

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PAMPA  
CAMPUS URUGUAIANA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

**BARBRA KATYÚSCYA SANCHES MORAES**

**AVALIAÇÃO PRÉ-CLÍNICA EM ROEDORES DO PERFIL FARMACOCINÉTICO  
DE NOVO CANDIDATO A LEISHMANICIDA LASSBIO-1736**

**Uruguiana  
2015**

**BARBRA KATYÚSCYA SANCHES MORAES**

**AVALIAÇÃO PRÉ-CLÍNICA EM ROEDORES DO PERFIL FARMACOCINÉTICO  
DE NOVO CANDIDATO A LEISHMANICIDA LASSBIO-1736**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-graduação *Stricto sensu* em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Pampa, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Sandra Elisa Haas

**Uruguiana**

2015

**BARBRA KATYÚSCYA SANCHES MORAES**

**AVALIAÇÃO PRÉ-CLÍNICA EM ROEDORES DO PERFIL FARMACOCINÉTICO  
DO NOVO CANDIDATO A LEISHMANICIDA LASSBIO-1736**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação Stricto Sensu em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Pampa, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Área de concentração: Farmácia

Dissertação defendida e aprovada em: 29/05/2015  
Banca examinadora:

---

Prof<sup>a</sup>. Dra. Sandra Elisa Haas  
Orientadora  
Unipampa

---

Prof. Dr. Clésio Soldateli Paim  
Unipampa

---

Prof. Dr. Rodrigo José Freddo  
Unipampa

Ficha catalográfica elaborada automaticamente com os dados fornecidos pela autora através do Módulo de Biblioteca do Sistema GURI (Gestão Unificada de Recursos Institucionais).

M827a	<p>Moraes, Barbra Katyúscya Sanches AVALIAÇÃO PRÉ-CLÍNICA EM ROEDORES DO PERFIL FARMACOCINÉTICO DE NOVO CANDIDATO A LEISHMANICIDA LASSBIO- 1736 / Barbra Katyúscya Sanches Moraes. 107 p.</p> <p>Dissertação (Mestrado)-- Universidade Federal do Pampa, MESTRADO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS, 2015. "Orientação: Sandra Elisa Haas".</p> <p>1. Farmacocinética. 2. Validação de método Analítico. 3. Candidato a Fármaco. 4. Leishmaniose.</p>
-------	---

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Farmacologia (UNIPAMPA), Laboratório de Nanobiotecnologia (UNIPAMPA) e no Centro Bioanalítico de Medicamentos (Faculdade de Farmácia da UFRGS), com financiamento do Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Fármacos e Medicamentos (INCT-Inofar).

Dedico esta dissertação aos meus pais, irmãs, avós, namorado e amigos, maiores incentivadores e fontes inesgotáveis de apoio, amor e compreensão.

## **AGRADECIMENTO**

A prof<sup>a</sup>. Dra Sandra Elisa Haas pela orientação e pelo apoio para que eu realizasse o curso de mestrado.

Aos professores, minha gratidão pela forma de conduzir o curso em todas as etapas.

A todos os colegas de curso pelo convívio e pelos momentos de amizade.

Aos colegas de laboratório pela amizade, convívio e auxílio.

A todas as pessoas que, direta ou indiretamente contribuíram para a realização desta pesquisa.

“Nas grandes batalhas da vida, o primeiro passo para a vitória é o desejo de vencer!”

Mahatma Gandhi



## RESUMO

Neste estudo, um método de CLAE-DAD foi desenvolvido e validado para a determinação de LASSBio-1736 em plasma de rato usando diclofenaco de sódio como padrão interno (PI). Extração líquido-líquido com acetonitrila foi utilizado para extrair LASSBio-1736. A separação cromatográfica foi realizada com coluna Waters Spherisorb®S5 ODS2 C<sub>18</sub> (150 mm x 4,6 mm, 5µm), fase móvel isocrática composta por Trietilamina 0,3% (pH 4), metanol e acetonitrila (45:15:40, v/v/v) com vazão de 1 mL/min. Ambos LASSBio-1736 e PI foram eluídos em 4,2 e 5 min, respectivamente. O limite inferior de quantificação foi de 0,2 µg/mL e linearidade entre 0,2 - 4 µg/mL, com um  $r^2 > 0,99$ . A exatidão do método foi  $> 90,5\%$ . Os desvios padrão relativos intra e inter-dias foram  $< 6,19$  e  $< 7,83\%$ , respectivamente. O método mostrou sensibilidade, linearidade, precisão, exatidão e seletividade necessária para quantificar LASSBio-1736 em estudos farmacocinéticos pré-clínicos. O presente trabalho também investigou a farmacocinética plasmática e a distribuição do LASSBio-1736 em ratos Wistar. A farmacocinética de LASSBio-1736 foi investigada após a administração de dose intravenosa (3,2 mg/kg), por via oral e intraperitoneal (12,6 mg/kg).. A distribuição nos tecidos foi avaliada após administração de dose i.v. *bolus*. Os resultados para a via intravenosa indicam longo tempo meia-vida ( $24,3 \pm 8,2$  h), depuração de  $49,3 \pm 9,8$  mL/Kg\*h e volume de distribuição de  $1,16 \pm 0,3$  L/kg. Para a via oral o tempo meia-vida foi de  $28,6 \pm 4,6$  h, depuração de  $49,7 \pm 13$  mL/Kg\*h e volume de distribuição de  $1,47 \pm 0,34$  L/kg foram semelhantes e biodisponibilidade de 12%. Para a via intraperitoneal o tempo meia-vida foi de  $26 \pm 8,9$  h, depuração de  $58 \pm 19,6$  mL/Kg\*h e volume de distribuição de  $1,8 \pm 0,8$  L/kg e biodisponibilidade de 38%. O LASSBio-1736 demonstrou penetração tecidual adequada no fígado, baço e pele. Com base nas características farmacocinéticas de outros fármacos leishmanicidas e a proposição de decisão para estudos farmacocinéticos visando a descoberta de candidatos a fármacos e a continuidade dos estudos, o LASSBio-1736 possui características farmacocinéticas apropriadas para um medicamento leishmanicida e novos estudos devem ser realizados para o escalonamento interespecies, além de estudos farmacológicos e toxicológicos complementares.

## ABSTRACT

In this study, a method was developed and validated for HPLC-PDA determination LASSBio-1736 in rat plasma using diclofenac sodium as internal standard (IS). Liquid-liquid extraction was used to extract acetonitrile LASSBio-1736. The chromatographic separation was performed with Waters Spherisorb<sup>®</sup>S5 ODS2 C18 column (150 mm x 4.6 mm, 5 $\mu$ m), isocratic mobile phase consisting of Triethylamine 0.3% (pH 4), methanol and acetonitrile (45:15:40, v / v / v) with a flow rate of 1 mL/min. Both LASSBio-1736 and IS were eluted at 4.2 and 5 min, respectively. The lower limit of quantification was 0.2  $\mu$ g/mL and linearity between 0.2 - 4  $\mu$ g/mL, with  $r^2 > 0.99$ . The accuracy was  $> 90.5\%$ . The relative standard deviation within and between days were  $< 6.19$  and  $< 7.83\%$ , respectively. The method showed sensitivity, linearity, precision, accuracy and selectivity needed to quantify LASSBio-1736 in preclinical pharmacokinetic studies. This study also investigated the plasma pharmacokinetics and distribution of LASSBio-1736 in Wistar rats. The pharmacokinetic LASSBio-1736 was investigated after intravenous dose administration (3.2 mg/kg) intraperitoneally and orally (12.6 mg/kg). The tissue distribution was evaluated after iv *bolus* dose administration. The results indicated an intravenous long half-life ( $24.3 \pm 8.2$  h) clearance  $49.3 \pm 9.8$  mL/kg\*h and the volume of distribution  $1.16 \pm 0.3$  L/ kg. The oral route the half-life was  $28.6 \pm 4.6$  h, clearance  $49.7 \pm 13$  mL/kg\*h and volume of distribution  $1.47 \pm 0.34$  L/kg and bioavailability of 12%. The intraperitoneally half-life was  $26 \pm 8.9$  h, clearance  $58 \pm 19.6$  mL/kg\*h and the volume of distribution  $1.8 \pm 0.8$  L/kg and bioavailability of 38% were similar. The LASSBio-1736 showed adequate tissue penetration for liver, spleen and skin. Based on the pharmacokinetic characteristics of other antileishmanial drugs and the decision proposition for pharmacokinetic studies for the discovery of drug candidates and continuing studies, the LASSBio-1736 has pharmacokinetic characteristics appropriate for a leishmanicide and new drug studies should be conducted to the interspecies scaling, and additional pharmacological and toxicological studies.

## LISTA DE FIGURAS

### REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

FIGURA 1- CICLO DA LEISHMANIOSE .....	20
FIGURA 2- MOSQUITO TRANSMISSOR DA LEISHMANIOSE ( <i>FLEBOTOMÍNEO</i> ).....	21
FIGURA 3- CÃO INFECTADO COM LEISHMANIOSE .....	21
FIGURA 4- MAPA DOS PAÍSES MAIS AFETADOS POR LEISHMANIOSE.....	23
FIGURA 5- DISTRIBUIÇÃO ESPACIAL DAS TAXAS MÉDIAS ANUAIS DE MORTALIDADE (POR 100.000 HABITANTES) RELACIONADAS COM VL PELOS MUNICÍPIOS BRASILEIROS.....	23
FIGURA 6- DETALHE DOS MUNICÍPIOS DO RIO GRANDE DO SUL AMOSTRADOS PARA A DETECÇÃO DE <i>L. LONGIPALPIS</i> E DETERMINAÇÃO DAS ÁREAS DE RISCO, 2008 A 2011.....	24

**CAPÍTULO I** - Desenvolvimento e validação de método bioanalítico por HPLC-UV para a quantificação de um novo candidato leishmanicida (E) -1-4 (trifluorometil) benzilideno -5- (2-4-diclorobenzoil) carbonil hidrazina (LASSBio-1736) em plasma de rato.

Figura 1- Cromatogramas de (A) amostra em branco, (B) LIQ (0,2 µg/mL) e (c) amostra de plasma de rato (0,99 µg/mL) 24 horas depois da administração iv de LASSBio-1736 (3,2 mg/kg).....

FIGURA 2- CURVA DE CALIBRAÇÃO PADRÃO DE LASSBio-1736 NO INTERVALO DE 0,2 À 4 µG/ML .....

FIGURA 3- PERFIL PLASMÁTICO DE CONCENTRAÇÃO MÉDIA VERSUS TEMPO DE LASSBio-1736 APÓS UMA ÚNICA DOSE INTRAVENOSA DE 3,2 MG/KG EM RATOS WISTAR MACHOS. OS PONTOS REPRESENTAM AS MÉDIAS ± DESVIO PADRÃO DE TRÊS ANIMAIS.....

**CAPÍTULO II** – Avaliação do perfil farmacocinético plasmático e tecidual do LASSBio-1736.

FIGURA 2 - PERFIS DE CONCENTRAÇÃO PLASMÁTICA-TEMPO MÉDIO APÓS A ADMINISTRAÇÃO DE LASSBio-1736: (A) 3,2 MG / KG POR VIA INTRAVENOSA (N=6), (B) 12,6 MG / KG POR VIA ORAL (N=8) E (C) DE 12,6 MG / KG VIA INTRAPERITONEAL (N=8) (MÉDIA ± DP). .....

FIGURA 3- PERFIS DE DISTRIBUIÇÃO TECIDUAL DE LASSBio-1736 APÓS A ADMINISTRAÇÃO INTRAVENOSA DE 3,2 MG/KG EM RATOS MACHOS. ....

## LISTA DE TABELAS

**CAPÍTULO I** - Desenvolvimento e validação de método bioanalítico por HPLC-UV para a quantificação de um novo candidato leishmanicida (E) -1-4 (trifluorometil) benzilideno -5- (2-4-diclorobenzoil) carbonil hidrazina (LASSBio-1736) em plasma de rato.

TABELA 1- PARÂMETROS DA CURVA DE CALIBRAÇÃO E ESTATÍSTICAS PARA LASSBIO-1736 EM PLASMA DE RATOS. ....	42
TABELA 2- VARIAÇÃO INTRA E INTER-DIA DE LASSBIO-1736 EM PLASMA DE RATOS .....	42
TABELA 3- RECUPERAÇÃO E EFEITOS DE MATRIZ RELATIVOS DE LASSBIO-1736 E PI EM PLASMA DE RATOS	43
TABELA 4- RESULTADOS DA ESTABILIDADE DE LASSBIO-1736 EM PLASMA DE RATOS. ....	43

**CAPÍTULO II** – Avaliação do perfil farmacocinético plasmático e tecidual do LASSBio-1736.

TABELA 1- PARÂMETROS FARMACOCINÉTICOS APÓS ADMINISTRAÇÃO INTRAVENOSA DE LASSBIO-1736 EM RATOS WISTAR. ....	53
TABELA 2- PARÂMETROS FARMACOCINÉTICOS DETERMINADOS APÓS A ADMINISTRAÇÃO ORAL DE LASSBIO-1736 EM RATOS WISTAR.....	53
TABELA 3- PARÂMETROS FARMACOCINÉTICOS DETERMINADO APÓS ADMINISTRAÇÃO INTRAPERITONEAL DE LASSBIO-1736 EM RATOS WISTAR .....	54
TABELA 4- PARÂMETROS FARMACOCINÉTICOS TECIDUAIS DE LASSBIO-1736 APÓS A ADMINISTRAÇÃO DA DOSE DE 3,2 MG/KG IV.....	55

## LISTA DE ABREVIATURAS

AMB	Anfotericina B
ANOVA	Análise de variância
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
$ASC_0^\infty$	Área sobre a curva de 0 a infinito
$ASC_{\text{extap}}$	Área sobre a curva extrapolada
$Cl_{\text{tot}}$	Clearence Total
$C_{\text{max}}$	Concentração plasmática máxima
DN	Doenças negligenciadas
EMEA	European Agency and Medicines
$F_{\text{abs}}$	Biodisponibilidade Fração absorvida
FDA	US Food and Drug Administration
CLAE-DAD	Cromatografia líquida de alta eficiência com detecção no Ultravioleta
$k_a$	Constante velocidade de absorção
$k_e$	Constante de velocidade de eliminação
LASSBio-1736	(E)-1-4(trifluorometil) benzilideno -5-(2-4-diclorizoil) carbonil hidrazina
LC	Leishmaniose cutânea
LM	Leishmaniose mucosa
LV	Leishmaniose visceral
MRT	Tempo de residência médio
i.p.	Via Intraperitoneal
i.v.	Via Intravenosa
P-gP	Glicoproteína P
PI	Padrão interno
p.o.	Via oral
$T_{\text{max}}$	Tempo para atingir a concentração máxima
$t_{1/2}$	Tempo de meia-vida de eliminação
$V_{\text{dss}}$	Volume de distribuição no <i>steady-state</i>
$r^2$	Coefficiente de determinação
OMS	Organização Mundial da Saúde

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	16
2 OBJETIVOS.....	18
2.1 Objetivos Específicos.....	18
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	19
3.1 Doenças Negligenciadas.....	19
3.2 Leishmaniose.....	20
3.3 Agentes Leishmanicidas.....	25
3.4 Cisteína Protease.....	26
3.5 Inibidores da Cisteína Protease.....	26
3.6 Estudos Farmacocinéticos.....	28
REFERÊNCIAS.....	29
CAPÍTULO I - Desenvolvimento e validação de método bioanalítico por CLAE-DAD para a quantificação de um novo candidato leishmanicida (E) -1-4 (trifluorometil) benzilideno -5- (2-4-diclorobenzoil) carbonil hidrazina (LASSBio-1736) em plasma de rato.....	
1 INTRODUÇÃO.....	34
2 MATERIAS E MÉTODOS.....	34
2.1 Reagentes químicos.....	34
2.2 Equipamentos e Condições Cromatográficas.....	35
2.3 Preparação de soluções e solução padrão.....	35
2.4 Preparação das amostras.....	36
2.5 Métodos de Validação.....	36
2.5.1 Seletividade.....	36
2.5.2 Linearidade e Sensibilidade.....	37
2.5.3 Exatidão e precisão.....	37
2.5.4 Recuperação e Efeito de Matriz.....	37
2.5.5 Estudos de Estabilidade.....	38
2.5.6 Efeito Residual.....	39
2.5.7 Aplicabilidade do Método.....	39
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	40
3.1 Desenvolvimento do método analítico.....	40
3.2 Seletividade.....	40
3.3 Linearidade e sensibilidade.....	41
3.4 Exatidão e precisão.....	42

3.5 Recuperação e Efeito de Matriz .....	42
3.6 Estudos de Estabilidade .....	43
3.7 Aplicabilidade do Método.....	43
4 CONCLUSÃO .....	44
REFERÊNCIAS .....	45
CAPÍTULO II – Avaliação do perfil farmacocinético plasmático e tecidual do LASSBio-1736. .....	46
1 INTRODUÇÃO.....	47
2 MATERIAIS E METODOS.....	47
2.1 Reagentes químicos.....	47
2.2 Animais.....	47
2.3 Preparação da formulação e administração.....	48
2.4 Ensaio farmacocinéticos.....	48
2.5 Análises por Cromatografia líquida de alta eficiência .....	49
2.6 Modelagem farmacocinética .....	49
2.7 Ligação as proteínas plasmáticas.....	50
2.8 Distribuição tecidual .....	51
2.9 Análises estatísticas.....	52
3 RESULTADOS .....	52
3.1 Perfil farmacocinético de LASSBio-1736 em plasma.....	52
3.2 Distribuição tecidual e ligação as proteínas plasmáticas de LASSBio-1736 .....	54
4 DISCUSSÃO .....	55
4.1 Farmacocinética plasmática de LASSBio-1736.....	56
4.2 Distribuição tecidual e ligação as proteínas plasmáticas de LASSBio-1736 .....	59
5 CONCLUSÃO .....	60
REFERÊNCIAS .....	61
Conclusões Gerais.....	63
ANEXOS .....	64
ANEXO A- Certificado de Aprovação de Protocolo para Uso de Animais em Pesquisa ....	65

## 1 INTRODUÇÃO

As doenças negligenciadas são um grupo diverso de doenças com características distintas que se desenvolvem principalmente entre as populações mais pobres. As 17 doenças negligenciadas priorizadas pela Organização Mundial da Saúde (OMS) são endêmicas em 149 países e afetam mais de 1,4 bilhão de pessoas ao redor do mundo (PAVLI; MALTEZOU, 2010). Essas enfermidades também apresentam indicadores inaceitáveis e investimentos reduzidos em pesquisas, produção de medicamentos e em seu controle. Em virtude disto, em maio de 2013, a 66ª Assembleia Mundial da Saúde aprovou a resolução WHA66.12 que exige a intensificação de medidas integradas e investimentos previstos para melhorar a saúde e bem-estar social das populações afetadas por doenças negligenciadas (WHO, 2015)

Depois da malária, em termos de mortalidade e número total de pacientes, a leishmaniose é doença infecciosa transmitida por vetor mais prevalente (JAIN; JAIN, 2013). No Brasil, as doenças causadas por protozoários *Leishmania* são responsáveis por 90% de todos os casos registrados na América Latina e recentemente, o Rio Grande do Sul está entre os três estados do Brasil com as maiores taxas de letalidade (28,6%) (MARTINS-MELO et al., 2014).

A leishmaniose é uma infecção causada por protozoário intracelular *Leishmania sp.*, que é transmitida pela picada da fêmea do mosquito hematófago vetor pertencente ao gênero *Phlebotomus* e *Lutzomyia* (WHO, 2015). Possui espectro clínico que inclui infecção assintomática e três principais síndromes clínicas: a leishmaniose visceral (LV, também conhecido como 'calazar'), a leishmaniose cutânea (LC) e leishmaniose mucosa (LM) (PAVLI; MALTEZOU, 2010).

O tratamento da leishmaniose é uma tarefa difícil atribuída às complicações associadas a esta doença, que incluem a susceptibilidade variável do paciente para a doença com diferentes áreas geográficas, diferentes sensibilidades e especificidades para medicamentos leishmanicidas e complexidade do parasita, entre outros (JAIN; JAIN, 2013). Nos últimos 70 anos, o arsenal terapêutico para o tratamento da leishmaniose tem sido extremamente limitado. Enquanto terapias convencionais, como antimônio pentavalente e anfotericina B (AMB) continuam a desempenhar um papel importante a miltefosina, primeira terapia oral, foi



recentemente aprovado na Índia para o tratamento dessa enfermidade (ATHANASIOU et al., 2013).

Para os antimoniais, foi observado um grande número de casos de resistência, particularmente na Índia, onde a taxa de insucesso foi reportado até 65%. A AMB é muito eficaz contra o parasita *Leishmania*, mas seus efeitos adversos frequentes e graves associados limitam a sua aplicação. O desenvolvimento de formulações lipossomais da AMB reduziu a gravidade e frequência dos efeitos adversos, mas resultou em altos custos de formulação (JAIN; JAIN, 2013). A busca por novos medicamentos leishmanicidas tem sido o foco de muitos estudos que procuram compostos com boa biodisponibilidade oral, baixo custo, pouca ou nenhuma toxicidade e baixa resistência contra infecções por *Leishmania* (SILVA-ALMEIDA et al., 2014).

O LASSBio-1736 foi sintetizado para gerar um derivado hidrazida-N-acil-hidrazona com potencial leishmanicida e atividade tripanomicida devido a sua homologia ao inibidor de cisteína protease. Seu efeito inibidor do crescimento de formas promastigotas de *Leishmania major* foi determinado em comparação com a pentamidina e os resultados mostraram que a  $IC_{50}$  (concentração necessária para obter 50% de inibição) foi inferior em comparação com o medicamento padrão. Seus efeitos citotóxicos também foram avaliados e este demonstrou-se sem efeitos sobre os macrófagos de roedores demonstrando que o composto LASSBio-1736 tem grande potencial como candidato a leishmanicida (MOREIRA LIMA, 2013).

Considerando a relevância da Leishmaniose e a limitação do arsenal terapêutico utilizado para o seu tratamento, como a baixa eficácia, a elevada toxicidade, o desenvolvimento de resistência e seu alto custo, torna-se importante o desenvolvimento de novos compostos capazes de melhorar esses aspectos do tratamento dessa doença. Nesse contexto o composto Lassbio-1736 apresenta-se como uma importante alternativa e como um possível candidato a fármaco, tornando necessária a realização de estudos para a sua avaliação farmacocinética pré-clínica.

## 2 OBJETIVOS

O Objetivo geral deste trabalho foi avaliar o perfil farmacocinético plasmático e tecidual do candidato a leishmanicida (E)-1-4(trifluorometil) benzilideno-5-(2-4-diclorozoil) carbonil hidrazina (LASSBio-1736) em ratos Wistar machos.

### 2.1 Objetivos Específicos

Os objetivos específicos foram:

- a) Desenvolver e validar método bioanalítico através de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE-UV) para o doseamento do derivado LASSBio-1736 em plasma, de acordo com as normas preconizadas pela ANVISA (Resolução-RDC Nº 27, de 17 de Maio de 2012)(BRASIL, 2012), European Agency and Medicines (EMEA, 2011) e US Food and Drug Administration (FDA, 2001).
- b) Avaliar as concentrações plasmáticas totais do derivado LASSBio-1736 em ratos após administração de uma dose intravenosa, intraperitoneal e oral;
- c) Avaliar a concentração tecidual do derivado LASSBio-1736 no cérebro, fígado, coração, baço, pulmão, rim, pele e tecido adiposo, através do método de homogeneizado de tecido após administração de uma dose intravenosa;
- d) Determinar os parâmetros farmacocinéticos do derivado LASSBio-1736 por meio de abordagem não compartimental a partir dos dados de concentração plasmática *versus* tempo obtidos experimentalmente, empregando o software Excel®;
- e) Determinar os parâmetros farmacocinéticos do derivado LASSBio-1736 através de abordagem compartimental a partir dos dados de concentração plasmática *versus* tempo obtidos experimentalmente, utilizando o software Scientist® 2.0.
- f) Determinar a ligação às proteínas plasmáticas do derivado LASSBio-1736 em ratos, através da técnica de ultrafiltração.

### 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 Doenças Negligenciadas

As doenças negligenciadas referem-se aquelas enfermidades, geralmente transmissíveis, que apresentam maior ocorrência nos países em desenvolvimento. Elas têm como característica elevada endemicidade nas áreas rurais, nas áreas urbanas menos favorecidas e a escassez de pesquisas para desenvolvimento de novos fármacos e resultam de quatro diferentes patógenos causadores: protozoários, Helmintos, bactérias e vírus (WHO, 2013).

A cada dia, cerca de três mil pessoas morrem no mundo vítimas de doenças negligenciadas como malária, leishmaniose visceral, doença de Chagas e doença do sono. São mais de 1 milhão de mortes por ano. Um dos motivos para esse número elevado de óbitos é a falta de ferramentas adequadas para o diagnóstico e tratamento destas doenças. (PONTES, 2009). Contudo, o prejuízo causado pelas doenças negligenciadas não pode ser calculado considerando apenas a mortalidade. Em geral, estas causam muito mais incapacidades do que mortalidade. (HOTEZ, 2006).

Embora exista financiamento para pesquisas relacionadas às doenças negligenciadas, o conhecimento produzido não se reverte em avanços terapêuticos, como, por exemplo, novos fármacos, métodos diagnósticos e vacinas. Uma das razões para esse quadro é o baixo interesse da indústria farmacêutica nesse tema, justificado pelo reduzido potencial de retorno lucrativo para a indústria, uma vez que a população atingida é de baixa renda e presente, em sua maioria, nos países em desenvolvimento (Brasil, 2010).

No Brasil, As ações iniciais do Ministério da Saúde com relação às doenças negligenciadas foram lançadas em 2003, com o primeiro edital temático em tuberculose, seguido pelos editais de dengue (2004) e hanseníase (2005) – todos editais nacionais que seguiram definições das oficinas de prioridades realizadas em Brasília, DF (Brasil, 2010).

Apesar da elevada ocorrência das doenças negligenciadas no Brasil, observa-se que, os gastos do Ministério da Saúde (MS) com medicamentos para os programas de assistência farmacêutica das doenças negligenciadas são pequenos

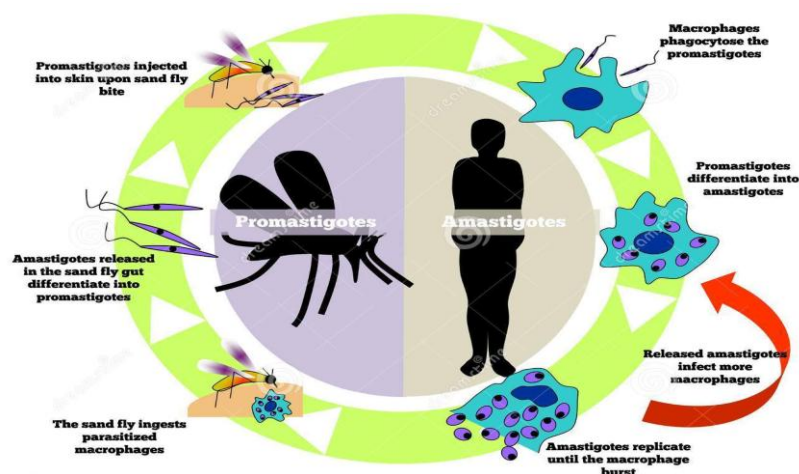
em relação ao gasto com outros programas, como o da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS), por exemplo. Acredita-se que isso reflita a inexistência de medicamentos novos para o tratamento das doenças negligenciadas que seriam, portanto, sujeitos à proteção patentária e, conseqüentemente, mais caros. Por outro lado, o Brasil é um dos países em desenvolvimento que mais investe recursos em estudos de novas formas de tratamento para as doenças negligenciadas (IPEA, 2011).

O financiamento da assistência farmacêutica, no Brasil, é de responsabilidade das três esferas de gestão do Sistema Único de Saúde (SUS). O repasse de recursos federais é realizado na forma de blocos de financiamento.<sup>6</sup> A aquisição de medicamentos e insumos é financiada por meio do Bloco de Financiamento da Assistência Farmacêutica, constituído por três componentes: i) componente básico da assistência farmacêutica; ii) componente estratégico da assistência farmacêutica; e iii) componente especializado (IPEA, 2011).

### 3.2 Leishmaniose

A leishmaniose é uma antropozoonose, ou seja, doença primária de animais que pode ser transmitida ao homem. Esta é provocada pelos protozoários da Família *Tripanosoma*, gênero *Leishmania*, que parasita animais (BRASIL, 2010), (IPEA, 2011). O ciclo evolutivo apresenta duas formas: amastigota, que é obrigatoriamente parasita intracelular em mamíferos e promastigota, presente no tubo digestivo do inseto transmissor (BRASIL, 2010).

Figura 1- Ciclo da Leishmaniose



Fonte: <http://pt.dreamstime.com/imagem-de-stock-royalty-free-leishmania-image39558776>

A doença não é transmitida de pessoa para pessoa. A transmissão se dá por meio da picada de mosquitos infectados (flebotomíneos), também conhecidos como mosquitos palha, tatuquira, birigui, entre outros (BRASIL, 2010), (IPEA, 2011). O nome científico da espécie de flebotomíneo mais importante para a transmissão da Leishmaniose Visceral (LV) é *Lutzomyia longipalpis*. Esses insetos são pequenos e têm como características a coloração amarelada ou de cor palha e, em posição de repouso, suas asas permanecem eretas e semiabertas. O ciclo biológico do vetor ocorre no ambiente terrestre e passa por quatro fases: ovo, larva, pupa e adulto (forma alada). Desenvolvem-se em locais úmidos, sombreados e ricos em matéria orgânica (folhas, frutos, fezes de animais e outros entulhos que favoreçam a umidade do solo). O desenvolvimento do ovo à fase adulta ocorre em cerca de 30 dias (BRASIL, 2010).

Figura 2- Mosquito transmissor da leishmaniose (*Flebotomíneo*)



Fonte: <http://whippetp.no.sapo.pt/leishmaniose.htm>

Caninos, felinos, equídeos, além de animais silvestres, podem ser reservatórios do protozoário (BRASIL, 2010), (IPEA, 2011). No ambiente urbano, o cão é a principal fonte de infecção para o vetor, podendo desenvolver os sintomas da doença, que são: emagrecimento, queda de pêlos, crescimento e deformação das unhas, paralisia de membros posteriores, desnutrição, entre outros. (BRASIL, 2010).

Figura 3- Cão infectado com leishmaniose



Fonte: <http://www.brasilecola.com/doencas/leishmaniose-visceral.htm>

Para combater a doença é essencial o apoio da população, no que diz respeito à higiene ambiental (manejo ambiental). Recomenda-se a limpeza periódica dos quintais, por meio da retirada da matéria orgânica em decomposição (folhas, frutos, fezes de animais e outros entulhos que favoreçam a umidade do solo) e destino adequado do lixo orgânico, a fim de impedir o desenvolvimento das formas imaturas dos flebotomíneos; a limpeza dos abrigos de animais domésticos; bem como a manutenção de animais domésticos distantes do domicílio, especialmente durante a noite, de modo a reduzir a atração dos flebotomíneos para o intradomicílio (BRASIL, 2010).

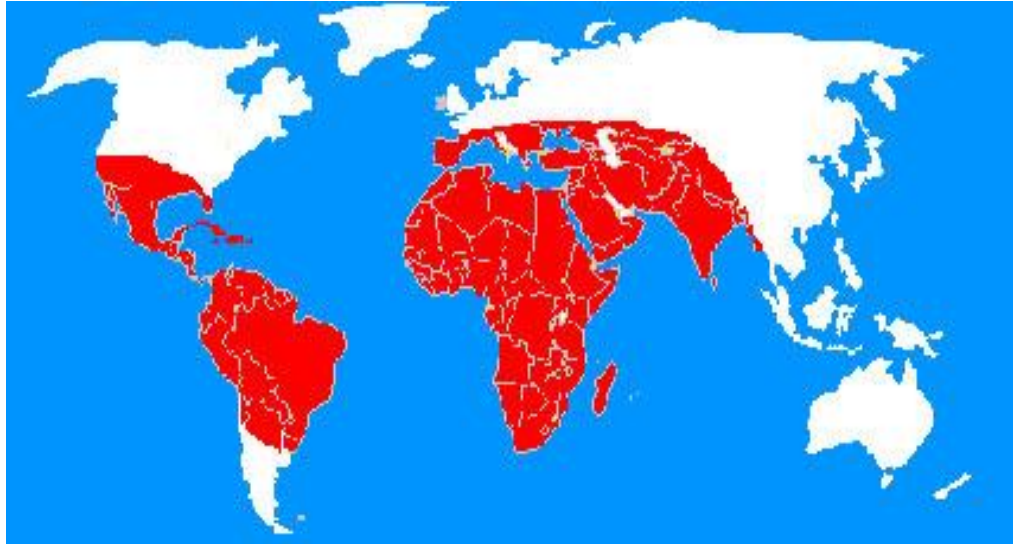
A doença pode se manifestar de três formas diferentes: Leishmaniose visceral, cutânea e mucocutânea (ou difusa). A LV É uma doença sistêmica, caracterizada por febre de longa duração, perda de peso, astenia, adinamia e anemia, dentre outras manifestações. Quando não tratada, pode evoluir para óbito em mais de 90% dos casos. A leishmaniose Cutânea (LC) é caracterizada por lesões podem ocorrer na pele. As lesões de pele podem ser única, múltiplas, disseminada ou difusa. Apresentam aspecto de úlceras, com bordas elevadas e fundo granuloso, geralmente indolor. A leishmaniose mucocutânea (LM) possui manifestações clínicas semelhantes as da LC, porém as lesões mucosas são mais frequentes no nariz, boca e garganta. Quando atingem o nariz podem ocorrer entupimentos, sangramentos, coriza e aparecimento de crostas e feridas. Na garganta, dor ao engolir, rouquidão e tosse (BRASIL, 2010).

Dentre elas, calazar, a forma visceral, se não for tratada pode ser fatal dentro de 2 anos (WHO, 2013). Estima-se em torno de 300.000 casos por ano e mais de 20.000 mortes. Por outro lado, a forma cutânea é a mais prevalente, causando ulcerações tópicas que cicatrizam espontaneamente. Cerca de 1 milhão de casos foram notificados em todo o mundo nos últimos cinco anos (WHO, 2015).

Estima-se que 350 milhões de pessoas estão em risco para a doença em 98 países de cinco continentes. A doença afeta principalmente pessoas na África, Ásia e América Latina. Na América Latina, LV é causada por *L. infantum* e no Brasil é responsável por 90% dos casos. Neste país, a leishmaniose visceral é um importante problema de saúde pública, sendo responsável por 0,03% do total de óbitos. As maiores taxas de mortalidade são observadas no sexo masculino, 1 ano de idade e que vivem na região Nordeste, mas casos fatais têm sido descritos em idosos e em habitantes da região Sul. A região Sul, considerada uma área não

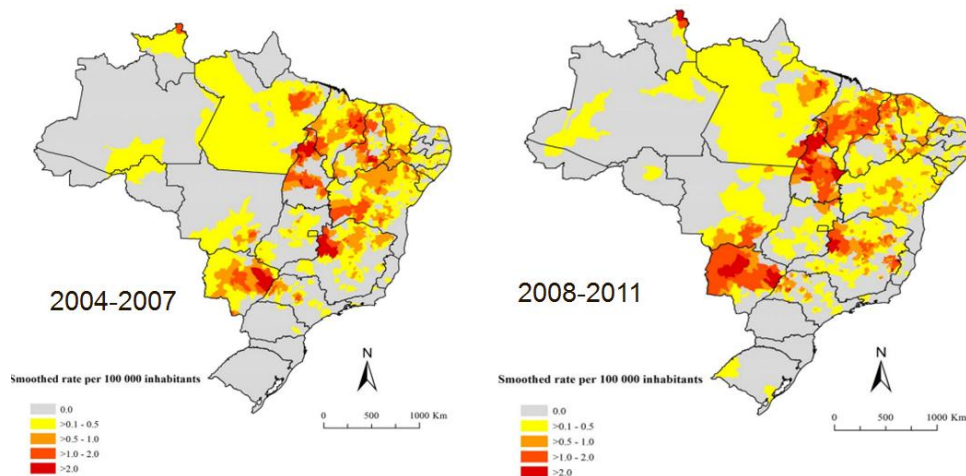
endêmica, mostrou um aumento de casos fatais entre 2000-2011 (MARTINS-MELO et al., 2014).

Figura 4- Mapa dos países mais afetados por Leishmaniose



Fonte: <http://whippetp.no.sapo.pt/leishmaniose.htm>

Figura 5- Distribuição espacial das taxas médias anuais de mortalidade (por 100.000 habitantes) relacionadas com VL pelos municípios brasileiros

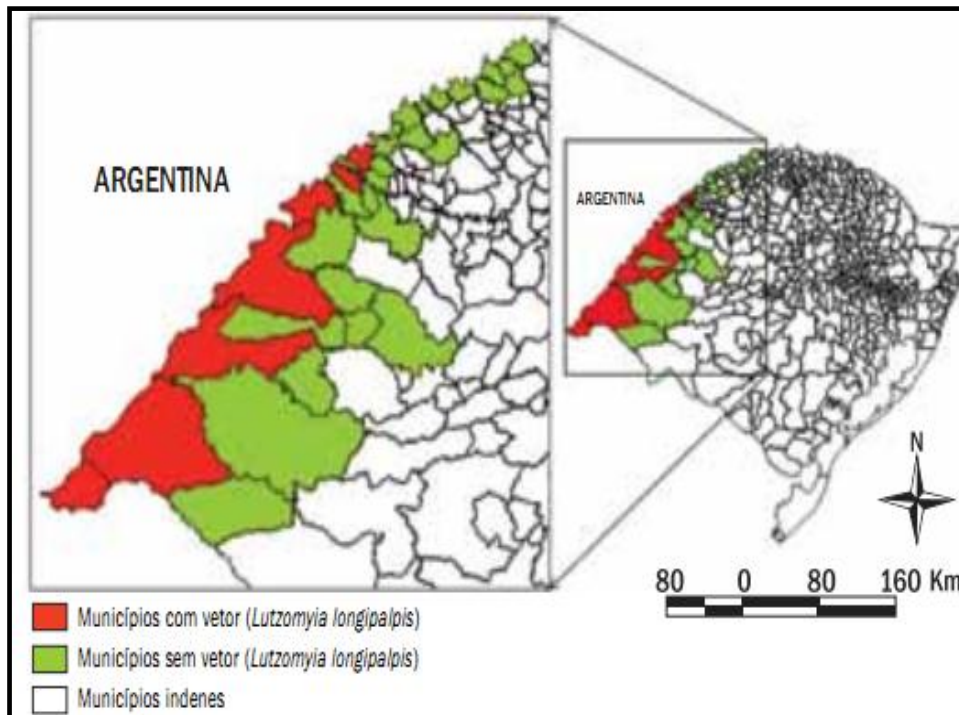


Fonte: MARTINS-MELO, 2014

Até o ano de 2008, as áreas de transmissão estavam em outras unidades federadas, não ocorrendo na região Sul. No entanto, houve os primeiros casos autóctones da doença em cães (2008), em humanos (2009) e o primeiro registro do vetor (2008) no estado, passando o Rio Grande do Sul a ser área de transmissão desse agravo (CEVS, 2011).



Figura 6- Detalhe dos municípios do Rio Grande do Sul amostrados para a detecção de *L. longipalpis* e determinação das áreas de risco, 2008 a 2011.



Fonte: NVRAAB/DVAS/CEVS/SES/RS

Apesar de grave, a LV tem tratamento para os humanos. Ele é gratuito, está disponível na rede de serviços do Sistema Único de Saúde e baseia-se na utilização de três fármacos, a depender da indicação médica: o antimoniato de N-metil glucamina, a anfotericina B lipossomal e o desoxicolato de anfotericina B. A escolha da droga baseia-se na sua toxicidade e eficácia (BRASIL, 2010).

Atualmente, duas apresentações de anfotericina B são disponibilizadas pelo Ministério da Saúde: o desoxicolato de anfotericina B e a anfotericina B lipossomal, com eficácias comparáveis. No entanto, a primeira possui toxicidade maior em relação à segunda, de acordo com resultados preliminares de um ensaio clínico realizado no Brasil. Diante dessa evidência, em novembro de 2013, o Ministério da Saúde decidiu ampliar os critérios de indicação da anfotericina B lipossomal para o tratamento de pacientes com LV. Essa ampliação foi uma mudança necessária, visando garantir uma maior segurança no tratamento dos pacientes de LV dos grupos com maior risco de morte. As solicitações de anfotericina B lipossomal deverão ser feitas por meio da ficha específica de solicitação, que poderá ser



enviada à Secretaria Estadual de Saúde ou ao Ministério da Saúde, a depender do fluxo estabelecido por Estado (BRASIL, 2010).

Contudo, apesar dos esforços para combater a leishmaniose, o avanço da urbanização, pauperização, a falta de acessibilidade aos serviços de saúde, a co-infecção *Leishmania*-HIV/AIDS e a globalização facilitou a propagação desta doença em todo o mundo (BELO et al., 2013), (MCGWIRE; SATOSKAR, 2014), (WHO, 2007)

### **3.3 Agentes Leishmanicidas**

O tratamento da leishmaniose continua sendo um desafio seja pelo aumento dos casos de resistência do protozoário (AIT-LOUDHIA et al., 2011), (CROFT; SUNDAR; FAIRLAMB, 2006), ou devido às características dos medicamentos disponíveis. Atualmente ele é baseado em medicamentos antigos e ineficientes. Os principais medicamentos utilizados são os antimoniais pentavalentes, anfotericina-B e miltefosina (ATHANASIOU et al., 2013).

A miltefosina, apesar de sua boa biodisponibilidade oral, mostra um perfil teratogênico, efeitos gastrointestinais, renais e hepatotoxicidade (DORLO et al., 2012). Além disso, o uso deste medicamento não é permitido em todos os países. Já a anfotericina B, um antibiótico macrolídeo polieno antifúngico descoberto em 1956, e está associado à insuficiência renal e problemas cardíacos. Esses problemas foram contornados a partir do desenvolvimento de uma formulação lipossômica (Ambisome<sup>®</sup>) contornou estes problemas e facilitou a acumulação do fármaco em órgãos como fígado e baço, o que é uma característica destes sistemas coloidais (SANGSHETTI, 2015). No entanto, o custo desta preparação é pelo menos 10 vezes maior do que a forma não lipossomal (WHO, 2010). O tratamento de LV/LC utilizando antimoniais pentavalentes pode variar de 10 a 60 dias e as formulações podem ser usadas na administração intravenosa, intramuscular ou forma intralesional. O mecanismo de ação dos antimoniais pentavalentes não é bem compreendido, mas há indício de ser multialvo. Vários efeitos colaterais sistêmicos são comuns, tais como cardiotoxicidade fatal, elevação nos níveis de enzimas hepáticas e pancreáticas, pancitopenia e alterações eletrolíticas, as quais exigem que o paciente seja monitorado durante todo o tratamento (MCGWIRE; SATOSKAR,

2014). Outros medicamentos associados podem ser usados para o tratamento, tais como pentamidina, paromomicina, pentamidina (SANGSHETTI, 2015).

### 3.4 Cisteína Protease

A busca por novas drogas leishmanicidas tem sido o foco de muitos estudos que procuram compostos com boa biodisponibilidade oral e baixo custo, com bons perfis de toxicidade contra infecções de *Leishmania* e baixa resistência. Neste contexto, a estratégia para o desenvolvimento de novas entidades químicas é a busca de substâncias que atuem em diferentes alvos dos parasitas, como a cisteína protease (SILVA-ALMEIDA et al., 2014), (SOUZA-SILVA et al., 2014).

As cisteínas proteases são uma das proteases encontradas em maior abundância nos parasitas causadores da leishmaniose, estando envolvidas em processos de desenvolvimento, replicação, crescimento, manipulação do sistema imune do hospedeiro e penetração em tecidos e pele (SILVA-LOPEZ et al., 2007). Em virtude dessas características as cisteínas proteases têm sido alvos moleculares potenciais para o desenvolvimento de novos candidatos a fármacos e estão sendo testadas para uma série de doenças inflamatórias e imunológicas (MOREIRA LIMA, 2013).

### 3.5 Inibidores da Cisteína Protease

Nos últimos anos, o arsenal terapêutico para o tratamento de leishmaniose tem sido extremamente limitado, embora as terapias convencionais continuem a desempenhar um papel importante a sua elevada toxicidade, efeitos adversos graves, resistência, ineficiência na cura da doença e alto custo indicam a necessidade do desenvolvimento de novos medicamentos. Considerando-se o atual tratamento da leishmaniose, hoje vem sendo desenvolvidos vários estudos de candidatos a fármacos contra esta doença, entre os compostos sintetizados no Brasil, destaca-se o composto LASSBio-1736.

O LASSBio-1736 foi sintetizado a partir de hibridação molecular de fragmento de aril-hidrazida oriundos do LASSBio-1111 e de acil-hidrazona retiradas do LASSBio-1064 (salicilaldeído 4-Cloro benzoil-hidrazona) gerando um derivado

hidrazida-N-acil-hidrazona com potencial leishmanicida e atividade tripanocida devido à sua homologia com inibidor de cisteína protease.

Figura 7- Planejamento dos compostos hidrazido-N-acilidrazona a partir da aplicação da estratégia de hibridação molecular entre os compostos LASSBio-1064 e LASSBio-1111.

O efeito inibidor do crescimento de formas promastigotas de *Leishmania major* foi determinada para o LASSBio-1736 em comparação com a pentamidina e seus resultados mostraram que a IC<sub>50</sub> (a concentração necessária para obter 50% de inibição) foi de 0,4 µg/mL para o candidato a fármaco e 0,8 µg/mL para o medicamento padrão e seu índice de seletividade foi de 250. Em testes de efeito *in vivo* do tratamento com miltefosina, glucantime e o composto LASSBio-1736 sobre o curso de lesão em camundongos BALB/C infectados com *L. amazonensis* na dose de 30 µmol/Kg/dia durante 28 dias a avaliação da carga parasitária na orelha e no linfonodo demonstrou redução da lesão e da carga parasitária em comparação com o grupo controle e os medicamentos testados (MOREIRA LIMA, 2013).

Os efeitos citotóxicos foram avaliados em cepas J774 de macrófagos de roedores por ensaio de lactato desidrogenase, não demonstrando efeitos sobre os mesmos. Em testes *in vivo* de sobrevivência de animais infectados com *L. amazonenses* durante o tratamento com miltefosina, glucantime e derivados semicarbazônicos hidrazino-N-acilidrazônicos na dose de 30 µmol/kg/dia durante 28 dias, a sobrevivência superou 80% dos animais. Nos experimentos de efeito *in vivo* do tratamento com miltefosina, glucantime e derivados semicarbazônicos hidrazino-N-acilidrazônicos sobre os níveis de alanina aminotransferase, aspartato aminotransferase e uréia no soro de animais infectados com *L. amazonensis* na dose de 30 µmol/kg/dia durante 28 dias e em Golden Hamsters infectados com *L. chagasi* tratados por 15 dias por via intraperitoneal, apresentou resultados similares aos do grupo controle e inferiores dos medicamentos padrão (MOREIRA LIMA, 2013).

Este composto apresenta ainda estabilidade química em pH 2 de 95%, em pH 7,4 de 99% e estabilidade plasmática de 98%, peso molecular de 419,19 g e solubilidade em DMSO (MOREIRA LIMA, 2013). Devido aos resultados promissores obtidos, outros estudos *in vivo* têm de ser realizados para a confirmação do potencial de LASSBio-1736 como candidato a fármaco.

### 3.6 Estudos Farmacocinéticos

As preocupações com a falta de eficácia, segurança e fatores econômicos são as principais razões para a interrupção de ensaios clínicos a candidatos a fármacos (CALDWELL et al., 2004). Na descoberta e desenvolvimento pré-clínico de medicamentos, uma compreensão da farmacocinética em animais permite a seleção e avanços de candidatos a fármacos. Os processos de absorção, distribuição, metabolismo e eliminação (ADME) desempenham um papel fundamental na definição da disposição de um candidato a fármaco no corpo e, por conseguinte, o seu potencial terapêutico (TASSO et al., 2005).

Os parâmetros farmacocinéticos considerados críticos são: *clearance* ou depuração (Cl), extensão da disponibilidade ou biodisponibilidade (F), fração de dose excretada inalterada ( $f_u$ ), concentração no sangue/plasmática no steady-state ( $C_{pSS}$ ), tempo de meia-vida ( $t_{1/2}$ ), medida da fração livre plasmática ( $f_{up}$ ) e volume de distribuição (Vd), e eles deverão ser determinados para cada molécula nova, tanto em testes com animais quanto em humanos (PANCHAGNULA; THOMAS, 2000).

O Cl e a F são necessários para definir a dosagem adequada (quantidade/dia) de um medicamento em uma via de administração particular. A  $f_u$  e a  $C_{pSS}$  são utilizados para fazer o julgamento se este fármaco pode ser comercializado com sucesso como uma forma e dosagem específica e se ele sofre indução ou inibição enzimática. O  $t_{1/2}$  é um parâmetro que define o intervalo de dosagem em que o fármaco deve ser administrado e também descreve o tempo necessário para atingir o estado estacionário (STORPIRTIS, 2011). O Vd é um volume hipotético de fluidos corporais que seriam necessários para dissolver a quantidade total do composto na mesma concentração que foi encontrada no sangue. A ligação às proteínas plasmáticas e teciduais pode limitar a distribuição do fármaco, pois somente a fração livre, não-ligada à proteína pode difundir-se através das membranas. Sua extensão de ligação é influenciada por vários fatores tais como a lipofilicidade, carga, estrutura química e complementar do composto para os locais de ligação (PANCHAGNULA; THOMAS, 2000).

Os parâmetros farmacocinéticos são constantes biológicas ou relações de proporcionalidade obtidas por meio da aplicação de um modelo farmacocinético (hipótese) na interpretação do destino de um fármaco no organismo (STORPIRTIS, 2011). Eles contribuem para elucidar os complexos comportamentos dos

medicamentos e substâncias nos diferentes organismos e se tornam cada vez mais importantes para o desenvolvimento de novos medicamentos.

## REFERÊNCIAS

AIT-OU DHIA, K. et al. Leishmania antimony resistance: what we know what we can learn from the field. **Parasitol Res**, v. 109, n. 5, p. 1225-32, Nov 2011.

ATHANASIOU, L. V. et al. Treatment of canine leishmaniosis with aminosidine at an optimized dosage regimen: A pilot open clinical trial. **Veterinary Parasitology**, v. 192, n. 1-3, p. 91-97, 2013.

BELO, V. S. et al. Factors associated with visceral leishmaniasis in the americas: a systematic review and meta-analysis. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 7, n. 4, p. e2182, 2013.

BRASIL. **Lei 11794/08. Procedimentos para Uso Científico de Animais**. DIÁRIO OFICIAL DA UNIÃO, S. D. D. O. D. C. Brasília, Brazil: Brazil. Diário Oficial da União, Seção 1 de 9 de outubro de 2008; CXLV (196): 1:2. 2008.

\_\_\_\_\_. **Dispõe sobre os requisitos mínimos para a validação de métodos bioanalíticos empregados em estudos com fins de registro e pós-registro de medicamentos**. Resolução RDC no. 27, de 17 de maio de 2012. ANVISA, B. Brasília: Diário Oficial da Uniao. Resolução RDC no. 27, de 17 de maio de 2012 2012.

BRAZIL. **Diretriz Brasileira para o cuidado e a utilização de animais para fins científicos e didáticos**. MINISTÉRIO DA CIÊNCIA, T. E. I. C. N. D. C. D. E. A. C. Brasília: MCTI, Brazil 2013.

CALDWELL, G. et al. Allometric scaling of pharmacokinetic parameters in drug discovery: Can human CL, Vss and t1/2 be predicted from in-vivo rat data? **European Journal of Drug Metabolism and Pharmacokinetics**, v. 29, n. 2, p. 133-143, 2004/06/01 2004.

CARTER, K. C. et al. The therapeutic effect of sodium stibogluconate in BALB/c mice infected with Leishmania donovani is organ-dependent. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 40, n. 5, p. 370-373, 1988.

CEVS. **Centro Estadual de Vigilância em Saúde. Boletim Epidemiológico. Secretaria de Saúde, Rio Grande do Sul**, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, 2011. Disponível em: < [http://www.saude.rs.gov.br/upload/1337355106\\_v.13,%20n.1,%20mar,%202011](http://www.saude.rs.gov.br/upload/1337355106_v.13,%20n.1,%20mar,%202011) >. Acesso em: Accessed 2015 March 22.

CROFT, S. L.; SUNDAR, S.; FAIRLAMB, A. H. Drug resistance in leishmaniasis. **Clin Microbiol Rev**, v. 19, n. 1, p. 111-26, Jan 2006.

DENIS, P.; OSSENBERG, F. W.; BENHAMOU, J. P. Hepatic blood flow and enzyme induction in the rat. **Biochemical Pharmacology**, v. 24, n. 2, p. 249-251, 1975.

DIEHL, K.-H. et al. A good practice guide to the administration of substances and removal of blood, including routes and volumes. **Journal of Applied Toxicology**, v. 21, n. 1, p. 15-23, 2001.

DORLO, T. P. et al. Miltefosine: a review of its pharmacology and therapeutic efficacy in the treatment of leishmaniasis. **J Antimicrob Chemother**, v. 67, n. 11, p. 2576-97, Nov 2012.

EMA. **Guideline on Bioanalytical Method Validation** EUROPEAN MEDICINES AGENCY, E. London: European Medicines Agency. EMEA/CHMP/EWP/192217/2009 2011.

FDA. **Guidance for industry: Bioanalytical method validation**. ADMINISTRATION, F. A. D. Rockville, US: FDA, US 2001.

JAIN, K.; JAIN, N. K. Novel therapeutic strategies for treatment of visceral leishmaniasis. **Drug Discovery Today**, v. 18, n. 23-24, p. 1272-1281, 2013.

JHA. **The treatment of Visceral Leishmaniasis: Safety and Efficacy**. J Nepal Med Assoc p.645. 2013

KHOJASTEH, S. C., WONG, HARVEY, HOP, CORNELIS E.C.A. **Drug Metabolism and Pharmacokinetics Quick Guide**. 1. edition. New York: Springer-Verlag New York, 2011. 228 ISBN 978-1441956286.

MARTINS-MELO, F. R. et al. Mortality and case fatality due to visceral leishmaniasis in Brazil: a nationwide analysis of epidemiology, trends and spatial patterns. **PLoS One**, v. 9, n. 4, p. e93770, 2014.

MCGWIRE, B. S.; SATOSKAR, A. R. Leishmaniasis: clinical syndromes and treatment. **QJM**, v. 107, n. 1, p. 7-14, Jan 2014.

MOREIRA LIMA, L. Q., A. C. ; ALVES, MA ; MOREIRA, MAGNA ALEXANDRE SUZANA ; BARREIRO, ELIEZER ; GONZÁLEZ, M ; CERECETTO, HUGO. **Compostos hidrazida-N-acilidrazonas, processo de obtenção de compostos hidrazida-N-acilidrazonas, uso de compostos intermediários para a obtenção de hidrazida-N-acilidrazonas para tratamento de leishmaniose e doença de chagas é composições farmacêuticas obtidas**. UFRJ. Brazil. WO2014019044 A1. 2013 2013.

PANCHAGNULA, R.; THOMAS, N. S. Biopharmaceutics and pharmacokinetics in drug research. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 201, n. 2, p. 131-150, 2000.

PAVLI, A.; MALTEZOU, H. C. Leishmaniasis, an emerging infection in travelers. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 14, n. 12, p. e1032-e1039, 2010.

SANGSHETTI, J. K., F.A.K.; KULKARNI, K.; AROTE, R.B.; PATIL, R.H. Antileishmanial drug discovery: a comprehensive review of last 10 years. **Royal Society of Chemistry Advances**, p. 1-100, 2015.

SHARGEL, L. W.-P., S.; YU, A. B. C. . In: MCGRAW-HILL (Ed.). **Applied biopharmaceutics & pharmacokinetics**. New York, 2005. p.267-269.

SILVA-ALMEIDA, M. et al. Overview of the organization of protease genes in the genome of *Leishmania* spp. **Parasit Vectors**, v. 7, p. 387, 2014.

SILVA-LOPEZ, R. E. et al. Effects of serine protease inhibitors on viability and morphology of *Leishmania (Leishmania) amazonensis* promastigotes. **Parasitology Research**, v. 101, n. 6, p. 1627-1635, 2007.

SNYDER, L. R. K., J.J.; DOLAN, J.W. . **Introduction to Modern Liquid Chromatography**. 3. edition. Wiley, 2009. 960 ISBN 9780470508183.

SOUZA-SILVA, F. et al. Dynamic identification of H2 epitopes from *Leishmania (Leishmania) amazonensis* cysteine proteinase B with potential immune activity during murine infection. **J Mol Recognit**, v. 27, n. 2, p. 98-105, Feb 2014.

STORPIRTIS, S. G., MARÍA NELLA; CAMPOS, DANIEL ROSSI DE;GONÇALVES, JOSÉ EDUARDO. In: KOOGAN, G. (Ed.). **Farmacocinética Básica e Aplicada**. Rio de Janeiro, 2011.

TASSO, L. et al. Pharmacokinetics and tissue distribution of a new heterocyclic N-phenylpiperazine derivative (LASSBio-581) in rats. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 26, n. 2, p. 194-202, 2005.

WHO. Control of the leishmaniasis: report of a meeting of the WHO expert committee on the control of leishmaniasis. Geneva, 2007. Disponível em: < [http://whqlibdoc.who.int/trs/WHO\\_TRS\\_949\\_eng.pdf](http://whqlibdoc.who.int/trs/WHO_TRS_949_eng.pdf) >. Acesso em: Accessed 2015 April 01.

\_\_\_\_\_. Cost of Medicines and suppliers. Extracted from The control of the leishmaniasis. WHO Technical Report Series N°949 (Annex 6). Geneva, 2010. Disponível em: < [http://www.who.int/leishmaniasis/research/978\\_92\\_4\\_12\\_949\\_6\\_Annex6.pdf?ua=](http://www.who.int/leishmaniasis/research/978_92_4_12_949_6_Annex6.pdf?ua=) >. Acesso em: Accessed 2015 March 22.

\_\_\_\_\_. Sustaining the drive to overcome the global impact of neglected tropical diseases. Second WHO report on neglected tropical diseases., Geneva, Switzerland, 2013. Acesso em: Accessed 2015 March 22.

\_\_\_\_\_. Leishmaniasis. 2015. Disponível em: < <http://www.who.int/leishmaniasis/research/en/> >. Acesso em: Accessed 2015 March 23.



**CAPÍTULO I** - Desenvolvimento e validação de método bioanalítico por CLAE-DAD para a quantificação de um novo candidato leishmanicida (E) -1-4 (trifluorometil) benzilideno -5- (2-4-diclorobenzoil) carbonil hidrazina (LASSBio-1736) em plasma de rato.

## **1 INTRODUÇÃO**

O passo preliminar dos estudos farmacocinéticos é o desenvolvimento de um método bioanalítico, que permite determinar as concentrações do candidato a fármaco na mistura complexa, denominada matriz biológica (KHOJASTEH, 2011). A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) é um dos métodos mais importantes de bioensaio. Diferentes tipos de detectores, tais como luz ultravioleta (UV) ou de fluorescência pode ser acoplado com CLAE, o que permite a medição das concentrações do composto em matrizes biológicas. Detectores de ultravioleta são muitas vezes preferidos, porque são mais baratos e mais facilmente disponíveis (SNYDER, 2009). Além disso, a especificidade da detecção de UV pode ser melhorada com a utilização de um detector de arranjo de fotodiodos (DAD), permitindo comparações espectrais e avaliação de pureza de pico, o que é especialmente útil na presença de outras substâncias (PRAGST, 2004). Medições fluorimétricas mostram uma maior sensibilidade e menor instabilidade instrumental, mas a principal desvantagem da detecção de fluorescência é que nem todos os compostos demonstram-se fluorescentes sob condições cromatográficas líquidas normais. O detector de espectrometria de massa também pode ser acoplado e oferece uma excelente seletividade e sensibilidade, mas é um instrumento relativamente caro, além da necessidade de conhecimentos técnicos específicos (SNYDER, 2009). Tendo em vista isso, este capítulo aborda o desenvolvimento e validação de metodologia analítica por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE- DAD) para a quantificação do composto LASSBio-1736 em amostras de plasma de ratos Wistar.

## **2 MATERIAS E MÉTODOS**

### **2.1 Reagentes químicos**

LASSBio-1736 foi sintetizado no Laboratório de Avaliação e Síntese de Substâncias Bioativas da Universidade Federal do Rio de Janeiro (LASSBio, UFRJ, Brasil), como descrito anteriormente (MOREIRA LIMA, 2013). O metanol e

acetonitrila, de grau HPLC, foram adquiridos a partir de Tedia<sup>®</sup> Brasil. A água foi obtida por sistema Milli-Q<sup>®</sup> (Millipore). A trietilamina e o ácido fosfórico foram adquiridos a partir de Dinâmica Química<sup>®</sup> Contemporânea LTDA. O hidróxido de sódio foi obtido a partir de Synth<sup>®</sup> e Diclofenaco de sódio foi obtido a partir de Delaware<sup>®</sup> (Porto Alegre, Brasil).

## **2.2 Equipamentos e Condições Cromatográficas**

O sistema de CLAE utilizado foi composto por controlador de bomba 600, injetor automático 717 Plus-Waters<sup>®</sup>, detector Waters<sup>®</sup> 2487 absorvância k dupla e Software Milênio 321 (Waters<sup>®</sup>, Milford, EUA). A separação foi realizada numa coluna Waters Spherisorb<sup>®</sup>S5 ODS2 C18 (150 mm x 4,6 mm, 5 µm), precedida por uma pré-coluna (C18, 4 mm x 3 mm) do mesmo material. A fase móvel foi uma mistura de reagentes de grau HPLC, composta por trietilamina 0,3%, metanol e acetonitrila (45:15:40, v/v/v). O pH da água foi corrigido para 4,0 utilizando-se ácido fosfórico. O vazão foi de 1,0 mL/min, injeção da amostras de 50 µL e tempo total de corrida foi de 8 minutos. O comprimento de onda utilizado para quantificação foi de 289 nm. Todas as análises foram realizadas à temperatura ambiente de 25 °C.

## **2.3 Preparação de soluções e solução padrão**

Uma solução estoque padrão de LASSBio-1736 foi preparado por dissolução do pó em acetonitrila a fim de obter-se uma concentração de 500 µg/mL. A solução de trabalho foram preparadas combinando alíquotas de soluções estoque e volumes adequados de acetonitrila para obtenção de 10 soluções padrão contendo as seguintes concentrações: 2, 4, 5, 6, 8, 9, 10, 20, 30, 40 µg/mL. Uma solução estoque padrão de diclofenaco de sódio (Padrão Interno (PI)) foi preparada em uma mistura de acetonitrila/água (50:50, v/v) para produzir uma concentração de 500 µg/ml diluído para 50 µg/mL. As soluções de estoque padrão e amostras de controle de qualidade (CQ) (0,5 µg/mL, 0,9 µg/mL e 3 µg/mL) foram preparadas no momento das análises. O controle de qualidade de diluição (CQD) foi preparado a partir de 90 µL de plasma enriquecido com LASSBio-1736 (200 µg/mL). Esta amostra foi diluída 10 vezes e processadas como descrito abaixo.

As amostras da curva de calibração foram preparadas em 90  $\mu\text{L}$  de plasma de rato Wistar com 10  $\mu\text{L}$  da solução de trabalho apropriada e 10  $\mu\text{L}$  da solução de PI resultando nas concentrações finais de 0,2, 0,4, 0,6, 0,8, 1,0, 2,0, 4,0  $\mu\text{g/mL}$ .

## **2.4 Preparação das amostras**

As amostras foram preparadas pelo método de extração líquido-líquido, onde após a adição de 10  $\mu\text{L}$  de NaOH a 0,1% em 100 mL da amostras, o plasma foi desproteinizado com 1 mL de acetonitrila, logo após agitado em vórtex durante 10 segundos e levado a centrifugada a 12000 rpm durante 10 minutos a 4 °C.. O sobrenadante foi transferido para tubos de ensaio e transportado para centrífuga evaporadora a vácuo RC 1010 (Jouan, França). Em seguida, o resíduo seco foi ressuspenso em 200  $\mu\text{L}$  de fase móvel e agitado durante 45 segundos. Todas as amostras de plasma, incluindo a curva de calibração e de CQ, foram processados do mesmo modo, antes das análises cromatográficas.

## **2.5 Métodos de Validação**

Os parâmetros como seletividade, linearidade, sensibilidade, precisão, exatidão, recuperação, efeito de matriz, estabilidade, efeito residual e aplicabilidade do método descritas abaixo foram validados seguindo os protocolos das diretrizes da Agência Nacional Vigilância Sanitária (ANVISA), (BRASIL, 2012), European Agency and Medicines (EMA, 2011) e US Food and Drug Administration (FDA, 2001).

### **2.5.1 Seletividade**

A partir de um pool de plasmas de 6 ratos Wistar diferentes, amostras de plasma normais, lipêmicos e hemolisados (n=4), foram preparados como descrito acima (item 2.4) para verificação de picos que pudessem interferir na detecção da substância analisada e/ou no PI. Além disso, um detector de arranjo de fotodiodos (DAD) foi usado para confirmar a ausência de impurezas espectrais em cada pico cromatográfico.

### 2.5.2 Linearidade e Sensibilidade

Alíquotas de plasma branco foram enriquecidas com as soluções de trabalho correspondentes para obtenção de 7 concentrações da curva de calibração ( 0,2, 0,4, 0,6, 0,8, 1,0, 2,0, 4.0 µg/mL) e analisadas em triplicata como descrito acima, em dois dias diferentes. As amostras foram preparadas no mesmo dia das análises. A razão das áreas dos picos de LASSBio-1736 e PI foram plotadas em concentração do analito e comparadas com curvas padrão, sendo bem representadas através da equações de regressão linear com um fator coeficiente do inverso da concentração ao quadrado ( $1/y^2$ ,  $y = \text{LASSBio-1736/PI}$  razão da área) no Intervalo de concentração de 0,2-4 µg/mL. O software utilizado foi Scientist<sup>®</sup> versão 2.01 (MicroMath, Salt Lake City, UT, EUA). Inclinações, interceptos e coeficientes de determinação ( $r^2$ ) foram observados.

A sensibilidade do método foi determinada pelo limite inferior de quantificação (LIQ). O LIQ foi determinado como a menor concentração reprodutível com precisão de 20% e Exatidão de 80-120%.

### 2.5.3 Exatidão e precisão

Para a exatidão e precisão, o LIQ, as amostras de CQ (0,5, 0,9, 3,0 µg/mL) e CQD (2 µg/mL) foram analisadas como descrito acima (item 2.3) em seis replicatas em cada um dos 2 dias. O ensaio de precisão intra e inter-dia e exatidão foram calculados e expressos como o desvio padrão (DP) e a porcentagem de desvio padrão relativo (DPR%). Os critérios de aceitação estabelecidos foram precisão de 15% e exatidão de 85-115%, exceto para o LIQ, de acordo com as orientações (Brasil 2012, EMEA 2011, FDA, 2001).

### 2.5.4 Recuperação e Efeito de Matriz

A recuperação e o efeito de Matriz foram investigados para assegurar que a precisão, a seletividade e a sensibilidade não fossem comprometidas. A recuperação foi determinada por comparação das áreas dos pico do LIQ e do Limite superior de quantificação (LSQ) processados em plasma (item 2.4) com os obtidos

em amostras onde houve a substituição do plasma por acetonitrila. As medições foram realizadas em triplicata.

O efeito de matriz refere-se à alteração ou interferência direta ou indireta, da presença de analitos Indesejáveis (para análise) ou outras substâncias que interfiram na amostra (EMEA 2011, FDA, 2001). Neste trabalho, o efeito de matriz foi avaliado por amostras de plasma processadas com adição subsequente de LASSBio-1736 e de PI, obtendo LIQ e LSQ. As amostras de plasma avaliadas foram: plasma normal (n = 3), plasma lipêmico (n = 4) e hemolisados (n = 4). Os resultados foram comparados com os obtidos a partir de amostras em solução com mesma concentração através do Fator de Matriz Normalizada (NMF), de acordo com a fórmula abaixo (Brasil 2012):

$$NMF = \frac{\text{Área do Analito na Matriz} / \text{Área do PI na Matriz}}{\text{Área media do Analito em solução} / \text{Área media do PI em solução}}$$

Coeficiente com variação inferior a 15% foram aceitos como critérios de avaliação.

### 2.5.5 Estudos de Estabilidade

A estabilidade de LASSBio-1736 em plasma de ratos foi analisada de cinco formas diferentes para simular as possíveis condições utilizadas durante os testes, sendo elas: estabilidade em plasma durante 6h (Estabilidade de bancada) à temperatura ambiente ( $22 \pm 3$  °C), pós-processamento após 24h à temperatura ambiente ( $22 \pm 3$  °C), após três ciclos de congelamento-descongelamento a  $-80 \pm 2$  °C), após o armazenamento a  $-20$  °C e  $-80$  °C (60 dias). As amostras Controle de qualidade baixo (CQM) (0.5µg/mL) e controle de qualidade alto (CQA) (3 µg/mL) foram processados como descrito acima. Todas as amostras foram analisadas em triplicata. As amostras foram consideradas estáveis se os resultados estivessem dentro dos limites aceitáveis de precisão ( $\pm 15\%$  da concentração nominal) e precisão ( $\pm 15\%$  DPR).

### 2.5.6 Efeito Residual

A detecção do efeito residual foram feitas através de três injeções da mesma amostra branca, uma antes e duas imediatamente após a injeção da amostra com concentração de 4 µg/mL (LSQ). De acordo com as orientações, o resíduo na amostra de plasma branca após a injeção do LSQ não deve ser superior a 20% do LIQ e 5% para o PI.

### 2.5.7 Aplicabilidade do Método

O protocolo deste estudo em animais foi aprovado pelo Comitê de Ética de Uso de Animais da Universidade Federal do Pampa (Número 23/2013). Os estudos farmacocinéticos foram realizados em três ratos Wistar machos (250-350 g). Os animais foram adquiridos a partir do Laboratório Central de Reprodução e Experimentação Animal da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM-RS). Os animais foram mantidos em condições controladas com ciclos diários de 12h de luz e 12h de escuridão, em sala climatizada com temperatura de  $22 \pm 1$  °C, umidade relativa de aproximadamente 65% e água/comida *ad libitum*, no Biotério do Laboratório de Farmacologia da Universidade Federal do Pampa. Foram seguidas todas as leis brasileiras que regulamentam a pesquisa com animais (BRASIL, 2008) e a diretriz brasileira de cuidado e uso de animais em experimentação (BRAZIL, 2013).

Uma dose de 3,2 mg/kg de solução de LASSBio-1736 foi administrada por via intravenosa através da veia lateral da cauda após a sua dissolução em 60% de polietilenoglicol 400, 20% de dimetilsulfóxido e água destilada. As amostras de sangue foram recolhidas em tubos heparinizados a partir da veia lateral direita da cauda em diferentes pontos de tempo (0,08, 0,25, 0,5, 1, 1,5, 2, 3, 4, 6, 12, 24, 36, 48, 60 e 72h). Depois, as amostras foram centrifugadas a 12000 rpm, 4 °C durante 10 minutos para separar o plasma, que foi congelado a -80 °C até à sua análise por CLAE-DAD.

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1 Desenvolvimento do método analítico

O desenvolvimento do método cromatográfico para separação em fase reversa do LASSBio 1736 foi realizado e otimizado para o analito em solução (solvente acetonitrila) e posteriormente, os testes em plasma.

A análise da qualidade da separação cromatográfica levou em consideração aspectos visuais do cromatograma, bem como quantitativos. Nestes, o FDA 2001, em seu guia "Guidance for Industry. Bioanalytical Method Validation" preconiza que uma boa separação cromatográfica deve considerar os pratos teóricos ( $>2000$ ), fator de capacidade ( $K>2$ ), *tailing* (cauda $<2$ ) e resolução ( $R_s>2$ ). Além dos parâmetros citados, a área do pico do cromatograma também foi considerada, assim como o tempo de retenção.

Para o desenvolvimento do método analítico testes avaliando a influência de fatores como o percentual de acetonitrila na fase móvel, a adição de metanol, pH, o efeito da adição de trietilamina foram conduzidos.

Os fármacos candidatos a padrão interno foram escolhidos de acordo com a disponibilidade, pelo seu perfil de absorção da região do ultravioleta e pela possibilidade de eluir em condições cromatográficas próximas as já estabelecidas para o LASSBio 1736.

As moléculas testadas foram primidona, losartan e diclofenaco de sódio. Nos testes em solução, o Diclofenaco apresentou boa absorção e eluição adequada nas mesmas condições testadas para o composto LASSBio-1736.

#### 3.2 Seletividade

A seletividade é a capacidade de um método analítico de diferenciar e quantificar o analito na presença de outros componentes da amostra. A seletividade do método foi avaliada por análise da interferência de picos de compostos endógenos nos mesmos tempos de retenção de LASSBio-1736 e PI. Amostras de LASSBio-1736 nas concentrações de LIQ (0,2 µg/ml), CQB (0,5 µg/mL), Controle de qualidade médio (CQM) (0,9 µg/mL) e CQA (3 µg/mL) foram analisadas para



verificar a seletividade do método de análise, onde as matrizes utilizadas foram amostras de plasma normal de diferentes ratos, bem como plasma hemolisado e lipêmico. Ambos os picos, do candidato a fármaco e PI, não foram interferidos por quaisquer componentes endógenos. Não foram observados picos adicionais nas amostras de ratos após a administração intravenosa de LASSBio-1736. Os cromatogramas de amostras em branco, LIQ e amostras de plasma de rato obtidas após a administração do composto estão apresentados na Figura 1, respectivamente.

Figura 2- Cromatogramas de (A) amostra em branco, (B) LIQ (0,2 µg/mL) e (c) amostra de plasma de rato (0,99 µg/mL) 24 horas depois da administração iv de LASSBio-1736 (3,2 mg/kg).

### 3.3 Linearidade e sensibilidade

A linearidade foi determinada a partir da curva de calibração padrão construída. A curva de calibração foi obtida plotando as razões das áreas de picos cromatográficos (LASSBio-1736/diclofenaco sódico) em função da concentração de LASSBio-1736 ( $1/y^2$ ,  $y = \text{LASSBio-1736} / \text{razão da área do PI}$ ) (Fig. 2). A equação de regressão linear foi  $y = 0,4564x - 0,0471$ , onde  $x$  é a concentração e  $y$  é a relação entre a área do pico do LASSBio-1736 e do PI.

Figura 1- curva de calibração padrão de LASSBio-1736 no intervalo de 0,2 à 4 µg/mL

As curvas de calibração padrão foram lineares nos intervalos de concentração de 0,2-4,0 µg/mL, utilizando fator 1 e um coeficiente de determinação inferior a 0,99 na matriz de plasma de rato. Todos os valores calculados individualmente para os padrões de calibração estavam dentro de 15% do valor determinado, exceto o LIQ, que estava dentro de 20%. Este método apresenta uma linearidade ampla, de modo que fornece flexibilidade para as análises de LASSBio-1736 após a administração de diferentes doses e para diferentes espécies. Os resultados da regressão e estatísticas a partir das curvas padrão de calibração em dois dias sucessivos são mostrados na Tabela 1.

Tabela 1- Parâmetros da curva de Calibração e Estatísticas para LASSBio-1736 em Plasma de ratos.

### 3.4 Exatidão e precisão

Os valores de desvio padrão relativos dos ensaios de precisão intra e inter-dia para LASSBio-1736 são mostrados na Tabela 2. As variações de precisão intra e inter-dia para as amostras de QC demonstraram-se menores que 8% para todas as concentrações. A maior variação de precisão encontrada foi de 101,8-115,6 para LIQ, porém encontrava-se dentro dos limites aceitos. Os CQ também demonstraram que a precisão preenche os critérios internacionalmente propostos.

CQD também foram avaliados e o DPR foi inferior a 8% em todas as análises, demonstrando que a diluição das amostras não deve afetar a exatidão e a precisão. Os resultados obtidos sugerem que as amostras cujas concentrações foram maiores do que o limite superior da curva de calibração pode ser avaliada através de diluição adequada (EMEA 2011).

Para precisão, os limites aceitáveis são DPR  $\pm 20\%$  para a LIQ e  $\pm 15\%$  para as outras concentrações. A precisão deve variar de 80-120% ou 85-115% para LIQ e para os CQ, respectivamente (Brasil 2012, EMEA 2011, FDA 2001), portanto, o método é considerado exato, preciso e reprodutível para quantificação de LASSBio-1736 em amostras biológicas

Tabela 2- Variação Intra e Inter-dia de LASSBio-1736 em Plasma de ratos

### 3.5 Recuperação e Efeito de Matriz

A recuperação obtida (eficácia de extração) foi de cerca de 88%, para todos CQ, demonstrando uma boa recuperação do analito e uma resposta independente da concentração. A recuperação do analito não precisa ser de 100%, mas a extensão da recuperação de LASSBio-1736 e do PI deve ser consistente, precisa e reprodutível, o que pode ser observado. O DPR% foi inferior a 15% para os CQ. Para o PI, a recuperação foi próxima a 100% e com baixa variabilidade.

A avaliação do efeito da matriz é uma maneira de assegurar que os componentes endógenos, mediante ligação não específica, não alteram a detecção

da substância a ser analisada em matrizes que podem, potencialmente, ser utilizadas durante os estudos. A coleta de sangue em estudos farmacocinéticos usando roedores pode resultar em hemólise da amostra, por isso a importância da avaliação dessa matriz. A recuperação média (CQB) foi de 104,4, 108 e 94,2% para o plasma normal, hemolisado e lipêmico, respectivamente. Os resultados foram semelhantes para o CQA. A recuperação do PI variou de 90,8-100%, dependendo da matriz avaliada. Os efeitos de matriz relativos foram inferiores a 12% para os CQ em todas as matrizes analisadas, demonstrando pouco ou nenhum efeito de matriz.

Tabela 3- Recuperação e efeitos de matriz relativos de LASSBio-1736 e PI em Plasma de ratos

### 3.6 Estudos de Estabilidade

A estabilidade do LASSBio-1736 em plasma de roedores foi avaliada por exposição das amostras de CQ a condições diferentes de armazenagem (Tabela 4). Após as análises de três amostras de cada concentração, a substância mostrou-se estável em todas as condições, com intervalo de precisão de 89,82 à 106,68 e DPR inferiores a 10,66. Estes resultados demonstram a estabilidade do LASSBio-1736 e PI em condições necessárias para estudo farmacocinético pré-clínicos em ratos.

Tabela 4- Resultados da estabilidade de LASSBio-1736 em Plasma de ratos.

Não foi observado efeito de transição na avaliação dos cromatogramas resultantes da injeção de plasma branco sucedidos por injeções de concentração mais elevada da curva padrão (4 µg / mL).

### 3.7 Aplicabilidade do Método

Para demonstrar a confiabilidade deste método para o estudo de LASSBio-1736 em plasma de ratos, este ensaio foi clinicamente aplicado para determinar as concentrações deste candidato à fármaco no plasma de três ratos Wistar saudáveis (3,2 mg/kg dose iv). Um cromatograma representativo de uma amostra de plasma

extraído de um rato é mostrada na Figura 1C e é possível ver que não há picos endógenos ou metabólicos interferentes.

O perfil da concentração plasmática média versus tempo de LASSBio-1736 é mostrado na figura 3. A meia-vida ( $t_{1/2}$ ) estimada foi de  $21,72 \pm 2,25$  horas, a depuração (Cl) foi  $42,96 \pm 3,61$  mL.h.kg<sup>-1</sup> e o volume de distribuição (Vd) foi de  $1,0 \pm 0,2$  L/Kg. A área sob a curva de 0 ao infinito ( $ASC_{0-\infty}$ ) calculada pela regra trapezoidal foi de  $74,84 \pm 6,53$  µg.h/mL. Os resultados mostram que o LIQ do método desenvolvido foi suficientemente baixo para permitir que a fase de eliminação do medicamento possa ser bem caracterizada, com o tempo de amostragem de aproximadamente 3 meias-vidas o que conduzem a uma ASC extrapolada em torno de  $12,8 \pm 5,8\%$ . Os resultados indicam que o método analítico é adequado para determinar as concentrações no plasma do composto em estudos pré-clínicos.

Figura 2- Perfil plasmático de concentração média versus tempo de LASSBio-1736 após uma única dose intravenosa de 3,2 mg/kg em ratos Wistar machos. Os pontos representam as médias  $\pm$  desvio padrão de três animais.

#### 4 CONCLUSÃO

Um método bioanalítico para quantificação LASSBio-1736 foi desenvolvido e validado seguindo os parâmetros: seletividade, linearidade, precisão, exatidão, limite de detecção, baixo limite de quantificação, recuperação, efeito de matriz e avaliação de efeito residual. Todos os procedimentos foram realizados de acordo com as normas nacionais e internacionais. Então, os resultados indicam que o método de análise é adequado para quantificar o candidato a fármaco leishmanicida nas concentrações plasmáticas de rato proporcionando meios para as investigações farmacocinéticas pré-clínicas.

## REFERÊNCIAS

BRAZIL. **Lei 11794/08. Procedimentos para Uso Científico de Animais.** DIÁRIO OFICIAL DA UNIÃO, S. D. D. O. D. C. Brasília, Brazil: Brazil. Diário Oficial da União, Seção 1 de 9 de outubro de 2008; CXLV (196): 1:2. 2008.

\_\_\_\_\_. **Dispõe sobre os requisitos mínimos para a validação de métodos bioanalíticos empregados em estudos com fins de registro e pós-registro de medicamentos.** Resolução RDC no. 27, de 17 de maio de 2012. ANVISA, B. Brasília: Diário Oficial da Uniao. Resolução RDC no. 27, de 17 de maio de 2012 2012.

\_\_\_\_\_. **Diretriz Brasileira para o cuidado e a utilização de animais para fins científicos e didáticos.** MINISTÉRIO DA CIÊNCIA, T. E. I. C. N. D. C. D. E. A. C. Brasília: MCTI, Brazil 2013.

EMEA. **Guideline on Bioanalytical Method Validation** EUROPEAN MEDICINES AGENCY, E. London: European Medicines Agency. EMEA/CHMP/EWP/192217/2009 2011.

FDA. **Guidance for industry: Bioanalytical method validation.** ADMINISTRATION, F. A. D. Rockville, US: FDA, US 2001.

KHOJASTEH, S. C., WONG, HARVEY, HOP, CORNELIS E.C.A. **Drug Metabolism and Pharmacokinetics Quick Guide.** 1. edition. New York: Springer-Verlag New York, 2011. 228 ISBN 978-1441956286.

MOREIRA LIMA, L. Q., A. C. ; ALVES, MA ; MOREIRA, MAGNA ALEXANDRE SUZANA ; BARREIRO, ELIEZER ; GONZÁLEZ, M ; CERECETTO, HUGO. **Compostos hidrazida-N-acilidrazonas, processo de obtenção de compostos hidrazida-N-acilidrazonas, uso de compostos intermediários para a obtenção de hidrazida-N-acilidrazonas para tratamento de leishmaniose e doença de chagas é composições farmacêuticas obtidas.** UFRJ. Brazil. WO2014019044 A1. 2013 2013.

Pragst, F. Herzler, M. Erxleben, B.T. **Systematic toxicological analysis by high-performance liquid chromatography with diode array detection (HPLC–DAD),** Clin. Chem. Lab. Med. 42, 1325–1340, 2004.

SNYDER, L. R. K., J.J.; DOLAN, J.W. . **Introduction to Modern Liquid Chromatography.** 3. edition. Wiley, 2009. 960 ISBN 9780470508183.



## 1 INTRODUÇÃO

Para se obter uma eficácia terapêutica ótima, os medicamentos ou candidatos a fármacos devem apresentar elevada potência e seletividade para interagir um alvo biológico específico, bem como a capacidade de atingir concentrações em tecido alvo com níveis necessários para produzir efeito (TASSO, 2005). A farmacocinética de um fármaco determina a sua disponibilidade no local de ação. Neste sentido, a caracterização da absorção, distribuição, metabolismo e excreção de uma nova entidade química são cruciais na descoberta e desenvolvimento de fármacos (PANCHAGNULA; THOMAS, 2000). Neste contexto, este capítulo aborda a farmacocinética do plasma, a distribuição nos tecidos e a ligação às proteínas plasmáticas de LASSBio-1736 após a administração em ratos por diferentes vias.

## 2 MATERIAIS E METODOS

### 2.1 Reagentes químicos

LASSBio-1736 foi sintetizado no Laboratório de Avaliação e Síntese de Substancias Bioativas (LASSBio), do Departamento de Química da Universidade Federal de Minas Gerais (Brasil), como descrito anteriormente (MOREIRA LIMA, 2013). O Diclofenaco sódico foi comprado de Delaware (Porto Alegre, Brasil). Metanol e acetonitrila de grau HPLC foram adquiridos a partir de Tedia<sup>®</sup> (Fairfield, EUA). A água ultrapura foi obtida pelo sistema Milli-Q (Millipore<sup>®</sup>). Todos os outros produtos utilizado eram de grau analítico ou HPLC.

### 2.2 Animais

Ratos Wistar machos (7-8 semanas de idade) foram adquiridos a partir do Laboratório Central de Reprodução e Experimentação Animal da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM-RS). Os animais foram colocados em quarentena no Biotério Biopampa por um período de 7 dias, com um ciclo 12h escuro/ luz e durante este período eles tiveram livre acesso à ração padrão e água *ad libitum*. Para todo o

trabalho experimental oral, os animais foram mantidos por 12 horas em jejum (overnight) e durante este tempo com água *ad libitum*. A alimentação foi fornecida 4h após a administração da dose e a água foi permitida *ad libitum*. Todos os experimentos com animais foram aprovados pelo Comitê de Ética animal Institucional da Universidade Federal do Pampa (n. 23/2013) e estavam em conformidade com a legislação brasileira que regulamenta a pesquisa com animais (Brasil, 2008) e da diretriz brasileira de cuidado e uso de animais de laboratório (Brasil, 2013)

### **2.3 Preparação da formulação e administração**

Foi preparado uma solução de LASSBio-1736 utilizando 60% de Polietilenoglicol (PEG) 400, 20% de dimetilsulfóxido e 20% de água destilada. A concentração final foi de 1,5 mg/mL. A solução foi preparada no mesmo dia do experimento. Para as administrações intravenosa, intraperitoneal e intragástrica, os volumes máximos de administração foram respeitados (DIEHL et al., 2001).

### **2.4 Ensaios farmacocinéticos**

Os animais não foram anestesiados durante os experimentos. A solução de LASSBio-1736 foi administrada por via intravenosa através da veia lateral da cauda (3,2 mg/kg), a dosagem oral foi administrada por gavagem (12,6 mg/kg) e a dose intraperitoneal com agulha 1,20 x 40 mm (12,6 mg/kg) (n = 8/grupo). As doses avaliadas foram baseadas em experimentos realizados anteriormente com ratos infectados por *L. major* (MOREIRA LIMA, 2013).

Após a administração intravenosa, amostras de sangue foram coletadas a 0,08, 0,25, 0,50, 1, 1,5, 2, 3, 4, 6, 12, 24, 36, 48, 60 e 72h. Os mesmos tempos foram utilizados para os experimentos intraperitoneal e oral, exceto a coleta em 0,08 h. Aproximadamente 0,2 mL de sangue foram coletados por punção da veia da cauda, em cada tempo e imediatamente colocadas em tubos heparinizados. O plasma foi então colhido após centrifugação a 12000 rpm à 4 °C durante 10 minutos e foi separado e armazenado a -80 °C até análise posterior.



## 2.5 Análises por Cromatografia líquida de alta eficiência

O método analítico foi desenvolvido e validado utilizando CLAE-DAD. Este método foi usado para quantificar LASSBio-1736 e as concentrações foram avaliadas até 72 horas após a sua administração. A linearidade, precisão e exatidão foram obtidas no intervalo de 0,2 à 4,0 µg/mL. A fase de eliminação terminal do perfil plasmático foi adequadamente caracterizado resultando em  $ASC_{0-\infty}/ASC_{0-72h} < 2$  para todas as vias avaliadas.

Resumidamente, a separação cromatográfica foi realizada em coluna Waters Spherisorb<sup>®</sup>S5 ODS2 C18 (150 mm x 4,6 mm, 5 µm) usando uma fase móvel isocrática constituída por trietilamina a 0,3% (pH 4), metanol e acetonitrila grau HPLC (45: 15:40, v / v / v) a um de fluxo de 1 mL/min. Extração líquido-líquido com acetonitrila foi utilizada para extrair LASSBio-1736 e o diclofenaco de sódio (PI) a partir de 100 µL de plasma anteriormente alcalinizado com NaOH 0,1mol/L.

## 2.6 Modelagem farmacocinética

Perfis individuais de plasma foram avaliados por abordagem não compartimental usando equações clássicas (SHARGEL, 2005) com o auxílio do programa de computador Excel<sup>®</sup> 2003 (Microsoft<sup>®</sup>). A constante de velocidade de eliminação ( $k_e$ ), a área sob a curva do tempo zero ao infinito ( $ASC_0^\infty$ ), a meia-vida de eliminação ( $t_{1/2}$ ), o tempo de residência médio (MRT), o volume de distribuição em estado estável ( $V_{dss}$ ), a depuração plasmática total ( $Cl_{tot}$ ) e a biodisponibilidade ( $F_{abs}$ ) foram calculados. O tempo para atingir o pico ( $t_{max}$ ) e a concentração máxima ( $C_{max}$ ) foram obtidos por inspeção direta do gráfico.

A análise farmacocinética compartimental dos perfis individuais de plasma foi realizada utilizando o software Scientist<sup>®</sup> 2.0 (MicroMath<sup>®</sup>). A modelagem inicial foi realizada sobre a média de dados de LASSBio-1736 nos modelos de um, dois e três compartimentos, uma série de modelos de absorção foram testados, incluindo absorção de uma e duas fases em *bólus*, avaliação de zero e de primeira ordem com e sem tempo inicial (lag time). Para a avaliação do modelo das médias observadas versus os valores individuais previstos foram utilizados Critérios de Seleção do modelo (MSC) e coeficiente de correlação para avaliar a decisão do

melhor modelo de ajuste. Os parâmetros de MSC utilizado foi o maior resultado obtido.

Para o modelo aberto de um compartimento com absorção e eliminação de primeira ordem (Equação 1), os parâmetros determinados foram Vd (volume de distribuição), ka (constante de velocidade de absorção) e ke (constante da taxa de eliminação). A biodisponibilidade ( $F_{abs}$ ) usada foi determinada a partir da análise não compartimental. O Modelo de três compartimentos após a administração de LASSBio-1736 i.v. foi o melhor modelo ajustado e os parâmetros foram determinados: A, B e C, como as interseções das fases de distribuição e eliminação, respectivamente,  $\alpha$  e  $\beta$  como as taxas de distribuição e  $\gamma$  como a taxa de eliminação constante, respectivamente.

$$Cp = \frac{F_{abs} \cdot D \cdot ka}{Vd(ka - ke)} \cdot (e^{-ke \cdot t} - e^{-ka \cdot t}) \quad \text{Equação 1}$$

$$Cp = A \cdot e^{-\alpha \cdot t} + B \cdot e^{-\beta \cdot t} + C \cdot e^{-\gamma \cdot t} \quad \text{Equação 2}$$

## 2.7 Ligação as proteínas plasmáticas

A ligação as proteínas plasmáticas de rato de LASSBio-1736 foi determinada pela técnica de ultrafiltração. Alíquotas de 100  $\mu$ L de soluções LASSBio-1736 em diferentes concentrações foram adicionados a alíquotas de 900  $\mu$ L de plasma de rato para obtenção das concentrações finais entre 0,5, 1, 5 e 50  $\mu$ g/mL. Após homogeneização sofreu agitação durante 30 segundos em vórtex, 100  $\mu$ L destas amostras foram utilizadas para determinar a concentração total da substância. As amostras foram processadas tal como descrito na seção 2.5, e analisados por CLAE-DAD.

Para determinar a concentração de LASSBio-1736 ligados e não ligado as proteínas, o volume remanescente (900  $\mu$ L) foi adicionado a Centrifree (Millipore<sup>®</sup>) em tubos de filtração e centrifugados a 12000 rpm durante 20 min, a 21 °C. Em seguida, alíquotas de 100  $\mu$ L do ultrafiltrado foram processadas (item 2.5). O experimento foi realizado em triplicata.

O LASSBio-1736 não ligado as proteínas ( $f_u$ ) foi calculada a partir da concentração de proteína não ligada ( $C_u$ ) determinada no ultrafiltrado e concentração plasmática total ( $C_{p_{tot}}$ ), usando a Equação 3.

$$f_u = \frac{C_u}{C_T} \quad \text{Equação 3}$$

A afinidade de LASSBio-1736 com a membrana de filtração foi investigada por meio de ultrafiltração das soluções aquosas da substância nas mesmas concentrações acima preparados. Da mesma forma, a concentração total de LASSBio-1736 ( $C_T$ ) e a concentração no ultrafiltrado ( $C_U$ ) foram determinadas. Assim, a fração aderente à membrana de filtração ( $f_A$ ) foi determinada conforme a Equação 4.

$$f_A = 1 - \frac{C'_U}{C'_T} \quad \text{Equação 4}$$

A fração aderente de LASSBio-1736 à membrana foi usada para corrigir os resultados, adicionando o valor obtido para a determinação da fração livre.

## 2.8 Distribuição tecidual

Estudos de distribuição tecidual foram realizados em ratos Wistar machos (250 - 300g), utilizando três animais por tempo de amostragem após administração da dose de 3,2 mg/Kg i.v. de solução LASSBio-1736. As amostras de cérebro, rim, baço, fígado, pulmão, coração, pele e tecido adiposo foram recolhidas nos tempos pré-determinados (0,5, 1, 2, 4, 8, 24 e 72h) após a administração da droga. Os órgãos/tecidos foram cuidadosamente limpos com papel absorvente para remover o sangue superficial e armazenados a  $-80 \pm 4$  °C. O sangue também foi recolhido por punção cardíaca e o plasma foi separado e armazenado na mesma forma como descrito acima.

No dia da análise, as amostras de tecido foram descongeladas, pesadas com precisão e adicionado 2 mL de acetonitrila/1,0 g de tecido e homogeneizadas por sonicação por 1 min utilizando aparelho PowerGen<sup>®</sup>125. Os homogeneizados de

tecido foram centrifugados a 12000 rpm durante 15 min a  $4 \pm 1$  °C e processado sequencialmente de modo semelhante como as amostras de plasma e analisadas por CLAE-DAD. A quantidade de LASSBio-1736 nas amostras de tecido foi expressa em termos de ug/g de tecido, e calculadas de acordo com a Equação 5 (KAISER et al., 2010):

$$C_t = \frac{C_s V_s}{W} \quad \text{Equação 5}$$

onde  $C_t$  representa a concentração de tecido ( $\mu\text{g/g}$ );  $C_s$  a concentração do sobrenadante,  $V_s$  o volume do sobrenadante e  $W$  o peso da amostra de tecido.

Os parâmetros farmacocinéticos foram determinados a partir da média de concentração tecidual por perfil de tempo entre utilizando equações não compartimentais (SHARGEL, 2005).

## 2.9 Análises estatísticas

Diferenças estatisticamente significativas em parâmetros farmacocinéticos entre os grupos tratados foram analisados por ANOVA e logo após por Tukey utilizando o Software SigmaStat<sup>®</sup> 3.5 (Systat<sup>®</sup> Software, Inc., Alemanha) e a significância estatística foi definida por  $p < 0,05$ .

## 3 RESULTADOS

### 3.1 Perfil farmacocinético de LASSBio-1736 em plasma

A concentração plasmática média versus tempo, obtida após administração intravenosa de LASSBio-1736 (3,2 mg / kg) a ratos Wistar, é mostrado na Figura 1A.

Figura 3 - Perfis de concentração plasmática-tempo médio após a administração de LASSBio-1736: (A) 3,2 mg / kg por via intravenosa (n=6), (B) 12,6 mg / kg por via oral (n=8) e (C) de 12,6 mg / kg via intraperitoneal (n=8) (média  $\pm$  DP).

A discriminação do modelo foi avaliada pela análise individual dos perfis plasmáticos e a maioria dos perfis foram melhor ajustados ao modelo de três compartimentos, resultando em um MSC de  $2,7 \pm 1,3$  e coeficiente de correlação de  $0,9463 \pm 0,056$ .

Os parâmetros farmacocinéticos médios estimados por abordagem não-compartimental e compartimental após administração de dosagem iv encontram-se resumidos na Tabela 1. Os parâmetros farmacocinéticos estimados por análise compartimental não foram estatisticamente diferentes ( $\alpha$  0,05) daqueles determinados por análise de modelo não compartimental, o que confirma a adequação do modelo de três compartimentos, para descrever os dados experimentais.

Tabela 1- Parâmetros farmacocinéticos após administração intravenosa de LASSBio-1736 em ratos Wistar.

\*A = intercepto da 1° fase de distribuição rápida; B = intercepto da 2° fase de distribuição; C= intercepto da fase de eliminação;  $\alpha$  = 1° constante de distribuição;  $\beta$  = 2° constante de distribuição;  $\gamma$  = Constante de eliminação;  $ASC_0^\infty$  = Área sob a curva da concentração plasmática versus o tempo do tempo zero ao infinito;  $CL_{tot}$ = Clearance total;  $V_\beta$ = volume do distribuição durante a fase de eliminação;  $V_{dss}$  = Volume de distribuição no estado estacionário;  $t_{1/2 \gamma}$  = tempo de meia vida de eliminação; MRT = tempo de residência médio; médio. Análise estatística realizada por Teste-t Student's ( $\alpha$  = 0.05). Valores representam média  $\pm$  DP. (n = 6).

O perfil de concentração plasmática média em função do perfil de tempo de LASSBio-1736 após administração oral da dose de 12,6 mg/kg, é mostrada na Figura 1B. Os parâmetros de ajuste determinados mostraram uma boa concordância entre os dados experimentais e o modelo de um compartimento resultando em MSC de  $1,67 \pm 1,12$  e um coeficiente de correlação de  $0,9030 \pm 0,1030$ . Após a administração oral um pico das concentrações plasmáticas foi observado com  $C_{max}$   $1,08 \pm 0,47$   $\mu\text{g/mL}$  em  $5,6 \pm 3,72$  h e a  $F_{abs}$  foi de aproximadamente 0,12 conforme tabela. Os parâmetros determinados por análise compartimental não foram estatisticamente diferentes ( $\alpha$  <0,05) daqueles determinados por análise não compartimental. Os parâmetros farmacocinéticos calculados para LASSBio-1736 após a administração oral, são apresentados na Tabela 2.

Tabela 2- Parâmetros farmacocinéticos determinados após a administração oral de LASSBio-1736 em ratos Wistar.

\*Ke = Constante de eliminação; Ka= Constante de absorção,  $ASC_0^\infty$ = Área sob a curva da concentração plasmática versus o tempo do tempo zero ao infinito;  $CL_{tot}$ = Clearance total; Vd= volume do distribuição;  $C_{max}$  = concentração máxima obtida;  $t_{max}$ = Tempo no qual a concentração máxima foi detectada;  $t_{1/2\gamma}$  = tempo de meia vida de eliminação; MRT = tempo de residência médio;  $F_{abs}$ = Fração absorvida; médio. Análise estatística realizada por Teste-t Student's ( $\alpha = 0.05$ ). Valores representam média  $\pm$  DP. (n = 8).

Após a administração intraperitoneal, o perfil de concentração plasmática de LASSBio-1736 versus tempo obtido foi mostrado na Figura 1C. Estes dados experimentais foram ajustados a um modelo de um compartimento, com valores de MSC de  $1,65 \pm 0,577$  e coeficientes de correlação de  $0,944 \pm 0,019$  para doses de 12,6 mg/kg. Os parâmetros farmacocinéticos calculados para LASSBio-1736 após a administração intraperitoneal estão apresentados na Tabela 3.

Tabela 3- Parâmetros farmacocinéticos determinado após administração intraperitoneal de LASSBio-1736 em ratos Wistar

\*Ke = Constante de eliminação; Ka= Constante de absorção,  $ASC_0^\infty$ = Área sob a curva da concentração plasmática versus o tempo do tempo zero ao infinito;  $CL_{tot}$ = Clearance total; Vd= volume do distribuição;  $C_{max}$  = concentração máxima obtida;  $t_{max}$ = Tempo no qual a concentração máxima foi detectada;  $t_{1/2\gamma}$  = tempo de meia vida de eliminação; MRT = tempo de residência médio;  $F_{abs}$ = Fração absorvida; médio. Análise estatística realizada por Teste-t Student's ( $\alpha = 0.05$ ). Valores representam média  $\pm$  DP. (n = 8).

### 3.2 Distribuição tecidual e ligação as proteínas plasmáticas de LASSBio-1736

A ligação de LASSBio-1736 às proteínas plasmáticas de ratos foi determinada na faixa de 0,5 - 50  $\mu\text{g/mL}$ , que abrange a faixa de concentrações obtidas no estudo de farmacocinética plasmática. A ligação à membrana de ultrafiltração de LASSBio-1736 foi de 27 %, independente de sua concentração e este valor foi utilizado para correção dos valores finais. Os resultados indicaram que a ligação foram adequados em torno de  $95,00 \pm 2,00\%$ , e a ligação ao plasma é linear no intervalo de concentração de 0,5 -50 ng/mL.

A concentração de LASSBio-1736 em vários tecidos de ratos em 0,5, 1, 2, 4, 8, 24 e 72h após a administração intravenosa de 3,2 mg/kg são apresentados na

Fig. 2. Os dados foram avaliados pelo método não compartimental e os parâmetros farmacocinéticos médios determinados são apresentados na Tabela 4.

Os resultados indicam que LASSBio-1736 foi amplamente distribuído e que a concentração foi relativamente elevada. Aos 30 min após a administração em ratos machos, tanto os extratos a partir de tecido de pulmão quanto de fígado continham grande quantidade de LASSBio-1736 (10,6 µg/g de fígado e de 9,6 µg/g de pulmão), enquanto que os extratos de tecido do baço, rim, coração, pele e tecido adiposo continham quantidades moderadas (4,1 - 1,16 µg/g). Em contraste, apenas vestígios de LASSBio-1736 foram encontrados no cérebro (0,67 µg/g). Após 72 horas da administração intravenosa, o conteúdo do candidato a fármaco foi substancialmente reduzido em todos os tecidos (Fig. 2), exceto para a gordura. Neste tecido, o  $t_{max}$  foi de 2h, em comparação com os todos os órgãos em que o pico foi atingido até 1 hora.

Figura 4- Perfis de distribuição tecidual de LASSBio-1736 após a administração intravenosa de 3,2 mg/kg em ratos machos.

O  $t_{1/2}$  foi semelhante ao plasma em todos os tecidos. O  $t_{1/2}$  mais longo foi observado na pele (36h) e rim (33h). O menor  $t_{1/2}$  foi determinado para o fígado (19h), seguido pelo coração (21h) e cérebro (22h). A relação tecidos - plasma ( $F_t$ ) de LASSBio-1736 em diferentes pontos de tempo após a administração intravenosa encontram-se resumidos na Tabela 4. Os valores  $F_t$  segue a ordem: Fígado ~ Pulmão > Baço > Coração > rim ~ Tecido adiposo > Pele > cérebro.

Tabela 4- Parâmetros farmacocinéticos teciduais de LASSBio-1736 após a administração da dose de 3,2 mg/kg iv.

\*  $F_t$  = fator de penetração, relação tecidos – plasma.

## 4 DISCUSSÃO

Atualmente, a busca por novos compostos com potencial leishmanicida é fundamental, por que as opções disponíveis hoje apresentam problemas de

toxicidade, baixa adesão e o surgimento de parasitas resistentes aos medicamentos. Outro elemento importante é o fato da leishmaniose ter se tornado endêmica em vários lugares, o que indica que a erradicação da doença está longe de acontecer. Com base neste problema, um novo candidato a fármaco leishmanicida, inibidor da cisteína protease oriunda de *Leishmania*, o LASSBio-1736, foi sintetizado e a sua atividade farmacológica tem sido investigada (Moreira Lima, 2013). A fim de contribuir para o desenvolvimento do candidato leishmanicida, a investigação pré-clínica farmacocinética foi realizada em ratos.

#### **4.1 Farmacocinética plasmática de LASSBio-1736**

As Tabelas 1, 2 e 3 mostram os parâmetros farmacocinéticos plasmáticos de LASSBio-1736 após a administração intravenosa, oral e intraperitoneal, respectivamente. Pode ser visto que não houve variabilidade destes parâmetros, o que sugere os perfis são equivalentes.

Perfis de concentração plasmática-tempo obtidos após a administração intravenosa de 3,2 mg/kg de LASSBio-1736 em ratos Wistar foi adequadamente ajustado ao modelo farmacocinético de três compartimentos, o qual demonstra que o composto possui uma primeira fase de distribuição muito rápida, seguido por uma segunda fase de distribuição rápida e lenta eliminação. Além disso, o candidato a fármaco exibiu um volume de distribuição ( $V_{dss}$ ) e uma depuração baixa com uma meia-vida alta.

Considerando-se os parâmetros farmacocinéticos obtidos após a administração intravenosa de LASSBio-1736, algumas observações podem ser realizadas. A depuração sistêmica ( $Cl_{tot}$ ) em torno de 50 mL/Kg\*h, que é cerca de 3% do fluxo sanguíneo hepático em ratos ( $66,4 \pm 27,6$  mL/min/Kg) (DENIS; OSSENBERG; BENHAMOU, 1975) sugerindo que LASSBio-1736 é muito lentamente eliminado por depuração hepática. O volume de distribuição em estado estacionário variou de 1,2-1,8 L/kg, cerca de 2 vezes maior do que a água total do corpo dos ratos (0,668 L/kg) (DENIS et al., 1975), sugerindo que LASSBio-1736 não está limitado aos compartimentos extra vasculares, mas amplamente distribuída em todos os tecidos e fluidos corporais. Este fato é ainda comprovado pela presença de LASSBio-1736 nos tecidos (ver abaixo).



Caldwell e colaboradores (2004) propuseram uma classificação de  $V_{dss}$ ,  $Cl_{tot}$  e  $t_{1/2}$  da seguinte forma: baixo, médio, alto e muito alto, com o objetivo de proporcionar uma simples escala alométrica humano/rato, gerando uma base comparativa que segue dessa forma, o  $CL_{Humano}$  é aproximadamente  $40 CL_{rato}$  (L/h),  $V_{dss_{Humano}}$  é aproximadamente  $200 V_{dss_{rato}}$  (L) e  $t_{1/2_{Humano}}$  é  $4 t_{1/2_{rato}}$  (h). Com base nisso, os possíveis parâmetros a serem observados em seres humanos para LASSBio-1736 é  $Cl_{tot} \sim 0,6$  L/h,  $V_{dss} \sim 70$  L e  $t_{1/2} \sim 100$  h. Em seguida, os parâmetros farmacocinéticos do candidato a fármaco leishmanicida foram classificados como  $t_{1/2}$  muito alto e  $V_{dss}$  e depuração baixa.

A Integração de índices farmacocinéticos e farmacodinâmicos pode ajudar a estabelecer dosagens eficazes, bem como na concepção de novos fármacos e formulações (TUNTLAND, 2014), (LAKSHMINARAYANA, 2014). Os antibióticos, por exemplo, têm sido classificados como concentração-dependente ou eliminação tempo-dependente com base nas abordagens farmacocinética e farmacodinâmica (ROBERTS, 2015). O conhecimento sobre a influência da concentração ou do tempo como fator decisivo para a eficácia de um dado fármaco foi utilizado para permitir a seleção dos regimes de dosagem que com melhor eficácia clínica suprimem o surgimento de organismos resistentes. No entanto, para os medicamentos leishmanicidas, não há índices substituto estabelecido que possa auxiliar no planejamento de novos fármacos.

Quando comparados os parâmetros farmacocinéticos de LASSBio-1736 com outros fármacos leishmanicidas, estes apresentaram semelhanças e diferenças importantes. O  $t_{1/2}$  observado para a anfotericina B em cães ( $23,39 \pm 0,45$ h), antimoniato de N-metilglucamina em ratos (19,2h) em seres humanos ( $20,6 \pm 1,8$ h) está na mesma ordem do  $t_{1/2}$  determinado para LASSBio-1736, no presente estudo ( $24,3 \pm 8,2$  h) e  $Cl_{tot}$  e  $V_{d_{ss}}$  são diferentes para cada fármaco (CRUZ, 2007), (SERRANO, 2013), (BORBOREMA, 2013). Borborema e colaboradores (2013) avaliaram a farmacocinética do antimoniato de N-metilglucamina em ratos (administração intraperitoneal) e pode-se observar que o LASSBio-1736 tem  $V_{d_{ss}}$  e  $Cl_{tot}$  duas vezes menor que o antimoniato (2,41 L/kg e 86,3 mL/h/kg, respectivamente). Apesar do alto  $V_{d_{ss}}$  observado para este fármaco, concentrações baixas são geralmente encontradas no baço, resultando em elevadas taxas de recidivas (CARTER, 1988). Após administração intravenosa de anfotericina B (5 mg/kg) em cães, os valores foram de  $3,25 \pm 0,17$  L/h/kg e 0,06 L/kg para  $Cl_{tot}$  e  $V_{d_{ss}}$ ,

respectivamente, demonstrando que o LASSBio-1736 possui resultados superiores (SERRANO, 2013).

A diferença considerável entre miltefosina, anfotericina B e antimoniais em relação ao LASSBio-1736 também deve-se a sua baixa toxicidade e diferente mecanismo de ação.

LASSBio-1736 também foi administrado por vias extra vasculares. Ambas as vias intraperitoneal e oral, exibiram decaimento mono-exponencial, e foram bem ajustados seguindo modelo aberto de um compartimento com absorção e eliminação de primeira ordem. Não houve diferença significativa entre os parâmetros farmacocinéticos obtidos através da abordagem compartimental e não compartimental, demonstrando a adequação do modelo escolhido, para os parâmetros de  $ASC_0^\infty$  e  $F_{abs}$  pode ser visto uma variabilidade, o que sugere uma variedade intrínseca de LASSBio-1736. Uma variedade de até 30% é comum em estudos farmacocinéticos pré-clínicos (HAN et al., 2007). O transporte através das membranas é fundamental para os processos de ADME, e estes resultados indicam que o transporte de LASSBio-1736 é eventualmente realizada por difusão.

Após a administração oral de 12,6 mg/kg do composto, foi calculada a biodisponibilidade de aproximadamente 13%. Diversos fatores podem influenciar a absorção de medicamentos desta forma como baixa solubilidade, má absorção, efeito de primeira passagem, CYP450 e atividades de Glicoproteína-P (Pg P) (FASINU, 2011). LASSBio-1736 mostrou estabilidade química após 4 horas de incubação em pH médio de 1,2 e 7,4. Além disso, o seu peso molecular e solubilidade aquosa é de 419,19 g/mol e 0.000357 mg/mL, respectivamente (MOREIRA LIMA, 2013). Por isso, era esperado uma baixa biodisponibilidade de LASSBio-1736. Para a via intraperitoneal, a biodisponibilidade foi de 38%. Em ambas as vias, a eficácia foi observada, utilizando camundongos BALB / C infectados com *L. amazonensis*.

A possível utilização de LASSBio-1736 por via oral é uma importante vantagem terapêutica. Pois em primeiro lugar, mais de 60% dos compostos comercializados são produtos orais, pois esta é a via mais favorável e preferida de administração de fármacos, devido à conveniência, possibilidade de auto-administração e melhor aceitação (FASINU, 2011). Segundo, os fármacos atualmente disponíveis para o tratamento da leishmaniose são utilizadas através de

injeção intravenosa ou intramuscular e seus tratamentos têm de 15 a 30 dias de duração, o que pode comprometer a adesão dos pacientes à terapêutica.

#### **4.2 Distribuição tecidual e ligação as proteínas plasmáticas de LASSBio-1736**

Após a avaliação do perfil farmacocinético em plasma de LASSBio-1736, é importante verificar se o candidato a fármaco atinge os tecidos-alvo para leishmaniose. Esta avaliação foi realizada após administração intravenosa porque para esta via não ocorre absorção, o que é uma possível interferência para os resultados e também permite maiores concentrações teciduais, facilitando a etapa analítica. Após a administração sistêmica, LASSBio-1736 foi distribuído em todos os órgãos investigados e a quantificação do composto foi possível em todos os tecidos, até o último ponto de tempo.

O resultado da infecção por *Leishmania sp.* pode variar de uma úlcera crônica de pele, conhecida como leishmaniose cutânea, a hepatoesplenomegalia progressiva e frequentemente fatal, conhecida como leishmaniose visceral (JHA, 2013). Por isso, fígado, baço e pele são os órgãos importantes para o candidato leishmanicida (BORBOREMA, 2013). Níveis mais elevados de LASSBio-1736 foram encontrados no fígado e a elevada taxa de perfusão no sangue, estão relacionadas com a supressão dos parasitas, os quais podem ser associados com os efeitos seletivos antiparasitários (PANCHAGNULA; THOMAS, 2000). No caso de antimoniais, por exemplo, elevadas concentrações foram observadas no fígado, relacionado com a sua eficácia, e as baixas concentrações no baço, provavelmente associadas a casos de recidivas (CARTER et al., 1988). Neste trabalho, níveis moderados foram observados no baço o que, associado a um maior Ft no fígado, pode ser necessário para alcançar a cura, pois os níveis baixos não são suficientes para a supressão do parasita.

A eficácia de LASSBio-1736 em infecções causadas por *Leishmania amazonensis* na pele da orelha de rato foram avaliados em um modelo animal para leishmaniose cutânea. LASSBio-1736 mostrou redução significativa no número de amastigotas na orelha de rato e linfonodos após o tratamento, em comparação com glucantime (30  $\mu$ mol/kg via i.p. por 28 dias para ambos os compostos). Apesar de não terem sido observadas concentrações altas ou moderadas na pele, os

resultados *in vivo* indicaram que o LASSBio-1736 é um composto promissor para leishmaniose cutânea, além da forma visceral (MOREIRA LIMA, 2013).

Sendo o pulmão um órgão com grande fluxo de sangue, espera-se um rápido equilíbrio de distribuição e elevadas concentrações, assim como para o cérebro e rins. Porém o Ft observado foi inferior a 1 e os resultados observados no pulmão podem ser devido a uma acumulação de LASSBio-1736 neste tecido, considerando-se que as moléculas alcalinas e muito lipofílicas tendem a se acumular neste órgão porque elas podem sofrer absorção pelos macrófagos alveolares (TASSO, 2005).

De acordo com a Figura 2, o tecido adiposo leva mais tempo do que outros tecidos para atingir o pico de concentração. Isto pode estar relacionado com o fluxo de sangue limitado na gordura o que leva a um atraso de distribuição de LASSBio-1736 em relação a outros tecidos com distribuição rápida, apesar da sua elevada lipofilicidade (solubilidade aquosa = 0.000357mg/mL).

O menor Ft e Cmax foram observadas no cérebro, sendo que LASSBio-1736 mostrou a menor penetração neste tecido com apenas 7%. A barreira cérebro-sangue representa um obstáculo para a penetração de compostos no cérebro, o que limita a penetração de LASSBio-1736 neste tecido. Mas é possível também que LASSBio-1736 possa ser substrato dos transportadores. Sabe-se que o sítio de ligação de adenosina-trifosfato (ABC), transportador de glicoproteína-P (Pgp), protege o cérebro da acumulação de compostos lipofílicos por transporte ativo através da barreira cérebro- sangue (BAUER, 2005). No entanto, outras investigações são necessárias para confirmar essa hipótese. De fato, a penetração do candidato a fármaco neste órgão não é desejado, uma vez que não é a sua biofase, e também evita a possível neurotoxicidade. Nenhum possível efeito neurotóxico foi observado nos estudos realizados em animais.

## 5 CONCLUSÃO

A farmacocinética pré-clínica é essencial para o desenvolvimento de medicamentos. LASSBio-1736 apresentou um grande volume de distribuição e tempo de meia-vida, baixa depuração sistêmica, penetração adequada no fígado, baço e pele. Com base nas características farmacocinéticas de outros fármacos leishmanicidas e a proposição de decisão para estudos farmacocinéticos visando a descoberta de candidatos a fármacos e a continuidade dos estudos, o LASSBio-1736 possui características farmacocinéticas apropriadas para um medicamento

leishmanicida e novos estudos devem ser realizados para o escalonamento interespecies, além de estudos farmacológicos e toxicológicos complementares.

## REFERÊNCIAS

BAUER, M. et al. **Approaching complete inhibition of P-glycoprotein at the human blood-brain barrier: an (R)-[<sup>11</sup>C]verapamil PET study.** J Cereb Blood Flow Metab, 2015.

BORBOREMA, S. E. T. et al. **Biodistribution of meglumine antimoniate in healthy and Leishmania (Leishmania) infantum chagasi-infected BALB/c mice.** Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, v. 108, n. 5, p. 623-630, 2013.

BRAZIL. Lei 11794/08. **Procedimentos para Uso Científico de Animais.** DIÁRIO OFICIAL DA UNIÃO, S. D. D. O. D. C. Brasília, Brazil: Brazil. Diário Oficial da União, Seção 1 de 9 de outubro de 2008; CXLV (196): 1:2. 2008.

\_\_\_\_\_. **Diretriz Brasileira para o cuidado e a utilização de animais para fins científicos e didáticos.** MINISTÉRIO DA CIÊNCIA, T. E. I. C. N. D. C. D. E. A. C. Brasília: MCTI, Brazil 2013.

CARTER, K. C. et al. **The therapeutic effect of sodium stibogluconate in BALB/c mice infected with Leishmania donovani is organ-dependent.** Journal of Pharmacy and Pharmacology, v. 40, n. 5, p. 370-373, 1988.

CALDWELL, G. et al. Allometric scaling of pharmacokinetic parameters in drug discovery: Can human CL, V<sub>ss</sub> and t<sub>1/2</sub> be predicted from in-vivo rat data? **European Journal of Drug Metabolism and Pharmacokinetics**, v. 29, n. 2, p. 133-143, 2004/06/01 2004.

CRUZ, A. et al. **Pharmacokinetics of Antimony in Children Treated for Leishmaniasis with Meglumine Antimoniate.** Journal of Infectious Diseases, v. 195, n. 4, p. 602-608, February 15, 2007 2007.

DENIS, P.; OSSENBERG, F. W.; BENHAMOU, J. P. Hepatic blood flow and enzyme induction in the rat. **Biochemical Pharmacology**, v. 24, n. 2, p. 249-251, 1975.

DIEHL, K.-H. et al. A good practice guide to the administration of substances and removal of blood, including routes and volumes. **Journal of Applied Toxicology**, v. 21, n. 1, p. 15-23, 2001.

HAN, K.-H. et al. **Differential regulation of B/K protein expression in proximal and distal tubules of rat kidneys with ischemia-reperfusion injury.** 2007. F100-F106

KAISER, M. et al. High Performance Liquid Chromatography for Determining a New Anticonvulsant Candidate, Benzaldehyde Semicarbazone in Rat Plasma. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**, v. 33, n. 4, p. 526-535, 2010.

LAKSHMINARAYANA, S. B. et al. **Pharmacokinetics-pharmacodynamics analysis of spiroindolone analogs and KAE609 in a murine malaria model**. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, December 8, 2014 2014.

MOREIRA LIMA, L. Q., A. C. ; ALVES, MA ; MOREIRA, MAGNA ALEXANDRE SUZANA ; BARREIRO, ELIEZER ; GONZÁLEZ, M ; CERECETTO, HUGO. **Compostos hidrazida-N-acilidrazonas, processo de obtenção de compostos hidrazida-N-acilidrazonas, uso de compostos intermediários para a obtenção de hidrazida-N-acilidrazonas para tratamento de leishmaniose e doença de chagas é composições farmacêuticas obtidas**. UFRJ. Brazil. WO2014019044 A1. 2013 2013.

PANCHAGNULA, R.; THOMAS, N. S. **Biopharmaceutics and pharmacokinetics in drug research**. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 201, n. 2, p. 131-150, 2000.

FASINU, P. et al. **Diverse approaches for the enhancement of oral drug bioavailability**. *Biopharmaceutics & Drug Disposition*, v. 32, n. 4, p. 185-209, 2011.

ROBERTS, D. M. et al. **A multicenter study on the effect of continuous hemodiafiltration intensity on antibiotic pharmacokinetics**. *Critical Care*, v. 19, n. 1, 2015.

SHARGEL, L. W.-P., S.; YU, A. B. C. . In: MCGRAW-HILL (Ed.). **Applied biopharmaceutics & pharmacokinetics**. New York, 2005. p.267-269.

SERRANO, D. R. et al. **Hemolytic and pharmacokinetic studies of liposomal and particulate amphotericin B formulations**. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 447, n. 1-2, p. 38-46, 2013.

TASSO, L. et al. **Pharmacokinetics and tissue distribution of a new heterocyclic N-phenylpiperazine derivative (LASSBio-581) in rats**. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 26, n. 2, p. 194-202, 2005.

TUNTLAND, T. et al. **Implementation of Pharmacokinetic and Pharmacodynamic Strategies in Early Research Phases of Drug Discovery and Development at Novartis Institute of Biomedical Research**. *Frontiers in Pharmacology*, v. 5, 2014-July-28 2014.

## **Conclusões Gerais**

No presente estudo pode-se observar que o método de análise é adequado para medir as concentrações plasmáticas do LASSBio-1736 em ratos, analisando-se os resultados apresentados anteriormente, bem como o novo composto candidato a fármaco LASSBio-1736, com base nas características farmacocinéticas de outros fármacos leishmanicidas e a proposição de decisão para estudos farmacocinéticos visando a descoberta de candidatos a fármacos e a continuidade dos estudos, possui características farmacocinéticas apropriadas para um fármaco leishmanicida.

**ANEXOS**



**ANEXO A-** Certificado de Aprovação de Protocolo para Uso de Animais em Pesquisa



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DO PAMPA  
(Lei nº 11.640, de 11 de janeiro de 2008)

**Pró-Reitoria de Pesquisa**

**COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS - CEUA**

Fone: (55) 3413 4321, E-mail: [ceua@unipampa.edu.br](mailto:ceua@unipampa.edu.br)

---

**CERTIFICADO DE APROVAÇÃO DE PROTOCOLO PARA USO  
DE ANIMAIS EM PESQUISA**

Número de protocolo da CEUA: **026/2013**

Título: **AVALIAÇÃO FARMACOCINÉTICA PRÉ-CLÍNICA DOS CANDIDATOS A  
FÁRMACOS LÁSSBIO-1705 E LASSBIO-1736**

Data da aprovação: **20/12/2013**

Período de vigência do projeto: De: **12/2013** Até: **12/2016**

Pesquisador: **SANDRA ELISA HAAS**

Campus: **URUGUAIANA**

Telefone: **(55) 96511984**

E-mail: [sandra.haas@gmail.com](mailto:sandra.haas@gmail.com)

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'Alessandra S. K. Tamajusuku Neis', written over a horizontal line.

Alessandra S. K. Tamajusuku Neis  
Professor Adjunto  
Coordenadora da CEUA/UNIPAMPA