

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

**Avaliação pré-clínica em roedores do perfil farmacocinético do benzaldeído
semicarbazona livre e complexado em β -ciclodextrina**

MOACIR KAISER

PORTO ALEGRE, 2009

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

**Avaliação pré-clínica em roedores do perfil farmacocinético do benzaldeído
semicarbazona livre e complexado em β -ciclodextrina**

Dissertação apresentada por **Moacir Kaiser**
para obtenção do GRAU DE MESTRE em
Ciências Farmacêuticas

ORIENTADORA: PROF^a. DR^a. TERESA DALLA COSTA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas em nível de Mestrado – Produção e Controle de Qualidade de Produtos Farmacêuticos – da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e aprovada em 10.06.2009, pela Banca Examinadora constituída por:

Prof^a. Dr^a. Clarissa Madalena Bueno Rolim
Universidade Federal de Santa Maria

Prof. Dr. Pedro Eduardo Fröhlich
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Prof^a. Dr^a. Renata Pereira Limberger
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

K13a Kaiser, Moacir

Avaliação pré-clínica em roedores do perfil farmacocinético do benzaldeído semicarbazona livre e complexado em β -ciclodextrina / Moacir Kaiser. – Porto Alegre : UFRGS, 2009. – xx, 90 p. : il., tab.

Dissertação (mestrado). UFRGS. Faculdade de Farmácia. Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas.

1. Anticonvulsivos. 2. Benzaldeído semicarbazona. 3. β -ciclodextrinas.
4. Farmacocinética. I. Dalla Costa, Teresa Cristina Tavares. II. Título.

CDU: 615.2.015.4

Bibliotecárias responsáveis:

Margarida Maria Cordeiro Fonseca Ferreira – CRB 10/480

Heloísa do Canto Canabarro – CRB 10/1036

Esse trabalho foi desenvolvido nos Laboratórios 405, Central Analítica e Centro Bioanalítico de Medicamentos da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, sendo financiado pelo Instituto do Milênio – Inovação e Desenvolvimento de Fármacos e Medicamentos (IM-INOVAR/CNPq).

Dedico este trabalho a meus pais, Iara Maria Hatwig Kaiser e Leoni Kaiser, por acreditarem que a educação e o aprendizado são os maiores legados deixados aos seus filhos, e a meu vovô, Afonso Guilherme Hatwig, pela humildade, amizade, serenidade, conselhos, ensinamentos e, acima de tudo, exemplo de vida.

AGRADECIMENTOS

À Prof^ª. Dr^ª. Teresa Dalla Costa, pela orientação, amizade, oportunidades concedidas, e acima de tudo, pelo profissionalismo.

À Prof^ª. Dr^ª. Sílvia Guterres, pelo auxílio direto ou indireto e pelo convívio.

Ao Instituto INOFAR/CNPq, órgão que financiou o desenvolvimento deste trabalho.

Aos Laboratórios 405, Centro Bioanalítico de Medicamentos e Central Analítica desta Faculdade, por oferecerem as condições e infraestrutura necessárias para o desenvolvimento experimental deste trabalho

Aos irmãos do laboratório 405, em especial, Francine Azeredo, Flávia De Toni Uchôa, Sandra Haas, Vitória Cattani, Rodrigo Freddo, Cândice Felippi, Leandro Tasso, Clarissa Bettoni, Bibiana Araújo, Maiara Pigatto, Liberato Brum Jr, Karina Paese, Renata Vidor Contri, Luana Fiel, Samuel de Marco, Ana Luisa Maurer, Letícia Colomé, Renata Raffin, Evelise Assumpção e demais colegas, pelos momentos de descontração apoio, amizade, aprendizado e companheirismo ao longo dos experimentos.

Os colegas dos Laboratórios de Controle de Qualidade e Desenvolvimento Galênico pela colaboração e companheirismo ao longo deste trabalho.

Aos Funcionários da Faculdade de Farmácia, pela colaboração direta ou indireta dos trabalhos.

Aos meus pais, Iara Maria Hatwig Kaiser e Leoni Kaiser, pelo carinho, apoio e compreensão da importância que o estudo representa ao futuro de seus filhos.

À Lúcia Irene Bieger, a qual sinceramente trago em meu coração como mãe.

A Samuel e Suzana Kaiser, irmãos queridos dos quais tenho muito orgulho e guardo em meu coração.

À minha vovó, Anita Carolina Hatwig, pelo eterno e intenso amor a mim concebido.

Aos meus tios, Augusto, Francisco Júlio e Fernando Hatwig, exemplos de caráter e determinação

À minha namorada, Renata Vidor Contri, quem carinhosamente defino como “meu porto seguro”, pela lealdade, ajuda, conselhos, e amor.

À família Vidor Contri, pelo carinho, amizade e conforto.

A todos os meus amigos, especialmente Diego Gnatta, Ricardo dos Santos Angeli, Giovanni Konat Zorzi, Fabrício Sulek e Douglas Schmatz Mallmann, pelo companheirismo e contribuição no crescimento pessoal.

LISTA DE ABREVIATURAS

BS	Benzaldeído Semicarbazona
β -CD	β -Ciclodextrina
HP- β -CD	Hidroxipropil- β -Ciclodextrina
BS/ β -CD	Benzaldeído Semicarbazona complexado em β -Ciclodextrina
CLAE-UV	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com Detecção no Ultravioleta
EEG	Achados eletroencefalográficos
GABA	Ácido γ -aminobutírico
GABA-T	GABAamino transferase
MES	Convulsão induzida por eletrochoque
AS	Convulsão audiogênica
scPTZ	Convulsão induzida por pentilenotetrazol subcutâneo
TD ₅₀	Dose tóxica em que 50% dos animais apresentam efeitos adversos
i.v.	Via intravenosa
i.p	Via intraperitoneal
p.o.	Via oral
k_e	Constante de velocidade de eliminação
k_a	Constante de velocidade de absorção
$t_{1/2}$	Tempo de meia vida
$ASC_{0-\infty}$	Área sob a curva de 0 a infinito
ASC_{extrap}	Área sob a curva extrapolada
Cl_{tot}	Clearence total
Vd	Volume de distribuição
Cp_{max}	Concentração plasmática máxima
t_{max}	Tempo para atingir a concentração máxima
MRT	Tempo de residência médio
F_{abs}	Biodisponibilidade
IS	Padrão Interno
BBB	Barreira hematoencefálica
P-gp	Glicoproteína P
ATP	Adenosina trifosfato
ANOVA	Análise de variância

LISTA DE FIGURAS

REVISÃO DE LITERATURA

Figura 1. Representação estrutural de alguns compostos arilsemicarbazônicos candidatos a fármacos anticonvulsivantes.....	9
Figura 2. Sítios de interação hipotéticos para compostos arilsemicarbazônicos.....	10
Figura 3. Principais mecanismos de ação associados a fármacos anticonvulsivantes.....	12
Figura 4. Síntese orgânica do Benzaldeído Semicarbazona.....	14
Figura 5. Esquema representando a estrutura de uma β -CD.....	17
Figura 6. Solubilidade do BS em função da concentração de β -CD.....	18

CAPÍTULO I. High Performance Liquid Chromatography for determining a new anticonvulsant candidate, benzaldehyde semicarbazone in rat plasma

Figure 1. Chemical structure of BS and Sodium diclofenac.....	30
Figure 2. Representative HPLC chromatograms of the method.....	36
Figure 3. Mean plasma concentration-time profile of BS after single oral dose of 100 mg/kg to male Wistar rats.....	40

CAPÍTULO II. Pre-clinical pharmacokinetic evaluation of an anticonvulsant candidate benzaldehyde semicarbazone free and included in β -cyclodextrin

Figure 1. Chemical structure of benzaldehyde semicarbazone (BS).....	48
Figure 2. Mean plasma concentration versus time profiles of BS after a single 10 mg/kg i.v. dose of the free BS and BS/ β -CD complex.....	57
Figure 3. Mean plasma concentration versus time profiles of BS after a single oral dose of the free BS at 50 mg/kg and 100 mg/kg, and BS/ β -CD 50 mg/kg.....	60
Figura 4. Tissue concentration time profiles of BS after a single 10 mg/kg i.v. dose of free BS and BS/ β -CD or 50 mg/kg p.o. of free BS and BS/ β -CD complex administration.....	64

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I. High Performance Liquid Chromatography for determining a new anticonvulsant candidate, benzaldehyde semicarbazone in rat plasma

Table 1. Calibration curve parameters and statistics for BS in rat plasma.....	37
Table 2. Intra and inter-day variation of BS in rat plasma.....	38
Table 3. Accuracy for the analysis of BS in rat plasma.....	38
Table 4. Stability results of BS in rat plasma expressed as drug percentage in relation to day one.....	39

CAPÍTULO II. Pre-clinical pharmacokinetic evaluation of an anticonvulsant candidate benzaldehyde semicarbazone free and included in β -cyclodextrin

Table 1. Animal experimental groups used to investigate free BS and BS/ β -CD complex pharmacokinetics.....	51
Table 2. Pharmacokinetic parameters estimated by non-compartmental and compartmental analysis after a single i.v. 10 mg/kg dose of free BS and BS/ β -CD complex.....	58
Table 3. Pharmacokinetic parameters estimated by non-compartmental and compartmental analysis after a single p.o. 50 mg/kg dose of free BS and BS/ β -CD complex.....	61
Table 4. Tissue pharmacokinetic parameters of free BS and BS/ β -CD complex after 10 mg/kg i.v. dosing.....	63
Table 5. Brain pharmacokinetic parameters of free BS and BS/ β -CD complex after 50 mg/kg p.o. dosing.....	65

RESUMO

Objetivos: Avaliar a farmacocinética e a distribuição tecidual do benzaldeído semicarbazona livre (BS) e incluso em β -Ciclodextrinas (BS/ β -CD) após administração de diversas doses por diferentes vias de administração. **Metodologia:** As concentrações plasmáticas de BS foram quantificadas através de método analítico por CLAE-UV desenvolvido e validado, após administração das doses de 10 mg/kg i.v. *bolus* e 50 e 100 mg/kg p.o. da droga livre e 10 mg/kg i.v. *bolus* e 50 mg/kg p.o. da droga complexada a ratos Wistar (n = 8 animais/grupo). Os perfis plasmáticos foram avaliados individualmente pelas abordagens não-compartimental e compartimental para determinação dos parâmetros farmacocinéticos. A avaliação compartimental foi realizada utilizando software Scientist 2.0.1 (Micromath®). A ligação do BS a proteínas plasmáticas foi determinada por ultrafiltração na faixa de 1,0 a 60,0 μ g/mL. O perfil de penetração tecidual da droga livre e complexada foi investigado em diferentes órgãos utilizando o método de homogeneizado de tecido até 5 h após administração de dose 10 mg/kg i.v. A penetração cerebral também foi avaliada para a droga livre e inclusa em β -CD após a dose de 50 mg/kg até 4 h após administração (n = 3 animais/tempo coleta). **Resultados e Discussão:** A fração livre do BS em plasma de ratos foi de $34 \pm 5\%$. O modelo de um compartimento descreveu adequadamente todos os perfis plasmáticos estudados. Após doses intravenosa (10 mg/kg) e oral (50 mg/kg), parâmetros farmacocinéticos como V_d ($1,6 \pm 0,5$ e $2,2 \pm 0,8$ L/kg, respectivamente) e Cl_{tot} ($1,4 \pm 0,5$ and $1,8 \pm 0,5$ L/h·kg, respectivamente) foram maiores para o BS complexado em relação à droga livre, embora os $t_{1/2}$ ($0,8 \pm 0,1$ h⁻¹) mantiveram-se similares ($p < 0,05$). A biodisponibilidade oral do BS/ β -CD (~37%) foi aproximadamente o dobro daquela observada para a droga livre (~20%). O fator de penetração cerebral após doses intravenosa (2,8) e oral (2,5), assim como tempo de residência médio, foram maiores para a droga complexada, independente da via de administração avaliada. **Conclusões:** A farmacocinética do BS livre e complexado mostra uma rápida distribuição tecidual e uma rápida eliminação. A maior penetração cerebral do complexo em relação à droga livre mostra que a β -CD é uma estrutura capaz de vetorizar, reter e modificar a liberação do BS nesse órgão, explicando os achados farmacodinâmicos prévios. **Palavras chave:** Anticonvulsivante, Benzaldeído Semicarbazona, Farmacocinética, Distribuição Tecidual, β -Ciclodextrina.

ABSTRACT

Preclinical evaluation in rodents of the pharmacokinetic profile of benzaldehyde semicarbazone free and complexed with β -cyclodextrin

Purpose: This study aimed to investigate the pharmacokinetics and tissue distribution of benzaldehyde semicarbazone (BS) free and complexed with β -cyclodextrin (BS/ β -CD) after administration to rodents at different doses by diverse routes. **Methodology:** BS plasma concentrations were determined in Wistar rats after administration of 10 mg/kg i.v. bolus and 50 and 100 mg/kg p.o. for the free drug and 10 mg/kg i.v. bolus and 50 mg/kg for the BS/ β -CD ($n = 8$ /group), using a HPLC-UV method specifically developed and validated. Individual plasma profiles obtained were evaluated by non-compartmental and compartmental approaches, using the software Scientist 2.0.1 (MicroMath[®]), analysis to determine the pharmacokinetic parameters. BS protein binding was determined by ultrafiltration at a concentration range of 1.0 a 60.0 $\mu\text{g/mL}$. BS tissue penetration after free or β -CD-complexed drug administration was investigated in different tissues homogenates up to 5 h after i.v. bolus dosing of 10 mg/kg dose. Brain penetration of the free and complexed drug was also evaluated up to 4 h after administration of 50 mg/kg p.o. dose (3 animals/time point). **Results and Discussion:** BS free fraction in plasma was $34 \pm 5\%$. The one-compartmental model described adequately the plasma profiles of all groups investigated. After i.v. (10 mg/kg) and p.o. (50 mg/kg) doses, pharmacokinetic parameters such as V_d (1.6 ± 0.5 e 2.2 ± 0.8 L/kg, respectively) and CL_{tot} (1.4 ± 0.5 and 1.8 ± 0.5 L/h·kg, respectively) were higher for the BS/ β -CD than for the free drug, although the $t_{1/2}$ (0.8 ± 0.1 h⁻¹) remained the same ($p < 0.05$). The oral bioavailability of the BS/ β -CD (~ 37%) was approximately 2-fold of that observed for the free BS (~ 20%). The brain penetration factor after i.v. (2.8) and p.o. (2.5) doses, as well as the mean residence time, were higher after BS/ β -CD dosing than after free drug dosing, regardless of the route administrated. **Conclusions:** BS pharmacokinetics (free and complexed) showed a fast tissue distribution and elimination. The higher brain penetration of the drug after the administration of the complex reveals that the β -CD may be a potential system to carrier, retain and change the delivery of BS in this organ, explaining the previous pharmacodynamic results.

Keywords: Anticonvulsant, Benzaldehyde Semicarbazone, Pharmacokinetics, Tissue Distribution, β -Cyclodextrin.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
2. OBJETIVOS.....	5
3. REVISÃO DE LITERATURA.....	7
3.1. ARILSEMICARBAZONAS.....	8
3.1.1. Relação Estrutura Química-Atividade Biológica.....	8
3.1.2. Mecanismo de Ação.....	11
3.2. BENZALDEÍDO SEMICARBAZONA (BS).....	13
3.2.1. Síntese e Aspectos Gerais.....	13
3.2.2. Estudos Farmacológicos.....	14
3.2.3. Inclusão em β -Ciclodextrinas.....	16
3.2.4. Estudos de Toxicidade.....	19
3.2.5. Referências.....	20

<i>CAPÍTULO I. High Performance Liquid Chromatography for determining a new anticonvulsant candidate, benzaldehyde semicarbazone in rat plasma.....</i>	25
--	-----------

Abstract.....	28
1. Introduction.....	29
2. Experimental.....	30
2.1. Chemical and reagents.....	30
2.2. Chromatographic equipment and conditions.....	31
2.3. Preparation of standard stock solutions and quality control samples.....	31
2.4. Sample preparations.....	32
2.5. Validation procedures.....	32
2.6. Stability studies.....	33
2.7. Pharmacokinetic studies.....	34
3. Results and Discussion.....	34
3.1. Selectivity and recovery.....	34
3.2. Quantitation limit.....	35
3.3. Linearity.....	35
3.4. Precision and accuracy.....	36
3.5. Stability.....	37
3.6. Applicability of the analytical method.....	39
4. Conclusion.....	40
References.....	41

<i>CAPÍTULO II. Pre-clinical pharmacokinetic evaluation of an anticonvulsant candidate benzaldehyde semicarbazone free and included in β-cyclodextrin.....</i>	43
--	-----------

Abstract.....	46
1. Introduction.....	47

2. Material and methods	49
2.1. Chemical and reagents.....	49
2.2. Animals.....	49
2.3. Pharmacokinetic study design.....	50
2.4. Bioanalytical analysis.....	52
2.5. Pharmacokinetic analysis.....	52
2.6. Plasma protein binding.....	54
2.7. Tissue distribution.....	54
2.8. Statistical analysis.....	56
3. Results	56
3.1. Pharmacokinetic profiles of BS and BS/ β -CD in plasma.....	56
3.1.1. Intravenous dosing.....	56
3.1.2. Oral dosing.....	59
3.2. Free BS and BS/ β -CD distribution.....	62
3.3. Plasma protein binding.....	66
4. Discussion	66
5. Conclusions	70
References	70
5. DISCUSSÃO GERAL	75
6. CONCLUSÕES	81
7. ANEXOS	85

1. *INTRODUÇÃO*

A epilepsia compreende os distúrbios de função cerebral caracterizados pela ocorrência periódica e imprevisível de convulsões, as quais, em geral, causam comprometimento transitório da consciência, não somente expondo os indivíduos a riscos de lesões físicas, mas também a restrições sociais que, na grande maioria das vezes, são injustificadas (GOODMAN & GILMAN, 2001).

Por estar associada a transtornos neurológicos graves e ser uma doença freqüente em países em desenvolvimento, com aproximadamente 340 mil a 900 mil casos somente no Brasil considerando a estimativa mundial (1% de prevalência pontual), a epilepsia pode ser considerada como um problema de saúde pública, gerando elevados custos no tratamento dos pacientes e um impacto significativo sobre a balança econômica desses países (GALLUCCI NETO & MARCHETTI, 2005).

A presença de epilepsia é definida pela recorrência de crises epiléticas espontâneas, não provocadas por febre, colapsos agudos do sistema nervoso central (SNC) ou desequilíbrios tóxico-metabólicos graves. A classificação das crises epiléticas se baseia na sintomatologia clínica apresentada pelo paciente e em seus achados eletroencefalográficos (EEG), sendo reconhecidas duas categorias principais: crises convulsivas parciais e crises convulsivas generalizadas, apesar de haver alguma superposição e muitas variedades de cada uma delas (BEN-MENACHEM *et al.*, 1999; GALLUCCI NETO & MARCHETTI, 2005; RANG, 2007). As crises convulsivas parciais começam focalmente em uma região do córtex cerebral e tendem a permanecer localizadas, produzindo sintomas simples sem perda de consciência, tais como contrações musculares e descarga autônoma. As convulsões generalizadas, cujas principais categorias são as convulsões tônico-clônicas e as ausências, envolvem todo o cérebro produzindo atividade elétrica anormal em ambos os hemisférios, com perda imediata da consciência (RANG, 2007). A correta caracterização clínica das crises para cada paciente é fundamental, uma vez que orientará racionalmente o tratamento (BEN-MENACHEN *et al.*, 1999).

O tratamento da epilepsia é sintomático, no sentido de que os fármacos disponíveis inibem as convulsões, não existindo profilaxia eficaz nem cura. A utilização de um único agente anticonvulsivante e o seu monitoramento terapêutico facilitam a otimização do tratamento, além de minimizarem a ocorrência de efeitos

tóxicos (GOODMAN & GILMAN, 2001). Apesar de um bom prognóstico, estima-se, no entanto, que entre 25 e 30% dos pacientes acometidos pelas crises não apresentam melhora clínica ao longo do tratamento com fármacos anticonvulsivantes atualmente comercializados (WHO, 2001; MCCORRY *et al.*, 2004). O insucesso da terapia deve-se a vários fatores: 1) falta de adesão ao tratamento medicamentoso prolongado, acompanhado pelos efeitos adversos de muitos fármacos, cuja gravidade vai desde o comprometimento mínimo do SNC até a morte por anemia aplásica ou insuficiência hepática; 2) diagnóstico incorreto associado à falta de conhecimento sobre as causas e o tratamento ideal das crises; 3) dificuldades de acesso a centros especializados de tratamento; 4) não reconhecimento da epilepsia como um problema de saúde pública, levando a restrições na aquisição de medicamentos anticonvulsivantes em função dos onerosos custos; 5) número limitado de alternativas terapêuticas, sendo a fenitoína, a carbamazepina, o fenobarbital e o ácido valpróico os fármacos mais utilizados na terapêutica (SHORVON & FARMER, 1988; RANG, 2007; GOODMAN & GILMAN, 2001; MEINARDI *et al.*, 2001).

No curso de investigações, descoberta e desenvolvimento de novas estruturas com atividade anticonvulsivante, o planejamento racional de fármacos solidificou-se nas técnicas de modelagem molecular e relação estrutura química-atividade biológica quantitativa (DIMMOCK *et al.*, 1993; YOGEE SWATI *et al.*, 2005a).

A necessidade e a busca constante de novas alternativas terapêuticas para o tratamento da epilepsia encontrou no grupo de arilsemicarbazonas protótipos bastante promissores, embora não haja muita semelhança estrutural deste grupo de compostos quando comparado a outros grupos de fármacos anticonvulsivantes amplamente utilizados no tratamento das crises (DIMMOCK *et al.*, 1993; YOGEE SWATI *et al.*, 2005a; YOGEE SWATI *et al.*, 2005b).

O benzaldeído semicarbazona (BS) é um dos compostos arilsemicarbazônicos que demonstrou promissora atividade anticonvulsivante, embora variável segundo modelo experimental utilizado. Por apresentar neurotoxicidade inferior, ser passível de administração oral e apresentar maior potencial anticonvulsivante pela mesma via de administração quando comparado em

estudos pré-clínicos a outros fármacos desta classe terapêutica, o BS constitui-se em alternativa terapêutica promissora para tratamento das desordens epiléticas (DIMMOCK *et al.*, 1993; DIMMOCK *et al.*, 1995a; DIMMOCK, *et al.*, 2000; BERALDO *et al.*, 2002).

A inclusão deste composto em β -ciclodextrinas proporcionou a melhora de vários aspectos farmacêuticos e farmacológicos. Além de aumentar a solubilidade em meio aquoso, a complexação permitiu redução da dose necessária para atividade anticonvulsivante mínima (BERALDO *et al.*, 2002; TEIXEIRA *et al.*, 2003), melhorando, provavelmente, aspectos farmacocinéticos de absorção oral (aumento da biodisponibilidade) e biodistribuição do composto ao longo do compartimento de efeito.

Frente aos resultados farmacológicos obtidos em animais, justifica-se a avaliação farmacocinética pré-clínica do BS livre e de sua inclusão em β -ciclodextrina, uma vez que o composto apresenta boa atividade anticonvulsivante em diferentes modelos experimentais de epilepsia avaliados e baixa toxicidade, sugerindo índice terapêutico elevado.

A avaliação farmacocinética pré-clínica visa determinar numericamente parâmetros de absorção, distribuição, metabolismo e excreção da droga sob investigação. Embora os estudos farmacocinéticos em humanos sejam mais minuciosos, detalhados e abrangentes, informações preliminares, obtidas a partir de ensaios em animais, são necessárias para nortear o delineamento dos estudos clínicos.

2. OBJETIVOS

O objetivo geral deste trabalho foi avaliar o perfil farmacocinético do benzaldeído semicarbazona livre (BS) e de sua forma de inclusão em β -Ciclodextrina (BS/ β -CD).

Os objetivos específicos foram:

- Desenvolver e validar metodologia analítica por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) para doseamento do BS em plasma de ratos;
- Determinar os parâmetros farmacocinéticos do BS livre após administração a ratos Wistar pelas vias intravenosa e oral, em diferentes doses;
- Determinar os parâmetros farmacocinéticos do composto de inclusão BS/ β -CD pelas vias intravenosa e oral após administração de dose única em ratos Wistar;
- Determinar a penetração tecidual (cérebro, coração, fígado, pulmão, rim, baço e tecido adiposo) do BS após administração a ratos Wistar de dose única 10 mg/kg i.v. *bolus* sobre a forma de BS livre e de complexo BS/ β -CD;
- Determinar a penetração cerebral do composto BS após administração oral de 50 mg/kg a ratos Wistar sob a forma de BS livre e de complexo BS/ β -CD;
- Determinar a ligação do BS a proteínas plasmáticas de ratos Wistar.

3. *REVISÃO DE LITERTURA*

3.1. ARILSEMICARBAZONAS

As arilsemicarbazonas (Figura 1) compreendem um amplo grupo de compostos com baixo custo de obtenção e fácil administração oral, além de apresentarem atividade anticonvulsivante superior a muitos fármacos atualmente utilizados como fenitoína, carbamazepina, e valproato de sódio (DIMMOCK *et al.*, 1995a; BERALDO *et al.*, 2002; TEIXEIRA *et al.*, 2003).

Outras características importantes do grupo, e que os tornam candidatos potenciais a fármacos anticonvulsivantes, estão relacionadas ao seu baixo índice de neurotoxicidade e hepatotoxicidade nas doses usualmente testadas (DIMMOCK *et al.*, 2000; PANDEYA *et al.*, 2000; YOGEE SWARI *et al.*, 2005b; THIRUMURUGAN *et al.*, 2006). São compostos que, assim como muitos fármacos utilizados clinicamente, apresentam os requisitos estruturais mínimos necessários à atividade anticonvulsivante, com a vantagem de não conter a função dicarboximida, a qual é responsável pelo aparecimento de grande parte dos efeitos tóxicos (DIMMOCK *et al.*, 1993). A curta duração do efeito para a maioria dos componentes desta classe, entretanto, pode ser considerada um obstáculo ao seu uso terapêutico, uma vez que dificultaria o regime posológico diário (DIMMOCK *et al.*, 2000).

Além da atividade anticonvulsivante, o grupo de arilsemicarbazonas apresenta um amplo perfil farmacológico e representa uma importante classe de compostos cujas propriedades tem sido extensamente estudadas na química medicinal. Estudos associam estes compostos a propriedades antibacterianas (SRIRAM *et al.*, 2004), antineoplásicas (ASSIS *et al.*, 1996), anti-hipertensivas (WARREN *et al.*, 1977), antinociceptivas e antiinflamatórias (ROCHA *et al.*, 2006).

3.1.1. Relação Estrutura Química-Atividade Biológica

A relação estrutura química-atividade anticonvulsivante das arilsemicarbazonas está associada à presença de duas áreas de interação, as quais foram denominadas como sítios de ligação para átomos de hidrogênios e sítios de ligação para grupamentos arílicos (DIMMOCK *et al.* 1995b).

A Figura 2 mostra as possíveis interações por pontes de hidrogênio entre os átomos 1, 3, 5 e 7 do grupamento semicarbazona e a cadeia peptídica de um receptor hipotético (DIMMOCK *et al.* 2000). Estudos mostram que o grupamento amino terminal (8) não é essencial para a atividade anticonvulsivante e sua troca por um grupamento metila melhora esta propriedade, uma vez que aumenta o número de hidrogênios disponíveis para interagir com o sítio de ligação endógeno, porém, com o inconveniente de aumentar neurotoxicidade (DIMMOCK *et al.*, 2000). Contudo, enquanto a substituição por um grupamento fenilamino é melhor tolerada, a substituição por grupamentos aril geralmente inativam a molécula, sugerindo que a bioatividade é dependente do tamanho do grupo incorporado à região amino terminal (8) (DIMMOCK *et al.*, 1996).

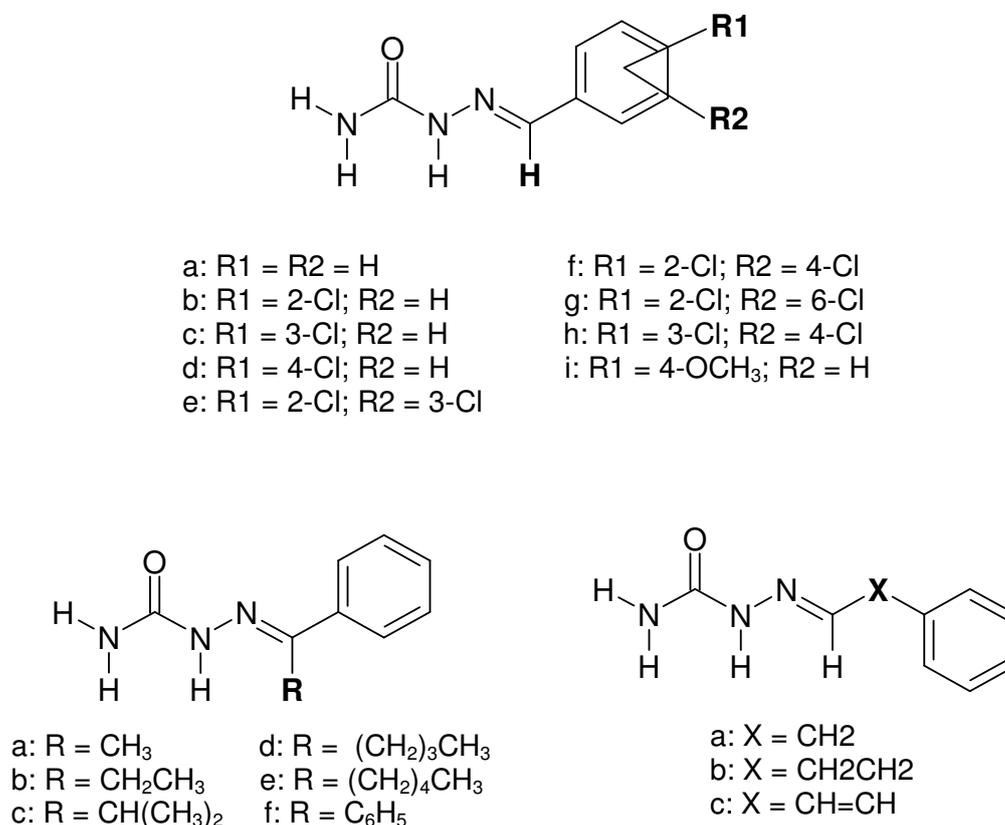


Figura 1. Representação estrutural de alguns compostos arilsemicarbazônicos candidatos a fármacos anticonvulsivantes (Adaptado de DIMMOCK *et al.*, 1993).

As alterações do átomo 1 por grupamentos metila conduzem a um aumento de 2 vezes na atividade anticonvulsivante dos compostos, corroborando a hipótese

de que quanto maior o número de átomos de hidrogênios disponíveis para interagir com o sítio, maior o efeito observado (DIMMOCK *et al.*, 1993).

Além disso, pode-se observar na Figura 1 a presença de um segundo farmacóforo, onde substituintes lipofílicos em R¹ e R² induzem a um aumento na atividade anticonvulsivante. No entanto, estudos revelam que a substituição do grupamento aril por outros grupamentos hidrofóbicos pode ser efetuada com retenção da atividade anticonvulsivante, indicando que os compostos em questão atuariam em uma região específica e de caráter hidrofóbico, ao invés de um sítio exclusivamente arílico (DIMMOCK *et al.*, 1995c).

Mudanças do átomo de oxigênio (7) por isósteros (átomos de enxofre) não conduziram a melhoras nas propriedades anticonvulsivantes (DIMMOCK, *et al.*, 1996).

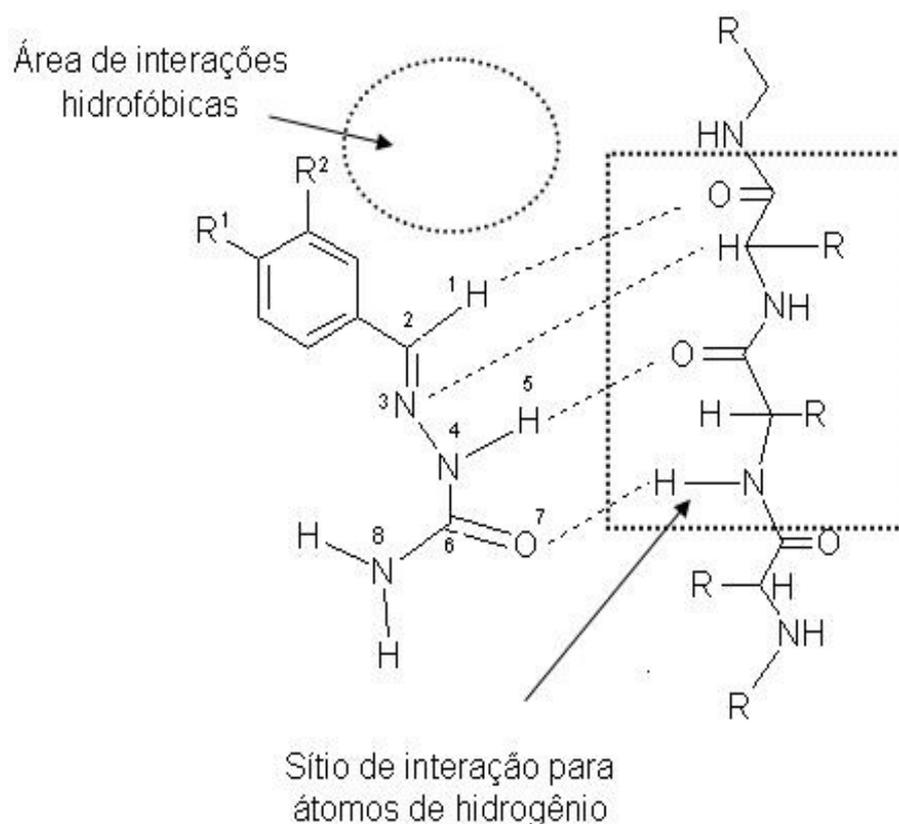


Figura 2. Sítios de interação hipotéticos para compostos arilsemicarbazônicos (Adaptado de DIMMOCK *et al.*, 2000).

3.1.2. Mecanismo de Ação

O suposto mecanismo de ação farmacológica das arilsemicarbazonas ainda não foi completamente esclarecido e sua elucidação tem sido dificultada pela baixa similaridade estrutural desses compostos frente a anticonvulsivantes clássicos. Os estudos, portanto, concentraram-se primeiramente na busca de mecanismos anticonvulsivantes estabelecidos para fármacos dessa classe (Figura 3): 1) ação agonista sobre os canais de cloreto; 2) ação inibitória da GABAamino transferase (GABA-T), enzima envolvida na degradação do neurotransmissor ácido γ -aminobutírico (GABA), o qual apresenta ação agonista sobre os canais de cloreto; 3) bloqueio de descargas repetitivas e redução na recuperação dos canais de sódio voltagem-dependente, o que estabilizaria as membrana neuronais pré-sinápticas, impedindo a liberação de neurotransmissores excitatórios (BEN-MENACHEN *et al.*, 1999; GOODMAN & GILMAN, 2001).

Inicialmente, os resultados de *binding in vitro*, onde utilizaram-se membranas sinápticas ricas em receptores GABA, procedentes de homogenatos cerebrais de ratos, concluíram que as arilsemicarbazonas se comportariam como agonistas gabaérgicos, conforme ficou evidenciado pelo deslocamento de [3 H]GABA, o que não ocorreu para o [3 H]flunitrazepam radiomarcado (DIMMOCK *et al.*, 1993). Além disso, os resultados decorrentes de estudos em modelos animais sugeriam esta hipótese, tendo em vista que as arilsemicarbazonas oferecem proteção contra crises induzidas por picrotoxina e bicuculina, potentes agentes convulsivantes cuja ação se dá através de uma diminuição na afinidade dos receptores gabaérgicos pelo seu neurotransmissor (DIMMOCK *et al.*, 1993; YOGESWATI *et al.*, 2005b). No entanto, o efeito de deslocamento de GABA radiomarcado e a proteção contra crises convulsivantes induzidas pela administração de picrotoxina e bicuculina, além de não ocorrer para todos os compostos da classe testados, foram somente observados para concentrações elevadas dos mesmos.

Estudos recentes sugerem, no entanto, a hipótese de que a atividade anticonvulsivante das arilsemicarbazonas envolveria mecanismos gabaérgicos indiretos. Nesses trabalhos, animais tratados com compostos arilsemicarbazônicos foram sacrificados para posterior remoção do tecido cerebral, o qual foi então subdividido em suas diferentes frações anatômicas, procedendo-se a análise das

concentrações de GABA das diferentes regiões teciduais. Os resultados revelaram aumentos significativos nos níveis de GABA em alguns homogenatos cerebrais, tais como medula oblongata e região cerebral média, em comparação ao grupo controle, provavelmente devido ao caráter inibitório, evidenciado tanto *in vitro* quanto *ex vivo*, de alguns dos compostos testados frente à GABAamino transferase (GABA-T), enzima responsável pela degradação metabólica deste neurotransmissor na fenda sináptica (YOGEE SWATI *et al.*, 2005a; YOGEE SWATI *et al.*, 2005b; THIRUMURUGAN *et al.*, 2006). Contudo, a variabilidade na inativação enzimática para diferentes concentrações dos compostos testados foi muito grande, e em alguns casos, mesmo havendo aumento das concentrações de neurotransmissor em diferentes frações cerebrais dos animais submetidos aos testes, a inativação *in vitro* e *ex vivo* da enzima mostrou-se extremamente baixa (YOGEE SWATI *et al.*, 2005b; THIRUMURUGAN *et al.*, 2006).

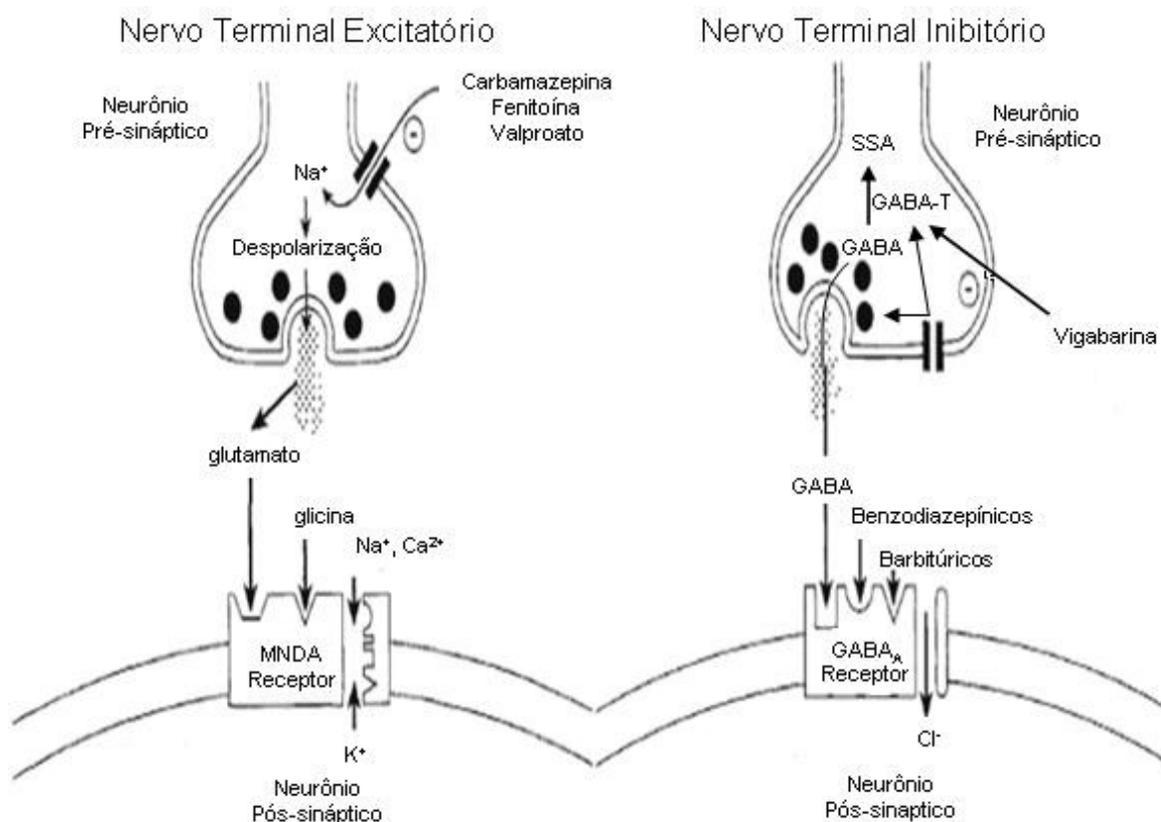


Figura 3: Principais mecanismos de ação associados a fármacos anticonvulsivantes (Adaptado de PODELL, 1998).

Ensaios eletrofisiológicos recentes demonstraram que o suposto mecanismo de ação dos derivados arilsemicarbazônicos envolveria o bloqueio e subsequente inibição da despolarização eletrônica dos canais de sódio voltagem-dependente. Para estes estudos, foram selecionadas duas linhagens celulares: neurônios hipocâmpais de ratos, pela sua alta densidade em canais de sódio e células embrionárias renais humanas, que sofreram inserção de agentes plasmidiais contendo regiões do DNA de roedores necessárias para expressar canais de sódio cerebrais tipo IIA. Utilizando técnicas de *whole-cell patch-clamp* para investigar e quantificar as mudanças de corrente elétrica em membranas celulares na presença de fármaco, evidenciou-se que o composto 4-(4-fluorofenoxi)benzaldeído semicarbazona caracterizava-se como um potente inibidor desses canais, sendo que o grau de inibição da despolarização eletrônica era diretamente proporcional à concentração do composto (ILYIN *et al.*, 2005).

Embora estes achados tenham sido promissores, coerentes e relevantes, novos estudos utilizando-se outros derivados arilsemicarbazônicos fazem-se necessários para consolidar os resultados observados.

3.2. BENZALDEÍDO SEMICARBAZONA (BS)

3.2.1. Síntese e Aspectos Gerais

Entre a classe de arilsemicarbazonas, o benzaldeído semicarbazona (BS) é um composto de síntese orgânica (Figura 4) (BABU *et al.*, 2002) e análise farmacêutica (BERALDO *et al.*, 2002) relativamente simples, além de apresentar baixo custo de obtenção (DIMMOCK *et al.*, 1995a). Esses aspectos, portanto, favorecem sua produção em escala industrial.

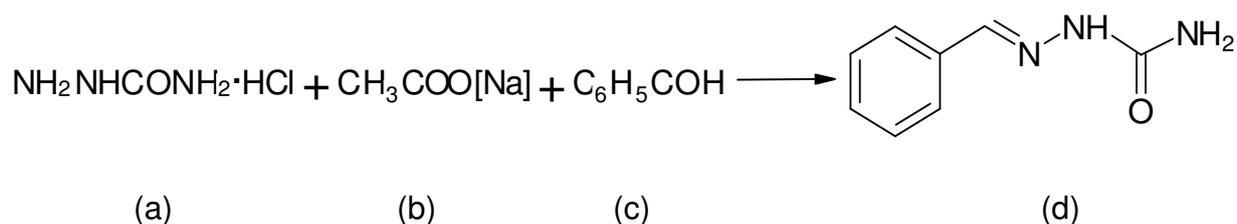


Figura 4. Síntese orgânica do Benzaldeído Semicarbazona: (a) hidrocloreto de semicarbazina; (b) acetato de sódio; (c) benzaldeído; (d) benzaldeído semicarbazona (BABU *et al.*, 2002).

3.2.2. Estudos Farmacológicos

A atividade anticonvulsivante, embora variável entre os modelos experimentais, foi descrita para o BS em diferentes ensaios indutores de crises convulsivas: convulsão induzida por eletrochoque (*maximum electroshock induced seizure* - MES), convulsão audiogênica (*audiogenic seizures* - AS) e convulsão induzida por pentilenotetrazol subcutâneo (*subcutaneous pentylenetetrazole* - scPTZ) (DIMMOCK *et al.*, 1993; DIMMOCK *et al.*, 1995a; DIMMOCK *et al.*, 1995b; DIMMOCK *et al.*, 2000; BERALDO *et al.*, 2002; TEIXEIRA *et al.*, 2003).

No modelo de MES, onde eletrodos são implantados junto à orelha de animais induzindo crises tônico-clônicas generalizadas por estímulos elétricos, o efeito anticonvulsivante observado, além de rápido, com início 30 min após administração, atingiu cerca de 90% dos animais (n = 5) para dose de 100 mg/kg/i.p. (DIMMOCK *et al.*, 1993; DIMMOCK *et al.*, 2000; BERALDO *et al.*, 2002; TEIXEIRA *et al.*, 2003). A atividade cessou após 240 minutos do início do experimento (DIMMOCK *et al.*, 1993; DIMMOCK *et al.*, 1995a; DIMMOCK *et al.*, 2000). Para dose de 50 mg/Kg/p.o., a ausência total e imediata de crises em 100% dos animais (n = 4) estendeu-se entre 12,5 e 120 min após administração, não sendo mais observada após 240 min. Contudo, para doses de 30 mg/kg/p.o. de fenitoína, apenas 25% dos animais (n = 4) apresentaram ausência de crises nos primeiros 12,5 min, e, decorridos 240 min, este percentual aumentou para 75% (DIMMOCK *et al.*, 2000). Esses resultados sugerem que o BS, além de apresentar ótima atividade pela via oral, é um fármaco cujo efeito é rapidamente alcançado, com a inconveniência de um período de ação muito curto, conforme já observado para a maioria dos

compostos arilsemicarbazônicos (DIMMOCK *et al.*, 1993; DIMMOCK *et al.*, 1995a; DIMMOCK *et al.*, 2000).

No modelo experimental de AS, no qual uma colônia de ratos WAR (*Wistar audiogenic rats*) é geneticamente selecionada por apresentar crises convulsivas quando são submetidos a um som de alta intensidade (120 dB), a taxa de atividade anticonvulsivante avaliada após 30 min foi proporcional à dose de BS administrada (50, 75 e 100 mg/kg/i.p.), sendo que a dose de 100 mg/kg/i.p. protegeu 83% (n = 5) dos animais contra as crises (BERALDO *et al.*, 2002). Este modelo aproxima-se mais da condição dos pacientes epiléticos, uma vez que os animais já nascem com a característica de apresentar convulsões.

Em estudos com pentilenotetrazol (scPTZ), um potente indutor de crises complexas de ausência, observou-se que a dose mínima de BS necessária para oferecer proteção em 50% ou mais dos animais, transcorridos 30 min da administração, é bem superior (300 mg/kg/i.p.) (DIMMOCK *et al.*, 1993; DIMMOCK *et al.*, 1995a; DIMMOCK *et al.*, 2000).

Os resultados descritos mostram uma alta variabilidade no grau de atividade anticonvulsivante obtido pelo BS entre os diferentes modelos experimentais de convulsão utilizados, a qual não depende somente da dose administrada, mas também do tipo de crise convulsiva induzida (DIMMOCK *et al.*, 2000). A diferença observada na inibição de crises induzidas pelos modelos experimentais de MES e scPTZ suporta a idéia de que a atividade anticonvulsivante no MES é dependente de um sítio hidrofóbico de interação (no caso, o grupamento aril) e de dois átomos doadores de elétrons (grupamento semicarbazona), o que justificaria as doses menores de BS necessárias para a observação do efeito (DIMMOCK *et al.*, 1995b).

Baseado na analgesia induzida por vários fármacos anticonvulsivantes bloqueadores de canais de sódio, como demonstrado para a carbamazepina (BIANCHI *et al.*, 1995), estudo recente utilizando ratos e camundongos evidenciou que o BS apresenta propriedades antinociceptivas, antiedematogênicas e antiangiogênicas. A redução do efeito nociceptivo induzido pela administração de formaldeído foi proporcional à dose testada (10, 25 e 50 mg/kg/i.p.). Contudo, o mesmo não ocorreu para outras formas de dor induzida, como hiperalgesia térmica e

alodinia mecânica produzidas pela administração de carragenina, onde somente doses elevadas de BS (50 mg/kg/i.p.) evidenciaram efeito analgésico. Na investigação de uma possível redução de edema de pata induzida por carragenina em camundongos, verificou-se que, para as doses mais elevadas (50 mg/Kg/i.p.), além do efeito antiedematogênico, havia prolongamento de duração da ação. Ainda, em modelo experimental que consiste na implantação subcutânea de um disco esponjoso de polieter-poliuretano no dorso de camundongos, o qual atuaria como elemento indutor de resposta inflamatória, desencadeando processos de aterosclerose e injúria tecidual, evidenciou-se que a inibição do processo de angiogênese decorrente da inflamação era diretamente proporcional a dose de BS administrada (0,25, 0,5 e 2,5 mg/kg/i.p.), fato observado pela queda dos níveis de hemoglobina que eram retidos no dispositivo (ROCHA *et al.*, 2006). Conforme resultados experimentais acima descritos e devido a similaridade estrutural frente ao 4-(4-fluorofenoxi)benzaldeído semicarbazona, já descrito como um potente inibidor dos canais de sódio voltagem dependente de neurônios excitatórios e inibidor de quadros de alodinia e hiperalgisia em modelos experimentais de neuropatia periférica em roedores (SHAO, *et al.*, 2004)., sugere-se que esse também seria o mecanismo de ação farmacológico do BS nesses ensaios (ROCHA, *et al.*, 2006).

3.2.3. Inclusão em β -Ciclodextrinas

Além da curta duração de efeito, outra grande desvantagem que afeta não só o BS, mas também as arilsemicarbazonas em geral, é sua baixa solubilidade em água. Nesse sentido, visando melhorar aspectos farmacêuticos de solubilidade em meio aquoso para aumentar a biodisponibilidade oral do composto BS, foi empregada com sucesso a estratégia de complexação molecular em β -ciclodextrinas, denominada hospedeiro-convidado (*host-guest*) (BERALDO *et al.*, 2002; TEIXEIRA *et al.*, 2003).

β -ciclodextrinas (Figura 5) são oligopolissacarídeos cíclicos (α , 1-4 ligados, formados por 7 sub-unidades α -D-glicopirranose). Sua estrutura é composta de 21 grupamentos hidroxila, dos quais 7 são primários e 14 secundários. Todos os grupamentos hidroxila são pontos de partida para modificações estruturais, e a

introdução de vários grupos funcionais no interior do anel macrocíclico é bem tolerada, gerando vários análogos sintéticos (UEKAMA & HIRAYAMA, 1999). Além de não higroscópicas e solúveis em meio aquoso, suas estruturas apresentam cavidades hidrofóbicas com zonas apropriadas para interação e acomodação de outros compostos (fármacos hidrofóbicos, por exemplo), aumentando a solubilidade desses em meio aquoso (SZEJTLI, 1998; UEKAMA *et al.*, 1998; HIRAYAMA & UEKAMA., 1999).

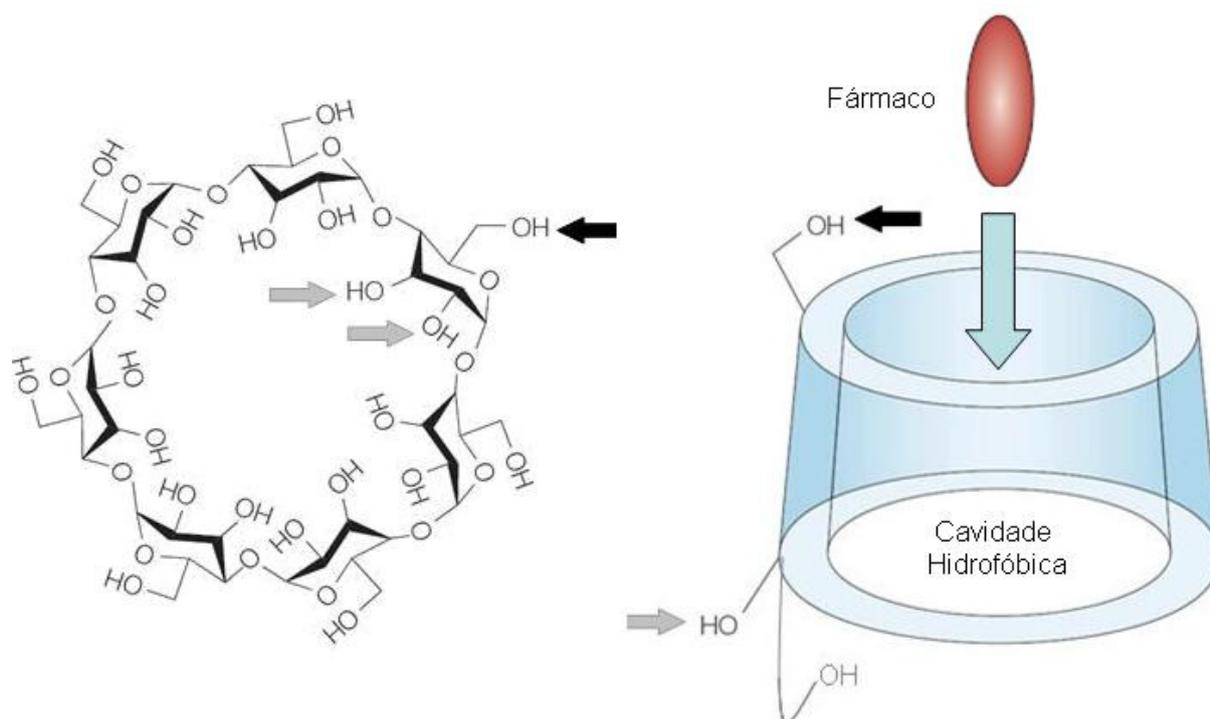


Figura 5. Esquema representando a estrutura de uma β -CD. As indicações em preto e cinza representam os grupamentos hidroxila primários e secundários, respectivamente (Adaptado de DAVIS & BREWSTER, 2004).

Além de aumentar a solubilidade em meio aquoso (Fig. 6), melhorar a estabilidade química frente a reações de hidrólise, oxidação e fotodecomposição, a complexação de fármacos com β -ciclodextrinas pode inclusive alterar parâmetros farmacocinéticos, melhorando aspectos de absorção, biodisponibilidade e biodistribuição (NAKANISHI, *et al.*, 1992; IRIE & UEKAMA, 1997; SZEJTLI, 1998; UEKAMA *et al.*, 1998; HIRAYAMA & UEKAMA, 1999; MONNAERT *et al.*, 2004).

A inclusão de BS em diferentes análogos de β -ciclodextrinas (hidroxipropil- β -CD e β -CD), além de melhorar consideravelmente a solubilidade em meio aquoso, possibilitou o desenvolvimento de promissoras formulações anticonvulsivantes avaliadas no modelo MES de epilepsia.

Utilizando modelo de MES, a dose mínima de BS livre necessária para produzir atividade anticonvulsivante foi de 100 mg/Kg (i.p. e oral). Contudo, a complexação com β -CD permitiu a redução de 75 e 85% das doses oral e i.p., respectivamente, necessárias para obtenção do mesmo efeito (TEIXEIRA *et al.*, 2003).

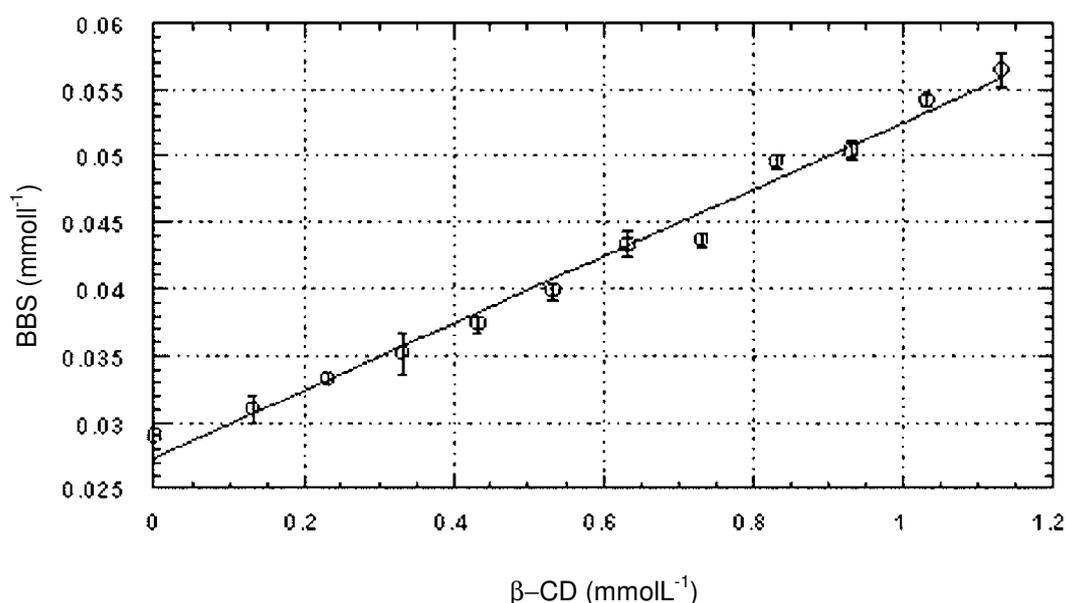


Figura 6. Solubilidade do BS em função da concentração de β -CD ($Y = M_0 + M_1X$; $X =$ concentração de β -CD, $M_0 = 0,0274 \text{ mmolL}^{-1}$, $M_1 = 0,0250 \text{ mmolL}^{-1}$, $R = 0,9935$) (TEIXEIRA *et al.*, 2003).

Resultados muito semelhantes já haviam sido obtidos utilizando-se hidroxipropil- β -CD como agente complexante, sendo que a reduções de dose, pelas vias oral e i.p., foram de 65 e 75%, respectivamente (BERALDO *et al.*, 2002). Os autores sugerem que a diferença de potência observada entre os análogos seja relacionada à melhor aderência das β -CD junto à parede celular epitelial, permitindo maior contato com as mucosas, o que tornaria a absorção mais eficiente (CORTÉS *et al.*, 2001). Outra explicação para o fato está diretamente associada ao grau de

substituição dos grupamentos hidroxila nas β -CDs. Embora aumentem a solubilidade dos complexos em meio aquoso, os grupamentos hidroxila substituídos prejudicam a capacidade complexante da cavidade hidrofóbica (UEKAMA *et al.*, 1998).

Como relatado anteriormente em estudo com o complexo BS/hidroxipropil- β -CD em modelo MES de epilepsia, as alterações de padrão farmacológico do BS incluso em relação a sua forma livre poderiam estar relacionadas a modificações de propriedades farmacocinéticas. Nesse experimento, ratos foram examinados 30 e 240 min após administração de 35 mg/kg do complexo. Enquanto o BS livre não apresenta atividade após 240 min, a sua inclusão em hidroxipropil- β -CD apresentou atividade anticonvulsivante em 60% dos animais ($n = 5$) nesse tempo. Entretanto, em modelo AS de epilepsia, a mesma dose de complexo não apresentou atividade após 240 min, indicando que a atividade anticonvulsivante do complexo não é universal e, portanto, dependente do tipo de crise induzida (BERALDO *et al.*, 2002).

3.2.4. Estudos de Toxicidade

Na avaliação de toxicidade, BS demonstrou ausência total de neurotoxicidade nas doses usuais testadas para o modelo de MES (100 mg/kg/i.p.). Contudo, para o modelo de scPTZ, onde doses maiores de BS foram utilizadas (300 mg/kg/i.p.), os efeitos neurotóxicos, caracterizados pelo decréscimo na resposta a estímulos ambientais e atividade motora foram evidenciados decorridos 30 min da administração, não sendo mais observados após 240 min (DIMMOCK *et al.*, 2000).

Estes dados de neurotoxicidade conferem com outros relatados na literatura, tanto para camundongos ($TD_{50} = 204,17$ mg/kg) quanto para ratos ($TD_{50} = 254,30$ mg/kg), demonstrando que o BS, assim como a maioria dos compostos da classe das arilsemicarbazonas, é um composto com baixos índices neurotóxicos (DIMMOCK *et al.*, 1993).

Estudos pré-clínicos de toxicidade aguda e subaguda para o BS e sua forma de inclusão em β -ciclodextrinas (BS/ β -CD), utilizando ratos Wistar ($n = 5$) de ambos os sexos, revelaram que a grande maioria dos parâmetros bioquímicos não sofreram alterações em relação ao grupo controle, fato condizente com a normalidade

histopatológica dos diferentes órgãos avaliados. A análise hematológica e as medidas de peso revelaram pequena variabilidade entre os grupos para diferentes doses de BS e BS/ β -CD testadas, porém sem significado toxicológico aparente¹.

Os resultados hematológicos da avaliação pré-clínica do BS são muito importantes, uma vez que, por exemplo, o valor preditivo de discrasias sangüíneas induzidas por fármacos, comparando ratos e humanos, é bastante elevado, ultrapassando os 90% (OLSON *et al.*, 2000). Além disso, as pequenas alterações bioquímicas observadas, que não apresentaram significado clínico ou foram reversíveis, são importantes para avaliar a segurança de um novo produto potencialmente terapêutico, pois, a reversibilidade de um determinado efeito tóxico indica a capacidade de reação do organismo para aquela substância (EATON & KLAASEN, 1996).

3.2.5. Referências

ASSIS, S.E.; BRUNO, A.M.; MOLINA, D.A.; CONTI, G.M.; GAOZZA, C.H. Synthesis, DNA interaction and antineoplastic activity of semicarbazone derivatives. *II Farmaco*, v.51, p. 419-423, 1996.

BADU, R.R.; VIJAYAN, N.; GOPALAKRISHNANA, R.; RAMASAMY, P. Growth and characterization of Benzaldehyde Semicarbazone (BSC) single crystals. *Journal of Crystal Growth*, v.240, p. 545-548, 2002.

BEN-MENACHEM, E.; HENRIKSEN, O.; JOHANNESSEN, S.I. Diagnosis and treatment partial seizures. *CNS Drugs*, v.11, p. 23-39, 1999.

BERALDO, H.; SINISTERRA, R.D.; TEIXEIRA, L.R.; VIEIRA, R.P.; DORETTO, M.C. An effective anticonvulsant prepared following a host-guest strategy that uses hydroxypropyl- β -cyclodextrin and benzaldehyde semicarbazone. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v.296, p. 241-246, 2002.

BIANCHI, M.; ROSSONI, G.; SACERDOTE, P.; PANERAI, A.E.; BERTI, F. Carbamazepine exerts anti-inflammatory effects in the rat. *European Journal of Pharmacology*, v.294, p. 71-74, 1995.

CORTÉS, M.E.; SINISTERRA, R.D.; AVILA-CAMPOS, M.J.; TORTAMANO, N.; ROCHA, R.G. The Chlorhexidine: β -cyclodextrin inclusion of compound: preparation, characterization and microbiological evaluation. *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry*, v.40, p. 297-302, 2001.

¹ Comunicação pessoal fornecida pela Prof^a. Dr^a. Heloísa Beraldo, IQ da UFMG. Dados submetidos à publicação.

DAVIS, M.E.; BREWSTER, M.E. Cyclodextrin-based pharmaceuticals: past, present and future. *Nature Reviews. Drug Discovery*, v.3, p. 1023-1035, 2004.

DIMMOCK, J.R.; SIDHU, K.K.; THAYER, R.S.; MACK, P.; DUFFY, M.J.; REID, R.S.; QUAIL, J.W.; PUGAZHENTHI, U.; ONG, A.; BIKKER, J.A.; WEAVER, D.F. Anticonvulsant activities of some arylsemicarbazones displaying potent oral activity in the maximal electroshock screen in rats accompanied by high protection indices. *Journal of Medicinal Chemistry*, v.36, p. 2243-2252, 1993.

DIMMOCK, J.R.; SIDHU, K.K.; TUMBER, S.D.; BASRAN, S.K.; CHEN, M.; QUAIL, YANG, J.; J.W.; ROZAS, I.; WEAVER, D.F. Some arylsemicarbazones possessing anticonvulsant activities. *European Journal of Medicinal Chemistry*, v.30, p. 287-301, 1995a.

DIMMOCK, J.R.; PANDEYA, S.N.; QUAIL, J.W.; PUGAZHENTHI, U.; ALLEN, T.M.; KAO, G.Y.; BALZARINI, J.; DECLERCQ, E. Evaluation of semicarbazones, thiosemicarbazones and bis-carbohydrazones of some aryl alicyclic ketones for anticonvulsant and other biological properties. *European Journal of Medicinal Chemistry*, v.30, p. 303-314, 1995b.

DIMMOCK, J.R.; VASHISHTHA, S.C.; STABLES, J.P. Anticonvulsant semicarbazones: are aryl group necessary for activity? *Pharmazie*, v.50, p. 823-824, 1995c.

DIMMOCK J.R.; PUTHUCODE, R.N.; LO, M.S.; QUAIL, J.W.; YANG, J.; STABLES, J.P. Structural modifications of the primary amino group of anticonvulsant arylsemicarbazones. *Pharmazie*, v.51, p. 83-88, 1996.

DIMMOCK, J.R.; VASHISHTHA, S.C.; STABLES, J.P. Anticonvulsant properties of various acetylhydrazones, oxamoylhydrazones and semicarbazones derived from aromatic and unsaturated carbonyl compounds. *European Journal of Medicinal Chemistry*, v.35, p. 241-248, 2000.

EATON, D. L.; KLAASSEN, C. D. Principles of Toxicology. In: KLAASSEN, C.D. Casarett and Doull's toxicology: the basic science of poisons. 5.ed. New York: McGraw-Hill, p. 13-33, 1996.

GALUCCI NETO, J.; MARCHETTI, R.L. Aspectos epidemiológicos e relevância dos transtornos mentais associados à epilepsia. *Revista Brasileira de Psiquiatria*, v.27, p. 323-328, 2005.

GOODMAN, L.S.; GILMAN, A.G. As bases farmacológicas da terapêutica. In: MCNAMARA, J.O. Fármacos eficazes no tratamento das epilepsias. 10.ed. New York: MacGraw-Hill, p. 391-410, 2001.

HIRAYAMA, F.; UEKAMA, K. Cyclodextrin-based controlled drug release system. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v.36, p. 125-141, 1999.

ILYIN, V.I.; HODGES, D.D.; WHITTEMORE, E.R.; CARTER, R.B.; CAI, S.X.; WOODWARD, R.M.; V102862 (Co 102862): a potent, broad-spectrum state-

dependent blocker of mammalian voltage-gated sodium channels. *British Journal of Pharmacology*, v.144, p. 801-812, 2005.

IRIE, T.; UEKAMA, K. Pharmaceutical applications of cyclodextrins. III. Toxicological issues and safety evaluations. *Journal of Pharmacological Science*, v.86, p. 147-162, 1997.

MEINARDI, H., SCOTT, R.A.; REIS, S., SANDER, J.W.A.S. The treatment gap in epilepsy: the current situation and way forward. *Epilepsy*, v. 42, p. 136-149, 2001.

MCCORRY, D.; CHADWICK, D.; MARSON, A. Current drug treatment of epilepsy in adults. *The Lancet Neurology*, v.3, p. 729-735, 2004.

MONNAERT, V.; TILLOY, S.; BRICOUT, H.; FENART, L.; CECHELLI, R.; MONFLIER, E. Behavior of α -, β -, and γ -cyclodextrins and their derivatives on an in vitro model of blood-brain barrier. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, v. 310, p. 745-751, 2004.

NAKANISHI, N.; NADAI, T.; MASADA, N.; MIYAGIMA, K. Effect of cyclodextrins on biological membranes. II. Mechanism of enhancement on the intestinal absorption of a non-absorbable drug by cyclodextrins. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, v. 40, p. 1252-1256, 1992.

OLSON, H.; BETTON, G.; ROBINSON, D.; THOMAS, K.; MONRO, A.; KOLAJA, G.; LILLY, P.; SANDERS, J.; SIPES, G.; BRACKEN, W.; DORATO, M.; VAN DEUN, K.; SMITH, P.; BERGER, B.; HELLER, A. A concordance of toxicity of pharmaceuticals in humans and in animals. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, v.32, p. 56-67, 2000.

PANDEYA, S.N.; YOGEEWARI, P.; STABLES, J.P. Synthesis and anticonvulsant activity of 4-bromophenyl substituted arylsemicarbazones. *European Journal of Medicinal Chemistry*, v.35, p. 879-886, 2000.

PODELL, M. Antiepileptic drug therapy. *Topics in Companion Animal Medicine*, v.13, p. 185-192, 1998.

RANG, H.P.; DALE, M.M.; RITTER, J.M.; FLOWER, R.J. *Farmacologia*. 6.ed. Rio de Janeiro: Elsevier, p. 575-587, 2007.

ROCHA, L.T.S.; COSTA, K.A.; OLIVEIRA, A.C.P.; NASCIMETO JR., E.B.; BERTOLLO, C.M.; ARAÚJO, F.; TEIXEIRA, L.R.; ANDRADE, S.P.; BERALDO, H.; COELHO, M.M. Antinociceptive, antiedematogenic and antiangiogenic effects of benzaldehyde semicarbazone. *Life Sciences*, v.79, p. 499-505, 2006.

SHAO, B.; VICTORY, S.; ILYIN, V.I.; GOEHRING, R.R.; SUN, Q.; HOGENKAMP, D.; HODGES, D.D.; ISLAM, K.; SHA, D.; ZHANG, C.; NQUYEN, P.; REBLEDO, S.; SAKELLAROPOULOS, G.; CARTER, R.B. Phenoxyphenyl pyridines as novel state-dependent, high-potency sodium channel inhibitors. *Journal of Medicinal Chemistry*, v. 47, p. 4277-4285, 2004.

SHORVON, S.D.; FARMER, P.J. Epilepsy and developing countries: a review of epidemiological, sociocultural and treatment aspects. *Epilepsia*, v.27, p. S36-S54, 1988.

SRIRAM, D.; YOGESWARI, P.; THIRUMURUGAN, R. Antituberculous activity of some aryl semicarbazone derivatives. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, v.14, p. 3923-3924, 2004.

SZEJTLI, J. Introduction and general overview of cyclodextrin chemistry. *Chemical Review*, v.98, p. 1743-1753, 1998.

TEIXEIRA, L.R.; SINISTERRA, R.D.; VIEIRA, R.P.; DORETTO, M.C.; BERALDO, H. Inclusion of benzaldehyde semicarbazone into β -cyclodextrin produces a very effective anticonvulsant formulation. *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry*, v.47, p. 77-82, 2003.

THIRUMURUGAN, R.; SRIRAM, D.; SAXENA, A.; STABLES, J.; YOGESWARI, P. 2,4-Dimethoxyphenylsemicarbazones with anticonvulsant activity against three animal models of seizures: synthesis and pharmacological evaluation. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, v.14, p. 3106-3112, 2006.

UEKAMA, K.; HIRAYAMA, F.; IRIE, T. Cyclodextrin drug carrier systems. *Chemical Review*, v.98, p. 2045-2076, 1998.

WARREN, J.D.; WOODWARD, D.L.; HARGREAVES, R.T. 4-Substituted semicarbazones of mono- and dichlorobenzaldehydes as antihypertensive agents. *Journal of Medicinal Chemistry*, v.20, n.11, p. 1520-1521, 1977.

WHO Epilepsy: aetiology, epidemiology and prognosis, 2001. Disponível no endereço eletrônico < <http://www.who.int>. > Acesso em 10 jun,2007.

YOGESWARI, P.; SRIRAM, D.; VEENA, V.; KAWYA, R.; RAKHRA K.; RAGAVENDRAN, J.V.; MEHTA, S.; THIRUMURUGAN, R.; STABLES, J.P. Synthesis of aryl semicarbazones as potential anticonvulsant agents. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, v.59, p. 51-55, 2005a.

YOGESWARI, P.; SRIRAM, D.; THIRUMURUGAN, R.; RAGHAVENDRAN, J.V.; SUDHAN, K.; PAVANA, R.K.; STABLES, J. Discovery of N-(2,6-Dimethylphenyl)-substituted semicarbazones as anticonvulsants: hybrid pharmacophore-based design. *Journal of Medicinal Chemistry*, v.48, p. 6202-6211, 2005b.

CAPITULO I. **High Performance Liquid
Chromatography for determining a new
anticonvulsant candidate, benzaldehyde
semicarbazone in rat plasma**

Este capítulo aborda o desenvolvimento e validação de metodologia analítica por CLAE-UV para quantificação do BS em amostras de plasma de ratos Wistar.

O método foi validado conforme as normas do *Food and Drug Administration* (FDA, 2001). Para tanto, utilizou-se um cromatógrafo em líquido Waters® com coluna e pré-coluna fase reversa C₁₈, utilizando o diclofenaco de sódio como padrão interno. A fase móvel foi composta de água, metanol e acetonitrila (65:30:5 v/v/v), e o pH ajustado para 9,0 com hidróxido de amônio. O fluxo empregado foi de 1,1 mL/min e o comprimento de onda estabelecido em 282 nm. Para o preparo das amostras foi utilizado o método de precipitação de proteínas plasmáticas com metanol, sendo que alíquotas de 25 µL do sobrenadante foram injetadas e analisadas por CLAE-UV. A curva de calibração foi estabelecida entre 0,1 e 16 µg/mL a partir de dados de estudo piloto, realizado previamente à validação, onde administraram-se BS nas dose oral de 100 mg/kg (n = 5). Parâmetros como linearidade, precisão (intra e interdia), exatidão, limite de quantificação, especificidade e seletividade do método analítico foram avaliados. Além disso, foram determinadas as porcentagens de recuperação (extração) do BS e padrão interno na matriz plasmática e, por último, foi conduzido um estudo de estabilidade do BS frente a diferentes condições de temperatura e ciclos de congelamento/descongelamento.

O método validado mostrou-se adequadamente sensível para caracterizar a fase de eliminação do BS no plasma de ratos Wistar após administrações de dose oral de 100 mg/kg, indicando a adequabilidade do método para estudo farmacocinético pré-clínico em roedores.

Os resultados do desenvolvimento e validação do método analítico para o BS em plasma de ratos Wistar permitiram a redação de um artigo intitulado “High Performance Liquid Chromatography for Determining a New Anticonvulsant Candidate Benzaldehyde Semicarbazone in Rat Plasma”, que foi submetido à publicação, tendo como autores: Moacir Kaiser; Francine Johansson Azeredo; Heloísa de Oliveira Beraldo e Teresa Dalla Costa.

CAPÍTULO II. **Pre-clinical pharmacokinetics
evaluation of an anticonvulsant candidate
benzaldehyde semicarbazone free and included
in β -cyclodextrin**

Este trabalho aborda os estudos de farmacocinética e de distribuição tecidual do BS livre e complexado em β -CD. O delineamento experimental do estudo farmacocinético foi conduzido a partir de 5 grupos de animais ($n = 8/\text{grupo}$). Aos grupos G1 e G2, foram administradas doses intravenosas de 10 mg/kg de BS livre e complexado. Os grupos G3 e G4 receberam doses orais de 50 e 100 mg/kg de BS livre, respectivamente, e o grupo G5 recebeu doses orais de 50 mg/kg de BS, administrado na forma de complexo.

Os resultados mostraram farmacocinética linear na faixa de doses estudada (10 a 100 mg/kg), com uma biodisponibilidade oral de aproximadamente 20% para o BS livre, contrastando com a biodisponibilidade de 37% do complexo BS/ β -CD, levando em consideração os diferentes perfis intravenosos de ambas as formas. Os estudos de farmacocinética intravenosa revelaram aumento significativo de CL_{tot} e Vd do BS complexado em relação à sua forma livre ($p < 0,05$), possivelmente associados, respectivamente, a uma maior extensão de depuração renal ou hepática e a maior capacidade da droga em difundir-se entre os tecidos quando incluída em β -CD. Esse mesmo fenômeno foi evidenciado quando o complexo foi administrado pela via oral, sugerindo que BS/ β -CD intacto esteja sendo absorvido ao longo do trato gastrointestinal. Os estudos de penetração tecidual do BS livre e complexado pela via intravenosa (10 mg/kg) mostram uma rápida e ampla distribuição da droga entre os órgãos avaliados. Contudo, o tecido cerebral apresentou diferentes perfis de concentração de BS em função do tempo, mostrando, para o BS/ β -CD, um platô de concentração que se estendeu por 4 h após a administração. Um perfil de penetração cerebral semelhante para o BS foi evidenciado após administração do complexo pela via oral (50 mg/kg). Além disso, o fator de penetração cerebral do BS/ β -CD observado para as vias intravenosa (2,8) e oral (2,5) foram semelhantes, corroborando a maior penetração da droga evidenciada nesse tecido e explicando os resultados farmacodinâmicos publicados sobre a droga.

Os dessa parte do trabalho permitiram a redação de um artigo, o qual foi submetido para publicação com o título “Pre-Clinical Pharmacokinetics Evaluation of an Anticonvulsant Candidate Benzaldehyde Semicarbazone Free and Included in β -Cyclodextrin”, tendo como autores Moacir Kaiser; Francine Johansson Azeredo; Flávia De Toni Uchôa; Heloísa de Oliveira Beraldo e Teresa Dalla Costa.

5. *DISCUSSÃO GERAL*

Este trabalho objetivou avaliar e caracterizar a farmacocinética pré-clínica do BS, uma vez que os resultados farmacológicos de diferentes modelos experimentais o credenciam como protótipo de fármaco para tratamento da epilepsia.

Para isso, primeiramente, foi desenvolvida e validada metodologia analítica por CLAE-UV para quantificação do BS em plasma de ratos. Parâmetros como seletividade, linearidade, limite de quantificação, precisão intra e interdia, exatidão, recuperação e estabilidade foram avaliados e atenderam as normas especificadas para validação de métodos bioanalíticos. De posse de um método bioanalítico validado, foi iniciada a investigação da farmacocinética do BS em ratos Wistar após administração de diferentes doses por duas vias de administração.

O perfil farmacocinético do BS livre após administração i.v. *bolus* (10 mg/kg) foi adequadamente descrito pelo modelo aberto de 1 compartimento com eliminação de primeira ordem e um $t_{1/2}$ aproximado de 1 hora. Parâmetros farmacocinéticos como Cl_{tot} e Vd foram de $0,6 \pm 0,4$ L/h·kg e $0,8 \pm 0,5$ L/kg, respectivamente. A fração do BS ligada a proteínas plasmáticas foi de $34 \pm 5\%$, não sendo concentração dependente na faixa de 1 $\mu\text{g/mL}$ a 60 $\mu\text{g/mL}$.

O modelo aberto de 1 compartimento com absorção e eliminação de primeira ordem foi capaz de descrever os perfis farmacocinéticos do BS livre após administração de 50 mg/kg e 100 mg/kg pela via oral. A escolha destas doses revelou que a farmacocinética dos BS livre é linear neste intervalo, apresentando uma biodisponibilidade relativa de aproximadamente 20% para ambas as doses avaliadas. A análise estatística dos parâmetros farmacocinéticos (k_e , Cl_{tot} e Vd) obtidos para as diferentes doses e vias administradas não revelou diferença significativa entre abordagem não-compartimental e análise compartimental ($p < 0,05$), mostrando assim que o modelo matemático utilizado para descrever os dados experimentais é adequado.

A inclusão do BS em β -CD (BS/ β -CD), além de melhorar a solubilidade em meio aquoso, proporcionou aumento da potência farmacológica da droga, com redução de 75% da dose necessária para se obter o mesmo efeito em relação à droga livre (100 mg/kg) pela via oral. Dessa forma, a avaliação farmacocinética do complexo (BS/ β -CD) pelas mesmas vias em que a forma livre foi caracterizada

também foi objetivo deste trabalho, uma vez que sua caracterização é importante para explicar os resultados farmacodinâmicos observados.

Assim como para o BS livre, o complexo BS/ β -CD após administração i.v. (10 mg/kg) apresentou decaimento monoexponencial, característico do modelo farmacocinético aberto de 1 compartimento com eliminação de primeira ordem. Comparando os parâmetros farmacocinéticos compartimentais entre BS livre e BS/ β -CD, nota-se maior capacidade de distribuição tecidual da formulação complexada, caracterizada pelo aumento de Vd ($1,8 \pm 0,5$ L/h·kg) ($p < 0,05$). Porém, a diminuição da $ASC_{0-\infty}$ plasmática do BS na forma de complexo está relacionada ao aumento significativo do Cl_{tot} ($2,2 \pm 0,5$ L/kg) ($p < 0,05$), refletindo um possível aumento do processo de filtração glomerular ou depuração hepática, ou, ainda, diminuição da reabsorção tubular do complexo ao longo dos túbulos renais.

A análise compartimental do perfil farmacocinético oral após administração de 50 mg/kg de BS na forma de complexo foi realizada utilizando modelo aberto de 1 compartimento, com absorção e eliminação de primeira ordem, não havendo diferença estatisticamente significativa entre abordagem não-compartimental e análise compartimental dos dados, com exceção de Cp_{max} . A biodisponibilidade do BS/ β -CD foi de 37%, sendo aproximadamente o dobro daquela observada para o BS livre. Assim como na farmacocinética i.v., o BS administrado na forma de complexo apresenta maiores valores de Vd e Cl_{tot} , os quais são estatisticamente diferentes daqueles estimado para o BS livre ($p < 0,05$). Logo, um maior Vd reforça a idéia de que o complexo esteja sendo absorvido intacto ao longo do trato gastrointestinal e se distribuindo melhor entre os tecidos.

As constantes de absorção (k_a) calculadas para as doses de 50 mg/kg, independente da formulação, não mostraram diferença estatisticamente significativa entre si. Porém, para a dose de 100 mg/kg de BS livre estudada, os valores médios de k_a estimados foram menores, fato provavelmente associado a uma lenta taxa de solubilização para doses mais elevadas, o que conseqüentemente retarda o processo de absorção do composto.

A distribuição do BS foi avaliada em diferentes tecidos (cérebro, coração, fígado, pulmão, baço, rim e de amostras de tecido adiposo) após administração de dose única i.v. *bolus* (10 mg/kg) do composto livre e complexado em β -CD.

Por se tratar de uma molécula com baixa ligação a proteínas plasmáticas e baixo peso molecular, estando associada a uma alta perfusão sanguínea, observa-se uma rápida e ampla distribuição para todos os tecidos analisados, com exceção do tecido adiposo, o qual apresentou as menores concentrações do composto. Contudo, os perfis de distribuição cerebral do BS livre e complexado foram muito diferentes entre si, embora haja uma biodistribuição relativamente semelhante para a maioria dos outros tecidos.

Ao contrário do BS livre, que quando administrado intravenosamente apresenta um decaimento linear de suas concentrações cerebrais, o complexo BS/ β -CD gera um platô de concentração de BS que se estende até o tempo de 4 h após a administração. A manutenção destes níveis de concentração pode estar associada ao prolongamento do efeito anticonvulsivante previamente relatado na literatura, embora sendo outras as vias de administração utilizada no experimento de farmacodinâmica (oral e intraperitoneal). Além disso, o fator de penetração tecidual do BS após administração do BS/ β -CD foi maior para todos tecidos avaliados, com exceção do tecido renal, sendo que para o cérebro o fator foi o maior de todos (2,8), havendo, portanto, maior distribuição do composto quando o mesmo é administrado na forma de BS/ β -CD.

Por último, para correlacionar os resultados farmacodinâmicos, a penetração cerebral do BS foi avaliada após administração oral da droga livre e complexada, na dose de 50 mg/kg. Os resultados mostraram que, independente da via de administração, os perfis de concentração cerebral do BS foram muito semelhantes após administração de BS livre e complexado, respectivamente. Contudo, as concentrações apresentaram diferenças entre o tipo de formulação administrada. Nesse sentido, enquanto que, para a forma livre administrada pela via oral, o decaimento das concentrações é linear e as concentrações estão próximas do limite de quantificação no tempo de 4 h, as concentrações de BS, quando administrado na forma de complexo, mantêm-se em platô ao longo das 4 h de experimento. Nos tempo de 4 h, essas concentrações são cerca de 20 vezes maiores que para

aquelas originadas após a administração do BS na forma livre, sendo a penetração cerebral privilegiada, gerando um fator de penetração cerebral próximo ao da via i.v. (2,5).

Assim, os dados de penetração cerebral oral de ambas as formulações corroboram os resultados obtidos pela via intravenosa. Estes resultados apontam para uma possível absorção do complexo BS/ β -CD intacto pela via oral, o qual rapidamente se distribui entre os tecidos, levando ao aumento das concentrações cerebrais, sítio de ação do BS, e prolongamento do tempo de meia-vida neste tecido, corroborando os resultados de farmacodinâmica previamente relatados na literatura utilizando diferentes modelos de convulsão.

6. *Conclusões*

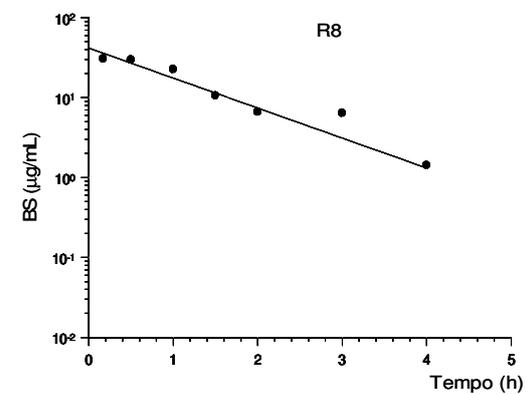
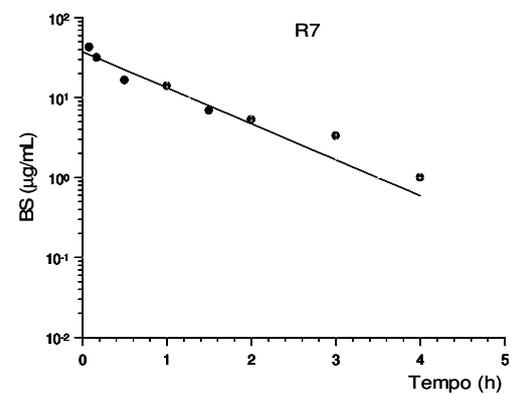
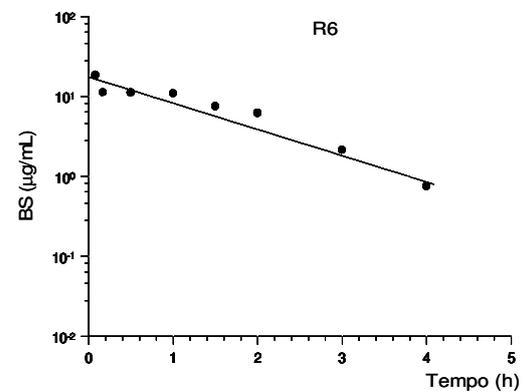
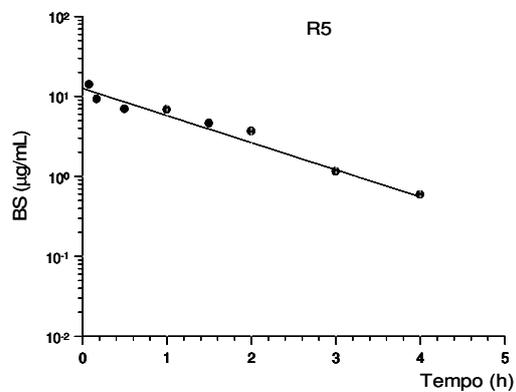
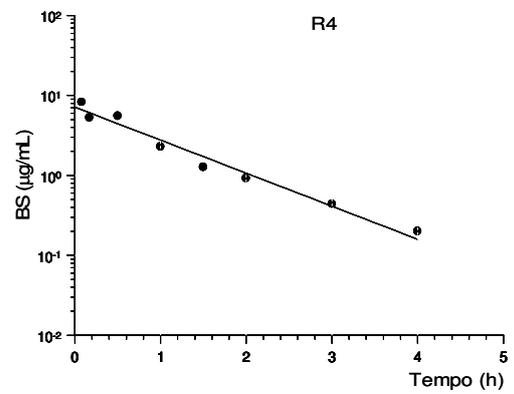
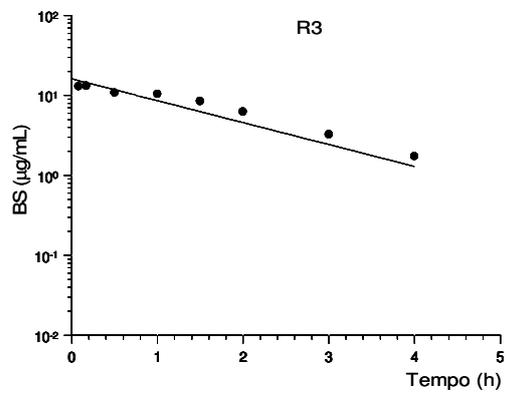
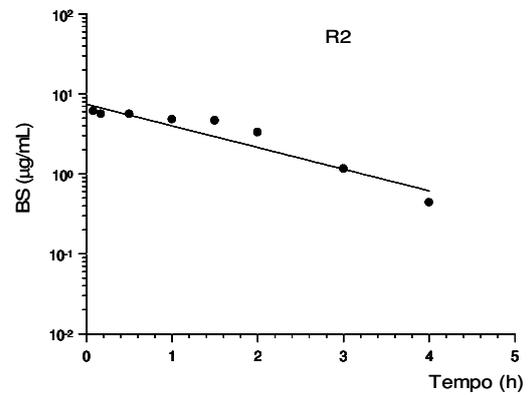
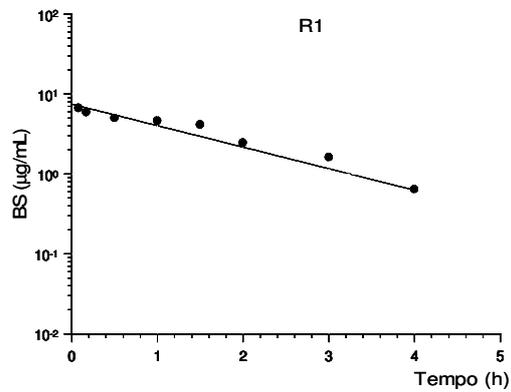
- O método analítico desenvolvido e validado por CLAE-UV mostrou-se sensível, linear, preciso e exato para quantificação do BS em amostras de plasma e de tecido de ratos Wistar;
- O perfil farmacocinético do BS após administração intravenosa das formas livre e complexada na dose de 10 mg/kg foi adequadamente descrito pelo modelo aberto de 1 compartimento. O mesmo modelo foi capaz de descrever os perfis farmacocinéticos orais de ambas as formas, a partir de diferentes doses (50 e 100 mg/kg de BS livre e 50 mg/kg de BS/ β -CD);
- A fração do BS ligada a proteínas plasmáticas foi de $34 \pm 5\%$, não sendo concentração dependente na faixa investigada (1 a 60 $\mu\text{g/mL}$);
- O BS mostrou farmacocinética linear na faixa de doses investigada (10 a 100 mg/kg), com biodisponibilidade oral de aproximada de 20% para a forma livre;
- BS/ β -CD apresentou biodisponibilidade oral superior (37%) quando comparado à forma livre, levando em consideração os diferentes perfis intravenosos observados para ambas as formas;
- BS/ β -CD após administração intravenosa apresentou aumento significativo do CL_{tot} e do Vd em relação ao BS livre. O mesmo foi observado após administração oral, sugerindo que o complexo intacto esteja sendo absorvido ao longo do trato gastrointestinal;
- O BS, tanto na forma livre quanto complexada, após administração intravenosa na dose de 10 mg/kg, distribuiu-se rápida e amplamente entre os tecidos analisados (fígado, baço, rim, pulmão, coração, tecido adiposo e cérebro), gerando perfis de concentração tecidual em função do tempo bastante semelhante entre as diferentes formas de BS, com exceção daquele observado no tecido cerebral;
- Ao contrário do BS livre, que quando administrado intravenosamente apresenta um decaimento monoexponencial de suas concentrações cerebrais, o complexo BS/ β -CD gera um platô de concentração de BS que se estende até o tempo de 4 h após a administração. Perfis semelhantes foram observados a

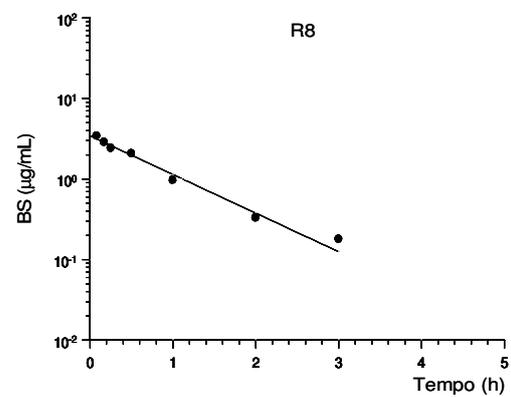
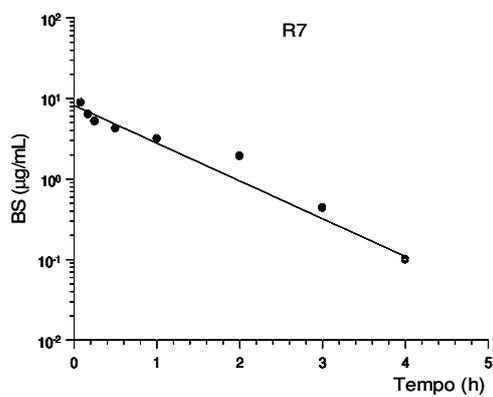
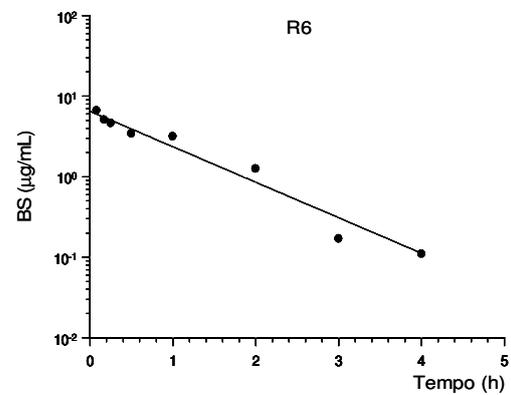
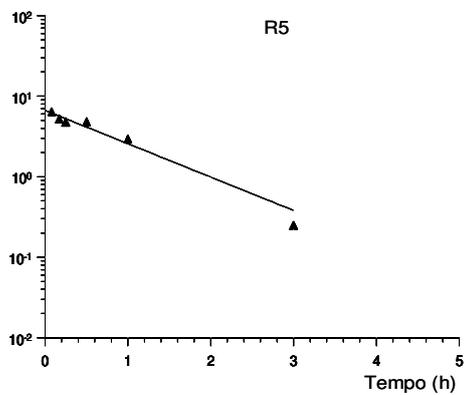
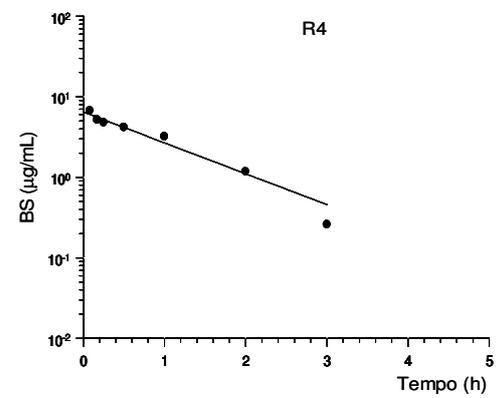
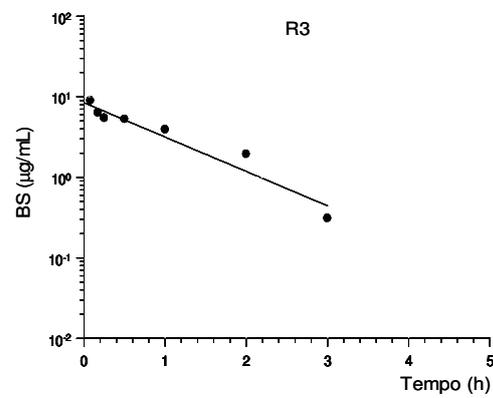
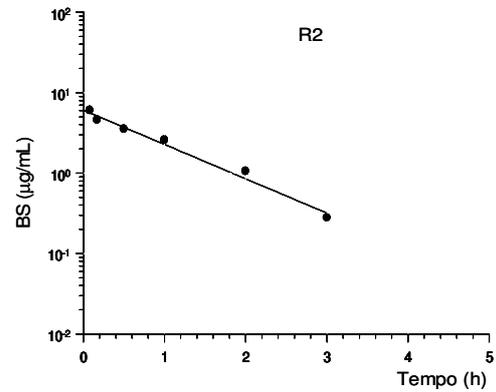
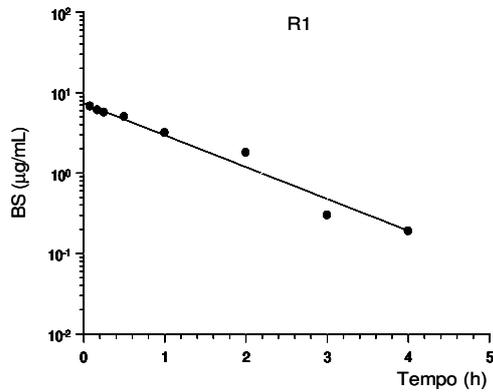
partir de dose oral (50 mg/kg), reforçando a hipótese de absorção do complexo intacto ao longo do trato gastrointestinal;

- Os dados de penetração tecidual após dose intravenosa mostram que o BS complexado tem maior distribuição nos tecidos, corroborando com o aumento do V_d observado para o complexo BS/ β -CD;
- Independente da via de administração, os perfis de concentração cerebral de BS após administração do complexo mostraram maior tempo de exposição da biofase à droga;
- Os dados de farmacocinética foram capazes de explicar os resultados farmacodinâmicos previamente relatados na literatura para o BS complexado em β -CD.

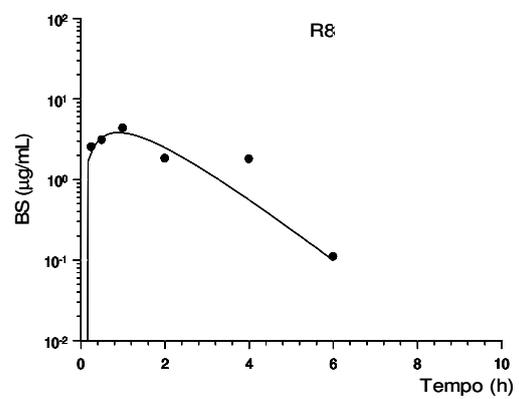
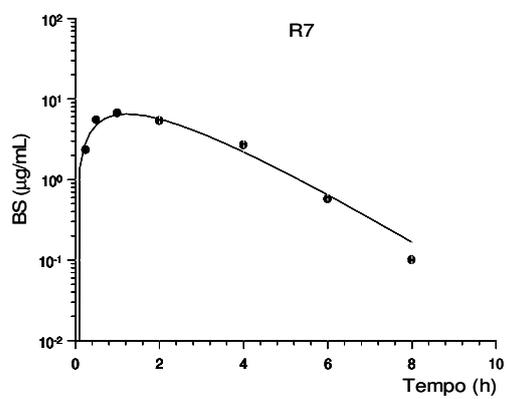
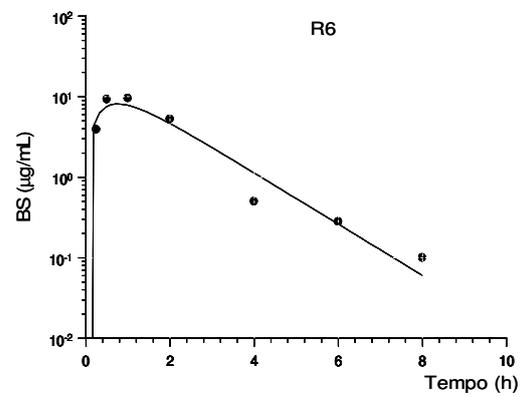
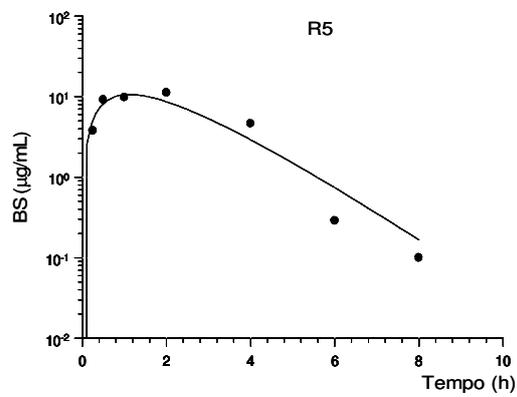
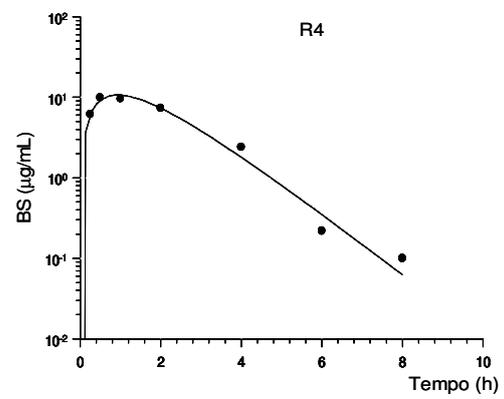
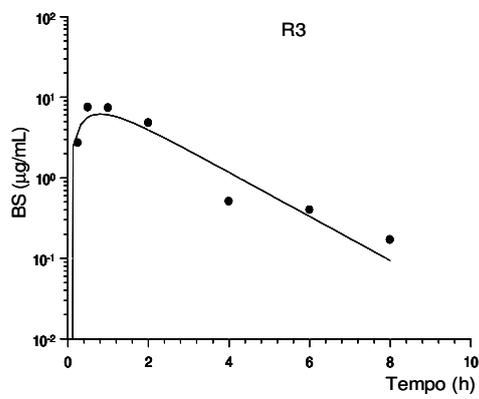
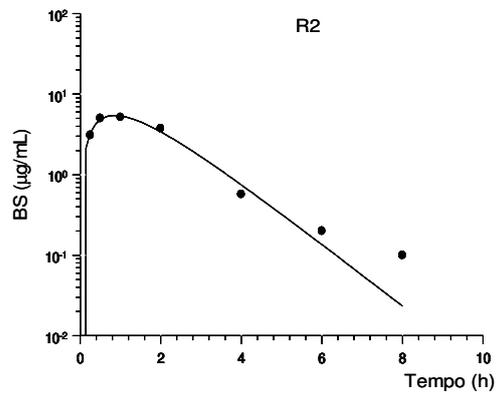
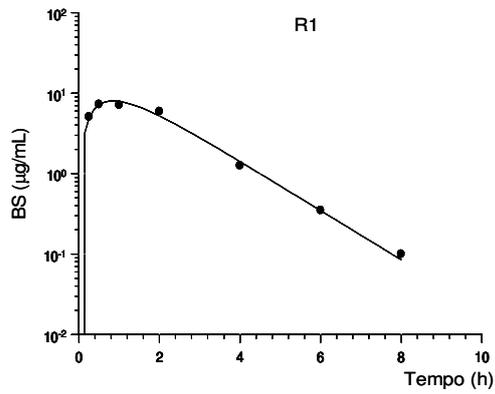
7. ANEXOS

ANEXO I (10 mg/kg i.v. BS livre)

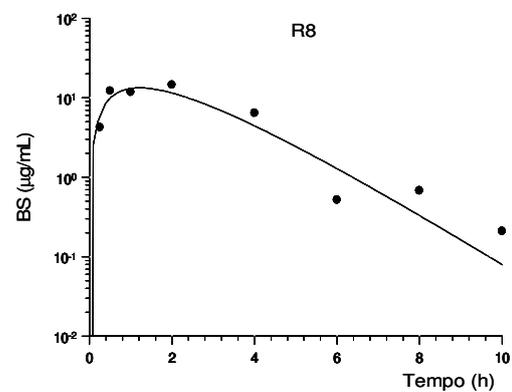
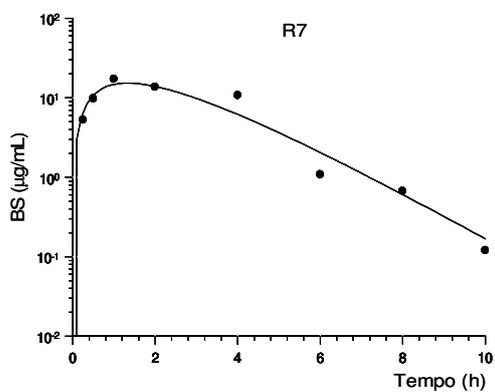
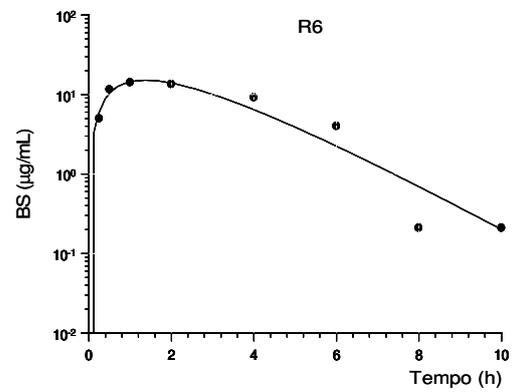
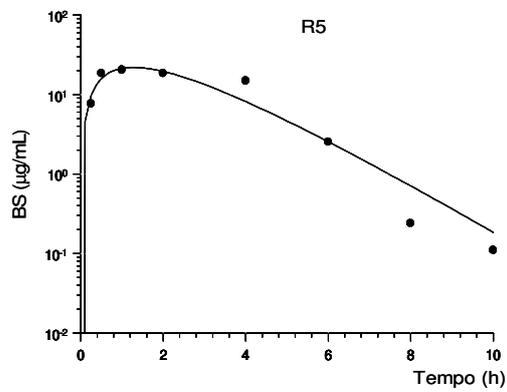
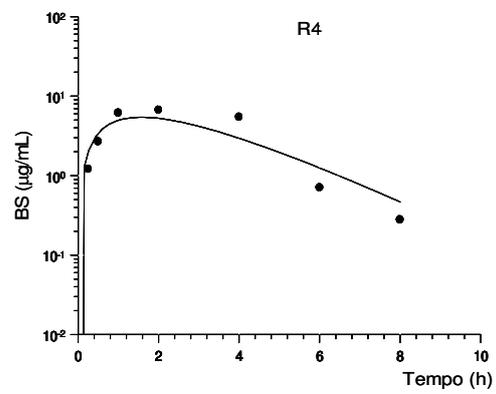
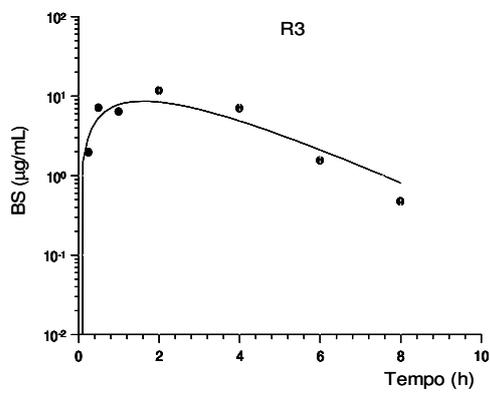
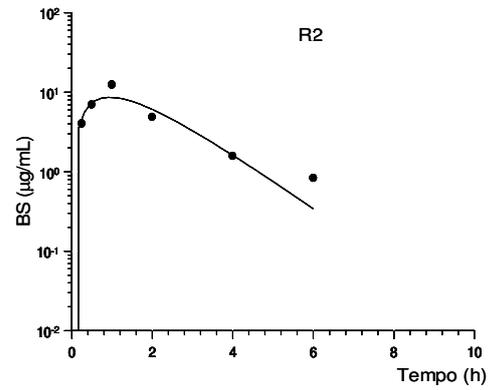
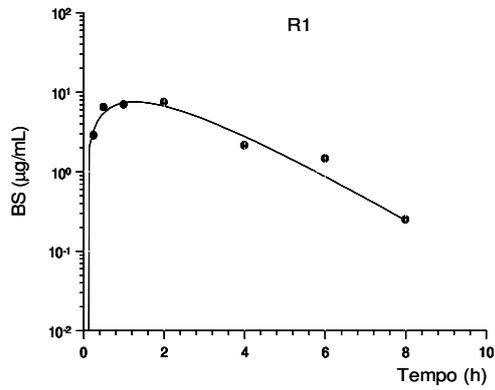


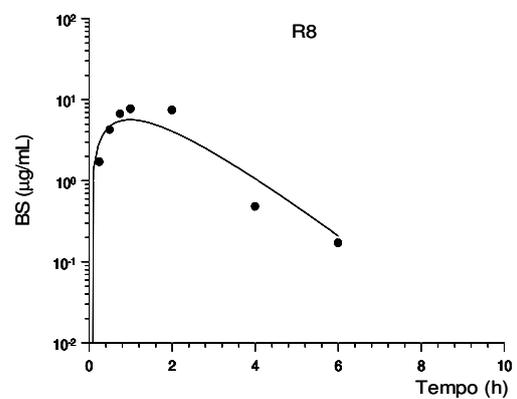
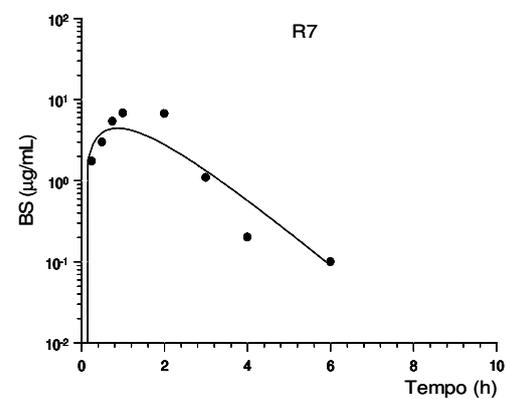
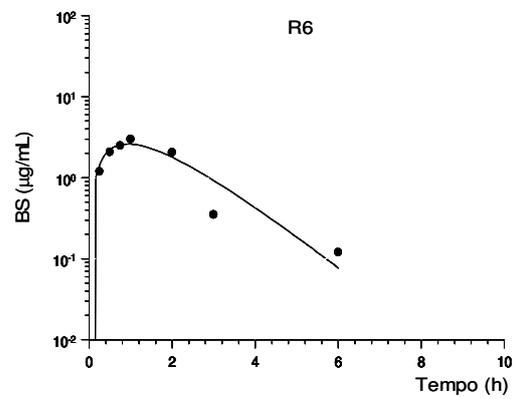
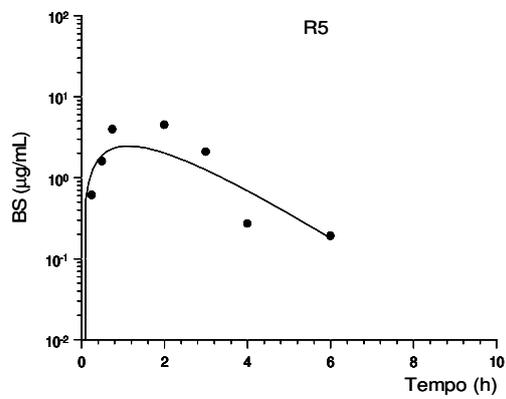
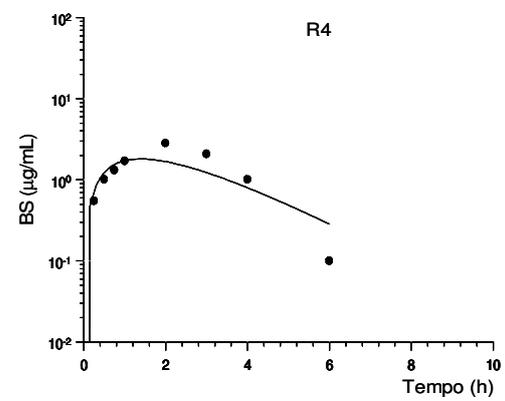
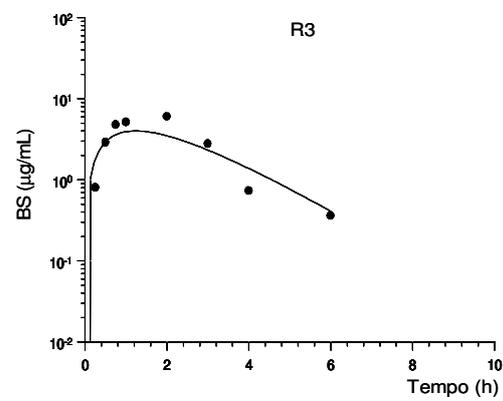
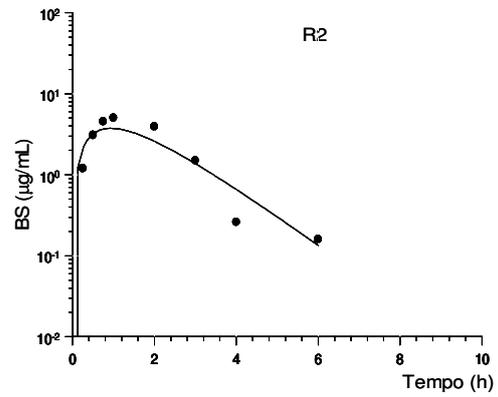
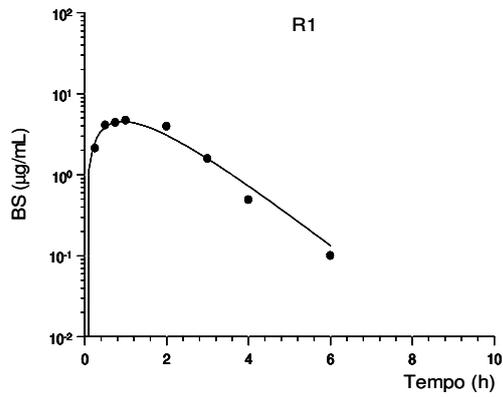
ANEXO II (10 mg/kg i.v. BS/ β -CD)

ANEXO III (50 mg/kg oral BS livre)



ANEXO IV (100 mg/kg oral BS livre)



ANEXO V (50 mg/kg oral BS/ β -CD)



PRÓ-REITORIA DE PESQUISA
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
CARTA DE APROVAÇÃO

pro.pesq

O Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Rio Grande do Sul analisou o projeto:

Número : 2007794

Título : AVALIAÇÃO PRÉ-CLÍNICA EM RATOS DO PERFIL FARMACOCINÉTICO DA SUBSTÂNCIA BENZALDEÍDO SEMICARBAZONA LIVRE E INCLUSA EM b-CICLODEXTRINA

Pesquisador (es) :

<u>NOME</u>	<u>PARTICIPAÇÃO</u>	<u>EMAIL</u>	<u>FONE</u>
TERESA CRISTINA TAVARES DALLA COSTA	PESQ RESPONSÁVEL	00006743@ufrgs.br	33085218
FRANCINE JOHANSSON AZEREDO	PESQUISADOR	00129671@ufrgs.br	
MOACIR KAISER	PESQUISADOR	00113331@ufrgs.br	

O mesmo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFRGS, reunião nº 19 , ata nº 99 , de 20/12/2007 , por estar adequado ética e metodologicamente e de acordo com a Resolução 196/96 e complementares do Conselho Nacional de Saúde.

Porto Alegre, terça-feira, 8 de janeiro de 2008


ILMA SIMONI BRUM DA SILVA
Coordenador do CEP-UFRGS

