	0.14 (0.13–0.15)
ρ	5.61 ^{†b} (4.70–6.52)	2.54 (2.11–2.98)	6.85 (5.00–8.71)	4.65 (2.61–6.69)
k_a (min^{-1})	0.2011 ^{†b} (0.1669–0.2354)	0.003 (0.0015–0.0045)	-	-
$t_{1/2 a}$ (min)	3.49 ^{†b} (2.89–4.11)	261 (130–393)	-	-
F	83.7 (65.7–101)	35.3 (30.5–40.1)	-	57.8 (36.4–77.5)
MRT (min)	71.6 (68.6–74.5)	83.8 ^{†c} (81.2–86.5)	55.5 (46.05–64.95)	70.2 (67.1–73.3)

†Gavage PQ diphosphate versus gavage PQ from prodrug;

‡gavage PQ from prodrug versus intravenous PQ diphosphate;

*intravenous PQ diphosphate versus intravenous PQ from prodrug.

^a $p < 0.05$;^b $p < 0.01$;^c $p < 0.001$; - not applicable.Figure 5. Curves of haemolysis in rats after treatment with multiple doses of primaquine or Phe-Ala-PQ ($n = 30$, mean, RSD, $*p < 0.05$)

is an important fact since toxicity is related to high plasma concentrations. So, lower plasma levels can reduce the toxicity of the drug and the observed levels were in the range for the antimalarial effect [11]. Another important fact is that the mean residence time (*MRT*) of primaquine was superior in the Phe-Ala-PQ group. This parameter reflects the time of duration of exposure. The higher *MRT* guarantees a higher time for the action of the drug and it allows the expansion of the administration intervals.

The amount of drug available after administration is expressed by the *AUC* parameter. In the Phe-Ala-PQ gavage group, this parameter was significantly lower when compared with all other groups. The oral bioavailability of the product should be considered so that adequate plasma levels are reached. However, even if the oral dose of the product is doubled, the peak plasma levels of primaquine provided did not reach the levels achieved in the administration of primaquine in the diphosphate form.

Erythrocyte osmotic fragility test in prodrug administration

The results of the erythrocyte osmotic test are shown in Figure 5. The group exposed to primaquine diphosphate presented an osmotic fragility superior to the control and Phe-Ala-PQ groups (Mann-Whitney test). The control and Phe-Ala-PQ groups did not present statistical differences in the fragility test. These results allow us to infer that the administration of Phe-Ala-PQ decreases the destabilization of the erythrocyte membrane produced by primaquine. According to Ginsburg and Krugliak [3] the destabilizing effect can be related to surfactant properties of quinoline-containing antimalarials at relatively higher concentrations. Our results of erythrocyte fragility are in agreement with the low levels of primaquine observed in the Phe-Ala-PQ administration.

In conclusion, the pharmacokinetic profile of primaquine was more favourable and haematotoxicity was not evidenced after the prodrug administration. The results reinforce the conduct of further studies with this prodrug, promising an alternative in the therapeutic use of primaquine.

Acknowledgements

The authors would like to thank São Paulo Research Foundation – FAPESP (process 02/13233-9, 07/50648-6 and 09/51075-5) and National Institute of Science and Technology - Pharmaceutical Innovation (INCT-if) for providing financial support during the course of this study.

Conflict of Interest

The authors state that there is no conflict of interest.

References

1. Vale N, Moreira R, Gomes P. Primaquine revisited six decades after its discovery. *Eur J Med Chem* 2009; **44**: 937–953.
2. Chung MC, Gonçalves MF, Colli W, Ferreira EI, Miranda MTM. Synthesis and *in vitro* evaluation of potential antichagasic dipeptide prodrugs of primaquine. *J Pharm Sci* 1997; **86**: 1127–1131.
3. Ginsburg H, Krugliak M. Effects of quinolone-containing antimalarials on the erythrocyte membrane and their significance to drug action on *Plasmodium falciparum*. *Biochem Pharmacol* 1988; **37**: 2013–2018.
4. Bolchoz LJC, Budinsky RA, McMillan DC, Jollow DJ. Primaquine-induced hemolytic anemia: formation and hemotoxicity of the arylhydroxylamine metabolite 6-methoxy-8-hydroxylaminoquinoline. *J Pharmacol Exp Ther* 2001; **297**: 509–515.
5. Chung MC, Ferreira EI. O processo de latência no planejamento de fármacos. *Quim Nova* 1999; **22**: 75–84.
6. Tsume Y, Hilfinger JM, Amidon GL. Enhanced cancer cell growth inhibition by dipeptide prodrugs of floxuridine: increased transporter affinity and metabolic stability. *Mol Pharm* 2008; **5**: 717–727.
7. Anand BS, Katragadda S, Mitra AK. Pharmacokinetics of novel dipeptide ester prodrugs of acyclovir after oral administration: intestinal absorption and liver metabolism. *J Pharmacol Exp Ther* 2004; **311**: 659–667.
8. Bundgaard H, Larsen C, Thorbek P. Prodrugs as drug delivery systems. *Int J Pharm* 1984; **18**: 67–77.
9. Rajic Z, Kos G, Zorc B, Singh PP, Singh S. Macromolecular prodrugs. XII. Primaquine conjugates: synthesis and preliminary antimalarial evaluation. *Acta Pharm* 2009; **59**: 107–115.
10. Vale N, Nogueira F, Rosario VE, Gomes P, Moreira R. Primaquine peptides derivatives bearing an imidazolidin-4-one moiety at the *N*-terminus as

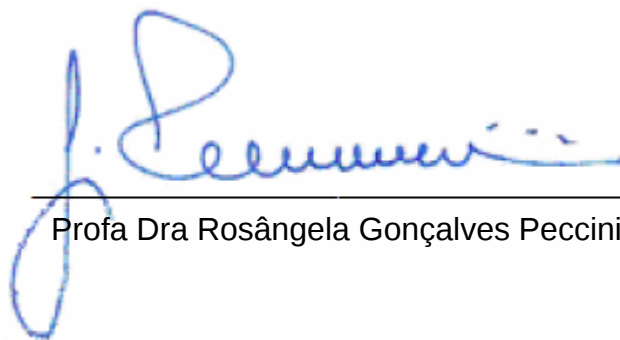
- potential antimalarial prodrugs. *Eur J Med Chem* 2009; **44**: 2506–2516.
11. Araujo MJ, Bom J, Capela R, *et al.* Imidazolidin-4-one derivatives of primaquine as novel transmission-blocking antimalarials. *J Med Chem* 2005; **48**: 888–892.
 12. Mihaly GW, Ward SA, Edwards G, Orme M, Breckenridge AM. Pharmacokinetics of primaquine in man: identification of the carboxylic acid derivative as a major plasma metabolite. *Br J Clin Pharmacol* 1984; **17**: 441–446.
 13. Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation. Food and Drug Administration (FDA), Center for Drug Evaluation and Research (CDER), May 2001.
 14. Krise JP, Narisawa S, Stella VJ. A novel prodrug approach for tertiary amines. 2. Physicochemical and *in vitro* enzymatic evaluation of selected *N*-phosphonooxymethyl prodrugs. *J Pharm Sci* 1999; **88**: 922–927.
 15. Liederer BM, Borchardt RT. Stability of oxymethyl-modified coumarinic acid cyclic prodrugs of diastereomic opioid peptides in biological media from various animal species including human. *J Pharm Sci* 2005; **94**: 2198–2206.
 16. Dhareshwar SS, Stella VJ. A novel prodrug strategy for β -dicarbonyl carbon acids: syntheses and evaluation of the physicochemical characteristics of C-phosphoryloxymethyl (POM) and phosphoryloxymethyloxymethyl (POMOM) prodrug derivatives. *J Pharm Sci* 2010; **99**: 2711–2723.
 17. Karabulut I, Balkanci ZD, Pehlivanoglu B, Erdem A, Fadillioglu E. Effect of toluene on erythrocyte membrane stability under *in vivo* and *in vitro* conditions with assessment of oxidant/antioxidant status. *Tox Ind Health* 2009; **25**: 545–550.
 18. Hopkins J, Tudhope GR. The effects of drugs on erythrocytes *in vitro*: Heinz body formation, glutathione peroxidase inhibition and changes in mechanical fragility. *Br J Clin Pharmacol* 1974; **1**: 191–195.
 19. Seeman P, Kwant WO, Sauks T, Argent W. Membrane expansion of intact erythrocytes by anesthetics. *Biochem Biophys Acta* 1969; **193**: 490–498.
 20. Evans ER, Pasadena MD. Diagnosis of the hemolytic anemias. *Calif Med* 1951; **75**: 271–275.

Araraquara, 20 de dezembro de 2013.

De acordo,



Marcelo Gomes Davanço



Profa Dra Rosângela Gonçalves Peccinini