

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Avaliação Pré-clínica em Ratos do Perfil Farmacocinético do Composto PT-31

TICIANA CARLA BESSEGATO

PORTO ALEGRE, 2013

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Avaliação Pré-clínica em Ratos do Perfil Farmacocinético do Composto PT-31

Dissertação apresentada por **Ticiano**
Carla Bessegato para obtenção do
GRAU DE MESTRE em Ciências
Farmacêuticas

Orientadora: Profa. Dra. Teresa Cristina Tavares Dalla Costa

Porto Alegre, 2013

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, em nível de Mestrado Acadêmico, da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e aprovada em 22.03.2013, pela Banca Examinadora constituída por:

Prof^a. Dr^a. Elfrides Eva Schermann Schapoval

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Prof. Dr. Leandro Tasso

Universidade de Caxias do Sul

Prof^a. Dr^a. Stela Maris Kuze Rates

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

CIP - Catalogação na Publicação

Bessegato, Ticiania Carla
Avaliação Pré-clínica em Ratos do Perfil
Farmacocinético do Composto PT-31 / Ticiania Carla
Bessegato. -- 2013.
121 f.

Orientadora: Teresa Cristina Tavares Dalla Costa.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Porto Alegre, BR-RS, 2013.

1. Farmacocinética. 2. Distribuição Tecidual. 3. Ligação Proteína. 4. Candidato a analgésico. 5. PT-31. I. Dalla Costa, Teresa Cristina Tavares, orient. II. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Este trabalho foi desenvolvido no Centro Bioanalítico de Medicamentos da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e no Núcleo de Pesquisa de Produtos Naturais e Sintéticos da Universidade de São Paulo – Ribeirão Preto, com financiamento do Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia de Fármacos e Medicamentos (INCT-*if*). A autora recebeu bolsa de mestrado do CNPq.

“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas Graças a Deus, não sou o que era antes.”

Marthin Luther King

AGRADECIMENTOS

Agradeço inicialmente a DEUS, pois “Se vencemos Alguém esteve conosco. Se nada conseguimos, Ele continua junto de nós. Se persistimos juntos, veremos realmente Quem nos fez continuar, sorrirá para nós, mesmo que Dele, na felicidade nos tenhamos esquecido. Obrigada por tudo”.

Aos meus pais, que mesmo de longe me acompanharam na concretização deste sonho. Vocês são meus exemplos, meu alicerce. Obrigada por acreditarem em mim e por todo o incentivo dado para que eu realizasse este sonho.

Ao meu irmão, Maurício, pelo carinho, e por saber que sempre posso contar com a sua presença também nos momentos difíceis.

À professora e orientadora Teresa Dalla Costa, pelo exemplo de profissional, pela grande dedicação, incentivo, disponibilidade e infinita paciência durante a elaboração deste trabalho.

Ao professor Norberto Peporine Lopes, pelo seu apoio e colaboração para a realização deste trabalho.

Aos queridos amigos “PKs”: Maiara Pigatto, Bruna Torres, Francine Azeredo, Sandra Haas, Pedro Sansone, Felipe Hurtado, Fernanda Galves, João Victor Laureano, Estevan Zimmerman, Cristiane de Andrade, Liberato Brum, Jonas Malman, Jaqueline Fabrício, Priscila Bernardi, Graziela Lock e Daniela Mossmann, por todos os momentos de descontração, aprendizados compartilhados, pela ajuda nos experimentos e principalmente pela amizade construída.

Aos colegas da USP Ribeirão Preto, Gabriela Amaral Buqui e Michael Niehues, por toda a colaboração no desenvolvimento analítico e quantificações.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas e a todos os professores e funcionários da Faculdade de Farmácia.

A todos os meus grandes amigos e familiares que sempre me deram força e incentivo para a realização deste trabalho, acreditando e me fazendo acreditar que tudo daria certo.

Ao CNPq pelo financiamento da bolsa de estudos concedida durante todo o desenvolvimento do projeto.

RESUMO

Objetivo: Contribuir para o desenvolvimento do novo agonista α_2 -adrenérgico (PT-31), candidato a analgésico, através da avaliação farmacocinética pré-clínica em ratos pela administração de diferentes doses pelas vias i.v., i.m. e p.o. **Metodologia:** O PT-31 foi administrado a ratos Wistar nas doses de 5 mg/kg i.v. bolus (n = 4) e 10 mg/kg i.m. e p.o. (n = 6/grupo). Para quantificação das concentrações plasmáticas foi desenvolvido e validado método analítico por CLUE-EM/EM. Os perfis plasmáticos obtidos foram avaliados por abordagem compartimental e não-compartimental. A ligação às proteínas plasmáticas foi determinada por ultrafiltração. A distribuição tecidual foi avaliada utilizando homogeneizado de tecido, após a administração de 5 mg/kg i.v. bolus (n = 3 animais/ponto de coleta). **Resultados e Discussão:** O método bioanalítico por CLUE-EM/EM foi validado de acordo com normas internacionais. O PT-31 apresentou uma farmacocinética linear na faixa de dose de 5 a 10 mg/kg (i.v., i.m. e p.o.). Após dose i.v. apresentou um *clearance* de $0,19 \pm 0,02$ L/h/kg, meia-vida de $1,6 \pm 0,3$ h e volume de distribuição de $0,34 \pm 0,20$ L/kg. Após administração extravascular (i.m. e p.o.) não foram observadas diferenças estatisticamente significativas nos parâmetros farmacocinéticos entre as vias. Biodisponibilidade reduzida foi observada para o composto nas administrações extravasculares (23,7% pela i.m. e 20,2% pela p.o.), principalmente para a via i.m. A ligação às proteínas plasmáticas foi de $30,5 \pm 0,4\%$. A distribuição tecidual apresentou uma razão maior para o rim (179,9%), seguido pelo fígado (93,6%) e pulmão (69,9%). Apesar de ser um composto lipofílico capaz de atravessar a barreira hematoencefálica, as concentrações totais no tecido adiposo e no cérebro foram baixas. **Conclusões:** O PT-31 demonstrou uma rápida distribuição tecidual e uma rápida eliminação após administração i.v. Sua biodisponibilidade foi baixa pelas vias oral e intramuscular, o que pode ser devido à formulação utilizada. Apesar de baixa, há penetração cerebral do PT-31, justificando os resultados obtidos nos estudos farmacodinâmicos.

Palavras-chaves: PT-31, candidato a analgésico, farmacocinética, distribuição tecidual, ligação proteína.

ABSTRACT

Pharmacokinetic Pre-clinical Evaluation of the Compound PT-31 in Rats

Purpose: To contribute with the development of new α_2 -adrenergic agonist (PT-31), an analgesic candidate through its preclinical pharmacokinetic evaluation in rats following administration of different doses by i.v., i.m. and p.o. routes. **Methodology:** PT-31 was administered to Wistar rats as 5 mg/kg i.v. *bolus* dose (n = 4) and 10 mg/kg i.m. and oral (n = 6/group) doses. Plasma concentrations were quantified by UPLC-MS/MS by a developed and validated method. The plasma protein binding was determined by ultrafiltration. The tissue distribution was evaluated by tissue homogenate after the administration of 5 mg/kg i.v. *bolus* (n = 3 animals/time point). **Results and Discussion:** The bioanalytical method by UPLC-MS/MS was validated according to international guidelines. PT-31 showed a linear pharmacokinetics in the 5 to 10 mg/kg dose range (i.v., i.m. and p.o.). After i.v. dosing the drug showed a clearance of 0.19 ± 0.02 L/h/kg, half-life of 1.6 ± 0.3 h and volume of distribution of 0.34 ± 0.20 L/kg. After extravascular administration (i.m. and p.o.) no statistically significant differences in the pharmacokinetic parameters among the three routes of administration were observed ($\alpha = 0.05$). A reduced bioavailability was determined for the drug following extravascular administrations (23.7% by i.m. and 20.2% by p.o.). Protein binding was $30.5 \pm 0.4\%$. The tissue distribution showed a major kidney penetration (179.9%), followed by the liver (93.5%) and lung (69.9%). Despite being a lipophilic drug capable of crossing the blood brain barrier, the concentrations in the brain and adipose tissue were lower. **Conclusions:** The PT-31 demonstrated a rapid tissue distribution and rapid elimination after i.v. administration. The drug bioavailability was low after p.o. and i.m. dosing which could be related to the dosing formulations used. Despite presenting a low brain penetration the drug was determined in brain, justifying the results observed in the pharmacodynamic studies.

Keywords: PT-31, candidate analgesic, pharmacokinetics, tissue distribution, protein binding.

LISTA DE FIGURAS

REVISÃO DA LITERATURA

Figura 1. Estrutura química do anel imidazol.....	34
Figura 2. Estrutura química da imidazolidina-2,4-diona.....	34
Figura 3. Estrutura química de derivados imidazolidínicos.....	35
Figura 4. Mecanismo molecular de agonistas α_2 -adrenérgicos ligados à proteína G inibitória induzindo a inibição da adenilciclase.....	37
Figura 5. Estrutura química da clonidina.....	39
Figura 6. Estrutura química da dexmedetomidina.....	42
Figura 7. Estrutura química do PT-31.....	45

CAPÍTULO 1

Figura 1. Estrutura química do PT-31 e da fenitoína.....	52
Figura 2. Fragmentação dos íons PT-31 e fenitoína.....	55
Figura 3. Cromatogramas representativos em MRM-ESI + de plasma de ratos Wistar.....	61
Figura 4. Perfil plasmático do PT-31 após dose única i.v. <i>bolus</i> de 5 mg/kg a ratos Wistar.....	64

CAPÍTULO 2

Figura 1. Estrutura química do PT-31 e da fenitoína.....	72
--	----

Figura 2. Perfil plasmático médio do PT-31 após dose única i.v. <i>bolus</i> de 5 mg/kg a ratos Wistar (G1).....	79
Figura 3. Perfil plasmático médio do PT-31 após dose única de 10 mg/kg pelas vias i.m. (G2) e p.o. (G3).....	81
Figura 4. Perfis de concentração tecidual médio <i>versus</i> tempo após administração i.v. <i>bolus</i> de 5 mg/kg de PT-31 a ratos Wistar.....	84
Figura 5. Modelo diferenciado de administração i.m.....	87

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1

Tabela 1. Parâmetros da curva padrão do PT-31 em plasma de ratos Wistar.....	59
Tabela 2. Variação intra e interdía do PT-31 em plasma de ratos.....	62
Tabela 3. Precisão da análise do PT-31 em plasma de ratos.....	62

CAPÍTULO 2

Tabela 1. Parâmetros farmacocinéticos do PT-31 após administração i.v. <i>bolus</i> de 5 mg/kg em ratos Wistar.....	80
Tabela 2. Parâmetros farmacocinéticos do PT-31 após administração de dose única de 10 mg/kg pelas vias i.m. e p.o. a ratos Wistar.....	82
Tabela 3. Parâmetros farmacocinéticos estimados para diferentes tecidos após dose única de 5 mg/kg de PT-31 pela via i.v.....	83

LISTA DE ABREVIATURAS

AMPc	Monofosfato cíclico de adenosina
ARC 239	(2-[2-[4-(o-metoxifenil)piperazin-1-il]etil]-4,4-dimetil-1,3-(2H,4H)-isoquinolinediona
ASC _{0-∞}	Área sob a curva do tempo zero a infinito
ASC _{ext}	Área sob a curva extrapolada
ASC _{0-t}	Área sob a curva do tempo zero ao tempo “t”
BRL 44408	2-[2H-(1-metil-1,3-dihidroisoindola)metil]-4,5-dihidroimidazola
CL	<i>Clearance</i>
CL _{tot}	<i>Clearance</i> total
CLUE	Cromatografia líquida de ultra eficiência
CLUE-EM/EM	Cromatografia líquida de ultra eficiência associada a espectrometria de massas
C _{máx}	Concentração máxima
CQ	Controle de qualidade
CQA	Controle de qualidade alto
CQB	Controle de qualidade baixo
CQM	Controle de qualidade médio
DE ₅₀	Dose efetiva
DMSO	Dimetilsufóxido
DP	Desvio Padrão

DPR	Desvio Padrão Relativo
ESI	Ionização por <i>eletrospray</i>
F _{abs}	Biodisponibilidade
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
Ft	Fração tecidual relativa
i.v.	Administração intravenosa
i.m.	Administração intramuscular
ILE-190	Isoleucina 190
k _a	Constante de velocidade de absorção
k _e	Constante de velocidade de eliminação
LIQ	Limite inferior de quantificação
MEP	Máximo efeito analgésico possível
MRM	Monitorização de reação múltipla
MRT	<i>Mean residence time</i> (tempo de residência médio)
MSC	<i>Model selection criterion</i> (critério de seleção de modelo)
n	Tamanho amostral
NUPIT/UFPE	Núcleo de Pesquisa em Inovação Terapêutica da Universidade Federal de Pernambuco
PI	Padrão interno
p.o.	Administração oral
Proteína G	Proteína de guanina
PT-31	3-(2-cloro-6-fluorobenzil)-imidazolidina-2,4-diona

SNC	Sistema nervoso central
SNP	Sistema nervoso periférico
$t_{1/2}$	Meia-vida
TFA	Ácido trifluoroacético
TIC	Cromatograma iônico total
$t_{máx}$	Tempo para atingir a concentração máxima
UPLC-MS/MS	Ultra performance liquid chromatography associated with mass spectrometry
UTI	Unidade de terapia intensiva
Vd	Volume de distribuição
Vd _{ss}	Volume de distribuição no <i>steady state</i>
α	Constante híbrida de distribuição
β	Constante híbrida de eliminação
λ	Constante de velocidade de eliminação (abordagem não-compartimental)

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO E OBJETIVOS	25
REVISÃO DE LITERATURA.....	31
1. Desenvolvimento de novos fármacos.....	33
2. Derivados imidazolidínicos.....	34
3. Receptores α_2 -adrenérgicos.....	34
4. Efeitos dos agonistas nos receptores α_2 -adrenérgicos no SNC.....	37
4.1 Sedação.....	37
4.2 Analgesia.....	38
4.3 Temperatura corporal.....	39
5. Fármacos agonistas α_2 -adrenérgicos utilizados em anestesia.....	39
5.1 Clonidina.....	39
5.1.1 Farmacocinética.....	40
5.1.2 Aplicações clínicas.....	40
5.1.3 Mecanismo de ação.....	41
5.1.4 Efeitos adversos.....	41
5.2 Dexmedetomidina.....	42
5.2.1 Farmacocinética.....	42
5.2.2 Aplicações clínicas.....	43
5.2.3 Mecanismo de ação.....	44
5.2.4 Efeitos adversos.....	44
5.3 Utilização de agonistas α_2 com opióides.....	44
6. PT-31.....	45
CAPÍTULO 1. Desenvolvimento e validação de método bioanalítico por CLUE-EM/EM para a quantificação do PT-31 em estudo farmacocinético	47
Resumo.....	50

1. Introdução.....	51
2. Parte experimental.....	53
2.1 Solventes e reagentes.....	53
2.2 Preparação de soluções e controles de qualidade.....	53
2.3 Instrumentação.....	54
2.4 Condições cromatográficas e de espectrometria de massas.....	54
2.5 Preparação das amostras biológicas.....	55
2.6 Procedimentos de validação.....	56
2.7 <i>Carry-over</i>	57
2.8 Efeito de matriz.....	57
2.9 Estudo preliminar de estabilidade.....	57
2.10 Estudo farmacocinético preliminar.....	58
3. Resultados e discussão.....	58
3.1 Seletividade e recuperação.....	58
3.2 Linearidade.....	59
3.3 <i>Carry-over</i>	60
3.4 Efeito de matriz.....	60
3.5 Limite inferior de quantificação.....	60
3.6 Precisão e exatidão.....	63
3.7 Estudo preliminar de estabilidade.....	63
3.8 Aplicabilidade do método analítico.....	63
4. Conclusões.....	64
5. Agradecimentos.....	65
6. Referências.....	65

CAPÍTULO 2. Avaliação farmacocinética pré-clínica do PT- 31: um novo agonista α_2-adrenérgico candidato a analgésico.....	67
Resumo.....	70

1. Introdução.....	71
2. Metodologia.....	72
2.1 Solventes e reagentes.....	72
2.2 Animais.....	73
2.3 Preparação das doses de PT-31.....	73
2.4 Desenho experimental.....	74
2.5 Processamento das amostras de plasma.....	74
2.6 Análise por CLUE-EM/EM.....	75
2.7 Análise farmacocinética dos perfis plasmáticos.....	75
2.8 Distribuição tecidual.....	74
2.9 Ligação às proteínas plasmáticas.....	77
2.10 Análise estatística.....	78
3. Resultados.....	78
3.1 Perfis farmacocinéticos do PT-31 em plasma.....	78
3.2 Distribuição tecidual.....	83
3.3 Ligação às proteínas plasmáticas.....	85
4. Discussão.....	85
5. Conclusão.....	90
6. Agradecimentos.....	90
7. Referências.....	90
DISCUSSÃO GERAL.....	93
CONCLUSÕES	99
REFERÊNCIAS.....	103
ANEXOS.....	109

INTRODUÇÃO E OBJETIVOS

A busca de novas opções de tratamento farmacológico para promover sedação e analgesia em pacientes em unidades de terapia intensiva é muito grande, em vista de que as terapêuticas atuais são restritas. Os fármacos mais utilizados para a sedação são os barbitúricos, opióides e benzodiazepínicos, que podem ser administrados isolados ou em associação. Entretanto, as reações adversas provocadas por estes fármacos limitam a sua utilização (BAGATINI et al., 2002)

Por volta dos anos de 1960 os primeiros fármacos agonistas α_2 -adrenérgicos foram sintetizados. Esses, inicialmente foram utilizados na clínica como descongestionantes nasais e, posteriormente, como agentes anti-hipertensivos. Estudos realizados posteriormente demonstraram que esta classe de fármacos também apresenta atividade analgésica, sedativa, ansiolítica e simpatolítica. A partir desta descoberta surgiu o interesse do emprego desta classe na anestesiologia, com a intenção de diminuir a utilização dos barbitúricos, benzodiazepínicos e opióides (VILELLA e NASCIMENTO, 2003).

A utilização de agonistas α_2 -adrenérgicos como analgésicos e sedativos teve seus estudos iniciais na medicina veterinária. Dado seu potente efeito antinociceptivo, os agonistas α_2 -adrenérgicos vêm sendo utilizados como coadjuvantes de opióides nos regimes pós-operatórios (PATIL e ANITESCU, 2012). As principais indicações de agonistas α_2 -adrenérgicos em anestesiologia são: medicação pré-anestésica, adjuvantes da anestesia inalatória, venosa e regional e analgesia (ALVES et al., 2000).

Três grupos de compostos químicos são descritos como agonistas α_2 -adrenérgicos: imidazolinás, feniletilaminas e oxalozepinas (BAGATINI et al., 2002). As imidazolidinas-2,4-dionas são moléculas que se sobressaem como candidatos a protótipos de modificações moleculares. Elas são formadas por um conjunto de compostos heterocíclicos, obtidos por meio da adição de quatro átomos de hidrogênio ao anel imidazol (ARDUENGO et al., 1992).

A clonidina é um composto imidazólico agonista α_2 -adrenérgico seletivo. Ela é capaz de potencializar a ação dos anestésicos, podendo diminuir a concentração alveolar mínima dos inalatórios halogenados bem como as doses necessárias dos anestésicos intravenosos (ALVES et al., 2000). Assim, os benefícios clínicos dos agonistas α_2 -adrenérgicos são claros, mas poucos fármacos têm esse perfil.

Portanto, a identificação de novos compostos para essa indicação é clinicamente relevante (SUDO et al., 2010).

O Núcleo de Pesquisa em Inovação Terapêutica da Universidade Federal de Pernambuco sintetizou uma nova entidade molecular, o composto PT-31, 3-(2-cloro-6-fluorobenzil)-imidazolidina-2,4-diona, estruturalmente similar à clonidina. Estudos *in silico* revelaram que o PT-31 induziu efeitos antinociceptivos e apresentou alta afinidade para o sítio ativo do receptor adrenérgico α_2A . A potência e a intensidade da atividade antinociceptiva do PT-31 foram determinadas como sendo inferiores a da morfina (SUDO et al., 2010).

Após a administração intraperitoneal do composto PT-31 em camundongos foi possível observar um efeito antinociceptivo dose-dependente (1 a 15 mg/kg). O máximo efeito analgésico possível (MEP%) induzido pela dose de 15 mg/kg foi de $78,2 \pm 10,5\%$. A dose efetiva (DE_{50}) responsável pelo efeito analgésico deste composto foi de 4 mg/kg. Já a DE_{50} da morfina é aproximadamente 1,56 mg/kg. Na associação 1:1 de DE_{50} de cada composto, PT-31/morfina, a dose DE_{50} da mistura foi de 1,75 mg/kg, sendo essa alteração estatisticamente significativa em relação às DE_{50} das substâncias isoladas, indicando sinergismo entre PT-31 e morfina (SUDO et al., 2010.)

Os resultados da investigação farmacológica do novo agonista α_2 -adrenérgico PT-31 e a vantagem do uso da combinação sinérgica com morfina, visando diminuir a dose necessária de cada composto para atingir um nível antinociceptivo adequado, indicaram o potencial terapêutico desse composto, justificando a investigação farmacocinética pré-clínica do PT-31.

Nesse contexto, o presente trabalho teve como objetivo geral avaliar a farmacocinética pré-clínica do candidato a fármaco PT-31 em ratos Wistar. Os objetivos específicos foram:

- Desenvolver e validar metodologia analítica por cromatografia líquida de ultra eficiência (CLUE) com detecção por espectrometria de massas para quantificação do PT-31 em plasma e tecido de ratos;

- Estabelecer os parâmetros farmacocinéticos do PT-31 em ratos Wistar após administração intravenosa (i.v.) *bolus* da dose de 5 mg/kg e administrações intramuscular (i.m.) e oral (p.o.) da dose de 10 mg/kg;
- Determinar a ligação a proteínas e a penetração tecidual do PT-31 (fígado, rim, tecido adiposo, cérebro, pulmão, coração e baço) em ratos Wistar após administração em dose única intravenosa *bolus* de 5 mg/kg.

REVISÃO DE LITERATURA

1. Desenvolvimento de novos fármacos

O principal objetivo da descoberta e desenvolvimento de fármacos é a cura e o alívio das doenças. Com o intuito de acelerar o processo de descoberta as indústrias farmacêuticas lançaram mão da química combinatória, onde aproximadamente 1 milhão de novas entidades químicas podem ser testadas no período de um ano. Ao mesmo tempo em que se reduziu o tempo para a descoberta de um novo fármaco, os custos para o desenvolvimento aumentaram expressivamente (DIMASI et al., 2003). Assim, de cada 30.000 moléculas sintetizadas, 66,7% delas avançam para estudos pré-clínicos, 0,67% conseguem atingir a fase I de estudos clínicos; 0,13% passam para a fase II, 0,04% entram na fase III e somente 0,027% conseguem ser aprovadas pelos órgãos regulatórios (CALIXTO e SIQUEIRA, 2008).

Antes dos anos 2000, as principais razões para um novo composto não avançar nas etapas de desenvolvimento eram a baixa biodisponibilidade (39%), a ausência de eficácia (29%), efeitos tóxicos (21%) e por razões mercadológicas (6%) (CALIXTO e SIQUEIRA, 2008). Com o entendimento da importância e o fortalecimento da investigação farmacocinética pré-clínica esse quadro foi alterado e, atualmente, os principais fatores que impedem o avanço de novas entidades químicas no caminho para se tornar um fármaco são a falta de eficácia seguida da toxicidade em estudos pré-clínicos, o duvidoso valor comercial e a segurança inadequada em ensaios clínicos (GONÇALVES, 2011).

Com base nos dados citados acima se pode observar as dificuldades em encontrar-se uma nova entidade química que venha a se tornar um novo fármaco. Uma das estratégias utilizada para descoberta de novas entidades químicas é a escolha de um protótipo, que tenha atividade biológica elucidada, no qual são realizadas modificações estruturais a fim de melhorar algumas propriedades funcionais, e assim obter um novo composto com maior possibilidade de chegar a ser registrado como novo fármaco. Os novos compostos obtidos por essa estratégia são conhecidos como “me-too” (WERMUTH, 2004).

2. Derivados imidazolidínicos

Sintetizado por Heinrich Bebus em 1858, o anel imidazol (Figura 1) pode ser obtido por vários métodos de síntese. O imidazol tornou-se uma parte importante de muitos produtos farmacêuticos, estando presente na estrutura química de vários fármacos (BHATNAGAR et al., 2011). Alterações da estrutura do anel podem alterar suas propriedades físico-químicas e ainda produzir variados efeitos biológicos (PITTA et al., 2006).

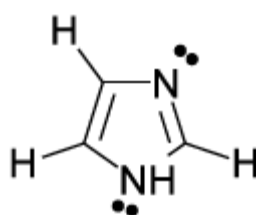


Figura 1. Estrutura química do anel imidazol.

Em 1861 a Bayer fez a descoberta da imidazolidina-2,4-diona, conhecida também como hidantoína (Figura 2). Desde então, um grande conjunto de derivados da imidazolidina foram sintetizados, apresentando variadas atividades biológicas. Nesse contexto, a modificação estrutural da imidazolidina tem sido objeto de grande interesse na busca de novas entidades químicas com vistas a novos fármacos (SANTOS et al., 2005).

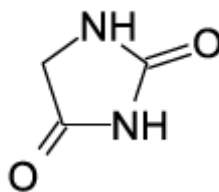


Figura 2. Estrutura química da imidazolidina-2,4-diona (hidantoína).

A 5,5-difenil-hidantoína, denominada de fenitoína (Figura 3A), é utilizada atualmente como o principal fármaco anticonvulsivante em crises epilépticas. A alantoína ou 5-ureído-hidantoína (Figura 3B) é amplamente utilizada na clínica como cicatrizante. Em alguns países o 1-[(4-nitro-fenil)-5-furfurilideno-amino]-imidazolidina-2,4-diona, conhecido como dantroleno (Figura 3C) é utilizado como miorelaxante. A nitrofurantoína (Figura 3D), que contém o anel hidantoínico, é utilizada como anti-séptica em vários países. Como fungicida hidantoínico mais importante tem-se o [3-(3,5-diclorofenil)-*N*-isopropil-2,4-dioxo-imidazolidina-1-carboxiamida] ou iprodiona (Figura 3E) (OLIVEIRA et al., 2008).

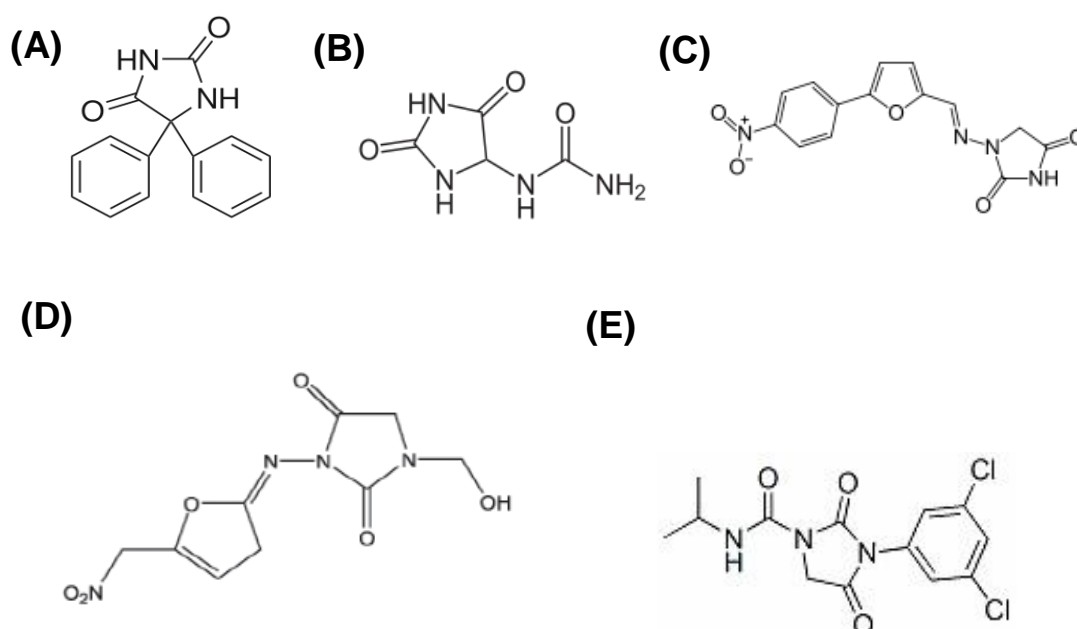


Figura 3. Estrutura química de derivados imidazolidínicos: (A) Fenitoína; (B) Alantoína; (C) Dantroleno; (D) Nitrofurantoína e (E) Iprodiona.

Como visto acima, são atribuídas diversas atividades biológicas aos derivados contendo o núcleo hidantoínico, devido a sua reatividade química e consequente afinidade por biomacromoléculas. Atualmente outras atividades estão sendo relacionadas a este heterociclo, como: atividade analgésica, antiinflamatória,

moduladora de colesterol HDL, inibidora de agregação plaquetária, antiarrítmica, anticâncer e antiviral (OLIVEIRA et al., 2008).

3. Receptores α_2 -adrenérgicos

Três grupos de compostos químicos são descritos como agonistas α_2 -adrenérgicos: imidazolininas, feniletilaminas e oxalozepinas (BAGATINI et al., 2002). Dentre estes grupos os derivados imidazolidínicos têm destaque, uma vez que possuem alta afinidade por estes receptores (BUCARETCHI et al., 2003).

Receptor α_2 é uma subclassificação distinta dos α -adrenérgicos, que estão localizados no sistema nervoso central e virtualmente em todos os tecidos periféricos. A classificação dos receptores α_2 -adrenérgicos está disposta de duas maneiras: em função da sua ação farmacológica α_2A , α_2B e α_2C e α_2D , sendo a última encontrada mais predominantemente em ruminantes, e ainda de acordo com a localização cromossômica dos genes que os codificam em α_22 , α_24 e α_210 . Estes receptores são localizados nos terminais pós-sinápticos dos músculos lisos dos vasos onde vão gerar vasoconstrição, sendo que o subtipo α_2C encontra-se localizado principalmente nas veias. Ainda, encontram-se receptores α_2 em vários tipos de tecidos como fígado, pâncreas, rins, tecido adiposo, olhos, onde promovem variadas funções fisiológicas (BYLUND, 1988; DOCHERTY, 1998; SINCLAIR, 2003).

Os subtipos de receptores de importância clínica geral incluem o subtipo α_2A , que regulam o estágio de consciência, excitação e vigília, localizado no tronco encefálico, e o subtipo α_2B , responsável pela regulação dos efeitos periféricos vasoconstritores (SINCLAIR, 2003; BASKER et al., 2009).

A maioria dos receptores α_2 -adrenérgicos são mediados através da inibição da ligação à proteína de guanina (Proteína-G), que resulta na diminuição da formação de adenosina monofosfato cíclica (AMPC), levando a mudanças na atividade de vários subsistemas intracelular (Figura 4). No entanto, nem todas as ações de agonistas α_2 -adrenérgicos pode ser explicada pela redução das concentrações de AMPC. Outro mecanismo que pode estar envolvido na atividade é a ativação direta de canais iônicos na membrana celular, resultando na saída de potássio (K⁺) do meio intracelular por um canal ativado. A ativação dos receptores α_2 pré-sinápticos pode, ainda, bloquear a entrada de cálcio no terminal nervoso,

causando inibição da liberação de neurotransmissores como noradrenalina (SIMONETTI et al., 1997; SCHOLZ e TONNER, 2000; BAGATINI et al., 2002).

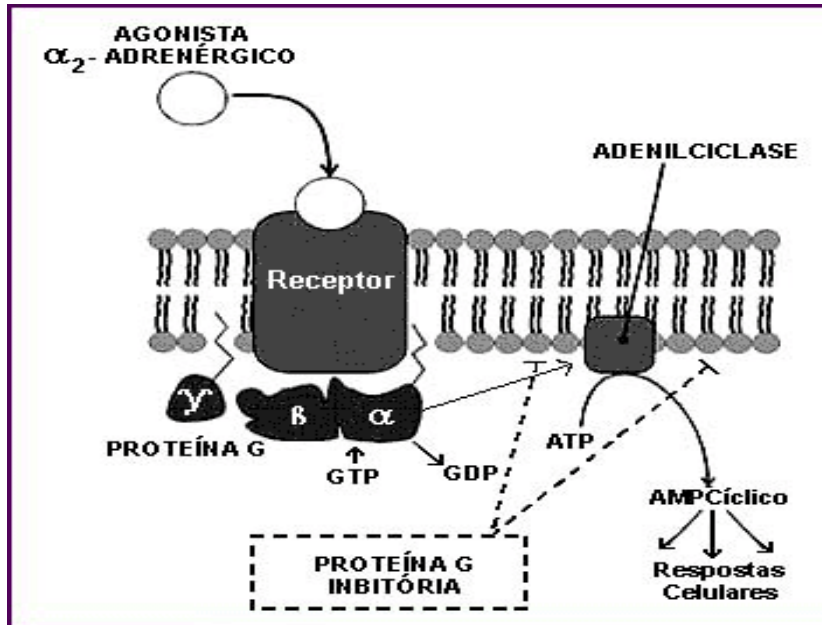


Figura 4. Mecanismo molecular de agonistas α_2 -adrenérgicos ligados à proteína-G inibitória induzindo a inibição da adenilciclase (Retirado de SIMONETTI et al., 1997).

4. Efeito dos agonistas nos receptores α_2 -adrenérgicos no sistema nervoso central (SNC)

4.1 Sedação

Quando ativado, o receptor α_2 pré-sináptico inibe a liberação de noradrenalina na fenda sináptica, modulando assim a atividade das células efectoras do sistema nervoso autônomo simpático. O tronco cerebral é a região com maior presença de células noradrenérgicas, localizadas bilateralmente em um pequeno núcleo neural conhecido como *Locus coeruleus*, principal local de ação dos agonistas adrenérgicos α_2 . A noradrenalina é necessária para a excitação. Se a sua liberação

é bloqueada, o resultado é a sedação. (SINCLAIR, 2003, MURRELL e HELLEBREKERS, 2005; ELFENBEIN et al., 2009).

4.2 Analgesia

A capacidade dos agonistas α_2 produzirem analgesia se deve ao estímulo dos receptores em vários locais do cérebro e da medula espinhal, especialmente no corno dorsal da medula espinhal e no tronco cerebral. A administração de doses reduzidas de agonistas α_2 em qualquer um destes locais induz analgesia com mínimos efeitos adversos (VALVERDE, 2010).

Os mecanismos dos agonistas α_2 -adrenérgicos em analgesia têm sido extensamente investigados. A cocaína, o primeiro anestésico aplicado por via espinhal, produz analgesia primariamente por sua ação como anestésico local, mas também por inibir a recaptação de noradrenalina. A analgesia espinhal produzida pela cocaína deve-se, em parte, à estimulação noradrenérgica de receptores α_2 . Esta descoberta motivou a utilização de agonistas α_2 -adrenérgicos com o intuito de obter-se analgesia. Entretanto, só em 1984, a clonidina foi administrada com sucesso, quando, após testes de neurotoxicidade em animais, essa substância foi injetada no espaço peridural de dois pacientes com dor crônica. Isto possibilitou a realização de estudos posteriores que demonstraram a segurança da clonidina subaracnóidea no tratamento de síndromes dolorosas (ROCHA et al., 2002).

Dados experimentais e evidências clínicas mostram que os agonistas α_2 não apresentam analgesia durante todo o período de sedação. Portanto, esses agentes por si só não são adequados para procedimentos cirúrgicos. Geralmente, o efeito analgésico destes compostos dura metade do tempo da duração da sedação. Assim, eles são associados com outros agentes anestésicos para procedimento cirúrgico (SINCLAIR, 2003).

4.3 Temperatura corporal

Quando os agonistas α_2 -adrenérgicos são utilizados para sedação, pode-se observar uma diminuição da temperatura corporal em animais de pequeno porte como roedores, que é atribuída à depressão do SNC. Em contraste, os agonistas α_2 -adrenérgicos permitem uma melhor manutenção da temperatura corporal em relação a outros agentes sedativos devido à vasoconstrição periférica e redistribuição central do sangue, com uma conseqüente redução das perdas de calor cutâneas em relação à redução consistente na temperatura corporal descrita com o uso de outros agentes anestésicos que induzem a vasodilatação (SINCLAIR, 2003).

5. Fármacos agonistas α_2 -adrenérgicos utilizados em anestesia

5.1 Clonidina

A clonidina, quimicamente como 2-(2,6-diclorofenilamina)-2-imidazolina (Figura 5), possui uma alta lipossolubilidade, sendo capaz de atravessar a barreira hematoencefálica, distribuindo-se amplamente no sistema nervoso central. É um agonista parcial dos receptores α_2 , que leva ao antagonismo dos receptores em nível central, reduzindo assim as descargas sinápticas. Foi utilizada inicialmente no tratamento de hipertensão arterial na década de 60, mas possui também propriedades sedativas e analgésicas que estão sendo amplamente estudadas, sendo que seu emprego em anestesia tem sido ampliado (JACOBI et al., 1999).

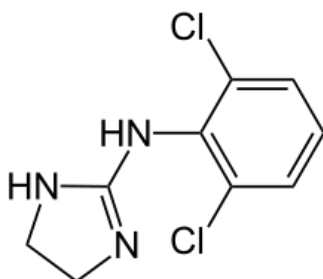


Figura 5. Estrutura química da clonidina

5.1.1 Farmacocinética

Em humanos, a clonidina é bem absorvida pela via oral, apresentando uma biodisponibilidade de quase 100%. Cerca de 20-40% do fármaco está ligado às proteínas plasmáticas. Seu efeito máximo é observado entre 1 a 3 h após administração oral, com um pico de efeito sedativo em 48 a 72 h. A eliminação ocorre entre 6 a 24 h, sendo metade da dose excretada de forma inalterada na urina e a outra metade metabolizada no fígado, gerando metabólitos inativos. Pode ainda ser utilizada por via retal em crianças, com biodisponibilidade de 95% (ALVES et al., 2000; BASKER et al., 2009).

5.1.2 Aplicações clínicas

A clonidina, em doses de 4 µg/kg por via oral ou por via intranasal e, em doses de 5 µg/kg por via retal, proporciona uma sedação adequada. A atropina tem sido administrada rotineiramente junto com clonidina para anular os efeitos adversos como bradicardia e hipotensão (BASKER et al., 2009).

Na anestesia regional, a clonidina pode ser utilizada como adjuvante, tanto em bloqueios raquídeos como nos periféricos. Assim, a adição de clonidina na dose de 1 a 2 µg/kg ao anestésico local para bloqueio de nervos periféricos aumenta a duração da anestesia cirúrgica em, aproximadamente, 75% e a analgesia pós-operatória em até 200% (ALVES et al., 2000).

Quando administrada pela via peridural, a clonidina é rapidamente absorvida, atingindo pico de concentração plasmática em torno de 30 min. Possui uma meia-vida de eliminação lenta, em torno de 13 h, quando comparada com a duração de 3 a 5 h do efeito analgésico. A clonidina também tem sido administrada no espaço subaracnóideo, onde produz efeitos mais intensos e seletivos do que aqueles observados com doses semelhantes no espaço peridural. Por potencializar a ação dos anestésicos, tanto no adulto como na criança, pode-se diminuir a concentração alveolar mínima dos inalatórios halogenados e as doses necessárias dos venosos (ALVES et al., 2000).

Após a administração sistêmica, a clonidina aumenta os efeitos analgésicos de agentes anti-inflamatórios e tem efeitos periféricos antinociceptivos em combinação com anestésicos locais, opióides e cetamina (BASKER et al., 2009).

A clonidina é utilizada como analgésico e sedativo em Unidades de Terapia Intensiva (UTI). A administração intravenosa de clonidina 1 µg/kg/h, com midazolam 50 µg/kg/h não foi associado a mudanças significativas na frequência cardíaca, pressão arterial e índice cardíaco e alcançou sedação satisfatória. Ainda, a adição de clonidina em baixas doses, para o regime analgésico produz uma redução drástica do consumo de morfina (BASKER et al., 2009).

5.1.3 Mecanismo de ação

A clonidina atua através da estimulação dos receptores α_2 pré-sinápticos, diminuindo assim a liberação de noradrenalina a partir do SNC e do sistema nervoso periférico (SNP). Os efeitos da clonidina ocorrem devido à sua ação nos locais espinhais e supra-espinhais. Estudos com a clonidina mostram a diminuição da concentração de noradrenalina no *Locus coeruleus* (JAMADARKHANA e GOPAL, 2010).

Segundo Eisenach e colaboradores (1996), para explicar a interação da clonidina com os anestésicos locais nos bloqueios regionais, são sugeridos dois mecanismos: a clonidina atuaria tanto diretamente, ao bloquear a condução do estímulo nas fibras, aumentando a condutância do potássio em neurônios isolados e intensificando o bloqueio de condução dos anestésicos locais, ou ainda indiretamente, ao reduzir a distribuição dos anestésicos locais, através de efeito vasoconstritor mediado pelos receptores α_2 pós-sinápticos, localizados na musculatura lisa de vasos peridurais.

5.1.4 Efeitos adversos

A administração de clonidina pode ser acompanhada de sonolência, boca seca, bradicardia, hipotensão ortostática e impotência. A retirada abrupta do fármaco pode levar à hipertensão rebote, resultando em uma crise hipertensiva. Ainda, ela

pode aumentar a concentração de glicose no sangue pela inibição da liberação de insulina (BASKER et al., 2009).

5.2 Dexmedetomidina

A dexmedetomidina (Figura 6) é o enantiômero dextrógiro da medetomidina. Apresenta relação de seletividade para receptores $\alpha_2:\alpha_1$ de 1600:1, sendo um fármaco agonista de receptores α_2 -adrenérgicos muito seletivo. O fármaco promove analgesia, relaxamento muscular e sedação com menor depressão ventilatória do que os outros fármacos do grupo. Permite também que os pacientes sejam despertados, ficando assim cooperativos. Possui propriedade hipnótica, amnésica relativa, ansiolítica intensa que a leva a ser uma poupadora de opióides (VILELA e NASCIMENTO, 2003).

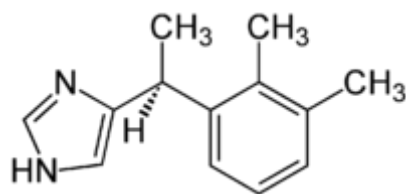


Figura 6. Estrutura química da dexmedetomidina.

5.2.1 Farmacocinética

A meia vida de distribuição da dexmedetomidina é entre 6 a 9 min e a eliminação de 2 a 2,25 h. Há relatos de o tempo exceder para 7,5 h em pacientes com insuficiência hepática. A taxa de ligação protéica é de 94%. A dexmedetomidina é metabolizada no fígado e eliminada pelos rins, após sofrer glicorunidação direta e metabolização via citocromo P450. Via muscular apresenta biodisponibilidade de 70% a 80% e o pico de concentração plasmática ocorre em cerca de 15 min (ALVES et al., 2000)

Em doses maiores a dexmedetomidina provoca vasoconstrição importante, o que provavelmente reduz o seu volume de distribuição. Por isso, esse fármaco não apresenta farmacocinética linear. Considerando-se que o nível plasmático terapêutico deve ficar na faixa de 0,5 a 1,0 ng/mL, os parâmetros farmacocinéticos dentro dessa faixa de concentração são melhores descritos por modelo tricompartmental (ALVES et al., 2000).

5.2.2 Aplicações clínicas

A dexmedetomidina pode ser empregada como medicação pré-anestésica ou associada à anestesia. Sua apresentação é sob a forma de cloridrato, em solução límpida, incolor e isotônica com pH de 4,5 a 7,0. Em humanos, o fármaco foi liberado para uso nos Estados Unidos, em 1999, indicado na medicação pré-anestésica, durante a anestesia ou para bloqueios loco-regionais como a epidural (VILELA e NASCIMENTO, 2003).

São empregados modelos farmacocinéticos para monitoramento da dexmedetomidina, para que o fármaco possa ser empregado em anestesia sob a forma de infusão contínua intravenosa, através da manutenção da concentração plasmática alvo, geralmente de 0,3 a 0,7 µg/mL, como ocorre com o propofol e os opióides (MAGALHÃES et al., 2006).

Em pacientes que se submeteram a pequenas cirurgias ortopédicas e gerais, anestesiados com tiopental, N₂O/O₂, fentanil e isoflurano, foi administrada uma dose de 2 µg/kg de dexmedetomidina por via intravenosa. Constatou-se uma redução da necessidade de dose extra do agente inalatório; estabilidade hemodinâmica após a intubação oro-traqueal, redução da necessidade de isoflurano; redução de 70 % da concentração da noradrenalina e adrenalina plasmática; redução da necessidade de analgésicos e antieméticos, mas observou-se bradicardia frequente (VILELA e NASCIMENTO, 2003).

5.2.3 Mecanismo de ação

Os efeitos sedativos da dexmedetomidina são mediados centralmente no *Locus coeruleus* onde concentra-se grande quantidade de receptores do tipo α_2 -adrenérgicos. A sedação proporcionada pela dexmedetomidina raramente utiliza medicação complementar para sua manutenção. Pacientes tratados com dexmedetomidina apresentaram redução de 50% na dose da morfina para produzir analgesia, comparada com pacientes que utilizam apenas o opióide (RAMADHYANI et al., 2010).

5.2.4 Efeitos adversos

Os efeitos adversos mais relatados para esse fármaco são: bradicardia e hipotensão arterial, hipertensão arterial, secura na boca causada pela modulação da secreção salivar pelo mecanismo pré-sináptico e febre (ALVES et al., 2000).

5.3 Utilização de agonistas α_2 com opióides

Para o tratamento da dor, a morfina é considerada padrão-ouro de uso sistêmico. Seu uso foi experimental e clinicamente relatado em combinação com agonistas α_2 -adrenérgicos. Porém essa interação leva a vários efeitos adversos como a retenção urinária, náuseas, dependência ao fármaco e depressão ventilatória. Assim sendo, a busca por novos compostos analgésicos com maior potência e menos efeitos colaterais são necessários (SCHOLZ e TONNER, 2000; SUDO et al., 2010)

Na modulação da dor, ocorrem interações entre os receptores de opiáceos e os α_2 -adrenérgicos no cérebro e na medula espinhal. Eles são encontrados em regiões semelhantes do cérebro e até mesmo nos mesmos neurônios. A ativação destes dois receptores induz uma série de eventos que são capazes de abrir os canais de potássio na membrana neuronal. Quando os canais de potássio são ativados no neurônio pós-sináptico ocorre a hiperpolarização da célula, fazendo com que esta responda de forma eficaz rompendo a via da dor. Sendo assim, os

agonistas α_2 e os agonistas μ -opióides produzem analgesia por mecanismo semelhante (SINCLAIR, 2003).

A utilização de agonistas α_2 -adrenérgicos associados a anestésicos continua sendo rara, apesar de vários estudos pré-clínicos e clínicos mostrarem os benefícios dessa prática e do conhecimento dos mecanismos de ação desses fármacos. A não utilização da associação se deve provavelmente a pouca familiaridade dos clínicos com esses fármacos e ao receio dos efeitos colaterais (VILLELA e NASCIMENTO, 2003; SUDO et al., 2010).

6. PT-31

O Núcleo de Pesquisa em Inovação Terapêutica da Universidade Federal de Pernambuco (NUPIT/UFPE) realizou estudos *in silico* que revelaram que o PT-31, composto sintetizado pelo mesmo grupo, induziu efeitos antinociceptivos e apresentou alta afinidade para o sítio ativo do receptor adrenérgico α_2A , devido à ligação de hidrogênio formada entre PT-31 e resíduos da isoleucina 190 (ILE-190) do receptor. A potência e a intensidade da atividade antinociceptiva do PT-31 foram determinadas como sendo inferiores a da morfina (SUDO et al., 2010).

O composto PT-31 ou 3-(2-cloro-6-fluorobenzil)-tiona-2,4-diona (Figura 7) é quimicamente relacionado a uma série de 3-benzil-imidazolidinas, com um perfil analgésico resultante da ativação de receptor α_2 -adrenérgico. A determinação das características físico-químicas e espectroscópicas do PT-31 revelou dois isômeros conformacionais para este composto (SUDO et al., 2010).

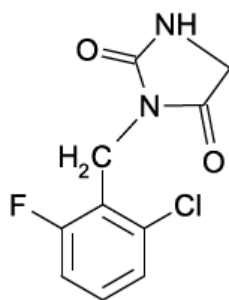


Figura 7. Estrutura química do PT-31.

A administração intraperitoneal do composto PT-31 em camundongos causou um efeito antinociceptivo dose-dependente (1 a 15 mg/kg). O máximo efeito analgésico possível (MEP%) induzido pela dose de 15 mg/kg foi de $78,2 \pm 10,5\%$. A dose efetiva (DE_{50}) responsável pelo efeito analgésico deste composto é de 4 mg/kg. Já a DE_{50} da morfina é aproximadamente 1,56 mg/kg. Na associação 1:1 de DE_{50} de cada droga, PT-31/morfina, a dose DE_{50} da mistura foi de 1,75 mg/kg, sendo essa alteração estatisticamente significativa em relação às DE_{50} das substâncias isoladas ($p < 0,05$), indicando sinergismo entre PT-31 e morfina (SUDO et al., 2010).

Um composto antagonista não-específico dos receptores α_2 -adrenérgicos, a ioimbina, que não tem atividade antinociceptiva, foi capaz de reverter completamente o efeito do PT-31 (10 mg/kg). O uso do antagonista seletivo α_2B e α_2C adrenérgicos, ARC 239, não modificou o efeito antinociceptivo do PT-31. Mas quando utilizado o antagonista dos receptores adrenérgicos α_2A seletivo, BRL 44408, este efeito foi totalmente revertido (SUDO et al., 2010).

Os resultados da investigação farmacológica do novo agonista α_2 -adrenérgico PT-31 e a vantagem do uso da combinação sinérgica com morfina, visando diminuir a dose necessária de cada composto para atingir um nível antinociceptivo adequado, indicaram o potencial terapêutico desse composto, justificando sua investigação farmacocinética pré-clínica.

CAPÍTULO 1

Desenvolvimento e validação de método bioanalítico por CLUE-EM/EM para a quantificação do PT-31 em estudo farmacocinético

**Desenvolvimento e validação de método bioanalítico por CLEU-EM/EM para a
quantificação do PT-31 em estudo farmacocinético**

T.C. Bessegato^a, M. Niehues^b, G.A. Buqui^b, N.P. Lopes^b, I.R. Pitta^c,
S.L. Galdino^{c,†}, T. Dalla Costa^{a*}

^aPrograma de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do
Rio Grande do Sul, Porto Alegre-RS, Brazil

^bNúcleo de Pesquisa de Produtos Naturais e Sintéticos, Universidade de São Paulo,
Ribeirão Preto - SP, Brazil

^cNúcleo de Pesquisa em Inovação Terapêutica, Universidade Federal de
Pernambuco, Recife - PE, Brazil

*Autor de correspondência

Profa. Dra. Teresa Dalla Costa

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Faculdade de Farmácia

Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas

Av. Ipiranga, 2752

Porto Alegre - RS, 90610-000 - Brasil

Fone: + 55 51 3308 5418

Fax: + 55 51 3308 5437

CAPÍTULO 2

Avaliação Farmacocinética Pré-Clínica do PT-31: um novo agonista α_2 - adrenérgico candidato a analgésico

**Avaliação Farmacocinética Pré-Clínica do PT-31: um novo agonista α_2 -
adrenérgico candidato a analgésico**

T.C. Bessegato^a, B.S. Torres^a, M.C. Pigatto^a, F.J. Azeredo^a, M. Niehues^b, G.A.
Biqui^b, N.P. Lopes^b, I.R. Pitta^c, S.L. Galdino^{c,†}, T. Dalla Costa^{a,*}

^aPrograma de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do
Rio Grande do Sul, Porto Alegre-RS, Brazil

^bNúcleo de Pesquisa de Produtos Naturais e Sintéticos, Universidade de São Paulo,
Ribeirão Preto - SP, Brazil

^cNúcleo de Pesquisa em Inovação Terapêutica, Universidade Federal de
Pernambuco, Recife - PE, Brazil

*Autor de correspondência

Teresa Dalla Costa

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas

Av. Ipiranga, 2752

Porto Alegre – RS – 90610-000

Fone: +55 51 3308 5418

Fax: + 55 51 3308 5437

DISCUSSÃO GERAL

As moléculas candidatas a fármacos são descobertas por meio de identificação e elucidação de um alvo para o composto, através de planejamento racional do fármaco, com base no conhecimento dos mecanismos biológicos, da estrutura dos receptores e estrutura própria, ou ainda, por modificações químicas de uma molécula conhecida, dentre outras.

Os candidatos a fármacos devem ser cuidadosamente avaliados quanto as suas características biológicas e riscos potenciais, através de testes pré-clínicos. Os estudos pré-clínicos têm como objetivo principal a avaliação farmacológica em sistemas *in vitro* e em animais, *in vivo*, para a obtenção do maior conhecimento possível acerca das propriedades, atividades e mecanismo de ação.

Neste contexto, este trabalho teve como objetivo realizar a avaliação pré-clínica da farmacocinética de um novo agonista α_2 - adrenérgico, o PT-31, visando contribuir para o desenvolvimento desta nova entidade química. Através de testes que avaliaram a sua farmacodinâmica, o PT-31 se mostrou uma molécula promissora por apresentar um potente efeito antinociceptivo, além de um sinergismo com a morfina (SUDO et al., 2010).

Visando atingir o objetivo geral do projeto, primeiramente foi desenvolvido e validado um método analítico por CLUE-EM/EM para quantificar o PT-31 em plasma de ratos, para sua posterior utilização na avaliação da farmacocinética deste composto. O método desenvolvido envolveu a precipitação das proteínas plasmáticas com acetonitrila e quantificação do PT-31 utilizando a fenitoína como padrão interno. Este método mostrou-se preciso, linear, específico e exato, com sensibilidade adequada para a quantificação do composto, permitindo assim uma determinação confiável dos seus perfis plasmáticos e teciduais, que foram utilizados para determinação dos parâmetros farmacocinéticos. A estabilidade do PT-31 em plasma em diferentes condições foi avaliada, sendo os resultados utilizados para nortear as condições de armazenamento e processamento das amostras nos estudos de farmacocinética.

Com o método analítico validado foi possível iniciar a avaliação farmacocinética pré-clínica do composto. O PT-31 foi administrado nas doses de 5 mg/kg i.v. *bolus* e 10 mg/kg pelas vias i.m. e oral. As doses foram escolhidas de

acordo com os estudos farmacodinâmicos. As vias de administração foram escolhidas devido a sua possível utilização clínica como analgésico e anestésico.

O perfil farmacocinético do PT-31 após administração i.v. foi adequadamente descrito pelo modelo de 2 compartimentos, mostrando uma fase de distribuição rápida ($t_{1/2\alpha} = 11,4 \pm 6,0$ min) seguido por uma fase de eliminação mais lenta ($t_{1/2\beta} = 1,6 \pm 0,05$ h). Ainda, após dose i.v., o PT-31 apresentou volume de distribuição de $0,34 \pm 0,2$ L/kg e *clearance* de $0,19 \pm 0,02$ L/h/kg.

Para as vias i.m. e oral, o modelo de 1 compartimento foi o que melhor descreveu os perfis plasmáticos. Para estas vias os parâmetros farmacocinéticos não foram estatisticamente diferentes. A biodisponibilidade do PT-31 foi determinada para ambas as vias, mostrando-se semelhantes (23,7% para i.m. e 20,2% para oral). Os motivos para a baixa biodisponibilidade i.m. precisam ser elucidados.

Ainda, pode-se observar um comportamento farmacocinético linear quando se compara os parâmetros farmacocinéticos obtidos após a dose de 5 mg/kg i.v. e os obtidos após a dose de 10 mg/kg pelas vias extravasculares. A ligação a proteínas plasmáticas do composto PT-31 foi de $30,5 \pm 0,4\%$, independente da concentração testada.

Após a investigação da distribuição tecidual, observou-se que as maiores concentrações do composto foram encontradas no rim, no fígado e no pulmão. O rim apresentou a maior exposição ao composto PT-31 ($ASC_{0-\infty} = 49,92$ $\mu\text{g}\cdot\text{h/g}$) com um alto pico de concentração ($C_{\text{max}} = 19,30$ $\mu\text{g/g}$), seguido pelo fígado e pulmão, que mostraram também uma alta exposição ($ASC_{0-\infty} = 25,95$ e $19,40$ $\mu\text{g}\cdot\text{h/g}$, respectivamente) e altos picos de concentração ($C_{\text{max}} = 8,71$ e $7,34$ $\mu\text{g/g}$, respectivamente). Os fatores de penetração no rim, fígado e pulmão foram 179,9, 93,6 e 69,9%, respectivamente. A avaliação de penetração realizada a partir de dados de homogeneizado de órgãos/tecidos tem como desvantagem a grande contaminação dos mesmos com sangue. No homogeneizado de tecido as concentrações totais determinadas são o somatório da fração intersticial, fração intracelular e fração devida à contaminação sanguínea. Desse modo, esses dados permitem informar sobre o acesso ou não do fármaco ao órgão ou tecido investigado, não permitindo conclusões sobre os mecanismos envolvidos no processo.

Esperava-se que, devido à moderada lipofilia do PT-31, o composto apresentasse uma concentração elevada no tecido adiposo. No entanto, observou-se uma penetração baixa nesse tecido ($F_t = 20,2\%$).

Do mesmo modo, as concentrações do PT-31 no cérebro foram baixas quando comparadas com os três tecidos de maior penetração ($F_t = 35,6\%$). A clonidina, que já tem sua farmacocinética e sua farmacodinâmica bem elucidadas, e apresenta um bom potencial terapêutico, incluindo o sistema nervoso central, também apresenta baixos índices de penetração cerebral (CONWAY e JARROTT, 1982).

De acordo com Sudo e colaboradores (2010), o PT-31 mostrou efeito central quando administrado a camundongos. Neste contexto, os resultados de penetração cerebral em ratos sugerem que o PT-31 atinge o SNC e, em função das baixas concentrações obtidas, pode-se supor que seja potente ou que não se distribua uniformemente nas estruturas cerebrais, atingindo concentrações mais elevadas nas estruturas onde se localizam os receptores alvo. Estudos visando elucidar essa questão devem ser realizados na mesma espécie animal na qual foram realizados os estudos farmacodinâmicos para que conclusões mais precisas possam ser obtidas.

Esse conjunto de resultados demonstra que o PT-31 possui características farmacocinéticas adequadas para a atividade no SNC observada previamente. Sua investigação farmacocinética, no entanto, deve ser aprofundada avaliando-se a biodisponibilidade de outras formulações, com intuito de aumentar sua absorção tanto oral quanto intramuscular, bem como investigando-se suas vias de metabolização e a possível toxicidade dos metabólitos, além da toxicidade do próprio composto.

CONCLUSÕES



- O método analítico por CLUE-EM/EM para determinação do PT-31 em amostras de plasma e tecido de ratos foi desenvolvido e validado. Este mostrou-se linear, exato, preciso, específico e sensível, de acordo com normas internacionais para validação de métodos bioanalíticos, sendo adequado para a determinação dos perfis plasmáticos e teciduais do composto;
- O perfil farmacocinético plasmático do PT-31 após administração i.v. *bolus* de 5 mg/kg foi descrito adequadamente pelo modelo de 2 compartimentos. Para as vias extravasculares, o modelo mais adequado foi o de 1 compartimento;
- O PT-31 apresentou farmacocinética linear na faixa de dose de 5 a 10 mg/kg, com volume de distribuição de $0,34 \pm 0,20$ L/kg, *clearance* de $0,19 \pm 0,02$ L/h/kg e meia-vida de $1,6 \pm 0,3$ h.
- O PT-31 apresentou biodisponibilidade baixa após dose oral (20,2%) e intramuscular (23,7%);
- A ligação a proteínas plasmáticas de ratos do PT-31 foi de $30,5 \pm 0,4\%$, sendo independente da concentração testada (0,05 – 5 µg/mL);
- O PT-31 apresentou alta penetração nos rins, fígado e pulmões, podendo ser encontrado em todos os tecidos investigados, com um fator de penetração cerebral de 35,61%.

REFERÊNCIAS

ALVES, T.C.A.; BRAZ, J.R.C.; VIANNA, P.T.G. α_2 -Agonistas em anestesiologia: Aspectos clínicos e farmacológicos. *Revista Brasileira de Anestesiologia*, v. 50, p. 396-404, 2000.

ARDUENGO, A.J. et al. Electronic stabilization of nucleophilic carbenes. *Journal American Chemical Society*, v. 114, p. 5530-5534, 1992.

BAGATINI, A. et al. Dexmedetomidina: Farmacologia e uso clínico. *Revista Brasileira de Anestesiologia*, v. 52, p. 606-617, 2002.

BASKER, S.; SINGH, G.; JACOB, R. Clonidine in paediatrics - A review. *Indian Journal of Anaesthesia*, v. 53, p. 270-280, 2009.

BHATNAGAR, A.; SHARMA, P.K.; KUMAR, N. A review on "imidazoles": their chemistry and pharmacological potentials. *International Journal of PharmTech Research*, v. 3, p. 268-282, 2011.

BUCARETCHI, F.; DRAGOSAVAC, S.; VIEIRA, R.J. Exposição aguda a derivados imidazolínicos em crianças. *Jornal de Pediatria*, v. 79, p. 519-524, 2003.

BYLUND D.B. Subtypes of α_2 -adrenoceptors: pharmacological and molecular biological evidence converge. *Trends in Pharmacological Sciences*, v. 9, p. 356-361, 1988.

CALIXTO, J.B. e SIQUEIRA, J.M. Desenvolvimento de Medicamentos no Brasil: Desafios. *Gazeta Médica da Bahia*, v. 78, p., 98-106, 2008.

CONWAY, E.L. e JARROTT, B. Tissue pharmacokinetics of clonidine in rats. *Journal of Pharmacokinetics and Biopharmaceutics*, v. 10, p. 187-200, 1982.

DIMASI, J.A.; HANSEN, R.W.; GRABOWSKI, H.G. The price of innovation: new estimates of drug development costs. *Journal of Health Economics*, v. 22, p., 151-185, 2003.

DOCHERTY, J.R. Subtypes of functional α_1 - and α_2 -adrenoceptors. *European Journal of Pharmacology*, v. 361, p. 1-15, 1998.

EISENACH, J.C.; DEKOCK, M.; KLIMSCHA, W. Alpha-2 adrenergic agonist for regional anesthesia. A clinical review of clonidine (1984-1995). *Anesthesiology*, v. 85, p. 655-674, 1996.

ELFENBEIN, J.R. et al. Effect of detomidine on visceral and somatic nociception and duodenal motility in conscious adult horses. *Veterinary Anaesthesia and Analgesia*, v. 36, p. 162-172, 2009.

GONÇALVES, J.A. O circuito do medicamento: Da molécula à farmácia. (Dissertação de Mestrado), Faculdade de Ciências da Saúde – Universidade Fernando Pessoa. Porto, 2011.

JACOBI, J. et al. Clinical practice guidelines for sustained use of sedatives and analgesics in the critically ill adult. *Critical Care Medicine*, v. 27, p. 32-33, 1999.

JAMADARKHANA, S. e GOPAL, S. Clonidine in adults as a sedative agent in the intensive care unit. *Journal of Anaesthesiology Clinical Pharmacology*, v. 26, p. 439-445, 2010.

MAGALHÃES, E. et al. A dexmedetomidina para sedação, por via venosa, não interfere com a duração dos bloqueios sensitivo e motor da raquianestesia. *Revista Brasileira de Anestesiologia*, v.56, p. 01-07, 2006.

MURRELL, J.C. e HELLEBREKERS, L.J. Medetomidine and dexmedetomidine: a review of cardiovascular effects and antinociceptive properties in the dog. *Veterinary Anaesthesia and Analgesia*, v. 32, p. 117-127, 2005.

OLIVEIRA, S.M. et al. Estrutura, reatividade e propriedades biológicas de hidantoínas. *Química Nova*, V. 31, p., 614-622, 2008.

PATIL, S.K. e ANITESCU, M. Opioid-free perioperative analgesia for hemicolectomy in a patient with opioid-induced delirium: A case report and review of the analgesic efficacy of the alpha-2 agonist agents. *Pain Practice*, V 12, p. 656-662, 2012.

PITTA, M.G.R. et al. New imidazolidinic bioisosters: potential candidates for antischistosomal drugs. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 101, p. 313-316, 2006.

RAMADHYANI, U. et al. Dexmedetomidine: Clinical Application as an Adjunct for Intravenous Regional Anesthesia. *Anesthesiology Clinics*, v. 28, p. 709-722, 2010.

ROCHA, A.P.C; LEMONICA, L.; BARROS, G.A.M. Uso de medicações por via subaracnóidea no tratamento da dor crônica. *Revista Brasileira de Anestesiologia*, v. 52, p. 628-643, 2002.

SANTOS, M.V.P. et al. Configurational and conformational analysis of some fully substituted imidazolidinic compounds: a theoretical study. *Journal of Molecular Structure: THEOCHEM*, v.715, p. 191-198, 2005.

SCHOLZ, J. e TONNER, P.H. α_2 -Adrenoceptor agonists in anaesthesia: a new paradigm. *Current Opinion in Anaesthesiology*, v.13, p. 437-442, 2000.

SIMONETTI, M.P.B.; VALINETTI, E.A.; FERREIRA, F.M.C. Clonidina: de descongestionante nasal a analgésico potente. Considerações históricas e farmacológicas. *Revista Brasileira de Anestesiologia*, v. 47, p. 37-47, 1997.

SINCLAIR, M.D. A review of the physiological effects of α_2 -agonists related to the clinical use of medetomidine in small animal practice. *Canadian Veterinary Journal*, v. 44, p. 885-897, 2003.

SUDO, R.T. et al. Interaction of morphine with a new α_2 -adrenoceptor agonist in mice. *The Journal of Pain*, v. 11, p. 71-78, 2010.

VALVERDE, A. Alpha-2 agonists as pain therapy in horses. *Veterinary clinics of North America: Equine practice*, v. 26, p. 515-532, 2010.

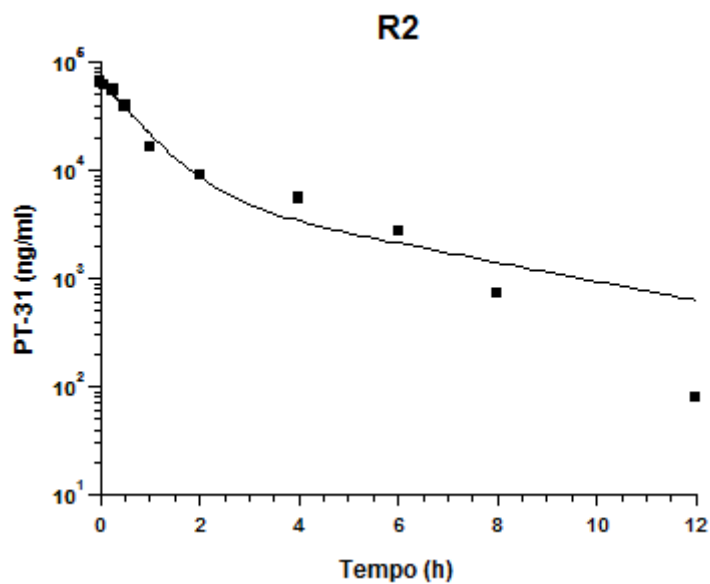
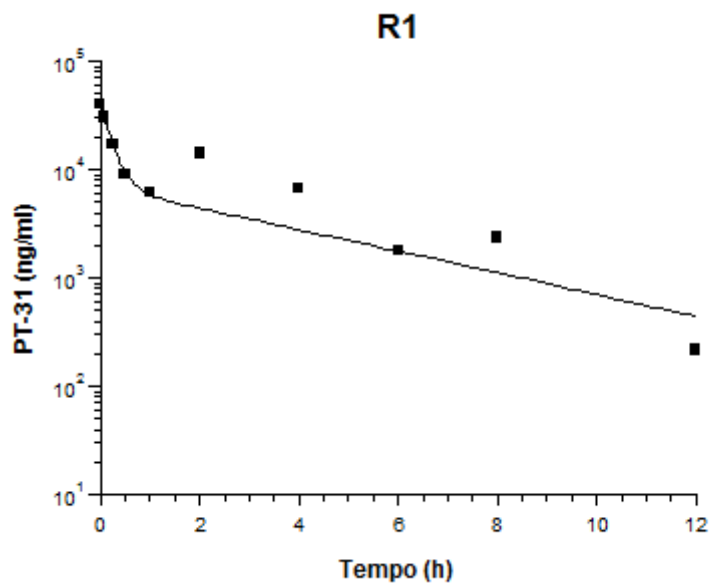
VILLELA, N.R. e NASCIMENTO, P. Uso de Dexmedetomidina em anestesiologia. *Revista Brasileira de Anestesiologia*, v. 53, p. 97-113, 2003.

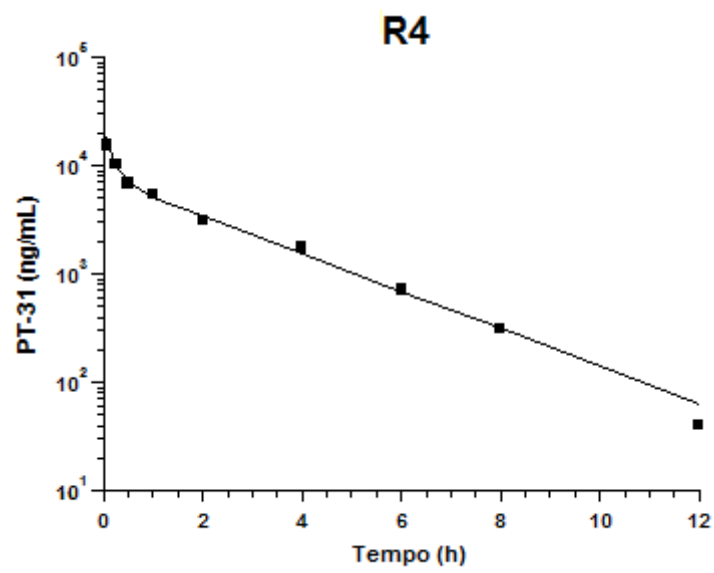
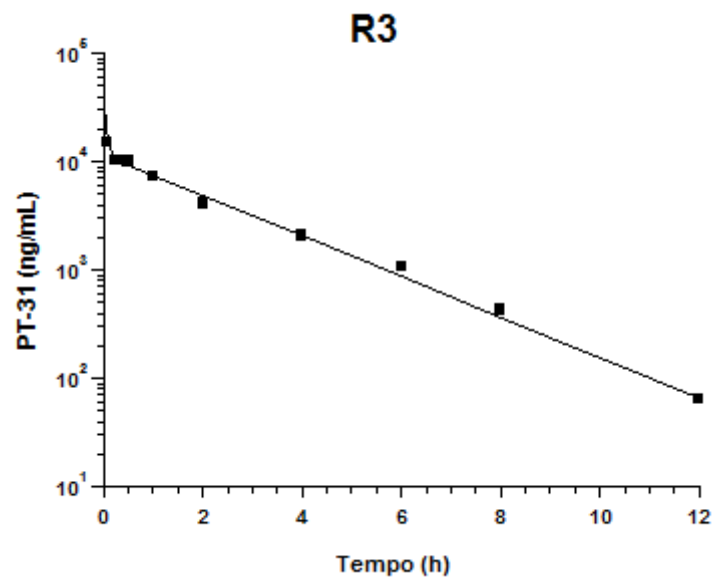
WERMUTH, C.G. Selective optimization of side activities: Another way for drug discovery. *Journal of Medicinal Chemistry*, V. 47, p. 1303-1314, 2004.

ANEXOS

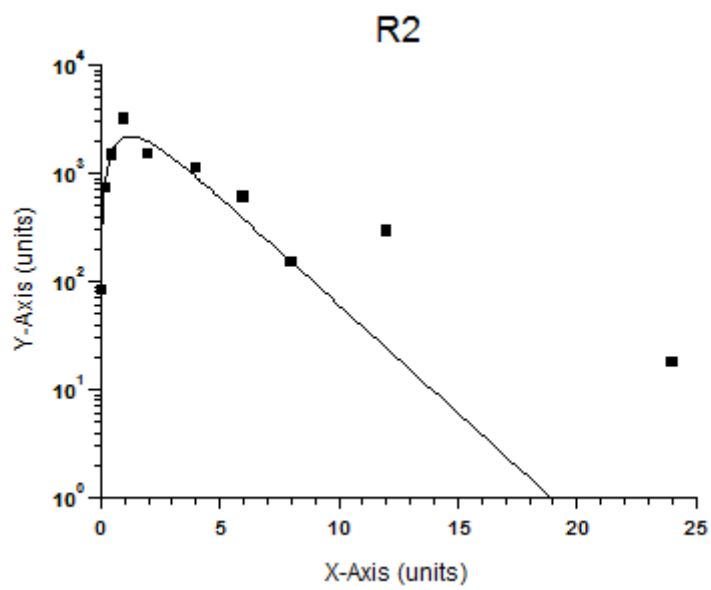
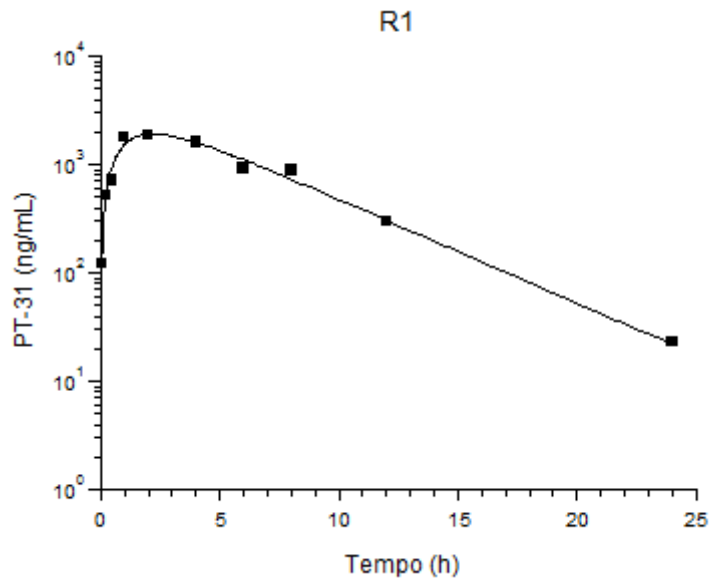


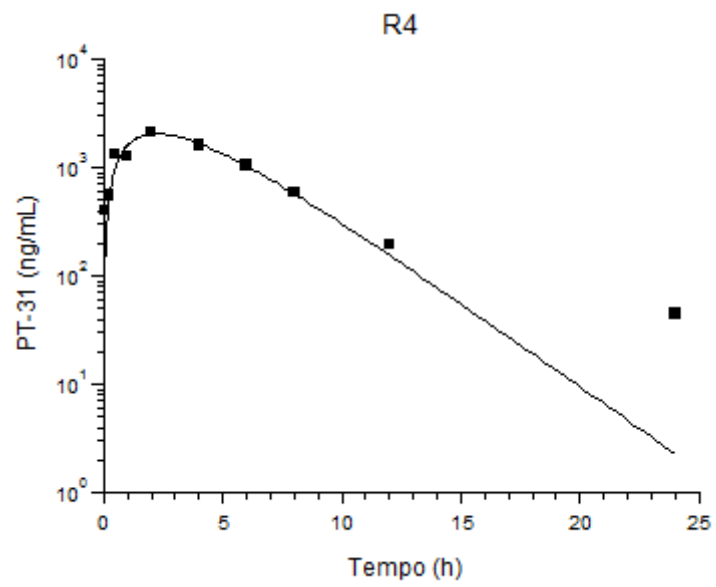
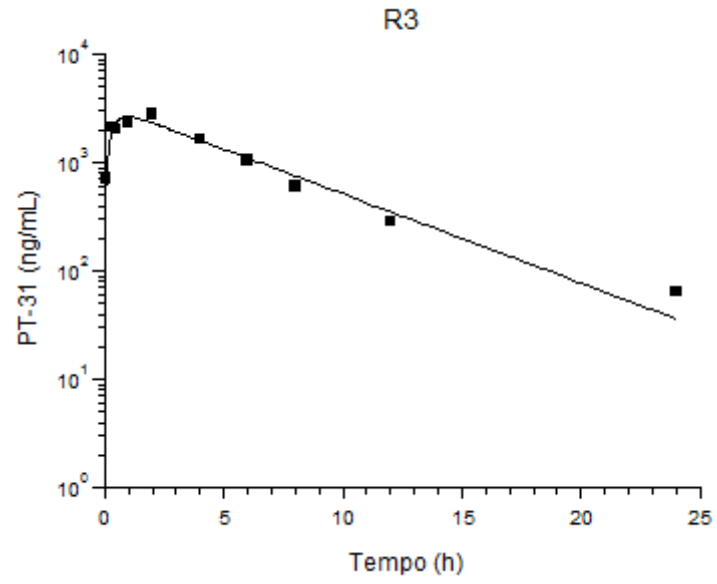
Anexo I – Perfis individuais após PT-31 5 mg/kg i.v. *bolus*

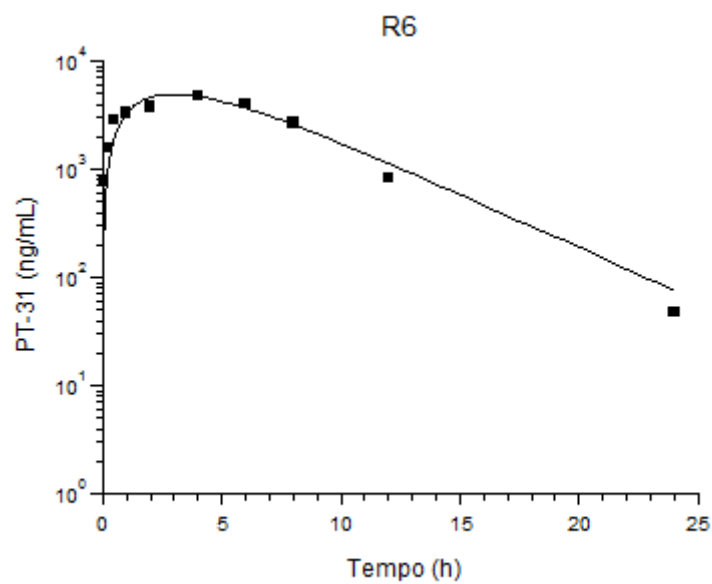
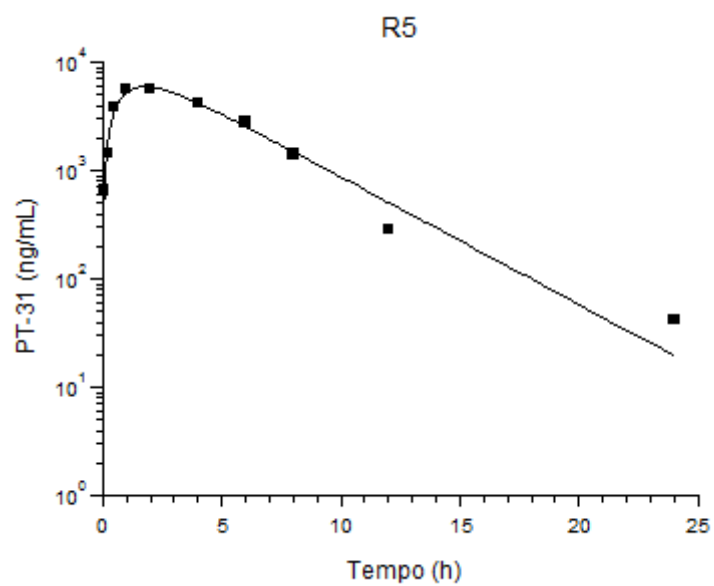




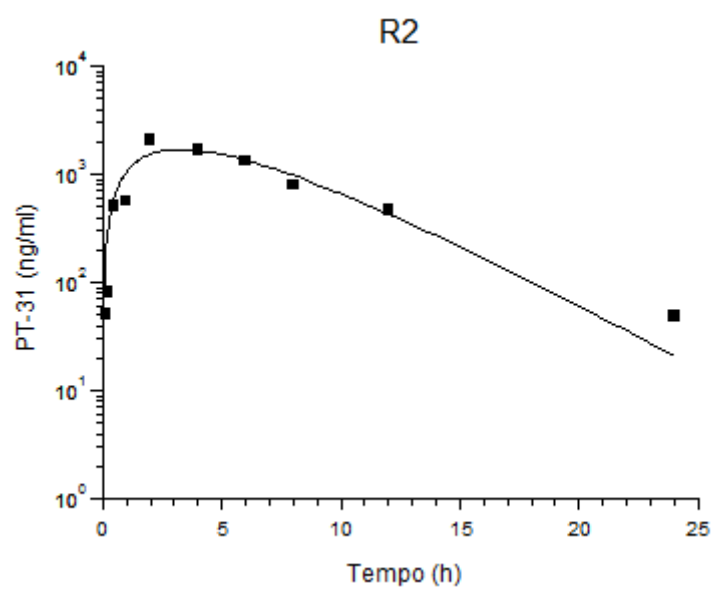
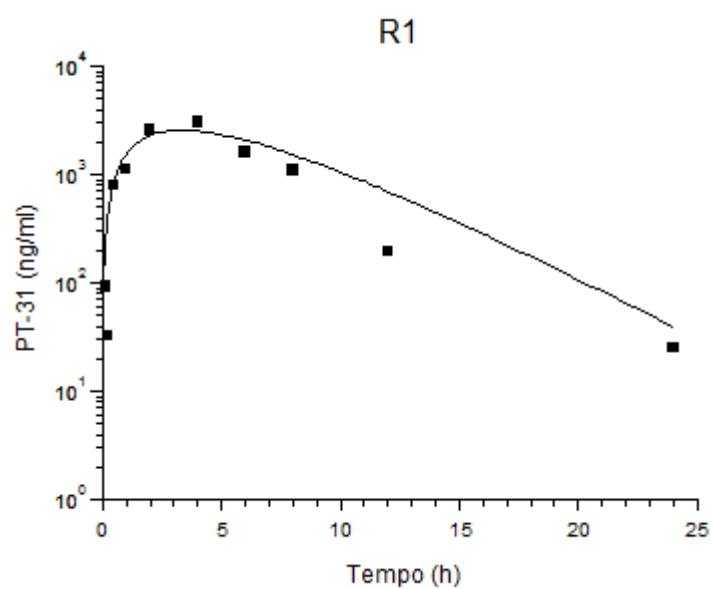
Anexo II – Perfis individuais após PT-31 10 mg/kg intramuscular

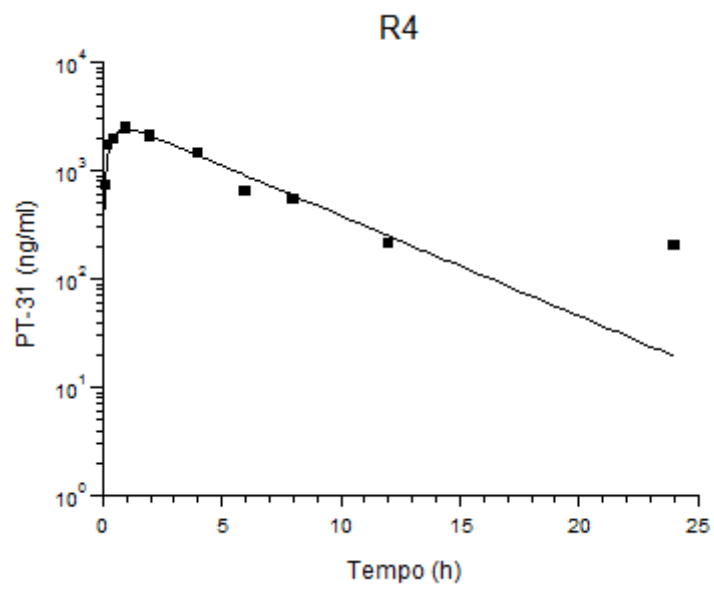
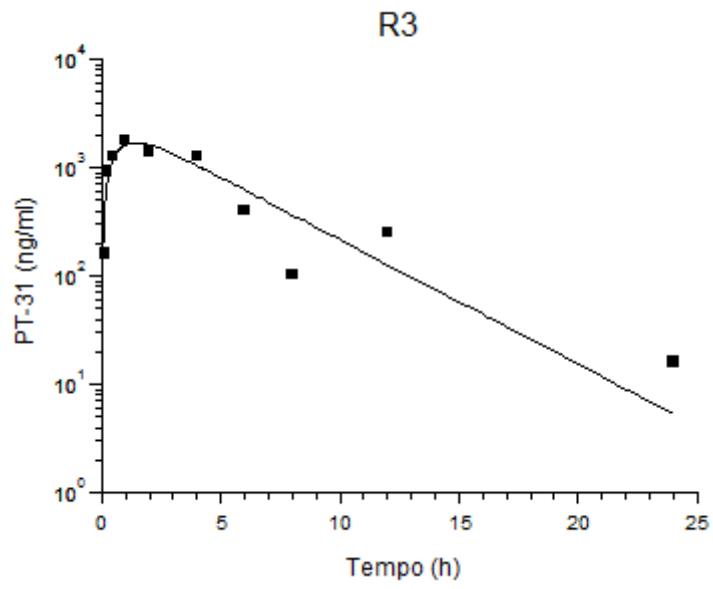


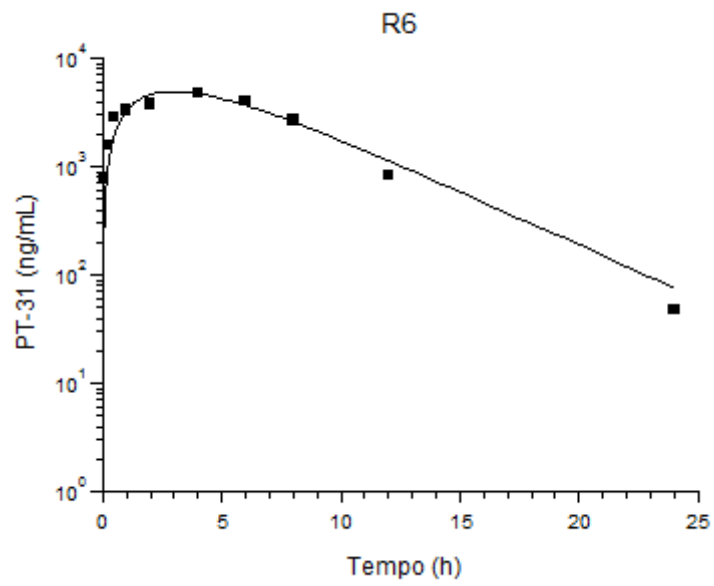
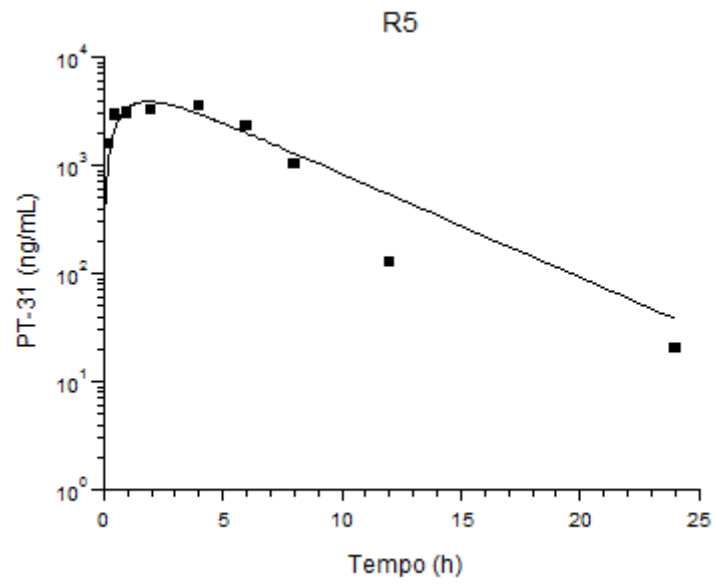




Anexo III – Perfis individuais após PT-31 10 mg/kg oral







ANEXO IV

Carta de aprovação da Comissão de Ética na Utilização de Animais da UFRGS



UFRGS

UNIVERSIDADE FEDERAL
DO RIO GRANDE DO SUL

PRÓ-REITORIA DE PESQUISA

Comissão De Ética Na Utilização De Animais



CARTA DE APROVAÇÃO

Comissão De Ética Na Utilização De Animais analisou o projeto:

Número: 19594

Título: AVALIAÇÃO PRE-CLÍNICA EM RATOS DO PERFIL FARMACOCINÉTICO DO COMPOSTO PT-31

Pesquisadores:

Equipe UFRGS:

TERESA CRISTINA TAVARES DALLA COSTA - coordenador desde 01/09/2010
Ticiania Carla Bessegato - Colaborador desde 01/09/2010

Comissão De Ética Na Utilização De Animais aprovou o mesmo, em seus aspectos éticos e metodológicos de acordo com as Diretrizes e Normas Nacionais e Internacionais, especialmente a Lei 11.794 de 08 de novembro de 2008 que disciplina a criação e utilização de animais em atividades de ensino e pesquisa.

Porto Alegre, Quarta-Feira, 12 de Janeiro de 2011

FLAVIO ANTONIO PACHECO DE ARAUJO
Coordenador da comissão de ética