

Universidade Federal de Ouro Preto – UFOP
Escola de Farmácia – EFAR
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas – CIPHARMA
Departamento de Análises Clínicas – DEACL

Luísa Helena Perin de Melo

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE UM MÉTODO BIOANALÍTICO
PARA ESTUDOS DE FARMACOCINÉTICA E BIODISTRIBUIÇÃO DO
FÁRMACO ANTI-CHAGÁSICO BENZNIDAZOL EM MODELO MURINO**

Ouro Preto – Minas Gerais - Brasil
Março de 2015

Universidade Federal de Ouro Preto – UFOP
Escola de Farmácia – EFAR
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas – CIPHARMA
Departamento de Análises Clínicas – DEACL

Luísa Helena Perin de Melo

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE UM MÉTODO BIOANALÍTICO
PARA ESTUDOS DE FARMACOCINÉTICA E BIODISTRIBUIÇÃO DO
FÁRMACO ANTI-CHAGÁSICO BENZNIDAZOL EM MODELO MURINO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, como parte das exigências do programa para aquisição do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Prof.^a Dra. Cláudia Martins Carneiro

Co-orientadora: Prof.^a Dra. Paula Melo de Abreu Vieira

Ouro Preto – Minas Gerais - Brasil
Março de 2015

M528d Melo, Luísa Helena Perin de.
Desenvolvimento e validação de um método bioanalítico para estudos de farmacocinética e biodistribuição do fármaco anti-chagásico benznidazol em modelo murino [manuscrito] / Luísa Helena Perin de Melo. - 2015.
75f.: il.: color; graf.; tabs.

Orientadora: Profa. Dra. Cláudia Martins Carneiro.
Coorientadora: Profa. Dra. Paula Melo de Abreu Vieira.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Ouro Preto. Escola de Farmácia. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas.
Área de Concentração: Fármacos e Medicamentos.

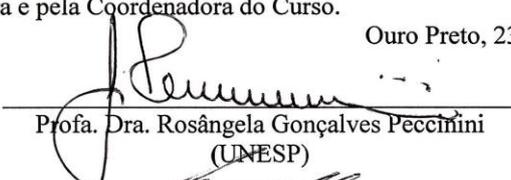
1. Cromatografia líquida de alta eficiência. 2. Farmacocinética. 3. Fármacos. 4. Chagas, Doença de. I. Carneiro, Cláudia Martins. II. Vieira, Paula Melo de Abreu. III. Universidade Federal de Ouro Preto. IV. Título.

CDU: 543.54

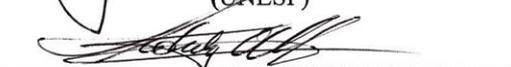
ATA DA SESSÃO DE DEFESA DA 95ª DISSERTAÇÃO DO PROGRAMA DE
PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DA ESCOLA DE
FARMÁCIA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO

1 Aos vinte três dias do mês de março de dois mil e quinze, segunda-feira, realizou-se, a
2 partir das quatorze horas, no Auditório do NUPEB, a sessão de defesa de dissertação da
3 candidata ao grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas, **Luísa Helena Perin de Melo**
4 intitulada: “Desenvolvimento e validação de um método bioanalítico para estudos de
5 farmacocinética e biodistribuição do fármaco anti-chagasico benznidazol em modelo
6 murino”. A Banca Examinadora foi constituída pela Profa. Dra. Rosângela Gonçalves
7 Peccinini (UNESP), Prof.Dr. Sidney Augusto Vieira Filho (UFOP), Prof. Dr. Jason
8 Guy Taylor (UFOP), e pela orientadora Profa Dra. Cláudia Martins Carneiro (UFOP).
9 De acordo com o regulamento do Curso, a orientadora, Profa. Dra. Cláudia Martins
10 Carneiro, presidente da banca, abriu a sessão, passando a palavra à candidata, que fez a
11 exposição do seu trabalho. Em seguida, foi realizada a arguição pelos examinadores na
12 ordem registrada acima, com a respectiva defesa da candidata. Finda a arguição, a
13 Banca Examinadora se reuniu, sem a presença da candidata, tendo deliberado pela sua
14 aprovação. Nada mais havendo para constar, lavrou-se
15 a presente ata por mim, Maria das Mercês Fortes da Silva Miranda, secretária do
16 CiPharma, e fez-se a leitura da presente ata que segue assinada pelos membros da
17 Banca Examinadora e pela Coordenadora do Curso.

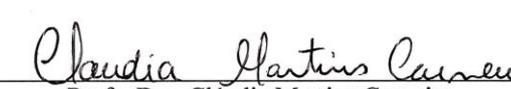
Ouro Preto, 23 de março de 2015.



Profa. Dra. Rosângela Gonçalves Peccinini
(UNESP)



Prof. Dr. Sidney Augusto Vieira Filho
(UFOP)



Profa. Dra. Cláudia Martins Carneiro
Orientadora



Profa. Dra. Neila Márcia Silva Barcellos
Coordenadora do programa de Pós Graduação em
Ciências Farmacêuticas- CiPharma

À Prof. Dr^a. Cláudia Martins Carneiro que seis anos atrás me proporcionou os primeiros contatos com a ciência. Obrigada pela oportunidade! Poucas pessoas possuem tamanha competência e dinamismo, sem dúvida uma pessoa ímpar e um exemplo a ser seguido.

À Prof. Dr^a. Paula Melo de Abreu Vieira por todo o aprendizado científico e de vida. Obrigada pela paciência e confiança e por, todos os dias, me mostrar a importância de se trabalhar com competência, ética e retidão.

Ao doutorando do Programa de Pós-Graduação em Toxicologia, USP-Ribeirão Preto, Rodrigo Moreira da Silva por me iniciar no fantástico e tortuoso caminho da farmacocinética. Um grande presente deste mestrado, ter tido a oportunidade de conhecê-lo e ver a pessoa incrível que você é. Os dias e noites intermináveis de extração e análise foram mais fáceis com seu bom humor!

Ao Prof. Dr. Alexandre Barbosa Reis, sua dedicação à pesquisa e à formação dos seus alunos com excelência é inspiradora.

Ao Prof. Dr. Bruno Mendes Roatt por todos os conselhos ao longo destes anos.

À pós-doutoranda Nádia das Dores Moreira, aos doutorandos Fernando Augusto Siqueira Mathias, Jamille Mirelle de Oliveira Cardoso, Kátia da Silva Fonseca, Levi Eduardo Soares Reis, Nívia Carolina Nogueira de Paiva e Thais Vieira de Carvalho e as alunas de iniciação científica Flávia de Souza Marques, Flávia Giovenardi, Larissa Maris R. Oliveri e Lívia Mendes de Carvalho pela ótima convivência, pelos momentos de descontração e conversas jogadas fora. Este trabalho e, principalmente, as necropsias não seriam possíveis sem a ajuda de vocês!

Aos integrantes dos laboratórios de Imunopatologia, Pesquisas Clínicas e Morfopatologia por manterem sempre vivo o espírito de trabalho em equipe.

Ao apoio técnico de Maria Chaves e a Tânia Kelly e Luciana da Fonseca Medeiros que sempre me auxiliaram fornecendo os materiais necessários para a realização deste trabalho e, por muitas vezes, me salvando das requisições de 24h de antecedência esquecidas.

À Prof^a. Dr. Vanja Maria Veloso por auxiliar nos cuidados com os animais.

Ao Prof. Dr. Gustavo Henrique Bianco de Souza por permitir a utilização das instalações do laboratório de Fitotecnologia. Ao Prof. Dr. Sidney Augusto Vieira Filho, carinhosamente conhecido por “Bibo”, e Dr. José Mario Barichello e aos demais integrantes do laboratório de Fitotecnologia sempre muito solícitos.

À técnica do laboratório de multiusuário do Cipharma/EF/UFOP Patrícia Capellari pelo auxílio na utilização do cromatógrafo líquido de alta eficiência.

Aos bioteristas Érica, Lílian, Hugo e Renata pela assessoria nos pedidos e manutenção dos animais.

Aos professores da pós-graduação pelo conhecimento adquirido e aos colegas, em especial, Mônica Auxiliadora de Paula, Carlos Geraldo Campos de Melo e Walyson Costa.

Aos professores Marta de Lana e Luiz Fernando de Medeiros Teixeira pelas experiências compartilhadas durante esses anos.

À secretaria do CiPharma Mirela Pena Fagundes.

À Dr^a. Ivanildes Vasconcelos sempre disposta a transmitir seus conhecimentos.

À aluna de graduação Caroline de Oliveira Faria pela pipetagem noturna intensiva.

À minha mãe Rúbia Helena Perin de Melo que nunca mediu esforços para educar a mim e a meus irmãos, exemplo de força e superação. Obrigada pela confiança e amor incondicional! Minhas realizações não seriam possíveis sem seu apoio.

Aos meus amados irmãos Fábio Rúbio e Júlio César Perin de Melo, obrigada por sempre estarem comigo. A caminhada na estrada da vida seria muito mais difícil sem vocês.

Aos meus familiares por sempre se fazerem presentes.

Ao Gabriel Erenha Albigante pelo carinho, compreensão e paciência nos momentos de cansaço e nervosismo.

À amiga Janaína Brandão Seibert pela cumplicidade, empatia e alto astral de todos os dias.

À República Doce Mistura pelos ensinamentos de convivência, respeito e irmandade e pelos momentos de diversão e leveza propiciados.

RESUMO

O benznidazol (BNZ) é o único fármaco empregado no tratamento da doença de Chagas no Brasil. Parte da ineficiência do BNZ pode estar relacionada a sua distribuição inadequada entre os tecidos. Portanto, o objetivo deste trabalho foi monitorar e avaliar os perfis farmacocinéticos do BNZ em amostras de plasma e tecidos de camundongos. Para isso foi desenvolvido e validado um método bioanalítico utilizando CLAE-UV destinado a quantificar o BNZ e o padrão interno em matrizes biológicas previamente tratadas pela extração líquido-líquido com acetato de etila e validado de acordo com as especificações da *European Medicines Agency – Science Medicines Health* (EMA). O método desenvolvido foi linear na faixa de concentração de 0,1 a 100,0 µg/mL para o baço, cérebro, coração, cólon, duodeno, plasma, pulmão e rim e 0,2 a 100,0 µg/mL para estômago e fígado e demonstrou ser sensível com resultados precisos e exatos. Além disso, constatou-se a estabilidade do BNZ ao ser submetido a diferentes condições de manipulação exigidas pelo método. Para os estudos de farmacocinética e biodistribuição foram utilizados cinquenta camundongos *Swiss*, fêmeas, com trinta dias de idade, necropsiados nos tempos de 0,16; 0,33; 0,50; 0,75; 1; 2; 3; 4; 5 e 6 hs após a administração, por gavagem, de uma dose única de 100 mg/kg de BNZ, após jejum de doze horas. Os parâmetros farmacocinéticos foram determinados aplicando o modelo monocompartimental. A absorção do BNZ foi relacionada com os dados de área sob a curva (ASC), concentração plasmática máxima ($C_{máx}$) e o tempo para atingir a concentração máxima ($t_{máx}$). A distribuição reversível do fármaco da circulação para os tecidos e órgãos foi relacionada ao volume de distribuição (Vd/F). O metabolismo do fármaco foi representado pela meia-vida de eliminação ($t_{1/2\beta}$) e sua excreção pelo *Clearance* (Cl/F). Além disso, foi calculado o tempo médio de residência (TMR). Os parâmetros farmacocinéticos confirmam a rápida absorção do BNZ, quando administrado por via oral e os parâmetros de biodistribuição demonstraram que, em geral, apesar das concentrações nos órgãos terem sido diferentes, a $t_{1/2\beta}$ e o TMR foram semelhantes: plasma ($C_{máx}=41,61\mu\text{g/mL}$; $t_{máx}=0,83\text{h}$; $MRT=3,86\text{h}$; $t_{1/2\beta}=2,03\text{h}$; $Vd/F=38,81\text{mL}$; $Cl/F=13,29\text{mL/h}$), estômago ($C_{máx}=127,95\mu\text{g/mL}$; $t_{máx}=0,67\text{h}$ e $MRT=2,66\text{h}$), pulmão ($C_{máx}=34,58\mu\text{g/mL}$; $t_{máx}=0,63\text{h}$ e $MRT=2,74\text{h}$), coração ($C_{máx}=21,68\mu\text{g/mL}$; $t_{máx}=0,67\text{h}$ e $MRT=2,42\text{h}$), cólon ($C_{máx}=18,11\mu\text{g/mL}$; $t_{máx}=0,67\text{h}$ e $MRT=2,03\text{h}$), baço ($C_{máx}=27,73\mu\text{g/mL}$; $t_{máx}=0,58\text{h}$ e $MRT=1,79\text{h}$), duodeno ($C_{máx}=8,48\mu\text{g/mL}$; $t_{máx}=0,83\text{h}$ e $MRT=2,14\text{h}$), cérebro ($C_{máx}=12,39\mu\text{g/mL}$; $t_{máx}=0,75\text{h}$ e $MRT=2,01\text{h}$), rim ($C_{máx}=6,98\mu\text{g/mL}$; $t_{máx}=0,49\text{h}$ e $MRT=2,00\text{h}$) e fígado ($C_{máx}=1,76\mu\text{g/mL}$; $t_{máx}=0,75\text{h}$ e $MRT=3,41\text{h}$). A biodistribuição do BNZ ocorre de maneira ampla, atingindo altas concentrações inclusive nos órgãos de maior relevância na infecção pelo *Trypanosoma cruzi*, coração e cólon.

Palavras-chave: farmacocinética, biodistribuição e benznidazol.

ABSTRACT

The benznidazole (BNZ) is the only drug employed in the treatment of Chagas disease in Brazil. A part of BNZ inefficiency could be related to its inadequate distribution between the tissues. Thus, the aim of this work was to monitor and evaluate the pharmacokinetic profiles of BNZ in samples of plasma and tissues of mice. For this, a bioanalytic method was developed and validated, using HPLC-UV destined to quantify the BNZ and the internal standard in biological matrices previously treated by the liquid-liquid extraction with ethyl acetate and validated according to the specifications of *European Medicines Agency – Science Medicines Health* (EMA). The method developed was linear over the concentration range of 0,1 to 100,0 µg/mL for the spleen, brain, heart, colon, duodenum, plasm, lung and kidney and 0,2 a 100,0 µg/mL for the stomach and liver and demonstrated that is sensitive with accurate and exacts results. Furthermore, it was found the BNZ stability when subjected to different conditions of manipulation required by the method. For the pharmacokinetic studies and biodistribution, it was used fifty *Swiss* female mice, with thirty days of life, necropsied in times of 0,16; 0,33; 0,50; 0,75; 1; 2; 3; 4; 5 and 6 hours after the administration, by gavage, of an only dose of 100 mg/kg of BNZ, after fasting of twelve hours. The pharmacokinetic parameters were determined applying the unicompartamental model. The absorption of BNZ was related to the data of area under the curve (AUC), maximal concentration in plasma ($C_{m\acute{a}x}$) and the time to occurrence of concentration maximal ($t_{m\acute{a}x}$). The reversible distribution of the drug of circulation to the tissues and organs was related to the distribution volume (V_d/F). The drug metabolism was represented by elimination half-life ($t_{1/2\beta}$) and its excretion by *Clearance* (Cl/F). Furthermore, the residence mean time (MRT) was calculated. The pharmacokinetic parameters confirmed BNZ rapid absorption when administered orally and the biodistribution parameters showed that, in general, although the concentrations in the organs were different, the $t_{m\acute{a}x}$ and MRT were similar. The BNZ that was found in plasm and tissues presented the following pharmacokinetic parameters: plasm ($C_{m\acute{a}x}=41,61\mu\text{g/mL}$; $t_{m\acute{a}x}=0,83\text{h}$; $\text{MRT}=3,86\text{h}$; $t_{1/2\beta}=2,03\text{h}$; $V_d/F=38,81\text{mL}$; $Cl/F=13,29\text{mL/h}$), stomach ($C_{m\acute{a}x}=127,95\mu\text{g/mL}$; $t_{m\acute{a}x}=0,67\text{h}$ e $\text{MRT}=2,66\text{h}$), lung ($C_{m\acute{a}x}=34,58\mu\text{g/mL}$; $t_{m\acute{a}x}=0,63\text{h}$ e $\text{MRT}=2,74\text{h}$), heart ($C_{m\acute{a}x}=21,68\mu\text{g/mL}$; $t_{m\acute{a}x}=0,67\text{h}$ e $\text{MRT}=2,42\text{h}$), c3lon ($C_{m\acute{a}x}=18,11\mu\text{g/mL}$; $t_{m\acute{a}x}=0,67\text{h}$ e $\text{MRT}=2,03\text{h}$) spleen ($C_{m\acute{a}x}=27,73\mu\text{g/mL}$; $t_{m\acute{a}x}=0,58\text{h}$ e $\text{MRT}=1,79\text{h}$), duodenum ($C_{m\acute{a}x}=8,48\mu\text{g/mL}$; $t_{m\acute{a}x}=0,83\text{h}$ e $\text{MRT}=2,14\text{h}$), brain ($C_{m\acute{a}x}=12,39\mu\text{g/mL}$; $t_{m\acute{a}x}=0,75\text{h}$ e $\text{MRT}=2,01\text{h}$), kidney ($C_{m\acute{a}x}=6,98\mu\text{g/mL}$; $t_{m\acute{a}x}=0,49\text{h}$ e $\text{MRT}=2,00\text{h}$) e liver ($C_{m\acute{a}x}=1,76\mu\text{g/mL}$; $t_{m\acute{a}x}=0,75\text{h}$ e $\text{MRT}=3,41\text{h}$). The biodistribution of BNZ occurs broadly, reaching high concentrations in the most relevant bodies in *Trypanosoma cruzi* infection, heart and colon.

Keywords: Pharmacokinetic, biodistribution and benznidazole.

LISTA DE ABREVIATURAS

ADME	Absorção, distribuição, metabolismo e excreção
ACN	Acetonitrila
ASC	Área sob a curva
ASMC	Área sob a curva do primeiro momento estatístico
BNZ	Benznidazol
CCA	Centro de Ciência Animal
CAS	<i>Chemical Abstracts Service</i>
Cl	<i>Clearance</i>
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
C_{máx}	Concentração máxima
CQ	Controle de qualidade
CQA	Controle de qualidade de alta concentração
CQB	Controle de qualidade de baixa concentração
CQM	Controle de qualidade de média concentração
CV	Coefficiente de variação
DTN	Doenças Tropicais Negligenciadas
F	Biodisponibilidade
ELL	Extração líquido-líquido
ERP	Erro relativo padrão
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i>
k_a	Constante de absorção
k_{el}	Constante de eliminação
LIQ	Limite inferior de quantificação
LSQ	Limite superior de quantificação
TMR	Tempo médio de residência

NFX	Nifurtimox
OPZ	Omeprazol
PBS	Tampão fosfato-salino (<i>phosphate buffered saline</i>)
PI	Padrão interno
ROS	Espécies reativas de oxigênio (<i>reactive oxygen species</i>)
t_{1/2β}	Meia-vida de eliminação
t_{máx}	Tempo para concentração máxima
UV	Ultravioleta
Vd	Volume de distribuição

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estrutura química do benznidazol.....	16
Figura 2: Fluxograma do desenvolvimento e validação do método bioanalítico	26
Figura 3: Recuperação dos padrões analíticos.....	35
Figura 4: Cromatograma dos padrões de BNZ e OPZ em acetonitrila nas concentrações de 10,0 e 30,0 µg/mL, respectivamente.....	35
Figura 5: Cromatogramas referentes às análises em amostra branca de plasma, coração, fígado, baço e cólon obtidos de animais sadios, sem a administração de BNZ comparados ao perfil cromatográfico de amostras brancas de cada órgão adicionada com o padrão analítico no LIQ, a 0,1 µg/mL e 0,2 µg/mL e o PI a 30 µg/mL.....	37
Figura 6: Cromatogramas referentes às análises em amostras brancas de duodeno, estômago, pulmão, rim e cérebro, obtidos de animais sadios, sem a administração de BNZ, comparado ao perfil cromatográfico de amostras brancas de cada órgão, adicionada com o padrão analítico no LIQ.....	38
Figura 7: Gráficos de linearidade do método bioanalítico para a quantificação de BNZ em plasma e tecidos.....	41
Figura 8: Delineamento experimental para a avaliação da farmacocinética e biodistribuição do BNZ.....	48
Figura 9: Cromatogramas da determinação de BNZ em amostra de animais tratados por via oral com 100 mg/kg em regime de dose única	52
Figura 10: Cromatogramas da determinação de BNZ em amostra de animais tratados por via oral com 100 mg/kg em regime de dose única.....	53
Figura 11: Concentração de BNZ no plasma e em diferentes tecidos de camundongos <i>Swiss</i> tratados com única dose de 100 mg/Kg por via oral em função do tempo.....	57

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Volumes utilizados para o preparo das soluções de trabalho nas concentrações reais referente aos valores da curva de calibração.....	28
Tabela 2: Volumes utilizados para o preparo das soluções de trabalho nas concentrações reais para obtenção das concentrações de 0,1 a 0,25 µg/mL de BNZ	28
Tabela 3: Erro relativo padrão (ERP%) referente a aplicação de diferentes pesos para as concentrações da curva de calibração do cérebro.....	39
Tabela 4: Erro relativo padrão (ERP%) referente a aplicação de diferentes pesos para as concentrações da curva de calibração do plasma	39
Tabela 5: Erro relativo padrão (ERP%) referente a aplicação do peso 1/x para as concentrações das curvas de calibração dos diferentes tecidos	40
Tabela 6: Comparação das equações de reta (coeficiente angular, linear e correlação linear) obtidas por regressão linear e regressão ponderada para os diferentes tecidos...	40
Tabela 7: Precisão e exatidão intra e inter-ensaios de amostras processadas no LIQ, CQB, CQM, CQA, sequencialmente obtidos, para validação do método desenvolvido	43
Tabela 8: Estabilidade de curta duração, pós-processamento, ciclos de congelamento e longa duração das amostras processadas no CQB e CQA para validação do método desenvolvido.....	44
Tabela 9: Parâmetros farmacocinéticos do BNZ no plasma de camundongos tratados com uma única dose de 100 mg/Kg por via oral	51
Tabela 10: Parâmetros farmacocinéticos do BNZ em plasma e tecido de camundongos tratados com uma única dose de 100 mg/Kg por via oral (média ±desvio padrão, n=5)	54
Tabela 11: Concentração de BNZ em função do tempo, determinadas em amostras de plasma, coração, fígado, baço e cólon de camundongos <i>Swiss</i> tratados com 100 mg/Kg em regime de dose única, por via oral (n=5)	55
Tabela 12: Concentração de BNZ em função do tempo, determinadas em amostras de duodeno, estômago, pulmão, rim e cérebro de camundongos <i>Swiss</i> tratados com 100 mg/Kg em regime de dose única, por via oral (n=5).....	56

SUMÁRIO

RESUMO	iii
ABSTRACT	iv
LISTA DE ABREVIATURAS.....	v
LISTA DE FIGURAS	vii
LISTA DE TABELAS	viii
<i>Parte I: Introdução e objetivo geral</i>	11
1 INTRODUÇÃO	12
1.1 Doença de Chagas	12
1.2 Tratamento da doença de Chagas	14
1.3 Farmacocinética e biodistribuição	17
1.3.1 Desenvolvimento do método bioanalítico	17
1.3.2 Validação	18
1.3.3 Parâmetros farmacocinéticos	18
2. OBJETIVO GERAL.....	21
<i>Parte II: Desenvolvimento e validação do método bioanalítico</i>	22
3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	23
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	24
4.1 Animais.....	24
4.1.1 Necropsia, coleta e preparo de material para validação.....	24
4.2 Substâncias químicas de referência	24
4.2.1 Padrão do analito	24
4.2.2 Padrão interno	25
4.3 Desenvolvimento de um novo método bioanalítico para a quantificação do benznidazol em plasma e tecido de camundongos	25
4.3.1 Condições cromatográficas.....	25
4.4 Extração e concentração de compostos presentes na matriz	26
4.5 Preparo dos padrões de calibração.....	27
4.6 Validação do método para quantificação do benznidazol	28
4.6.1 Seletividade	29
4.6.2 Efeito residual (Carry-over).....	29
4.6.3 Limite inferior de quantificação.....	29
4.6.4 Linearidade (curva de calibração).....	30
4.6.5 Precisão.....	30
4.6.6 Exatidão	31
4.6.7 Estabilidade.....	32
5 RESULTADOS	34
5.1 Padrão interno	34
5.2 Extração e concentração de compostos presentes na matriz	34
5.3 Condições cromatográficas.....	35
5.4 Validação do método para quantificação do benznidazol	36
5.4.1 Seletividade e efeito residual.....	36
5.4.2 Linearidade (curva de calibração).....	39
5.4.3 Precisão e exatidão	42
5.4.4 Estabilidade.....	42
<i>Parte III: Avaliação da farmacocinética e biodistribuição em camundongos tratados com benznidazol</i>	45
6 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	46
7 MATERIAL E MÉTODOS.....	47
7.1 Fármaco	47

7.2 Animais.....	47
7.3 Esquema de tratamento.....	47
7.4 Necropsia, coleta e preparo das amostras para os estudos de farmacocinética e biodistribuição	47
7.5 Quantificação do benznidazol no plasma e tecido.....	48
7.6 Parâmetros farmacocinéticos.....	49
7.7 Biodistribuição	50
7.8 Análise dos dados farmacocinéticos.....	50
8 RESULTADOS	51
8.1 Aplicação do método para quantificação do benznidazol em plasma e órgãos.....	51
8.1.1 Avaliação farmacocinética.....	51
8.1.2. Biodistribuição.....	54
<i>Parte IV: Discussão e conclusão.....</i>	58
9 DISCUSSÃO.....	59
10 CONCLUSÃO.....	67
11 REFERÊNCIAS	68
ANEXO 1 – PROTOCOLO 2013/59 CEUA-UFOP	75

Parte I:
Introdução e objetivo geral

1 INTRODUÇÃO

1.1 Doença de Chagas

No cenário mundial as chamadas “Doenças Tropicais Negligenciadas” (DTN) englobam 17 enfermidades e são endêmicas em aproximadamente 149 países/territórios do globo. No grupo das DTN figuram enfermidades de clima tropical que estão diretamente relacionadas às péssimas condições de moradia e higiene, provenientes de uma sociedade com baixo desenvolvimento socioeconômico, sem voz política e com reduzida visibilidade perante o resto do mundo (OMS, 2010).

A tripanossomíase americana, doença de Chagas, está inclusa entre as DTN sendo endêmica em 21 países da América Latina (OMS, 2010), sendo o protozoário hemoflagelado *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*) o agente etiológico da doença de Chagas. Acredita-se que 90 milhões de pessoas que moram nessas áreas estão expostas a infecção (COURA & DIAS, 2009) e 7-8 milhões estão infectadas pelo *T. cruzi* (OMS, 2014). Nas áreas endêmicas, a infecção dos seres humanos pelo *T. cruzi* ocorre, principalmente, durante ou após o repasto sanguíneo do triatomíneo, chamado popularmente de “barbeiro” (GOLGHER & GAZZINELLI, 2004).

O ciclo do parasito consiste de dois ciclos interligados: o ciclo no triatomíneo, vetor, e o ciclo em seres humanos e outros mamíferos, hospedeiro vertebrado. Dependendo da etapa no ciclo biológico, o *T. cruzi* pode se apresentar em diferentes estágios morfológicos (ANDRADE & ANDREWS, 2005; BRENER, 1987; CHAGAS, 1909).

Graças a um conjunto de medidas que combina a utilização de inseticidas com educação voltada à saúde pública, a transmissão por vetores tem sido interrompida no Cone Sul e novas infecções pelo *T. cruzi* em todo o continente tem diminuído em mais de 70 % (MONCAYO, 2003).

Quando analisamos a doença de Chagas de forma global notamos que esta enfermidade não se restringe aos países endêmicos, sendo cada vez maior a notificação de casos em áreas não endêmicas como Europa, Austrália e Japão (GASCON, BERN e PINAZO, 2010). Esta nova realidade dá-se devido à internacionalização das relações humanas, sendo estas localidades os principais destinos da migração latina americana. Nas regiões não-endêmicas a infecção vetorial perde importância e passa a serem as infecções congênitas, por transplante de órgãos e transfusão sanguínea, importantes formas de

contaminação (SCHMUNIS, 2007). Neste contexto, a doença de Chagas é um problema epidemiológico, político, social e econômico mundial.

Os indivíduos infectados pelo *T. cruzi* apresentam uma fase aguda onde há uma sintomatologia inespecífica representada por febre, taquicardia, linfadenopatia, esplenomegalia leve e linfocitose. Além disso, podem ocorrer sinais devido à entrada do parasito como edema bipalpebral unilateral (sinal de Romana) e chagoma de inoculação. Nesta fase a parasitemia é patente sendo a doença facilmente diagnosticada por exame de sangue a fresco. Todavia, devido à ausência de manifestações clínicas características isso raramente ocorre e os sintomas em sua maioria cessam sem necessidade de intervenção médica. Extra-sístole ventricular e fibrilação auricular são raras e indicam um mau prognóstico. Cerca de 5-10% dos pacientes vão a óbito devido a lesões no sistema nervoso central com edema e congestão (encefalomielite) ou insuficiência cardíaca congestiva, na fase aguda a morte súbita ocorre raramente. Ao término de três meses de infecção inicia-se a fase crônica caracterizada por parasitemia subpatente, podendo o paciente permanecer por toda a vida na forma indeterminada. Os pacientes com a forma indeterminada da doença de Chagas apresentam exames sorológicos positivos, com raio-X do coração, esôfago e cólon normais, além de não haver alterações no eletrocardiograma convencional. Após um longo período sem manifestações clínicas, 20-30% dos pacientes infectados pelo *T. cruzi* irão evoluir para a forma cardíaca podendo apresentar cardiomegalia, arritmias ou insuficiência cardíaca congestiva devido à miocardiopatia inflamatória fibrosante, que resultará em danos permanentes no coração, sendo frequentes os casos de morte súbita. Já a forma digestiva ou mista ocorre em 8-10% dos casos. Os pacientes com a forma digestiva possuem redução dos movimentos peristálticos, disfagia e apresentam megacólon e/ou megaesôfago. Alterações psíquicas na fase crônica já foram relatadas, todavia não é aceita como uma forma clínica. As causas que levam um indivíduo a desenvolver determinada forma clínica ainda são pouco conhecidas (PRATA, 2001; BRENER, 1987; ANDRADE, 1985).

Estima-se que o Brasil deixa de faturar anualmente 5,6 milhões de dólares devido a perda da produtividade dos pacientes chagásicos. Este prejuízo chega a 1,2 bilhões de dólares quando reunimos os sete países mais ao sul da América Latina (OMS, 2010). As quantias gastas no tratamento destes doentes são ainda maiores. Um levantamento realizado na Colômbia mostrou que o estado desembolsa anualmente cerca de 267 milhões de dólares para tratar os pacientes crônicos (US\$1.028/paciente) (CASTILLO-RIQUELME *et al.*, 2008).

1.2 Tratamento da doença de Chagas

As buscas por medicamentos eficazes contra o *T. cruzi* iniciaram logo após o descobrimento da infecção e permanece até os dias de hoje. Coura & De Castro (2002) apresentam num artigo de revisão toda a evolução no tratamento da doença de Chagas. Até 1935 os compostos utilizados foram o Atoxil (arsenical), fucsina (um corante da rosanilina), tártaro emético (antimonial pentavalente) e cloreto de mercúrio. Entre os anos de 1936-1960 foram utilizados os derivados de quinoleínas e vários outros antimaláricos, arsenobenzóis e outros arsemicais, fenantridinas, sais de ouro, bismuto, cobre e de zinco, iodeto de sódio, violeta de genciana, aminopterinas, ácido para-aminosalicílico, hidrazida do ácido nicotínico, sulfonamidas, anti-histamínicos, hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) e cortisona, derivados da estilomicilina, anfotericina B e mais de 30 antibióticos. Finalmente, nas décadas de 60 e 70 os fármacos nifurtimox (NFX) e benznidazol (BNZ) foram introduzidos na terapêutica de forma empírica, mas são utilizados até os dias atuais (URBINA, 2002).

O NFX foi lançado pela Bayer com o nome de Lampit[®] em 1967 e atualmente é produzido em El Salvador (SCHOFIELD, JANNIN e SALVATELLA, 2006). Devido aos efeitos colaterais maiores e mais intensos somado a uma menor eficácia quando comparado ao BNZ, a comercialização do NFX foi suspensa no Brasil, Argentina, Chile e Uruguai na década de 80 (BERN, 2011; COURA & DE CASTRO, 2002). Nesses países o BNZ passou a ser o único fármaco utilizado no tratamento da doença de Chagas. Lançado em 1972 com o nome de Rochagan[®] no Brasil e Radanil[®] na Argentina, o BNZ teve sua tecnologia de produção cedida pela Roche ao Brasil e, atualmente, é fabricado pelo Laboratório Farmacêutico do Estado de Pernambuco (Lafepe) (LAFEPE, 2007; SCHOFIELD, JANNIN e SALVATELLA, 2006). Nos países não endêmicos como Espanha, Portugal e França o BNZ não possui registro, todavia está disponível através de fontes governamentais (GASCON, BERN e PINAZO, 2010).

A ação do NFX contra o *T. cruzi* está associada a produção de altas concentrações de espécies reativas de oxigênio (ROS). O NFX atua reduzindo intracelularmente o grupo nitro a radicais nitroânion instáveis, que por sua vez, reagem para produzir metabólitos de oxigênio reduzidos altamente tóxicos como superóxido $O_2^{\cdot-}$ e peróxido H_2O_2 (DOCAMPO & MORENO 1986). Por outro lado, o mecanismo de ação do BNZ não está associado com a geração de níveis significativos de ROS. Sugere-se que o grupo nitro é reduzido a grupo

amino, pela ação de enzimas do tipo nitroredutases, resultando na formação de radicais livres intermediários bem como em metabólitos eletrofílicos, que envolve a ligação covalente de macromoléculas como o DNA, proteínas e lipídios, afetando assim o metabolismo da tripanotona do *T. cruzi* (RIBEIRO *et al.*, 2010; DOCAMPO, 1990; DOCAMPO & MORENO, 1986). Acredita-se que os metabólitos provenientes da biotransformação desses fármacos apesar de responsáveis pelo combate ao protozoário *T. cruzi* também provocam o surgimento dos efeitos secundários tóxicos no hospedeiro (CASTRO, MECCA e BARTEL, 2006).

O BNZ (**Figura 1**) (N-benzil-2-nitro-1H-imidazol-1-acetamida; $C_{12}H_{12}N_4O_3$; MM=260,2g/mol) é um composto de Classe 4 no Sistema de Classificação Biofarmacêutica, ou seja, possui baixa solubilidade e baixa permeabilidade (MAXIMIANO *et al.*, 2010; MARTINDALE, 2005).

Após a administração oral, o BNZ tem absorção rápida e praticamente total alcançando concentrações plasmáticas máximas entre 2–4 horas, sendo observado picos de concentração plasmática de 2,2–2,8 $\mu\text{g/mL}$ entre 3–4 h após a administração oral em indivíduos saudáveis. A sua meia-vida de eliminação plasmática é de aproximadamente 12 horas, sendo encontrado no organismo principalmente sob a forma inalterada. O BNZ é eliminado por biotransformação no fígado com apenas 20% da dose excretada na urina sob a forma inalterada, o restante apresenta-se como os metabólitos 2-amino-imidazol e o 2-hidroxi-imidazol (RAETHER & HANEL, 2003; RAAFLAUB & ZIEGLER, 1979).

Disponível em comprimidos de 100 mg, a posologia consiste na administração oral e diária de 5 mg/kg (adulto) e 5–10 mg/kg (criança) dividida em duas ou três tomadas diárias, com regime de tratamento de 60 dias, não excedendo 300 mg/dia (LAFEPE, 2013; MARTINDALE, 2005). Para evitar fracionamento dos comprimidos, crianças de até dois anos de idade devem ser tratadas com BNZ infantil, apresentação de 12,5 mg, por possibilitar administração adequada da dose e facilitar no tratamento por dispersar em líquido. Para experimentos em modelo murino a dose utilizada é de 100 mg/kg, via oral por 20 dias.

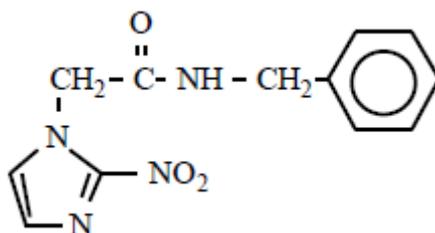


Figura 1: Estrutura química do benznidazol

Durante o tratamento com BNZ, podem surgir reações adversas que são classificadas em três grupos: 1) Sintomas de hipersensibilidade, dermatite com erupções cutâneas (que surgem entre o 7º e o 10º dia de tratamento), febre, edema, linfadenopatia, dor muscular e nas articulações; 2) Depressão de medula óssea, trombocitopenia púrpura e agranulocitose, nas manifestações mais severas; 3) Polineuropatia, parestesia e polineurite dos nervos periféricos (COURA & DE CASTRO, 2002). Somado aos efeitos adversos da terapia, tem-se que, apesar do tratamento da fase aguda da doença de Chagas com BNZ reduzir a letalidade da doença, o agravamento do quadro clínico e, em certa porcentagem, levar a cura (65–80%) (BERN, 2011; CANÇADO, 1991), o tratamento na fase crônica, ainda que apresente um efeito protetor sobre a evolução clínica da doença é capaz de curar em apenas 37% dos casos (FABBRO *et al.*, 2007; GARCIA *et al.*, 2005). Em estudo recente foi observado que pacientes tratados com o BNZ alcançaram altas taxas de soroconversão (16/17 pacientes), havendo falha de terapêutica em apenas 5,9% dos casos (MOLINA *et al.*, 2014). Além disso, a eficácia terapêutica do BNZ e do NFX é dependente do tipo de cepa do *T. cruzi*, uma vez que há cepas mais resistentes que outras. Como cada área endêmica possui um predomínio de determinada cepa, o tratamento escolhido deve levar em conta a região geográfica (ANDRADE *et al.*, 1985).

Nesse sentido, um fármaco ideal para o tratamento da doença de Chagas deve promover a cura parasitológica para casos agudos e crônicos, ser eficaz em dose única ou em poucas doses, ser de baixo custo para o paciente, não apresentar efeitos colaterais ou teratogênicos, não ser necessário internação hospitalar e não induzir resistência (COURA & DE CASTRO, 2002). Assim, devido às limitações do tratamento com o BNZ, este não é o medicamento ideal, todavia, é o tratamento de primeira linha para a doença de Chagas (RASSI Jr, RASSI e MARIN-NETO, 2010). Esta situação impulsiona a busca por novos compostos ou novas formulações do BNZ mais eficientes.

1.3 Farmacocinética e biodistribuição

1.3.1 Desenvolvimento do método bioanalítico

A análise de fármacos em meio biológico é uma atividade complexa devido aos compostos endógenos e/ou outros fármacos administrados concomitantemente com o analito. Frente a essa realidade, o pré-tratamento da matriz (abrangendo as etapas de extração, pré-concentração e purificação) é fundamental para eliminar os interferentes e melhorar a sensibilidade e seletividade analítica do método (QUEIROZ & LANÇAS, 2005). Há diversas técnicas para a extração e/ou concentração de compostos presentes em matriz biológica como: extração líquido-líquido, extração em fase sólida, extração com fluido supercrítico, extração com membranas sólidas (diálise e ultrafiltração) ou líquidas e precipitação de proteínas (ALNOUTI *et al.*, 2005; BARRIONUEVO & LANÇAS, 2001; QUEIROZ, 2001). Deve-se escolher uma técnica de extração que seja simples, rápida, de baixo custo, capaz de gerar extratos relativamente livres de interferentes e ter adequada recuperação com boa precisão e exatidão para o analito estudado (QUEIROZ, 2001).

A extração líquido-líquido (ELL) é uma técnica clássica muito utilizada por gerar extratos de alta seletividade e baixa sujidade, cuja eficiência depende da afinidade entre soluto/solvente, da razão das fases e do número de extrações. A ELL tem como desvantagens a necessidade de solventes ultrapuros (impurezas do solvente são retidas e concentradas), utilização de solventes tóxicos e elevado volume de amostra e solvente a serem descartados. Por outro lado, possui como vantagens a simplicidade da técnica, a possibilidade de se utilizar uma variedade de solventes (ampla faixa de solubilidade e seletividade) e causa a desnaturação de proteínas, excluindo possíveis contaminações da coluna cromatográfica (QUEIROZ, 2001).

Na literatura são encontrados vários métodos empregando CLAE-UV para a quantificação do BNZ em matriz biológica tanto em modelo animal (MOREIRA DA SILVA *et al.*, 2012; BULFFER, CASTRO e FANELLI, 2011; SILVA *et al.*, 2007; MORILLA, PRIETO e ROMERO, 2005; MORILLA *et al.*, 2003; WORKMAN, *et al.*, 1984) quanto em amostra de urina, leite e plasma humano (MARSÓN *et al.*, 2013 (a) e (b); GUERRERO *et al.*, 2010).

A CLAE é uma técnica analítica de separação bastante utilizada devido a sensibilidade, ampla aplicabilidade, fácil adaptação para determinações quantitativas, além da

sua adequação à separação de espécies não-voláteis ou termicamente frágeis (SKOOG *et al.*, 2011). Entretanto, o desenvolvimento de um método cromatográfico nem sempre é uma tarefa simples, visto que um número substancial de parâmetros influencia no resultado final (ARDREY, 2003).

1.3.2 Validação

Para garantir confiabilidade nos resultados obtidos experimentalmente, são realizados estudos prévios que comprovem as aplicações analíticas do método escolhido (BRASIL, 2003). Essa avaliação denominada “Validação” é um processo contínuo que começa no planejamento da estratégia analítica e continua ao longo de todo o seu desenvolvimento e transferência (RIBANI *et al.*, 2004). Órgãos e agências regulatórias do Brasil, Estados Unidos e Europa orientam sobre a validação de métodos bioanalíticos aplicados na análise de fármacos em matriz biológica. Estas recomendações são ajustadas ou modificadas dependendo da metodologia utilizada. Entretanto, os parâmetros de desempenho analítico mais comumente analisados são: seletividade, efeito residual (*carry over*), precisão, exatidão, linearidade (curva de calibração), estabilidades, limite inferior de quantificação e recuperação (US-FDA, 2013; BRASIL, 2012; EMEA, 2011).

1.3.3 Parâmetros farmacocinéticos

A farmacocinética estuda, a partir de modelos matemáticos, a concentração do fármaco nos líquidos e tecidos do organismo ao longo do tempo. Para a interpretação do destino do fármaco no organismo são determinados os parâmetros farmacocinéticos (também conhecidos como constantes biológicas ou relações de proporcionalidade) por meio da aplicação de um modelo farmacocinético (compartimental ou não compartimental). Assim, a farmacocinética estuda em termos quantitativos os processos de absorção, distribuição, metabolismo (biotransformação) e excreção (ADME) de um fármaco (STORPIRTIS *et al.*, 2011).

Após a etapa de quantificação do fármaco obtêm-se o perfil de concentração em relação ao tempo que é uma função da taxa e da extensão do processo de ADME. A absorção de fármacos administrados por via oral (ex. BNZ) está relacionada a permeabilidade pela mucosa do trato gastrointestinal e a passagem pelo sistema porta hepático (metabolismo de primeira passagem). Os principais parâmetros relacionados com a absorção são: exposição

sistêmica total, medida através da área sob a curva (ASC); concentração plasmática máxima ($C_{máx}$) e o tempo para atingir a concentração máxima ($t_{máx}$). Após a absorção do fármaco os fenômenos de distribuição, metabolismo e excreção ocorrem simultaneamente.

O fármaco é distribuído reversivelmente da circulação para os tecidos e órgãos. Essa etapa é dependente do fluxo sanguíneo e linfático, da ligação do fármaco a proteínas plasmáticas, do coeficiente de partição e do pH tecidual. O parâmetro que melhor representa esta fase é o volume de distribuição (Vd), ou seja, o volume no qual o fármaco está diluído no organismo. A metabolização do fármaco geralmente ocorre por intermédio de várias enzimas que o transforma em um ou mais derivados e, por fim, tanto o fármaco como seu metabólito é removido de forma irreversível do organismo, principalmente através das vias renais. A metabolização e excreção juntas formam o processo de eliminação. O parâmetro farmacocinético que representa a velocidade na qual esse processo ocorre é a meia-vida de eliminação ($t_{1/2\beta}$) que é o tempo necessário para reduzir a quantidade do fármaco no plasma à metade e o parâmetro farmacocinético que representa a eficiência deste processo é o Clearance (Cl) (STORPIRTIS *et al.*, 2011; TOZER & ROWLAND, 2009; BOROUJERDI, 2002).

Após a administração de um fármaco algumas moléculas são eliminadas imediatamente e outras não. Isso porque o movimento de cada molécula é aleatório e independente. O tempo de permanência da molécula no organismo é uma variável aleatória que pode ser expressa como uma curva de distribuição normal, cuja média e variância refletem o comportamento global das moléculas. A probabilidade estatística de uma molécula percorrer o organismo e ser eliminada pode ser determinada pelo cálculo da área sob a curva do primeiro momento estatístico (ASCM). Esse dado permite estimar quantitativamente a persistência do fármaco no organismo pelo cálculo do tempo médio de residência (TMR) (STORPIRTIS *et al.*, 2011).

Os estudos da distribuição entre os diferentes órgãos (biodistribuição) do BNZ são escassos na literatura. Até o momento, existem dois trabalhos que descrevem esse tipo de análise, sendo que Workman e *cols.* (1984) analisaram o BNZ presente no cérebro e no fígado de camundongos e cães, enquanto que Morilla e *cols.* (2003) compararam a biodistribuição de BNZ livre com a do BNZ lipossomal no fígado, células vermelhas, pulmão, baço, rim, coração e rabo de ratos *wistar*.

Sendo assim, este trabalho é o primeiro a realizar a quantificação do BNZ em diferentes tecidos de camundongos *Swiss*. Através dele, iremos esclarecer o perfil cinético completo do BNZ em camundongos, avaliando, também, como esse fármaco se distribui pelo organismo murino e relacionando esta cinética ao tropismo do *T. cruzi*. Diante do exposto sobre a doença de Chagas e seu tratamento na atualidade, e sabendo que parte da ineficiência do BNZ pode estar relacionada a sua distribuição inadequada entre os tecidos, os resultados obtidos neste estudo serão comparados com futuros trabalhos que visam avaliar novas formulações contendo BNZ, já em desenvolvimento no projeto BERENICE “**BE**nznidazol and triazol **RE**search group for **N**anomedicine and **I**nnovation on **C**hagas **d**iseas**E**”.

2. OBJETIVO GERAL

Monitorar e avaliar os perfis farmacocinéticos e de biodistribuição do benznidazol.

Parte II:
*Desenvolvimento e validação do método
bioanalítico*

3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Desenvolver um método bioanalítico de quantificação do benznidazol em amostras de plasma e órgãos de camundongos;
- b) Validar a metodologia desenvolvida para baço, cérebro, coração, cólon, duodeno, estômago, fígado, plasma, pulmão e rim;

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Animais

Foram utilizados 60 camundongos *Swiss*, com 30 dias de idade, fêmeas, pesando 25 a 30 g, nascidos no Setor de Criação do Centro de Ciência Animal da Universidade Federal de Ouro Preto (CCA, UFOP), mantidos em ambiente controlado com ciclos regulares de luz, temperatura de 23 ± 2 °C e disponibilidade de água e alimento *ad libitum*. Todos os procedimentos foram realizados de acordo com os princípios éticos preconizados pelo SBCAL/COBEA (Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório), tendo sido aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Ouro Preto (Protocolo nº 2013/59 CEUA-UFOP - Anexo I).

4.1.1 Necropsia, coleta e preparo de material para validação

As amostras de sangue dos animais (400 µL) foram coletadas do plexo orbital e imediatamente submetidas a centrifugação (Eppendorf® 5810R) por 10 min / 8609 x g / 18° C para separação e coleta do plasma. Posteriormente, os animais foram eutanasiados por deslocamento cervical e foram coletados o baço, cérebro, cólon, coração, duodeno, estômago, fígado, pulmão e rins *in totum* que foram lavados em tampão fosfato-salino (PBS / pH 7,4), secos em papel de filtro, pesados e armazenados em *freezer* -80 °C. Posteriormente, os tecidos foram macerados (Qiagen® TissueLyser II) com PBS (pH 7,4) na proporção 1 grama de tecido para 2 mL de PBS. Foram preparados os *pools* de cada tecido e os mesmos armazenados em *freezer* -80 °C.

4.2 Substâncias químicas de referência

4.2.1 Padrão do analito

O analito é o composto químico de interesse a ser mensurado em uma matriz (BRASIL, 2012). O analito utilizado neste trabalho é o fármaco anti-chagásico benznidazol.

4.2.2 Padrão interno

Devido as diversas etapas de tratamento da amostra no método bioanalítico desenvolvido, optou-se por utilizar padronização interna para corrigir possíveis variações de resultados em função da manipulação da amostra (CASSIANO, 2009). Nas amostras de validação com diferentes concentrações do analito e nas amostras do experimento de farmacocinética e biodistribuição foi adicionada uma concentração fixa do padrão interno (PI).

Idealmente, a estrutura química utilizada como padrão interno deve ser similar à substância a ser quantificada (analito), ter tempo de retenção próximo a esta substância, não reagir com a substância ou outro componente da matriz, não fazer parte da amostra e, quando cromatografada, ficar separada das demais substâncias presentes na amostra (RIBANI, 2004). Foram testados atenolol, cafeína, cimetidina, dexametasona, diazepam, fenitoína, fenobarbital, ibuprofeno, metoprolol omeprazol e paracetamol como padrão interno (PI) para monitoramento do método de extração.

4.3 Desenvolvendo de um novo método bioanalítico para a quantificação do benznidazol em plasma e tecido de camundongos

A partir do estudo de trabalhos anteriores foi desenvolvido um método bioanalítico (**Figura 2**) para a quantificação do BNZ em plasma e tecido de camundongos (MARSÓN *et al.*, 2013 (a) e (b); MOREIRA DA SILVA *et al.*, 2012; BULFFER, CASTRO e FANELLI, 2011; GUERRERO *et al.*, 2010; SILVA *et al.*, 2007; MORILLA, PRIETO E ROMERO, 2005; MORILLA *et al.*, 2003; WORKMAN *et al.*, 1984). Esses trabalhos representaram um ponto de partida para o desenvolvimento de uma nova metodologia adequada para a análise do BNZ nos diferentes tecidos analisados.

4.3.1 Condições cromatográficas

As condições cromatográficas de temperatura (40 °C) e comprimento de onda (324 nm) foram embasadas em trabalhos anteriores (MOREIRA DA SILVA *et al.*, 2012; MORILLA *et al.*, 2003).

Foram testados diferentes volumes de injeção, sendo 15,0, 20,0, 25,0 e 30,0 µL e diferentes proporções de acetonitrila/água, sendo 70:30, 60:40, 50:50, 40:60, 35:65, 30:70,

25:75 (v/v) em fluxo de 0,8, 0,9 e 1,0 mL/min. As fases móveis foram filtradas em membrana de acetato de celulose, com 47 mm de diâmetro e poro de 0,22 μm e degaseificadas em banho ultrassônico (BRANSONIC® CPX3800H) por 30 min.

Foi utilizando um Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência (eWaters® 2695) do Laboratório Multiusuário do Cipharma, equipado com detector (UV Waters® 2489); Coluna analítica (C18 Phenomenex®, Gemini-NX, 150mm x 4,6mm x 5 μm) e Pré-coluna (C18 Phenomenex®, modelo AJ0-4287, 4mm x 3mm x 5 μm).

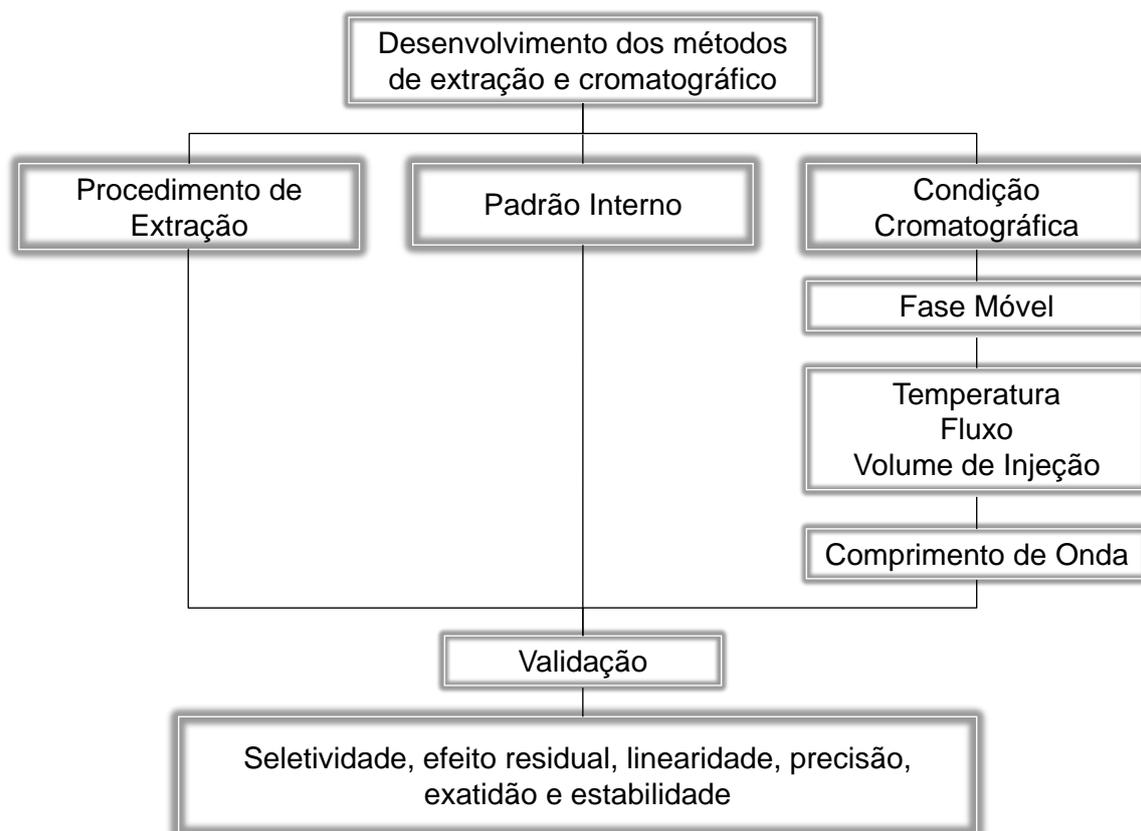


Figura 2: Fluxograma do desenvolvimento e validação do método bioanalítico

4.4 Extração e concentração de compostos presentes na matriz

Foi empregado o método de extração líquido-líquido (ELL) devido a sua simplicidade, disponibilidade de solvente e aos resultados positivos obtidos por Moreira da Silva e colaboradores (2012).

Foram avaliadas diferentes condições de extração utilizando o método ELL a partir de 90,0 μL de matriz biológica branca (proveniente de animais não tratados) adicionada com 5,0

μL do padrão do analito (BNZ) e 5,0 μL do padrão interno (OPZ), totalizando volume de 100,0 μL .

Como solvente extrator foram testados éter etílico PA (CROMOLINE[®]) e acetato de etila PA (TEDIA[®]), nos volumes de 1000,0 μL e 500,0 μL . Foram testados os tempos de 10 e 20 min de agitação a 2500 rpm (Vórtex IKA[®] Genius 3). Em todos os métodos de extração testados a amostra foi centrifugada por 10 min a 6973 x g (Eppendorf[®] 5418). Foi testado coletar 300,0 ou 400,0 μL fase orgânica. Em todos os métodos de extração testados a amostra foi seca à vácuo (Buchi[®] v-700). Foi testada ressuspensão da amostra em 100,0 μL de fase móvel e 200,0 μL de fase móvel e hexano (1:1). Em ambos os casos, a amostra foi agitada por 1 min em vórtex, centrifugada por 3 min a 6973 x g e em seguida foram coletados 80,0 μL do sobrenadante e transferidos para *vials* de vidro de 300 μL .

4.5 Preparo dos padrões de calibração

Curvas de calibração diárias foram obtidas a partir das soluções-padrão preparadas em acetonitrila nas concentrações de 0,1 a 100,0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de BNZ para baço, cérebro, cólon, coração, duodeno, pulmão, plasma e rim e de 0,2 a 100,0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de BNZ para estômago e fígado. Todos os pontos das curvas foram adicionados com OPZ a 30,0 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

A solução estoque do padrão do analito a 2 mg/mL foi preparada pesando 10,0 mg do padrão de BNZ (Balança Analítica Celta[®] FA-2104N) e completando o volume do balão volumétrico de 5,0 mL com acetonitrila (ACN).

As soluções de trabalho foram preparadas a partir da diluição da solução estoque (**Tabela 1**), com exceção das menores concentrações m preparadas a partir da diluição da solução de trabalho de 20,0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (**Tabela 2**). Para a escolha das amostras de controles de qualidade (CQ) o controle de qualidade de baixa concentração (CQB) deve ser até três vezes o limite inferior de quantificação (LIQ); o controle de qualidade de média concentração (CQM) deve estar próximo a média do intervalo da curva de calibração e o controle de qualidade de alta concentração (CQA) deve estar entre 75 e 85 % do limite superior de quantificação (LSQ) (BRASIL, 2012).

Tabela 1: Volumes utilizados para o preparo das soluções de trabalho nas concentrações reais referente aos valores da curva de calibração

Volume de solução estoque (µL)	Volume de acetona nitrila (µL)	Concentração real (µg/mL)	Concentração final em meio biológico (µg/mL) [#]	Amostra de controle de qualidade
–	–	2000	100	LSQ
750	250	1500	75	CQA
500	500	1000	50	CQM
250	750	500	25	-
100	900	200	10	-
10	990	20	1	-
5	995	10	0,5	CQB*

LSQ – Limite superior de quantificação

CQA – Controle de qualidade de alta concentração

CQM – Controle de qualidade de média concentração

CQB* – Controle de qualidade de baixa concentração para estômago e fígado.

[#]Referente a 5 uL da solução de trabalho para volume final de 100 µL.

Tabela 2: Volumes utilizados para o preparo das soluções de trabalho nas concentrações reais para obtenção das concentrações de 0,1 a 0,25 µg/mL de BNZ

Volume de solução de trabalho 20µg/ml (µL)	Volume de acetona nitrila (µL)	Concentração real (µg/mL)	Concentração final em meio biológico (µg/mL) [#]	Amostrade controle de qualidade
250	750	5	0,25	CQB**
200	800	4	0,2	LIQ*
100	900	2	0,1	LIQ**

CQB – Controle de qualidade de baixa concentração

LIQ – Limite inferior de quantificação

* para estômago e fígado

** para baço, cérebro, cólon, coração, duodeno, pulmão, plasma e rim.

[#]Referente a 5 uL da solução de trabalho para volume final de 100 µL.

A solução estoque do PI foi preparada em balão volumétrico de 5,0 mL à 1,0 mg/mL, pesando 5,0 mg do PI e completando o volume com ACN. A solução de trabalho foi preparada a partir de 600 µL da solução estoque diluída em 400µL de ACN. Ao pipetar 5 uL da solução de trabalho para 100 µL de volume final a concentração em meio biológico foi 30 µg/mL do PI.

4.6 Validação do método para quantificação do benznidazol

Para validar o método de quantificação adotou-se as diretrizes do guia da *European Medicines Agency – Science Medicines Health (EMA)* do ano de 2011. Desta maneira, foram

analisados os seguintes parâmetros: seletividade, efeito residual, limite inferior de quantificação, curva de calibração, precisão, exatidão e estabilidade.

4.6.1 Seletividade

Utilizando um método seletivo é possível diferenciar e quantificar o analito e o PI dos componentes endógenos da matriz e/ou demais componentes na amostra (BRASIL, 2012; EMEA, 2011). A seletividade interfere diretamente na linearidade, na precisão do método e na exatidão dos resultados obtidos (RIBANI, 2004).

Para os ensaios de seletividade foram analisadas individualmente seis amostras brancas de cada tecido e do plasma e avaliadas quanto aos possíveis interferentes.

Conforme especificado pela EMEA (2011) as amostras estarão dentro da normalidade se os componentes endógenos da matriz forem inferiores a 20 % do LIQ para o analito e menor de 5 % para o PI.

4.6.2 Efeito residual (Carry-over)

O efeito residual é o efeito gerado pelo surgimento ou aumento do sinal do analito ou do PI devido a interferentes provenientes de amostras anteriormente analisadas (BRASIL, 2012).

Para os ensaios de efeito residual foi injetada em HPLC, uma amostra branca antes e duas após uma amostra LSQ, procedimento esse realizado em triplicata.

Conforme especificado, o efeito residual presente na amostra branca deve ser inferior a 20% do LIQ para o BNZ e inferior a 5% para o OPZ (EMEA, 2011).

4.6.3 Limite inferior de quantificação

O LIQ corresponde a menor concentração do analito na curva de calibração que o método é capaz de quantificar de forma fidedigna (BRASIL, 2012; EMEA, 2011). Para a determinação do LIQ utilizou-se cinco amostras de concentrações decrescentes de BNZ até a menor concentração possível de ser quantificada com precisão e exatidão aceitáveis

A intensidade do sinal do BNZ na amostra LIQ deve ser pelo menos cinco vezes o sinal de uma amostra branca com precisão e exatidão $\pm 20\%$ do valor nominal (EMEA, 2011).

4.6.4 Linearidade (curva de calibração)

A linearidade de um método se refere a relação entre a resposta do sistema e a concentração do analito ao longo de um intervalo de concentração especificado (BRASIL, 2012; EMEA, 2011).

Foi determinada uma faixa de concentração esperada englobando o LIQ e o LSQ, além de outros seis pontos. Para os ensaios de linearidade os diferentes tecidos foram adicionados com oito concentrações distintas do analito, em quintuplicata, e então analisados.

Avaliou-se a linearidade entre as concentrações previamente conhecidas e as razões das áreas dos sinais cromatográficos do padrão analítico sob o PI. O modelo de regressão linear foi estimado pelo método dos mínimos quadrados onde foi estabelecida a tendência da variável dependente y (área do padrão analítico/ área do PI) em função da variável independente x (concentrações previamente conhecidas), representado pela equação $y = ax + b$, sendo a o coeficiente angular da reta e b (coeficiente linear) seu intercepto com o eixo y (SILVA, 2011; CASSIANO, 2009). Devido à falta de ajuste do modelo linear, decorrente de uma ampla faixa de concentração da curva de calibração, foi aplicado um modelo de regressão ponderada. Essa ferramenta matemática consiste em dar maior peso aos dados com pouca variância e menor peso para os dados com elevada variância (ALMEIDA, CASTELBRANCO & FALCÃO, 2002).

Conforme especificado pela EMEA (2011), os resultados aceitos foram aqueles com concentrações calculadas dentro de $\pm 20\%$ do valor nominal para LIQ e $\pm 15\%$ para as demais concentrações. Pelo menos 75% dos padrões de calibração devem cumprir esses critérios, com no mínimo de 50% em cada concentração.

4.6.5 Precisão

A precisão de um método analítico refere-se a proximidade entre os resultados de diferentes alíquotas de uma amostra em comum (BRASIL, 2012; EMEA, 2011). A precisão é expressa como o coeficiente de variação (CV) e deve ser demonstrada para o LIQ, CQB, CQM e CQA intra e inter-ensaio, utilizando a fórmula:

$$CV (\%) = \frac{DP}{C_{média}} * 100$$

Onde:

CV (%) porcentagem do coeficiente de variação

DP desvio padrão

$C_{média}$ concentração média determinada

A precisão intra-ensaio refere-se a precisão relativa as amostras feitas conjuntamente (de uma mesma corrida analítica), enquanto a precisão inter-ensaio refere-se a precisão relativa as amostras feitas em corridas diferentes (três corridas em pelo menos dois dias).

Para o ensaio de precisão intra-corrída e inter-corrída deve-se ter um mínimo de 5 (cinco) amostras para cada concentração de análise (LIQ, CQB, CQM e CQA) e os CVs não devem exceder 15 % para as amostras de CQ e 20 % para o LIQ (EMEA, 2011).

4.6.6 Exatidão

A exatidão de um método analítico refere-se a proximidade do valor obtido nos experimentos com o valor de referência (BRASIL, 2012; EMEA, 2011).

A exatidão foi expressa como porcentagem do valor nominal do LIQ, CQB, CQM e CQA intra e inter-ensaio, através da fórmula:

$$ERP(\%) = \frac{C_{obtida} - C_{teórica}}{C_{teórica}} * 100$$

Sendo:

ERP = Erro relativo padrão

C_{obtida} = concentração obtida

$C_{teórica}$ = concentração teórica ou nominal

A exatidão intra-ensaio refere-se às amostras processadas conjuntamente (de uma mesma corrida analítica) enquanto a exatidão inter-ensaio refere-se às amostras processadas em corridas diferentes (três corridas em pelo menos dois dias).

Para o ensaio de exatidão intra-corrída e enter-corrída deve-se ter um mínimo de 5 (cinco) amostras para cada concentração de análise (LIQ, CQB, CQM e CQA) e os resultados não devem exceder 15 % para as amostras de CQ e 20 % para o LIQ (EMEA, 2011).

4.6.7 Estabilidade

O estudo de estabilidade assegura que as medidas tomadas ao longo do desenvolvimento do método foram suficientes para que a concentração do analito se mantenha dentro dos limites estabelecidos (BRASIL, 2012; EMEA, 2011). O ensaio de estabilidade garante todos os passos do método (matriz, anticoagulante, condições de armazenamento, extração e análise). Os ensaios devem ser realizados utilizando amostras CQB e CQA em triplicata e os resultados devem ser $\pm 15\%$ em relação a concentração nominal da curva de calibração (EMEA, 2011).

Os ensaios de estabilidade foram realizados em condições semelhantes de armazenamento e manipulação durante períodos de tempo superiores aos aplicados às amostras de estudo reais.

4.6.7.1 Estabilidade de curta duração

As amostras foram deixadas a temperatura ambiente por 4h, tempo superior ao que as amostras do estudo real ficaram. Posteriormente foram processadas e analisadas conforme a metodologia desenvolvida. Os resultados foram comparados com aqueles das amostras frescas.

4.6.7.2. Estabilidade em ciclos de congelamento e descongelamento

As amostras foram submetidas a 3 (três) ciclos de congelamento e descongelamento, um ciclo a mais que o necessário para o estudo real. As amostras foram descongeladas a temperatura ambiente por uma hora e posteriormente congeladas a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 12 (doze) horas para um novo ciclo de descongelamento. Após completados três ciclos foram processadas e analisadas, conforme a metodologia desenvolvida, e comparadas a amostras frescas

4.6.7.3 Estabilidade pós-processamento

As amostras foram processadas e mantidas sob as mesmas condições de análise das amostras do estudo real, todavia o tempo entre o término da preparação e o término da corrida analítica foi maior, 36 horas.

4.6.7.4 Estabilidade de longa duração

As amostras foram armazenadas a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 30 (trinta) dias. Posteriormente foram descongeladas, processadas e analisadas, conforme a metodologia desenvolvida, e comparadas a amostras preparadas no dia.

4.6.7.5 Estabilidade das soluções-padrão

As soluções-padrão em ACN foram analisadas diariamente durante a validação e análise das amostras biológicas e os resultados obtidos foram comparados com os resultados de soluções-padrão recém-preparadas.

5 RESULTADOS

Neste trabalho foi estabelecido um método bioanalítico utilizando CLAE-UV para a quantificação do BNZ em baço, cérebro, cólon, coração, duodeno, estômago, fígado, plasma, pulmão e rim de camundongos, na presença do padrão interno.

O método foi desenvolvido de forma a não apresentar interferentes da matriz, ser preciso, exato e linear, ter curto tempo de preparo e análise das amostras de forma que as mesmas permaneçam estáveis, utilizar o menor volume possível de solvente orgânico tanto na extração quanto na fase móvel e apresentar boa recuperação.

5.1 Padrão interno

Dentre as substâncias testadas como padrão interno a que apresentou melhor resultado foi o omeprazol. Dessa forma, foi utilizado como padrão analítico o BNZ (Lote: MKBL3727V; Val.: 21/11/2017) e como padrão interno o OPZ (Lote: BCBL3570V; Val.: 29/05/2016), ambos da Sigma-Aldrich®.

5.2 Extração e concentração de compostos presentes na matriz

O procedimento de extração e concentração que apresentou a melhor recuperação dos padrões analíticos foi a extração líquido-líquido, empregando 500 μL de acetato de etila. As amostras foram agitadas por 10 min e centrifugadas por 10 min a 6973 x g. Quatrocentos microlitros da fase orgânica foram coletados, evaporado à vácuo e posteriormente ressuspendido em 100 μL de fase móvel. As amostras foram agitadas por 1 min em vórtex, centrifugada 3 min a 6973 x g e foi coletado 80 μL do sobrenadante para ser analisado pelo método cromatográfico desenvolvido. Na **Figura 3**, porcentagem da recuperação do analito e do PI extraídos de plasma, empregando acetato de etila ou éter etílico, em comparação com soluções padrão de mesma concentração. A recuperação do BNZ (75,3%) e do OPZ (65,3%) utilizando acetato de etila, nas condições de agitação e centrifugação empregadas, foi maior quando comparado a extração empregando éter etílico, que recuperou apenas 38,5% do BNZ e 33,7% do OPZ.

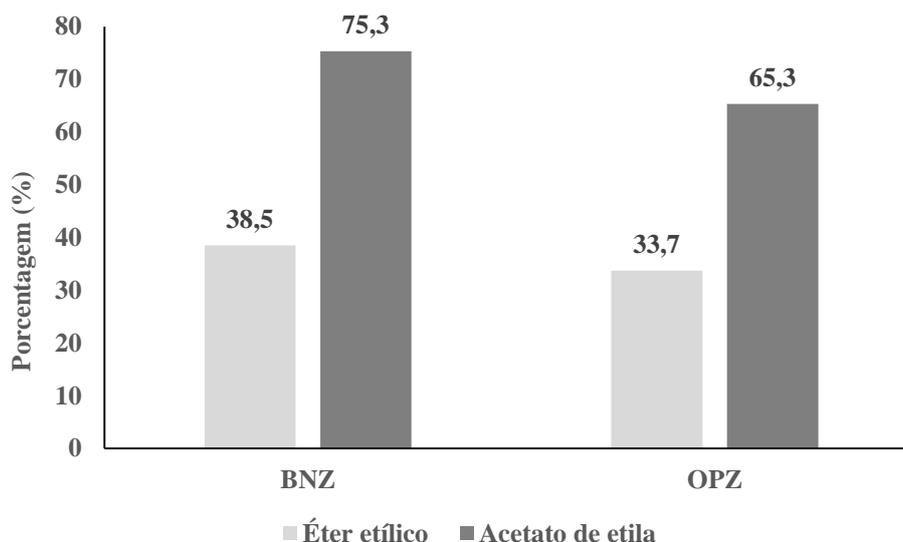


Figura 3: Recuperação dos padrões analíticos utilizando acetato de etila ou éter etílico como solvente extrator.

5.3 Condições cromatográficas

A melhor separação e detecção dos analitos foi obtida utilizando fase móvel composta de acetonitrila e água 30:70 (v/v), com fluxo de 1,0 mL/min, em temperatura de 40 °C, comprimento de onda de 324 nm e volume de injeção de 20,0 µL. Abaixo, o cromatograma dos padrões (em acetonitrila) nas concentrações de 10,0 µg/mL (BNZ) e 30,0 µg/mL (OPZ) com tempo de retenção de 4,1 e 5,7 minutos, respectivamente (**Figura 4**).

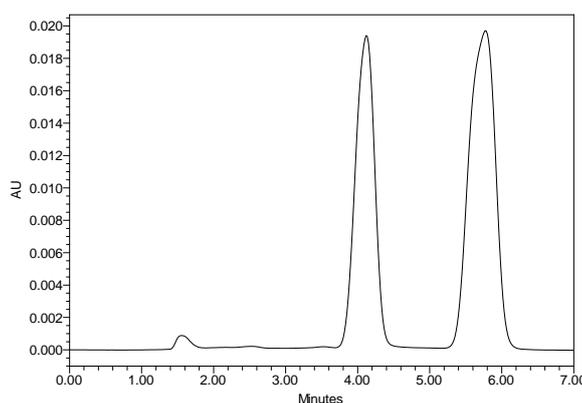


Figura 4: Cromatograma dos padrões de BNZ e OPZ em acetonitrila nas concentrações de 10,0 e 30,0 µg/mL, respectivamente. Tempos de retenção: BNZ 4,1 min e OPZ 5,7 min. Condições de uso: comprimento de onda de 324 nm, fase móvel composta por ACN:H₂O (30:70 v/v), fluxo de 1,0 mL/min, volume de injeção de 20µL e temperatura de 40° C para Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência (eWaters® 2695) com detector ultra violeta (Waters® 2489), coluna analítica C18 (Phenomenex®, Gemini-NX, 150mm x 4,6mm x 5µm) e pré-coluna C18 (Phenomenex®, AJ0-4287, 4mm x 3mm x 5µm).

5.4 Validação do método para quantificação do benznidazol

5.4.1 Seletividade e efeito residual

Utilizando o método bioanalítico desenvolvido obteve-se boa separação entre o BNZ e o PI e entre estes e os constituintes químicos extraídos dos tecidos. Os sinais cromatográficos do BNZ e do PI obtiveram resolução adequada, **Figuras 5 e 6**. Amostras brancas precedidas de amostras processadas no LSQ foram comparadas com as processadas no LIQ e não foi observado efeito residual expressivo.

Todos os interferentes próximos ao pico de retenção do analito e/ou efeito residual foram menores de 20 % do LIQ e de 5 % do PI.

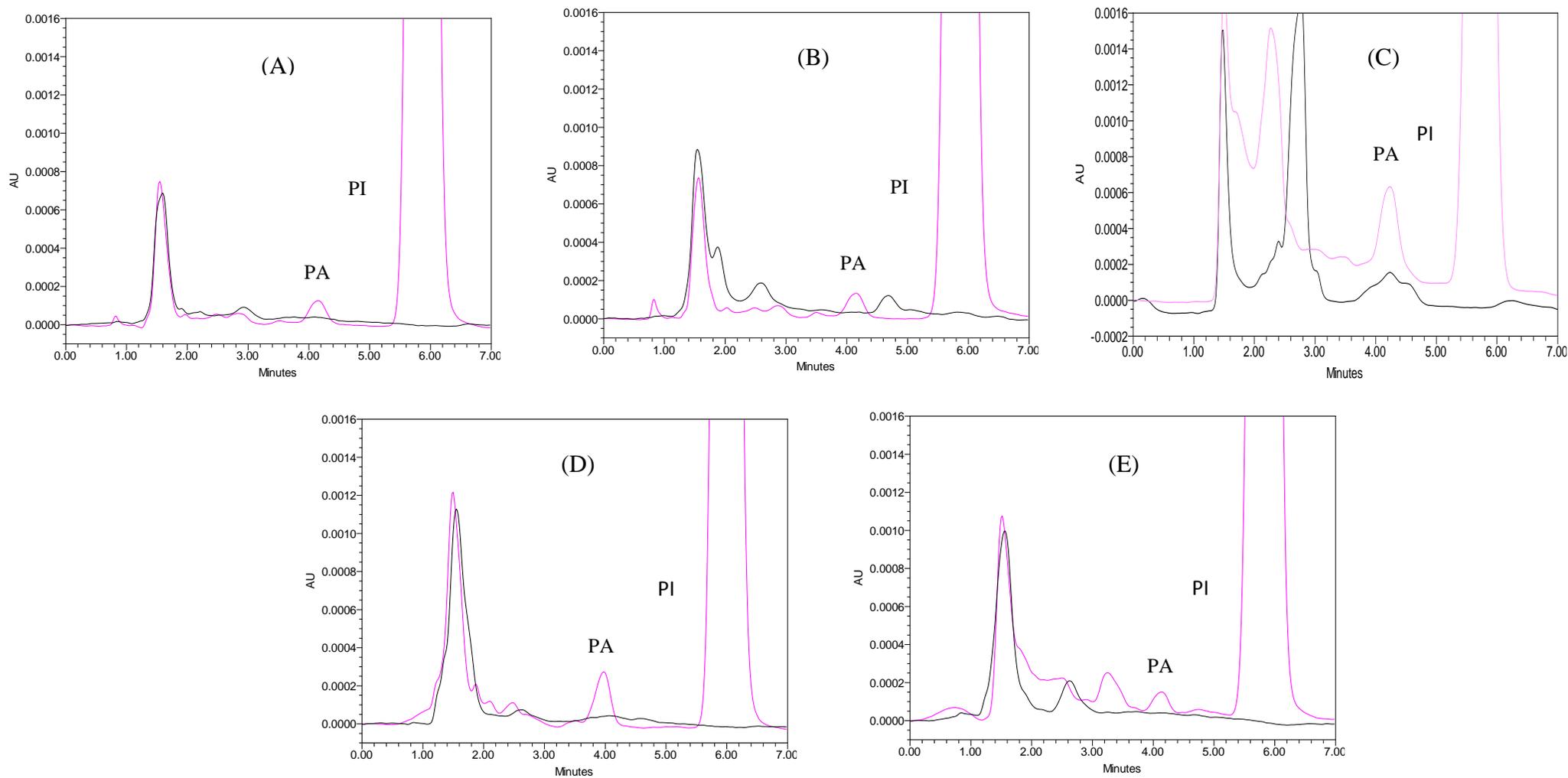


Figura 5: Cromatogramas referentes às análises em amostra branca de plasma (A), coração (B), fígado (C), baço (D) e cólon (E) obtidos de animais saudáveis, sem a administração de BNZ (■) comparados ao perfil cromatográfico de amostras brancas de cada órgão adicionada com o padrão analítico no LIQ, a 0,1 µg/mL para (A), (B), (D) e (E), 0,2 µg/mL para (C) e o PI a 30 µg/mL (■).

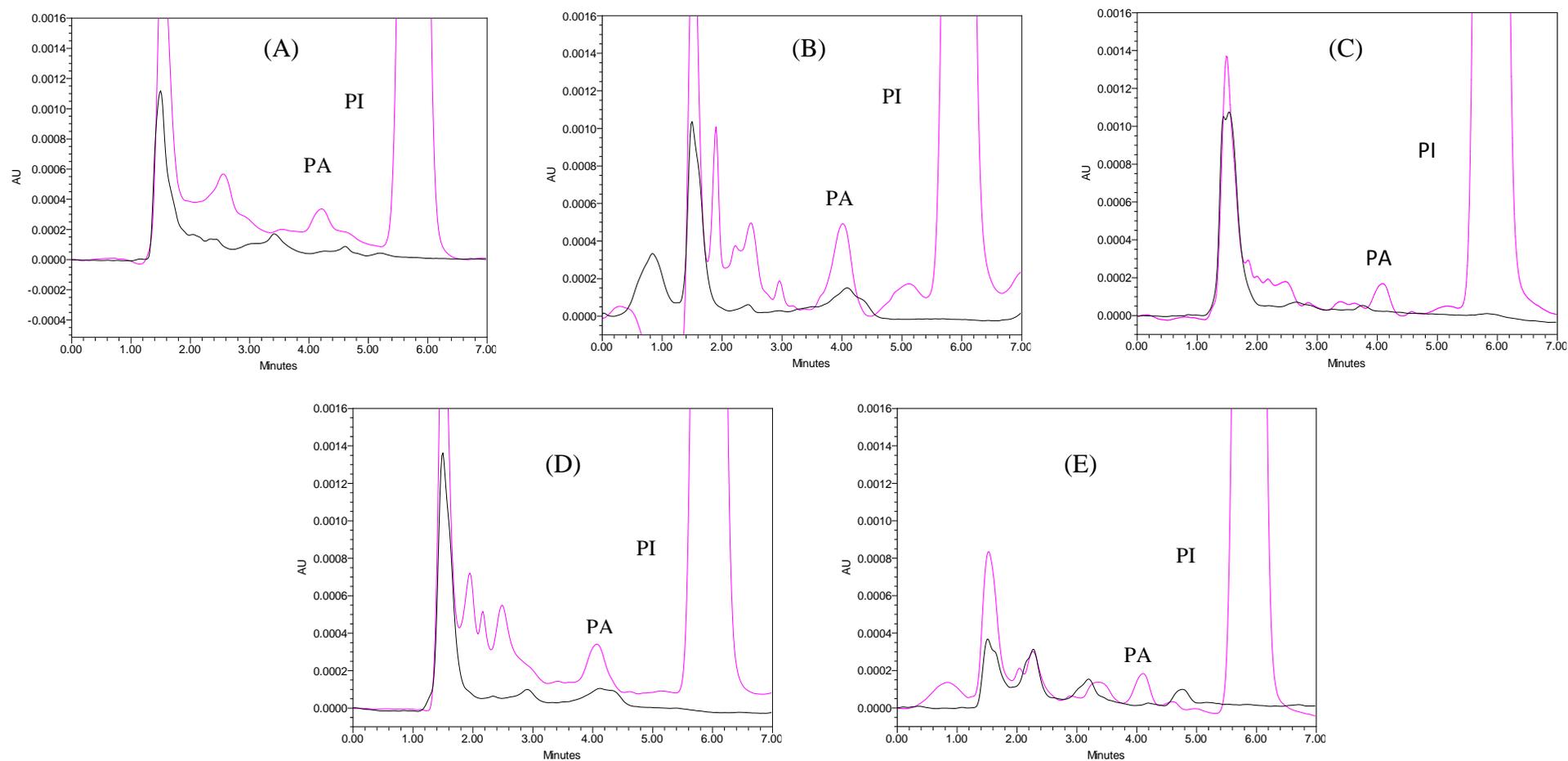


Figura 6: Cromatogramas referentes às análises em amostras brancas de duodeno (A), estômago (B), pulmão (C), rim (D) e cérebro (E), obtidos de animais saudáveis, sem a administração de BNZ (■), comparado ao perfil cromatográfico de amostras brancas de cada órgão, adicionada com o padrão analítico no LIQ, a 0,1 µg/mL para (A), (C), (D) e (E), 0,2 µg/mL para (B) e o PI a 30 µg/mL (■).

5.4.2 Linearidade (curva de calibração)

Utilizando o método dos mínimos quadrados, apesar de ter sido obtida uma correlação linear satisfatória ($r^2 > 0,98$), foram observados erros de quantificação nas concentrações mais baixas, devido a uma dispersão heterogênea dos resíduos (diferença entre a concentração obtida e a concentração nominal) ao longo das curvas de calibração, como resultado da ampla faixa de concentração de BNZ empregada (0,1 ou 0,2 a 100 mg/mL). Devido a essa dificuldade de ajuste do modelo linear foi aplicado um modelo de regressão ponderada, no qual foram testados, inicialmente para um dos tecidos (cérebro) e para o plasma, os pesos de $1/x$, $1/x^2$, $1/x^{1/2}$, $1/y$, $1/y^2$, $1/y^{1/2}$ (ALMEIDA, CASTEL-BRANCO & FALCÃO, 2002).

Posteriormente, para a definição do melhor peso a ser empregado na ponderação, calculou-se os parâmetros relativos à curva de calibração do método analítico (a, b e r^2) e a percentagem de erro relativo padrão (ERP) dos mesmos, conforme descrito nas **Tabelas 3 e 4**.

Tabela 3: Erro relativo padrão (ERP%) referente a aplicação de diferentes pesos para as concentrações da curva de calibração do cérebro

Peso	Coefficiente angular (a)	Coefficiente linear (b)	Coefficiente de correlação (r^2)	ERP(%)
$1/x^{1/2}$	0,0868	-0,0219	0,9963	725,89
1/x	0,0854	-0,0073	0,9962	0,00
1/x²	0,0803	-0,0046	0,9904	0,00
$1/y^{1/2}$	0,0865	-0,0182	0,9963	544,79
$1/y$	0,0848	-0,0063	0,9959	-39,28
$1/y^2$	0,0787	-0,0045	0,9871	38,97

Tabela 4: Erro relativo padrão (ERP%) referente a aplicação de diferentes pesos para as concentrações da curva de calibração do plasma

Peso	Coefficiente angular (a)	Coefficiente linear (b)	Coefficiente de correlação (r^2)	ERP(%)
$1/x^{1/2}$	0,0794	-0,0063	0,9988	217,38
1/x	0,0790	-0,0023	0,9989	0,00
1/x²	0,0776	-0,0016	0,9983	0,00
$1/y^{1/2}$	0,0793	-0,0061	0,9988	207,42
$1/y$	0,0789	-0,0023	0,9989	2,10
$1/y^2$	0,0770	-0,0016	0,9979	16,77

Os pesos com melhor ajuste para o modelo linear foram $1/x$ e $1/x^2$, com ERP igual a 0%. Optou-se por testar o peso de $1/x$ para os demais órgãos, seguido do cálculo dos parâmetros

relativos à curva de calibração do método analítico (a, b e r^2) e da percentagem do ERP, obtendo êxito, com ERP igual a 0% (Tabela 5).

Tabela 5: Erro relativo padrão (ERP%) referente a aplicação do peso 1/x para as concentrações das curvas de calibração dos diferentes tecidos

Órgão	Coefficiente angular (a)	Coefficiente linear (b)	Coefficiente de correlação (r^2)
Plasma	0,0790	-0,0023	0,9989
Coração	0,0785	-0,0030	0,9988
Fígado	0,0904	-0,0039	0,9978
Baço	0,0837	-0,0018	0,9981
Cólon	0,1016	-0,0045	0,9991
Duodeno	0,2908	-0,0069	0,9992
Estômago	0,1642	-0,0081	0,9969
Pulmão	0,1835	0,0022	0,9981
Rim	0,0985	0,0035	0,9958
Cérebro	0,0854	-0,0073	0,9962

ERP = 0,00%

As quantificações foram, portanto, realizadas a partir das curvas de calibração ponderadas, que apresentaram melhor ajuste do coeficiente linear (b), que se refere ao erro relativo das medidas em y na equação de regressão linear (Tabela 6).

Tabela 6: Comparação das equações de reta (coeficiente angular, linear e correlação linear) obtidas por regressão linear e regressão ponderada para os diferentes tecidos.

Órgão	Curva de calibração			Curva de calibração ponderada		
	a	b	r^2	a	b	r^2
Plasma	0,0801	-0,0403	0,9982	0,0790	-0,0023	0,9989
Coração	0,0796	-0,0396	0,9980	0,0785	-0,0030	0,9988
Fígado	0,0925	-0,0732	0,9968	0,0904	-0,0039	0,9978
Baço	0,0854	-0,0603	0,9970	0,0837	-0,0018	0,9981
Cólon	0,1010	0,0168	0,9983	0,1016	-0,0045	0,9991
Duodeno	0,2928	-0,0725	0,9986	0,2908	-0,0069	0,9992
Estômago	0,1667	-0,0923	0,9948	0,1642	-0,0081	0,9969
Pulmão	0,1884	-0,1561	0,9973	0,1835	0,0022	0,9981
Rim	0,0980	0,0208	0,9925	0,0985	0,0035	0,9958
Cérebro	0,0889	-0,1226	0,9950	0,0854	-0,0073	0,9962

As concentrações das curvas de calibração bioanalítica foram 0,1 (LIQ), 0,25 (CQB), 1, 10, 25, 50 (CQM), 70 (CQA), 100 $\mu\text{g/mL}$ (LSQ) para o baço, cérebro, coração, cólon, duodeno, plasma, pulmão e rim e 0,2 (LIQ), 0,5 (CQB), 1, 10, 25, 50 (CQM), 70 (CQA), 100 $\mu\text{g/mL}$ (LSQ) para estômago e fígado. As curvas de calibração obtida para os diferentes órgãos e suas respectivas equações da reta, após a aplicação da ponderação 1/x (Figura 7).

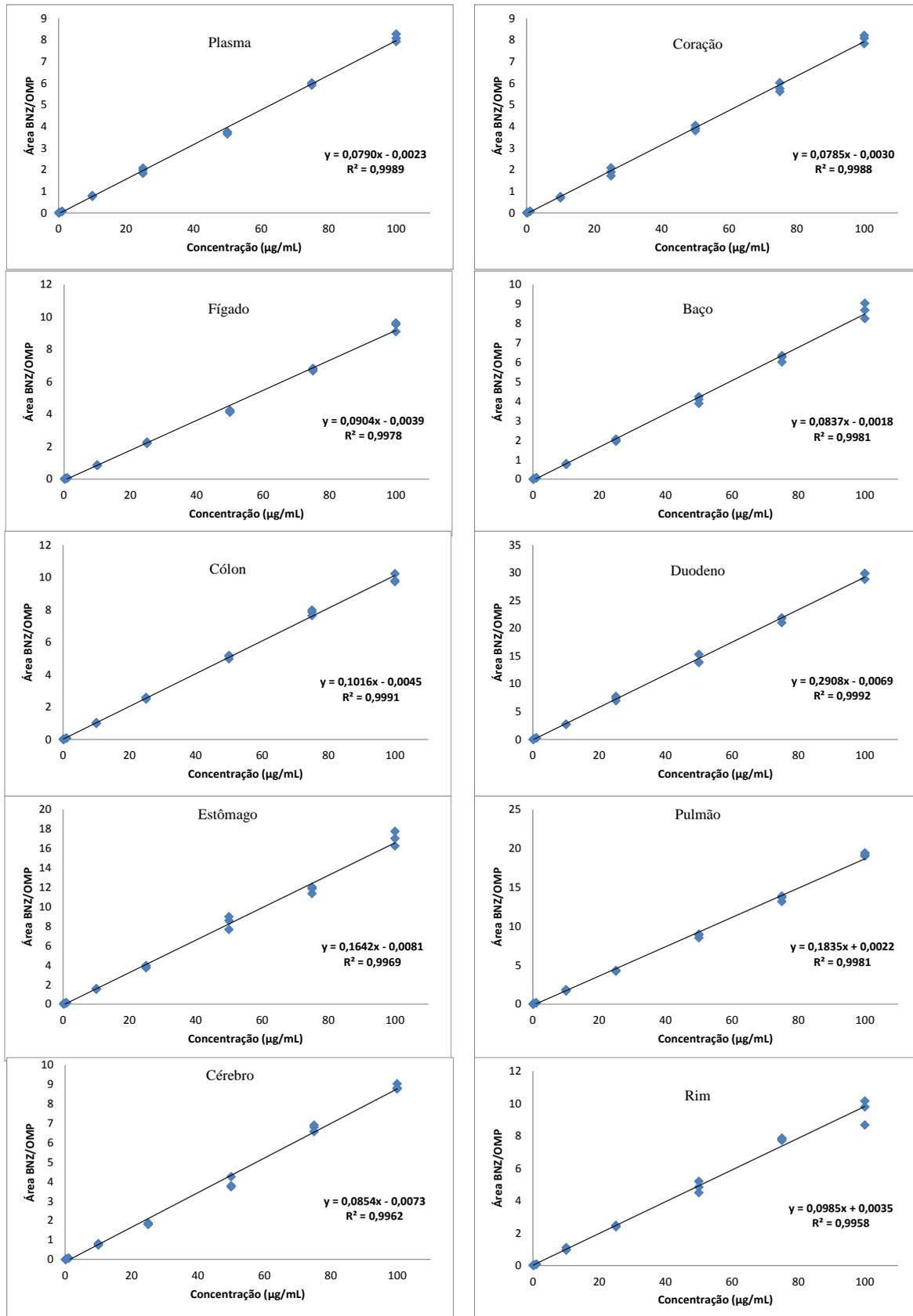


Figura 7: Gráficos de linearidade do método bioanalítico para a quantificação de BNZ em plasma e tecidos

5.4.3 Precisão e exatidão

Através dos dados obtidos (**Tabela 7**) considerou-se o método desenvolvido adequado para gerar resultados semelhantes e próximos ao valor real (preciso e exato), uma vez que o CV e o ERP intra e inter corrida estão dentro da variação permitida de até 15 % para as amostras de CQB, CQM e CQA e 20 % para as do LIQ.

5.4.4 Estabilidade

A partir dos resultados obtidos pelos testes de estabilidade pode-se concluir que as amostras analisadas não são degradadas em função da metodologia utilizada, ou seja:

- As amostras não processadas permaneceram estáveis ao longo de 4h à temperatura ambiente (estabilidade de curta duração);
- As amostras processadas permaneceram estáveis por 36h, período de análise pelo autoinjeter na CLAE (Estabilidade de pós processamento);
- As amostras não processadas e armazenadas em freezer -80 °C permaneceram estáveis ao longo de 30 dias de congelamento ininterrupto;
- Em função das manipulações envolvidas no método, as amostras não processadas sofreram três ciclos de descongelamento e congelamento sem sofrer decomposição.

Estas afirmativas são condizentes com os dados da **Tabela 8**, onde CV e ERP para todos os testes de estabilidade estão dentro da variação permitida de 15 % para as amostras de CQB e CQA.

5.4.4.1 Estabilidade das soluções de trabalho

Os resultados da avaliação da estabilidade das soluções-padrão em acetonitrila apresentaram desvio médio de +4,92% e -3,98% para o BNZ e o OPZ, respectivamente, de acordo com o limite de variação em 10% permitido pelo guia de validação adotado.

Tabela 7: Precisão e exatidão intra e inter-ensaios de amostras processadas no LIQ, CQB, CQM, CQA, sequencialmente obtidos, para validação do método desenvolvido

Amostra	Concentração Nominal	% Obtida da Concentração Nominal	Precisão (CV%)		Exatidão (ERP%)	
			Intra-ensaios	Inter-ensaios	Intra-ensaios	Inter-ensaios
Plasma	0,10	105,12	2,92	3,98	5,12	1,54
	0,25	106,63	3,57	4,72	6,63	9,40
	50,00	92,08	6,36	4,22	-7,92	-4,90
	75,00	102,03	2,00	8,70	2,03	-0,03
Coração	0,10	108,56	6,26	11,86	8,56	8,68
	0,25	105,57	4,86	6,05	5,57	3,16
	50,00	100,17	3,32	5,54	0,17	-4,08
	75,00	101,95	5,33	6,07	1,95	-4,03
Fígado	0,20	97,73	3,47	6,80	-2,27	-0,87
	0,50	98,56	4,80	7,19	-1,44	-0,93
	50,00	91,87	2,46	12,84	-8,13	-1,75
	75,00	100,32	1,03	5,94	0,32	1,94
Baço	0,10	116,07	12,23	8,63	16,07	6,73
	0,25	95,30	7,79	7,36	-4,70	-6,08
	50,00	98,08	3,12	7,13	-1,92	-0,27
	75,00	101,05	2,81	6,17	1,05	0,47
Cólon	0,10	115,59	6,22	9,30	15,59	13,47
	0,25	105,17	4,08	7,43	5,17	5,31
	50,00	93,99	4,17	5,97	-6,01	-0,71
	75,00	92,55	4,10	4,20	-7,45	-2,69
Duodeno	0,10	113,71	12,79	10,73	13,71	11,55
	0,25	99,07	5,11	7,12	-0,93	0,74
	50,0	97,49	10,02	10,03	-2,51	-1,27
	75,0	94,49	4,49	7,48	-5,51	-4,14
Estômago	0,20	115,99	17,47	14,80	15,99	11,15
	0,50	100,49	3,06	5,40	0,49	1,27
	50,00	95,76	12,68	6,25	-4,24	-0,59
	75,00	97,84	7,41	6,19	-2,16	-2,75
Pulmão	0,10	102,32	12,51	9,11	2,32	2,75
	0,25	87,93	10,01	10,29	-12,07	-3,54
	50,0	103,51	5,25	7,31	3,51	1,21
	75,0	102,21	8,07	7,76	2,21	-0,96
Rim	0,10	104,18	5,25	12,87	4,18	-11,89
	0,25	105,42	5,34	4,10	5,42	-7,38
	50,0	99,01	5,33	6,15	-0,99	-0,68
	75,0	105,35	1,11	3,00	5,35	3,06
Cérebro	0,10	112,72	8,30	12,14	12,72	15,76
	0,25	90,29	10,44	7,94	-9,71	-3,02
	50,0	88,01	9,35	8,37	-11,99	-8,72
	75,0	99,59	4,88	4,11	-0,41	1,90

Tabela 8: Estabilidade de curta duração, pós-processamento, ciclos de congelamento e longa duração das amostras processadas no CQB e CQA para validação do método desenvolvido.

Amostra	Concentração Nominal (µg/ml)	% Obtida da Concentração Nominal	Estabilidade de Curta Duração		% Obtida da Concentração Nominal	Estabilidade de Pós Processamento		% Obtida da Concentração Nominal	Est. de Ciclos de Congelamento		% Obtida da Concentração Nominal	Estabilidade de Longa Duração	
			Precisão (CV%)	Exatidão (ERP%)		Precisão (CV%)	Exatidão (ERP%)		Precisão (CV%)	Exatidão (ERP%)		Precisão (CV%)	Exatidão (ERP%)
Plasma	0,25	107,39	1,91	7,39	105,95	7,70	5,95	108,59	6,51	8,59	95,00	9,07	-5,00
	75,00	92,17	7,15	-7,83	94,47	2,19	-5,53	94,96	3,54	-5,04	97,23	9,95	-2,77
Coração	0,25	90,68	10,67	-9,32	112,38	1,56	12,38	88,14	5,50	-11,86	84,19	5,64	-14,40
	75,00	95,93	4,04	-4,07	89,82	2,22	-10,18	105,77	4,35	5,77	104,43	1,58	4,43
Fígado	0,50	108,67	6,74	8,67	100,32	12,07	0,32	96,85	10,92	-3,15	96,29	10,57	-3,71
	75,00	102,78	5,31	2,78	95,65	11,68	-4,35	95,55	9,19	-4,45	99,79	4,08	-0,21
Baço	0,25	101,38	7,24	1,38	101,19	5,36	1,19	95,63	4,81	-4,37	97,40	9,85	-2,60
	75,00	100,31	12,22	0,31	98,58	2,10	-1,42	104,61	7,69	4,61	103,44	6,35	3,44
Cólon	0,25	101,08	5,48	1,08	104,78	3,44	4,78	92,91	4,72	-7,09	101,89	11,65	1,89
	75,00	93,61	4,24	-6,39	92,01	4,00	-7,99	96,49	3,38	-3,51	110,99	7,55	10,99
Duodeno	0,25	92,85	6,51	-7,15	93,92	10,93	-6,08	97,49	0,97	-2,51	92,29	1,80	-7,71
	75,0	88,77	8,60	-11,23	93,45	5,35	-6,55	102,25	9,10	2,25	95,94	7,39	-4,06
Estômago	0,50	95,04	4,16	-4,96	99,92	10,67	-0,08	94,07	7,55	-5,93	92,13	6,00	-7,87
	75,00	99,92	6,95	-0,08	100,25	4,04	0,25	101,28	7,92	1,28	98,33	5,06	-1,67
Pulmão	0,25	89,90	8,02	-10,10	101,77	11,11	1,77	94,78	7,68	-5,22	92,44	4,51	-7,56
	75,0	99,06	7,15	-0,94	92,58	10,20	-7,42	92,03	10,29	-7,97	100,69	4,57	0,69
Rim	0,25	89,94	3,43	-10,06	88,11	6,80	-11,89	91,64	4,18	-8,36	104,15	4,96	4,15
	75,0	102,95	2,19	2,95	103,94	0,99	3,94	98,41	5,07	-1,59	107,94	13,92	7,94
Cérebro	0,25	90,93	6,59	-9,07	97,35	5,04	-2,65	98,27	1,55	-1,73	93,62	4,77	-6,38
	75,0	91,42	8,36	-8,58	95,11	6,14	-4,89	98,06	3,74	-1,94	91,20	10,65	-8,80

Parte III:
Avaliação da farmacocinética e biodistribuição
em camundongos tratados com benznidazol

6 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Avaliar a farmacocinética do benznidazol;
- b) Avaliar a biodistribuição do benznidazol.

7 MATERIAL E MÉTODOS

7.1 Fármaco

Nesse trabalho foi utilizado o BNZ sintetizado pelo LAFEPE[®], disponibilizados em comprimidos de 100 mg para administração oral. O fármaco utilizado refere-se ao Lote: 13030214 com data de fabricação de março de 2013 e validade até março de 2016.

7.2 Animais

Foram utilizados 50 camundongos *Swiss*, com 30 dias de idade, fêmeas, pesando 25 a 30 g, nascidos no Setor de Criação do Centro de Ciência Animal da Universidade Federal de Ouro Preto (CCA, UFOP), mantidos em ambiente controlado com ciclos regulares de luz, temperatura de 23 ± 2 °C disponibilidade de água *ad libitum* e ração retirada doze horas antes do tratamento. Todos os procedimentos foram realizados de acordo com os princípios éticos preconizados pelo SBCAL/COBEA (Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório), tendo sido aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Ouro Preto (Protocolo nº 2013/59 CEUA-UFOP - Anexo I).

7.3 Esquema de tratamento

O BNZ foi pulverizado em gral de porcelana e ressuspenso em solução de 0,5% de CMC (Carboximetilcelulose) em 20 mL de água mineral. Os animais foram pesados e tratados, por gavagem, com uma dose de 100 mg/kg do BNZ após jejum de 12 horas.

7.4 Necropsia, coleta e preparo das amostras para os estudos de farmacocinética e biodistribuição

O sangue e órgão dos animais tratados foram coletados nos tempos de 0,16; 0,33; 0,5; 0,75; 1; 2; 3; 4; 5 e 6 h (**Figura 2**). Por se tratar de um animal de pequeno porte foram utilizados cinco camundongos por tempo. Plasma e órgãos de animais não tratados foram utilizados para construir as curvas de calibração.

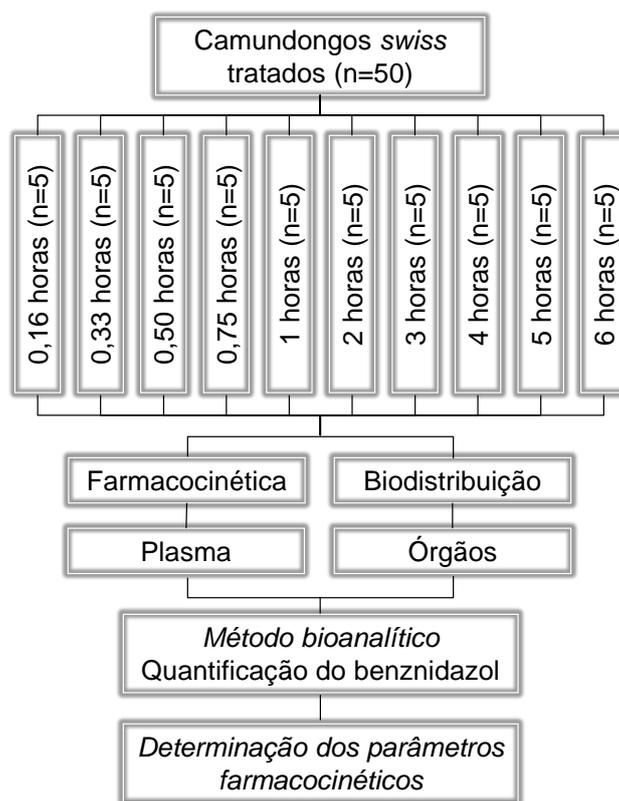


Figura 8: Delineamento experimental para a avaliação da farmacocinética e biodistribuição do BNZ

Para realizar os estudos de farmacocinética do BNZ, amostras de sangue de cada animal (400 µL) foram coletadas do plexo orbital e imediatamente submetidas a centrifugação (Eppendorf® 5810R) por 10 min / 8609 x g / 18° C para separação e coleta do plasma.

Para os estudos de biodistribuição, os animais foram eutanasiados por deslocamento cervical e foram coletados o baço, cérebro, cólon, coração, duodeno, estômago, fígado, pulmão e rins *in totum* que foram lavados em tampão fosfato-salino (PBS / pH 7,4), secos em papel de filtro, pesados e armazenados em freezer -80 °C. Posteriormente, os tecidos foram macerados (Qiagen® TissueLyser II) com PBS (pH 7,4) na proporção 1 grama de tecido para 2 mL de PBS.

7.5 Quantificação do benznidazol no plasma e tecido

A quantificação do BNZ foi realizada aplicando o método analítico para amostra biológica desenvolvido e validado previamente.

As amostras de plasma, baço, cérebro, cólon, coração, duodeno, estômago, fígado, pulmão e rins foram analisadas posteriormente a análise das suas respectivas curvas de calibração com oito pontos em triplicata.

7.6 Parâmetros farmacocinéticos

Os parâmetros farmacocinéticos, que determinam a taxa e a extensão dos processos de ADME (Absorção, Distribuição, Metabolismo e Excreção), foram calculados aplicando o modelo monocompartimental a partir do perfil de concentração plasmática em relação ao tempo.

As constantes de eliminação (k_{el}) e de absorção (k_a) foram determinadas através do gráfico concentração *versus* tempo.

As meias vidas de eliminação ($t_{1/2\beta}$) e de absorção ($t_{1/2\alpha}$) foram calculadas pela fórmula:

$$t_{1/2} = \frac{0,693}{k}$$

A área sob a curva de 0 a 6h (ASC_{0-6}) foi calculada pelo *método dos trapézios* e a área sob a curva de 0 a ∞ ($ASC_{0-\infty}$) foi calculada pela fórmula:

$$ASC_{0-\infty} = ASC_{0-6} + \frac{C_n}{k_{el}}$$

Onde:

C_n - concentração no último tempo

A área sob a curva do primeiro momento estatístico de 0 a 6h ($ASMC_{0-6}$) foi calculada a partir da *teoria dos momentos estatísticos* e a área sob a curva do primeiro momento estatístico de 0 a ∞ ($ASMC_{0-\infty}$) foi calculada pela fórmula:

$$ASMC_{0-\infty} = ASMC_{0-6} + \frac{C_n * t_n}{k_{el}} + \frac{C_n}{k_{el}^2}$$

Onde:

C_n concentração no último tempo

t_n tempo no último momento

O tempo médio de residência (TMR) foi calculado pela fórmula:

$$TMR = \frac{ASMC_{0-\infty}}{ASC_{0-\infty}}$$

O *clearance* (Cl) foi calculado pela fórmula:

$$Cl = \frac{Dose}{ASC_{0-\infty}}$$

O volume de distribuição (Vd) foi calculado pela fórmula:

$$Vd = \frac{Cl}{k_{el}}$$

Como neste trabalho não foi realizado um tratamento similar por via intravenosa para a determinação da biodisponibilidade (F) do BNZ, o *Cl* e o Vd foram apresentados em função de F.

Foi obtido o tempo para a concentração máxima ($t_{m\acute{a}x}$) e a concentração plasmática máxima ($C_{m\acute{a}x}$) diretamente do gráfico.

7.7 Biodistribuição

Ao longo da metodologia utilizada, os órgãos foram macerados na proporção 1 grama de tecido para 2 mL de PBS. Dessa forma, os dados obtidos pelo cromatógrafo líquido de alta eficiência estavam em relação a esta diluição ($\mu\text{g/mL}$). Para a correção dos resultados, os dados foram multiplicados pelo fator de diluição 3 (três) e, então, determinado o gráfico concentração ($\mu\text{g/g}$) *versus* tempo.

A biodistribuição do BNZ entre os diferentes órgãos foi avaliada levando em consideração a ASC_{0-6} , $ASC_{0-\infty}$, TMR, $t_{m\acute{a}x}$, $C_{m\acute{a}x}$. Esses parâmetros farmacocinéticos foram calculados conforme explicado no item 3.12. Foi determinada, também, a relação (R) existente entre ASC_{0-6} dos tecidos e plasma:

$$R = \frac{ASC_{0-6 \text{ Tecido}}}{ASC_{0-6 \text{ Plasma}}} * 100$$

7.8 Análise dos dados farmacocinéticos

Todos os cálculos de farmacocinética foram realizados no software Excel e os parâmetros farmacocinéticos expressos pela média. Foi utilizado o software *GraphPadPrism 5* para a confecção do gráfico de barras.

8 RESULTADOS

8.1 Aplicação do método para quantificação do benznidazol em plasma e órgãos

O método bioanalítico desenvolvido e validado foi aplicado para a determinação de BNZ na presença de um padrão interno em amostra de plasma, coração, fígado, baço, cólon, duodeno, estômago, pulmão, rim e cérebro de camundongos previamente tratados (**Figura 8 e 9**).

8.1.1 Avaliação farmacocinética

Os parâmetros farmacocinéticos foram calculados a partir das curvas de concentração plasmática em função do tempo, e o resultados estão demonstrados na **Tabela 9**.

Tabela 9: Parâmetros farmacocinéticos do BNZ no plasma de camundongos tratados com uma única dose de 100 mg/Kg por via oral

Parâmetros farmacocinéticos	Unidade	Média
k_{el}	h^{-1}	$0,34 \pm 0,03$
$t_{1/2\beta}$	h	$2,03 \pm 0,16$
k_a	h^{-1}	$2,23 \pm 0,41$
$t_{1/2a}$	h	$0,29 \pm 0,03$
ASC_{0-6}	$\mu g/mL.h$	$154,53 \pm 1,57$
ASC_{0-INF}	$\mu g/mL.h$	$195,71 \pm 6,04$
TMR	h	$3,86 \pm 0,23$
t_{max}	h	$0,83 \pm 0,29$
C_{max}	$\mu g/mL$	$41,61 \pm 2,99$
V_d/F	mL	$38,81 \pm 2,02$
Cl/F	mL/h	$13,29 \pm 0,41$

k_{el} , constante de eliminação; $t_{1/2\beta}$, meia-vida de eliminação; k_a , constante de absorção; $t_{1/2a}$, meia-vida de absorção; ASC_{0-t} , área sob a curva de 0 a 6 h; ASC_{0-INF} , área sob a curva extrapolada ao infinito; TMR, tempo médio de residência; C_{max} , concentração máxima; t_{max} , tempo para a concentração máxima; V_d , volume de distribuição; Cl , Clearance; F , biodisponibilidade oral.

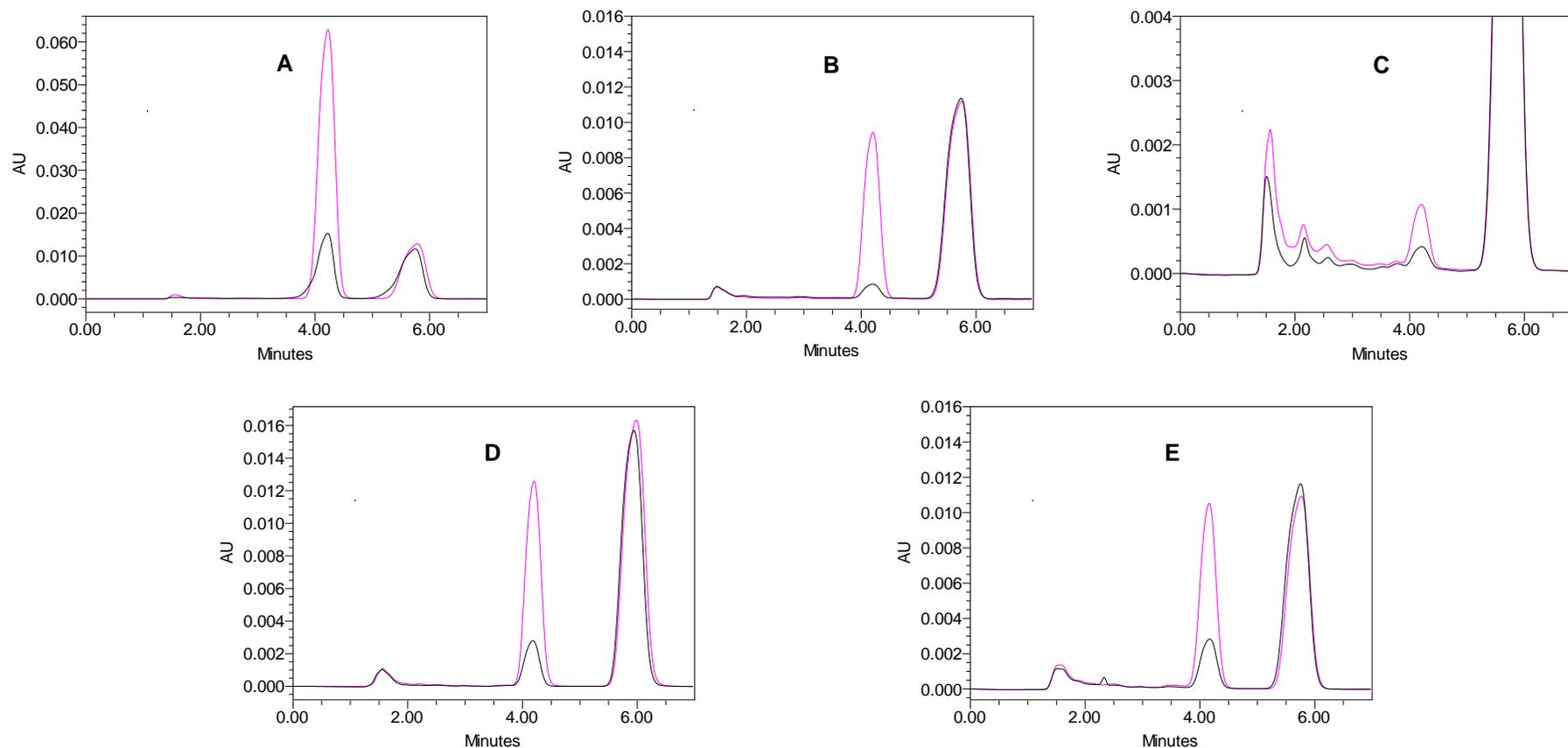


Figura 9: Cromatogramas da determinação de BNZ em amostra de animais tratados por via oral com 100 mg/kg em regime de dose única. (A) plasma nos tempos 0,16 h (■) e 1h (■); (B) coração nos tempos 0,16 h (■) e 0,50h (■); (C) fígado nos tempos 0,16 h (■) e 0,75h (■); (D) baço nos tempos 0,16 h (■) e 0,75h (■); (E) cólon nos tempos 0,16 h (■) e 0,5h (■). Em rosa, cromatogramas referentes ao tempo para a maior concentração em cada órgão. PA: Padrão analítico; PI: Padrão interno.

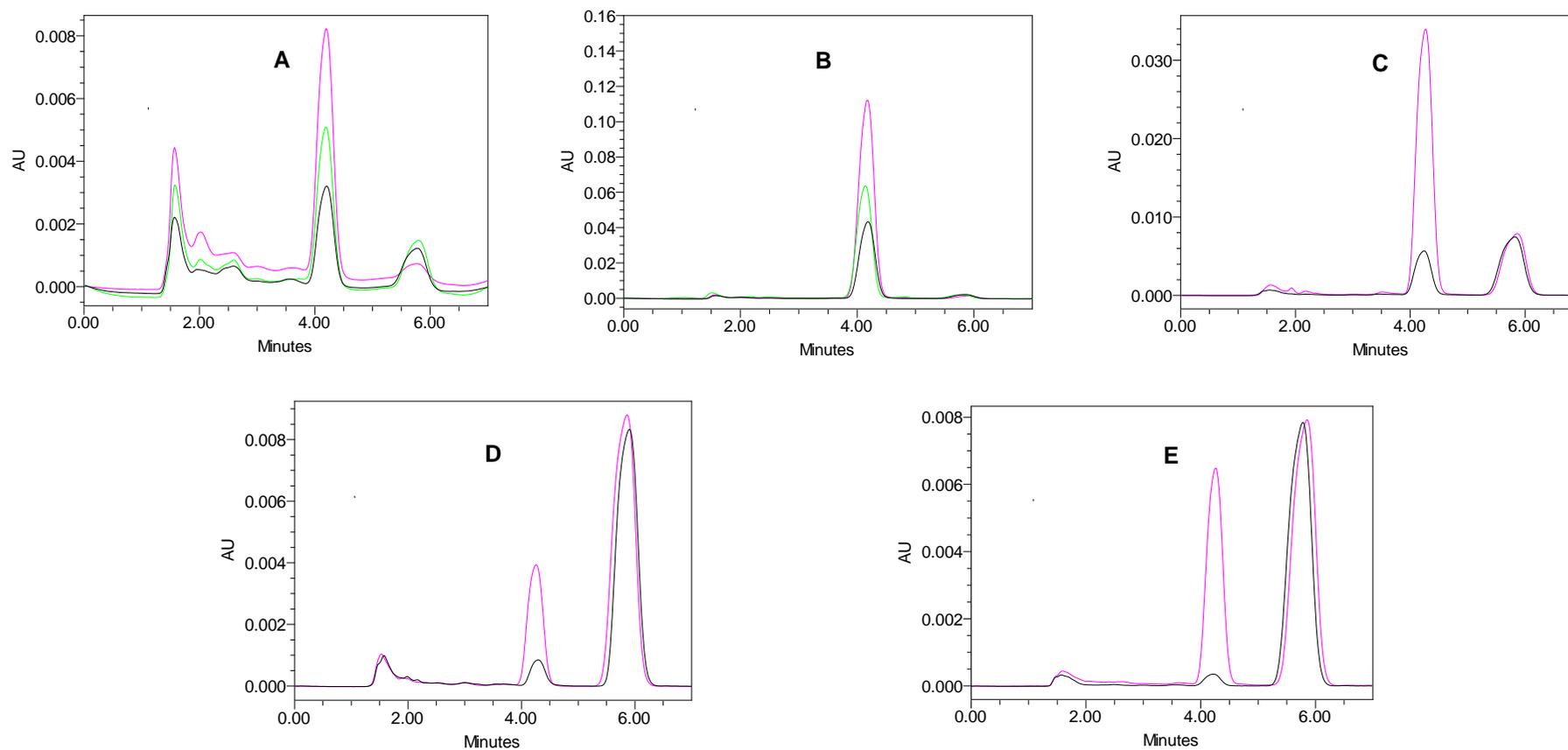


Figura 10: Cromatogramas da determinação de BNZ em amostra de animais tratados por via oral com 100 mg/kg em regime de dose única. (A) duodeno nos tempos 0,16 h (■), 0,33h (■) e 0,75h (■); (B) estômago nos tempos 0,16 h (■), 0,75h (■) e 2h (■); (C) pulmão nos tempos 0,16 h (■) e 0,75h (■); (D) rim nos tempos 0,16 h (■) e 0,50h (■); (E) cérebro nos tempos 0,16 h (■) e 0,75h (■). Em rosa, cromatogramas referente ao tempo para a maior concentração em cada órgão. Em verde, cromatogramas referentes ao tempo para o segundo pico de concentração ocorrida no duodeno e estômago. PA: Padrão analítico; PI: Padrão interno.

8.1.2. Biodistribuição

Os parâmetros farmacocinéticos para os tecidos de interesse foram calculados de forma semelhante ao do plasma, todavia foram determinados apenas aqueles parâmetros que poderiam ser relacionados a biodistribuição (**Tabela 10**).

Tabela 10: Parâmetros farmacocinéticos do BNZ em plasma e tecido de camundongos tratados com uma única dose de 100 mg/Kg por via oral (média \pm desvio padrão, n=5)

Amostra	Parâmetros farmacocinéticos					
	ASC ₀₋₆ ($\mu\text{g/mL.h}$ ou $\mu\text{g/g.h}$)	R ASC ₀₋₆	ASC _{0-∞} ($\mu\text{g/g.h}$)	TMR (h)	t _{max} * (h)	C _{max} * ($\mu\text{g/mL}$ ou $\mu\text{g/g}$)
Plasma	154,53 \pm 1,57	1	195,71 \pm 6,04	3,86 \pm 0,23	0,83 \pm 0,29	41,61 \pm 2,99
Coração	49,42 \pm 7,07	0,32	57,78 \pm 10,24	2,42 \pm 0,58	0,67 \pm 0,29	21,68 \pm 2,70
Fígado	2,24 \pm 0,16	0,01	2,86 \pm 0,04	3,41 \pm 0,17	0,75 \pm 0,00	1,76 \pm 0,19
Baço	42,39 \pm 3,41	0,27	44,11 \pm 3,54	1,79 \pm 0,11	0,58 \pm 0,14	27,73 \pm 2,14
Cólon	45,64 \pm 6,73	0,30	46,09 \pm 6,71	2,03 \pm 0,22	0,67 \pm 0,29	18,11 \pm 1,32
Duodeno	17,61 \pm 8,34	0,11	20,03 \pm 4,87	2,14 \pm 0,72	0,83 \pm 0,14	8,48 \pm 0,80
Estômago	358,89 \pm 25,39	2,32	368,98 \pm 25,13	2,66 \pm 0,12	0,67 \pm 0,14	127,95 \pm 16,59
Pulmão	96,06 \pm 3,34	0,62	106,14 \pm 5,34	2,74 \pm 0,17	0,63 \pm 0,13	34,58 \pm 2,87
Rim	11,75 \pm 0,75	0,08	12,20 \pm 0,74	2,00 \pm 0,03	0,49 \pm 0,02	6,98 \pm 0,51
Cérebro	28,76 \pm 4,32	0,19	29,45 \pm 4,23	2,01 \pm 0,24	0,75 \pm 0,25	12,39 \pm 1,70

ASC₀₋₆, área sob a curva de 0 a 6h; R, Relação entre ASC₀₋₆ dos tecidos e plasma; ASC_{0-INF}, área sob a curva extrapolada ao infinito; TMR, tempo médio de residência; C_{max} concentração máxima; t_{max}, tempo para a concentração máxima.

* Valores estimados diretamente à partir do gráfico de concentração X tempo.

As concentrações encontradas nos tecidos e no plasma nos diferentes tempos analisados estão representadas nas **Tabelas 11 e 12** e na **Figura 10**.

Tabela 11: Concentração de BNZ em função do tempo, determinadas em amostras de plasma, coração, fígado, baço e cólon de camundongos *Swiss* tratados com 100 mg/Kg em regime de dose única, por via oral (n=5)

		Tempo (h)									
		0,16	0,33	0,50	0,75	1	2	3	4	5	6
Plasma	C (µg/mL)	8,83	25,60	39,00	37,59	41,97	38,02	25,99	21,54	13,05	13,06
	DP	±0,46	±1,37	±1,50	±2,97	±4,47	±1,05	±1,62	±2,82	±0,83	±2,32
	R	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Coração	C (µg/g)	2,43	15,93	20,13	17,99	16,99	13,31	9,58	3,45	ND	ND
	DP	±1,99	±1,75	±3,41	±0,38	±4,88	±1,27	±2,20	±2,12		
	R	0,27	0,62	0,52	0,48	0,40	0,35	0,37	0,16		
Fígado	C (µg/g)	0,5	0,42	0,55	1,76	0,68	0,35	0,24	0,23	0,25	0,27
	DP	±0,21	±0,19	±0,25	±0,19	±0,08	±0,03	±0,02	±0,03	±0,01	±0,00
	R	0,06	0,02	0,01	0,05	0,02	0,01	0,01	0,01	0,02	0,02
Baço	C (µg/g)	4,48	19,69	23,67	26,16	19,00	5,61	4,47	2,25	1,17	1,44
	DP	±0,32	±2,34	±4,90	±2,73	±2,38	±0,69	±1,55	±0,51	±0,06	±0,06
	R	0,51	0,77	0,61	0,70	0,45	0,15	0,17	0,10	0,09	0,11
Cólon	C (µg/g)	8,40	9,44	17,61	15,12	13,26	12,65	8,01	3,20	2,45	0,35
	DP	±6,60	±3,34	±2,17	±1,86	±3,53	±1,73	±2,80	±0,83	±2,28	±0,00
	R	0,95	0,37	0,45	0,40	0,32	0,33	0,31	0,15	0,19	0,03

ND, não detectado; C, concentração média; DP, desvio padrão, R, relação entre C do tecido e plasma.

Tabela 12: Concentração de BNZ em função do tempo, determinadas em amostras de duodeno, estômago, pulmão, rim e cérebro de camundongos *Swiss* tratados com 100 mg/Kg em regime de dose única, por via oral (n=5).

		Tempo (h)									
		0.16	0.33	0.50	0.75	1	2	3	4	5	6
Duodeno	C (µg/g)	8,21	13,44	3,96	8,46	5,52	4,99	2,43	1,28	ND	ND
	DP	±2,10	±1,07	±1,45	±0,83	±2,13	±0,56	±0,40	±0,08		
	R	0,93	0,53	0,10	0,23	0,13	0,13	0,09	0,06		
Estômago	C (µg/g)	95,79	97,64	91,55	157,62	87,13	120,69	115,64	52,51	5,66	9,28
	DP	±33,64	±13,72	±80,62	±18,77	±37,00	±18,52	±6,04	±10,42	±0,49	±0,06
	R	10,85	3,81	2,35	4,19	2,08	3,17	4,45	2,44	0,43	0,71
Pulmão	C (µg/g)	8,19	25,13	25,73	33,20	26,97	26,74	19,31	8,73	5,13	4,43
	DP	±1,35	±0,97	±6,50	±4,05	±3,46	±1,49	±2,98	±2,02	±1,23	±1,07
	R	0,93	0,98	0,66	0,88	0,64	0,70	0,74	0,41	0,39	0,34
Rim	C (µg/g)	1,60	6,12	7,26	3,84	3,26	2,61	2,17	0,75	0,29	0,31
	DP	±0,58	±0,17	±0,13	±1,59	±0,78	±0,25	±0,25	±0,07	±0,06	±0,00
	R	0,18	0,24	0,19	0,10	0,08	0,07	0,08	0,03	0,02	0,02
Cérebro	C (µg/g)	0,80	8,68	9,50	12,04	10,13	8,18	7,00	0,65	ND	ND
	DP	±0,17	±1,14	±2,46	±1,55	±0,69	±1,55	±3,11	±0,06		
	R	0,09	0,34	0,24	0,32	0,24	0,22	0,27	0,03		

ND, não detectado; C, concentração média; DP, desvio padrão, R, relação entre C do tecido e plasma.

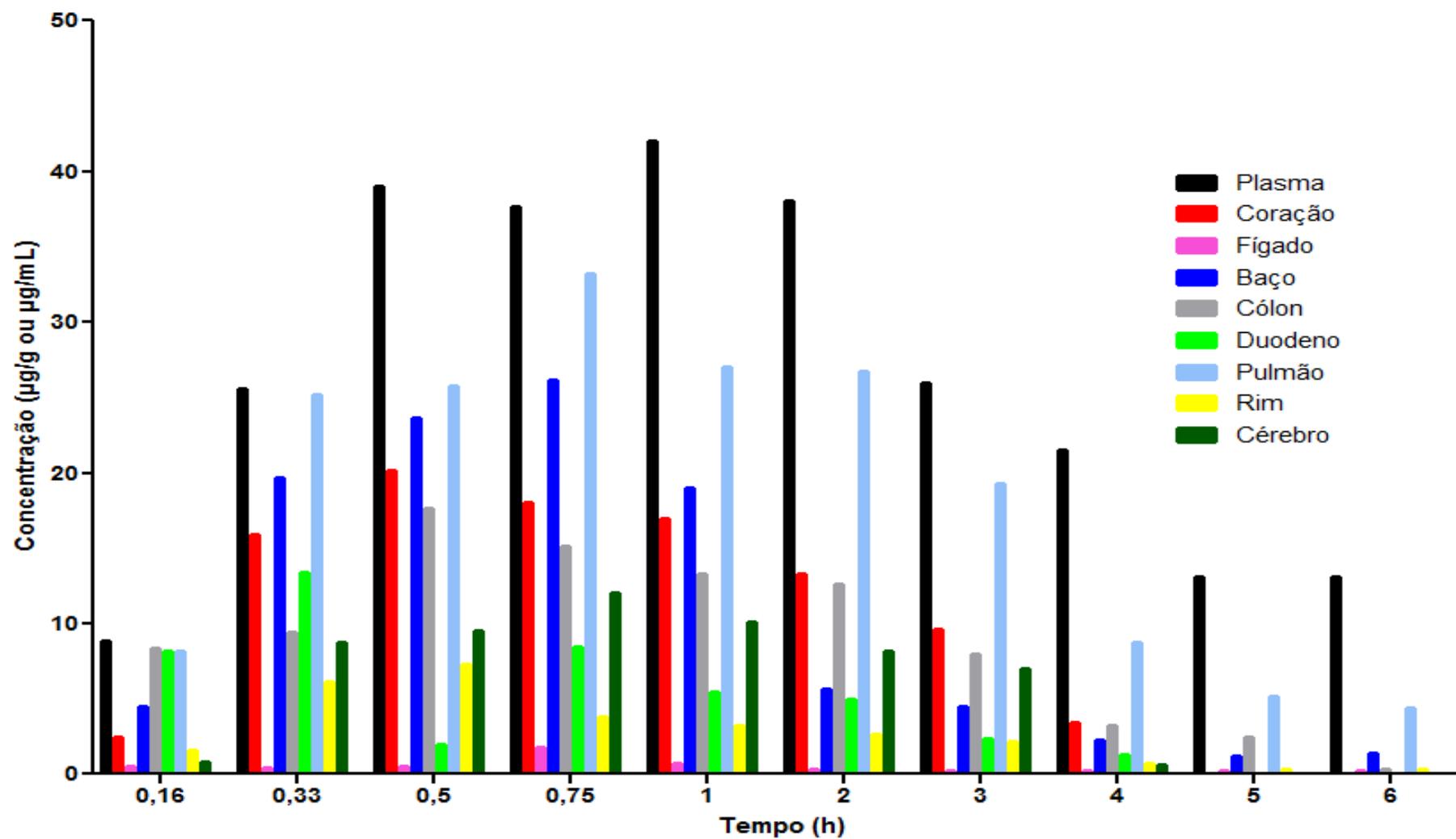


Figura 11: Concentração de BNZ no plasma e em diferentes tecidos de camundongos *Swiss* tratados com única dose de 100 mg/Kg por via oral em função do tempo.

Parte IV:
Discussão e conclusão

9 DISCUSSÃO

Este estudo visou desenvolver e validar um método bioanalítico para investigar a farmacocinética e a biodistribuição do BNZ por meio da análise de plasma e tecido de camundongos avaliados até seis horas após o tratamento com 100 mg/Kg em regime de dose única. A partir da determinação das concentrações ao longo do tempo, os parâmetros farmacocinéticos foram calculados. A eficácia terapêutica do BNZ é dependente da fase de infecção, com alta porcentagem de cura na fase aguda e baixa na fase crônica, necessitando de supervisão médica devido aos efeitos colaterais frequentes e intensos. Além disso, a eficácia de uma quimioterapia empregada na doença de chagas é diretamente relacionada à variabilidade genética do *T. cruzi*, pois existem cepas resistentes ao tratamento, inclusive com o BNZ (BERN, 2011; FABBRO *et al.*, 2007; GARCIA *et al.*, 2005; COURA & DE CASTRO, 2002; CANÇADO, 1991; ANDRADE *et al.*, 1985).

A cromatografia líquida de alta eficiência foi a técnica analítica de separação utilizada devido a sensibilidade, ampla aplicabilidade, fácil adaptação para determinações quantitativas, além da sua adequação à separação das amostras de interesse (SKOOG *et al.*, 2011). Existem na literatura diversos estudos que empregam CLAE-UV para a quantificação do BNZ em matriz biológica (MARSÓN *et al.*, 2013 (a) e (b); MOREIRA DA SILVA *et al.*, 2012; BULFFER, CASTRO e FANELLI, 2011; GUERRERO *et al.*, 2010; MORILLA, PRIETO e ROMERO, 2005; MORILLA *et al.*, 2003; WORKMAN *et al.*, 1984). Todavia, o presente trabalho é o primeiro relato da quantificação do BNZ em diferentes tecidos de camundongos *Swiss*.

Devido à variedade de tecidos, bem como de seus compostos endógenos, foi escolhido para o preparo das amostras a técnica de extração líquido-líquido, devido a sua simplicidade, obtenção de extratos de alta seletividade e baixa sujidade e por já ter sido relatada para a extração do BNZ em plasma de camundongos (MOREIRA DA SILVA, *et al.* 2012; QUEIROZ & LANÇAS, 2005; QUEIROZ, 2001). Em razão da baixa polaridade do BNZ foram testados como solvente extrator o éter etílico e o acetato de etila. Por ter uma polaridade mais próxima à do BNZ o acetato de etila apresentou melhores resultados na extração dos padrões na matriz biológica que o éter etílico, além de ter gerado extratos com menos interferentes.

A extração foi realizada na presença do padrão interno omeprazol (OPZ) de fácil aquisição, cuja recuperação também foi maior com o emprego de acetato de etila. O OPZ foi escolhido como PI devido a boa detecção no mesmo comprimento de onda que o BNZ, além de apresentar um tempo de retenção ligeiramente maior do que o do padrão analítico de BNZ, resultando em uma

separação com tempo razoável de análise. A comparação dos cromatogramas obtidos da matriz biológica branca e da matriz biológica adicionada com BNZ e OPZ mostrou que não houveram interferentes da amostra nos tempos de retenção dos padrões, com exceção do fígado e do estômago que apresentaram um pequeno interferente no tempo de retenção do BNZ o que foi compensado pelo aumento do limite inferior de quantificação para estes órgãos.

Diversos estudos que visaram quantificar o BNZ em matriz biológica utilizaram acetonitrila (ACN) e água como fase móvel (DAVANÇO, CAMPOS e PECCININI, 2014; MOREIRA DA SILVA *et al.*, 2012; MORILLA, PRIETO e ROMERO, 2005; MORILLA *et al.*, 2003). A fração de ACN e água na fase móvel foi determinada após um estudo onde se alterou as proporções até ser alcançada uma proporção ideal, ou seja, separação completa entre os padrões analíticos (BNZ e OPZ) e os interferentes da matriz biológica (plasma e tecidos), além de manter um tempo de análise reduzido. A melhor separação dos analitos foi obtida utilizando fase móvel composta pela mistura de acetonitrila e água na proporção de 30:70 (v/v), com vazão de 1,0 mL/min, com a coluna cromatográfica submetida à temperatura de 40 °C. Nessas condições de separação, as análises cromatográficas de um volume de injeção de 20 µL, após a detecção em ultravioleta (UV) no comprimento de onda de 324 nm, resultaram nos tempos de retenção de 4,1 e 5,7 minutos para o BNZ e o OPZ, respectivamente.

Esta metodologia é semelhante ao estudo publicado por Leonardi, Bombardiere e Salomon (2013) no qual foi utilizada fase móvel composta pela mistura de acetonitrila e água (40:60 v/v), com fluxo de 1,0 mL/min, detecção em comprimento de onda de 324 nm e volume de injeção de 20,0 µL. Moreira da Silva *e cols.* (2012) utilizaram fase móvel composta pela mistura de acetonitrila e água (60:40 v/v), com fluxo de 1,0 mL/min, em temperatura de 40 °C, comprimento de onda de 324 nm, volume de injeção de 25,0 µL. Já Morilla *e cols.* (2003 e 2005) utilizaram fase móvel composta pela mistura de acetonitrila e água (40:60 v/v), com fluxo de 0,9 mL/min, em temperatura de 20 °C, comprimento de onda de 324 nm, volume de injeção de 20,0 µL e Workman *e cols.* (1984) utilizaram fase móvel composta pela mistura de metanol e água (55:66 v/v), com fluxo entre 2,7 e 4,0 mL/min, comprimento de onda de 313 nm, volume de injeção de 20,0 µL. O tempo de retenção do BNZ observado por Moreira da Silva *e cols.* (2012) foi de aproximadamente 2 min e de Workman *e cols.* (1984) entre 1 e 2 min. Esses tempos de retenção podem não ser os mais adequados, pois dependendo das especificações da coluna cromatográfica, essa faixa de tempo é considerada como “volume morto”, que se refere ao tempo necessário para que um composto que não interage com a fase estacionária atravesse a coluna (SKOOG *et al.*, 2011). Neste trabalho, o tempo de retenção do BNZ foi mais semelhante ao observado por Morilla *e cols.* (2003 e 2005),

sendo de 4,7 e 4,8 min. Este tempo é proveniente de um conjunto de condições que inclui, além do fluxo e das proporções de ACN e água na fase móvel, as dimensões da coluna.

Para garantir confiabilidade nos resultados obtidos experimentalmente e a aplicabilidade analítica do método desenvolvido, o mesmo foi validado conforme as diretrizes do guia da *European Medicines Agency – Science Medicines Health (EMA)* do ano de 2011. Desta maneira, foram analisados os seguintes parâmetros: seletividade, efeito residual, limite inferior de quantificação, curva de calibração, precisão, exatidão e estabilidade. O método mostrou-se seletivo com todos os interferentes próximo ao pico de retenção do analito e/ou efeito residual menores de 20 % do LIQ e de 5 % do PI. A metodologia desenvolvida foi linear na faixa de concentração de 0,1 a 100,0 µg/mL para o baço, cérebro, coração, cólon, duodeno, plasma, pulmão e rim e 0,2 a 100,0 µg/mL para estômago e fígado com correlação linear direta (r^2) de 0,99 para todos os tecidos analisados, cumprindo o requisito de no mínimo 0,98 (Brasil, 2003). A faixa de concentração mostrou-se adequada para a quantificação do BNZ nas amostras uma vez que contemplou as concentrações plasmáticas e teciduais encontradas. Por exemplo, no fígado, órgão cujas concentrações observadas foram extremamente baixas, foi possível determinar todas as concentrações durante o intervalo de 6 h, pois estas se mantiveram ligeiramente acima do LIQ a partir da terceira hora após a administração (0,24; 0,23; 0,25 e 0,27 µg/g). Nos casos do coração, duodeno e cérebro, não foram quantificadas as concentrações de BNZ da quinta hora em diante após a administração, não por estarem abaixo do LIQ, mas por não ter sido detectado nenhum sinal relativo ao BNZ pelo método aplicado. Em relação ao estômago, foram detectadas concentrações maiores que o limite superior de quantificação (LSQ) nos tempos de 0,75, 2 e 3 horas após a administração. Tendo em vista que o estômago é um órgão que está envolvido, mesmo que parcialmente, nos processos de absorção do BNZ, as concentrações elevadas e praticamente constantes observadas nos primeiros 30 minutos (média de 95,0 µg/g) sugerem que o período de absorção do BNZ interfere na quantificação deste, causando equívoco em relação às quantidades que estão sendo absorvidas e biodistribuídas. Para melhor discussão dessas observações atípicas encontradas no estômago, em relação aos demais órgãos, é necessário maiores estudos e avaliações experimentais.

Os resultados de precisão intra e inter ensaios, expressos como coeficiente de variação mostraram-se dentro dos limites aceitáveis, ou seja, com variações ≤ 15 %. Dessa forma, pode-se dizer que as leituras são coincidentes entre si. A média das precisões intra e inter ensaios foram respectivamente 3,71 e 5,41 % (plasma), 4,94 e 7,38 % (coração), 2,94 e 8,19 % (fígado), 6,49 e 7,32 % (baço), 4,64 e 6,73 % (cólon), 8,10 e 8,84 % (duodeno), 10,16 e 8,16 % (estômago), 8,96 e

8,62 % (pulmão), 4,26 e 6,53 % (rim) e 8,24 e 8,14 % (cérebro). Da mesma forma, os resultados de exatidão intra e inter ensaios, expressos como erro relativo padrão mostraram-se dentro dos limites aceitáveis, com variações ± 15 %. Assim, observou-se que as leituras são próximas do valor real. A média das exatidões intra e inter ensaios foram respectivamente 1,47 e 1,50% (plasma), 4,06 e 0,93% (coração), -2,88 e -0,40 (fígado), 2,63 e 0,21% (baço), 1,83 e 3,85% (côlon), 1,19 e 1,72% (duodeno), 2,52 e 2,27% (estômago), -1,01 e -0,14% (pulmão), 3,49 e -4,22% (rim) e -2,35 e 1,48% (cérebro).

Constatou-se a estabilidade do BNZ após ser submetido a diferentes condições de manipulação exigidas pelo método, com resultados dentro dos limites aceitáveis ≤ 15 %. As amostras não apresentaram degradação expressiva ao serem submetidas a: temperatura ambiente por 4 horas antes do processamento (estabilidade de curta duração); espera de 36h, após o processamento, para serem injetadas na CLAE (estabilidade de pós processamento); armazenamento em *freezer* -80 °C por 30 dias ininterruptos antes de serem processadas (estabilidade de longa duração); três ciclos de descongelamento e congelamento para serem processadas. Foi ainda avaliada a estabilidade das soluções-padrão em acetonitrila que apresentaram desvio médio de +4,92 % e -3,98 % para o BNZ e o OPZ, respectivamente. Dessa forma, o método bioanalítico proposto neste trabalho para quantificar BNZ em plasma e tecido de camundongos está de acordo com as especificações da *European Medicines Agency – Science Medicines Health* (EMA).

Com a aplicação do método bioanalítico desenvolvido e validado para a quantificação do BNZ em plasma e tecidos foi possível esclarecer o perfil de distribuição do BNZ em camundongos *Swiss*, avaliando como esse fármaco distribui pelo organismo murino. A escolha por este modelo deu-se devido à facilidade de manutenção e manejo e pela ampla utilização de camundongos nas pesquisas em doença de Chagas. O modelo rato é também de fácil manutenção e manejo quando comparado ao modelo cão, entretanto é pouco utilizado por apresentar resistência ao desenvolvimento da doença de Chagas. A infecção neste modelo induz uma rápida produção, maturação e ativação do sistema de monócitos / macrófagos, de modo a controlar a replicação do *T. cruzi* (MELO & MACHADO, 2011).

Em relação ao tratamento dos animais, este foi realizado pela via oral, por gavagem, com o BNZ ressuspenso em uma solução de água e CMC após ser pulverizado em gral de porcelana. Este procedimento é necessário em consequência da baixa solubilidade do fármaco em água (MANARIN *et al.*, 2013; MAXIMIANO *et al.*, 2010; MANARIN *et al.*, 2008). A CMC nas concentrações entre 0,25 e 1% p/v é, entre os derivados da celulose, o agente suspensor mais

utilizado nas preparações farmacêuticas. Age aumentando a viscosidade da formulação e possibilitando uma maior homogeneidade da substância suspensa (FRITZ & BECKER, 1981; IDSON & BACHYNSKY, 1978).

A partir do perfil de exposição sistêmica em relação ao tempo foi calculado os parâmetros farmacocinéticos. O modelo que melhor se ajustou à disposição cinética foi o modelo monocompartimental. Ou seja, todos os locais que o fármaco atinge é visto como um compartimento único por se distribuir de maneira rápida e homogênea por todo o organismo (SOMOZA, 2008; LARA, 2004).

Neste estudo, foi observado que o tempo para atingir a concentração máxima no plasma foi rápido, sendo em média, apenas 0,83 h. Este resultado é semelhante ao encontrado na literatura. Davanço, Campos e Peccinini (2014) e Leonardi, Bombardiere e Salomon (2013) encontraram em ratos *Wistar* tratados pela via oral, os $t_{m\acute{a}x}$ de 1,1 e 2,0 h respectivamente. Moreira da Silva *e cols.* (2012) demonstraram que camundongos *Swiss* tratados pela via oral apresentavam $t_{m\acute{a}x}$ de 2,2 h e Workman *e cols.* (1984) encontraram $t_{m\acute{a}x}$ de 15-30-60 min (dependendo da dose) em camundongos *Balb/c* após tratamento intraperitoneal (i.p.) e os $t_{m\acute{a}x}$ de 1-5 h para cães tratados pela via oral.

A concentração plasmática máxima observada nesse trabalho foi de 41,61 $\mu\text{g/mL}$, em média. Esse resultado difere dos encontrados nos artigos anteriormente o que poderia ser explicado pelas diferentes doses utilizadas em cada trabalho. Todavia, Workman *e cols.* (1984) após tratar camundongos *Balb/c* com uma dose próxima daquela utilizada neste trabalho (78mg/kg) encontraram um $C_{m\acute{a}x}$ também próxima ao observado (36 $\mu\text{g/mL}$).

Em relação a meia vida de eliminação ($t_{1/2\beta}$), os resultados observados nesse trabalho foram semelhantes aos encontrados por outros autores. Nesse estudo, a $t_{1/2\beta}$ do BNZ foi de 2,03 h, o que corrobora com o encontrado por Davanço, Campos e Peccinini (2014), de 2,7 h, Moreira da Silva *e cols.* (2012), de 1,64 h e Workman *e cols.* (1984), de 1,55–1,60 h para camundongos e 9,5–11,2 horas para cães. Morilla, Prieto e Romero (2005) após administração intravenosa de BNZ chegaram a uma $t_{1/2\beta}$ de 3,5 h. Este resultado não é o esperado, já que a $t_{1/2\beta}$ de um fármaco administrado por via oral deve ser superior quando comparada à administração intravenosa, devido a etapa de absorção (DAVANÇO, CAMPOS e PECCININI, 2014).

O volume de distribuição ($V_d/F = 38,81 \text{ mL}$), o *Clearance* ($Cl/F = 13,29 \text{ mL/h}$), ambos em função da biodisponibilidade do BNZ, e o tempo médio de residência ($MRT = 3,86 \text{ h}$) não foram semelhantes em nenhum caso, o que é explicado em função da diferença de doses utilizadas, do modelo escolhido ou da idade dos animais. Bulffer, Castro e Fanelli (2011) mostraram que ratos

jovens apresentam níveis mais elevados e tempo de persistência do BNZ no plasma maiores quando comparados a ratos adultos.

Na avaliação da biodistribuição do BNZ, após a determinação da relação existente entre a ASC_{0-6} de cada tecido com a ASC_{0-6} do plasma foi possível comparar e ordenar de forma decrescente a ASC_{0-6} dos órgãos em função do plasma: estômago (232%), plasma (100%), pulmão (62%), coração (32%), cólon (30%), baço (27%), duodeno (11%), cérebro (10%), rim (8%) e fígado (1%). Frente a esse resultado, podemos observar que existem dois grandes grupos: coração, cólon e baço com média de 30% e duodeno, cérebro e rim com média de 10%. O BNZ encontrado nos tecidos apresentou os seguintes parâmetros farmacocinéticos: estômago ($C_{m\acute{a}x}=127,95$; $t_{m\acute{a}x}=0,67h$ e $TMR=2,66h$), pulmão ($C_{m\acute{a}x}=34,58$; $t_{m\acute{a}x}=0,63h$ e $TMR=2,74h$), coração ($C_{m\acute{a}x}=21,68$; $t_{m\acute{a}x}=0,67h$ e $TMR=2,42h$), cólon ($C_{m\acute{a}x}=18,11$; $t_{m\acute{a}x}=0,67h$ e $TMR=2,03h$) baço ($C_{m\acute{a}x}=27,73$; $t_{m\acute{a}x}=0,58h$ e $TMR=1,79h$), duodeno ($C_{m\acute{a}x}=8,48$; $t_{m\acute{a}x}=0,83h$ e $TMR=2,14h$), cérebro ($C_{m\acute{a}x}=12,39$; $t_{m\acute{a}x}=0,75h$ e $TMR=2,01h$), rim ($C_{m\acute{a}x}=6,98$; $t_{m\acute{a}x}=0,49h$ e $TMR=2,00h$) e fígado ($C_{m\acute{a}x}=1,76$; $t_{m\acute{a}x}=0,75h$ e $TMR=3,41h$). A concentração do BNZ nos tecidos variou. Isso ocorre porque a afinidade do fármaco pelas estruturas dos diversos tecidos é variável. Todavia, no enfoque cinético eles são homogêneos. Esses tecidos podem ser agrupados como um único compartimento porque o BNZ é distribuído rapidamente e de forma reversível entre eles (STORPIRTIS *et al.*, 2011; SCHOENWARD, 2002;). Morilla *e cols.* (2003) relataram que o BNZ livre dissolvido em DMSO com tampão Tris 10mM e administrados pela via intravenosa a 0,2 mg/kg em ratos *Wistar* apresentam 9,1 % da dose no fígado, 1,42 % no pulmão, 0,63 % no rim e zero no baço e no coração. Não é possível efetuar uma comparação com este trabalho devido ao modelo animal, via de administração, meio dispersor e doses diferentes.

A curva de concentração *versus* tempo do estômago e do duodeno foram irregular. Com alta concentração já no primeiro tempo (95,79 $\mu g/g$) para o estômago e picos de concentração em 0,75 e 2 h com concentrações a 157,62 e 120,69 $\mu g/g$, respectivamente. Já no duodeno, apesar das concentrações baixas, os picos de concentração foram em 0,33 e 0,75 h com valores de 13,44 e 8,46 $\mu g/g$, respectivamente. O BNZ é de absorção rápida e praticamente total quando administrado oralmente (LAFEPE, 2013; RAETHER & HANEL, 2003; RAAFLAUB & ZIEGLER, 1979).

O BNZ é encontrado no cérebro dos camundongos em até 4 h após o tratamento. Workman *e cols.* (1984) utilizando CLAE-UV demonstraram a presença de BNZ no cérebro de camundongos e cães previamente tratados por via intraperitoneal e oral, respectivamente. Há ainda estudos que revelam a toxicidade do BNZ com efeitos no sistema nervoso central. Cães tratados com BNZ pela via oral apresentaram encefalopatia com características multifocais e alterações neurológicas

clínicas e patológicas com sequelas dose e tempo-dependentes (FLORES-VIEIRA & BARREIRA, 1997; FLORES-VIEIRA *et al.*, 1997). O resultado obtido nesse trabalho reforça a questão da toxicidade do BNZ, demonstrando que o mesmo atravessa a barreira hematoencefálica.

O BNZ foi encontrado em baixíssimas concentrações no fígado e no rim de camundongos *Swiss*, ao contrário do que foi documentado por Workman *e cols.* (1984) onde camundongos *Balb/c* e *C3h/He* apresentaram uma média de 41,7 e 70,6% da dose do plasma presente no fígado, após administração intraperitoneal de 78 mg/kg. Como já mencionado, Morilla *e cols.* (2003) relataram que, após administração intravenosa de 0,2 mg/Kg em ratos *Wistar*, foram encontrados no fígado e rins, 9,1 e 0,63% da dose administrada, respectivamente. O BNZ, administrado oralmente, é metabolizado no fígado pelo sistema enzimático citocromo P450 gerando como metabólitos o 2-amino-imidazol (redução metabólica do grupo nitro) e o 2-hidroxi-imidazol (substituição hidrolítica do grupo nitro) que são excretados na urina (RAETHER & HANEL, 2003; WORKMAN *et al.*, 1984;). Isso poderia reduzir a quantidade de BNZ presente em alguns órgãos, como o fígado, mas para esclarecer se o metabolismo pode interferir nesta quantificação seria necessário a dosagem dos metabólitos nesses órgãos.

Excluindo a observação atípica de concentração encontrada no estômago, no pulmão foi encontrado a maior relação das áreas sob a curva, no intervalo de tempo de zero a seis horas (ASC_{0-6}) com o plasma (62%), bem como o maior $C_{máx}=34,58 \mu\text{g/g}$. Este resultado pode ser justificado devido à alta vascularização do pulmão necessária para que todo o débito cardíaco proveniente da câmara cardíaca direita se distribua ao longo do parênquima alveolar de forma a permitir uma eficiente relação entre ventilação e perfusão (SALDIVA *et al.*, 2011).

O baço possui alta capacidade filtrante do sangue (fagocitose dos eritrócitos, reciclagem do ferro sanguíneo e captura de patógenos), além de induzir respostas imunitárias adaptativas (MEBIUS & KRAAL, 2005). A ASC_{0-6} do baço dos camundongos deste experimento foi correspondente a 27% da ASC_{0-6} do plasma, o que é explicado devido a elevada vascularização do baço para a filtração sanguínea. Em relação à infecção pelo *T. cruzi*, a biodistribuição do BNZ no baço pode ter importantes implicações clínicas durante a fase aguda, onde é frequente o surgimento de esplenomegalia. Olivieri *e cols.* (2006) mostraram que camundongos infectados e tratados com BNZ apresentam no nono dia após a infecção uma redução do peso do baço quando comparado a animais não tratados, mostrando que quanto mais cedo o tratamento é iniciado menor será a parasitemia e conseqüentemente menores são as mudanças no sistema imunológico do hospedeiro.

Coração e cólon foram órgãos que mostraram uma alta relação das suas ASC_{0-6} com o plasma, sendo 32% e 30%, respectivamente. Esses dados são interessantes se levarmos em conta

que a doença de Chagas na fase aguda torna-se fatal nos casos de insuficiência cardíaca congestiva e na fase crônica sintomática se apresenta nas formas cardíaca e digestiva (PRATA, 2001; BRENER, 1987; ANDRADE, 1985). Como já mencionado, a doença de Chagas quando tratada na fase aguda com BNZ alcança 80% de cura dos pacientes, entretanto na fase crônica esta percentagem cai para 37%. Pacientes crônicos tratados são menos propensos a progressão da cardiopatia, todavia não há comprovação se o tratamento afeta, também, a progressão da doença de Chagas gastrointestinal (BERN, 2011; RASSI Jr, RASSI e MARIN-NETO, 2010; BERN, 2007; FABBRO, *et al*, 2007; GARCIA *et al.*, 2005; CANÇADO, 1991). Acredita-se que as manifestações gastrointestinais são reações tardias (fase crônica) de danos neuronais que ocorreram principalmente na fase aguda da infecção (OLIVEIRA *et al.* 1998; KÖBERLE, 1968). Fabbro *e cols.* (2007) comprovaram que a erradicação do parasito é um requisito para prevenir o desenvolvimento da doença de Chagas. Neste trabalho, foi demonstrado que a biodistribuição do BNZ ocorre de maneira ampla, atingindo altas concentrações inclusive nos órgãos de maior relevância na infecção pelo *T. cruzi*.

10 CONCLUSÃO

Foi desenvolvido e validado um novo método bioanalítico utilizando CLAE-UV eficaz para quantificar o BNZ tanto em plasma quanto em tecidos (coração, fígado, baço, cólon, estômago, duodeno, pulmão, rim e cérebro) de camundongos.

A biodistribuição do BNZ ocorre de maneira ampla, atingindo inclusive os órgãos de maior relevância na infecção pelo *T. cruzi*, coração e cólon.

11 REFERÊNCIAS

ALMEIDA, A.M.; CASTEL-BRANCO, M.M.; FALCÃO, A.C. Linear regression for calibration lines revisited: weighting schemes for bioanalytical methods. **Journal of Chromatography B**, v. 774, p. 215–222, Apr 2002

ALNOUTI, Y.; SRINIVASAN, K.; WADDELL, D.; BI, H.; KAVETSKAIA, O.; GUSEV, A.I. Development and application of a new on-line SPE system combined with LC-MS/MS detection for high throughput direct analysis of pharmaceutical compounds in plasma. **Journal of Chromatography A**, v.1080, n.2, p. 99-106, Jul 2005.

ANDRADE, L. O.; ANDREWS, N. W. The Trypanosoma cruzi-host-cell interplay: location, invasion, retention. **Nat Rev Microbiol**, v. 3, n. 10, p. 819-23, Oct 2005. ISSN 1740-1526.

ANDRADE, Z. A. [The pathology of Chagas disease in man]. **Ann Soc Belg Med Trop**, v. 65 Suppl 1, p. 15-30, 1985.

ARDREY, R. E. Liquid Chromatography - Mass Spectrometry: An introduction. **John Wiley & Sons Ltd.**, Chichester, 2003.

BARRIONUEVO, W.R.; LANÇAS, F.M. Solid-phase extraction (Spe) and solid-phase microextraction of pyrethroids in water. **Química Nova**, v. 24, n. 2, p.172-175, Oct 2001.

BERN, C. Antitrypanosomal Therapy for Chronic Chagas' Disease. **N Engl J Med** v.364, n.34, p. 2527, Jun 2011;

BERN, C.; MONTGOMERY, S.P; HERWALDT, B.L. et al. Evaluation and treatment of Chagas disease in the United States: a systematic review. **JAMA**, 298, p. 2171-81. 2007.

BOROUJERDI, M. Noncompartmental approach in pharmacokinetics based on statistical moments. In: Pharmacokinetics: Principles and applications. New York: **Mc Graw-Hill**, 2002. Cap. 17, p. 331-341

BRASIL. ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução RDC n.27, de 17 de maio de 2012**. Dispõe sobre os requisitos mínimos para a validação de métodos bioanalíticos empregados em estudos com fins de registro e pós-registro de medicamentos.

BRASIL. ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução RE n.899, de 29 de maio de 2003**. “Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos”.

BRENER Z. Atividade terapêutica do 5–nitrofuraldeidosemicarbazona (nitrofurazona) em esquemas de duração prolongada na infecção experimental pelo *Trypanosoma cruzi*. **Rev Inst Med Trop**, v.3, p. 43-49. 1961.

- BRENER, Z. Pathogenesis and immunopathology of chronic chagas' disease. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 82, Suppl. 1, p. 205-213, Nov 1987.
- BULFFER, R.F.; CASTRO, J.A.; FANELLI, S.L. Benznidazol levels in blood vary with age in rats. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 106, n. 3, p. 374-377, May 2011
- CASTRO, J.A.; MECCA, M.M.; BARTEL, L.C. Toxic side effects of drugs used to treat Chagas' disease (American trypanosomiasis). **Hum Exp Toxicol**, v. 25, p. 471-479, 2006
- CANÇADO, J.R. Eficácia da Terapêutica do Benzonidazol na doença de Chagas aguda humana. **Ver. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 24, suppl. I, p. 20-21, 1991.
- CASSIANO, N.M.; BARREIRO, J.C.; MARTINS, L.R.R.; OLIVEIRA, R.V.; CASS, Q.B. Validação em métodos cromatográficos para análises de pequenas moléculas em matrizes biológicas. **Quim. Nova**, Vol. 32, No. 4, 1021-1030, 2009.
- CASTILLO-RIQUELME, M. et al. The costs of preventing and treating chagas disease in Colombia. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 2, n. 11, p. e336, 2008. ISSN 1935-2735.
- CHAGAS C. Nova tripanozomíase humana: Estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n. gen., n. sp., agente etiológico de nova entidade morbida do homem. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, tomo 1, p. 159-218, 1909
- COURA, J. R.; DE CASTRO, S. L. A Critical Review on Chagas Disease Chemotherapy. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 97, Suppl. 1, p. 3-24, Jan 2002.
- COURA, J. R.; DIAS, J. C. Epidemiology, control and surveillance of Chagas disease: 100 years after its discovery. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 104 Suppl 1, p. 31-40, Jul 2009.
- DAVANÇO, M.G.; CAMPO, M.L. de; PECCININI, R.G. Rapid and sensitive ultra-high-pressure liquid chromatography method for quantification of antichagasic benznidazole in plasma: application in a preclinical pharmacokinetic study. **Biomedical Chromatography**, 2014
- DOCAMPO, R. Sensitivity of parasites to free radical damage by antiparasitic drugs. **Chem. Biol. Interactions**, Elsevier Scientific Publishers Ireland Ltd. v.73, p. 1-27, 1990.
- DOCAMPO R.; MORENO, S.N.J. Free radical metabolism of antiparasitic agents, **Fed. Proc.**, v. 45, p. 2471, 1986.
- EUROPEAN MEDICINES AGENCY – SCIENCE MEDICINES HEALTH (EMA). *Guideline on bioanalytical method validation*. 2011

- FABBRO, D.L.; STREIGER, M.L.; ARIAS, E.D.; BIZAI, M.L.; DEL BARCO, M.; AMICONE, N.A. Trypanocide treatment among adults with chronic Chagas disease living in Santa Fe city (Argentina), over a mean follow-up of 21 years: parasitological, serological and clinical evolution. **Rev Soc Bras Med Trop**. v. 40, p.1-10. Jan 2007
- FLORES-VIEIRA, C.L.L. & BARREIRA, A.A. Experimental benznidazole encephalopathy: I. Clinical-neurological alterations. **Journal of Neurological Sciences**, v. 150, p. 3-11, 1997.
- FLORES-VIEIRA, C.L.L.; CHIMELLI, L.; FERNANDES, R.M.F.; BARREIRA, A.A. Experimental benznidazole encephalopathy: II. Electroencephalographic and morphological alterations. **Journal of Neurological Sciences**, v. 150, p. 13-25, 1997.
- FRITZ, H. & BECKER, H. The suitability of carboxymethylcellulose as vehicle reproductive studies. **Arznein Forsch**, Aulendorf, v.31, p. 813-815, 1981
- GARCIA, S. et al. Treatment with benznidazole during the chronic phase of experimental Chagas' disease decreases cardiac alterations. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 49, n. 4, p. 1521-8, Apr 2005.
- GASCON, J.; BERN, C.; PINAZO, M. J. Chagas disease in Spain, the United States and other non-endemic countries. **Acta Trop**, v. 115, n. 1-2, p. 22-7, 2010 Jul-Aug 2010. ISSN 1873-6254.
- GOLGHER, D.; GAZZINELLI, R. T. Innate and acquired immunity in the pathogenesis of Chagas disease. **Autoimmunity**, v. 37, n. 5, p. 399-409, Aug 2004. ISSN 0891-6934.
- GUERRERO, L.; PINAZO, M.J.; POSADA E.; GASCÓN, J.; RIBAS J.; SOY, D. A high-performance liquid chromatographic method for benznidazole quantitation in plasma of patients with Chagas disease. **Clinical Chemistry and Laboratory Medicine**. v. 49, Issue 1, p. 77-82, Nov 2010.
- IDSON, B. & BACHYNSKY, M.O. Natural raw materials in semi-solid dosage forms. **Drug Cosmet Ind**, New York, v. 122, p. 3, 44,153-154, 1978
- KÖBERLE F. Chagas' disease and Chagas' syndromes: the pathology of American trypanosomiasis. **Adv Parasitol**, v.6, p. 63-116, 1968.
- LAFEPE. LAFEPE produzirá Benzonidazol. **Laboratório Farmacêutico do Estado de Pernambuco Governador Miguel Arraes**. 09 Ago 2007.
- LAFEP, BENZNIDAZOL. Responsável técnico: Leduar Guedes de Lima. Recife: **LAFEP**, Laboratório Farmacêutico do Estado de Pernambuco, 2013. Bula de Remédio.
- LARA, P.F. Modelos Farmacocinéticos. In DeLUCIA, R.; OLIVEIRA-FILHO, R.M. **Farmacologia integrada**, 2º. Ed., Rio de Janeiro: Revinter, cap.10, p.81-90, 2004.

LEONARDI, D.; BOMBARDIERE, M.E.; SALOMON, C.J. Effects of benznidazole: cyclodextrin complexes on the drug bioavailability upon oral administration to rats. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 62, p. 543-548, 2013.

MANARIN, R.; BOTTASSO, E.; BOTASSO, O.; SERRA, E.; REVELLI, S. Short report: beneficial effects of benznidazole during an infectious-based situation of systemic inflammatory response: cecal ligation and puncture. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 79, n. 5, p. 793-796, 2008

MANARIN, R.; LAMAS, M.C.; BOTTASSO, E.; SERRA, E.; REVELLI, S.; SALOMON, C.J. Efficacy of novel benznidazole solutions during the experimental infection with *Trypanosoma cruzi*. **Parasitology International**, v. 62, p. 79-81, 2013

MARSON, M.E.; PADRÓ, J.M.; RETA, M.R.; ALTCHÉH, J.; GARCÍA-BOURNISSEN, F.; MASTRANTONIO, G. A simple and efficient HPLC method for benznidazole dosage in human breast milk. **The Drug Monit**, v. 35, n. 4, p. 522-6, Aug 2013 (a).

MARSÓN, M.E.; DANA, D.D.; ALTCHÉH, J.; GARCÍA-BOURNISSEN, F.; MASTRANTONIO, G.; Development of UV/HPLC methods for quantitative analysis of benznidazole in human plasma and urine for application in pediatric clinical studies. **J Clin Lab Anal**, v. 27, n. 5, p. 384-90, Sep 2013 (b).

MARTINDALE. The complete drug reference, 34^o ed. UK: **Royal Pharmaceutical Society**, London, 2005

MAXIMIANO, F.P.; COSTA, G.Y.C.; SOUZA, J.; CUNHA-FILHO, M.S.S. Caracterização físico-química do fármaco antichagásico benznidazol. **Química Nova**, v. 25, p. 1-6, 2010

MELO, R.C.N & MACHADO, C.R.S. *Trypanosoma cruzi*: Peripheral Blood Monocytes and Heart Macrophages in the Resistance to Acute Experimental Infection in Rats. **Experimental Parasitology**. V. 97, P. 15-23, 2001.

MEBIUS, R.E. E KRAAL, G. Structure and function of the spleen. **Nature Review Immunology**, v. 5, p. 606-16, Aug 2005

MONCAYO, A. Chagas disease: current epidemiological trends after the interruption of vectorial and transfusional transmission in the Southern Cone countries. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 98, n. 5, p. 577-91, Jul 2003.

MORILLA, M.J.; PRIETO, M.J.; ROMERO, E.L. Benznidazole vs benznidazole in multilamellar liposomes: how different they interact with blood components? **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 100, n.2, p. 213-219, Apr 2005.

MORILLA, M.J.; BENAVIDEZ, P.E.; LOPEZ, M.O.; ROMERO, E.L. Liposomal Benznidazole: A High-Performance Liquid Chromatographic Determination for Biodistribution Studies. **Journal of Chromatographic Science**, v. 41, Sep 2003.

MOLINA, I.; PRAT, J.G.; SALVADOR, F.; TREVIÑO, B.; SULLEIRO, E.; SERRE, N. POU, D.; ROURE, S.; CABEZOS, J.; VALERIO, L.; BLANCO-GRAU, A.; SÁNCHEZ-MONTALVÁ, A.; VIDAL, X.; PAHISSA, A. Randomized Trial of Posaconazole and Benznidazole for Chronic Chagas' Disease. **N Engl J Med.** v. 370, n.20, p. 1899-1908, May 2014.

OLIVEIRA, R.B.; TRONCON, L.E.; DANTAS, R.O.; MENGHELLI, U.G. Gastrointestinal manifestations of Chagas' disease. **Am J Gastroenterol**, 93, p. 884-9. 1998.

OLIVIERI, B.P.; SOUZA, A.P.; COTTA-DE-ALMEIDA, V; CASTRO, S.L.; ARAÚJO-JORGE, T. Trypanosoma cruzi: Alteration in the lymphoid compartment following interruption of infection by early acute benznidazole therapy in mice. **Experimental Parasitology**, v. 114, p. 228-234, 2006

PRATA, A. Clinical and epidemiological aspects of Chagas disease. **Lancet Infect Dis**, v. 1, n. 2, p. 92-100, Sep 2001.

QUEIROZ, M.E.C. & LANÇAS, F.M. Analysis of drugs in biological samples: Automated "Intube" solid-phase microextraction and High performance liquid chromatography. **Química Nova**, v. 28, n. 5, p. 880-886, 2005.

QUEIROZ, S.C.N.; COLLINS, C.H.; JARDIM, I.C.S.F. Methods of extraction and/or concentration of compounds found in biological fluids for subsequent chromatographic determination. **Química Nova**, v. 24, n. 1, p. 68-76, 2001.

RAAFLAUB, J. & ZIEGLER, W.H. Single-dose pharmacokinetics of the trypanosomicide benznidazole in man. **Arzneimittelforschung**, v. 29, p 1611-4, 1979.

RAETHER, W. & HANEL, H. Nitroheterocyclic drugs with broad-spectrum activity. **Parasitol. Res.** v.90, p.s19-s39, 2003

RASSI Jr, A.; RASSI, A.; MARIN-NETO, J.A. Chagas disease, **The Lancet**, v. 375, Issue 9723, p 1388-1402, Apr 2010.

RIBANI, M.; BOTTOLI, C.B.G.; COLLINS, C.H.; FONTES, I.C.S.; MELO, L.F.C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, v. 27, n. 5, p. 771-780, 2004

RIBEIRO, C.M.; BUDNI P.; PEDROSA, R.C.; FARIAS, M.S.; PARISOTTO, E.B.; DALMARCO, E.M.; FRÖDE, T.S.; OLIVEIRA-SILVA, D.; COLEPICCOLO, P.; WILHELM FILHO, D. Antioxidant therapy attenuates oxidative insult caused by benznidazole in chronic Chagas' heart disease. **International Journal of Cardiology**, v.145, p. 27-33, 2010.

SCHOFIELD, C.J.; JANNIN, J.; SALVATELLA, R. The future of Chagas disease control. **TRENDS in Parasitology**, v. 22, n.12, p. 583-588, Oct 2006.

SCHMUNIS, G. A. Epidemiology of Chagas disease in non-endemic countries: the role of international migration. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 102 Suppl 1, p. 75-85, Oct 2007.

SCHOENWALD, Ronald D. Pharmacokinetics in Drug Discovery and Development by Ronald D. Schoenwald. **Hardcover**, 2002.

SILVA, A.L.M; SOARES-SOBRINHO, J.L; NETO, P.J.R.; SILVA, R.M.F.; MEDEIROS, F.P.M.; LIMA, L.G. Desenvolvimento de método analítico por CLAE em comprimidos de Benznidazol para a Doença de Chagas. **Química Nova**, v.30, p. 1163-1166, 2007.

MOREIRA DA SILVA, R.; OLIVEIRA, L.T.; BARCELLOS, N.M.S.; SOUZA, J.; LANA, M. Preclinical monitoring of drug association in experimental chemotherapy of Chagas' disease by a new HPLC-UV method. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 56, n. 6, p. 3344-8, Jun 2012.

MOREIRA DA SILVA, R. Avaliação da associação de Benznidazol e Itraconazol no tratamento de camundongos infectados com clones de *Trypanosoma cruzi* de grupos genéticos distintos: eficácia terapêutica e farmacocinética. 2011. 117p. Dissertação – **Universidade Federal de Ouro Preto** / Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. Ouro Preto, 2011.

SALDIVA, P.H.N; MAUAD, T.; DOLHNIKOFF, M.; BERNARDI, F.D.C.; SILVA, L.F.F. da; CURY, P.M. Pulmões/Pleura. In: BRASILEIRO-FILHO, G. **Bogliolo Patologia**, 8º ed., Guanabara Koogan, p. 383-441, 2011

SKOOG, D.A.; HOLLER, F.J.; NIEMAN, T.A.; trad. Ignez Caracelli. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência. Em: Princípios de Análise Instrumental 5º ed, Porto Alegre: **Bookman**, 2002. Cap. 28, p. 641-676

STORPIRTIS, S.; GAI, M.N.; CAMPOS, D.R.; GONÇALVES, J.D. Farmacocinética básica e aplicada. Rio de Janeiro: **Guanabara Koogan**, 2011. p. 221

SOMOZA, M.C.. Administración intravenosa rápida: datos plasmáticos. In: ROS et al. **Biofarmacia y Farmacocinética. Ejercicios y problemas resueltos**. Barcelona: Elsevier, cap. 6, p.77-86, 2008

TOZER, T.N.; ROWLAND, M. trad. Eduardo Celia Palma. Introdução à farmacocinética e à farmacodinâmica: as bases quantitativas da terapia farmacológica. Porto Alegre: **Artmed**, 2009. p. 336

UNITED STATES FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (US-FDA). *Guidance for Industry, Bioanalytical Method Validation*, 2013.

URBINA, J. A. Chemotherapy of Chagas disease. **Current Pharmaceutical Design**, v. 8, p. 287-295, 2002.

WORKMAN, P.; WHITE, R.A.S.; WALTON, M.I.; OWEN, L.N.; TWENTYMAN, P.R. Preclinical pharmacokinetics of benznidazole. **Br. J. Cancer**, v. 50, p. 291-303, 1984.

World Health Organization (2010). First WHO report on neglected tropical diseases: working to overcome the global impact of neglected tropical diseases, Geneva.

World Health Organization (2014). Investing to overcome the global impact of neglected tropical diseases Third WHO report on neglected tropical diseases, Geneva.

ANEXO 1 – PROTOCOLO 2013/59 CEUA-UFOP

**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS**

Campus Universitário - Morro do Cruzeiro – ICEB-II, Sala 29
35400-000 - Ouro Preto - MG - Brasil
Fone (31) 3559 -1368 Fax: (31) 3559-1370
Email: ceua@propp.ufop.br

**CERTIFICADO**

Certificamos que o protocolo do projeto com uso de animais nº. 2013/59, intitulado "*Biodistribuição do benzonidazol e novas formulações*", que tem como responsável a Profa. Dra. Cláudia Martins Carneiro, foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UFOP – CEUA-UFOP.

Este certificado expira em 06/12/2016.

Ouro Preto, 30 de junho de 2014.

Wanderson Geraldo de Lima

Prof. Dr. Wanderson Geraldo de Lima
Coordenador da CEUA/UFOP