

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

**Avaliação Pré-clínica em Ratos e Camundongos do Perfil
Farmacocinético do Composto LAFIS 10: um candidato a
antimalárico**

JOÃO VICTOR LAUREANO

PORTO ALEGRE, 2014

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

**Avaliação Pré-clínica em Ratos e Camundongos do Perfil
Farmacocinético do Composto LAFIS 10: um candidato a
antimalárico**

Dissertação apresentada por **João Victor
Laureano** para obtenção do GRAU DE
MESTRE em Ciências Farmacêuticas

Orientadora: Profa. Dra. Bibiana Verlindo de Araujo

PORTO ALEGRE, 2014

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, em nível de Mestrado Acadêmico, da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e aprovada em 28.03.2014, pela Banca Examinadora constituída por:

Prof^a. Dr^a. Aline Rigon Zimmer

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Prof^a. Dr^a. Cássia Virginia Garcia

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Prof. Dr. Whocely Victor de Castro

Universidade Federal de São João Del-Rei

CIP - Catalogação na Publicação

Laureano, João Victor

Avaliação Pré-clínica em Ratos e Camundongos do Perfil Farmacocinético do Composto LAFIS 10: um candidato a antimalárico / João Victor Laureano. -- 2014.

113 f.

Orientadora: Bibiana Verlindo de Araujo.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Porto Alegre, BR-RS, 2014.

1. Antimalárico. 2. validação de método bioanálítico. 3. LC-MS/MS. 4. Farmacocinética pré-clínica. 5. Penetração nos eritrócitos. I. Verlindo de Araujo, Bibiana, orient. II. Título.

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

Este trabalho foi desenvolvido no Centro Bioanalítico de Medicamentos, no Laboratório 405 da Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e no LANAGRO-RS, Laboratório Nacional Agropecuario com financiamento do **Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia - Inovação Farmacêutica (INCT-IF)**. O autor recebeu bolsa de mestrado da CAPES.

“O sucesso, tal como a felicidade, não pode ser perseguido; deve acontecer... como se fosse um, efeito secundário da dedicação pessoal de alguém a uma causa maior do que o próprio.”

Viktor Frankl

AGRADECIMENTOS

À professora e orientadora Bibiana Verlindo de Araujo, pelo exemplo de profissional, pela grande dedicação, incentivo, amizade, disponibilidade e pela paciência. Muito Obrigado.

Ao Fabiano Barreto agradeço pelo apoio, pela amizade e pelo auxílio na parte prática deste trabalho. O desenvolvimento do mesmo só foi possível devido ao teu comprometimento, determinação e disponibilidade.

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

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

A Camila Patzer, pelo apoio nesta fase da minha vida, obrigado pela compreensão diante de tantos momentos de ausência, incentivo e confiança.

A Ligia Patzer e Mauri Patzer, por todo apoio e incentivo que me deram nesta etapa da minha vida.

Aos queridos amigos “PKs”: Estevan Zimmerman, Maiara Pigatto, Bruna Torres, Fernanda Galves, Sandra Haas, Felipe Hurtado, Cristiane de Andrade, Jaqueline Fabrício, Priscila Bernardi, Graziela Lock, Fernando Carrenõ, Andressa Braga, Izabel Almeida, Carolina Miranda, Camila Neris e Renatha Romam por todos os momentos de descontração, aprendizados compartilhados, pela ajuda nos experimentos e principalmente pela amizade construída.

A Profa. Teresa Dalla Costa, por sempre estar disposta a contribuir, no decorrer do trabalho e pela colaboração.

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

A todos os meus grandes amigos e familiares em especial Thamyres Araujo e Rafaelo Rodel que sempre me deram força e incentivo para a realização deste trabalho, acreditando e me fazendo acreditar que tudo daria certo e pelos momentos de descontração.

Ao INCT-IF e a Capes pelo financiamento do projeto e bolsa de estudos concedida durante todo o desenvolvimento do projeto.

Enfim a todos que me ajudaram de forma direta e indireta o meu Muito Obrigado.

LISTA DE ABREVIATURAS

$ASC_{0-\infty}$	Área sob a curva do tempo zero ao infinito
ASC_{0-t}	Área sob a curva do tempo zero ao tempo “t”
ASC_{ext}	Área sob a curva extrapolada
AU	Ácido Ursólico
CL	<i>Clearance</i>
CL_{tot}	<i>Clearance</i> total
$C_{máx1}$	Concentração máxima do primeiro pico
$C_{máx2}$	Concentração máxima do segundo pico
C_p	Concentração plasmática
CQ	Controle de qualidade
CQA	Controle de qualidade alto
CQB	Controle de qualidade baixo
CQM	Controle de qualidade médio
D	Dose
DMSO	Dimetilsufóxido
DP	Desvio Padrão
DPR	Desvio Padrão Relativo
ESI+	Ionização por <i>electrospray positivo</i>
F	Biodisponibilidade
f	Fração biodisponível
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
f_u	Fração livre
i.p.	Administração intraperitoneal
i.v.	Administração intravenosa
k_{a1}	Constante de absorção no primeiro sitio de absorção
k_{a2}	Constante de absorção no segundo sitio de absorção
k_e	Constante de velocidade de eliminação
LIQ	Limite inferior de quantificação
MRM	Monitorização de reação múltipla
MRT	<i>Mean residence time</i> (tempo de residência médio)

MSC	<i>Model selection criterion</i> (critério de seleção de modelo)
n	Tamanho amostral
OMS	Organização Mundial da Saúde
p.o.	Administração oral
PI	Padrão interno
PM	Peso molecular
RBM	Roll Back Malária
REA	Relação estrutura atividade
SIDA	Síndrome da imunodeficiência adquirida
$t_{1/2}$	Meia-vida
TIC	Cromatograma iônico total
$t_{máx1}$	Tempo para atingir a concentração máxima do primeiro pico
$t_{máx2}$	Tempo para atingir a concentração máxima do segundo pico
UNICEF	Fundo das nações unidas para a infância
LC-MS/MS	<i>liquid chromatography associated with mass spectrometry</i>
Vd	Volume de distribuição
Vd _{ss}	Volume de distribuição no <i>steady state</i>
α	Constante híbrida de distribuição
β	Constante híbrida de eliminação
λ	Constante de velocidade de eliminação (abordagem não-compartmental).

LISTA DE FIGURAS

REVISÃO DA LITERATURA

Figura 1. Distribuição da malária no mundo	22
Figura 2. Classificação das áreas de risco para malária segundo o incidência parasitária anual (IPA).	23
Figura 3. Espécies de <i>Plasmodium</i> responsáveis pelas infecções diagnosticadas no Brasil entre 2009-2012.	24
Figura 4. Ciclo vital dos parasitas da malária.	26
Figura 5. Estrutura química dos principais antimaláricos disponíveis atualmente.	29
Figura 6. Estrutura química do ácido ursólico	32
Figura 7. Estrutura química LAFIS 10 (N-{3-[4-(3-(Bis(4-hidroxibenzil)amino)propil)piperazinil]propil}-3-O-acetilursolamida	34

CAPÍTULO 1

Figura 1. Estrutura química do LAFIS 10 (A) e do padrão interno dexametasona (B)	39
Figura 2. Cromatogramas representativos em MRM-ESI+ do plasma de ratos Wistar.	46
Figura 3. Média das seis curvas padrão em plasma utilizadas na validação da metodologia por LC-MS/MS para LAFIS 10	47
Figura 4. Perfil plasmático médio do LAFIS 10 após dose única intravenosa de 2,5 mg/kg a ratos wistar machos.	51

CAPÍTULO 2

Figura 1. Ácido Ursólico (A) e LAFIS 10 (B)	57
Figura 2. Perfil plasmático médio do LAFIS 10 modelado após dose única i.v. bolus de 2.5mg/kg a ratos Wistar	64
Figura 3. Perfil plasmático médio do LAFIS 10 modelados após dose única de 15 mg/kg pela via i.p. (A) e p.o. (B) a ratos Wistar	66
Figura 4. Perfil plasmático médio do LAFIS 10 modelados após dose única de 15 mg/kg pela via i.p. a ratos camundongos	71

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1

Tabela 1. Parâmetros espectrométricos otimizados para o LAFIS 10 e o Padrão Interno (dexametasona).	41
Tabela 2. Parâmetros da curva padrão do LAFIS 10 em plasma de ratos Wistar.	48
Tabela 3. Variação intra e interdía do LAFIS 10 em plasma de ratos Wistar	49
Tabela 4. Exatidão da análise do LAFIS 10 em plasma de ratos	49

CAPÍTULO 2

Tabela 1. Parâmetros farmacocinéticos do LAFIS10 após administração <i>intravenosa bolus</i> da dose de 2,5 mg/kg a ratos Wistar	65
Tabela 2. Parâmetros farmacocinéticos após administração de dose única de 15 mg/kg pela via intraperitoneal de camundongos.	67
Tabela 3. Parâmetros farmacocinéticos após dose única de 15 mg/kg de LAFIS 10 pelas vias intraperitoneal e oral em ratos wistar.	69

RESUMO

Objetivo: Avaliar o perfil farmacocinético plasmático em ratos e camundongos do derivado do ácido ursólico LAFIS 10, um candidato a fármaco com atividade antimalárica. **Metodologia:** Lafis 10 foi administrado a ratos Wistar nas doses de 2,5 mg/kg i.v. *bolus*, e 15mg/kg para as vias i.p. e p.o. em ratos e i.p para camundongos, sendo as concentrações plasmáticas determinadas por metodologia analítica LC-MS/MS validada. Os perfis plasmáticos individuais foram avaliados mediante análise não-compartimental e compartimental, utilizando-se os softwares Microsoft Excel[®] 2011 e Scientist[®] v 2.01, respectivamente, para a determinação dos parâmetros farmacocinéticos. A ligação às proteínas plasmáticas foi determinada por ultrafiltração. **Resultados e Discussão:** O método bioanalítico por LC-MS/MS foi validado de acordo com normas internacionais (FDA e EMEA). Após dose i.v., o LAFIS 10 apresentou um *clearance* de $0,88 \pm 0,17$ L/h/kg, meia-vida de $8,69 \pm 0,98$ h e volume de distribuição de $5,34 \pm 0,94$ L/kg. Após administração extravascular (i.p. e p.o.) não foram observadas diferenças estatisticamente significativas nos parâmetros farmacocinéticos entre as vias diferindo apenas na F de 2 % vs 43%, para p.o e i.p, respectivamente. Os perfis plasmáticos obtidos após a administração i.v., i.p e v.o em ratos foram adequadamente descritos por modelos multicompartmentais. O perfil obtido após administração i.p em camundongos foi adequadamente descrito pelo modelo de 2 compartimentos sem absorção, já que apresenta uma absorção quase que instantânea, os parâmetros foram determinados pela modelagem foram tempo de meia-vida de $1,82 \pm 0,56$ h, *CL/F* de $9,08 \pm 23,01$ L/h/kg e *Vd/F* de $8,46 \pm 0,65$ L/kg. A ligação do composto às proteínas plasmáticas, foi de $80,85 \pm 0,14\%$ sendo concentração independente e a penetração do LAFIS 10 em eritrócitos sadios foi de $4,17 \pm 0,52$. **Conclusões:** O composto apresenta adequadas propriedades farmacocinéticas, cujos perfis de concentração *versus* tempo obtidos por via intravenosa e não-sistêmica (oral e intraperitoneal) puderam ser apropriadamente descritas por modelos multicompartmentais. Apesar da baixíssima biodisponibilidade oral (menor que 2%), outros parâmetros como o volume de distribuição moderado e sua penetração eritrocitária elevada são comparáveis a de fármacos classicamente utilizados como a quinina, permitindo caracterizá-lo como um potencial candidato a antimalárico.

Palavras-chaves LAFIS 10, antimalárico, validação de método bioanalítico, LC-MS/MS, farmacocinética pré-clínica, penetração nos eritrócitos, ligação às proteínas plasmáticas.

ABSTRACT

Pre-clinical evaluation in rats and mice of the pharmacokinetics of the compound LAFIS 10 an antimalarial candidate

Objective: Evaluate the plasma pharmacokinetic profile in rats and mice from the derivative of ursolic acid LAFIS 10, a drug candidate with antimalarial activity.

Methodology: LAFIS 10 was administered to Wistar rats in the doses of 2.5 mg/kg iv bolus and 15mg/kg for the i.p. and p.o. routes in rats and i.p. for mice, being the plasma concentrations determined by validated LC-MS/MS analytical methodology. The individual plasma profiles were assessed by non-compartmental and compartmental analysis using the softwares Microsoft Excel® 2011 and Scientist® version 2.01, respectively, for the determination of the pharmacokinetic parameters.

The plasma protein binding was determined by ultrafiltration. **Results and**

Discussion: The bioanalytical method by LC-MS/MS was validated according to the international standards (FDA and EMEA). After i.v. dose, the LAFIS 10 presented a clearance of 0.88 ± 0.17 L/h/kg, half-life of 8.69 ± 0.98 h and distribution volume of 5.34 ± 0.94 L/kg. After extravascular administration (i.p. and p.o.) no statistically significant difference was found in pharmacokinetic parameters between the routes, differing only in F of 2% vs 43% for p.o. and i.p., respectively. The plasmatic profiles obtained after i.v., i.p and p.o administration in rats were adequately described by multicompartmental models. The profile obtained after i.p. administration in mice was adequately described by the 2-bay model without absorption, since it is absorbed almost instantly, the parameters were determined by the modeling and the half-life of 1.82 ± 0.56 h, CL/F of 9.08 ± 2.30 L/h/kg and Vd/F 8.46 ± 0.65 L/kg. The compound binding to plasma proteins was of $80.85 \pm 0.14\%$ being the concentration independent and the penetration of LAFIS 10 in healthy erythrocytes was of 4.17 ± 0.52 . **Conclusions:** The compound has adequate pharmacokinetic properties whose concentration profile versus time obtained intravenously and non-systemic (oral and intraperitoneal) could be appropriately described by multicompartmental model. Despite the very low oral bioavailability (less than 2%), other parameters such as moderate volume of distribution and its high erythrocyte penetration are comparable to conventionally used drugs as quinine, allowing to characterize it as a potential candidate for antimalarial.

Keywords: LAFIS 10, antimalarial, bioanalytical method validation, LC-MS/MS, preclinical pharmacokinetics, penetration into erythrocytes, plasma protein binding.

SUMÁRIO

Conteúdo

INTRODUÇÃO	21
OBJETIVOS	25
Objetivo geral:.....	27
Objetivos específicos	27
REVISÃO DA LITERATURA	28
2. Biologia da infecção malárica	34
3. Manifestações clínicas da malária.....	36
4. Tratamento e resistência aos antimaláricos	38
5. A descoberta de fármacos antimaláricos	41
CAPÍTULO 1	45
INTRODUÇÃO.....	49
2. PARTE EXPERIMENTAL	50
2.1 Solventes e reagentes	50
2.2 Instrumentação	51
2.3 Preparação das Soluções Padrão e Controles de Qualidade em Plasma	51
2.4. Processamento das Amostras Biológicas,	51
2.5 Condições cromatográficas e de espectrometria de massas.....	52
2.6 Validação de Metodologia Bioanalítica por LC-MS/MS.....	53
2.6.1. Linearidade, limite de quantificação e seletividade.....	53
2.6.2. Precisão, exatidão.....	53
2.6.3. Recuperação.....	54
2.6.4. Estabilidade.	54
2.6.5 Carry-over.....	54
2.6.6 Efeito Matriz.....	55
2.6.7 Integridade de Diluição.....	55
2.7. Estudo farmacocinético.....	55
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	56
3.1. Seletividade e recuperação.....	56
3.2 Linearidade	57
3.3 Carry-over.....	59
3.4 Efeito de matriz.....	59
3.5 Limite inferior de quantificação.....	59
3.6 Precisão e Exatidão	60
3.7 Estudo de estabilidade.....	61
3.8 Integridade de diluição	61
3.9 Aplicabilidade do método analítico	61
4. CONCLUSÕES.....	62
6. REFERÊNCIAS	63
CAPÍTULO 2	65
Introdução.....	69
2. Materiais e métodos.....	70
2.1 Solventes e reagentes	70
2.2. Preparação das doses	70
2.3. Animais.....	71
2.5 Metodologia Bioanalítica	72
2.6. Análise dos Perfis Plasmáticos do LAFIS 10.....	73

2.7. Ligação a Proteínas Plasmáticas	74
2.8. Avaliação da Penetração aos eritrócitos do LAFIS 10.....	75
2.9. Análise Estatística.....	76
3. Resultados.....	77
3.1 Perfis farmacocinético do LAFIS10 em plasma.	78
3.2 Ligação às Proteínas Plasmáticas.....	82
3.3 Avaliação da Penetração aos eritrócitos do LAFIS 10.....	82
4. Discussão	82
5. Conclusão.....	87
6. Referências.....	88
DISCUSSÃO GERAL	93
CONCLUSÕES	99
REFERÊNCIAS	103
ANEXOS	109
ANEXO I –	111
ANEXO II -	113

INTRODUÇÃO

A malária é uma doença causada por cinco espécies de parasitas do gênero *Plasmodium*: *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale*, *P. malariae* e *P. knowlesi*, que apresenta efeitos devastadores em todo o mundo (Schantz-Dunn, J., 2009). Seus sintomas são caracterizados por febre alta acompanhada de calafrios, suores e cefaleia, que ocorre em padrões cíclicos, dependendo da espécie do plasmódio. É a principal causa de morte e doença em muitos países em desenvolvimento. A OMS estima um total de 207 milhões de casos de malária ocorridos no mundo em 2012 e cerca de 627 000 mortes. Calcula-se que na África a cada 30 segundos morre uma criança da doença. Mulheres grávidas são o segundo maior grupo de risco (OMS, 2013). A doença mata duas vezes mais que a SIDA e muito mais que qualquer outra doença infecciosa. Está presente em mais de 109 países, sendo que os mais comprometidos são a Índia, o Brasil, o Afeganistão, os países africanos e asiáticos, incluindo a China (Camargo, 2003). No Brasil, a malária ocorre predominantemente na chamada Amazônia Legal, prevalecendo as infecções pelo *Plasmodium vivax* e pelo *Plasmodium falciparum* (Reiners et al., 2010).

O tratamento adequado e oportuno da malária é hoje a principal forma de controle da doença. Antes do surgimento da resistência do *P. falciparum* a cloroquina, esta era utilizada para todas as espécies de plasmódios que parasitam o homem. Além da cloroquina, o *P. falciparum* apresenta resistência a diversos outros antimaláricos, tornando o seu tratamento um dilema e um desafio para as autoridades de saúde responsáveis pelo controle da malária (Neves, 2005).

Resultados mostram que a resistência aos fármacos antimaláricos causa uma incompleta eliminação dos parasitas do sangue do paciente. Problema agravado pela resistência cruzada, em que a resistência a um fármaco confere resistência a outros fármacos que pertencem a uma mesma família química, ou que tenham modos de ação semelhantes. Durante as últimas décadas, vários antimaláricos altamente eficazes tiveram desenvolvimento da resistência do parasita a eles, como foi o caso da cloroquina, quinina, artemisinina (Pleeter, 2010, Butler, 2010).

No contexto da evolução da resistência aos fármacos e da necessidade de se aumentar o seu tempo de vida útil pelo uso de terapias combinadas, novas alternativas terapêuticas devem ser buscadas a fim de contornar esse grave problema mundial, onde potentes fármacos antimaláricos precisam ser desenvolvidos.

Algumas substâncias naturais com atividade antimalárica, principalmente alcalóides, estão sendo isoladas de plantas. A descoberta e o isolamento de

substâncias provenientes de produtos naturais tem sido proposta como uma abordagem promissora, uma vez que tais substâncias podem ser utilizadas como modelo para o desenvolvimento de novos fármacos antimaláricos (Oliveira *et al.*, 2009).

Com base no exposto acima, Gnoatto *et al.* (2008) descreveu uma série de novos análogos do ácido ursólico com atividade antimalárica *in vitro* significativa que acredita-se atuar pela interação com o carboxilato da hemozoína. Estes compostos foram desenvolvidos utilizando o esqueleto do ácido ursólico, munido de um grupo acetil em C-3, e nestes adicionados por hibridização molecular uma porção de 1,4 -bis (3-aminopropil) em C-28 um grupo farmacofórico promissor antimalárico. O planejamento destes compostos baseou-se no mecanismo de ação molecular proposto para a cloroquina, ou seja, a interação com resíduos do heme inibindo a formação de β -hematina.

Dentre esta série de compostos testados *in vitro* destaca-se o LAFIS 10 (N-{3-[4-(3-(Bis(4-hidroxibenzil)amino)propil)piperazinil]propil}-3-O-acetilursolamida), que demonstrou ter atividade *in vitro* significativa frente a cepa FcB1 de *P. falciparum* resistente a cloroquina na faixa nanomolar $IC_{50} = 167$ nM, enquanto que a cloroquina apresentou um $IC_{50} = 130$ nM. O derivado se mostrou ativo contra cepas de *P. falciparum* resistente a cloroquina FcB₁ e de *P. falciparum* thai sugerindo baixos níveis de resistência cruzada à cloroquina. O índice de resistência calculado a partir da razão entre os valores de IC_{50} de cepas sensíveis e resistentes de *P. falciparum* foi de 0,37 para o LAFIS 10 e de 11 para a cloroquina. O composto quando testado apresentou citotoxicidade sobre as células diploides humanas (MRC-5) na faixa de micromolar e o valor de IC_{50} foi de 1,61 μ M. Este também apresentou uma inibição *in vitro* da formação de β -hematina, sugerindo um efeito sobre o alvo (Gnoatto *et al.*, 2008).

Frente aos resultados farmacodinâmicos obtidos *in vitro*, justificou-se a avaliação farmacocinética pré-clínica do LAFIS 10, uma vez que o composto apresentou promissora atividade antimalárica. Dessa forma, essa dissertação teve como objetivo determinar os parâmetros farmacocinéticos do candidato a fármaco, avaliando seus parâmetros de absorção, distribuição e eliminação em duas espécies roedoras através de abordagens não-compartimental e compartimental clássicas.

OBJETIVOS

Objetivo geral:

Avaliar o perfil farmacocinético plasmático de um derivado do ácido ursólico (LAFIS 10) com atividade antimalárica em ratos Wistar machos e camundongos BALBc.

Objetivos específicos

- ✓ Desenvolver e validar metodologia analítica por LC/MS-MS para o doseamento do derivado antimalárico LAFIS-10 em plasma, de acordo com as normas preconizadas pelo FDA e EMEA;
- ✓ Determinar a ligação as proteínas plasmáticas do derivado antimalárico em ratos;
- ✓ Avaliar as concentrações plasmáticas totais do derivado antimalárico em ratos após administração de uma dose intravenosa de 2,5 mg/kg, uma dose intraperitoneal e uma dose oral ambas de 15 mg/kg;
- ✓ Avaliar a farmacocinética intraperitoneal de uma dose de 15 mg/kg em camundongos BalbC;
- ✓ Determinar a penetração nos eritrócitos de ratos Wistar.
- ✓ Determinar os parâmetros farmacocinéticos do derivado através de abordagem não compartimental, a partir dos dados de concentração plasmática *versus* tempo obtido experimentalmente, empregando o software Excel®;
- ✓ Modelar, através de abordagem compartimental apropriada, os perfis plasmáticos em função do tempo e determinar os parâmetros compartimentais do derivado antimalárico, através do emprego do software Scientist®.

REVISÃO DA LITERATURA

1. Malária

A malária é uma doença infecciosa, com efeitos devastadores em todo o mundo (Schantz, 2009). É a principal causa de morte e doença em muitos países em desenvolvimento, onde as crianças e as mulheres grávidas são os grupos mais afetados. A Organização Mundial da Saúde (OMS) publicou estatísticas que revelam que metade da população mundial corre o risco de contrair malária. A OMS estima um total de 207 milhões de casos de malária ocorridos no mundo em 2012 e cerca de 627 000 mortes.

A malária é causada por cinco espécies de parasitas, que são transmitidas através das picadas de mosquitos que infectam os seres humanos, e todas estas espécies pertencem ao gênero *Plasmodium*: *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale*, *P. malariae* e *P. knowlesi*. O *P. falciparum* e o *P. vivax* são responsáveis pela maior parte das infecções maláricas em todo o mundo. Destes o *P. falciparum* causa a maior parte dos surtos de malária no sul e no leste da Ásia e 80% das infecções maláricas da América. A malária causada pelos *P. ovale* e *P. malariae* é relativamente incomum, porém requer identificação para tratamento. O *P. knowlesi*, considerado por muito tempo como capaz de infectar somente primatas, emergiu como um parasito zoonótico e atualmente é uma causa importante muitas vezes letal da malária humana em regiões do sul da Ásia (Cox-Singh e cols., 2008). Os protozoários do gênero *Plasmodium* têm um ciclo de vida dividido entre um hospedeiro vertebrado e um inseto vetor. Segundo Rey (2001), os *Plasmodium falciparum*, *vivax* e *ovale* são parasitas exclusivos do homem enquanto que o *P. malariae* seria capaz também de infectar chimpanzés em condições naturais. O vetor é sempre a fêmea do mosquito do gênero *Anopheles*, embora das 380 espécies conhecidas de mosquitos desse gênero, apenas 60 possam transmitir a doença (Stanley, 2001, Blackman, 2004).

A doença mata duas vezes mais que a SIDA e muito mais que qualquer outra doença infecciosa. Está presente em mais de 109 países (Figura 1), sendo que os mais comprometidos são a Índia, o Brasil, o Afeganistão e os países africanos e asiáticos, incluindo a China (Camargo, 2003).

Países e áreas de risco de transmissão de malária



Figura 1. Distribuição da malária no mundo. Adaptado de OMS (2011).

Nos últimos tempos, em diversas partes do mundo, esforços têm sido realizados a fim de erradicar a malária. Um programa mundial estabelecido pela OMS, UNICEF (Fundo das Nações Unidas para a Infância) e o Banco Mundial contando com a participação de governos, entidades não-governamentais, empresas privadas e pesquisadores foi criado com o nome de *Roll Back Malária* (RBM). Os principais objetivos desse programa são melhorar o acesso da população a um tratamento efetivo, prevenir a malária durante a gravidez, reduzir o contato com o mosquito (através da utilização de inseticidas) e garantir ações de saúde adequadas durante uma epidemia de malária (Suh et al., 2004; OMS, 2013). Para garantir esses objetivos, as estratégias destes programas são: melhorar o nível de informação sobre a doença nas localidades atingidas; disponibilizar um acesso efetivo e de alta qualidade aos medicamentos e promover a qualificação dos profissionais de saúde na prevenção e no tratamento da doença (OMS, 2013).

No Brasil, a malária ocorre predominantemente na chamada Amazônia Legal (Figura 2), prevalecendo as infecções pelo *Plasmodium vivax* e pelo *Plasmodium falciparum* (Reiners et al., 2010).

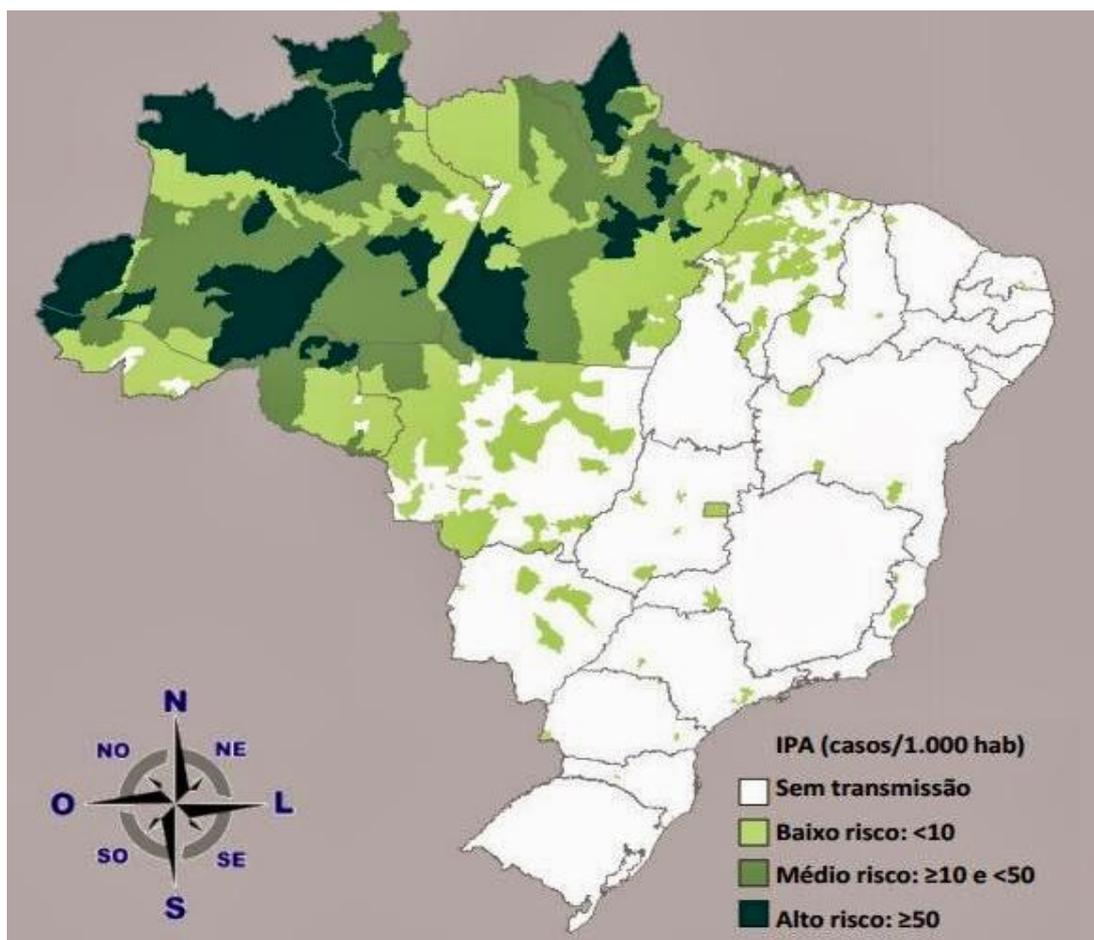


Figura 2. Classificação das áreas de risco para malária segundo a incidência parasitária anual (IPA). Quanto mais escuro o verde, maior o índice (dados do Ministério da Saúde do Brasil, 2011). *IPA é a Incidência Parasitária Anual e é determinado pelo número de testes positivos realizados em uma localidade dividido pelo número total de habitantes dessa localidade. Esse valor é multiplicado por mil.

Os esforços realizados pelos órgãos governamentais do Brasil nas últimas décadas, focados no estabelecimento de programas de combate a doença, proporcionaram dois resultados importantes: uma redução em 40,58 % dos casos de malária diagnosticados nos últimos 7 anos (579.059 casos em 2005 e 235.000 casos em 2012) e uma mudança no perfil epidemiológico da doença, em que a 85,6% dos casos são associados a infecções *Plasmodium vivax*, 13,1% por *Plasmodium falciparum* e raras ocorrências de *Plasmodium malarie* ou infecções mistas (Oliveira-Ferreira *et al.*, 2010). Dados do Ministério da Saúde brasileiro de 2009-2012 ilustram a maior incidência dessa espécie, conforme mostrado na Figura 3.

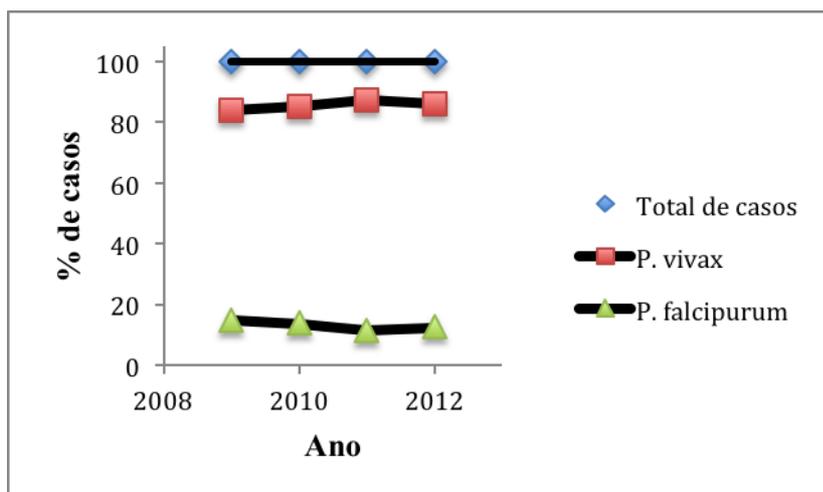


Figura 3. Espécies de *Plasmodium* responsáveis pelas infecções diagnosticadas no Brasil entre 2009-2012, expressos em valores percentuais. Valores determinados a partir de dados extraídos do Sistema de Informação de Agravos de Notificação do Ministério da Saúde (disponível em <http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/defthtm.exe?idb2012/d04.def>).

Embora a “erradicação” de infecções por *Plasmodium malariae* seja discutida por alguns autores como um “artefato” da forma de diagnóstico da doença após os anos 80, a qual não permitiria uma diferenciação entre as infecções causadas por essa espécie e a de *P. vivax* (Oliveira-Ferreira *et al.*, 2010), essa característica diferencia o perfil epidemiológico do Brasil do de países africanos, em que o *Plasmodium falciparum* apresenta maior prevalência (Akande & Musa, 2005), trazendo consequências importantes relacionadas às menores taxas de letalidade e hospitalizações associadas a doença no Brasil, em comparação as observadas no continente africano em geral.

2. Biologia da infecção malárica

Os esporozoítos do *Plasmodium*, que iniciam a infecção em humanos, são inoculados na derme e entram na corrente sanguínea após a picada da fêmea do mosquito infectada pelo *Plasmodium*. Em minutos, os esporozoítos migram para o fígado, onde infectam os hepatócitos. Dentro do hepatócito o parasito sofre replicação assexuada, originando os esquizontes do estágio hepático. Na ruptura dos hepatócitos infectados, dezenas de milhares de merozoítos são liberados na corrente sanguínea e infectam os eritrócitos. Após o estágio exoeritrocítico inicial, os *P. falciparum* e *P. malariae* não são mais encontrados no fígado. Os *P. vivax* e *P. ovale*, entretanto podem

sustentar uma infecção quiescente dos hepatócitos como uma forma dormente do parasito, conhecida como hipnozoíto (Goodman & Gilman, 2012).

Os estágios eritrocíticos assexuados dos parasitas da malária são responsáveis pelas manifestações clínicas da doença. Uma vez no interior dos eritrócitos, o merozoíto assume uma forma anelar, tornando-se um trofozoíto que irá sofrer mutação e se transformar em um esquizonte sanguíneo assexuado. Com a ruptura dos eritrócitos infectados, esses esquizontes liberam de 8 a 32 merozoítos, que poderão estabelecer novas infecções nos eritrócitos a sua volta. O ciclo de replicação eritrocítica dura 24 horas (para o *P. Knowlesi*), 48 horas (para os *P. falciparum*, *P. vivax* e *P. ovale*) ou 72 horas (para o *P. malariae*). Embora a maioria dos merozoítos invasores se transforme em gametócitos, a forma do parasito que é infectante para os mosquitos. Os gametócitos são ingeridos e vão para o intestino médio do mosquito durante um repasto sanguíneo infeccioso e, em seguida, se transformam em gametas, que podem sofrer fertilização tornando-se zigotos. Estes amadurecem no interior de oocinetos, que atravessam a parede do intestino médio do mosquito e se desenvolvem no interior de oocistos. Numerosas séries de replicações assexuadas ocorrem no oocisto de forma a gerar esporozoítos em 10-14 dias. Os esporozoítos completamente desenvolvidos são liberados do oocisto e invadem as glândulas salivares do mosquito, de onde poderão dar início a uma nova infecção, durante um repasto sanguíneo subsequente feito pelo mosquito (figura 4) (Goodman & Gilman, 2012).

Compreender o ciclo de vida dos parasitos do *Plasmodium* é fundamental para direcionar as terapias farmacológicas de acordo com as diferentes espécies causadoras da doença. Assim, os mecanismos de invasão eritrocíticas incluem a ligação inicial dos merozoítos a ligantes específicos na superfície dos eritrócitos. O *P. falciparum* possui uma família de proteínas de ligação que pode reconhecer certo número de moléculas das células hospedeiras e invade reticulócitos e eritrócitos, podendo atingir, dessa forma, altos níveis de parasitemia. O *P. vivax* se liga seletivamente à proteína receptora de quimiocina *Duffy*, bem como a proteínas específicas de reticulócitos. Por esse motivo, o *P. vivax* não estabelece infecções em indivíduos *Duffy* negativos e invade apenas os reticulócitos. O *P. ovale* é semelhante ao *P. vivax* em sua predileção por hemácias jovens, embora não seja conhecido o mecanismo pelo qual ele reconhece o eritrócito. O *P. malariae* parasita hemácias senescentes: a parasitemia se mantém muito

baixa e causa uma infecção indolente típica. O ciclo da malária pode ser observado na Figura 4.

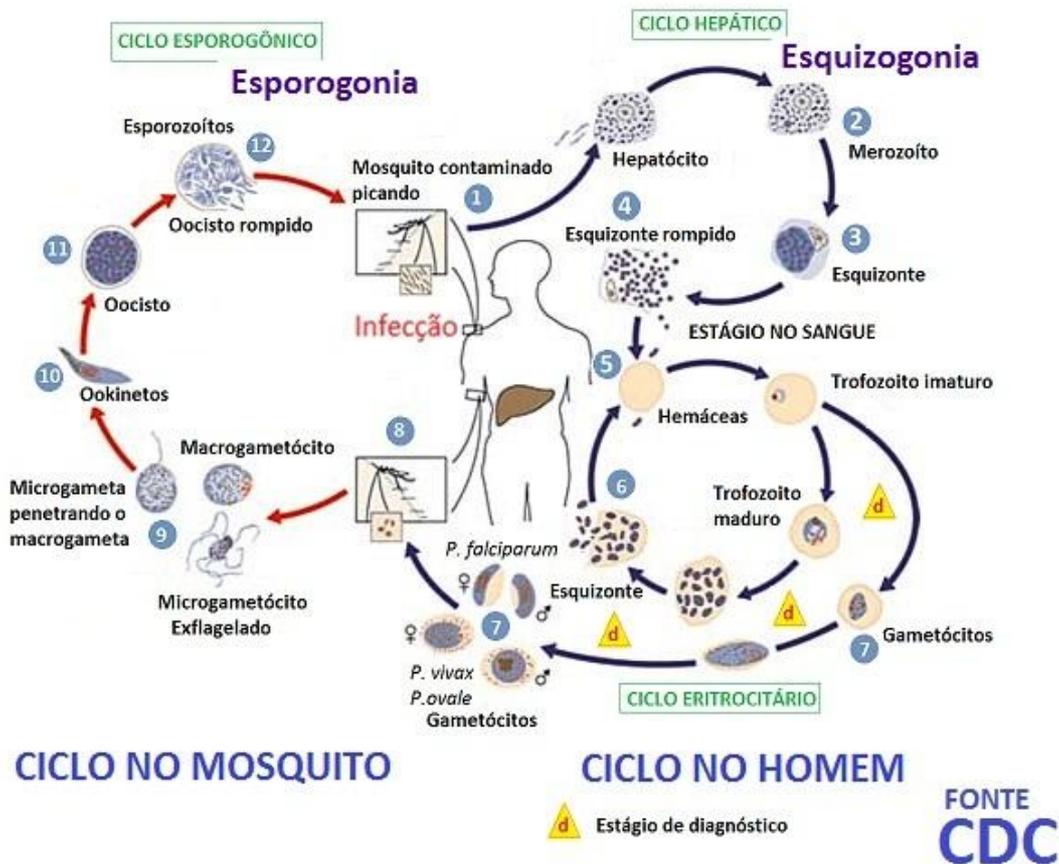


Figura 4. Ciclo vital dos parasitas da malária. Fonte (CDC, disponível em <http://www.cdc.gov/malaria/about/biology/>, acessado em fevereiro de 2014)

3. Manifestações clínicas da malária

A malária é uma doença infecciosa febril aguda, caracterizada por febre alta acompanhada de calafrios, suores e cefaléia, que ocorre em padrões cíclicos, dependendo da espécie do plasmódio. Uma fase sintomática inicial, caracterizada por mal-estar, cefaléia, cansaço e mialgia, geralmente precede a clássica febre da malária. O ataque paroxístico inicia-se com calafrios que duram de 15 minutos à uma hora, sendo seguidos por uma fase febril, com temperatura corpórea podendo atingir 41 °C ou mais. Após um período de duas a seis horas, ocorre redução da febre e o paciente apresenta sudorese profusa e fraqueza intensa (Brasil, 2008). O *P. falciparum* é responsável pela doença mais grave e pode levar a insuficiência de órgãos e ao óbito, este mesmo também pode se aderir a placenta causando a

malária placentária, de especial perigo durante a primeira gravidez. Este fato geralmente leva a complicações graves, incluindo o aborto.

A doença aguda causada pela infecção do *P. vivax* apresenta um limiar pirogênico menor quando comparado ao *P. falciparum* e normalmente apresenta uma baixa taxa de mortalidade, entretanto a mesma é caracterizada por recorrências causadas pela reativação de formas teciduais latentes. Nos últimos anos a malária grave causada pelo *P. vivax* na Oceania e na Índia apresentam similaridade com a malária causada pelo *P. falciparum*. Estas incluem os sintomas neurológicos e edema pulmonar. O *P. ovale* causa uma síndrome clínica semelhante com a causada pelo *P. vivax*, embora possa ser mais branda, com níveis inferiores de parasitemia. Ele compartilha com o *P. vivax* a habilidade de formar hipnozoítos (estágio hepático dormente). O *P. malariae* causa uma infecção geralmente indolente com níveis muito baixos de parasitemia e, em geral, não produz sintomas clínicos. Embora incomum, uma complicação potencialmente fatal causada pelo *P. malariae* é a glomerulonefrite. A infecção pelo *P. knowlesi*, em geral, é diagnosticada erroneamente, por microscopia ótica, como sendo causada pelo *P. malariae*. A primeira é diferenciada por apresentar um ciclo eritrocítico mais curto (24 h comparadas às 72 h do *P. malariae*) e níveis mais altos de parasitemia. O *P. knowlesi* é geralmente sensível a cloroquina, porém os pacientes que se apresentam em estágio avançado da doença poderão chegar a óbito, apesar do uso adequado do fármaco.

O diagnóstico laboratorial da malária é realizado através do exame da gota espessa de sangue, que é um método simples, eficaz e de baixo custo. A técnica baseia-se na visualização do parasito através de microscopia de luz, após coloração permanente (azul de metileno e Giemsa), permitindo a diferenciação específica dos parasitos a partir da análise da sua morfologia e pelos estágios de desenvolvimento dos protozoários encontrados no sangue periférico (OMS, 2006). Segundo a OMS (2006), o rápido diagnóstico e tratamento da malária são elementos básicos para controlar a doença. Tratando no início, pode-se diminuir a duração da infecção e prevenir complicações posteriores, dentre elas a maioria das mortes. O acesso ao tratamento deve ser considerado não só um componente do controle da malária, mas um direito fundamental de toda a população em risco.

4. Tratamento e resistência aos antimaláricos

O tratamento adequado e oportuno da malária é hoje o principal recurso para o controle da doença. Antes do surgimento da resistência do *P. falciparum* a cloroquina, este fármaco era utilizado para as quatro espécies de plasmódios que parasitam o homem. Hoje, além da cloroquina, o *P. falciparum* apresenta resistência a diversos outros antimaláricos, tornando o seu tratamento um dilema e um desafio para as autoridades de saúde responsáveis pelo controle da malária. O tratamento da malária visa à interrupção da esquizogônica sanguínea, responsável pela patogenia e manifestações clínicas da infecção. Entretanto, pela diversidade do seu ciclo biológico, é também objetivo da terapêutica proporcionar a erradicação de formas latentes do parasito no ciclo tecidual (hipnozoíto) das espécies *P. vivax* e *P. ovale*, evitando assim as recaídas tardias. Além disso, a abordagem terapêutica de pacientes residentes em áreas endêmicas pode visar também a interrupção da transmissão, pelo uso de fármacos que eliminam as formas sexuadas dos parasitos (Neves, 2005).

Os principais fármacos antimaláricos (Figura 5) podem ser classificados de acordo com o seu grupo químico em arilaminoálcoois (quinina, mefloquina e halofantrina), 4-aminoquinolinas (cloroquina e amodiaquina), 8-aminoquinolinas (primaquina), peróxido de lactona sesquiterpênica (derivados da artemisinina), naftoquinona (atovaquona) e antibióticos (tetraciclina, doxiciclina e clindamicina) (Neves, 2005).

Pelo seu alvo de ação no ciclo biológico do parasita, a classificação se dá em esquizonticidas teciduais ou hipnozoitocidas (cura radical do *P. vivax* e *P. ovale*), esquizonticidas sanguíneos (promovem a cura clínica), gametocitocidas (bloqueiam a transmissão) e esporonticidas (impede a infecção pelos esporozoítos). Infelizmente nenhum fármaco desse último grupo está disponível para uso em humanos (Neves, 2005).

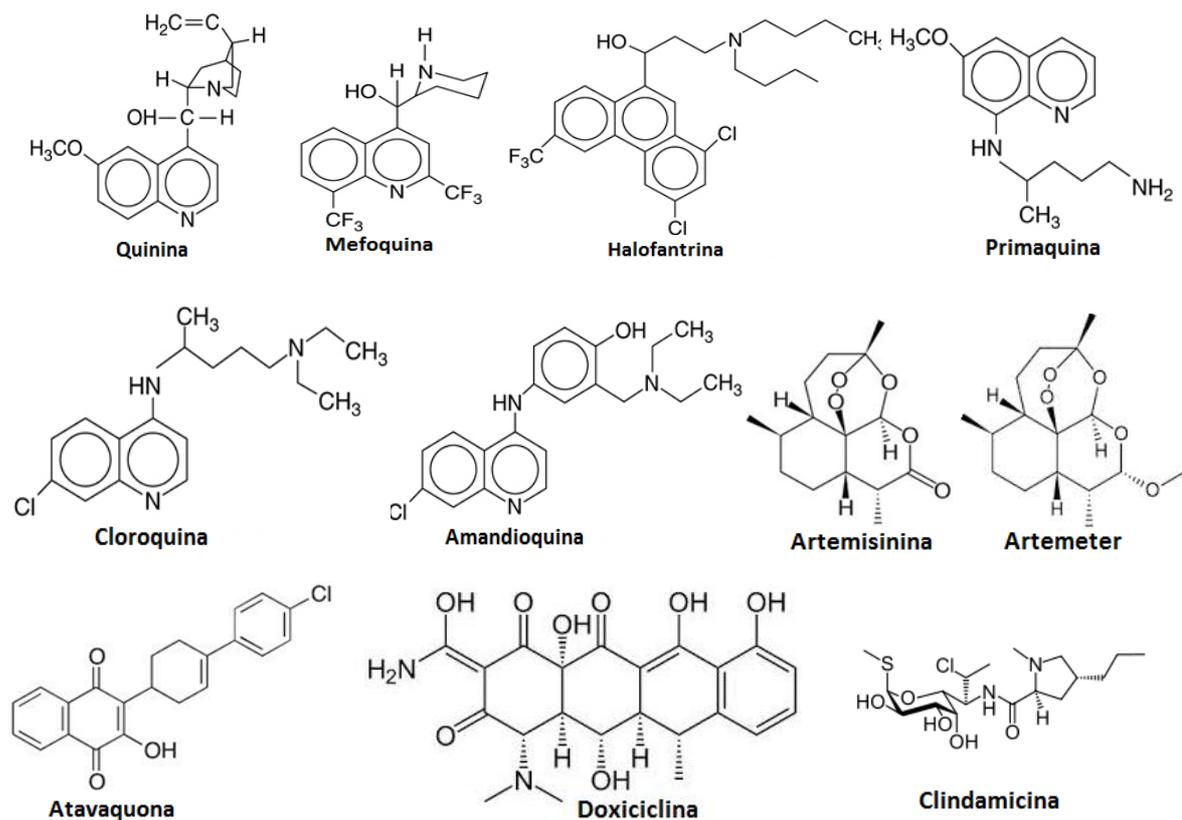


Figura 5. Estrutura química dos principais antimaláricos disponíveis atualmente (Goodman & Gilman, 2012).

A cloroquina atua, principalmente, durante a fase eritrocítica, onde o parasito alimenta-se da hemoglobina que gera como resíduo o grupamento HEME, tóxico para ele. Assim, para manter um ambiente favorável ao seu desenvolvimento, ele polimeriza o HEME formando a hemozoína, também conhecida como pigmento malárico, atóxica. É nesse mecanismo que este fármaco age, o qual impede a polimerização do HEME, tóxico para o parasita. Na atualidade, *P. falciparum* tornou-se resistente à cloroquina na maior parte do mundo (Slater, 1993).

A amodiaquina possui ação muito semelhante à da cloroquina e já foi retirada do mercado para uso profilático (Olliaro, 1996) visto que causava agranulocitose potencialmente fatal e hepatotoxicidade. Entretanto, voltou a ser utilizada na atualidade devido à alta incidência de resistência à cloroquina para uso no tratamento (Tafazoli, 2009)

A quinina é um alcalóide derivado da casca da cinchona e trata-se de um agente esquizonticida sanguíneo, eficaz contra formas eritrocitárias. Assim como a cloroquina, seu mecanismo de ação está associado à inibição da heme polimerase

do parasita. A mefloquina também é esquizonticida sanguíneo, que exibe atividade contra *P. falciparum* e *P. vivax*, mas é inativa contra as formas hepáticas do parasita, sendo freqüentemente associada à pirimetamina. Outro potente esquizonticida sanguíneo é a halofantrina, ativa contra isolados de *P. falciparum* resistentes a cloroquina, pirimetamina e quinina. É eficaz também contra a forma eritrocitária do *P. vivax*. A lumefantrina, estruturalmente relacionada à halofantrina, é eficaz contra *P. falciparum*, particularmente quando combinada com mefloquina ou derivados de artemisinina (Rang *et al.*, 2012).

A primaquina atua contra os hipnozoítos hepáticos primários e latentes de *Plasmodium sp.* E previne as recaídas provocadas por *P. vivax* e *P. ovale*. Esse fármaco não afeta os esporozoítos e exerce pouca ou nenhuma ação sobre o estágio eritrocitário do parasita. Entretanto, exerce ação gametocida, constituindo o agente antimalárico mais eficaz para prevenção da transmissão da doença (Rang *et al.*, 2012).

Os compostos à base de artemisinina são derivados da erva Ging hao (*Artemisia annua L.*), utilizada tradicionalmente pelos chineses contra malária. A artemisinina é um esquizonticida sanguíneo de ação rápida, eficaz no tratamento de ataque agudo da malária, incluindo malária resistente à cloroquina e malária cerebral. Os análogos sintéticos artesunato, artemeter e arteéter exibem maior atividade e são melhor absorvidos. Esses compostos concentram-se nos eritrócitos parasitados e apresentam ação gametocida (Rang *et al.*, 2012).

A atovaquona é um agente antimalárico que atua inicialmente inibindo a cadeia de transporte de elétrons mitocondrial do parasita. A atovaquona e o antifolato proguanil são habitualmente utilizados em combinação, uma vez que atuam produzindo um efeito antimalárico sinérgico (Rang *et al.*, 2012).

Atualmente a resistência do parasita tem sido documentada em três das cinco espécies de malária que foram observadas parasitando os seres humanos: *P. falciparum*, *P. vivax* e *P. malariae*. Resultados mostram que a resistência aos medicamentos causa uma incompleta eliminação dos parasitas do sangue do paciente. Problema agravado pela resistência cruzada, em que a resistência a um fármaco confere resistência a outros fármacos que pertencem a uma mesma família química, ou que tenham modos de ação semelhantes. Durante as últimas décadas, vários antimaláricos altamente eficazes tiveram que ser

removidos do mercado após o desenvolvimento da resistência do parasita a eles. (OMS, 2013).

Hoje, a OMS recomenda terapias combinadas à base de artemisinina (ACTs) para o tratamento da malária não complicada causada por *P. falciparum*. ACTs têm sido parte integrante dos recentes sucessos no controle global da malária. No entanto, a resistência de *P. falciparum* a artemisinina vem sendo detectada em vários países. O surgimento de *P. falciparum* resistentes à artemisinina é uma preocupação em saúde pública, ameaçando a sustentabilidade do esforço global para reduzir a incidência de malária em todas as regiões endêmicas (OMS, 2013).

Algumas substâncias naturais com atividade antimalárica, principalmente alcalóides, estão sendo isoladas de plantas. A descoberta e o isolamento de substâncias provenientes de produtos naturais tem sido proposta como uma abordagem promissora, uma vez que tais substâncias podem ser utilizadas como modelo para o desenvolvimento de novos fármacos antimaláricos (Oliveira *et al.*, 2009).

5. A descoberta de fármacos antimaláricos

No contexto da evolução da resistência aos fármacos e da necessidade de se aumentar o seu tempo de vida útil pelo uso de terapias combinadas, novos e potentes fármacos antimaláricos precisam ser desenvolvidos.

A descoberta de medicamentos é altamente desafiadora por razões científicas (dificuldades para criar novos medicamentos) e também em termos de desafios econômicos (como limitar os investimentos e os custos de saúde a um nível razoável). A duração média de tempo para desenvolver um fármaco aumentou e varia de 12 a 15 anos, em comparação com uma média de 8 anos na década de 1960 esse fato está associado a fatores como o desenvolvimento de novos medicamentos a partir da síntese de um composto para a aprovação de novas drogas pode levar 10-20 anos, com uma média estimada de cerca de 9-12 anos e também devido ao aumento das exigências regulatórias e no tamanho e complexidade dos ensaios clínicos necessárias que variaram nas últimas cinco décadas (Dimasi, 2003, Dickson, 2004).

Até agora, vários dos medicamentos usados como agentes antimaláricos foram desenvolvidos a partir de fontes naturais, como a quinina, a artemisinina e seus derivados. Neste contexto deve-se dar destaque aa classes de produtos

naturais que apresentam atividade antimalárica promissoras que pode ser encontrada em saponinas, substâncias anfífilas, compostas por uma aglicona (triterpênica ou esteróide), e por cadeias de hidratos de carbono ligados por um éter ou éster. As saponinas, têm sido investigadas por inúmeras atividades biológicas. Esses compostos são moléculas constituídas de 30 átomos de carbono e provenientes de seis unidades isoprenóides (com cinco átomos de carbonos). Estudos demonstraram propriedades biológicas e farmacológicas importantes, como atividades anti-HIV, antiinflamatória, citotóxica, antimicrobiana e hepatoprotetora (Liu, 1995 e 2005). Entre os que possuem atividades marcantes, podemos destacar três triterpenos pentacíclicos: ácido betulínico, ácido oleanólico e o ácido ursólico.

Estes compostos também serviram de base para o desenvolvimento de novas moléculas através de modificações estruturais. Durante as duas últimas décadas mais de 700 artigos científicos foram publicados sobre suas pesquisas, refletindo o enorme interesse e progresso na compreensão dos efeitos desses triterpenos. Isto inclui o isolamento, purificação e modificações químicas a partir de diversas plantas e a investigação farmacológica sobre os seus efeitos benéficos ao uso clínico (Liu, 2005).

Dentre os que possuem atividades antimaláricas, destaca-se o ácido ursólico (Figura 6) que é encontrado livre ou como aglicona de saponinas (Gosmann, 1995). Em relação à atividade antimalárica, o ácido ursólico (AU) produziu supressão da parasitemia contra *P. berghei berghei* em camundongos (Amusan, 1996). Além disso, o AU Também foi relatado ser capaz de reduzir a proliferação de parasitas contra cepas de *P. falciparum* 3D7, W2, e K1 *in vitro* (Traore-Keita, F., 2000), indicando o potencial dos triterpenóides como grupos farmacofóricos para o desenvolvimento de novos agentes antimaláricos, conforme evidenciado por outros grupos de pesquisa (Pathak, 2002, Suksamrarn, 2003).

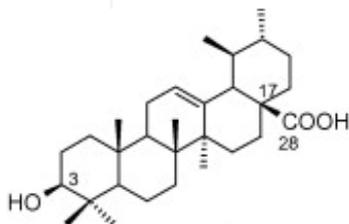


Figura 6. Ácido Ursólico (AU)

Recentemente, o progresso das técnicas de biologia molecular aumentou o conhecimento da bioquímica dos parasitas da malária, contribuindo para a identificação de potenciais alvos para novos medicamentos (Fidock, 2004). Considerando-se a cadeia lateral de aminoalquila como um requisito importante para uma forte atividade antimalárica (Egan, 2000), a função 1,4 -bis (3-aminopropil) piperazinil foi identificada como um grupo farmacofórico promissor associado à atividade antimalárica contra cepas de *P. falciparum* resistente e sensíveis a cloroquina (CQ) (Girault, 2001). Este foi relacionado a possíveis interações entre átomos de azoto da piperazina com o radical carboxilato do HEME, promovendo a inibição da formação de hemozoína e impedindo a desintoxicação do HEME no vacúolo digestivo do parasita (Guillon, 1997).

O mecanismo de ação dos triterpenos como antimaláricos não é totalmente compreendido. Gnoatto *et al.*, (2008) descreveu uma série de novos análogos do ácido ursólico com atividade antimalárica significativa, atribuído a interação com o carboxilato da hemozoína. Estes compostos foram desenvolvidos utilizando o esqueleto do ácido ursólico, munidos de um grupo acetil em C-3, adicionado para aumentar a lipofilia além da adição por hibridização molecular de uma porção de 1,4 -bis (3-aminopropil) em C-28, um promissor grupo farmacofórico antimalárico. O planejamento destes compostos baseou-se no mecanismo de ação molecular proposto para a cloroquina, ou seja, a interação com resíduos do HEME inibindo a formação de β -hematina. As interações hidrofóbicas do esqueleto do AU também foram caracterizadas por meio de simulações de dinâmica molecular, apoiando a ligação do triterpeno no HEME como um mecanismo de ação para estes novos derivados. Por isso, a pesquisa de novos derivados de triterpenos é uma abordagem promissora para o desenvolvimento de fármacos com potencial atividade antimalárica.

Dentre esta série de compostos testados *in vitro*, destacou-se o LAFIS 10 (N-{3-[4-(3-(Bis(4-hidroxibenzil)amino)propil)piperazinil]propil}-3-acetilursolamida) (Figura 7) sintetizado por pesquisadores do Laboratório de Fitoquímica e Síntese Orgânica (LAFIS) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, que demonstrou ter atividade antimalárica contra cepas de *P. falciparum*.

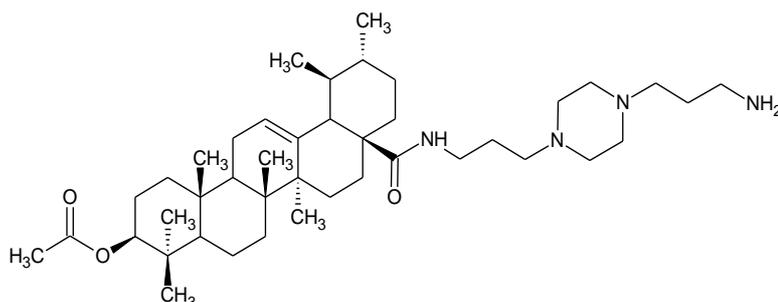


Figura 7. Estrutura química do LAFIS 10 (N-{3-[4-(3-(Bis(4-hidroxibenzil)amino)propil)pip-erazinil]propil}-3-O-acetilursolamida).

Este análogo piperazínico em estudo de REA mostrou atividade *in vitro* significativa frente a cepa FcB1 de *P. falciparum* resistente a cloroquina na faixa nanomolar $IC_{50} = 167$ nM, enquanto que a cloroquina apresentou um $IC_{50} = 130$ nM. O derivado se mostrou ativo contra cepas de *P. falciparum* resistente a cloroquina FcB₁ e de *P. falciparum* thai sugerindo baixos níveis de resistência cruzada à cloroquina. O índice de resistência calculado a partir da razão entre os valores de IC_{50} de cepas resistentes e sensíveis de *P. falciparum* foi de 0,37 para o LAFIS 10 e de 11 para a cloroquina (Gnoatto, 2008).

O composto quando testado apresentou citotoxicidade sobre as células diplóides humanas (MRC-5) na faixa de micromolar e o valor de IC_{50} foi de 1,61 μ M. O composto também apresentou uma inibição *in vitro* da formação de β -hematina, sugerindo um efeito sobre o alvo (Gnoatto et al, 2008).

CAPÍTULO 1

Desenvolvimento e validação de método bioanalítico por LC-MS/MS para a quantificação do LAFIS 10 - um candidato antimalárico - em estudo farmacocinético

Desenvolvimento e validação de método bioanalítico por LC-MS/MS para a quantificação do - LAFIS 10 - um candidato antimalárico em estudo farmacocinético

Laureano, J.V.^a; Barreto, F^a.; Gnoatto, S.^{a,c}; Araujo, B.V. De.*^{a, b}

^a Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil

^bCentro Bioanalítico de Medicamentos (CBIM), Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil

^c Laboratório de Fitoquímica e Síntese Orgânica (LAFIS), Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil

*Corresponding author current address:

Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas

Faculdade de Farmácia

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Av. Ipiranga, 2752 - 90610-000 - Porto Alegre, RS - Brazil.

Tel.: +55 51 3308 5418

Email: bvaraujo@yahoo.com.br

Resumo:

Um método rápido, simples, sensível, exato e preciso por LC-MS/MS foi desenvolvido e validado para a determinação de LAFIS10 em plasma de ratos, utilizando dexametasona como padrão interno. O método foi validado de acordo com os guias do *Food and Drug Administration (FDA)* e do *European Medicines Agency (EMA)*. As análises foram realizadas em um sistema Agilent 1260 LC, acoplado a um espectrômetro de massa triplo quadrupolo, AB Sciex 5500 QTRAP, com uma interface de ionização *electrospray*, operando em modo positivo. A separação cromatográfica foi efetuada com uma coluna Poroshell 120 EC-C18 (2,7 μ m, 50mm \times 3.0 mm; Agilent, USA), com pré-coluna (Phenomenex, EUA). A fase móvel constituiu-se de água (A) e acetonitrila (B), ambas contendo 10 mM de formato de amônio e de ácido fórmico a 0,1%, a qual foi entregue na forma de gradiente de eluição. A taxa de vazão foi de 500 μ L.min⁻¹. A temperatura da coluna foi mantida a 40°C e o volume de injeção foi de 2 μ L. As amostras de plasma foram desproteinizadas com acetonitrila (1:4, v/v) e o sobrenadante foi injetado no sistema cromatográfico, sendo a recuperação superior a 97%. Os tempos de retenção do LAFIS 10 e do padrão interno foram aproximadamente 2,3 e 2,6 min, respectivamente. As curvas padrão foram lineares no intervalo de concentração de 10-1000 ng/mL apresentando coeficiente de determinação > 0,99. O limite inferior de quantificação foi de 10 ng/mL. A exatidão do método foi superior a 90%. Os desvios padrões relativos intra e interdia foram inferiores a 8,80 e 6,37%, respectivamente. Não foram observadas interferências de substâncias endógenas no cromatograma, indicando a especificidade do método, o mesmo não apresentou efeito de *carry-over* e efeito de matriz significativo. Estudo de estabilidade do LAFIS 10 em plasma foi conduzido em diferentes condições demonstrando estabilidade do mesmo. O método foi empregado para a quantificação do LAFIS10 após a administração i.v. de 2,5 mg/kg a ratos Wistar machos (n = 6) e mostrou-se adequadamente sensível para caracterizar a fase de eliminação do candidato antimalárico, com uma ASC extrapolada inferior a 20%. Assim sendo, o método descrito provou ter sensibilidade necessária, linearidade, precisão, exatidão e especificidade para permitir a determinação do LAFIS 10 em estudos farmacocinéticos pré-clínicos.

Palavras-chaves: LAFIS 10, antimalárico, validação de método bioanalítico, LC-MS/MS, farmacocinética pré-clínica. INTRODUÇÃO

CAPÍTULO 2

Avaliação Farmacocinética Pré-Clínica do LAFIS 10: Um candidato a antimalárico em ratos e camundongos

Avaliação Farmacocinética Pré-Clínica do LAFIS 10: Um candidato a antimalárico em ratos e camundongos.

Laureano, J.V.^a; Barreto, F.^a; Pigatto, M.^a; Torres, B.^a; Gnoatto, S.^{a, b}; Dalla Costa, T.; De Araujo, B.V.*^a

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

^bLaboratório de Fitoquímica e Síntese Orgânica da Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil

*Corresponding author current address:

Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas

Faculdade de Farmácia

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Av. Ipiranga, 2752 - 90610-000 - Porto Alegre, RS - Brazil.

Tel.: +55 51 3308 5418

Resumo

Este trabalho teve como objetivo investigar a farmacocinética de um candidato a antimalárico (LAFIS 10). As concentrações plasmáticas do LAFIS 10 foram determinadas após a administração de doses únicas pela via i.v. *bolus* (2,5 mg/kg), i.p e oral (15 mg/kg) em ratos Wistar e i.p (15 mg/kg) em camundongos e quantificadas por LC-MS/MS. Os perfis individuais foram avaliados por modelos não-compartimental e compartimental. O modelo de três compartimentos foi o que melhor descreveu os perfis plasmáticos após dose intravenosa. Para a vias intraperitoneal e oral, o modelo de dois compartimentos e dois compartimentos com duas constantes de absorção, respectivamente, foram os mais adequados. Quando administrado via intraperitoneal em camundongos o modelo que melhor descreveu os dados foi o de 2 compartimentos intravenoso. A biodisponibilidade oral foi de 1,6% e a intraperitoneal foi de 53%. Após a dose i.v o CL_{tot} foi de $0,80 \pm 0,38$ L/h/kg, o Vd_{ss} de $5,04 \pm 3,81$ L/kg e o $t_{1/2\gamma} = 8,69 \pm 0,98$ h e esses parâmetros não diferiram estatisticamente dos determinados para as vias extravasculares. Quando administrado via i.p em camundongos os valores de tempo de meia-vida foi de $2,012 \pm 0,19$ h, o Vd/F de $8,46 \pm 0,65$ L/h/kg) e o CL/F de $3,47 \pm 0,35$ L/h/kg). A ligação do composto às proteínas plasmáticas, determinada por ultrafiltração, foi de $80,85 \pm 0,14\%$ sendo concentração independente na faixa de 100-1000 ng/mL. A penetração do LAFIS 10 em eritrócitos sadios foi de $4,17 \pm 0,52$. Esse conjunto de resultados demonstra que o LAFIS 10 possui uma boa penetração nos eritrócitos (biofase) e características farmacocinéticas adequadas para a atividade antimalárica para a qual está sendo investigado, quando administrado via i.p e i.v.

Palavras-chave: LAFIS 10, farmacocinética pré-clínica, penetração nos eritrócitos, ligação às proteínas plasmáticas.

DISCUSSÃO GERAL

Este trabalho objetivou avaliar e caracterizar a farmacocinética pré-clínica do LAFIS 10, uma vez que os resultados farmacológicos *in vitro* o credenciaram como protótipo de fármaco para tratamento antimalárico.

Para isso, inicialmente um método foi desenvolvido e validado utilizando LC-MS/MS para quantificação de LAFIS 10 em plasma de roedores de acordo com as diretrizes do FDA e do EMEA e todos os resultados se demonstraram de acordo com os critérios de aceitabilidade de métodos bioanalíticos como especificidade, linearidade, precisão, exatidão e limite inferior de quantificação. Também foram avaliados os efeitos de matriz, de *carry-over* e de integridade de diluição. Tendo o método bioanalítico validado se procedeu a investigação pré-clínica da farmacocinética deste composto em roedores, após diferentes vias de administração.

O perfil plasmático do LAFIS 10 após administração intravenosa de 2,5 mg/kg foi adequadamente descrito pelo modelo de três compartimentos, com duas inclinações referente a distribuição e uma referente a eliminação mais lenta ($t_{1/2\gamma} = 8,69 \pm 0,98$). Os parâmetros farmacocinéticos como $V_{d_{SS}}$ e Cl_{tot} foram de $0,80 \pm 0,38$ L/h/kg e $5,04 \pm 3,82$ L/kg respectivamente. A fração do LAFIS 10 ligada a proteínas plasmáticas foi de $80,85 \pm 0,14\%$, não sendo concentração dependente na faixa de 100 a 1000 ng/mL.

Após a administração i.p. da dose de 15mg/kg o modelo de dois compartimentos com absorção de primeira ordem foi o mais adequado para descrever os dados. Apresentando os parâmetros farmacocinéticos como $t_{1/2} = 10,66 \pm 3,15$ h, $V_{d_{SS}}$ de $8,79 \pm 3,63$ L/kg, e um Cl_{tot} de $0,80 \pm 0,30$ L/h/kg, estes parâmetros não foram estatisticamente diferentes dos obtidos após a administração do composto pela via i.v. Além disso a análise estatística dos parâmetros farmacocinéticos ($t_{1/2}$, $V_{d_{SS}}$ e Cl_{tot}) obtidos entre a abordagem compartimental e não-compartimental ($p < 0,05$), não revelou diferença significativa, mostrando que os modelos utilizados foram adequados para descrever os dados. A biodisponibilidade absoluta do LAFIS 10 para a via i.p foi de 53 %.

Quando o LAFIS 10 foi administrado pela via oral, a curva de concentração plasmática média apresentou um comportamento incomum, apresentando dois picos máximos de concentração plasmática, indicando possibilidade de janelas de absorção ao longo do trato gastrointestinal.

O modelo mais adequado para descrever os dados experimentais foi o modelo de dois compartimentos abertos com dois locais de absorção onde o trato gastrointestinal está dividido em diversos compartimentos, mas a absorção irá ocorrer apenas no primeiro e no último compartimento. Apresentando os parâmetros farmacocinéticos compartimentais de V_c $1109,94 \pm 927$ L/kg, constante de eliminação (λ) $0,096 \pm 0,046$ h⁻¹ e o MRTns $10,83 \pm 1,97$ h que quando comparados aos parâmetros obtidos pela análise não-compartimental não demonstraram diferenças e apresentando um MSC variando entre 1,61 - 3,66, com um coeficiente de correlação de 0,98 (faixa variação da modelagem individual entre 0,97 – 0,99), indicando que o modelo escolhido descreve corretamente o perfil plasmático do LAFIS 10 com seus respectivos picos de absorção. A biodisponibilidade absoluta determinada para o LAFIS 10 via oral foi de 1,67%.

A penetração do LAFIS 10 nos eritrócitos sadios de ratos foi avaliada, uma vez que essa propriedade é desejável em fármacos antimaláricos, pois a ação intra eritrocitária é essencial para a atividade dos principais antimaláricos. O valor determinado foi de $4,17 \pm 0,52$, comparável aos valores encontrados para a quinina $4,1 \pm 0,60$ determinados por Hass e colaboradores (2009), permitindo concluir que esse parâmetro é semelhante em ambos os compostos.

A avaliação do perfil farmacocinético do LAFIS 10 quando administrado em camundongos pela via i.p, foi realizada a fim de se verificar o comportamento deste composto em camundongos, uma vez que estes animais são freqüentemente utilizados como modelo animal para *screening* de novas moléculas antimaláricas. O modelo que descreveu corretamente os dados após administração i.p em camundongos foi o de dois compartimentos sem absorção. Optou por esse modelo pois o LAFIS 10 apresentou uma absorção quase que instantânea, onde no primeiro ponto de coleta foi obtido o $C_{p_{max}}$. Quando avaliados os parâmetros ASC_{0-inf} , $V_{d_{SS}}/F$, Cl_{tot}/F e tempo de meia vida, entre a análise compartimental e não compartimental não foram evidenciadas diferenças significativas, sendo o modelo de 2 compartimentos sem absorção considerado adequado para descrever os dados experimentais. Quando se fez a comparação dos parâmetros obtidos para a administração i.p em ratos e i.p em camundongos da dose de 15mg/kg, podemos ver diferenças nos parâmetros farmacocinéticos, esta diferença pode estar relacionada a uma taxa de metabolização maior no camundongo como relatado por

Kreiling em 1986 que demonstrou que a metabolização do camundongo é cerca de duas vezes maior que em ratos.

O conjunto de resultados da investigação pré-clínica do LAFIS 10 demonstrou que o composto possui características farmacocinéticas interessantes, como uma alta penetração nos eritrócitos (biofase), devendo sua investigação ser continuada.

CONCLUSÕES

- Um método analítico por CL-MS/MS para determinação de LAFIS 10 em amostras de roedores foi desenvolvido e validado. O mesmo mostrou-se linear, exato, preciso, específico e sensível, sendo adequada para a determinação dos perfis plasmáticos do composto após diferentes doses e vias de administração.
- O perfil plasmático do LAFIS 10 após administração intravenosa foi adequadamente descrito pelo modelo de três compartimentos. Após a administração i.p. o modelo de dois compartimentos com absorção de primeira ordem foi o mais adequado para descrever os dados. Quando o LAFIS 10 foi administrado pela via oral o modelo mais adequado para descrever os dados experimentais foi o modelo de dois compartimentos abertos com dois locais de absorção e o modelo que descreveu corretamente os dados após administração i.p em camundongos foi o de dois compartimentos sem absorção.
- A fração do LAFIS 10 ligada a proteínas plasmáticas foi de $80,85 \pm 0,14\%$, não sendo concentração dependente na faixa de 100 a 1000 ng/mL.
- O composto apresentou uma biodisponibilidade absoluta para a via i.p de 53 % e para via oral de 1,67%.
- A penetração do LAFIS 10 nos eritrócitos sadios de ratos foi de $4,17 \pm 0,52$

REFERÊNCIAS

AMUSAN, O. O. G.; ADESOGAN, E. K.; MAKINDE, J. M. Antimalarial Active Principles of *Spathodea campanulata* Stem Bark. **Phytotherapy Research**, v. 10, p. 692-693, 1996

AKANDE, T.M., MUSA, I.O. Epidemiology of Malaria in Africa. *African Journal of Clinical and Experimental Microbiology*, v. 6, n. 2, p. 107-111, 2005.

AMUSAN, O. O. G.; ADESOGAN, E. K.; MAKINDE, J. M. **Antimalarial Active Principles of *Spathodea campanulata* Stem Bark.** ISSN 8.

BLACKMAN, M. J. Proteases in host cell invasion by the malaria parasite. **Cell Microbiol**, v. 6, n. 10, p. 893-903, Oct 2004. ISSN 1462-5814. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15339265> >.

BULTER, A. R.; Khan, S.; Ferguson, E. A brief history of malaria chemotherapy. **J R Coll Physicians Edinb**, 40: 172-177, 2010

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. SECRETARIA DE VIGILANCIA À SAÚDE. Guia de gestão local do controle da malária. Brasília: **Ministério da Saúde**; 2008. Disponível em: <http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/guia_gestao_local_controle_malaria.pdf>. Acessado em: fevereiro de 2014.

CAMARGO, Erney Plessmann. Malária, maleita, paludismo. **Cienc. Cult.** [online]. 2003, vol.55, n.1, pp. 26-29. ISSN 2317-6660.

COX-SINGH, J. et al. Plasmodium knowlesi malaria in humans is widely distributed and potentially life threatening. **Clin Infect Dis**, v. 46, n. 2, p. 165-71, Jan 2008. ISSN 1537-6591. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18171245> >.

DICKSON, M.; GAGNON, J. P. Key factors in the rising cost of new drug discovery and development. **Nat Rev Drug Discov**, v. 3, n. 5, p. 417-29, May 2004. ISSN 1474-1776. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15136789> >.

DIMASI, J. A.; HANSEN, R. W.; GRABOWSKI, H. G. The price of innovation: new

estimates of drug development costs. **Journal of Health Economics**, v. 22, n. 2, 2003. ISSN 2.

EGAN, T. J. et al. Structure-function relationships in aminoquinolines: effect of amino and chloro groups on quinoline-hematin complex formation, inhibition of beta-hematin formation, and antiplasmodial activity. **J Med Chem**, v. 43, n. 2, p. 283-91, Jan 2000. ISSN 0022-2623. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10649984> >.

FIDOCK, D. A. et al. Antimalarial drug discovery: efficacy models for compound screening. **Nat Rev Drug Discov**, v. 3, n. 6, p. 509-20, Jun 2004. ISSN 1474-1776. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15173840> >.

GIRAULT, S. et al. Antiplasmodial activity and cytotoxicity of bis-, tris-, and tetraquinolines with linear or cyclic amino linkers. **J Med Chem**, v. 44, n. 11, p. 1658-65, May 2001. ISSN 0022-2623. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11356101> >.

GNOATTO, S. C. B. et al. Pharmacomodulation on the 3-acetylursolic acid skeleton: Design, synthesis, and biological evaluation of novel N-{3-[4-(3-aminopropyl)piperazinyl]propyl}-3-O-acetylursolamide derivatives as antimalarial agents. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 16, n. 2, p. 771-782, 2008. ISSN 0968-0896. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0968089607008929> >.

GOODMAN & GILMAN: As Bases Farmacológicas da Terapêutica. 12^a ed. Rio de Janeiro: **McGraw-Hill**, 2012.

GOSMANN, G. et al. Triterpenoid saponins from *Ilex paraguariensis*. **J Nat Prod**, v. 58, n. 3, p. 438-41, Mar 1995. ISSN 0163-3864. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7775986> >.

GUILLON, J., P. Grellier, M. Labaied, P. Sonnet, JM Leger, R. Deprez-Poulain, I. Forfar-Bares, P. Dallemagne, N. Lemaitre, F. Pehourcq, J. Rochette, C. Sergheraert , C. Jarry. *J. Med. Chem.*, 47 (2004), p. 1997

MEUNIER, B. Hybrid molecules with a dual mode of action: dream or reality? **Acc Chem Res**, v. 41, n. 1, p. 69-77, Jan 2008. ISSN 1520-4898. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17665872> >.

NEVES, D. P.; MELO, A. L.; GENARO, O.; LINARDI, P. M. **Parasitologia Humana**. 11 ed., São Paulo, Atheneu, 2005. 494p.

OLLIARO, P. et al. Systematic review of amodiaquine treatment in uncomplicated malaria. **Lancet**, v. 348, n. 9036, p. 1196-201, Nov 1996. ISSN 0140-6736. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8898036> >.

OMS: Guidelines for the treatment of malaria. Disponível em: <[http://](http://gamapserver.who.int/mapLibrary/Files/Maps/Global_Malaria_2010.png)>
OMS:<http://gamapserver.who.int/mapLibrary/Files/Maps/Global_Malaria_2010.png>
, Acessado em setembro de 2012.

PATHAK, A. et al. Synthesis of combinatorial libraries based on terpenoid scaffolds. **Comb Chem High Throughput Screen**, v. 5, n. 3, p. 241-8, May 2002. ISSN 1386-2073. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11966432> >.

PLEETER, P.; LEKOSTAI, J.K.; ROEPE, P.D. Purified Plasmodium falciparum multi-drug resistance protein (PfMDR 1) binds a high affinity chloroquine analogue. **Mol Biochem Parasitol**, 173: 158-161, 2010.

RANG, H.P., DALE, M.M., RITTER, J.M., FLOWER, R.J., HWNERSON, G. *Farmacologia*. 7^a ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2012.

SCHANTZ-DUNN, J.; NOUR, N. M. Malaria and pregnancy: a global health perspective. **Rev Obstet Gynecol**, v. 2, n. 3, p. 186-92, 2009. ISSN 1941-2797. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19826576> >.

SLATER, A. F. G. Chloroquine: Mechanism of drug action and resistance in

plasmodium falciparum. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 57, n. 2–3, p. 203-235, 1993. ISSN 0163-7258. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/016372589390056J> >.

SUH, K. N.; KAIN, K. C.; KEYSTONE, J. S. Malaria. **CMAJ**, v. 170, n. 11, p. 1693-702, May 2004. ISSN 0820-3946. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15159369> >.

SUKSAMRARN, A.; TANACHATCHAIRATANA, T.; KANOKMEDHAKUL, S. Antiplasmodial triterpenes from twigs of *Gardenia saxatilis*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 88, n. 2–3, p. 275-277, 2003. ISSN 0378-8741. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378874103002617> >.

TFAZOLI, S.; O'BRIEN, P. J. Amodiaquine-induced oxidative stress in a hepatocyte inflammation model. **Toxicology**, v. 256, n. 1–2, p. 101-109, 2009. ISSN 0300-483X. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0300483X0800557X> >.

TRAORE-KEITA, F. et al. Antimalarial activity of four plants used in traditional medicine in Mali. **Phytother Res**, v. 14, n. 1, p. 45-7, Feb 2000. ISSN 0951-418X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10641048> >.

WHITE, N. J. Assessment of the pharmacodynamic properties of antimalarial drugs in vivo. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 41, n. 7, p. 1413-22, Jul 1997. ISSN 0066-4804. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9210658> >.

ANEXOS

ANEXO I –



U F R G S
UNIVERSIDADE FEDERAL
DO RIO GRANDE DO SUL

PRÓ-REITORIA DE PESQUISA
Comissão De Ética No Uso De Animais



CARTA DE APROVAÇÃO

Comissão De Ética No Uso De Animais analisou o projeto:

Número: 21979

Título: AVALIAÇÃO FARMACOCINÉTICA PRÉ-CLÍNICA DE DERIVADO ANTIMALÁRICO EM RATOS WISTAR

Pesquisadores:

Equipe UFRGS:

BIBIANA VERLINDO DE ARAUJO - coordenador desde 01/01/2012
SIMONE CRISTINA BAGGIO GNOATTO - pesquisador desde 01/01/2012
SANDRA ELISA HAAS - pesquisador desde 01/01/2012
João Victor Laureano - Colaborador desde 01/01/2012

Comissão De Ética No Uso De Animais aprovou o mesmo, em reunião realizada em 17/01/2012 - sala 01 de reuniões do Gabinete do Reitor, 6º andar do prédio da Reitoria, em seus aspectos éticos e metodológicos, para a utilização de 30 ratos Wistar machos, de acordo com as Diretrizes e Normas Nacionais e Internacionais, especialmente a Lei 11.794 de 08 de novembro de 2008 que disciplina a criação e utilização de animais em atividades de ensino e pesquisa.

Porto Alegre, Segunda-Feira, 6 de Fevereiro de 2012

STELA MARIS KUZE RATES
Vice Coordenador da comissão de ética

ANEXO II -



U F R G S
UNIVERSIDADE FEDERAL
DO RIO GRANDE DO SUL

PRÓ-REITORIA DE PESQUISA

Comissão De Ética No Uso De Animais



CARTA DE APROVAÇÃO

Comissão De Ética No Uso De Animais analisou o projeto:

Número: 22188

Título: Obtenção de derivados triterpênicos semi-sintéticos visando à atividade antimalárica.

Pesquisadores:

Equipe UFRGS:

SIMONE CRISTINA BAGGIO GNOATTO - coordenador desde 01/03/2011

BIBIANA VERLINDO DE ARAUJO - pesquisador desde 01/03/2011

Laura Cardozo Vieira - pesquisador desde 01/03/2011

Comissão De Ética No Uso De Animais aprovou o mesmo , em reunião realizada em 28/05/2012 - Sala de Reuniões do 2º andar da Reitoria, Campus Central, em seus aspectos éticos e metodológicos, para a utilização de 72 camundongos e 16 ratos machos, Wistar, de acordo com as Diretrizes e Normas Nacionais e Internacionais, especialmente a Lei 11.794 de 08 de novembro de 2008 que disciplina a criação e utilização de animais em atividades de ensino e pesquisa.

Porto Alegre, Sexta-Feira, 8 de Junho de 2012

FLAVIO ANTONIO PACHECO DE ARAUJO
Coordenador da comissão de ética