

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

"JULIO DE MESQUITA FILHO"

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

CAMPUS DE ARARAQUARA

***Tratamento da Tuberculose: estudo de
interações farmacocinéticas da pirazinamida***

Rodrigo Vieira Pires

Araraquara-SP

2011

Rodrigo Vieira Pires

**Tratamento da Tuberculose:
Estudo de interações farmacocinéticas da pirazinamida**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado à Faculdade de Ciências
Farmacêuticas da Universidade
Estadual Paulista – Julio de Mesquita
Filho – UNESP, como requisito para
obtenção do grau de Farmacêutico-
Bioquímico

Laboratório de Toxicologia – Departamento de Princípios Ativos Naturais e
Toxicologia - PANT

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Rosângela Gonçalves Peccinini

Araraquara-SP

2011

I know, nobody knows
Where it comes and where it goes
I know it's everybody's sin
You got to lose to know how to win

(Dream on – Aerosmith)

Agradeço a todos aqueles que estiveram comigo durante todos esses anos no laboratório de toxicologia, Elias, Marquinhos, Zigoto, Michel, Terezão, Berê, Kelly, Juliana e amigos da Toxicologia e da Bioequivalência.

Agradeço ao amigo Elias por ter me incentivado a fazer parte deste grupo de pesquisa logo no primeiro ano de faculdade. Realmente valeu a pena! Foi o melhor conselho que alguém me deu durante a graduação.

Agradeço a minha orientadora Rosangela por ter acreditado em mim, por ter me auxiliado sempre que precisei e pelo apoio que tive ao longo desta etapa. Obrigado pela oportunidade de fazer parte desta família, pelas cobranças, pelas puxadas de orelhas, pelas responsabilidades delegadas, pela confiança e reconhecimento do trabalho realizado e por ser uma mãe para todos nós. Crescemos e amadurecemos muito ao longo desses anos. Reflexos da sua competência. Obrigado!

Agradeço aos amigos da minha República, Rancho, pelo apoio e reconhecimento do meu trabalho. Leozinho e Dallas vocês são como irmãos para mim!

Agradeço também à República Caverna pela hospitalidade, pelas festas, por todos os bons momentos vividos nesta república, e por exportar cabeças para o laboratório de toxicologia.

Agradeço aos meus pais, Renato e Lourdes, pelo apoio e sustento durante esses anos.

Agradeço a todos os coelhos responsáveis por nossas noites em claro, sem vocês nada disso seria possível.

Abreviaturas e Siglas

ALP – Fosfatase alcalina

ALT – Alanina amino transferase

ASC – Área sob a Curva

ASAL – Arginino succinato liase

AST – Aspartato amino transferase

AZT – Zidovudina

BK - Bacilo de Koch

BMRC - British Medical Research Council

CK – Creatinina quinase

CV% - Coeficiente de Variação em porcentagem

DP – Desvio Padrão

FCFAR – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara

GGT – Gama Glutamil Transferase

HIV – Síndrome da Imunodeficiência Humana Adquirida

HPLC – High Performance Liquid Chromatography

INH - isoniazida

LD – Lactato Desidrogenase

MDR-TB – Tuberculose Multirresistente

OFX – Ofloxacino

PZA - pirazinamida

r - Coeficiente de correlação

r² - Coeficiente de determinação

RMP - rifampicina

TB – Tuberculose

TCA - Ácido tricloroacético

TFA – Ácido trifluoracético

TGO – Transaminase oxalacética

TGP – Transaminase pirúvica

U/L – Unidades por Litro

UA – Unidades de absorvância

UICTMR - International Union Against Tuberculosis and Lung Disease

UNESP – Universidade Estadual Paulista – Julio de Mesquita Filho

UV – Ultra Violeta

VS – Visível

Lista de Figuras

Figura 1 – Esquema de medicação para o tratamento da TB.....	11
Figura 2 – Esquema I para o tratamento da TB.....	11
Figura 3 – Esquema IR para o tratamento da TB.....	12
Figura 4 – Esquema II para o tratamento da TB.....	12
Figura 5 – Esquema III para o tratamento da TB.....	13
Figura 6 - Curva de calibração da enzima ALT.....	32
Figura 7 - Média da variação ALT dos coelhos entre os grupos.....	33
Figura 8 - Curva de calibração da enzima AST.....	34
Figura 9 - Média da variação AST dos coelhos entre os grupos.....	34
Figura 10 - Média das diferenças de valores para cada grupo sobre o parâmetro Bilirrubina.....	36
Figura 11 - Curva de calibração da pirazinamida.....	37
Figura 12- Perfis farmacocinéticos dos grupos estudados.....	41

Lista de Tabelas

Tabela 1 – Obtenção dos parâmetros farmacocinéticos.....	30
Tabela 2 - Valores da Curva de Calibração da ALT.....	31
Tabela 3 - Valores da Curva de Calibração da AST.....	33
Tabela 4 - Absorbância dos Padrões de Bilirrubina para cálculo do Fator de conversão de absorbância para mg/dL.....	35
Tabela 5 - Valores de área de pico versus concentração de pza utilizados para a construção da curva analítica em plasma de coelhos.....	38
Tabela 6 – precisão intra-ensaio.....	39
Tabela 7 – precisão inter-ensaio.....	39
Tabela 8 – exatidão intrar-ensaio.....	39
Tabela 9 – exatidão inter-ensaio.....	40
Tabela 10 – Comparações encontradas entre os parâmetros farmacocinéticos entre os grupos animais.....	40

Sumário

1. INTRODUÇÃO	9
1.1. TRATAMENTO	10
1.2. EFEITOS ADVERSOS RELACIONADOS AO TRATAMENTO	13
1.3. FARMACOLOGIA CLÍNICA	16
1.3.1. <i>Farmacologia clínica da Pirazinamida</i>	16
1.3.2. <i>Farmacologia Clínica da Rifampicina</i>	18
1.3.3. <i>Farmacologia clínica da Isoniazida</i>	21
1.4. HEPATOTOXICIDADE	23
2. OBJETIVOS	24
3. MATERIAIS E MÉTODOS	25
3.1. LOCAL DO EXPERIMENTO	25
3.2. ANIMAIS	25
3.2.1. <i>Grupo 1 - Controle (n = 5)</i>	26
3.2.2. <i>Grupo 2 - Pirazinamida (n=5)</i>	26
3.2.3. <i>Grupo 3 - Associação (n=5)</i>	27
3.3. TÉCNICA DA Sonda NASOGÁSTRICA	27
3.4. DETERMINAÇÃO DOS PARÂMETROS BIOQUÍMICOS ASL E ALT	28
3.5. DETERMINAÇÃO DE BILIRRUBINA	28
3.6. DETERMINAÇÃO DA PIRAZINAMIDA EM PLASMA POR HPLC	29
3.7. ANÁLISE FARMACOCINÉTICA	29
3.8. ANÁLISE ESTATÍSTICA	31
4. RESULTADOS	31
4.1. ALT	32
4.2. AST	33
4.3. BILIRRUBINA	35
4.4. DETERMINAÇÃO DA PZA EM PLASMA	36
4.4.1. <i>Curva de calibração da pirazinamida (PZA)</i>	36
5. DISCUSSÃO	41
6. CONCLUSÃO	49
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	50
8. APÊNDICE	54
8.1. FLUXOGRAMA 1	54

Resumo do Projeto

Convencionalmente o tratamento da tuberculose se dá pela administração simultânea dos fármacos pirazinamida (PZA), rifampicina (RMP) e isoniazida (INH) durante dois meses, seguida por quatro meses da associação INH e RMP.

A medicação é de uso diário e deve ser administrada de preferência em uma única dose em jejum ou, em caso de intolerância digestiva, junto com uma refeição. Esta estratégia resulta em sucesso terapêutico na maioria dos casos quando existe obediência do paciente ao regime posológico.

O abandono ao tratamento pelo paciente tem sido relacionado ao longo período de exposição aos fármacos e ao aparecimento de efeitos adversos, entre eles, a hepatotoxicidade principalmente em pacientes geriátricos que apresentam deficiências nutricionais ou etilismo crônico.

A utilização de associações medicamentosas, como no tratamento da tuberculose, pode resultar em interações farmacocinéticas. Considerando a importância do metabolismo da PZA no desenvolvimento da hepatotoxicidade, a capacidade de indução ou inibição enzimática dos fármacos e a probabilidade de interação farmacocinética entre a PZA, a INH e a RMP, é possível que esta associação resulte em diferentes perfis farmacocinéticos com conseqüente alteração de efeitos hepatotóxicos.

Assim, o presente trabalho visa avaliar os efeitos da administração simultânea de INH e RMP sobre os parâmetros farmacocinéticos da PZA em um grupo de animais (coelhos albinos) sob tratamento com PZA e outro com PZA+INH+RMP bem como os níveis de biomarcadores de hepatotoxicidade – as transaminases AST e ALT – antes e após a administração de doses múltiplas destes fármacos.

1. Introdução

A infecção por tuberculose (TB) é conhecida desde a antiguidade, relatada por egípcios, gregos, árabes e outros povos do oriente, no entanto o seu tratamento persiste como uma problemática entre os estudiosos (DE SOUZA & VASCONCELOS, 2005). É considerada um problema de saúde prioritário no Brasil, que juntamente com outros 21 países em desenvolvimento, albergam 80% dos casos mundiais da doença. No Brasil, estima-se que ocorram 129.000 casos por ano, dos quais são notificados cerca de 90.000, entretanto, parte dos doentes não é diagnosticada nem registrada oficialmente (MANUAL TÉCNICO PARA CONTROLE DA TUBERCULOSE, 2002)

Trata-se de uma doença infecto contagiosa, causada por uma bactéria denominada *Mycobacterium tuberculosis*, também conhecido como bacilo de Koch (BK), que se propagam através do ar, por meio de perdigotos, gotículas contendo os bacilos, expelidos por um doente com TB pulmonar ao tossir, espirrar ou falar. Quando estas gotículas são inaladas por pessoas sadias provocam a infecção tuberculosa, devido à instalação do bacilo no organismo, levando ao risco de desenvolver a doença (MANUAL TÉCNICO PARA CONTROLE DA TUBERCULOSE, 2002)

A propagação da tuberculose está relacionada às condições de vida da população e, como todas as doenças infecciosas, dissemina-se em áreas de grande concentração humana, com precários serviços de infra-estrutura urbana, como saneamento e habitação. Estes fatores levam a uma maior incidência nas periferias das grandes cidades. (MANUAL TÉCNICO PARA CONTROLE DA TUBERCULOSE, 2002)

As pessoas infectadas, portadoras do bacilo, que não apresentem sintomas da doença, não são capazes de transmitirem o bacilo, porém uma vez infectada a pessoa pode desenvolver os sinais e sintomas em qualquer fase da vida. Isto ocorrerá quando o sistema imune do indivíduo não conseguir mais combater a bactéria em uma velocidade maior que a de sua multiplicação. (CONSENSO SOBRE TUBERCULOSE, 1995)

Todos os órgãos podem ser acometidos pelo bacilo da tuberculose, porém, ocorrem mais freqüentemente nos pulmões, nos gânglios, na pleura, nos rins, no cérebro e nos ossos. Trata-se de uma doença grave, porém curável em praticamente 100% dos casos novos, desde que os princípios da quimioterapia sejam seguidos. (CONSENSO SOBRE TUBERCULOSE, 1995)

1.1. Tratamento

A associação medicamentosa adequada, doses corretas, uso por tempo suficiente, com supervisão das doses dos medicamentos são os meios para evitar a persistência bacteriana e o desenvolvimento de resistência aos fármacos clássicos, assegurando assim a cura do paciente. Em todos os esquemas, a medicação deve ser administrada diariamente, em uma só ingestão, de preferência em jejum. Segundo a situação do caso, os esquemas a serem adotados são (BARON & BELL, 1974):

Situação	Esquema indicado
Sem tratamento anterior	I
Com tratamento anterior: – recidivante do Esquema I ou – retorno após abandono do Esquema I	IR
Meningite Tuberculosa	II
Falência dos Esquemas I ou IR	III

Figura 1 – Esquema de medicação para o tratamento da TB.(MINISTÉRIO DA SAÚDE,1995)

As figuras a seguir mostram os esquemas I, IR, II e III, com suas indicações, dosagens e observações específicas.

ESQUEMA I					
2RHZ/4RH* – Indicado nos casos novos de todas as formas de tuberculose pulmonar e extrapulmonar, exceto meningite					
Fases do tratamento	Drogas	Peso do doente			
		Até 20kg mg/kg/dia	Mais de 20kg e até 35kg mg/dia	Mais de 35kg e até 45kg mg/dia	Mais de 45 kg mg/dia
1ª fase (2 meses)	R	10	300	450	600
	H	10	200	300	400
	Z	35	1.000	1.500	2.000
2ª fase (4 meses)	R	10	300	450	600
	H	10	200	300	400

Observações:

a) No tratamento da tuberculose oftálmica e cutânea, a isoniazida poderá ser mantida por mais seis meses, a critério médico (2RHZ/4RH/6H).

b) No tratamento da associação tuberculose e portador de HIV ou paciente com AIDS, a 2ª fase terá a duração de 7 meses (2RHZ/7RH).

* 2RHZ – 1ª fase (2 meses), 4RH – 2ª fase (4 meses)

R: Rifampicina – H: Isoniazida – Z: Pirazinamida

Siglas adotadas pela Organização Mundial de Saúde – OMS

Figura 2 – Esquema I para o tratamento da TB. (MINISTÉRIO DA SAÚDE,1995)

ESQUEMA IR*					
2RHZE/4RHE** – Indicado nos casos de retratamento em recidivantes e retorno após abandono do Esquema I					
Fases do tratamento	Drogas	Peso do doente			
		Até 20kg mg/kg/dia	Mais de 20kg e até 35kg mg/dia	Mais de 35kg e até 45kg mg/dia	Mais de 45 kg mg/dia
1ª fase (2 meses)	R	10	300	450	600
	H	10	200	300	400
	Z	35	1.000	1.500	2.000
	E	25	600	800	1.200
2ª fase (4 meses)	R	10	300	450	600
	H	10	200	300	400
	E	25	600	800	1.200

Observações:

a) Os recidivantes de esquemas alternativos por toxicidade ao Esquema I devem ser avaliados para prescrição de esquema individualizado.

b) Havendo alteração visual durante o tratamento, o paciente deverá ser encaminhado para um serviço de referência, com o objetivo de avaliar o uso do Etambutol.

* Esquema I reforçado.

** 2RHZE – 1ª fase (2 meses). 4RHE – 2ª fase (4 meses)

R: Rifampicina – H: Isoniazida – Z: Pirazinamida – E: Etambutol

Figura 3 – Esquema IR para o tratamento da TB. (MINISTÉRIO DA SAÚDE,1995)

ESQUEMA II			
2RHZ/7RH* – Indicado na meningite tuberculosa			
Fases do tratamento	Drogas	Dose para todas as idades mg/kg de peso/dia	Dose máxima em mg
1ª fase (2 meses)	R	20	600
	H	20	400
	Z	35	2.000
2ª fase (7 meses)	R	10 a 20	600
	H	10 a 20	400

Observações:

a) Nos casos de concomitância de meningite tuberculosa com qualquer outra localização de tuberculose, usar o Esquema II.

b) Nos casos de meningite tuberculosa, em qualquer idade, recomenda-se o uso de corticosteróides por um prazo de 2 a 4 meses, no início do tratamento.

c) Na criança a prednisona é administrada na dose de 1 a 2mg/kg de peso corporal, até a dose máxima de 30mg/dia. No caso de se utilizar outro corticosteróide, aplicar a tabela de equivalência entre eles.

d) A fisioterapia na meningite tuberculosa deverá ser iniciada, com orientação, o mais precocemente possível.

* 2RHZ – 1ª fase (2 meses), 7RH – 2ª fase (7 meses)

R: Rifampicina – H: Isoniazida – Z: Pirazinamida

Síglas adotadas pela Organização Mundial de Saúde – OMS

Figura 4 – Esquema II para o tratamento da TB. (MINISTÉRIO DA SAÚDE,1995)

ESQUEMA III					
3SEtEZ/9EtE* – Indicado nos casos de falência de tratamento com os Esquemas I, IR e II					
Fases do tratamento	Drogas	Peso do doente			
		Até 20kg mg/kg/dia	Mais de 20kg e até 35kg mg/dia	Mais de 35kg e até 45kg mg/dia	Mais de 45 kg mg/dia
1ª fase (3 meses)	S	20	500	1.000	1.000
	Et	12	250	500	750
	E	25	600	800	1.200
	Z	35	1.000	1.500	2.000
2ª fase (9 meses)	Et	12	250	500	750
	E	25	600	800	1.200

Observações:
a) Em pessoas maiores de 60 anos, a estreptomicina deve ser administrada na dose de 500mg/dia.
b) Havendo alteração visual durante o tratamento, o paciente deverá ser encaminhado para um serviço de referência, com o objetivo de avaliar o uso do Etambutol.
* 3SEtEZ – 1ª fase (3 meses). 9EtE – 2ª fase (9 meses)
S: Estreptomicina – Et: Etionamida – Z: Pirazinamida – E: Etambutol
Siglas adotadas pela Organização Mundial de Saúde – OMS

Figura 5 – Esquema III para o tratamento da TB. (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 1995)

1.2. Efeitos adversos relacionados ao tratamento

Alguns pacientes podem eventualmente apresentar reações indesejáveis, o que raramente determina a suspensão definitiva dos fármacos. Sinais como neuropatia periférica, náuseas, vômitos e icterícia (isoniazida); artralguas, náuseas, vômitos e icterícia (pirazinamida); náuseas, vômitos, icterícia, asma, urticária e manifestações hemorrágicas (rifampicina); perda de equilíbrio e diminuição de audição (estreptomicina); náuseas, vômitos e alterações visuais (perda da visão periférica, perturbação das cores, perda de acuidade visual e até cegueira) (etambutol); náuseas, vômitos, diarreia e icterícia (etionamida) levam a suspensão do tratamento. (DE SOUZA E VASCONCELOS, 2005)

A maioria dos fármacos antituberculose pode causar dano hepático e quando a hepatite ocorre no curso do tratamento da tuberculose ou da quimioprofilaxia, nem sempre é evidente que tenha relação causal com os agentes quimioterápicos.

Há 20 anos, um estudo duplo-cego foi patrocinado pela *International Union Against Tuberculosis and Lung Disease* (UICTMR), envolvendo 20.838 pessoas submetidas à quimioprofilaxia (300mg/dia) e outras 6.991 pessoas que receberam placebo. O risco de hepatite causada ou agravada por Isoniazida foi de 5,2/1.000 nos 12 meses de uso do fármaco, sendo que a complicação ocorreu nas primeiras 16 semanas; não variou com o sexo, mas variou consideravelmente com a idade. Até 35 anos o risco foi de 2,8/1.000 e no grupo acima de 55 anos foi de 7,7/1.000. (TOSTMANN & BOEREE, 2007)

O mecanismo de desencadeamento da hepatite pela INH não é restrito à reação tóxica ao medicamento ou a um de seus metabólitos, já que não observa-se correlação entre a dose de INH e a frequência de hepatite. Em certos casos nos quais a INH foi suspensa a hepatite pode reaparecer após a administração de pequena dose de provocação. Por outro lado, muitos pacientes podem reiniciar a INH sem acusar novamente os sintomas após breve interrupção. A hepatite desenvolvida em pacientes em uso de esquemas contendo INH e outros fármacos que não a PZA ou RMP foi exaustivamente avaliada nos estudos coordenados pelo BMRC (*British Medical Research Council*) em 20 países, envolvendo cerca de 10.000 pacientes. A incidência de hepatite foi baixa, em torno de 1 e 2%, e similar nas diferentes populações estudadas. Nos esquemas que associavam INH e RMP, o efeito hepatotóxico não foi estabelecido até o amplo estudo conduzido por Baron e Bell que constataram que ocorria aumento transitório das transaminases e que estas voltavam a níveis normais sem que houvesse necessidade de suspensão dos medicamentos. Somente dois casos de hepatite foram observados (CONSENSO SOBRE TUBERCULOSE, 1995)

A rifampicina é bem tolerada, metabolizada exclusivamente pelo fígado e pode produzir hiperbilirrubinemia transitória na fase inicial do tratamento sem causar dano hepatocelular. Pode causar hepatite em 0,4% dos casos, quando usada como monoterapia, e em 2,5% quando associada à isoniazida. A rifampicina induz as enzimas microssomais hepáticas, reduzindo a vida média e a eficácia dos corticosteróides, cumarínicos, contraceptivos orais, hipoglicemiantes orais, narcóticos, analgésicos e dapsona. Aumenta ainda o metabolismo da zidovudina (AZT) e dos agentes antifúngicos entre os pacientes soropositivos para o HIV. (ZHANG & MITCHISON, 2003).

Considerando a importância do metabolismo da PZA no desenvolvimento da hepatotoxicidade, a capacidade de indução ou inibição enzimática dos fármacos e a probabilidade de interação farmacocinética entre a PZA, a INH e a RMP, é possível que esta associação resulte em diferentes perfis farmacocinéticos com consequente alteração na indução de efeitos hepatotóxicos. Ainda não foi elucidado porque a administração de PZA associada à RMP resulta em maior toxicidade do que a INH administrada isoladamente ou em regime associada à PZA e RMP por seis semanas. Alguns autores sugerem que a PZA possa ser a principal causa (TOSTMANN & BOEREE, 2007)

A pirazinamida tem sido padronizada no esquema primário de tratamento contra TB, inicialmente utilizada em doses elevadas, juntamente com INH e RMP nos últimos 50 anos, pois possui grande influência no ataque de bacilos semidormentes (ZHANG & MITCHISON, 2003), porém a hepatotoxicidade é o seu principal efeito adverso (PEREIRA & TRESOLDI, 2000).

1.3. Farmacologia Clínica

O efeito de um fármaco no organismo é decorrente da sua interação nos sítios receptores, e está associado a uma determinada concentração e à sua permanência no local de ação por determinado tempo. Associações medicamentosas são amplamente utilizadas na terapêutica, no entanto, as interações que podem ocorrer, como resultado dessas associações, nem sempre são satisfatoriamente elucidadas, de maneira a garantir a segurança dessa utilização. (ACOCCELA, 1978)

1.3.1. Farmacologia clínica da Pirazinamida.

Mecanismo de ação

A pirazinamida (PZA) é um fármaco antibacteriano. Seu mecanismo de ação é pouco conhecido. Ela e o ácido pirazinóico podem desenergizar a membrana do *Mycobacterium tuberculosis* pelo colapso do potencial de membrana, afetando a função do transporte através da membrana, em pH ácido (DUCATI, 2006).

Absorção

A dose diária de PZA recomendada é de 35 mg/kg/dia para crianças de até 20 kg, 1000 mg/dia entre 20 kg e 35 kg, 1500 mg/dia entre 35 kg e 45 kg e para adultos acima de 45 kg uma dose de 2000 mg/dia (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2007).

O fármaco é rapidamente absorvido no trato gastrointestinal com picos de concentrações plasmáticas de 38,7 µg/ml após administração de uma dose oral de 27 mg/kg, atingindo concentração sérica de 30-50 µg/mL, uma meia vida de 9,6 horas e AUC de 502 mg.h/L (GROSSET, 1992)

Distribuição

Após a absorção, a pirazinamida é distribuída por todo o organismo, tecidos e fluidos (pleural, ascítico, saliva, cérebro espinhal) em níveis similares aos níveis séricos. Sua ligação com as proteínas plasmáticas é de aproximadamente 10-20%. O volume de distribuição da PZA é de aproximadamente 0,7 L/Kg (HARDMAN & LIMBIRD, 2004).

Biotransformação

Há evidências de que a pirazinamida entra no *M. tuberculosis* por difusão passiva, sendo convertida a ácido pirazinóico pela atividade da enzima pirazinamidase/nicotinamidase e é excretada por uma bomba de efluxo fraca. Em meio ácido, ácido pirazinóico protonado se acumula e é reabsorvido, causando lesão celular. Pirazinamida e ácido pirazinóico podem desenergizar a membrana, pelo colapso do potencial de membrana, afetando a função do transporte através da membrana, em pH ácido (DUCATI, 2006)

A resistência ocorre por mutação no gene *pncA* o que impede a conversão de pirazinamida em sua forma ativa, o ácido pirazinóico. A pirazinamida é também metabolizada pelo fígado, mas os seus metabólitos (ácidos pirazinóico e 5-hidroxi-pirazinóico) podem se acumular na vigência de insuficiência renal (ZHANG & MITCHISON, 2003).

Excreção

A meia vida da PZA é cerca de 9,2 horas em pacientes com funções renal e hepática normais. Sua meia vida pode ser prolongada em pacientes com disfunção renal e hepática. Aproximadamente 70% da dose do fármaco e seus metabólitos são

excretados principalmente por filtração glomerular renal (SHEN & MENG, 2008). As concentrações urinárias atingem 50 a 100 mg/mL durante várias horas após uma dose única de 1g (HARDMAN & LIMBIRD, 2004).

Interações farmacológicas

Em estudo de dose única da associação RMP+INH ou RMP+INH+PZA, JAIN e colaboradores (1993) observaram concentrações plasmáticas de RMP significativamente menores na presença de PZA.

1.3.2. Farmacologia Clínica da Rifampicina

Mecanismo de ação

A RMP, derivado semi-sintético da rifamicina B, atua inibindo a RNA-polimerase DNA-dependente de micobactérias e de outros microorganismos, através da formação de um complexo estável fármaco-enzima, resultando em supressão do início da formação da cadeia na síntese de RNA. As micobactérias podem desenvolver rapidamente resistência à rifampicina, de modo que este antibiótico não deve ser utilizado isoladamente na quimioterapia da tuberculose (HARDMAN & LIMBIRD, 2004).

Absorção

A RMP tem uma biodisponibilidade oral de 90%. A administração oral de RMP produz concentrações plasmáticas máximas em 2 a 4 horas; após a administração de 600mg, este valor varia em torno de 7-12 µg/mL. (ELLENHORN & BARCELOUX, 1988), (HARDMAN & LIMBIRD 2004)

Distribuição

Após absorção no trato gastrointestinal, cerca de 80% do fármaco liga-se às proteínas plasmáticas (ZHOU & YUNG, 2005). A RMP distribui-se por todo o organismo, possuindo volume de distribuição aparente de 1,6L/Kg sendo encontrada em concentrações eficazes em muitos órgãos e líquidos corporais, como LCR (líquido céfalo raquidiano) (HARDMAN & LIMBIRD, 2004) (ELLENHORN & BARCELOUX, 1988). A sua extensa distribuição pode ser demonstrada pelo fato do fármaco conferir coloração laranja-avermelhada à urina, fezes, saliva, escarro, lágrimas e suor (HARDMAN & LIMBIRD, 2004).

Biotransformação

A RMP pode ser metabolizada ou por hidrólise dando origem a formil-rifampicina ou por desacetilação formando a desacetil-rifampicina (TASDUQ & KAISAR, 2005) a qual retém praticamente toda a atividade antibacteriana. De forma que após 6 horas da ingestão do fármaco ele encontra-se na bile quase todo na forma desacetilada. A reabsorção intestinal é reduzida devido ao processo de desacetilação e pela presença de alimento (HARDMAN & LIMBIRD, 2004).

Excreção

A RMP sofre rápida eliminação via bile, em consequência da circulação entero-hepática. A forma desacetilada é predominantemente encontrada na bile. (TASDUQ & KAISAR, 2005)

A meia vida de eliminação da RMP varia de 1,5 a 5 horas e aumenta na presença de disfunção hepática; porém pode estar reduzida em pacientes que

recebem INH concomitantemente. A meia vida diminui progressivamente em cerca de 40% durante os primeiros 14 dias de tratamento, devido à indução de enzimas microsossomais hepáticas, com aceleração da acetilação do fármaco. (KASHUBA & BERTINO, 1998).

Até 30% de uma dose de RMP são excretados na urina, enquanto 60 a 65% são excretados nas fezes, sendo que menos da metade deste valor consiste no antibiótico inalterado. Pacientes com disfunção renal, não necessitam de ajuste da posologia (KASHUBA & BERTINO, 1998).

A RMP na forma inalterada e seu metabólito desacetil-rifampicina, ambos farmacologicamente ativos, são excretados primariamente na bile e posteriormente na urina enquanto que o metabólito formil-rifampicina tem excreção exclusivamente renal (ACOCELLA & LUVARÁ, 1978). O clearance da RMP é de 8,7 ml/mim/Kg (ZHOU & YUNG, 2005).

Interações Farmacológicas

Este fármaco é um potente indutor das isoformas do *CYP450* e de uma série de enzimas envolvidas na biotransformação de fármacos. De Rosa⁸ e colaboradores verificaram em seus estudos que a administração concomitante de RMP+INH pode levar ao aumento da toxicidade causada pela INH devido à indução dessas isoformas do *CYP450*, que estão relacionadas com a conversão da AcHz, metabólito da INH, a compostos reativos e hepatotóxicos. As principais isoformas induzidas pela RMP são *CYP3A4*, *1A2*, *2C9*, *2C19* e *2E1* entre outras. (ZHOU & YUNG, 2005).

A RMP, como indutor enzimático, é capaz de intensificar a sua própria biotransformação e diminuir sua meia vida plasmática quando administrada em doses múltiplas como descrito anteriormente (DOUGLAS & MCLEOD, 1999).

1.3.3. Farmacologia clínica da Isoniazida

Mecanismo de ação

A isoniazida é um fármaco antibacteriano, utilizada tanto no tratamento profilático quanto na doença ativa da tuberculose, que inibe a síntese do ácido micólico, componente essencial da parede celular da micobactéria, sendo as enzimas enoil-acil redutase (InhA) e β -cetoacil-acil sintase responsáveis pela síntese de ácidos graxos de cadeia longa (SARICH & ZHOU, 1995).

Absorção

A dose diária de INH recomendada é de 5mg/kg/dia com máximo de 300 mg para adultos e 10 a 20 mg/kg/dia para crianças. Existem evidências de apreciável metabolização pré-sistêmica após a administração oral da INH. No entanto, não se encontram estabelecidos os valores da biodisponibilidade oral (HARDMAN & LIMBIRD, 2004).

O fármaco é rapidamente absorvido no trato gastrintestinal com picos de concentrações plasmáticas de 3 a 5 μ g/mL após administração de 5 a 20mg/Kg, atingidos entre 1 a 2 horas. A absorção e a biodisponibilidade são reduzidas quando a isoniazida é administrada na presença de alimentos e antiácidos. (KASHUBA ET AL. 1998)

Distribuição

Após a absorção, a isoniazida é distribuída por todo o organismo, tecidos e fluidos (pleural, ascítico, saliva, cérebro espinhal) em níveis similares aos níveis séricos. Sua ligação com as proteínas plasmáticas é de aproximadamente 10-15% e o volume de distribuição de aproximadamente 0,6 L/Kg em voluntários sadios com peso normal rifampicina (TASDUQ ET AL, 2005).

Biotransformação

O metabolismo da isoniazida envolve uma etapa inicial de acetilação para formar acetil-isoniazida, mediada pela N-acetiltransferase 2(NAT-2) rifampicina (TASDUQ & KAISAR, 2005). A etapa subsequente é a hidrólise, com liberação de ácido isonicotínico e acetil-hidrazina. A acetil-hidrazina pode sofrer acetilação originando diacetil-hidrazina ou sofrer oxidação microsomal, mediada por isoformas do CYP principalmente CYP2E1, para originar metabólitos reativos com potencial hepatotóxico, como a hidrazina, que pode ser formada por hidrólise direta da isoniazida ainda nas etapas iniciais de sua biotransformação (SARICH & ADAMS, 1999).

Excreção

A meia vida da isoniazida em voluntários sadios varia de 1 a 4 horas, sendo 70 minutos em acetiladores rápidos e 2 a 5 horas em acetiladores lentos. A meia vida plasmática pode ser prolongada para 4,3 horas em pacientes com disfunção renal moderada ou insuficiência renal (BALDAN, 2007).

A excreção urinária de isoniazida em adultos com função renal normal é de aproximadamente 50-70% da dose de 5mg/Kg. A porcentagem de diferentes compostos excretados varia de acordo com o fenótipo acetilador. Já a excreção através do leite materno é em torno de 0,75-2,3% da dose em 24h. Pequenas quantidades do fármaco são excretadas através da saliva, do escarro e nas fezes (KASHUBA ET AL. 1998).

O clearance da isoniazida é de aproximadamente 3,7 mL/min em acetiladores lentos e 7,4 mL/min em acetiladores rápidos (KASHUBA ET AL. 1998).

Interações farmacológicas

O citocromo *CYP3A* é bastante abundante nos seres humanos e é responsável pelo metabolismo de 60% dos fármacos conhecidos no mercado. Especificamente a isoforma *CYP3A4* é susceptível à inibição por uma grande diversidade de fármacos, o que pode acarretar diminuição do metabolismo de antibacterianos tais como a claritromicina, a eritromicina e a isoniazida. Assim, no tratamento da tuberculose, a associação de fármacos pode levar a interações farmacocinéticas com consequente interferência na produção de metabólitos da INH (ZHOU ET AL. 2005).

1.4. Hepatotoxicidade

As transaminases são indicadores sensíveis de dano hepático, particularmente quando é uma lesão aguda, e incluem a AST (aspartato aminotransferase) e a ALT (alanina aminotransferase). A AST existe também em outros tecidos como o coração, músculo esquelético, rins, cérebro, pâncreas e, portanto é muito menos específica de lesão hepática do que a ALT, que existe

primariamente no fígado. Portanto, quando tem-se uma lesão hepática há refluxo de ambas as enzimas para o plasma com elevação dos níveis de ambas as enzimas, sendo que a ALT sobe ligeiramente mais do que a AST se a lesão for puramente hepática. A exceção é na lesão hepática alcoólica em que a elevação da AST é cerca de 2-3 vezes superior à elevação da ALT, dado que o álcool tem um efeito inibidor na síntese de ALT. (ZHOU & YUNG, 2005).

A bilirrubina pode existir na forma não conjugada e na forma conjugada. Um aumento isolado da fração não conjugada é raramente devido à doença hepática e geralmente traduz um aumento da produção de bilirrubina não conjugada por aumento de destruição eritrocitária (hemólise). (KASHUBA ET AL. 1998).

Em contraste, um aumento da fração conjugada da bilirrubina indica quase sempre uma lesão hepática ou biliar. Isto acontece porque o passo limitante no metabolismo hepático da bilirrubina e, portanto, o mais comprometido quando há uma lesão hepática, não é a captação nem a conjugação, mas sim a excreção canalicular da bilirrubina. Como apenas a bilirrubina conjugada aparece na urina, sua presença é quase sempre indicativa de doença hepática. (ZHOU & YUNG, 2005).

2. Objetivos

- Desenvolver e validar um método bioanalítico para a determinação da pirazinamida em plasma por HPLC;
- Avaliar o perfil farmacocinético da pirazinamida administrada isoladamente e associada à rifampicina e isoniazida em coelhos albinos em doses múltiplas;

- Estabelecer os valores basais dos parâmetros ALT, AST e bilirrubina neste modelo animal através do grupo controle;
- Avaliar os mesmos parâmetros bioquímicos nos coelhos albinos quando expostos a doses múltiplas de pirazinamida isoladamente e em associação;
- Realizar a análise estatística entre os grupos para verificar diferenças e semelhanças entre os valores dos parâmetros bioquímicos e farmacocinéticos.

3. Materiais e Métodos

3.1. Local do Experimento

A pesquisa foi desenvolvida no Departamento de Princípios Ativos Naturais e Toxicologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas (FCFAR), Universidade Estadual Paulista - Julio de Mesquita Filho - (UNESP), Araraquara, São Paulo, Brasil.

3.2. Animais

Foram utilizados cinco coelhos albinos neozelandeses, brancos, machos, adultos, fornecidos pelo biotério central da UNESP em Botucatu, para cada grupo.

Os Coelhos foram acondicionados em gaiolas individuais, em sala em condições controladas de temperatura ($23 \pm 1^\circ \text{C}$), umidade ($55 \pm 5\%$) e luz (ciclo 12/12h, luzes acesas às 07h) sob uma dieta de ração para coelhos Purina[®] e água à vontade, até que obtivessem o peso médio de 3 kg para o início dos testes.

Os experimentos foram realizados na fase de claro e os animais ficaram privados de alimento por 12 horas anteriores às administrações dos fármacos.

Os animais foram divididos nos seguintes grupos:

3.2.1. Grupo 1 - Controle (n = 5)

Ao Grupo 1 foi administrada água estéril via nasogástrica por um período de 7 dias. O objetivo deste grupo foi conhecer os valores basais dos parâmetros bioquímicos em coelhos, importante para a comparação com os outros grupos experimentais assim como para verificar o efeito do estresse gerado pela manipulação dos animais sobre estes parâmetros bioquímicos.

A coleta foi realizada na veia marginal da orelha dos animais antes do início da administração e ao final dos 7 dias de experimento. Após a coleta do sangue total foi realizado o procedimento para a obtenção do soro em no máximo 2 horas após a coleta em decorrência da instabilidade dos parâmetros bioquímicos no material biológico.

3.2.2. Grupo 2 - Pirazinamida (n=5)

Ao segundo Grupo foi administrada pirazinamida isoladamente na dose de 56mg/kg durante 7 dias.

Os procedimentos para a administração, coleta e obtenção das amostras foram feitos à semelhança do grupo 1.

3.2.3. Grupo 3 - Associação (n=5)

Ao segundo Grupo foi administrada PZA (56mg/kg), INH (50mg/kg) e RMP (100mg/kg) durante 7 dias.

Os procedimentos para a administração, coleta e obtenção das amostras foram feitos à semelhança dos demais grupos.

3.3. Técnica da Sonda Nasogástrica

A administração de soluções via gavagem em coelhos albinos demonstrou-se ineficiente, pois se constatou perda de solução no processo devido à difícil deglutição na introdução da cânula de gavagem, tornando menos precisa a dose administrada. Assim, foi utilizada a sonda nasogástrica, técnica descrita no *Textbook of Rabbit Medicine* (FRANCES & BROWN, v6. p.82.) com sucesso.

A técnica consiste na passagem de um tubo flexível lubrificado com pomada de lidocaína (2%) pela narina do animal através do esôfago para atingir o estômago. O coelho também recebe uma solução de anestésico local (lidocaína) instilada na narina minutos antes do procedimento.

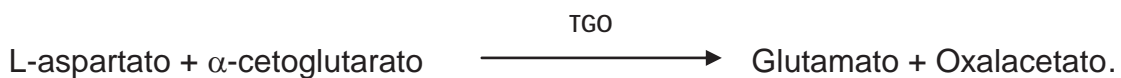
A sonda deve ser introduzida pelo meato ventricular e direcionada ligeiramente na direção ventral para evitar a traquéia, no momento da introdução, a cabeça do coelho deve ser levemente flexionada para facilitar a condução do tubo.

Foi uma técnica de condução simples e executada com sucesso pelo grupo, observando-se redução significativa do estresse para o animal quando comparada à administração por gavagem.

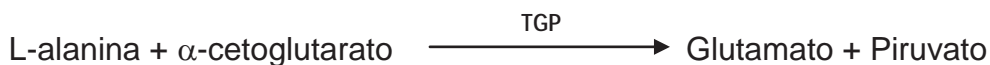
3.4. Determinação dos parâmetros bioquímicos ASL e ALT

Foram realizados testes bioquímicos para a determinação de ALT e AST por método colorimétrico pela reação de Reitman-Frankel (BURTIS e ASHWOOD, 2005), Kit Labtest, cujas etapas estão descritas abaixo:

⇒ Aspartato Aminotransferases (AST ou TGO) - a transaminase oxalacética promove a transferência de grupamentos amina de α -aminoácidos para α -cetoácidos.



⇒ Alanina Aminotransferase (ALT ou TGP) - a transaminase pirúvica promove a transferência de grupamentos amina de α -aminoácidos para α -cetoácidos.



O piruvato e/ou oxalacetato formados reagem com a 2,4-dinitrofenilhidrazina com formação da hidrazona correspondente que absorve luz à 505nm, em meio alcalino.

3.5. Determinação de Bilirrubina

A bilirrubina é dosada por diazotização e formação de azobilirrubina vermelha com absorção máxima em 525nm. A bilirrubina direta (diglicurônide) é determinada em meio aquoso, enquanto a total (direta e indireta) é determinada por potente solubilizador de ação catalisadora. O ensaio foi realizado através da utilização do Kit Labtest (Colorimétrico - Sims-Horn).

3.6. Determinação da pirazinamida em plasma por HPLC

A determinação de pirazinamida foi realizada por HPLC. No fluxograma 1 está descrito o procedimento analítico que foi utilizado para o processamento das amostras. O método bioanalítico estabelecido para a execução deste projeto foi desenvolvido a partir da publicação de Smith ET AL., com as adaptações necessárias para a otimização da resposta analítica. O método desenvolvido foi validado obedecendo-se os critérios estabelecidos pela RE-899 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (2003). Os limites de confiança determinados foram linearidade, limite de detecção, limite de quantificação, precisão e exatidão intra e inter-ensaios.

A detecção da pirazinamida foi realizada por um sistema de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) Waters Alliance equipado com detector UV-VS 2487, operando a 290 nm, coluna Resolve TM C₁₈ (5µm, 90 A, 3,9mm x 300mm) com injetor automático. A fase móvel foi constituída dos solventes: Solução TFA 0,06% (C) e acetonitrila (D) em modo isocrático (93/7 v/v), com fluxo de 1mL/min. O procedimento analítico para a determinação da pirazinamida em plasma está descrito no Fluxograma 1 (Apêndice).

3.7. Análise Farmacocinética

A disposição cinética da isoniazida, pirazinamida e rifampicina será avaliada após a administração de doses múltiplas em coelhos albinos neozelandeses por sonda naso gástrica.

A concentração plasmática máxima (C_{max}) e o tempo para atingir C_{max} (T_{max}) foram obtidos diretamente dos dados experimentais. Os demais parâmetros

farmacocinéticos foram calculados com base nas curvas da concentração plasmática *versus* tempo.

As meias-vidas e as constantes de velocidade (absorção, distribuição, eliminação) foram determinadas após a definição do modelo compartimental que melhor se adaptar aos dados experimentais.

As constantes de velocidade serão calculadas através da equação $0.693/T_{1/2}$. As áreas sob as curvas, concentração plasmática *versus* tempo (AUC^{0-t}), serão calculadas através do método dos trapezóides. Esse parâmetro será empregado nos cálculos do *clearance* total aparente ($Cl/f = \text{dose}/AUC$) e do volume aparente de distribuição ($Vd/f = Cl/f/\beta$).

Parâmetro	Método para obtenção
C_{max} (ug/mL)	Gráfico
T_{max} (h)	Gráfico
AUC^{0-t}	Trapezóides
K_a	$0.693/t_{1/2}^a$
$T_{1/2}^a$	Resíduos
Vd/f (L)	$Cl/f/\beta$
Cl_T / f (L/h)	Dose/AUC
$t_{1/2}$ (h)	Gráfico
β (h^{-1})	$0.693/t_{1/2}$

Tabela 1 – Obtenção dos parâmetros farmacocinéticos

3.8. Análise Estatística

Os dados farmacocinéticos de cada grupo foram apresentados através das medianas (Intervalo de confiança 95%). O teste t pareado (teste paramétrico) ou o não paramétrico (*Wilcoxon*) foram empregado para avaliar razões diferentes da unidade, com nível de significância fixado em 5% para a comparação entre os grupos.

Forão empregados os programas GraphPad Instat[®], Origin[®],e GMC[®].

4. Resultados

Os resultados foram obtidos utilizando Kits Labtest das respectivas enzimas no laboratório de Bioquímica Clínica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas com base nos gráficos e fatores calculados e descritos nos itens Materiais e Métodos e Resultados. As amostras coletadas tiveram o soro extraído em no máximo 2 horas após a coleta, conservadas em geladeira e analisadas em até 4 dias após acondicionamento.

Para que se realize a interpretação correta das absorbâncias lidas no espectrofotômetro é necessária a confecção de curvas de calibração que podem ser encontradas no manual do Kit Labtest e executadas para cada kit que venha a ser utilizado. Para este experimento foram utilizadas as seguintes curvas.

4.1. ALT

Curva ALT

Referência	Absorbância
0	0,256
28	0,340
57	0,429
97	0,515
150	0,570

Tabela 2 - Valores da Curva de Calibração da ALT

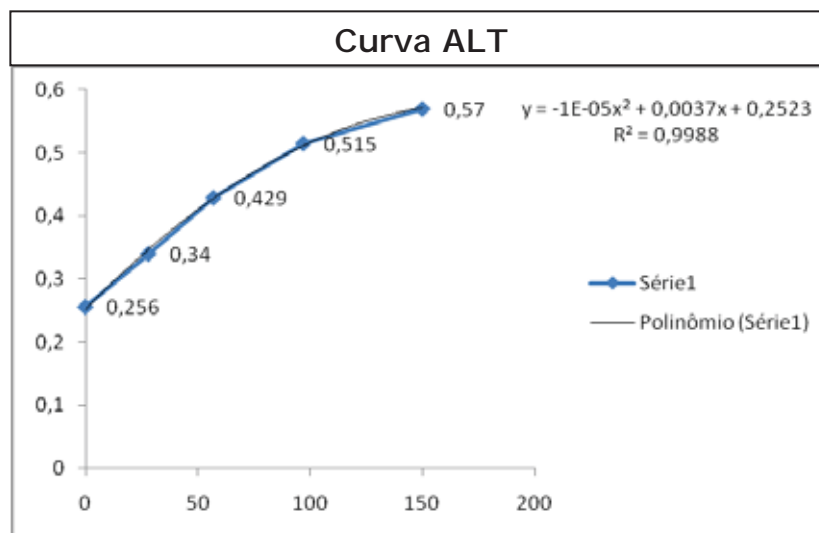


Figura 6 - Curva de calibração da enzima ALT

Estes gráficos servem de referência especificamente para o kit e aparelho utilizado, quando se obter um valor de absorbância de uma amostra animal, utilizam-se os gráficos para estimar os valores das enzimas em Unidades/L. Estes gráficos são construídos a partir de um padrão de concentração conhecida

utilizando-se piruvato de sódio 2 mmol, tanto para ALT quanto para AST, cujos valores de referência previamente estão previamente estabelecidos.

Na figura 7 estão demonstrados os resultados da variação de ALT para o grupo controle, o grupo que recebeu PZA e para o grupo que recebeu a associação. Houve diferença estatística significativa entre os grupos PZA e associação ($p=0,037$).

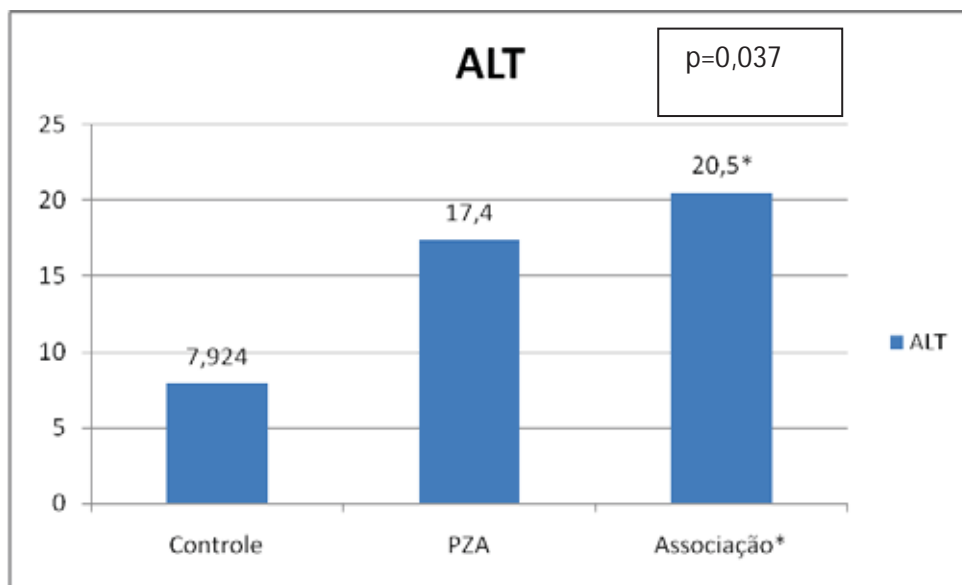


Figura 7 - Média da variação ALT dos coelhos entre os grupos

4.2. AST

Curva AST

Referência	Absorbância
0	0,209
24	0,294
61	0,379
114	0,443
190	0,489

Tabela 3 - Valores da Curva de Calibração da AST

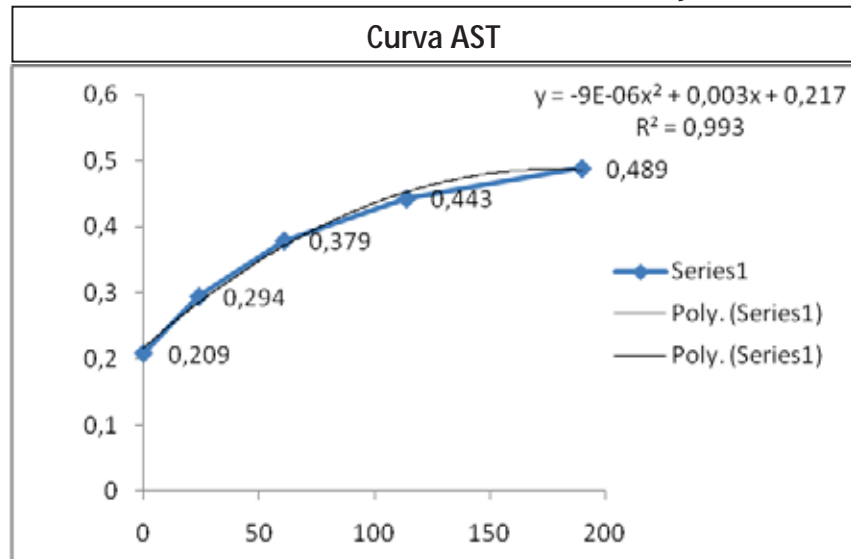


Figura 8 - Curva de calibração da enzima AST

Na figura 9 apresentamos a variação de AST para os grupos estudados. Não houve diferença estatística significativa entre os grupos ($p > 0,05$).

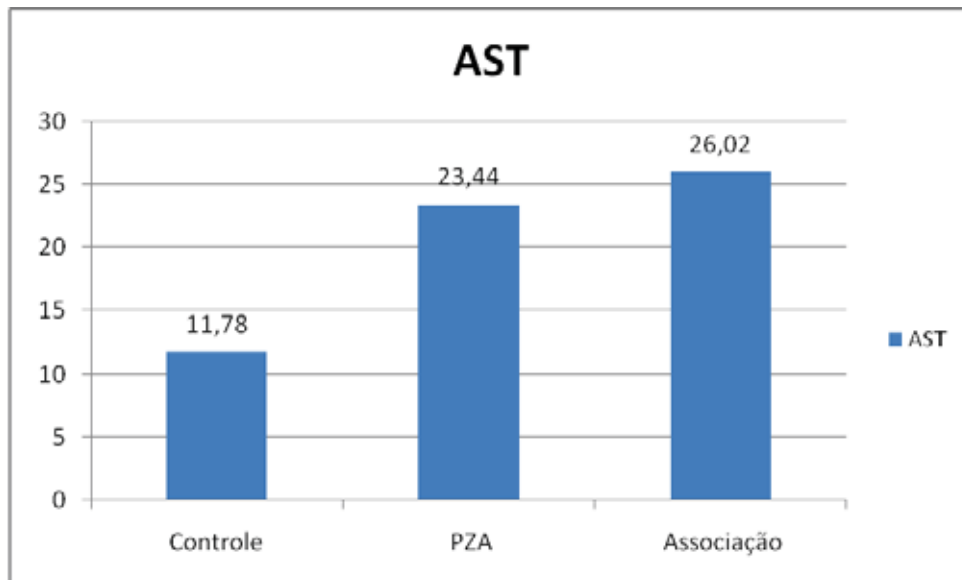


Figura 9 - Média da variação AST dos coelhos entre os grupos

4.3. Bilirrubina

Para a determinação da bilirrubina é necessário a determinação de um fator para converter absorbância em mg/dL. Para isso faz-se a medida do padrão de bilirrubina em triplicata (kit labtest). Na tabela a seguir estão demonstrados os valores obtidos para as replicatas dos padrões de bilirrubina.

Padrão	Absorbância
P1	0,300
P2	0,300
P3	0,320
Soma	0,92
Média	0,306

$$\text{Fator} = \frac{10}{0,306} = 32,60$$

Tabela 4 - Absorbância dos Padrões de Bilirrubina para cálculo do Fator de conversão de absorbância para mg/dL.

Após a obtenção dos valores de absorbância, procede-se a determinação do fator, através da equação acima descrita (10/Absorbância do padrão). Neste experimento obteve-se fator igual a 32,60. Este fator será referência para toda medida de bilirrubina posteriormente realizada.

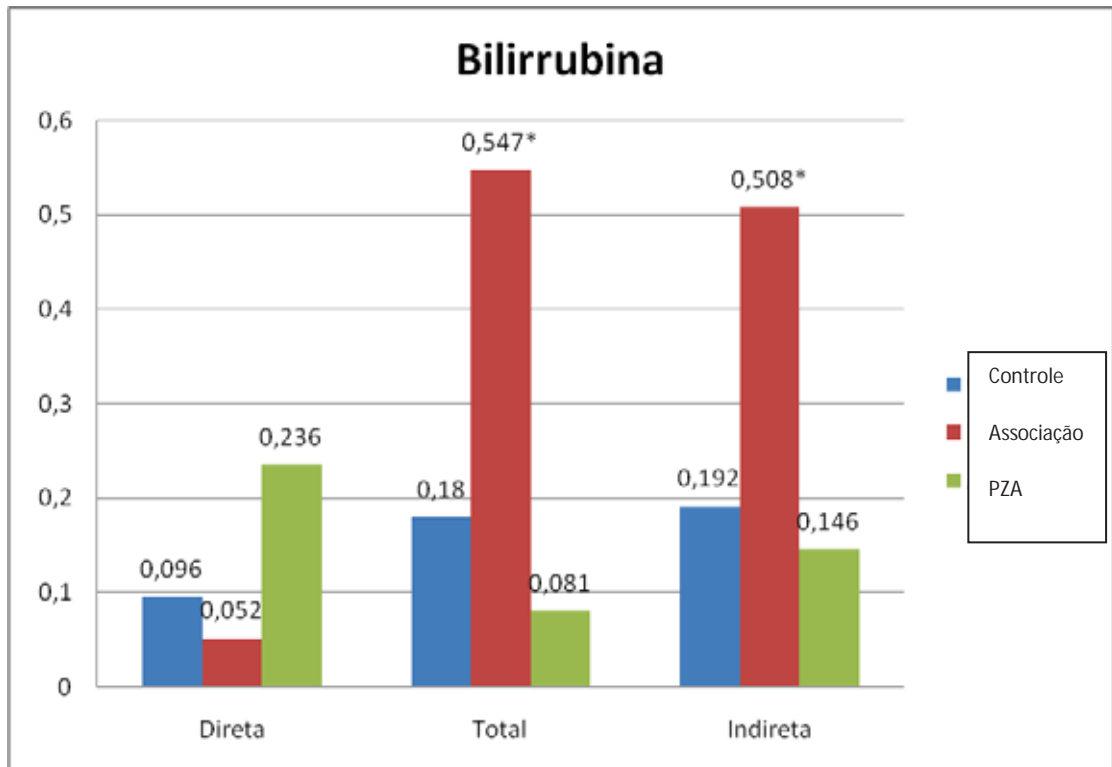


Figura 10 - Média das diferenças de valores para cada grupo sobre o parâmetro Bilirrubina.

4.4. Determinação da PZA em plasma

4.4.1. Curva de calibração da pirazinamida (PZA)

Foi obtido um pool de plasma de coelhos mantidos no biotério do Departamento de Princípios Ativos Naturais e Toxicologia da FCF/UNESP para a realização dos procedimentos de validação do método bioanalítico para a determinação de pirazinamida em plasma por HPLC. Uma alíquota de plasma foi enriquecida com solução concentrada de pirazinamida para 50µg/mL e a partir desta amostra realizou-se diluições seriadas para a obtenção das concentrações finais de 0,25; 0,5; 1,0; 2,5; 5,0; 10,0; 25,0 e 50,0µg/mL em plasma; em seguida procedeu-se a extração com solução TCA 10% para a precipitação de proteínas. A curva foi

construída com. A curva foi construída com 7 níveis de concentração em triplicata que apresentaram coeficiente de variação inferior a 15%, definido como critério de aceitação. O coeficiente de correlação foi superior a 0,99, adequado para a finalidade analítica proposta:

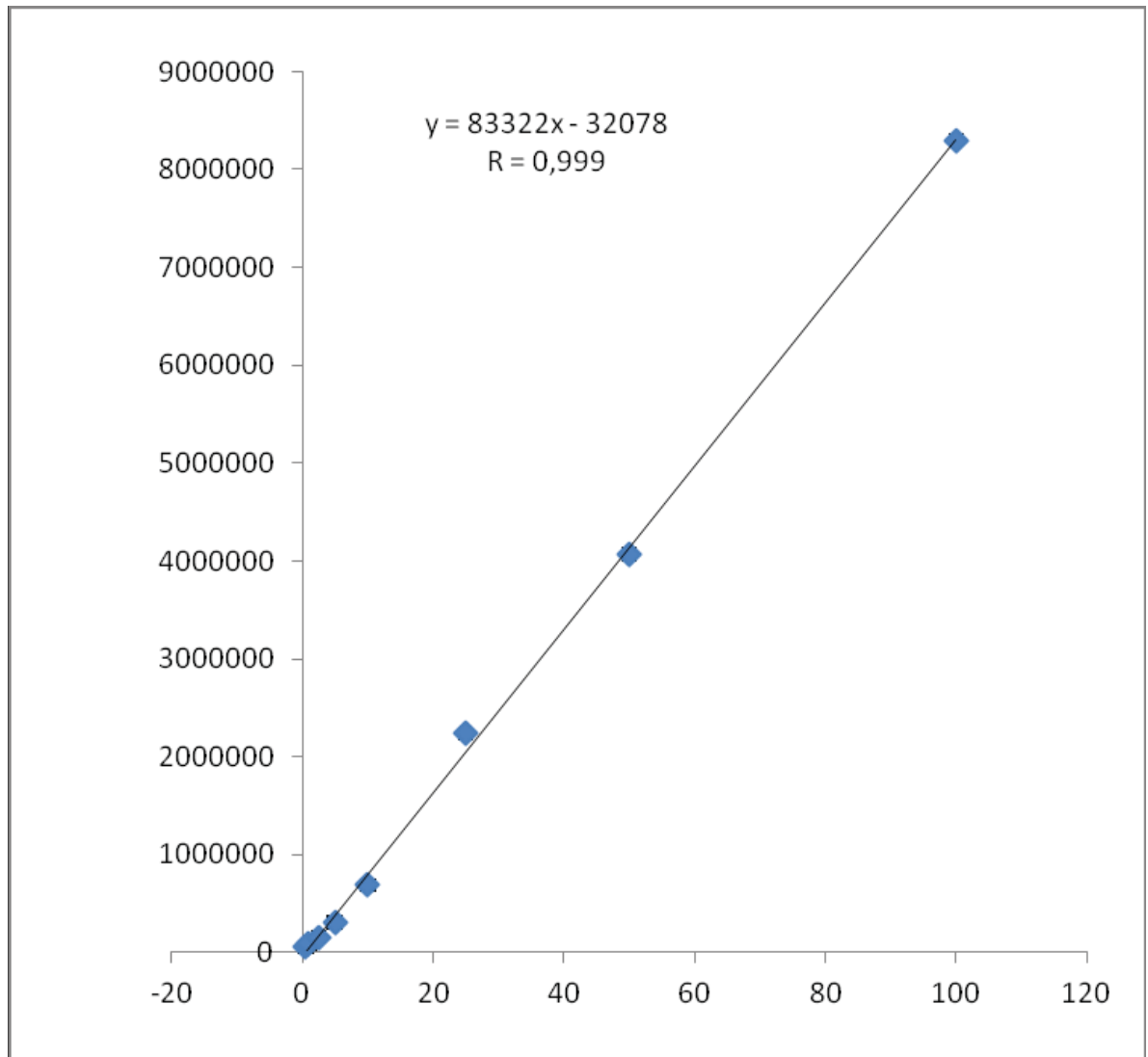


Figura 11 - Curva de calibração da pirazinamida.

A curva de calibração foi construída projetando-se no eixo das ordenadas a área (área média das triplicatas injetadas) do pico da PZA e no eixo das abscissas as concentrações de pirazinamida (µg/mL). Na tabela abaixo estão demonstradas as

áreas médias de três replicatas utilizadas para a construção da curva de calibração, o desvio padrão e coeficiente de variação.

conc (ug/mL)	média	DP	CV (%)
0,5	55448,2 0	8420,82	15,19
1	87018,6 7	9807,77	11,27
2,5	158368, 60	13278,0 5	8,38
5	309993, 67	13512,2 5	4,36
10	691500, 33	52377,6 9	7,57
25	2235422 ,80	189743, 94	8,49
50	4069074 ,33	153675, 48	3,78
100	8301068 ,60	887442, 39	10,69

Tabela 5 – Valores de área de pico versus concentração de pza utilizados para a construção da curva analítica em plasma de coelhos.

O limite inferior de quantificação foi de 0,5 ug/mL, com coeficiente de variação de aproximadamente 15,2 % (conforme demonstrado na tabela acima). O limite de detecção do método foi calculado em 0,25 ug/mL. Os resultados do estudo de precisão e exatidão intra e inter-ensaios - realizado em três dias consecutivos – estão demonstrados na tabela abaixo. Os coeficientes de variação foram inferiores a 15% nas três concentrações analisadas (2,5; 25 e 100 ug/mL) e assim, considerou-se adequada a precisão do método. Os valores de exatidão oscilaram entre 91,4 e 108,9% e considerada igualmente satisfatória para a aplicação do método no estudo em farmacocinética.

Precisão Intra-ensaio								
conc	A1	A2	A3	A4	A5	média	DP	CV
2,5	14181	14966	17583	15908	16543	15836	13278,	8,38
	7	9	8	7	2	8,6	05	
25	21350	22908	25424	20710	21376	22354	18974	8,49
	26	76	81	51	80	22,8	3,94	
100	75350	96002	85808	74114	83778	83010	88744	10,69
	24	17	33	37	32	68,6	2,39	

Tabela 6 – precisão intra-ensaio

Precisão Inter-ensaio													
conc	A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7	A8	A9	A10	média	DP	CV
2,5	141817	149669	175838	159087	165432	228791	190117	183513	202278	172935	176947	25805,	14,58
											,7	10	
25	213502	229087	254248	207105	213768	183424	192345	213367	205183	182345	209437	215281	10,28
	6	6	1	1	0	6	4	5	4	4	7,7	,98	
100	753502	960021	858083	741143	837783	698554	667022	730001	785463	792256	782383	856842	10,95
	4	7	3	7	2	7	5	2	2	7	2,6	,09	

Tabela 7 – precisão inter-ensaio

Exatidão Intra-ensaio									
conc	A1	A2	A3	A4	A5	méd ia	DP	CV	%
2,5	2,09	2,18	2,50	2,29	2,37	2,29	0,16	6,97	91,43
25	26,01	27,88	30,90	25,24	26,04	27,21	2,28	8,37	108,85
100	90,82	115,60	103,37	89,33	100,93	100,01	10,65	10,65	100,01

tabela 8 – exatidão intar-ensaio

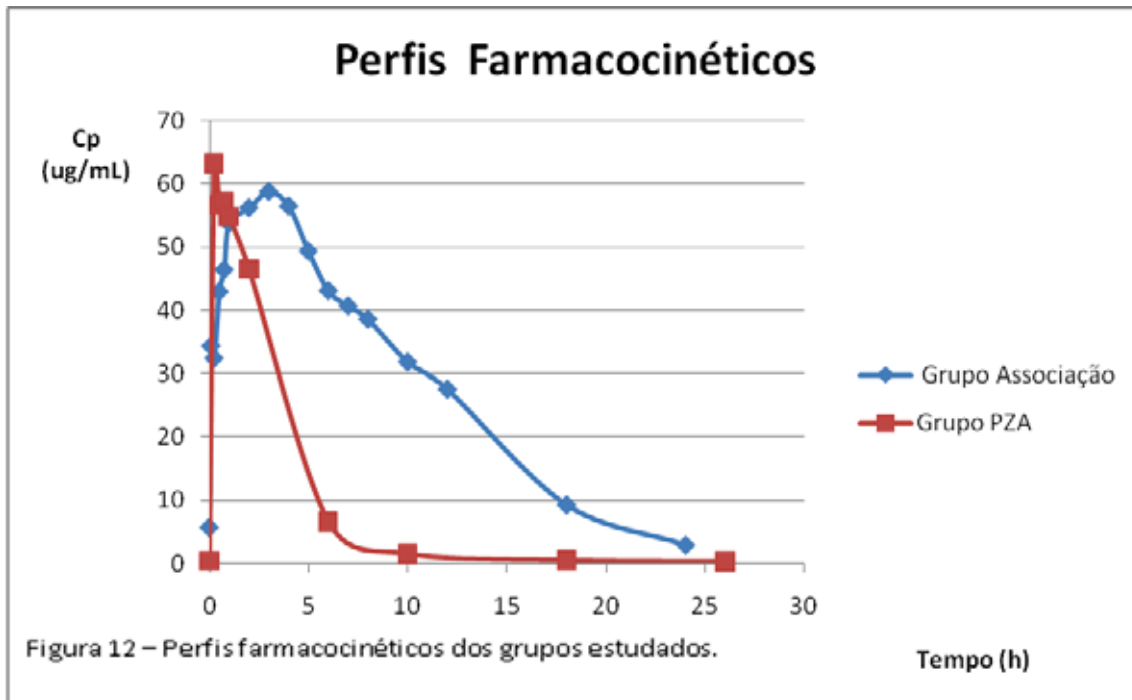
Exatidão Inter-ensaio														
conc	A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7	A8	A9	A10	méd ia	DP	CV	%
2,50	2,09	2,18	2,50	2,29	2,37	3,13	2,67	2,59	2,81	2,46	2,51	0,31	12,3 5	100, 35
25,0 0	26,0 1	27,8 8	30,9 0	25,2 4	26,0 4	22,4 0	23,4 7	25,9 9	25,0 1	22,2 7	25,5 2	2,58	10,1 2	102, 08
100, 00	90,8 2	115, 60	103, 37	89,3 3	100, 93	84,2 2	80,4 4	88,0 0	94,6 5	95,4 7	94,2 8	10,2 8	10,9 1	94,2 8

Tabela 9 – exatidão inter-ensaio

Foram, ainda, amostras de plasma branco adicionadas de rifampicina e isoniazida foram processadas e introduzidas no sistema cromatográfico com objetivo de verificar a possível interferência destes fármacos na quantificação da pirazinamida, uma vez que em um grupo de animais houve associação. Os cromatogramas obtidos não mostraram picos no tempo de retenção da pirazinamida.

Parametros	Grupo PZA	Grupo Associação
Kel (h-1)	0,125	0,146
t 1/2 (h)	6,293	4,984
ASC 0-t (ug/mL.h)	235,275	665,565*
ASC 0-inf(ug/mL.h)	238,798	688,508*
Cl /F (L/h.Kg)	0,238	0,084*
Vd/F (L/Kg)	2,116	0,601*
K alfa (h-1)	0,432	0,305*
t 1/2 alfa (h)	1,611	4,071*
Ka (h-1)	3,566	0,847*
t 1/2 absorção (h)	0,299	0,863*

Tabela 10 - Comparações encontradas entre os parâmetros farmacocinéticos entre os grupos animais.



5. Discussão

Coelhos são modelos animais cuja função hepática é frequentemente analisada através da avaliação destas enzimas. Este modelo animal é uma referência melhor do que ratos para a avaliação da toxicidade induzida por RMP e INH, pois seu metabolismo é mais semelhante aos humanos quando comparados a ratos, à indução do citocromo P450 causada por RMP (JIRO ET AL. 2008)

A pirazinamida é um análogo estrutural da nicotinamida e tem sido usada no esquema primário de tratamento contra TB, juntamente com INH e RMP nos últimos 50 anos. A adição desse fármaco no esquema de tratamento fez com que este fosse reduzido de nove para seis meses. A PZA tem grande influência no ataque de bacilos semidormientes, visto que esse fármaco tem alta atividade em meios ácidos

(pH= 5,5). Esses meios são característicos de focos inflamatórios de TB, em que geralmente se encontram esses bacilos (ZHANG ET AL. 2003)

A hepatotoxicidade é o principal efeito adverso da pirazinamida. Quando usada na dose de 40 a 50 mg/kg/dia, a elevação das aminotransferases e a hepatite sintomática ocorrem em 20% e 10% dos casos, respectivamente (Pereira ET AL. 2000)

Os três principais fármacos antituberculosos – a isoniazida, a rifampicina e a pirazinamida – são potencialmente hepatotóxicos. A isoniazida e a pirazinamida podem provocar lesão aguda de tipo hepatocelular e o uso concomitante de rifampicina aumenta a hepatotoxicidade da isoniazida (Nolan ET AL. 1999)

Os parâmetros bioquímicos avaliados neste estudo são ferramentas amplamente utilizadas para determinar a toxicidade de produtos em animais, experimentais procurando estabelecer relações entre a exposição e o efeito. Estas avaliações podem ser extrapoladas ao homem, desde que feitas às considerações adequadas interespecies.

As transaminases são enzimas produzidas principalmente no tecido hepático e que permanecem neste local em grande quantidade com a função de catalisar as reações de transferência de um grupo amino presente em um aminoácido para um alfa cetoácido com conseqüente produção de outro aminoácido e outro alfa cetoácido correspondente (BURTIS & ASHWOOD, 2005)

Estas enzimas são liberadas em grande quantidade na circulação sanguínea quando ocorre destruição do hepatócito e, desta forma, podem ser utilizadas como parâmetros indiretos para a determinação de danos hepáticos.

Níveis elevados de ALT e AST são encontrados em quadros de necrose hepática extensa, como ocorre nas hepatites agudas A ou B, nas exposições a toxinas ou em doses elevadas de acetaminofeno. A esteatose hepática também determina elevações moderadas das transaminases no sangue; o que é comum na exposição crônica ao etanol, nos quadros de diabetes e na obesidade. Alguns medicamentos podem elevar as transaminases, tais como o ibuprofeno, diclofenaco, fenilbutazona, fenitoína, ácido valpróico, carbamazepina, fenobarbital, sulfonamidas, nitrofurantoína, sinvastatina, amiodarona, quinidina, antidepressivos tricíclicos, entre outros.

A ALT também conhecida como TGP (transaminase pirúvica) é uma enzima que catalisa a transaminação da *L*-alanina para 2-oxoglutarato(2-cetogruarato) formando piruvato e *L*-glutamato; o piruvato pode ser usado para a gliconeogênese além de ter papel importante no transporte de nitrogênio entre as células. Esta transaminase é encontrada principalmente no fígado e nos rins, variando de espécie para espécie, claro que por ser importante para todo o metabolismo, encontra-se em menor quantidade em outros tecidos. No caso da investigação de hepatotoxicidade, há interesse na presença desta enzima no citoplasma dos hepatócitos embora ela também possa ser encontrada em menor concentração nas mitocôndrias destas células. Quando há danos ao hepatócito, inicialmente são liberadas as enzimas do citoplasma destas células e, com a persistência do dano ou em caso de hepatotoxicidade aguda, são liberadas também as enzimas presentes nas mitocôndrias, em menor velocidade (SHEN & MENG, 2008)

Em animais o uso da ALT como marcador de injúria hepática é controverso. Para alguns animais esta enzima não é tão confiável para este fim, por exemplo, em eqüinos e bovinos a quantidade de ALT por quilograma de fígado é bem menor

quando comparada à quantidade presente na musculatura e tecido ósseo. Em canídeos, felinos, leporídeos e outros animais domésticos o aumento da ALT plasmática é mais específica para danos hepáticos (BURTIS & ASHWOOD, 2005).

A AST, Aspartato Amino Transferase, também conhecida como TGO, catalisa a transaminação de L-aspartato para 2-oxoglutarato para formar oxalacetato e L-glutamato, com grande importância nos ciclos biológicos.

Esta enzima pode ser usada para a avaliação de várias funções no organismo e não apenas a hepática, devido a sua alta concentração em outros órgãos além do fígado; por isso ela é sempre acompanhada da avaliação da ALT em paralelo para a comparação. AST está presente em grandes quantidades no tecido muscular e cardíaco. Assim, quando ocorre morte celular nestes tecidos há grande aumento desta enzima no plasma sanguíneo.

Não se sabe ao certo a meia vida da ALT, porém ela fica em circulação tempo suficiente para que seja confiável como ferramenta para a determinação de danos ao fígado. Presume-se que a partir da ocorrência de uma injúria tecidual, os níveis de ALT permaneçam elevados no período de horas a dias. Em cães, a meia vida da ALT foi estimada entre 3 a 60 horas (BURTIS & ASHWOOD, 2005).

O equilíbrio entre AST e ALT é importante para a homeostasia do organismo, sendo que em condições fisiológicas, a AST plasmática é maior que a ALT. No caso de algum tipo de injúria do tecido hepático estas enzimas contidas no citoplasma dos hepatócitos são liberadas para a corrente sanguínea e desta forma pode-se avaliar a extensão dos danos de acordo com estas enzimas. No caso de injúria do tecido as condições fisiológicas são invertidas, a ALT, que é mais específica para o fígado,

atinge níveis acima da AST, que é um sinal claro do dano tissular, podendo resultar num diagnóstico de problemas hepáticos (BURTIS & ASHWOOD, 2005).

Embora um resultado clássico de hepatotoxicidade seja o aumento destas enzimas com os níveis de ALT ultrapassando os de AST, algumas interpretações clínicas podem ser feitas de formas diferentes. No caso de aumento dessas enzimas sem que ocorra a inversão dos níveis das mesmas, pode ocorrer no caso de cirrose, hepatite alcoólica e neoplasias. Porém a maior parte das causas de hepatites configura o quadro clássico de disposição destes marcadores. Mesmo assim, interpretações podem diferir de acordo com a extensão do aumento das transaminases observado.

No caso de necrose hepática, pode-se observar um aumento de até 100 vezes destas enzimas acima do valor de referência, outras patologias geralmente resultam num valor 10 a 40 vezes maior. No caso de hepatotoxicidade causada por Isoniazida e Rifampicina em coelhos, segundo Kalra¹⁵, em uma semana de exposição a estes fármacos, observou-se aumento de 3 a 4 vezes os valores de referência para coelhos. O que é esperado, pois há apenas um aumento modesto destas enzimas no caso de hepatotoxicidade causado por antibióticos (BURTIS & ASHWOOD, 2005).

Neste experimento, a exposição de coelhos albinos a uma dose de pirazinamida de 56 mg/kg por 07 dias não resultou em elevações dos níveis séricos das transaminases quando comparados aos níveis do grupo controle pré ou pós-exposição. Porém, houve um aumento significativo da transaminase ALT no grupo associação o que caracteriza um quadro de hepatite tóxica e sugere que houve dano hepático nos animais.

Vale ressaltar que o parâmetro ALT é mais específico a danos hepáticos em relação à AST. A ALT é específica do fígado e sua principal aplicação clínica é para a doença hepática parenquimatosa, enquanto que a AST também é encontrada no músculo esquelético, coração, rins e hemácias e suas principais aplicações clínicas se dão no infarto do miocárdio, doença hepática parenquimatosa e doença muscular (BURTIS & ASHWOOD, 1998).

Hepatotoxicidade associada à PZA tende a ocorrer durante o segundo mês de tratamento, enquanto que a hepatotoxicidade associada à INH ocorre predominantemente no primeiro mês de terapia (KUNIMOTO ET AL. 2003). Fato que indica que a possível causa deste aumento da transaminase ALT seja pela introdução da INH.

A bilirrubina é um pigmento da bile muito importante para diversos aspectos do metabolismo. Ela conjuga-se com fármacos que participam do ciclo êntero-hepático e tem grande função na formação das fezes e absorção de nutrientes. Pode ser encontrada na circulação de duas formas, da forma direta, sem estar conjugada ou da forma indireta que é quando está conjugada com alguma proteína ou molécula, normalmente a albumina. A avaliação de seus níveis plasmáticos é interessante para verificar danos ao fígado geralmente ligados à obstrução do ducto biliar (PEREIRA & TRESOLDI, 2000).

A bilirrubina é detectada geralmente pelo método de Van der Bergh ou reação Diazo e neste protocolo pode diferenciar-se a Bilirrubina direta da bilirrubina total. Isso ocorre, pois a bilirrubina não conjugada ou bilirrubina direta é solúvel em água e conjuga-se prontamente ao reagente Diazo composto por ácido sulfanílico diazotado, este conjugado é caracterizado pela formação da azobilirrubina vermelha, com a formação desta pode-se realizar a leitura em espectrofotômetro a 525nm.

Para a detecção da bilirrubina total é necessário um reagente chamado acelerador. A bilirrubina conjugada ou indireta não é tão solúvel em água e liga-se bem mais lentamente ao reagente diazo. Desta forma é necessário acrescentar um solvente orgânico para que a reação ocorra, por isso o acelerador, que pode ser etanol ou metanol (BURTIS & ASHWOOD, 2005).

No kit Labtest utilizado, o acelerador é composto por cafeína 130mmol/L, benzoato de sódio 260mmol/L, acetato de sódio 460mmol/L e surfactante. Esta determinação inclui tanto a bilirrubina direta quanto a conjugada, desta forma para determinar a bilirrubina conjugada isolada deve-se subtrair do resultado o valor encontrado na bilirrubina direta.

No experimento realizado não houve diferença estatística significativa entre os valores séricos de bilirrubina direta ou indireta do grupo controle e grupo pirazinamida, pré ou pós-exposição. Porém houve aumento significativo nos valores de bilirrubina total e indireta no grupo associação, sugerindo dano hepático.

Em condições fisiológicas a bilirrubina indireta é maior que a direta. Porém estas condições podem inverter-se nos casos agudos de hepatite onde há o aumento da bilirrubina direta, com exceção de 15% dos casos onde apenas a bilirrubina indireta continua sendo superior (BURTIS & ASHWOOD, 2005). Há aumento da bilirrubina indireta no caso de colestase intra-hepática, extra-hepática ou obstrução do ducto biliar (PEREIRA & TRESOLDI, 2000).

Durante a execução dos protocolos do grupo associação observou-se uma queda na ingestão de alimento, com consequente perda considerável de peso que provavelmente se relacionou ao efeito anorexígeno da INH. As doses administradas foram ajustadas de acordo com o peso do animal no exato momento da administração.

A proposta deste estudo foi associar os três fármacos e estudar se esta associação causaria alterações sobre farmacocinética da PZA e com conseqüentes modificações no perfil toxicológico do produto em coelhos. O método bioanalítico estabelecido para a execução deste projeto foi desenvolvido a partir da publicação de SMITH ET AL., 1999, com as adaptações necessárias para a otimização da resposta analítica. O método desenvolvido foi validado obedecendo-se os critérios estabelecidos pela RE-899 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (2003).

O perfil farmacocinéticos da PZA, como mostra a figura 12, apresenta alterações quando associada à INH e RMP, demonstrando a interferência desses fármacos em seus parâmetros. As concentrações plasmáticas da PZA foi significativamente maior quando houve a associação de fármacos. Na tabela 5 estão relacionados os parâmetros farmacocinéticos da PZA nos dois grupos estudados e constataram-se diferenças estatísticas entre vários parâmetros farmacocinéticos.

A constante de absorção K_a foi diminuída quase quatro vezes no grupo associação, o que levou a um aumento no tempo de absorção da PZA que passou de $0,3 \text{ h}^{-1}$ para mais de $0,8 \text{ h}^{-1}$ e conseqüentemente a uma alteração no T_{max} de 0,7 horas para 2 horas no grupo associação, porém não observamos variações estatisticamente significantes nos valores de C_{max} obtidos.

Tanto a AUC_{0-t} como a AUC_{0-inf} foram aumentadas quase 3 vezes seus valores no grupo associação que passou de 239 para 688 $\mu\text{g/mL.h}$ (em AUC_{0-inf}). Isto se deve pela diminuição do Clearance da PZA que conseqüentemente aumenta a concentração sérica deste fármaco.

O volume de distribuição da PZA também foi diminuído no grupo associação, o que nos mostra uma competição pelos sítios de ligação às proteínas plasmáticas provocada pela RMP e INH. Porém não podemos associar a competição pelos sítios

como um dos fatores de aumento da AUC na associação, pois a ligação protéica da PZA é da ordem de 10 a 15%, ou seja, pequena porcentagem de ligação e, caso ocorra competição as conseqüências seriam pouco significativas sobre os parâmetros farmacocinéticos. (HARDMAN & LIMBIRD, 2004).

A Constante de eliminação (k_{el}) e a meia vida de eliminação ($t_{1/2}$) da PZA não apresentaram consideráveis variações estatísticas em seus valores. A meia vida de eliminação é um parâmetro híbrido do Vd e Cl ($t_{1/2} = Vd/Cl * 0,693$), como não variou significativamente entre os grupos podemos concluir e observar que houve variação linear do Vd e Cl, que diminuíram como relatado anteriormente, mantendo assim sua meia vida de eliminação.

Ao observarmos a evolução temporal das concentrações da PZA após sua administração podemos verificar que a distribuição deste fármaco nos diferentes tecidos e fluidos do organismo ocorre em velocidades diferentes, caracterizando um modelo farmacocinético bicompartimental. Assim, o fármaco distribui-se inicialmente de forma muito rápida em um conjunto de tecidos e órgãos que formam um hipotético compartimento central, e o faz mais lentamente em outros tecidos que formam o compartimento periférico.

Com a diminuição da constante de eliminação K_{α} no grupo associação tivemos como conseqüência o aumento da meia vida de distribuição ($t_{1/2\alpha}$) do fármaco pirazinamida quando associado aos demais, podendo ser observado no gráfico dos perfis farmacocinéticos em maiores concentrações plasmáticas de PZA por intervalo de tempo.

6. Conclusão

Com isso podemos concluir que a associação de INH e RMP juntamente a PZA resulta em interações farmacocinéticas com conseqüentes modificações nos

níveis plasmáticos de pirazinamida, sendo responsável pela diminuição da constante de absorção e distribuição, Cl e Vd, e pelo aumento da AUC, Tmax, t1/2 de absorção e distribuição.

O aumento estatisticamente significativo da transaminase ALT na interação medicamentosa, juntamente com a bilirrubina total e indireta, indica um maior comprometimento hepático e pode estar associado ao aumento dos níveis séricos da PZA na associação.

7. Referências Bibliográficas

1. ACOCCELA, G. Clinical pharmacokinetics of rifampicin. *Clin Pharmacokinet.* V.3, p.108-127, 1978.
2. BARON ON, BELL JL. Serum enzymes changes in patients receiving antituberculosis therapy with rifampicin or PAS plus INH and SM. *Tubercle* 1974;55:115-120.
3. BURTIS C, ASHWOOD E. *Tietz Fundamentals of Clinical Chemistry.* V. 5, P. 1091, 2005.
4. SHEN C, MENG Q, ZHANG G AND W HU. Rifampicin exacerbates isoniazid induced toxicity in human but not in rat hepatocytes in tissue like cultures. *British Journal of Pharmacology.* V.153, P.784–791, 2008.
5. *CONSENSO SOBRE TUBERCULOSE MANUAL DE NORMAS PARA O CONTROLE DA TUBERCULOSE (ED. 1995, Ministério da saúde).*
6. DE SOUZA MVN E VASCONCELOS TRA. Fármacos No Combate À Tuberculose: Passado, Presente E Futuro *Quim. Nova,* V. 28, N. 4, P. 678 682, 2005.

7. DOUGLAS JG, MCLEOD MJ. Pharmacokinetic factors in the modern drug treatment of tuberculosis. *Clin Pharmacokinet.* v. 37, n. 2, p. 127-146, 1999.28. ELLENHORN MJ, BARCELOUX DG. *Medical toxicology. New York: Elsevier p. 367-372. 1988.*
8. DUCATI RG, Ruffino-Netto A, Basso LA, Santos DS. The resumption of consumption - a review on tuberculosis. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2006 Nov;101(7):697-714.
9. ELLENHORN MJ, BARCELOUX DG. *Medical toxicology. New York: Elsevier p. 367-372. 1988.*
10. FRANCES HARCOURT-BROWN *Textbook of Rabbit Medicine v.6.p.82.*
11. GROSSET, J.; TRUFFOT-PERNOT, C.; LACROIX, C.; JI, B. Antagonism between isoniazid and the combination pyrazinamide-rifampin against tuberculosis infection in mice. *Antimicrob Agents Chemother.* v. 36, n. 3, p. 548-551, 1992.
12. HARDMAN, J. G.; LIMBIRD, L. E. GOODMAN & GILMAN: *as bases farmacológicas da terapêutica. 10. ed. Rio de Janeiro: Mc Graw Hill, 2004. p. 955-961.*
13. HELEN M. BALDAN, HELENE J. DE ROSA, IGUATEMY L. BRUNETTI, VALDECIR F. XIMENES, ROSÂNGELA G. P. MACHADO. The Effect of Rifampicin and Pyrazinamide on Isoniazid Pharmacokinetics in Rats. *Biopharm. Drug Dispos.* 28: 409–413 (2007)
14. JIRO JERRY KANEKO, JOHN W. HARVEY, AND MICHAEL L. BRUSS *Clinical Biochemistry of Domestic Animals, V.6.P.388-400, 2008.*

15.KALRA BS, AGGARWAL S, KHURANA N, GUPTA U. Effect of cimetidine on hepatotoxicity induced by isoniazid-rifampicin combination in rabbits. *Chem Biol Interact.* V.26, N.1, P.18-21, 2007.

16.KASHUBA ADM, BERTINO JS, KEARNS GL, LEEDER S, JAMES, A.; GOTSCHALL, R, NAFZIGGER, A. Quantitation of three-month intraindividual variability and influence of sex and menstrual cycle phase on CYP1A2, N acetyltansferase-2, and xanthine oxidase activity determined with caffeine phenotyping. *Clin Pharmacol Ther.* V. 63, N. 5, P. 540-551, 1998.

17.MANUAL TÉCNICO PARA CONTROLE DA TUBERCULOSE, 2002 Brasília.

18.MINISTÉRIO DA SAÚDE. *Manual de Normas para o Controle da Tuberculose.* J Pneumol. v. 23, n. 6, p. 281-310, 1997.

19.NOLAN CM, GOLDBERG SV, BUSKIN SE. Hepatotoxicity associated with isoniazid preventive therapy: a 7-year survey from a public health tuberculosis clinic. *JAMA* 1999; 281: 1014–18.

20.PEREIRA RM, TRESOLDI AT, HESSEL G. Isoniazid-induced hepatic failure. Report of a case. *Arq Gastroenterol.* 2000 Jan-Mar; 37(1):72-5.

21.SARICH TC, ADAMS SP, PETRICCA G, WRIGHT JM. Inhibition of isoniazid-induced hepatotoxicity in rabbits by pretreatment with an amidase inhibitor. *J Pharmacol Exp Ther.* V.28 N.2, P.695-702. 1999.

22.SARICH, T. C.; ZHOU, T.; ADAMS, S. P.; BAIN, A. I.; WALL, R. A.; WRIGHT, J. M. A model of isoniazida-induced hepatotoxicity in rabbits. *J Pharmacol Toxicol Methods.* V. 34, p. 109-116, 1995.

23.SHEN C., MENG Q, ZHANG G. HU W. Rifampicin exacerbates isoniazid-induced toxicity in human but not in rat hepatocytes in tissue like cultures. *British Journal of Pharmacology* V.153.P.784–791, 2008.

24.SMITH PJ, van Dyk J, Fredericks A. Determination of rifampicin, isoniazid and pyrazinamide by high performance liquid chromatography after their simultaneous extraction from plasma. *Int J Tuberc Lung Dis.* 1999 Nov;3(11 Suppl 3):S325-8; discussion S351-2.

25.TASDUQ SA, KAISAR P, GUPTA DK, KAPPAHI BK, MAHESHWARI HS, JYOTSNA S, JOHRI RK. Protective effect of a 50% hydroalcoholic fruit extract of *Emblca officinalis* against anti-tuberculosis drugs induced liver toxicity. *Phytother Res.* V.19, N.3, P.193-197, 2005.

26.TOSTMANN A, BOEREE MJ, AARNOUTSE RE, DE LANGE WC, VAN DER VEN AJ, DEKHUIJZEN R. Antituberculosis drug-induced hepatotoxicity: concise up-to-date review. *J Gastroenterol Hepatol.* 2008 V.23, N.2, P.192-202, 2007.

27.Y. ZHANG, D. MITCHISON The curious characteristics of pyrazinamide *The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease* 7(1):6–21 2003.

28.ZHOU S, YUNG CHAN S, CHER GOH B, CHAN E, DUAN W, HUANG M, MCLEOD HL. Clin Mechanism-based inhibition of cytochrome P450 3A4 by therapeutic drugs. *Pharmacokinet.* V.44 N.3, P.279-304, 2005.

8. Apêndice

8.1. Fluxograma 1

