

Ministério da Saúde

**FIOCRUZ**  
**Fundação Oswaldo Cruz**



Monica Regina Pimentel Siqueira

**Estudo da alteração do tempo de esvaziamento gástrico em roedores**

Rio de Janeiro

2016

Monica Regina Pimentel Siqueira

**Estudo da alteração do esvaziamento gástrico em roedores**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Saúde Pública, da Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca, na Fundação Oswaldo Cruz, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Saúde Pública. Área de concentração: Abordagem ecológica de doenças transmissíveis.

Orientador: Prof. Dr. Francisco José Roma Paumgarten.

Coorientador: Prof. Dr. Davyson de Lima Moreira.

Rio de Janeiro

2016

Catálogo na fonte  
Fundação Oswaldo Cruz  
Instituto de Comunicação e Informação Científica e Tecnológica em Saúde  
Biblioteca de Saúde Pública

S618e Siqueira, Monica Regina Pimentel.  
Estudo da alteração do esvaziamento gástrico em roedores /  
Monica Regina Pimentel Siqueira. -- 2016.  
77 f. ; il. color. ; tab.

Orientador: Francisco José Roma Paumgarten.  
Coorientador: Davyson de Lima Moreira.  
Dissertação (mestrado) – Fundação Oswaldo Cruz, Escola  
Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca, Rio de Janeiro, 2016.

1. Gravidez. 2. Esvaziamento Gástrico. 3. Acetaminofen.  
4. Camundongos Endogâmicos DBA. 5. Camundongos.  
6. Ratos Wistar. 7. Cromatografia Líquida de Alta Pressão.  
I. Título.

CDD – 22.ed. – 616.332

Monica Regina Pimentel Siqueira

**Estudo da alteração do esvaziamento gástrico em roedores**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Saúde Pública, da Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca, na Fundação Oswaldo Cruz, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Saúde Pública. Área de concentração: Abordagem ecológica de doenças transmissíveis.

Aprovada em: 31 de maio de 2016.

Banca Examinadora

Prof.<sup>a</sup> Dra. Isabella Fernandes Delgado  
Fundação Oswaldo Cruz – Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

Prof. Dr. Valmir Laurentino Silva  
Fundação Oswaldo Cruz – Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca

Prof. Dr. Davyson de Lima Moreira (Coorientador)  
Fundação Oswaldo Cruz – Instituto de Tecnologia em Fármacos

Prof. Dr. Francisco José Roma Paumgarten (Orientador)  
Fundação Oswaldo Cruz – Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca

Rio de Janeiro

2016

Este trabalho é dedicado aos meus pais, Aparecida Avelar Pimentel (*in memoriam*) e Luiz Antônio Casado Siqueira.

## AGRADECIMENTOS

A Deus pela vida, por estar sempre no meu caminho, iluminando e me guiando às escolhas certas;

Ao meu pai Luiz Antônio Casado Siqueira, por todo amor e dedicação, homem pelo qual tenho maior orgulho de chamar de pai, pessoa que sigo como exemplo, pai dedicado, amigo, batalhador, que abriu mão de muitas coisas para me proporcionar a realização deste trabalho;

À minha mãe Aparecida Avelar Pimentel (*in memoriam*), por ser tão dedicada e amiga, por ser a pessoa que mais me apoiou e acreditou na minha capacidade, que sempre sonhou com este momento e que tenho certeza que agora onde estiver está muito orgulhosa de mim;

Às minhas irmãs, Alessandra e Elisângela, pelo carinho e atenção que sempre tiveram comigo;

À minha irmã caçula, Munique, que é uma pessoa forte, amiga e que me dá força nos momentos em que mais preciso;

Ao prof. Dr. Davyson de Lima Moreira pela orientação, ensinamentos, confiança e oportunidades desde a minha graduação;

Ao prof. Dr. Francisco José Roma Paumgartten pela orientação e ensinamentos dedicados a este trabalho;

À minha amiga, Lorena Rosa Carvalho, companheira de turma e a quem eu pude dividir todos os meus momentos bons e ruins durante esses dois anos;

Ao Rafael e a Gabriela, sem os quais não conseguiria realizar os tratamentos em animais desse trabalho.

A todos os meus amigos, de perto e de longe, pelos momentos de descontração. Em especial à Ana Paula Carmo que tive a oportunidade de conhecer durante o curso.

A todos do laboratório de Toxicologia Ambiental, em especial à Rosângela que sempre esteve pronta para ajudar em todos os momentos. A profa. Ana Cecília Xavier pelos ensinamentos dedicados no início do curso;

A CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pela concessão de bolsa durante parte do período de realização do Mestrado.

Por fim, gostaria de agradecer a todos que contribuíram direta ou indiretamente para que esse trabalho fosse realizado.

## RESUMO

Fatores que alteram os níveis plasmáticos de substâncias químicas e, por conseguinte, modificam a sua cinética, como por exemplo, a gravidez, podem ter impactos sobre a segurança e eficácia de medicamentos. Em estudo recente, realizado por Carmo (2015), no Laboratório de Toxicologia Ambiental do Departamento de Biologia da Escola Nacional de Saúde Pública da Fundação Oswaldo Cruz (ENSP/FIOCRUZ), foi observado que a concentração plasmática do antimalárico difosfato de primaquina em camundongos fêmeas grávidas DBA/2 era menor do que a concentração do fármaco registrada em igual intervalo de tempo pós-administração em camundongos fêmeas não grávidas. Vários estudos sugerem que a diminuição da concentração plasmática de fármacos na gestante pode se dever a um retardo no esvaziamento gástrico e/ou um aumento no volume de distribuição. Alterações do trânsito no trato gastrointestinal podem influenciar diretamente a absorção de fármacos, resultando em absorção mais rápida ou mais lenta. O fármaco analgésico e antipirético paracetamol é absorvido quase que exclusivamente no intestino. Assim a velocidade da sua absorção depende do tempo de esvaziamento gástrico. Fatores tais como alimentação, idade, gravidez e/ou o uso de fármacos que promovem aceleração (metoclopramida) ou o retardo (morfina) da motilidade gastrointestinal, podem influenciar em sua absorção. O objetivo desse trabalho foi desenvolver e padronizar uma metodologia de análise do paracetamol que permitisse investigar o efeito da gravidez sobre o esvaziamento gástrico sobre a cinética de fármacos administrados em pequenos roedores. O método empregado para determinar as concentrações plasmáticas de paracetamol foi a cromatografia em fase líquida de alta eficiência com detector por arranjo de diodos e visualização no ultravioleta (CLAE-DAD-UV), em equipamento Shimadzu Class-VP. Nesse estudo camundongos DBA/2 e Suíços, e ratos Wistar, foram tratados com 50 mg.kg<sup>-1</sup> de paracetamol e 10 mg.kg<sup>-1</sup> de metoclopramida ou sulfato de morfina. O desenvolvimento e validação do método de análise de paracetamol em plasma de camundongos envolveu o uso dos seguintes parâmetros: coluna cromatográfica ACE® 5 C18 (250 mm x 4,6 mm i.d., 5 µm); fase móvel composta por água ultrapura acidificada (pH 3,0) e acetronitrila grau HPLC na proporção 80:20, respectivamente; fluxo de 1,0 mL.min<sup>-1</sup>; temperatura do forno 50°C. O método desenvolvido demonstrou ser seletivo para análise do paracetamol em plasma, bem como linear, preciso, exato e robusto. Os limites do método para detecção e quantificação do paracetamol foram de 30 ng.mL<sup>-1</sup> e 45 ng.mL<sup>-1</sup>, respectivamente. O teste escolhido para estudo do esvaziamento gástrico foi adequado para detectar tanto a aceleração quanto o retardo da absorção de fármacos. A velocidade de eliminação do paracetamol não diferiu entre ratos fêmeas grávidas e não grávidas, sugerindo que a gravidez não altera o tempo de esvaziamento gástrico. Portanto as menores concentrações plasmáticas de primaquina em fêmeas grávidas não se deve a alterações do esvaziamento gástrico. Possivelmente outros fatores como alterações do volume de distribuição e ou da metabolização (*clearance*) são responsáveis pelas modificações das concentrações plasmáticas da primaquina durante a gestação.

Palavras-chave: Gravidez. Esvaziamento gástrico. Paracetamol. Camundongos DBA/2. Camundongos Suíços. Ratos Wistar. CLAE-DAD.

## ABSTRACT

Factors that affect plasma levels of chemicals, and consequently their kinetics, such as pregnancy, can impact on the safety and efficacy of medicines. In a recent study, conducted by Carmo (2015) at the laboratory of Environmental Toxicology (Department of Biological Sciences, National School Public Health, Oswaldo Cruz Foundation -ENSP / FIOCRUZ), it was shown that plasma concentrations of the anti-malarial drug primaquine diphosphate in pregnant female DBA/2 mice were lower than levels found in non pregnant female mice. During pregnancy a delayed gastric emptying and/or an increased volume of distribution may result in lower drug plasma concentrations. Pregnancy-produced changes in the gastrointestinal transit may influence drug absorption. Depending on whether gastric emptying is accelerated or slowed and on the place where drug absorption takes place (stomach or intestines) absorption can be accelerated or slowed. Paracetamol, an analgesic and antipyretic drug, is absorbed almost exclusively in the intestines and is used to investigate the effects of treatment on the gastric emptying rate. Factors such as diet, age, pregnancy or the administration of drugs which accelerate (metoclopramide) or delay (morphine) gastric emptying influence the absorption of paracetamol. The aim of this study was to develop and standardize a methodology to investigate the effect of gastric emptying on the kinetics of drugs administered in small rodents. The methodology used in the analysis of plasma concentrations of paracetamol was High Performance Liquid Chromatography coupled to diode-array detector and visualization on ultraviolet range (HPLC-DAD-UV), using a Shimadzu Class-VP equipment. The animals used in this study were DBA/ 2 and Swiss mice, as well as Wistar rats treated with 50 mg.kg<sup>-1</sup> of paracetamol and/or 10 mg.kg<sup>-1</sup> metoclopramide or morphine sulfate. The development and validation of paracetamol analysis method in mice plasma was possible with the following parameters: ACE® 5 RP18 chromatographic column (250mm x 4.6 mm i.d., 5 µm particle size); mobile phase comprising ultrapure acidified water (pH 3.0) and HPLC grade acetonitrile (80:20); flow rate 1.0 ml.min<sup>-1</sup>; oven temperature at 50°C. The method proved to be selective for plasma paracetamol analysis and to be linear, precise, accurate and robust. Detection and quantification limits of paracetamol were 30 and 45 ng.mL<sup>-1</sup>, respectively. This assay for effects of treatments on gastric emptying was suitable to verify the acceleration and delay absorption of drugs. The pharmacokinetics of paracetamol administered by the oral route did not differ between pregnant and non-pregnant female rats a result that suggested that pregnancy does not affect gastric emptying time. Therefore, pregnancy-caused changes in gastric emptying time can be ruled out as a plausible explanation for the lower concentrations of primaquine in pregnant females when compared to concentrations recorded in non-pregnant animals. Possibly, pregnancy-induced alterations of other factors such as volume of distribution and/or drug metabolism (clearance) may account for this effect on primaquine kinetics noted in previous studies

Keywords: Pregnancy. Gastric emptying. Paracetamol. DBA/2 mice. Swiss mice. Wistar rats. HPLC-DAD.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 -	Fórmula estrutural do paracetamol (acetaminofeno).....	21
Figura 2 -	Fórmula estrutural da metoclopramida.....	23
Figura 3 -	Fórmula estrutural da morfina.....	24
Figura 4 -	Fórmula estrutural da primaquina.....	25
Figura 5 -	Equipamento CLAE-DAD-UV Nexera Shimadzu.....	36
Esquema 1 –	Desenvolvimento e validação de metodologia analítica para análise de paracetamol (PAR) no plasma. Desenvolvimento de metodologia analítica para análise de sulfato de morfina (MOR) e metoclopramida no plasma (MET).....	37
Figura 6 -	Cromatograma do paracetamol em água ( $28,57 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ) obtido por CLAE-DAD-UV na condição 3. Visualização em 246 nm.....	43
Figura 7 –	Espectro de absorção no ultravioleta do paracetamol obtido por CLAE-DAD-UV na condição 3.....	43
Figura 8 –	Cromatograma do paracetamol em extrato do plasma ( $7,14 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ) obtido por CLAE-DAD-UV na condição 3. Visualização em 246 nm...	44
Figura 9 –	Cromatograma do Sulfato de Morfina em água ( $14,28 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ) obtido por CLAE-DAD-UV na condição 3. Visualização em 246 nm..	45
Figura 10 –	Cromatograma da metoclopramida em extrato de plasma ( $2,86 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ) obtido por CLAE-DAD-UV na condição 3. Visualização em 246 nm. Destaque para o sinal da metoclopramida em 5,67 minutos.....	45
Figura 11 –	Cromatograma da metoclopramida em plasma ( $2,86 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ) obtido por CLAE-DAD-UV na condição 3. Visualização em 310 nm.....	45
Figura 12 –	Sobreposição de cromatogramas: sulfato de morfina (MOR) em água + metoclopramida (MET) em extrato de plasma + paracetamol (PAR) em extrato de plasma; Obtidos por CLAE-DAD-UV na condição 3. Visualização em 246nm (A). Expansão do cromatograma de 2,0 a 6,0 minutos (B).....	46
Esquema 2 –	Procedimento desenvolvido para extração do paracetamol em matriz biológica plasma .....	47

Figura 13 –	Cromatogramas obtidos por CLAE-DAD-UV para determinar a seletividade do método: A. Amostra branco – água; B. Amostra branco – extrato do plasma; C. Amostra de extrato de plasma fortificado com paracetamol (28,57 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ).....	49
Figura 14 –	Sobreposição dos sinais obtidos por CLAE-DAD-UV em amostra branco – água (rosa), branco extrato de plasma (marrom) e extrato de plasma fortificado com paracetamol - azul (28,57 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ).....	50
Figura 15 –	Curvas de calibração obtidas para quantificação do paracetamol, no intervalo de concentração de 0,10 a 28,57 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e em três dias diferentes.....	50
Figura 16 –	Médias das concentrações plasmáticas ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) do paracetamol por tempo após a administração por via oral de dose única de 50 $\text{mg.kg}^{-1}$ em camundongos DBA/2.....	55
Figura 17 -	Médias das concentrações plasmáticas ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) do paracetamol por tempo após a administração por via oral de dose única de 50 $\text{mg.kg}^{-1}$ , 15 minutos após os camundongos DBA/2 receberem 10 $\text{mg.kg}^{-1}$ de metoclopramida por via subcutânea.....	56
Figura 18 –	Médias das concentrações plasmáticas ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) do paracetamol por tempo após a administração por via oral de dose única de 50 $\text{mg.kg}^{-1}$ , 15 minutos após os camundongos DBA/2 receberem 10 $\text{mg.kg}^{-1}$ de morfina por via subcutânea.....	57
Figura 19 –	Médias das concentrações plasmáticas ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) do paracetamol por tempo após a administração por via oral de dose única de 50 $\text{mg.kg}^{-1}$ em camundongos Suíços.....	59
Figura 20 –	Médias das concentrações plasmáticas ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) do paracetamol por tempo após a administração por via oral de dose única de 50 $\text{mg.kg}^{-1}$ , 15 minutos após os camundongos Suíços receberem 10 $\text{mg.kg}^{-1}$ de metoclopramida por via subcutânea.....	60
Figura 21 –	Médias das concentrações plasmáticas ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) do paracetamol por tempo após a administração por via oral de dose única de 50 $\text{mg.kg}^{-1}$ , 15 minutos após os camundongos Suíços receberem 10 $\text{mg.kg}^{-1}$ de morfina por via subcutânea.....	61

Figura 22 –	Médias das concentrações plasmáticas ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) do paracetamol por tempo após a administração por via oral de dose única de $50 \text{ mg.kg}^{-1}$ de paracetamol em ratos Wistar fêmeas não grávidas.....	62
Figura 23 –	Médias das concentrações plasmáticas ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) do paracetamol por tempo, após a administração por via oral de dose única de $50 \text{ mg.kg}^{-1}$ , 15 minutos após os ratos Wistar fêmeas não grávidas receberem $10\text{mg.kg}^{-1}$ de morfina por via subcutânea.....	63
Figura 24 –	Médias das concentrações plasmáticas ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) do paracetamol por tempo, após a administração por via oral de dose única de $50 \text{ mg.kg}^{-1}$ em ratos Wistar fêmeas grávidas.....	64
Figura 25 -	Comparação das Médias das concentrações plasmáticas ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) do paracetamol por tempo, após a administração por via oral de dose única de $50 \text{ mg.kg}^{-1}$ em ratos fêmeas grávidas e não grávidas.....	65

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Parâmetros analíticos e variações para a avaliação da robustez do método cromatográfico de quantificação do paracetamol em plasma .....	40
Tabela 2 -	Resumo dos tratamentos dos animais.....	41
Tabela 3 -	Condições testadas para análise do paracetamol.....	42
Tabela 4 -	Avaliação da Precisão do método de análise do paracetamol.....	51
Tabela 5 -	Avaliação da Exatidão do método de análise do paracetamol.....	52
Tabela 6 -	Avaliação da recuperação do paracetamol em plasma de camundongo DBA/2.....	53
Tabela 7 -	Avaliação da recuperação do paracetamol em plasma de camundongo Suíço.....	53
Tabela 8 -	Avaliação da recuperação do paracetamol em plasma de rato Wistar.....	53
Tabela 9 -	Parâmetros testados para avaliar a robustez do método de análise do paracetamol em plasma (7,14 e 0,22 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ).....	54
Tabela 10 -	Concentrações plasmáticas médias do paracetamol ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) por tempo, após a administração por via oral de dose única de 50 $\text{mg.kg}^{-1}$ em camundongos DBA/2.....	56
Tabela 11 -	Concentrações plasmáticas médias do paracetamol ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) por tempo, após a administração por via oral de dose única de 50 $\text{mg.kg}^{-1}$ , 15 minutos após os camundongos DBA/2 receberem 10 $\text{mg.kg}^{-1}$ de metoclopramida por via subcutânea.....	57
Tabela 12 -	Concentrações plasmáticas médias do paracetamol ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) por tempo, após a administração por via oral de dose única de 50 $\text{mg.kg}^{-1}$ , 15 minutos após os camundongos DBA/2 receberem 10 $\text{mg.kg}^{-1}$ de morfina por via subcutânea.....	58
Tabela 13 -	Concentrações plasmáticas médias do paracetamol ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) por tempo, após a administração por via oral de dose única de 50 $\text{mg.kg}^{-1}$ , 15 minutos após os camundongos Suíços.....	59
Tabela 14 -	Concentrações plasmáticas médias do paracetamol ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) por tempo, após a administração por via oral de dose única de 50 $\text{mg.kg}^{-1}$ , 15 minutos após os camundongos Suíços receberem 10 $\text{mg.kg}^{-1}$ de metoclopramida por via subcutânea.....	60

Tabela 15 -	Concentrações plasmáticas médias do paracetamol ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) por tempo, após a administração por via oral de dose única de $50 \text{ mg.kg}^{-1}$ , 15 minutos após os camundongos Suíços receberem $10\text{mg.kg}^{-1}$ de morfina por via subcutânea.....	61
Tabela 16 -	Concentrações plasmáticas médias do paracetamol ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) por tempo, após a administração por via oral de dose única de $50 \text{ mg.kg}^{-1}$ , em ratos Wistar não grávidas.....	62
Tabela 17 -	Concentrações plasmáticas médias do paracetamol ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) por tempo, após a administração por via oral de dose única de $50 \text{ mg.kg}^{-1}$ , 15 minutos após os ratos Wistar fêmeas não grávidas receberem $10\text{mg.kg}^{-1}$ de morfina por via subcutânea.....	63
Tabela 18 -	Concentrações plasmáticas médias do paracetamol ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) por tempo, após a administração por via oral de dose única de $50 \text{ mg.kg}^{-1}$ em ratos Wistar fêmeas grávidas.....	65

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABS	Absorbância
ACN	Acetonitrila
ADME	Processos Farmacocinéticos: Absorção, Distribuição, Metabolização e Eliminação
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
C18	Sílica modificada com hidrocarbonetos linear C18, octadecilsilano
CECAL	Centro de Criação de Animais de Laboratório
CEUA	Comitê de Ética no Uso de Animais
CG	Cromatografia em Fase Gasosa
CL	Cromatografia em Fase Líquida
CLAE	Cromatografia em Fase Líquida de Alta Eficiência
C <sub>máx</sub>	Concentração Máxima
CMD	Concentração Média Determinada
CT	Concentração Teórica
CV%	Coefficiente de Variação Percentual
CYP	Citocromo
D2	Receptor de Dopamina
DAD	Detector por arranjo de diodos, do inglês, “ <i>Diodo Array Detector</i> ”
DP	Desvio Padrão
DPa	Desvio Padrão do intercepto com o eixo do Y
DPR	Desvio Padrão Relativo
ENSP	Escola Nacional de Saúde Pública
FDA	<i>Food And Drug Administration</i>
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
FM	Fase Móvel
GD21	Ratos fêmeas no vigésimo primeiro dia de gestação
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana, do inglês, “ <i>Human Immunodeficiency Virus</i> ”
HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Performance, do inglês, “ <i>High Performance Liquid Chromatography</i> ”
IC	Inclinação da curva

IM	Via Intramuscular
INMETRO	Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia
IUPAC	União Internacional de Química Pura e Aplicada, do inglês, “ <i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i> ”
IV	Via Intravenosa
LD	Limite de Detecção
Liq-Liq	Extração Líquido – Líquido
LQ	Limite de Quantificação
MD	Média
MET	Metoclopramida
MOR	Morfina
PAR	Paracetamol
PEG	Polietilenoglicol
p/v	Peso por Volume
rcf	Força centrífuga relativa
SC	Via subcutânea
SNC	Sistema Nervoso Central
SPE	Extração em Fase Sólida, do inglês, “ <i>Solid Phase Extration</i> ”
T <sub>1/2</sub>	Tempo de Meia Vida
tR	Tempo de Retenção
T <sub>máx</sub>	Tempo para atingir a concentração Máxima
UV	Ultravioleta
v.o.	Via Oral
v/v	Volume por Volume
ZnSO <sub>4</sub>	Sulfato de Zinco
5-HT <sub>4</sub>	5-hidroxitriptamina (serotonina)

## SUMÁRIO

1	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	17
2	<b>JUSTIFICATIVA E RELEVÂNCIA</b> .....	31
3	<b>OBJETIVOS</b> .....	32
4	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	33
4.1	<b>Reagentes</b> .....	33
4.2	<b>Materiais</b> .....	33
4.3	<b>Equipamentos</b> .....	33
4.4	<b>Animais</b> .....	34
4.5	<b>Avaliação das alterações da farmacocinética do paracetamol durante a gravidez</b> .....	34
4.6	<b>Padrão para desenvolvimento e validação do método</b> .....	34
4.7	<b>Soluções – Desenvolvimento e validação do método</b> .....	35
4.7.1	Solução estoque do paracetamol.....	35
4.7.2	Soluções de tratamento dos animais.....	35
4.8	<b>Amostras para quantificação dos fármacos</b> .....	35
4.9	<b>Desenvolvimento e validação do método analítico</b> .....	35
4.9.1	Desenvolvimento de metodologia de extração do paracetamol em plasma....	37
4.9.2	Validação da metodologia.....	38
4.10	<b>Estudos farmacocinéticos</b> .....	40
4.11	<b>Análise estatística</b> .....	41
5	<b>RESULTADOS</b> .....	42
5.1	<b>Desenvolvimento do método de análise</b> .....	42
5.1.1	Condições de análise do paracetamol.....	42
5.1.2	Método de extração.....	46
5.2	<b>Validação do método analítico - Paracetamol</b> .....	48
5.2.1	Seletividade.....	48
5.2.2	Linearidade.....	48
5.2.3	Precisão.....	51
5.2.4	Exatidão.....	51
5.2.5	Limite de Detecção.....	51
5.2.6	Limite de Quantificação.....	52

5.2.7	Recuperação.....	52
5.2.8	Robustez.....	54
5.3	<b>Esvaziamento Gástrico</b> .....	55
5.3.1	Perfil farmacocinético em camundongos DBA/2.....	55
5.3.2	Perfil farmacocinético em camundongos Suíços.....	58
5.3.3	Perfil farmacocinético em ratos Wistar não grávidas e grávidas.....	62
6	<b>DISCUSSÃO</b> .....	66
7	<b>CONCLUSÕES</b> .....	72
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	73

# 1 INTRODUÇÃO

## Concentração Plasmática de Fármacos

A concentração plasmática de fármacos é objeto de estudo da Farmacocinética, que se volta para a elucidação do movimento do fármaco no organismo após sua administração. A concentração plasmática é determinada a partir de quatro etapas, definidos pela abreviação ADME: (A) absorção (passagem de um fármaco do seu local de administração para a corrente sanguínea); (D) distribuição (do sangue para os tecidos); (M) metabolização ou biotransformação (conversão enzimática que altera a estrutura química de xenobióticos de modo que a sua excreção seja facilitada); (E) eliminação (*clearance*) (PEREIRA, 2007; DUARTE, 1994; RANG & DALE, 2007).

Alguns modelos cinéticos são propostos para determinar a concentração de fármacos no plasma de acordo com sua distribuição e eliminação. Modelos compartimentais e modelos de base fisiológica são os mais explorados (PALLASCH, 1988; LEITÃO *et al*, 2005).

Os modelos compartimentais ilustram, de forma simples, o modo pelo qual os fármacos são distribuídos no corpo humano. São baseados na relação entre os diferentes “compartimentos” do organismo. Segundo esse modelo, os fármacos são distribuídos por todo o corpo rapidamente e de maneira homogênea. Além disso, obedecem em princípio a uma cinética de primeira ordem, isto é, a velocidade de eliminação diminui com a redução da quantidade do fármaco no organismo (PALLASCH, 1988; LEITÃO *et al*, 2005; BASSINGTHWAIGHTE *et al* 2012). Os modelos compartimentais tornam possível determinar a concentração do fármaco disponível em função do tempo e com isso definir melhores esquemas posológicos e prever os seus efeitos em diferentes tecidos. Modelos de um, dois ou três compartimentos são descritos BASSINGTHWAIGHTE *et al* 2012; NETO, 2012):

- (a) O modelo de um compartimento é o mais simples e considera apenas a concentração do fármaco em um compartimento central, isto é, no plasma. Esse modelo sugere que há um equilíbrio rapidamente entre o sangue e todos os tecidos do organismo (PALLASCH, 1988; LEITÃO *et al*, 2005; NETO,

2012);

- (b) O modelo de dois compartimentos é o mais realista para quase todos os fármacos. É composto por um compartimento central constituído pelo sistema circulatório e órgãos bastante irrigados, tais como, fígado e rins e outro compartimento “periférico” que recebe menor fluxo sanguíneo, como, por exemplo, tecidos adiposos (PALLASCH, 1988; BASSINGTHWAIGHTE *et al* 2012; NETO, 2012). O fármaco passa primeiramente pelo compartimento central devido o maior fluxo sanguíneo nesse local e posteriormente migra para o compartimento periférico (PALLASCH, 1988; BASSINGTHWAIGHTE *et al* 2012);
- (c) O modelo de três compartimentos (ou multicompartimental) é mais preciso, porém, difícil de ser compreendido. Ele descreve o destino do fármaco após sua administração, passando por um compartimento central (plasma), um compartimento que representa órgãos e tecidos altamente irrigados por sangue e um outro compartimento que representa os órgãos e tecidos com pouca perfusão sanguínea (CASCONI *et al*, 2013).

Os modelos de base fisiológica levam em consideração as estruturais anatômicas reais e fisiológicas dos órgãos e as características físico-químicas dos diferentes fármacos. Por exemplo, consideram o fluxo sanguíneo (arterial que recebe e venoso que expelle) do compartimento e a massas do órgão que recebe o fármaco (PALLASCH, 1988; LEITÃO *et al*, 2005; BASSINGTHWAIGHTE *et al* 2012; NETO, 2012).

O efeito de fármacos no local de ação desejado (Farmacodinâmica) e as reações adversas aos medicamentos são definidos por concentrações plasmáticas de uma janela terapêutica, sendo algumas vezes necessário ajustar doses para compensar a variabilidade de cada indivíduo. Esse ajuste racional dos esquemas posológicos se dá com o conhecimento da Farmacocinética. Fatores que alteram a concentração plasmática de algumas substâncias e, por conseguinte, sua cinética, como patologias, gravidez ou idade avançada, podem gerar impactos sobre a segurança e eficácia de um medicamento, sobretudo, para aqueles fármacos cujos efeitos colaterais podem ocorrer mesmo em doses baixas e próximas as da faixa terapêutica. Portanto, o entendimento da cinética de fármacos também é fundamental para o sucesso da terapia medicamentosa

(DUARTE, 1994; STORPIRTIS et al, 2011).

Especial atenção em relação a concentração plasmática de fármacos deve ser dispensada durante a gravidez, uma vez que alterações anatômicas e fisiológicas ocorrem em quase todos os órgãos. Essas mudanças podem impactar de forma significativa na cinética de diversos grupos de fármacos usados por mulheres grávidas. O organismo de uma gestante sofre diversas adaptações, tais como, aumento do tecido adiposo e do percentual de água corporal, diminuição de proteínas plasmáticas, aumento do volume sanguíneo, do débito cardíaco e do fluxo sanguíneo para os rins e sistema útero-placentário, de forma a sustentar a gestante e o feto em desenvolvimento, por toda a gravidez. Outras alterações fisiológicas nos sistemas cardiorrespiratórios, renal, endócrino, hematológico e gastrointestinal são comuns, incluindo, retardo no esvaziamento gástrico e na motilidade gastrointestinal, além de mudanças na atividade de enzimas hepáticas (CONSTANTINE, 2014; SANGHAVI *et al*, 2014; CHEUNG *et al*, 2013; CHANDRA *et al*, 2012; ZIELINSKI *et al*, 2015).

Em um estudo recente, realizado por Carmo (2015), no Laboratório de Toxicologia Ambiental do Departamento de Biologia da Escola Nacional de Saúde Pública da Fundação Oswaldo Cruz (ENSP/FIOCRUZ), foi demonstrado em camundongos fêmeas grávidas DBA/2 que a concentração plasmática do antimalárico difosfato de primaquina era menor em comparação com camundongos fêmeas não grávidas. Foi demonstrado, também, que a infecção de grávidas pelo *Plasmodium berghei* ANKA levou o grupo experimental ao óbito, mesmo com tratamento com difosfato de primaquina (CARMO, 2015). Alterações na concentração plasmática na gestação também foram observados em estudos publicados na literatura com outros fármacos antimaláricos. Segundo estudos, a diminuição na concentração plasmática de fármacos na gestante pode estar relacionada a um retardo no esvaziamento gástrico e/ou um aumento no volume de distribuição (WILBY & ENSOM, 2011; PAVEK et al, 2009). Os mecanismos pelos quais a gravidez diminuiu a concentração plasmática de difosfato de primaquina não foram totalmente elucidados pelo trabalho de Carmo (2015). A hipótese aventada é *que um atraso na absorção oral da primaquina tenha sido ocasionado por retardo no esvaziamento gástrico, o que levou a menores níveis plasmáticos observados durante a gestação de camundongos DBA/2* (CARMO, 2015). Assim, novos estudos sobre o impacto da gestação na concentração plasmática de agentes terapêuticos para o tratamento da malária (objeto de estudo do grupo), em especial ao difosfato de primaquina, devem ser efetuados,

principalmente, focados no esvaziamento gástrico, já que drogas antimaláricas são administradas por via oral e algumas vezes por longos períodos. A compreensão desses mecanismos poderá contribuir para a garantia da eficácia e segurança dos esquemas posológicos num grupo de indivíduos bastante sensível, ou seja, em grávidas.

### **Esvaziamento gástrico**

O esvaziamento gástrico é um processo complexo e depende da individualidade de cada pessoa quanto suas capacidades absorptiva e digestiva. O objetivo do esvaziamento gástrico é permitir a passagem do conteúdo alimentar do estômago para o duodeno (HIRATA *et al*, 2007), dessa forma, pode desempenhar um papel importante na biodisponibilidade e no perfil farmacocinético de formulações orais.

Alterações no trânsito normal do trato gastrointestinal podem influenciar diretamente a absorção de fármacos, que poderão ser absorvidos mais rapidamente ou mais lentamente. Sabe-se, por exemplo, que a administração de medicamentos por via oral concomitantes à refeições pode retardar a absorção de fármacos e, por consequência, interferir no sucesso terapêutico. Dessa forma, é importante determinar em que situações, patológicas ou não, existe alteração no esvaziamento gástrico (GOINEAU *et al*, 2015; SHAUGHNESSY *et al*, 2013).

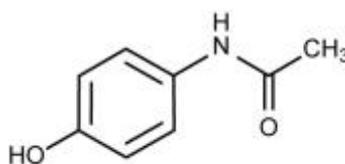
São conhecidas diferentes técnicas para avaliar o esvaziamento gástrico. Em humanos, a técnica de cintilografia gástrica feita após ingestão de uma refeição marcada com radioisótopos é bem estabelecida e considerada “padrão ouro”. Em roedores, técnicas usando o vermelho de fenol ou polietilenoglicol (PEG) marcados com radioisótopos são descritas, porém, possuem limitações como produzir dados em apenas um tempo e manipulação de radioisótopos, o que requer condição laboratorial especial (GOINEAU *et al*, 2015). Outra técnica mais simples e empregada para avaliar as alterações no trânsito gastrointestinal é uso de carvão ativo vegetal. Os efeitos no esvaziamento gástrico são determinados a partir da comparação do percurso feito pela refeição com o carvão ativo vegetal com ou sem a administração dos fármacos em estudo. Esta técnica é simples e de fácil execução, porém, produz resultados com grande variação, já que o conteúdo intestinal deve ser avaliado em diferentes porções do intestino (SHAUGHNESSY *et al*, 2013). Outra técnica para avaliação do esvaziamento gástrico em diferentes tempos tem como base o monitoramento dos níveis plasmáticos de paracetamol

(Figura 1) por Cromatografia em Fase Líquida de Alta Eficiência (CLAE). Esse fármaco é usado para avaliação do esvaziamento gástrico, pois é absorvido exclusivamente no intestino (GOINEAU *et al*, 2015).

## Paracetamol

O paracetamol (Figura 1) (MORETTO & MASTELARO, 2013; ANVISA, 2010), denominação comum para o *N*-(4-hidroxifenil)acetamida (IUPAC), é um fármaco analgésico, utilizado em adultos e crianças, amplamente prescrito para o alívio de diversos tipos de dores, tais como de cabeça, de dente, musculares, dores associadas a artrites, além de cólicas menstruais. Além do efeito analgésico, o paracetamol possui também efeito antipirético, reduzindo a febre por atuar no centro regulador da temperatura no Sistema Nervoso Central (SNC) (AMERICAN SOCIETY OF HEALTH-SYSTEM PHARMACISTS, 2014; ANVISA, 2009). Também denominado como *N*-acetil-*p*-aminofenol ou paracetamol, essa substância faz parte da composição química de diversos medicamentos de venda livre, sendo comercializado puro ou em associação a outros ativos em medicamentos (FDA, 2016).

Figura 1 – Fórmula estrutural do paracetamol (acetaminofeno)



Fonte: Farmacopeia Brasileira 5ª Ed, 2010

O paracetamol segue modelo farmacocinético bicompartimental e seus efeitos ocorrem rapidamente, de 15 a 30 minutos após a administração oral, e mantem-se por um período de 4 a 6 horas, com tempo de meia-vida de 1,5 a 3 horas. É metabolizado, principalmente, no fígado e engloba as vias de oxidação por meio do complexo citocromo P450 e por conjugação com ácido glucorônico ou sulfatação. A sua excreção é feita, em maior parte, sob forma de conjugados na urina. Apenas uma pequena fração (3,5%) é eliminada de forma inalterada pelos rins (TYLENOL DC<sup>®</sup>, 2016).

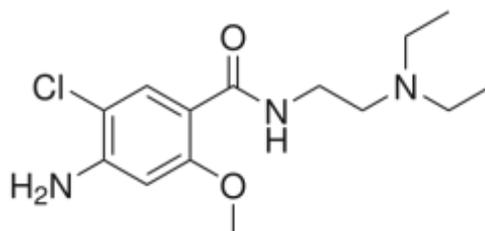
O paracetamol é pouquíssimo absorvido no estômago. Sua absorção se dá, principalmente, por difusão passiva no intestino delgado. A determinação da quantidade de paracetamol absorvido ocorre através da taxa de esvaziamento gástrico e, assim, fatores tais como, alimentação, distúrbios no trato gastrointestinal, idade, gravidez, fármacos que promovem aceleração (metoclopramida) ou retardo (morfina) na motilidade gastrointestinal influenciam em sua absorção (RAFFA *et al*, 2014).

O uso do paracetamol em doses terapêuticas é seguro, porém a superdosagem pode prolongar a meia vida do fármaco e causar danos graves ao fígado. A necrose hepática é uma possível consequência do uso abusivo do paracetamol e, se não tratada, pode levar a morte (RAFFA *et al*, 2014; HAYWARD *et al*, 2016; PRESCOTT, 1980).

### Metoclopramida

A metoclopramida (MORETTO & MASTELARO, 2013) ou cloridrato de (*N*-dietilaminoetil)-2-metoxi-4-amino-5-cloro-benzamida (Figura 2) é uma droga pró-cinética, ou seja, capaz de melhorar a motilidade e o trânsito de conteúdo do trato gastrointestinal, geralmente, ampliando e controlando a contração muscular na região. Além de ser indicada para o tratamento de náuseas e vômitos, é também usada para facilitar procedimentos radiológicos do trato gastrointestinal (ACOSTA & CAMILERI, 2015; VAN DER MEER *et al*, 2014). A metoclopramida é metabolizada pelas enzimas do citocromo P450, sendo a CYP2D6 a que possui papel chave nesse processo. A metoclopramida possui mecanismo de ação dupla, como antagonista do receptor D2 e agonista de receptor 5-HT4, estimulando receptores colinérgicos e acelerando o esvaziamento gástrico. A sua excreção é feita, principalmente, pela urina e seu tempo de meia vida é de aproximadamente 3 horas. As formas farmacêuticas para metoclopramida comerciais puras ou em associação com outros fármacos disponíveis também são de venda livre (oral, sublingual, intranasal, subcutânea e intravenosa) (ACOSTA & CAMILERI, 2015).

Figura 2 - Fórmula estrutural da metoclopramida



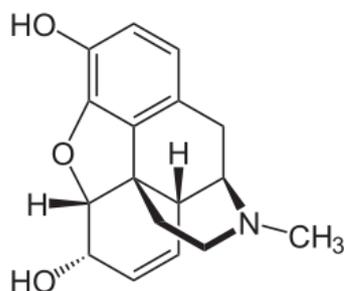
Fonte: Farmacopeia Brasileira 5<sup>o</sup> Ed, 2010

## Morfina

A morfina (MORETTO E MASTELARO, 2013) (Figura 3) é um analgésico potente, da classe dos opioides, usada no tratamento da dor intensa, seja ela aguda ou crônica. Pode ser administrada por diferentes vias, tais como, intravenosa (IV), intramuscular (IM), subcutânea (SC), retal ou oral; disponível em formulações de liberação imediata ou controlada (ALTAMIMI *et al*, 2015). Além da ação analgésica também pode produzir euforia, hipotensão, depressão respiratória, redução da motilidade gástrica, constipação (DEVILLIERS *et al*, 2013), náuseas e vômitos (CHEN *et al*, 2013), miose (MEISSNER *et al*, 2013) e supressão da tosse (DICKINSON *et al*, 2014). A constipação é um efeito inevitável com o uso de analgésicos opioides, pois diminuem a pressão do esfíncter esofágico e a atividade de propulsão relacionada as contrações musculares, retardando o esvaziamento gástrico de líquidos e sólidos em humanos (MILNE *et al*, 1996).

O processo de metabolização da morfina ocorre, principalmente, no fígado, onde são formados conjugados com o ácido glucurônico. Nessa etapa, a morfina sofre um extenso efeito de primeira passagem. Cerca de 30 a 90 minutos após a administração oral, os níveis plasmáticos máximos são alcançados, porém em baixas concentrações. Após administração intramuscular (IM) ou subcutânea (SC), os níveis máximos de morfina encontrados no plasma são obtidos em cerca de 15 a 20 minutos (GLARE & WALSH, 1991). O tempo de meia vida é de 2 a 3 horas e a maior parte é eliminada pelos rins, sendo que apenas uma pequena fração (cerca de 10%) é eliminada por via biliar (DIMORF<sup>®</sup>, 2016).

Figura 3 - Fórmula estrutural da morfina



Fonte: Farmacopeia Brasileira 5ª Ed, 2010

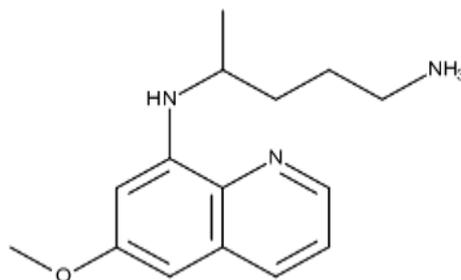
### Primaquina

A primaquina é um fármaco 8-aminoquinolínico usado no tratamento da malária e produzido pela primeira vez nos Estados Unidos na década de 40. Em 1952, a *Food and Drug Administration* (FDA), aprovou o fármaco para a cura radical da malária causada pelos *Plasmodium vivax* e *Plasmodium ovale*. Esse fármaco possui também ação de combate aos gametócitos maduros de todos os plasmódios, incluindo as cepas resistentes a múltiplas drogas (*P. falciparum*). Por ser um pró-fármaco, a eficiência da primaquina se dá através da formação de metabólitos ativos. Em humanos, a enzima CYP2D6 exerce função importante na depuração e metabolização da primaquina (CARMO, 2015).

A primaquina é um forte indutor de meta-hemoglobinemia, portanto pacientes com deficiência da enzima glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD) são mais susceptíveis a anemia hemolítica e meta-hemoglobinemia (acúmulo de meta-hemoglobina no sangue causando hipóxia nos tecidos). A primaquina pode causar hemólise na mãe e no feto, devido sua capacidade de atravessar a barreira transplacentária, portanto, seu uso é contraindicado em mulheres grávidas.

Após administração oral, a primaquina é rapidamente absorvida pelo trato gastrointestinal e distribuída pelos tecidos. Sua meia-vida de eliminação é aproximadamente 7 horas em humanos. O principal metabólito formado é a carboxiprimaquina (CARMO, 2015).

Figura 4 - Fórmula estrutural da primaquina



Fonte: Carmo, 2015.

### Desenvolvimento e Validação de Método Analítico

O desenvolvimento de um método analítico é o primeiro passo quando se deseja realizar análises qualitativas ou quantitativas. Um método analítico ao ser desenvolvido deve passar pelo processo de validação, antes de sua aplicação na rotina laboratorial, de forma a assegurar que os resultados gerados apresentem confiança, reprodutibilidade, sensibilidade e seletividade para determinação da (s) substância (s). Durante o desenvolvimento do método é importante definir a aplicação, objetivo da validação e determinar quais parâmetros e critérios de aceitação serão utilizados, os quais dependem dos protocolos de validação que variam em função da amostra. Por exemplo, existem protocolos que se aplicam às amostras químicas e os que se aplicam às amostras biológicas. Geralmente, os protocolos que se destinam às amostras biológicas são mais rigorosos (ANVISA, 2003; INMETRO, 2007).

A validação deve garantir, por meio de análises experimentais, que o método apresente resultados confiáveis e atenda às exigências das aplicações analíticas. Para isso, deve preencher requisitos de especificidade, seletividade, linearidade, precisão, exatidão, limite de detecção, limite de quantificação e robustez (ANVISA, 2003), definidos a seguir:

*Seletividade* - A seletividade de um método analítico é a capacidade de identificação de um analito de forma inequívoca, mesmo na presença de outros componentes na amostra. Deve-se garantir por análise comparativa com padrão ou por análises com detectores que demonstrem a

identidade inequívoca (como espectrometria de massas em modo *tandem*) que o sinal de resposta seja unicamente do analito de interesse e não de outras substâncias da matriz ou metabólitos. O método não deve identificar o analito quando o mesmo estiver ausente na matriz e deve ser capaz de identificá-lo quando for adicionado. A seletividade é o primeiro parâmetro a ser avaliado para desenvolvimento e validação de um método analítico (ANVISA, 2003; INMETRO, 2007).

*Linearidade* - Um método analítico apresenta linearidade ao ser capaz de demonstrar que os resultados obtidos são diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra, dentro de um intervalo especificado de concentração. Em uma análise, um mínimo de 5 (cinco) concentrações diferentes são recomendadas para determinar a linearidade, sendo que a concentração média do analito deve estar entre 80% e 120% da concentração que compõe a curva analítica. O coeficiente de correlação linear deve ser igual ou superior a 0,98 e os pontos que formam a curva e suas réplicas devem ter distribuição homocedástica. A linearidade deve ser avaliada em pelo menos 3 dias diferentes quando se deseja validar um método. Assim, será obtida uma equação de regressão linear (concentração x resposta do detector) com as respectivas médias e desvio-padrão do coeficiente angular e linear (a e b, respectivamente). A curva analítica gerada a partir da linearidade será utilizada para quantificação das amostras (ANVISA, 2003; INMETRO, 2007).

*Precisão* - A precisão é a observação de resultados próximos obtidos em uma série de medidas para uma mesma amostra. Pode ser determinada em concordância entre resultados dentro de um curto intervalo de tempo, usando a mesma metodologia, o mesmo analista e mesmo equipamento (repetibilidade/ precisão intracorrída). A precisão pode ser, também, de forma intermediária (ou precisão intercorrídas), na qual a concordância entre os resultados do mesmo laboratório é obtida em dias diferentes, com operadores diferentes e/ou instrumentação diferente. Por fim, a precisão pode apresentar condições de reprodutibilidade (ou precisão interlaboratorial), onde os resultados são obtidos para uma mesma amostra usando a mesma metodologia em laboratórios diferentes, com diferentes analistas e diferentes equipamentos (ANVISA, 2003; INMETRO, 2007).

A precisão de um método analítico é expressa como desvio padrão relativo (DPR) ou

coeficiente de variação (CV%), de acordo com a fórmula:

$$\text{DPR} = (\text{DP}/\text{CMD}) \times 100$$

Onde DP é definido como desvio padrão e CMD como concentração média determinada. Valores acima de 15% não são aceitos, exceto no limite de quantificação, onde se aceita até 20% (ANVISA, 2003; INMETRO, 2007).

*Exatidão* - A exatidão de um método analítico determina o grau de concordância entre os resultados encontrados pelo método em estudo e o valor aceito como referência ou verdadeiro. A exatidão deve ser determinada, geralmente, empregando-se 3 (três) concentrações, baixa, média e alta e a avaliação é realizada de forma “intra-dia” e “inter-dia” (ANVISA, 2003; INMETRO, 2007). A exatidão é dada pela relação entre a concentração média determinada experimentalmente e a concentração teórica correspondente e pode ser expressa pela fórmula:

$$\text{Exatidão} = (\text{CMDE} / \text{CT}) \times 100$$

Onde, CMDE é igual a concentração média determinada experimentalmente e CT é a concentração teórica esperada. Valores acima de 15% não são aceitos, exceto no limite de quantificação, onde se aceita até 20% (ANVISA, 2003; INMETRO, 2007).

*Limite de detecção* - O limite de detecção (LD) corresponde à menor quantidade do analito presente na amostra que pode ser detectado, porém, não quantificado pelo procedimento analítico. A determinação do limite de detecção pode ser realizada por ensaios de soluções de concentrações conhecidas e decrescentes da substância (diluições sucessivas) de interesse até que o sinal seja 3 vezes maior do que o ruído da linha de base. Uma outra forma de se calcular o limite de detecção é a partir da curva analítica, de acordo com a fórmula abaixo, no qual o desvio-padrão do intercepto com o eixo do Y é descrito como DP<sub>a</sub> e IC é a inclinação de calibração. São necessárias, no mínimo, 3 curvas analíticas, englobando as concentrações do fármaco próximas ao provável limite de detecção (ANVISA, 2003; INMETRO, 2007).

$$LD = Dpa \times 3 / IC$$

Apesar da possibilidade de se avaliar o limite de detecção pela fórmula 3, o método escolhido para este estudo foi o da diluição sucessiva, a partir da solução estoque de paracetamol a  $200 \mu\text{g.mL}^{-1}$  (vide Experimental).

*Limite de quantificação* - O limite de quantificação (LQ) é a menor quantidade do analito em uma amostra que pode ser determinada quantitativamente com precisão e exatidão aceitáveis. Desvios inferiores ou iguais a 20% são aceitos. A determinação do limite de quantificação pode ser realizada por ensaios de soluções de concentrações conhecidas e decrescentes da substância (diluições sucessivas) de interesse até que o sinal seja 10 vezes maior do que o ruído da linha de base. O limite de quantificação também pode ser obtido pela fórmula abaixo, a partir de três curvas analíticas:

$$LQ = Dpa \times 10 / IC$$

Onde o desvio-padrão do intercepto com o eixo do Y é representado por DPa e a inclinação da curva de calibração por IC (ANVISA, 2003; INMETRO, 2007).

Assim como para o limite de detecção, o limite de quantificação foi determinado pela técnica de diluição sucessiva, a partir da solução estoque de paracetamol a  $200 \mu\text{g.mL}^{-1}$ .

*Recuperação* - A recuperação avalia a eficiência do processo de extração de um método analítico. É expressa como a porcentagem da quantidade conhecida de um analito, obtida pela comparação de resultados analíticos de amostras branco fortificadas com soluções de concentrações conhecidas do padrão de interesse e submetidas ao procedimento de extração, com os resultados analíticos de soluções padrão não extraídas. Admite-se recuperação entre 85% e 115%, desde que seja exata e precisa (ANVISA, 2003; INMETRO, 2007).

*Robustez* - A robustez de um método analítico é indicativo de confiança durante o uso normal do instrumento e das condições de análise. A robustez mede a capacidade do sistema de análise de resistir a pequenas e deliberadas variações dos parâmetros analíticos estipulados. Alguns parâmetros que podem resultar na variação na resposta do método analítico

desenvolvido em Cromatografia em Fase Líquida de Alta Eficiência (CLAE) e que podem ser avaliados na determinação da robustez incluem variação do pH da fase móvel, temperatura, diferentes fabricantes de solventes, variação na composição da fase móvel, fluxo da fase móvel, entre outros (ANVISA, 2003; INMETRO, 2007).

#### Determinação analítica do paracetamol

Diversos métodos analíticos são descritos na literatura para determinação de paracetamol em matrizes biológicas ou em amostras de medicamentos, como por exemplo, técnicas de quimioluminescência ou espectrofotometria (SEBBEN *et al*, 2010; SEQUINEL, 2008, BOSCH *et al*, 2006). Dentre as técnicas de separação, a Cromatografia em Fase Líquida de Alta Eficiência (CLAE) é amplamente empregada na análise de paracetamol (CALINESCU *et al*, 2012; ATTIMARAD, 2011; ALTUN, 2002; ACHEAMPONG *et al*, 2015).

#### Cromatografia em Fase Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

A cromatografia é uma das principais técnicas de separação e tem sido empregada em diversas áreas, como nas indústrias química e farmacêutica, em laboratórios de pesquisa em saúde, toxicologia e em análises ambientais (NOGUEIRA *et al*, 2011). Nas últimas décadas, a cromatografia em fase líquida (CL) teve avanços importantes, e com a automatização da técnica é possível separar de forma eficiente e com alta resolução constituintes de misturas complexas, tais como fluídos biológicos e produtos naturais (NOGUEIRA *et al*, 2011; LANÇAS, 2009).

O princípio básico de separação por CL é a migração diferencial de substâncias de uma mistura através de uma fase móvel líquida e uma fase estacionária sólida ou líquida. Essa migração diferencial é possível devido às diferentes características físico-químicas das substâncias. No início do desenvolvimento da CL todo o sistema de separação era manual, ou seja, desde a injeção da amostra no sistema até a eluição, portanto, as separações eram pouco eficientes e de difícil reprodução. A sofisticação do sistema de CL permitiu que o analito de interesse fosse introduzido automaticamente no sistema e o bombeamento contínuo de fase móvel permitiu melhores separações e com reprodutibilidade. Diferentes colunas surgiram o

que permitiu à CL maior versatilidade para realizar as separações. Colunas pequenas (medindo centímetros), de pequeno diâmetro interno e empacotadas com materiais feitos de partículas pequenas e regulares possibilitaram o desenvolvimento da cromatografia em fase líquida de alta eficiência (CLAE). A CLAE é um sistema automatizado e que trabalha com elevada pressão. Ao fim da coluna cromatográfica tem-se acoplado um detector responsável por gerar um sinal que é processado por um computador. A representação da intensidade desse sinal ao longo do tempo constitui um cromatograma. A concentração da amostra pode ser determinada a partir da integração da área do sinal. As análises por CLAE são voltadas para substâncias termicamente instáveis ou não voláteis, que não podem ser analisadas por equipamentos que trabalham com a cromatografia em fase gasosa (CG). A utilização de colunas pequenas e altamente eficientes, empacotadas com materiais resistentes a passagem da fase móvel (FM) que é impulsionada por bombas de altas pressões e conectadas a detectores especiais, aliados a programas de computadores, permitem a separação e a quantificação de substâncias presentes em amostras com concentrações muito baixas (até picogramas em se considerando um detector de massas), em um curto período de tempo, com alta resolução, eficiência e sensibilidade (NOGUEIRA *et al.*, 2011; LANÇAS, 2009; NETO, 2011; CEFET, 2016).

Para avaliar o efeito do esvaziamento gástrico na concentração plasmática do paracetamol foi necessário desenvolver e validar um método de análise, utilizando um pequeno volume de amostra, pois os experimentos foram conduzidos em pequenos roedores (camundongos Suíços e DBA/2; e ratos Wistar). De acordo com as condições disponíveis no laboratório, o método foi desenvolvido com a técnica CLAE acoplada a detector de ultravioleta em rede de diodos (DAD-UV). Os procedimentos de extração do paracetamol do plasma foram simples, tendo em mente custo baixo e bom rendimento, além de alta seletividade e alta sensibilidade, em um período curto de análise. A técnica de extração do paracetamol por precipitação das proteínas do plasma e solubilização do fármaco em acetonitrila com posterior análise por CLAE-DAD-UV demonstrou possuir todos os requisitos necessários para sua validação, conforme apresentado e discutido nos Resultados.

## 2 JUSTIFICATIVA E RELEVÂNCIA

Alterações na concentração plasmática de um fármaco podem impactar na sua segurança e eficácia, binômio altamente relevante em Saúde Pública. Um fármaco com eficácia, porém sem segurança pode colocar em risco a saúde de quem o usa ou de suas gerações, como no caso da talidomida, fármaco utilizado no passado para tratamento de enjoo de mulheres grávidas que causou malformação em fetos (efeito teratogênico). Em casos mais recentes, drogas antivirais disponibilizadas no final da Década de 80 para tratamento de pacientes com Síndrome de Imunodeficiência Adquirida, causada pelos retrovírus HIV, foram colocadas no mercado mesmo sabendo-se que eram neurotóxicas, nefrotóxicas e hepatotóxicas. Portanto, esforços não devem ser medidos para avaliar a segurança e a eficácia de fármacos recém-descobertos ou aqueles que já estão no mercado, bem como, avaliar se alterações fisiopatológicas podem produzir alterações na farmacocinética desses fármacos.

Em 2015, Carmo (Laboratório de Toxicologia Ambiental/ ENSP/FIOCRUZ) demonstrou que camundongos fêmeas grávidas apresentavam uma menor concentração plasmática do antimalárico difosfato de primaquina quando comparadas com camundongos fêmeas não grávidas. O retardo no esvaziamento gástrico pode atrasar a absorção da primaquina e com isso, reduzir os níveis do fármaco no plasma de grávidas. Esta hipótese não pôde ser esclarecida. Assim, a validação de um método analítico para estudo de alterações na concentração plasmática de fármacos em função do esvaziamento gástrico é extremamente relevante para responder esta questão e norteará futuros trabalhos científicos do Laboratório de Toxicologia Ambiental. A escolha do paracetamol como fármaco de estudo foi devido a sua absorção ocorrer quase que exclusivamente no intestino e, com isso, alterações na taxa de esvaziamento gástrico, podem impactar na sua absorção. A técnica de CLAE-DAD-UV foi adotada devido o laboratório dispor de um equipamento novo e com excelentes especificações que permitem a separação e quantificação eficiente e rápida do paracetamol e a identificação da metoclopramida e morfina (agentes modificadores do trânsito intestinal). O desenvolvimento e validação de um método analítico para estudo do esvaziamento gástrico permite uma melhor compreensão do efeito da gestação na concentração plasmática de agentes terapêuticos antimaláricos (objeto de estudo do grupo) e poderá ser usado em estudos futuros com fármacos de origem natural ou sintético.

### **3 OBJETIVOS**

#### **Objetivo Geral**

Desenvolver e padronizar uma metodologia para investigar o efeito do esvaziamento gástrico sobre a cinética de fármacos administrados em camundongos e ratos.

#### **Objetivos Específicos**

1. Desenvolver e validar um método para quantificação do paracetamol em plasma de camundongos e ratos por CLAE-DAD-UV;
2. Avaliar o efeito do esvaziamento gástrico sobre a farmacocinética do paracetamol em camundongos DBA/2 e camundongos Suíços;
3. Avaliar o efeito do esvaziamento gástrico durante a gravidez sobre a farmacocinética do paracetamol em ratos Wistar;

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Reagentes

- ✓ Acetonitrila *gradient grade* para cromatografia líquida (Lichrosolv®);
- ✓ Acetonitrila grau espectroscópico HPLC/SPECTRO (Tedia®);
- ✓ Ácido acético glacial P.A. (Vetec®);
- ✓ Água ultrapura do tipo 1 (Milliq-Millipore®);
- ✓ Heparina sódica 5.0000 U.I / mL, Hipolabor®;
- ✓ Sulfato de zinco heptahidratado (Merck®);

### 4.2 Materiais

- ✓ Agulha de gavagem para camundongo em aço inox curvo e com esfera;
- ✓ Agulha hipodérmica 0,45 x 13 mm;
- ✓ Agulha hipodérmica 0,70 x 25 mm;
- ✓ Lâmina para microscópio fosca lapidada (Precision®);
- ✓ Membrana para filtração em PTFE 0,45 µm (Millipore®);
- ✓ Seringa de insulina 100 U, 1 mL;
- ✓ Seringa de tuberculina 1 mL;
- ✓ Coluna cromatográfica ACE5 C18 (250 mm x 4,6 mm i.d., 5 µm) (ACE®).

### 4.3 Equipamentos

- ✓ Agitador de tubos do tipo vortex, modelo AP56 (Phoenix®);
- ✓ Balança analítica modelo AA-200 (Denver®);
- ✓ Balança serie *extend* modelo ED822 (Sartorius®);
- ✓ Bomba de vácuo (Millipore®);
- ✓ Centrífuga modelo 5418 (Eppendorf®);
- ✓ Cromatógrafo de fase líquida acoplado ao detector de Ultravioleta com Rede de Diodos - CLAE-DAD Nexera XR (Shimadzu®);
- ✓ Lavadora ultrassônica modelo USC 1400 (Unique®);
- ✓ Potenciômetro modelo Basic (Denver®).

#### 4.4 Animais

Os animais utilizados nos experimentos foram camundongos Suíços e DBA/2, machos e fêmeas e ratos Wistar, fêmeas, com idades entre oito e treze semanas, obtidos do Centro de Criação de Animais de Laboratório (CECAL) da Fundação Oswaldo Cruz. Os animais foram mantidos em gaiolas ( $n = 5$ ), em condições padrão de temperatura ( $22 \pm 2^\circ\text{C}$ ), umidade (aproximadamente 70%) e ciclo claro/escuro de 12 horas, com acesso *ad libitum* à água filtrada e ração (Nuvital®, Nuvilab, Curitiba, PR, Brasil). O protocolo experimental foi submetido e aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da FIOCRUZ com o número de aprovação P-84/ 10-7.

#### 4.5 Avaliação das alterações da farmacocinética do paracetamol durante a gravidez

Para obtenção das fêmeas grávidas, os ratos fêmeas ( $n = 2$ ) com idade entre 8 a 10 semanas foram alojados na mesma gaiola com ratos machos ( $n = 1$ ), por um período de até 3 h. Após este período, as fêmeas foram examinadas para confirmação da cópula pela presença de “*plug*” ou massa de espermatozoides retida no canal vaginal e visualização do lavado vaginal sob microscópio para verificação da presença de espermatozoides. As fêmeas grávidas foram separadas e a gestação acompanhada nos dias subsequentes. O dia da cópula foi considerado o dia zero (0) da gestação. Para cada fêmea gestante foi separada uma fêmea controle não-grávida. O procedimento de acasalamento foi repetido diariamente até a obtenção das 6 fêmeas grávidas que foram incluídas neste estudo.

A gestação foi acompanhada até o 21º dia, quando a fêmea grávida e respectivo controle foram tratados com a paracetamol. Durante este período, foi observado o estado geral dos animais e o ganho de peso (grávidas e controles).

#### 4.6 Padrão para Desenvolvimento e validação do método

O padrão paracetamol ou acetaminofeno ( $\text{C}_8\text{H}_9\text{NO}_2$ , PM 151,17, m.p.  $167^\circ\text{C}$ , Lote 124k0165 – Sigma-Aldrich ) foi utilizado para o desenvolvimento, validação do método e para o tratamento dos animais.

## 4.7 Soluções – Desenvolvimento e validação do método

### 4.7.1 Solução estoque de paracetamol

Uma solução estoque em concentração de  $200 \mu\text{g.mL}^{-1}$  de paracetamol foi preparada em balão volumétrico de 50 mL com água ultrapura milliQ (Milipore®). A solução foi agitada em banho de ultrassom por 5 minutos e mantida sob refrigeração ( $\pm 4^\circ\text{C}$ ) e ao abrigo da luz. As soluções de trabalho utilizadas para o desenvolvimento e validação do método analítico de quantificação foram obtidas a partir de diluições seriadas da solução estoque, preparadas no dia das análises. A solução estoque manteve-se estável por um período de 60 dias.

### 4.7.2 Soluções de tratamento dos animais

As soluções usadas para tratar os animais foram preparadas em água ultrapura milliQ (Milipore®), a partir do padrão paracetamol (Sigma-Aldrich) e de ampolas comerciais de sulfato de morfina (Granado) e de metoclopramida (Sanofir-Aventis). As doses usadas no tratamento de camundongos e ratos foram  $50 \text{ mg.kg}^{-1}$  de paracetamol e  $10 \text{ mg.kg}^{-1}$  de sulfato de morfina e de metoclopramida. As soluções foram preparadas nos dias dos tratamentos e mantidas sob refrigeração ( $\pm 4^\circ\text{C}$ ) e ao abrigo da luz até serem utilizadas.

## 4.8 Amostras para quantificação dos fármacos

As amostras de plasma foram obtidas a partir de amostras de sangue heparinizado de ratos e camundongos que foram centrifugadas a 12.000 rcf por 15 minutos. O plasma foi recolhido imediatamente após centrifugação, em seguida mantido em congelador ( $-20^\circ\text{C}$ ) até ser submetido à análise no prazo máximo de 7 dias.

## 4.9 Desenvolvimento e validação do método analítico

O desenvolvimento e validação do método analítico foram realizadas em cromatógrafo em fase líquida de alta eficiência (CLAE) Nexera XR (Shimadzu®), equipado com controlador CBM20A, desgaseificador DGU20A, bomba binária LC20AD, forno CTO20A, injetor automático SILA20A, sistema de detecção por DAD-UV-VIS SPDM20A (Figura 5). A área do

sinal foi integrada automaticamente pelo programa Shimadzu LabSolutions.

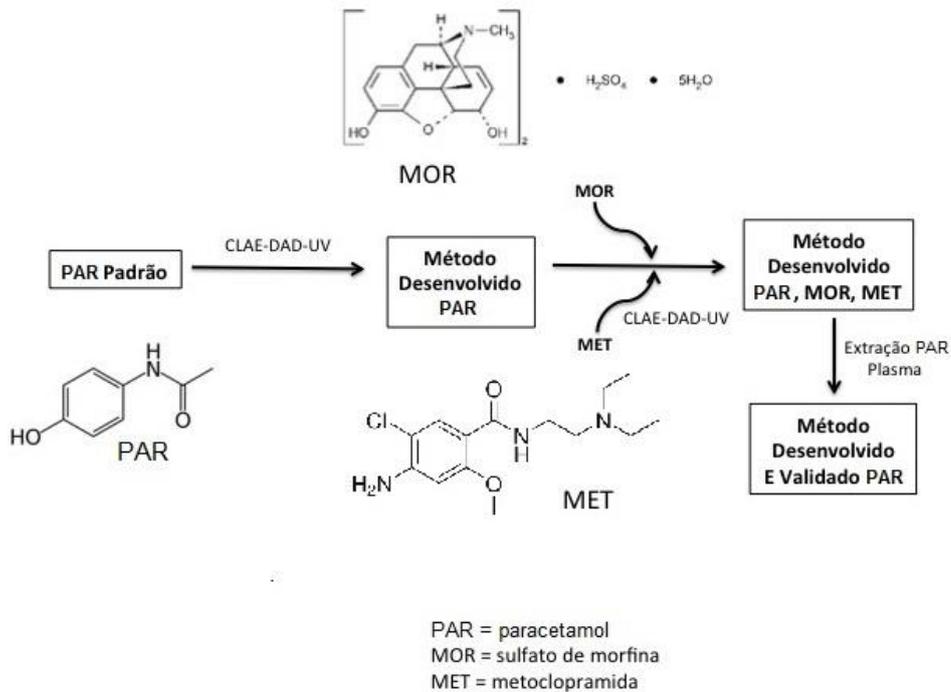
Figura 5 - Equipamento CLAE-DAD-UV Nexera Shimadzu



Fonte: A autora, 2016.

A primeira etapa do desenvolvimento do método analítico foi determinar a fase móvel e a fase estacionária, de acordo com procedimentos de desenvolvimento analítico para CLAE e de acordo com a disponibilidade de materiais do laboratório (SNYDER *et al*, 1997). Em seguida foram avaliados os espectros de UV do padrão paracetamol, assim como, parâmetros analíticos de desempenho, incluindo tempo de retenção ( $t_R$ ), simetria do sinal e fator de retenção ou capacidade ( $\alpha$ ). Uma vez que o método foi desenvolvido para análise do paracetamol (PAR), as substâncias de tratamento sulfato de morfina (MOR) e metoclopramida (MET) foram analisadas nas mesmas condições. Feito isso, deu-se sequência aos testes de extração do paracetamol do plasma e, só então, à validação do método conforme 4.9.1 e 4.9.2 (Esquema 1).

Esquema 1 - Desenvolvimento e validação de metodologia analítica para análise de paracetamol (PAR) no plasma. Desenvolvimento de metodologia analítica para análise de sulfato de morfina (MOR) e metoclopramida no plasma (MET)



Fonte: A autora, 2016.

Os parâmetros analíticos para análise de paracetamol no plasma estão apresentados na Seção Resultados e Discussão.

#### 4.9.1 Desenvolvimento de metodologia de extração do paracetamol em plasma

Plasmas de camundongos Suíços e DBA/2, além de plasma de ratos Wistar foram usados para testes de extração e recuperação do paracetamol. O método escolhido para realizar a extração do fármaco do plasma foi o de precipitação de proteínas, seguido de recuperação do extrato de plasma e análise direta por CLAE-DAD-UV (CARMO, 2015). Diferentes quantidades de plasma (50, 100, 150  $\mu\text{L}$ ), de solução padrão de paracetamol (1,54, 6,23 e 50  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) e reagentes precipitantes de proteínas (Solução aquosa de Sulfato de Zinco a 25% p/v e acetonitrila grau espectroscópico) foram testados. A metodologia selecionada como adequada permitiu recuperar o fármaco do plasma de camundongos e de rato com percentual maior do

que 80% e será apresentada na seção Resultados e Discussão.

#### 4.9.2 Validação da metodologia

A validação do método de análise do paracetamol em plasma por CLAE-DAD-UV foi realizada de acordo com o Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos da Resolução RE nº 899/2003 do Ministério da Saúde/ Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e de acordo com normas nacionais e internacionais para validação analítica (ANVISA, 2003; INMETRO, 2007; ICH-Q2A,1995; ICH-Q2B, 1995). Os parâmetros de desempenho analítico avaliados foram *seletividade, linearidade, precisão, exatidão, limite de detecção, limite de quantificação, recuperação, robustez*, discutidos a seguir:

##### *Seletividade*

A seletividade do método desenvolvido foi avaliada a partir da análise de extrato de plasma obtido de camundongos Suíço, DBA/2 e rato Wistar que não receberam paracetamol e da análise deste extrato fortificado com paracetamol na concentração de 0,89  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ .

##### *Linearidade*

A linearidade do método foi avaliada por meio da análise da curva analítica obtida para o paracetamol em plasma na faixa de concentração de 0,10 a 28,57  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ . Foram analisados **11 níveis** de concentração neste intervalo, são eles: 0,10; 0,15; 0,22; 0,45; 0,89; 1,78; 3,57; 7,14; 10,71; 14,28 e 28,57  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ . As concentrações foram analisadas em réplicas de seis, em três dias diferentes. As equações lineares foram obtidas por cálculo da regressão linear pelo método dos mínimos quadrados. A curva-resposta utilizada para a quantificação do paracetamol foi obtida através do cálculo da média e o desvio-padrão do coeficiente angular e da interseção com o eixo y das três curvas analíticas obtidas.

##### *Precisão*

Para avaliar a precisão foram considerados 02 níveis de concentração do paracetamol, um médio e um alto (0,714 e 7,140  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ). As duas concentrações foram analisadas em réplicas de 6 na parte da manhã e na parte da tarde no mesmo dia (precisão intradia) e em três dias diferentes (precisão interdia). Os valores médios de área foram comparados dentro do mesmo dia (precisão intradia) e em dias diferentes (precisão interdia).

*Exatidão* - A exatidão do método foi avaliada em relação a concentração teórica e a concentração experimental, ou seja, concentração obtida pela curva analítica, de acordo com a fórmula:

$$\text{Exatidão} = (\text{CMDE} / \text{CT}) \times 100$$

Onde CMDE é a concentração média determinada experimentalmente e CT é a concentração teórica. Não foram aceitos valores superiores a 15%, exceto no limite de quantificação quando um valor de até 20 % pode ser aceito (ANVISA, 2003). A avaliação foi feita nos mesmos intervalos de concentração da curva analítica.

#### *Limite de Detecção (LD)*

O limite de detecção do método foi obtido por avaliação da relação sinal/ ruído de concentrações conhecidas e obtidas por diluição sucessiva, a partir da solução estoque de paracetamol a 200  $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$ .

#### *Limite de Quantificação (LQ)*

O limite de quantificação do método foi obtido por avaliação da relação sinal/ ruído de concentrações conhecidas e obtidas por diluição sucessiva, a partir da solução estoque de paracetamol a 200  $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$ .

#### *Recuperação*

A recuperação do procedimento de extração foi avaliada nos níveis de concentração baixo, médio e alto da curva analítica (0,22, 0,89 e 7,14  $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$ ). Foram analisadas amostras padrão de extrato de plasma (branco) de camundongos e ratos, fortificadas com paracetamol e amostras padrão de plasma fortificadas com paracetamol e posteriormente submetidas à extração. O cálculo da recuperação foi realizado em função da área do padrão extraído e não extraído (100 %).

#### *Robustez*

A avaliação da robustez do método foi feita com base na avaliação da influência de 5 parâmetros analíticos (Tabela 1) e suas respectivas variações. A influência de cada parâmetro

sobre a determinação do paracetamol em amostra padrão de plasma fortificado foi realizada nas concentrações baixa e alta da curva analítica (0,22 e 7,14  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ).

Tabela 1 - Parâmetros analíticos e variações para a avaliação da robustez do método cromatográfico de quantificação do paracetamol em plasma

Parâmetros analíticos	Condição nominal	Variação
Fluxo da fase móvel	1,0 mL.min <sup>-1</sup> - A	1,1 mL.min <sup>-1</sup> - a
Temperatura do forno	50°C - B	45°C - b
Concentração de acetonitrila na fase móvel	20% - C	21% - c
pH da fase aquosa	3,0 - D	3,2 - d
Comprimento de onda no UV	246 nm - E	250 nm - e

Fonte: A autora, 2016.

#### 4.10 Estudos farmacocinéticos

O estudo da cinética do paracetamol, no sentido de se estabelecer um protocolo de avaliação de esvaziamento gástrico, foi realizado pela quantificação do fármaco no plasma. Previamente ao tratamento, os animais foram pesados e o volume administrado foi corrigido pelo peso do animal (10  $\mu\text{L}$  e 5  $\mu\text{L}$  de solução para cada grama de camundongo e rato, respectivamente). A curva cinética do controle positivo foi obtida após administração por via oral de solução a 50  $\text{mg.kg}^{-1}$  de paracetamol para camundongos e ratos (*tratamento 1*). Para avaliação da influência de acelerador e de retardador do esvaziamento gástrico na curva cinética, o paracetamol foi administrado pela mesma via e na mesma concentração 15 minutos após os animais receberem metoclopramida (10  $\text{mg.kg}^{-1}$ , s.c., *tratamento 2*) ou sulfato de morfina (10  $\text{mg.kg}^{-1}$ , s.c., *tratamento 3*). Os tratamentos 1, 2 e 3 foram realizados com camundongos Suíços e DBA/2 em fêmeas não grávidas. Com o intuito de avaliar o esvaziamento gástrico *versus* gravidez, as ratas fêmeas grávidas foram submetidas somente ao tratamento 1 e as ratas fêmeas não grávidas aos tratamentos 1 e 3 (tabela 2).

Os tempos pós-dose selecionados para a coleta do sangue e construção da curva foram padronizados em 5, 15, 30, 60, 90 e 120 minutos para os tratamentos 1 e 2. Para o tratamento 3 (uma vez que a morfina retarda o esvaziamento gástrico) admitiu-se os tempos 15, 30, 60, 90 e

120. Para cada tempo da curva, o sangue de 6 camundongos foi coletado. Em relação aos ratos, o sangue de um rato foi coletado em todos os tempos, sendo o grupo composto por 6 ratos diferentes. Os animais foram anestesiados e o sangue coletado por punção cardíaca (camundongo) ou pela cauda (rato) (tabela 2).

Tabela 2 – Resumo dos tratamentos dos animais

<b>Animal</b>	<b>Animais/ tempo</b>	<b>Tratamento</b>	<b>Tempos (min) coleta sangue</b>
Camundongo DBA2	6	1	5,15, 30, 60, 90, 120
Camundongo Suíço	6	1	5,15, 30, 60, 90, 120
Camundongo DBA2	6	2	5, 15, 30, 60, 90,120
Camundongo Suíço	6	2	5, 15, 30, 60, 90,120
Camundongo DBA2	6	3	15, 30, 60, 90, 120
Camundongo Suíço	6	3	15, 30, 60, 90, 120
Rato fêmea Wistar	1*	1	15, 30, 60, 90,120
Rato fêmea Wistar	1*	3	15, 30, 60, 90,120
Rato fêmea Wistar grávida	1*	1	15, 30, 60, 90,120

Nota: Tratamento 1 = paracetamol v.o., 50 mg.kg<sup>-1</sup>; Tratamento 2 = paracetamol, v.o., 50 mg.kg<sup>-1</sup>, 15 minutos após metocropramida s.c., 10 mg.kg<sup>-1</sup>; Tratamento 3 = paracetamol v.o., 50 mg.kg<sup>-1</sup>, 15 minutos após sulfato de morfina, s.c., 10 mg.kg<sup>-1</sup>. \* tratamento em 6 animais, com coleta de sangue da cauda nos cinco tempos.

Fonte: A autora, 2016.

#### 4.11 Análise estatística

O teste de Bonferroni com múltiplas comparações foi utilizado para verificar se os valores das médias em função do tempo eram significativos entre si. Os dados foram analisados por testes paramétricos ANOVA a um critério ( $p < 0,05$ ). A comparação das médias da robustez foi feita com o teste estatístico de kruskal-wallis. Os valores representam Médias  $\pm$  Desvio Padrão (M $\pm$ DP) para validação analítica e Médias  $\pm$  Erro Padrão (M $\pm$ EP) para os tratamentos. O programa usado para construir os gráficos e fazer as análises estatísticas foi o GRAPHPAD PRISM6<sup>®</sup>.

## 5 RESULTADOS

### 5.1 Desenvolvimento do método de análise

#### 5.1.1 Condições de análise do paracetamol

Os parâmetros analíticos para quantificação do paracetamol por CLAE-DAD-UV foram determinados a partir de solução do padrão em água (28,57  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) e ensaios variando condições de fases móveis, de acordo com a tabela 3.

Tabela 3 - Condições testadas para análise do paracetamol

Condição	Fase Móvel (v/v)
1	Acetonitrila ( 50% ) Água ultrapura acidificada ( 50% )
2	Acetonitrila ( 25% ) Água ultrapura acidificada ( 75% )
3	Acetonitrila ( 20% ) Água ultrapura acidificada ( 80% )

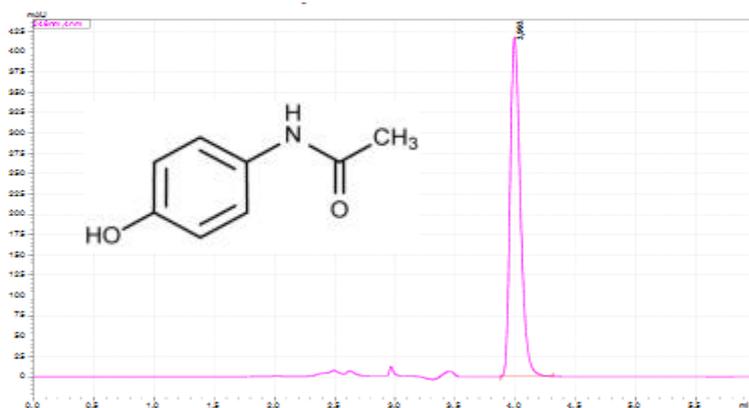
Nota: Todas as análises foram realizadas com coluna cromatográfica ACE® 5 C18 (250 mm x 4,6 mm i.d., 5  $\mu\text{m}$ ), fluxo de 1,0  $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ , pH da fase aquosa = 3,0 (ácido acético glacial) e temperatura do forno: 50 °C.  
Fonte: A autora, 2016.

De todas as condições testadas para análise do paracetamol, a condição 3 foi a que apresentou o melhor fator de capacidade ou separação ( $\alpha = 1,9$ ), simetria de sinal ( $\sim 1,0$ ) e tempo total de análise (6 minutos). O tempo de retenção (tR) do paracetamol nessa condição é igual a 3,80 ( $\pm 0,20$ ) minutos (Figura 6). Portanto, o melhor parâmetro estabelecido para análise de paracetamol em água é:

1. Coluna cromatográfica ACE® 5 C18 (250 mm x 4,6 mm i.d., 5  $\mu\text{m}$ )
2. Água ultrapura acidificada pH 3,0 (80%)
3. Acetonitrila grau HPLC Tedia (20%)
4. Fluxo: 1,0  $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ .
5. Temperatura do forno: 50 °C
6. Tempo total de análise: 6 minutos

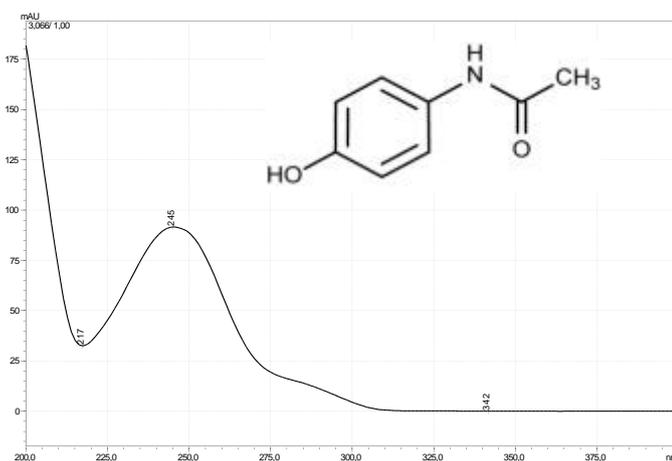
O comprimento de onda ( $\lambda$ ) do paracetamol que apresentou maior seletividade e maior absorção foi definido em 246 nm. Na figura 7 tem-se o espectro de absorção no ultravioleta do paracetamol obtido por CLAE-DAD-UV.

Figura 6 - Cromatograma do paracetamol em água ( $28,57 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) obtido por CLAE-DAD-UV na condição 3. Visualização em 246 nm



Fonte: A autora, 2016.

Figura 7 - Espectro de absorção no ultravioleta do paracetamol obtido por CLAE-DAD-UV na condição 3

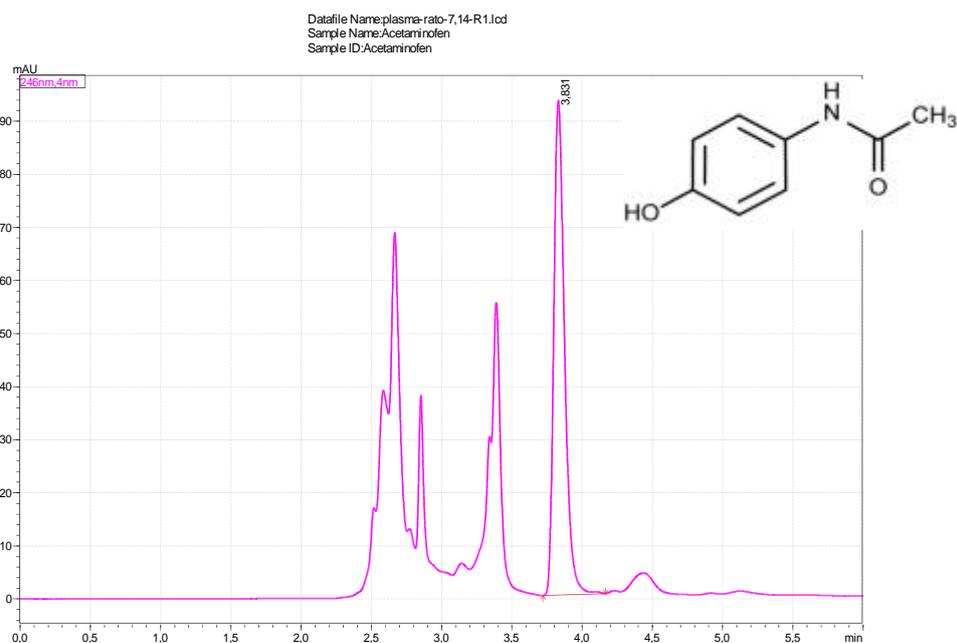


Fonte: A autora, 2016.

Uma amostra de plasma fortificada com paracetamol foi analisada na melhor condição (condição 3). A análise demonstrou que os mesmos parâmetros de seletividade, fator de capacidade e simetria de sinal obtidos para o paracetamol em água também foram obtidos para o paracetamol extraído do plasma, o que assegura qualidade do método para análise desse

fármaco em matriz biológica plasma. Além disso, as substâncias do extrato do plasma eluem em até 3,5 minutos, portanto, não interferem na janela de detecção do paracetamol (figura 8).

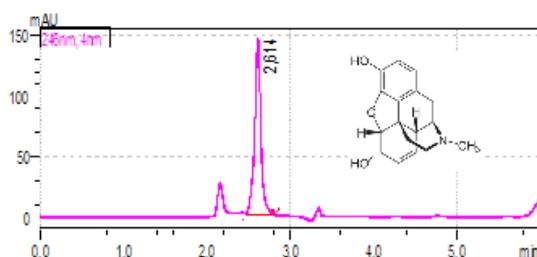
Figura 8 - Cromatograma do paracetamol em extrato do plasma ( $7,14 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) obtido por CLAE-DAD-UV na condição 3. Visualização em 246 nm



Fonte: A autora, 2016.

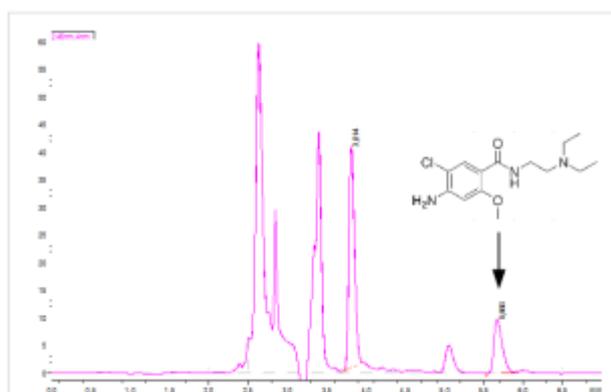
As substâncias de tratamento sulfato de morfina e metoclopramida foram analisadas nas mesmas condições do método desenvolvido para análise do paracetamol. Os tempos médios de retenção do sulfato de morfina (Figura 9) e da metoclopramida (Figura 10) nestas condições de análise foram de  $2,60 (\pm 0,20)$  e  $5,67 (\pm 0,20)$  minutos, respectivamente. O comprimento de onda no ultravioleta ( $\lambda$ ) mais seletivo para análise da metoclopramida, sem sofrer interferência do paracetamol ou outras substâncias do plasma foi estabelecido em 310 nm (Figura 11). Portanto, o método desenvolvido para o paracetamol também apresentou seletividade para o sulfato de morfina e para a metoclopramida, sendo que essas substâncias não interferem na janela de detecção do paracetamol, como pode ser visualizado na figura 12.

Figura 9 – Cromatograma do Sulfato de Morfina em água ( $14,28 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) obtido por CLAE-DAD-UV na condição 3. Visualização em 246 nm



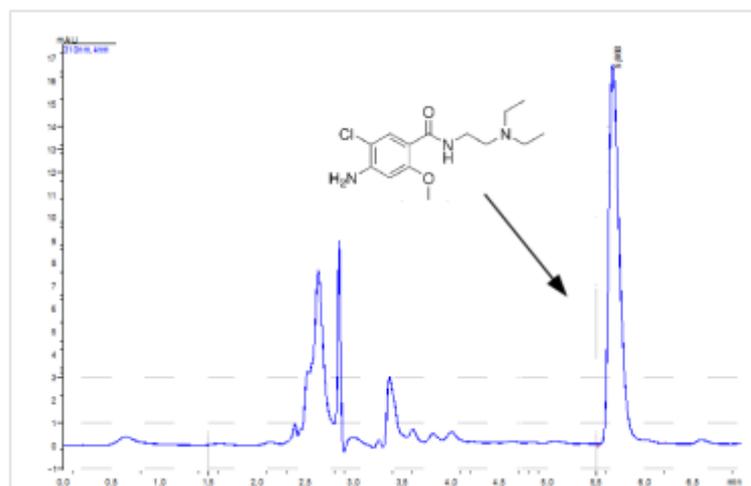
Fonte: A autora, 2016.

Figura 10 - Cromatograma da metoclopramida em extrato de plasma ( $2,86 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) obtido por CLAE-DAD-UV na condição 3. Visualização em 246 nm. Destaque para o sinal da metoclopramida em 5,67 minutos



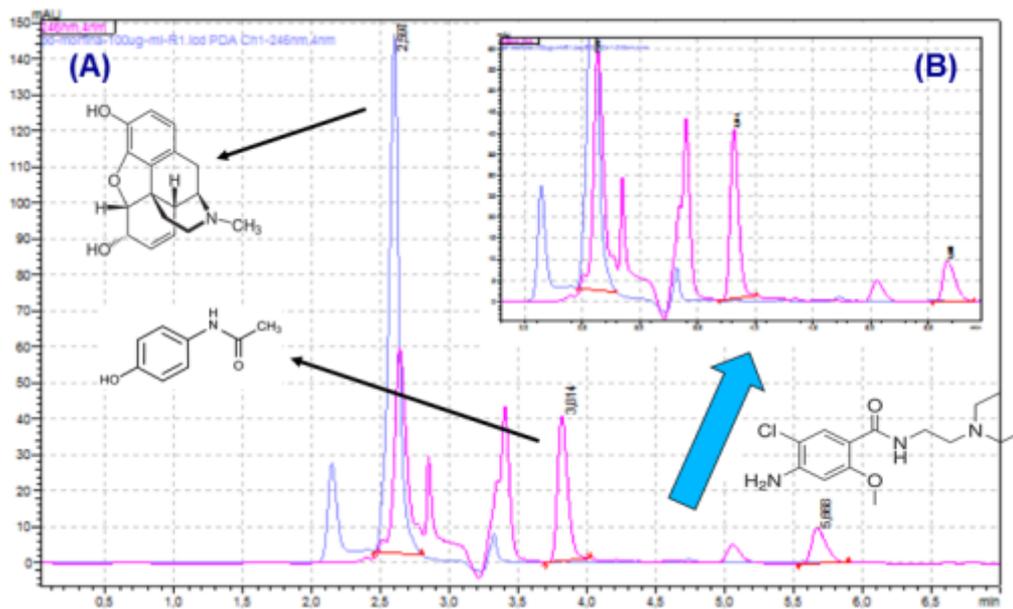
Fonte: A autora, 2016.

Figura 11 - Cromatograma da metoclopramida em plasma ( $2,86 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) obtido por CLAE-DAD-UV na condição 3. Visualização em 310 nm



Fonte: A autora, 2016.

Figura 12 - Sobreposição de cromatogramas: sulfato de morfina (MOR) em água + metoclopramida (MET) em extrato de plasma + paracetamol (PAR) em extrato de plasma; obtidos por CLAE-DAD-UV na condição 3.



Nota: Visualização em 246 nm (A). Expansão do cromatograma de 2,0 a 6,0 minutos (B)

Fonte: A autora, 2016.

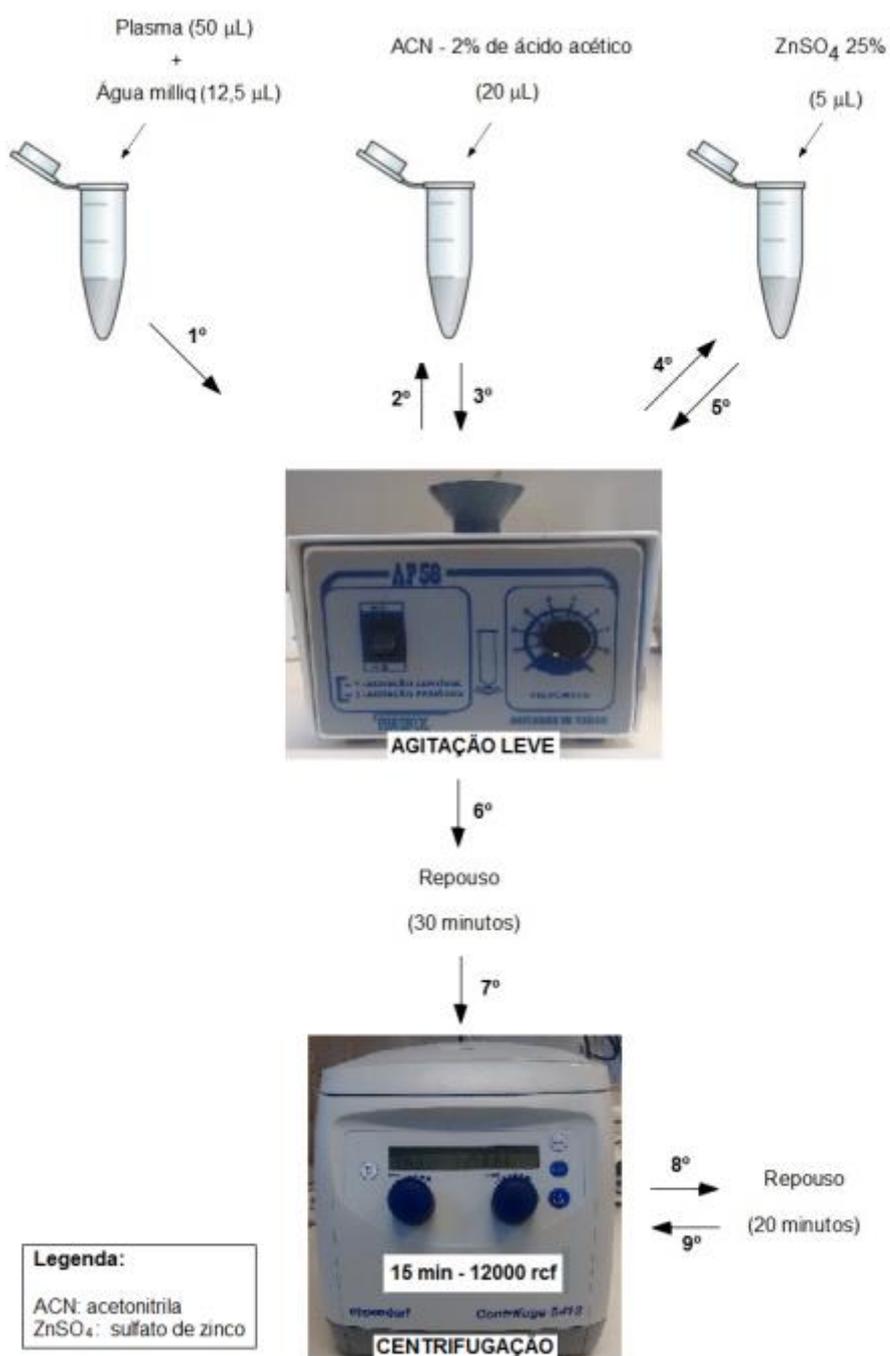
### 5.1.2 Método de extração

A metodologia de extração foi desenvolvida utilizando-se a técnica de precipitação de proteínas. O método padronizado foi baseado na metodologia empregada por Carmo (2015), com modificações. Em todos os testes de validação do método analítico e também nas análises das amostras de interesse foram empregadas essa metodologia. A seguir, uma breve descrição do método de extração desenvolvido e um esquema de representação do mesmo (esquema 2):

Uma alíquota de 50  $\mu\text{L}$  de plasma foi transferida para um tubo do tipo eppendorf® e 12,5  $\mu\text{L}$  de água ultrapura milliQ (Milipore®) foram adicionados. O tubo foi agitado cuidadosamente em vórtex baixo por 10 segundos. Em seguida foram adicionados 20  $\mu\text{L}$  de acetonitrila (grau HPLC, Tedia) acidificada com 2% de ácido acético. Após uma segunda agitação em vórtex por 10 segundos, foram adicionados 5  $\mu\text{L}$  de uma solução aquosa de sulfato de zinco ( $\text{ZnSO}_4$ ) a 25% (p/v) e o tubo foi levado mais uma vez ao vórtex para uma agitação leve. A suspensão foi deixada em repouso por 30 minutos para início da precipitação das proteínas. Após esse tempo, o tubo foi levado à centrifugação por 15 minutos a 12000 rcf. Em

seguida, o tubo foi deixado em repouso por mais 20 minutos e foi realizada uma nova centrifugação por 15 minutos a 12000 rcf. O sobrenadante foi transferido para tubos “vials” e, então, foram analisados por CLAE-DAD-UV. O tempo total para extração foi estimado em cerca de 65 minutos.

Esquema 2 - Procedimento desenvolvido para extração do paracetamol em matriz biológica plasma



Fonte: Adaptado de Carmo, 2015.

## 5.2 Validação do Método Analítico - Paracetamol

### 5.2.1 Seletividade

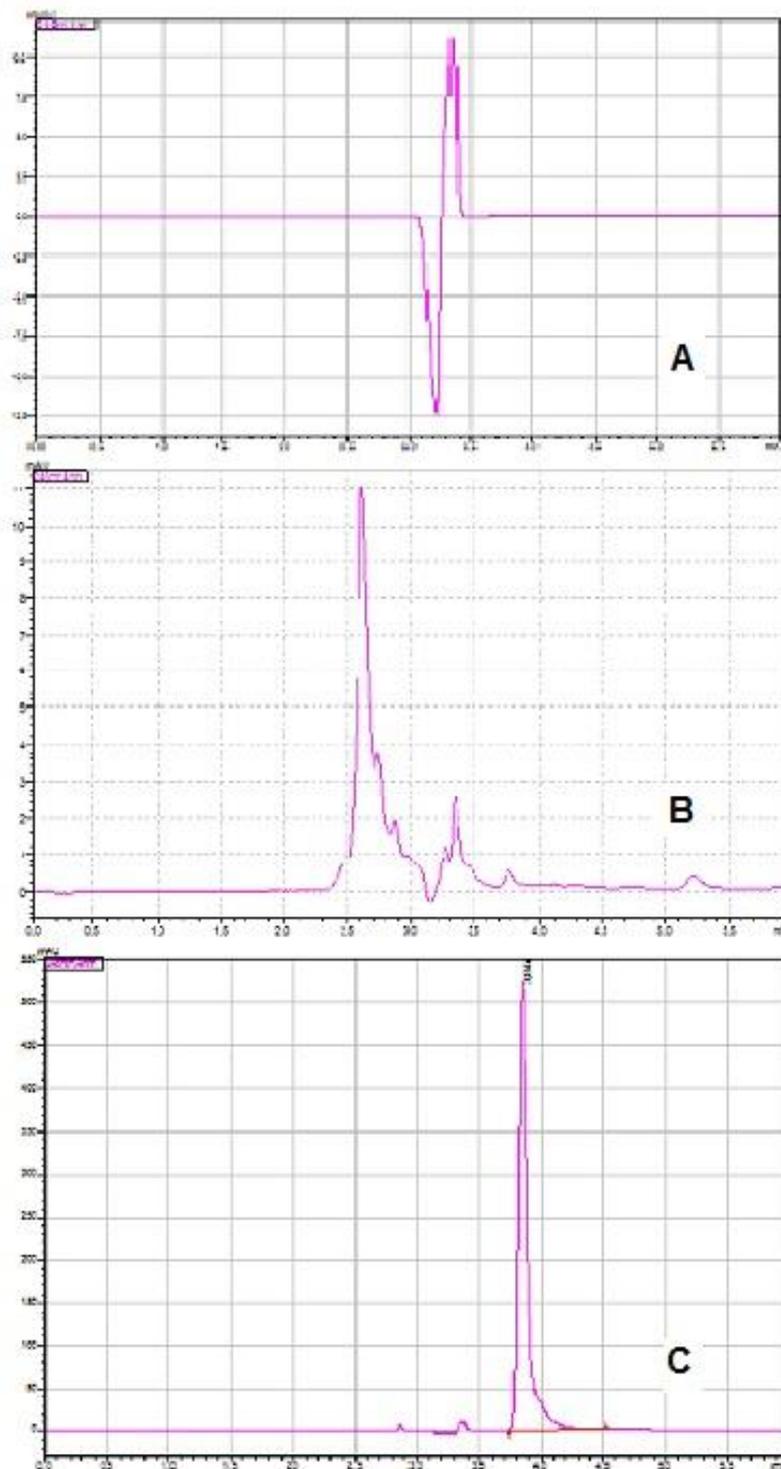
As análises de amostras branco (água), extrato de plasma sem o fármaco e extrato de plasma fortificado com padrão paracetamol permitiu demonstrar a seletividade do método, com leitura no comprimento de maior absorção do fármaco (246 nm). Na figura 13.A tem-se o cromatograma da água com ausência de interferentes na amostra, isto é, amostra branco-água. Os sinais obtidos a partir do extrato de plasma podem ser visualizados no cromatograma 13.B e por último, é possível observar um sinal no tempo de retenção de 3,81 minutos, referente ao padrão de paracetamol em extrato de plasma (Figura 13.C). A seletividade do método é melhor demonstrada na sobreposição dos cromatogramas das amostras branco (água), branco extrato do plasma sem o fármaco e extrato do plasma fortificado com paracetamol. A sobreposição dos três cromatogramas permite observar a total ausência de interferentes do plasma ou da água na janela de detecção do paracetamol, neste caso em tR igual a 3,81 minutos (Figura 14).

### 5.2.2 Linearidade

As curvas de calibração do paracetamol em plasma foram obtidas no intervalo de concentração de 0,10 a 28,57  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ . Os resultados obtidos das três curvas de calibração estão ilustrados na figura 15. As curvas de calibração apresentaram correlação linear positiva, com  $r = 0,9996$ . A fórmula abaixo foi obtida por regressão linear e utilizada para a quantificação do paracetamol, tendo sido calculada pela média e desvio padrão dos coeficientes lineares e angulares das três equações, obtidas nos três diferentes dias:

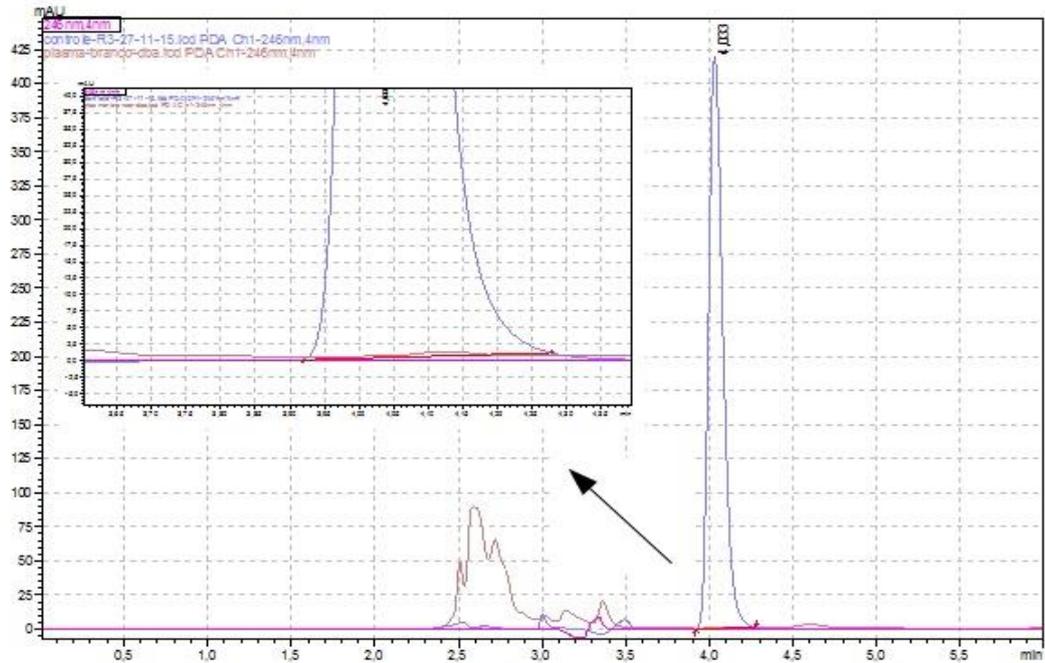
$$\text{ABS} = (96383 \pm 365) \times \text{Concentração} - (6678 \pm 555)$$

Figura 13 - Cromatogramas obtidos por CLAE-DAD-UV para determinar a seletividade do método: **A.** Amostra branco - água; **B.** Amostra branco - extrato do plasma; **C.** Amostra de extrato de plasma fortificado com paracetamol ( $28,57 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ).



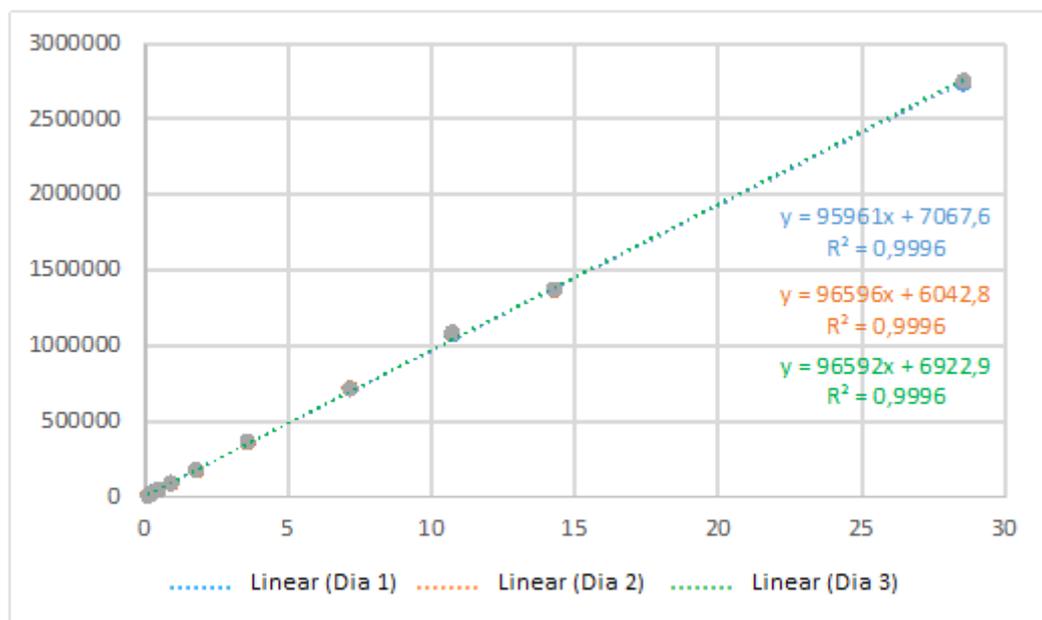
Fonte: A autora, 2016.

Figura 14 - Sobreposição dos sinais obtidos por CLAE-DAD-UV em amostra branco – água (rosa), branco extrato do plasma (marrom) e extrato de plasma fortificado com paracetamol - azul ( $28,57 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ )



Fonte: A autora, 2016.

Figura 15 - Curvas de calibração obtidas para quantificação do paracetamol, no intervalo de concentração de  $0,10$  a  $28,57 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  e em três dias diferentes



Fonte: A autora, 2016.

### 5.2.3 Precisão

Os resultados obtidos na avaliação da precisão do método estão demonstrados na tabela 4. Foram avaliadas duas concentrações, uma média e uma alta (0,714 e 7,14  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ), em réplicas de 6 na parte da manhã e na parte da tarde no mesmo dia (precisão intradia) e em três dias diferentes (precisão interdia). Os desvios observados foram inferiores ao limite de 15 % (ANVISA, 2003; INMETRO, 2007). Ainda, não houve variação entre média intradia quando comparada com a média interdia. Portanto, o método desenvolvido é preciso.

Tabela 4 - Avaliação da precisão do método de análise do paracetamol

Concentração $\mu\text{g.mL}^{-1}$	Intradia			Interdia		
	M	DP	CV %	M	DP	CV %
<b>7,14</b>	519760,8	512,8	0,1	519398,2	3048,3	0,6
<b>0,71</b>	46250,8	208,4	0,4	46398,2	239,3	0,5

M: Média; DP: Desvio-padrão; CV: Desvio Padrão relativo ou coeficiente de variação.

Fonte: A autora, 2016.

### 5.2.4 Exatidão

A exatidão do método foi avaliada em dez níveis de concentração, compreendendo baixo, médio e alto (0,10; 0,15; 0,22; 0,45; 0,89; 1,78; 3,57; 7,14; 10,71 e 14,28  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ). Os resultados demonstram que a menor variação foi de 100,87% para 0,45  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  e as maiores foram de 85,51% e 114,83 % para 0,15  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  e 0,22  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ , respectivamente. As variações estão, portanto, dentro dos limites permitidos (85 – 115%). Dessa forma, o método desenvolvido pode ser considerado exato (ANVISA, 2003; INMETRO, 2007).

### 5.2.5 Limite de Detecção

O Limite de detecção (LD) para o paracetamol encontrado foi de 30  $\text{ng.mL}^{-1}$ , obtido por meio da técnica de diluição sucessiva.

### 5.2.6 Limite de Quantificação

O Limite de Quantificação (LQ) para o paracetamol encontrado foi de 45 ng.mL<sup>-1</sup>, obtido por meio da técnica de diluição sucessiva.

Tabela 5 - Avaliação da Exatidão do Método de análise do paracetamol

[ ] Nominal µg/mL	Absorbância Média Experimental	[ ] Experimental µg/mL	Δ µg	Δ µg %	Δ %
<b>14,28</b>	1368658,18	14,02	-0,26	-1,84	98,16
<b>10,71</b>	1079585,22	11,06	0,35	3,29	103,29
<b>7,14</b>	713584,89	7,32	0,18	2,53	102,53
<b>3,57</b>	361024,49	3,72	0,15	4,09	104,09
<b>1,78</b>	175513,17	1,82	0,04	2,20	102,20
<b>0,89</b>	87577,01	0,92	0,03	3,38	103,38
<b>0,45</b>	41978,56	0,45	0,00	0,87	100,87
<b>0,22</b>	22291,13	0,25	0,03	14,83	114,83
<b>0,15</b>	10126,72	0,13	-0,02	-14,49	85,51
<b>0,10</b>	6752,39	0,09	-0,01	-6,23	93,77

[ ] = concentração.  
Fonte: A autora, 2016.

### 5.2.7 Recuperação

A recuperação do paracetamol foi avaliada em três níveis de concentração (baixa, média e alta) e em três tipos de plasma: camundongo DBA/2, camundongo Suíço e Rato Wistar. Os dados estão dispostos, separados por tipo de animal, nas tabelas 6, 7 e 8. Em todos os níveis de concentração e para os três diferentes tipos de plasma a recuperação foi maior do que 80%, portanto, dentro das especificações legais (ANVISA, 2003).

Tabela 6 - Avaliação da recuperação do paracetamol em plasma de camundongo DBA/2

<b>Concentração (<math>\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}</math>)</b>	<b>Média das áreas (n=3)</b>	<b>Recuperação (%)</b>	<b>CV (%)</b>
0,22	16106,67	<b>104,49</b>	6,42
0,89	56763,67	<b>95,47</b>	4,19
7,14	482221,01	<b>99,31</b>	4,65

Fonte: A autora, 2016.

Tabela 7 - Avaliação da recuperação do paracetamol em plasma de camundongo Suíço

<b>Concentração (<math>\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}</math>)</b>	<b>Média das áreas (n=3)</b>	<b>Recuperação (%)</b>	<b>CV (%)</b>
0,22	18572,67	<b>93,91</b>	2,81
0,89	85595,67	<b>94,77</b>	4,67
7,14	667099,01	<b>103,52</b>	4,67

Fonte: A autora, 2016.

Tabela 8 - Avaliação da recuperação do paracetamol em plasma de Rato Wistar

<b>Concentração <math>\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}</math></b>	<b>Média das áreas (n=3)</b>	<b>Recuperação (%)</b>	<b>CV (%)</b>
0,22	16596,01	<b>87,38</b>	3,02
0,89	59454,33	<b>91,25</b>	2,19
7,14	485607,67	<b>90,04</b>	1,99

Fonte: A autora, 2016.

## 5.2.8 Robustez

Os efeitos dos parâmetros testados para avaliar a robustez do método de análise do paracetamol estão dispostos na tabela 9. É possível observar que as variações analisadas pouco influenciaram na média das áreas de ambas as concentrações testadas (0,22 e 7,14  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ), o que indica que o método desenvolvido é robusto (ANVISA, 2003; INMETRO, 2007).

Tabela 9 - Parâmetros testados para avaliar a robustez do método de análise do paracetamol em plasma (7,14 e 0,22  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ )

Parâmetros	Condição					
	0	1	2	3	4	5
<b>Fluxo FM</b>	A	a	A	A	A	A
<b>Temperatura do Forno</b>	B	B	b	B	B	B
<b>Composição de FM</b>	C	C	C	c	C	C
<b>pH fase aquosa</b>	D	D	D	D	d	D
<b><math>\lambda</math> U.V.</b>	E	E	E	E	E	e
<b>Concentração da amostra alta: 7,14 <math>\mu\text{g.mL}^{-1}</math></b>						
<b>M</b>	699383	660504	700258	700882	698945	675518
<b>DP</b>	798	4639	709	360	517	548
<b>CV%</b>	0,11	0,71	0,11	0,05	0,07	0,08
<b>Concentração da amostra baixa: 0,22 <math>\mu\text{g.mL}^{-1}</math></b>						
<b>M</b>	20078	19238	19916	19981	20065	19343
<b>DP</b>	261	116	333	50	213	291
<b>CV%</b>	1,31	0,61	1,67	0,25	1,06	1,51

Condição 0 = condição padrão; condições 1 – 5 = variações; M = média; DP = desvio-padrão; CV% = coeficiente de variação percentual.

Fonte: A autora, 2016.

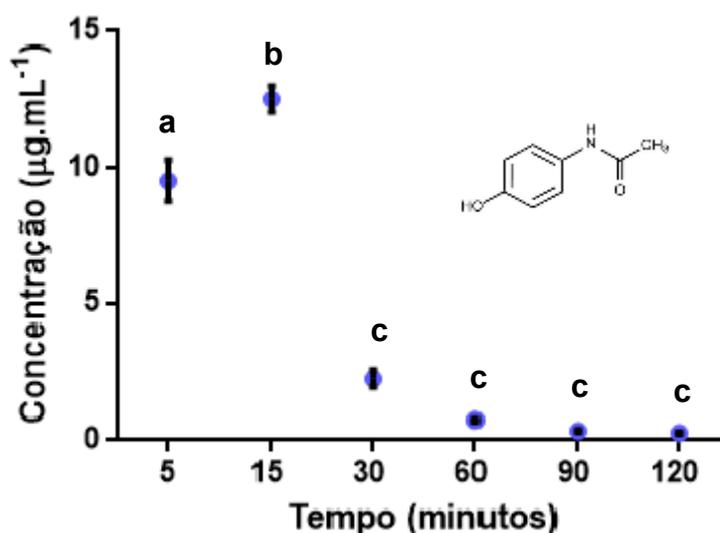
### 5.3 Esvaziamento Gástrico

#### 5.3.1 Perfil farmacocinético em camundongos DBA/2

Os perfis de distribuição plasmática do paracetamol puro ou em associação com metoclopramida e morfina em camundongos DBA/2 estão representados nas Figuras 16, 17 e 18.

A concentração plasmática máxima ( $C_{máx}$ ) do grupo tratado com dose única de 50  $\text{mg.kg}^{-1}$  foi 12,52  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ , atingida no tempo de 15 minutos. As médias das concentrações em função do tempo estão dispostas na tabela 10. Os resultados demonstram, ainda, uma queda brusca na concentração de paracetamol no plasma no tempo de 30 minutos. A partir do tempo de 60 minutos do tratamento as médias das concentrações deixam de ser diferentes ( $p < 0,05$ )

Figura 16 - Médias das concentrações plasmáticas ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) do paracetamol por tempo após a administração por via oral de dose única de 50  $\text{mg.kg}^{-1}$  em camundongos DBA/2.



Nota: Análise estatística realizada por meio do Teste de *Bonferroni* com múltiplas comparações. A mesma letra indica não haver diferença significativa ( $p < 0,05$ ).

Fonte: A autora, 2016.

Tabela 10 - Concentrações plasmáticas médias do paracetamol ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) por tempo, após a administração por via oral de dose única de  $50 \text{ mg.kg}^{-1}$  em camundongos DBA/2

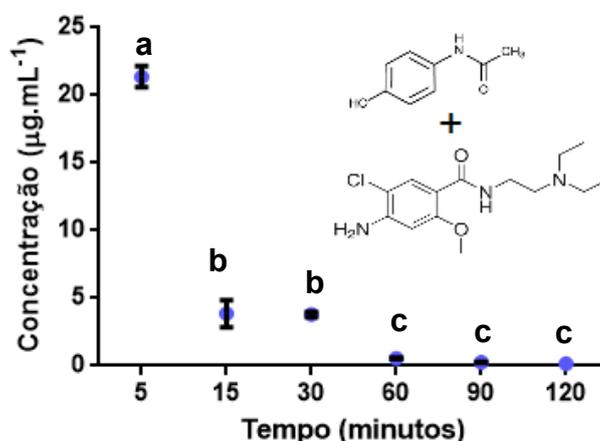
Tempo (minutos)	Concentração Média ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ )	Desvio Padrão
5	9,52 <sup>a</sup>	1,54
15	12,52 <sup>b</sup>	0,07
30	2,25 <sup>c</sup>	0,78
60	0,73 <sup>c</sup>	0,11
90	0,35 <sup>c</sup>	0,1
120	0,27 <sup>c</sup>	0,09

Nota: A mesma letra indica não haver diferença significativa ( $p < 0,05$ ).

Fonte: A autora, 2016.

Os resultados demonstram  $C_{\text{máx}}$  de paracetamol igual a  $21,37 \mu\text{g.mL}^{-1}$  no tempo de 5 minutos para o grupo tratado com a metoclopramida por via subcutânea, 15 minutos antes da administração por via oral do paracetamol (Figura 17). A tabela 11 apresenta as concentrações em função do tempo. A concentração do fármaco no plasma diminui bruscamente para  $3,86 \mu\text{g.mL}^{-1}$  no tempo de 15 minutos. A partir do tempo de 60 minutos as médias das concentrações não diferem significativamente entre si ( $p < 0,05$ ).

Figura 17 - Médias das concentrações plasmáticas ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) do paracetamol por tempo após a administração por via oral de dose de  $50 \text{ mg.kg}^{-1}$ , 15 minutos após os camundongos DBA/2 receberem  $10 \text{ mg.kg}^{-1}$  de metoclopramida por via subcutânea.



Nota: Análise estatística realizada por meio do Teste de *Bonferroni* com múltiplas comparações. A mesma letra indica não haver diferença significativa ( $p < 0,05$ ).

Fonte: A autora, 2016.

Tabela 11 - Concentrações plasmáticas médias do paracetamol ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) por tempo, após a administração por via oral de dose única de  $50 \text{ mg.kg}^{-1}$ , 15 minutos após os camundongos DBA/2 receberem  $10 \text{ mg.kg}^{-1}$  de metoclopramida por via subcutânea

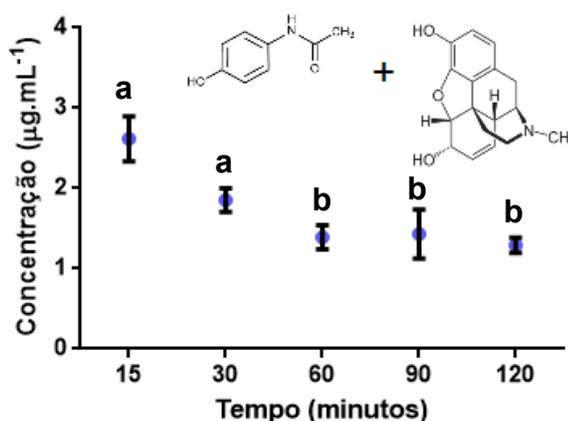
Tempo (minutos)	Concentração Média ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ )	Desvio Padrão
5	21,37 <sup>a</sup>	1,75
15	3,86 <sup>b</sup>	1,74
30	3,81 <sup>b</sup>	0,42
60	0,56 <sup>c</sup>	0,11
90	0,25 <sup>c</sup>	0,05
120	0,15 <sup>c</sup>	0,01

Nota: A mesma letra indica não haver diferença significativa ( $p < 0,05$ ).

Fonte: A autora, 2016.

A  $C_{\text{máx}}$  do paracetamol no grupo tratado com morfina (via s.c.) foi de  $2,62 \mu\text{g.mL}^{-1}$  no tempo de 15 minutos (Tabela 12, Figura 18). Observa-se na figura 17 um claro retardo na absorção do paracetamol ao longo do tempo, já que a concentração média em 120 minutos é apenas a metade da concentração no tempo de 15 minutos (primeiro tempo avaliado). As concentrações médias não foram diferentes entre si, exceto para a comparação do tempo de 15 e 60 minutos ( $p > 0,05$ ).

Figura 18 - Médias das concentrações plasmáticas ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) do paracetamol por tempo após a administração por via oral de dose de  $50 \text{ mg.kg}^{-1}$ , 15 minutos após os camundongos DBA/2 receberem  $10 \text{ mg.kg}^{-1}$  de morfina por via subcutânea.



Nota: Análise estatística realizada por meio do Teste de *Bonferroni* com múltiplas comparações. A mesma letra indica não haver diferença significativa ( $p < 0,05$ ).

Fonte: A autora, 2016.

Tabela 12 - Concentrações plasmáticas médias do paracetamol ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) por tempo, após a administração por via oral de dose única de  $50 \text{ mg.kg}^{-1}$ , 15 minutos após os camundongos DBA/2 receberem  $10 \text{ mg.kg}^{-1}$  de morfina por via subcutânea

<b>Tempo (minutos)</b>	<b>Concentração Média (<math>\mu\text{g.mL}^{-1}</math>)</b>	<b>Desvio Padrão</b>
5	-	-
15	2,62 <sup>a</sup>	0,56
30	1,86 <sup>a</sup>	0,29
60	1,39 <sup>b</sup>	0,33
90	1,29 <sup>b</sup>	0,61
120	1,29 <sup>b</sup>	0,19

Nota: A mesma letra indica não haver diferença significativa ( $p < 0,05$ ).

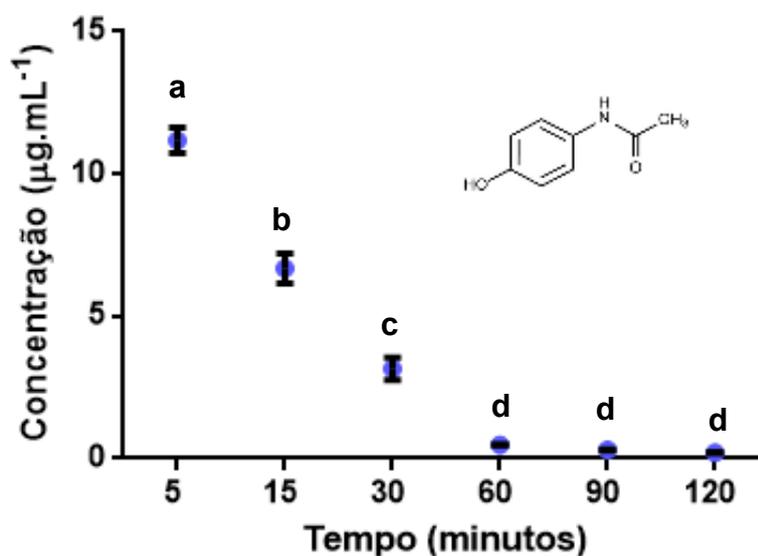
Fonte: A autora, 2016.

### 5.3.2 Perfil farmacocinético em camundongos Suíços

O perfil de distribuição do paracetamol puro ou em associação com metoclopramida ou morfina, no plasma de camundongos Suíços está representado nas figuras 19, 20 e 21. No grupo controle ( $n = 6$ ), tratado apenas com paracetamol, a  $C_{\text{máx}}$  foi encontrada no tempo de 5 minutos ( $11,18 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ), após a administração por via oral do fármaco (Figura 19). No tempo de 15 minutos após a administração do paracetamol, os níveis plasmáticos reduziram quase pela metade ( $6,68 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ). As concentrações médias não variaram significativamente a partir de 60 minutos ( $p < 0,05$ ). Todas as médias das concentrações do tratamento com paracetamol em função do tempo estão disponibilizadas na tabela 13.

O perfil de absorção e eliminação do paracetamol para os camundongos Suíços tratados previamente com metoclopramida por via subcutânea foi similar ao perfil dos camundongos DBA/2. A  $C_{\text{máx}}$  foi determinada em  $16,05 \mu\text{g.mL}^{-1}$  no tempo de 5 minutos. A partir do tempo de 15 minutos a concentração média de paracetamol já é bem mais baixa e não diferente significativamente entre si ( $p < 0,05$ ) (Figura 21). As médias das concentrações no plasma em função do tempo para esse tratamento estão demonstradas na tabela 14.

Figura 19 - Médias das concentrações plasmáticas ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) do paracetamol por tempo após a administração por via oral de dose única de  $50 \text{ mg.kg}^{-1}$  em camundongos Suíços.



Nota: Análise estatística realizada por meio do Teste de *Bonferroni* com múltiplas comparações. A mesma letra indica não haver diferença significativa ( $p < 0,05$ ).

Fonte: A autora, 2016.

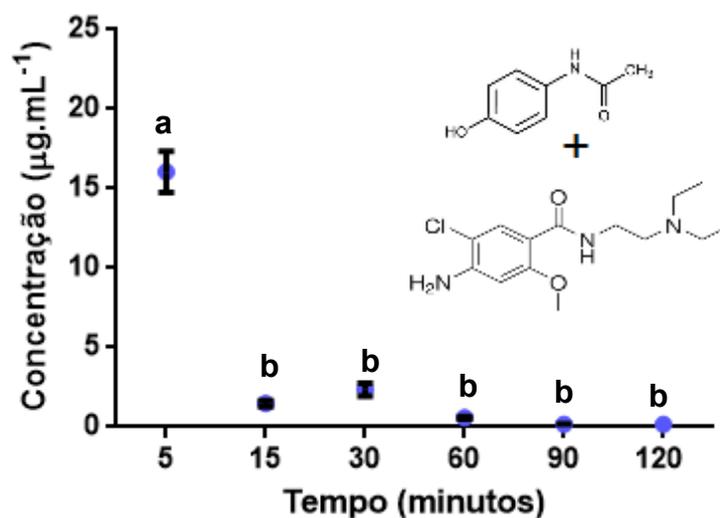
Tabela 13 - Concentrações plasmáticas médias do paracetamol ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) por tempo, após a administração por via oral de dose única de  $50 \text{ mg.kg}^{-1}$  em camundongos Suíços.

Tempo (minutos)	Concentração Média ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ )	Desvio Padrão
5	11,18 <sup>a</sup>	0,89
15	6,68 <sup>b</sup>	1,05
30	3,16 <sup>c</sup>	0,87
60	0,48 <sup>d</sup>	0,02
90	0,31 <sup>d</sup>	0,05
120	0,21 <sup>d</sup>	0,04

Nota: A mesma letra indica não haver diferença significativa ( $p < 0,05$ ).

Fonte: A autora, 2016.

Figura 20 - Médias das concentrações plasmáticas ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) do paracetamol por tempo após a administração por via oral de dose única de  $50 \text{ mg.kg}^{-1}$ , 15 minutos após os camundongos Suíços receberem  $10 \text{ mg.kg}^{-1}$  de metoclopramida por via subcutânea.



Nota: Análise estatística realizada por meio do Teste de *Bonferroni* com múltiplas comparações. A mesma letra indica não haver diferença significativa ( $p < 0,05$ ).

Fonte: A autora, 2016.

Tabela 14 - Concentrações plasmáticas médias do paracetamol ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) por tempo, após a administração por via oral de dose de  $50 \text{ mg.kg}^{-1}$ , 15 minutos após os camundongos Suíços receberem  $10 \text{ mg.kg}^{-1}$  de metoclopramida por via subcutânea

Tempo (minutos)	Concentração Média ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ )	Desvio Padrão
5	16,05 <sup>a</sup>	2,58
15	1,49 <sup>b</sup>	0,38
30	2,36 <sup>b</sup>	0,82
60	0,58 <sup>b</sup>	0,16
90	0,18 <sup>b</sup>	0,04
120	0,17 <sup>b</sup>	0,01

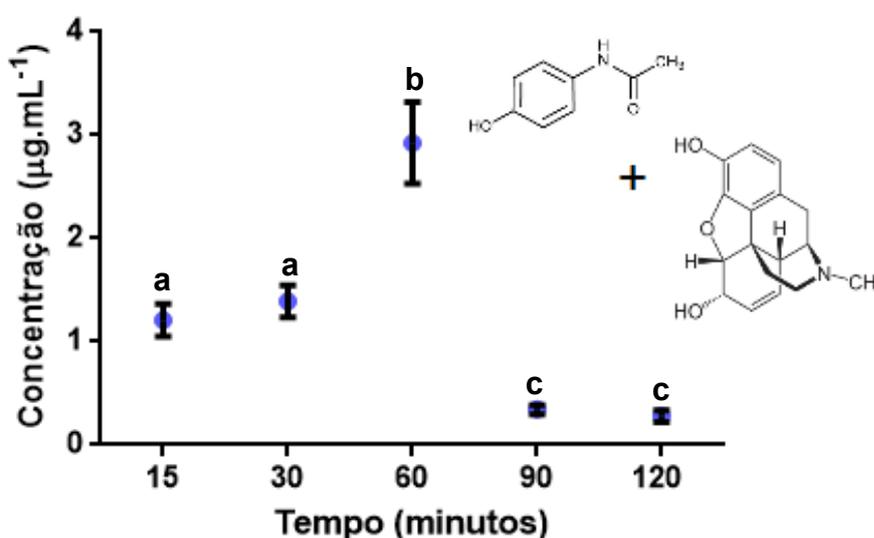
Nota: A mesma letra indica não haver diferença significativa ( $p < 0,05$ ).

Fonte: A autora, 2016.

O perfil de absorção e eliminação do paracetamol para os camundongos Suíços tratados previamente com morfina por via subcutânea foi diferente do perfil dos camundongos DBA/2

(Figura 21). No entanto, também houve retardo na absorção do paracetamol, sendo que a  $C_{\text{máx}}$  passou de 15 minutos (apenas paracetamol) para 60 minutos (morfina + paracetamol). As concentrações plasmáticas do paracetamol no plasma verificadas após administração da morfina (Tabela 15) são mais baixas que o controle (tratamento apenas com paracetamol).

Figura 21 - Médias das concentrações plasmáticas ( $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) do paracetamol por tempo após a administração por via oral de dose de  $50 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ , 15 minutos após os camundongos Suíços receberem  $10 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  de morfina por via subcutânea.



Nota: Análise estatística realizada por meio do Teste de *Bonferroni* com múltiplas comparações. A mesma letra indica não haver diferença significativa ( $p < 0,05$ ).

Fonte: A autora, 2016.

Tabela 15 - Concentrações plasmáticas médias do paracetamol ( $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) por tempo, após a administração por via oral de dose única de  $50 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ , 15 minutos após os camundongos Suíços receberem  $10 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  de morfina por via subcutânea

Tempo (minutos)	Concentração Média ( $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ )	Desvio Padrão
5	-	-
15	1,21 <sup>a</sup>	0,38
30	1,39 <sup>a</sup>	0,38
60	2,93 <sup>b</sup>	0,69
90	0,34 <sup>c</sup>	0,1
120	0,23 <sup>c</sup>	0,08

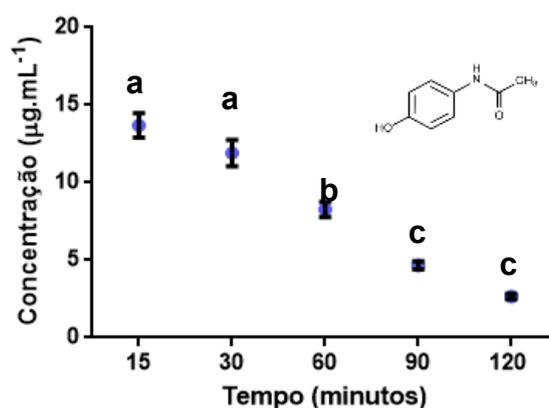
Nota: A mesma letra indica não haver diferença significativa ( $p < 0,05$ ).

Fonte: A autora, 2016.

### 5.3.3 Perfil farmacocinético em ratos Wistar não grávidas e grávidas

O perfil de absorção e eliminação do paracetamol puro ou em associação com morfina no plasma de ratos Wistar **não grávidas** está ilustrado nas figuras 22 e 23, respectivamente. A  $C_{\text{máx}}$  foi verificada no tempo de 15 minutos ( $13,69 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ). Nota-se uma diminuição linear da concentração em função do tempo, sendo que as médias diferem entre si significativamente ( $p > 0,05$ ), exceto quando se compara as concentrações dos tempos de 15 x 30 minutos ( $p < 0,05$ ). As médias das concentrações do tratamento em função do tempo estão demonstradas na tabela 16.

Figura 22 - Médias das concentrações plasmáticas ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) do paracetamol por tempo após a administração via oral de dose única de  $50 \text{ mg.kg}^{-1}$  de paracetamol, em ratos Wistar fêmeas não grávidas.



Nota: Análise estatística realizada por meio do Teste de *Bonferroni* com múltiplas comparações. A mesma letra indica não haver diferença significativa ( $p < 0,05$ ).

Fonte: A autora, 2016.

Tabela 16 - Concentrações plasmáticas médias do paracetamol ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) por tempo, após a administração por via oral de dose única de  $50 \text{ mg.kg}^{-1}$  em ratos Wistar não grávidas

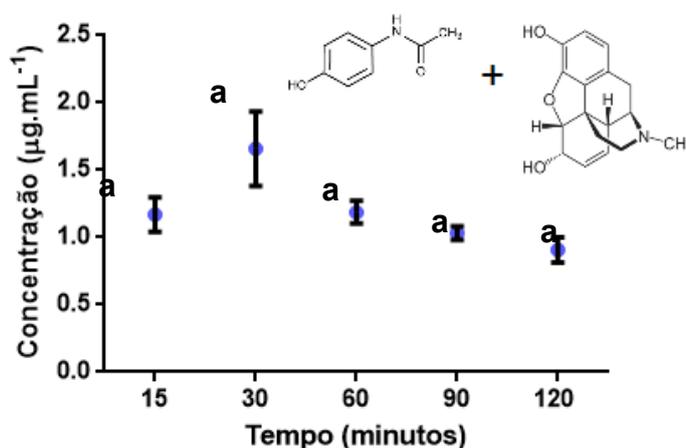
Tempo (minutos)	Concentração Média ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ )	Desvio Padrão
15	13,69 <sup>a</sup>	1,57
30	11,50 <sup>a</sup>	1,74
60	8,27 <sup>b</sup>	1,22
90	4,66 <sup>c</sup>	0,63
120	2,66 <sup>c</sup>	0,39

Nota: A mesma letra indica não haver diferença significativa ( $p < 0,05$ ).

Fonte: A autora, 2016.

O grupo de ratos fêmeas não grávidas, tratado com morfina antes da administração por via oral de paracetamol, apresentou um retardo e diminuição da concentração plasmática do fármaco (Figura 23). A  $C_{máx}$  passou de 15 minutos (apenas paracetamol,  $13,69 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ) para 30 minutos ( $1,66 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ). As médias das concentrações plasmáticas em função do tempo estão disponibilizadas na tabela 17.

Figura 23 - Médias das concentrações plasmáticas ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) do paracetamol por tempo, após a administração por via oral de dose única de  $50 \text{ mg.kg}^{-1}$ , 15 minutos após os ratos Wistar fêmeas não grávidas receberem  $10 \text{ mg.kg}^{-1}$  de morfina por via subcutânea.



Nota: Análise estatística realizada por meio do Teste de *Bonferroni* com múltiplas comparações. A mesma letra indica não haver diferença significativa ( $p < 0,05$ ).

Fonte: A autora, 2016.

Tabela 17 - Concentrações plasmáticas médias do paracetamol ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) por tempo, após a administração por via oral de dose única de  $50 \text{ mg.kg}^{-1}$ , 15 minutos após os ratos Wistar fêmeas não grávidas receberem  $10 \text{ mg.kg}^{-1}$  de morfina

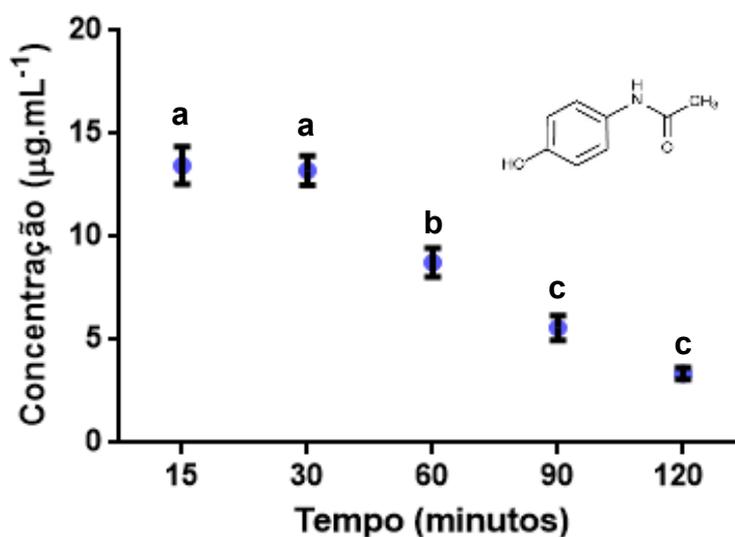
Tempo (minutos)	Concentração Média ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ )	Desvio Padrão
5	-	-
15	1,17 <sup>a</sup>	0,32
30	1,66 <sup>a</sup>	0,55
60	1,19 <sup>a</sup>	0,19
90	1,03 <sup>a</sup>	0,12
120	0,91 <sup>a</sup>	0,23

Nota: A mesma letra indica não haver diferença significativa ( $p < 0,05$ ).

Fonte: A autora, 2016.

A administração da dose de  $50 \text{ mg.kg}^{-1}$  de paracetamol por via oral a ratos fêmeas **grávidas** ( $n = 6$ ) resultou em curva de concentração plasmática *versus* tempo (eliminação) semelhante a obtida com tratamento de fêmeas **não grávidas**, o que indica que a gravidez não alterou o tempo de esvaziamento gástrico (Figura 24). Tanto em fêmeas grávidas quanto não-grávidas a  $T_{\text{max}}$  foi 15 minutos sendo a  $C_{\text{max}}$  registrada para as fêmeas grávidas igual a  $13,46 \mu\text{g.mL}^{-1}$ . Após atingir a  $C_{\text{max}}$ , a concentração plasmática de paracetamol manteve-se no tempo de 30 minutos alta em grávidas ( $13,22 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ) e não grávidas ( $11,50 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ). A partir de 30 minutos nota-se uma diminuição linear da concentração plasmática de paracetamol em função do tempo, tal qual foi observado para o grupo de fêmeas não grávidas. As médias das concentrações plasmáticas do fármaco em função do tempo são demonstradas na tabela 18. A comparação das médias das concentrações plasmáticas de paracetamol em ratos fêmeas grávidas e ratos fêmeas não grávidas é ilustrada na figura 25.

Figura 24 - Médias das concentrações plasmáticas ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) do paracetamol por tempo, após a administração por via oral de dose única de  $50 \text{ mg.kg}^{-1}$  em ratos Wistar fêmeas grávidas.



Nota: Análise estatística realizada por meio do Teste de *Bonferroni* com múltiplas comparações. A mesma letra indica não haver diferença significativa ( $p < 0,05$ ).

Fonte: A autora, 2016.

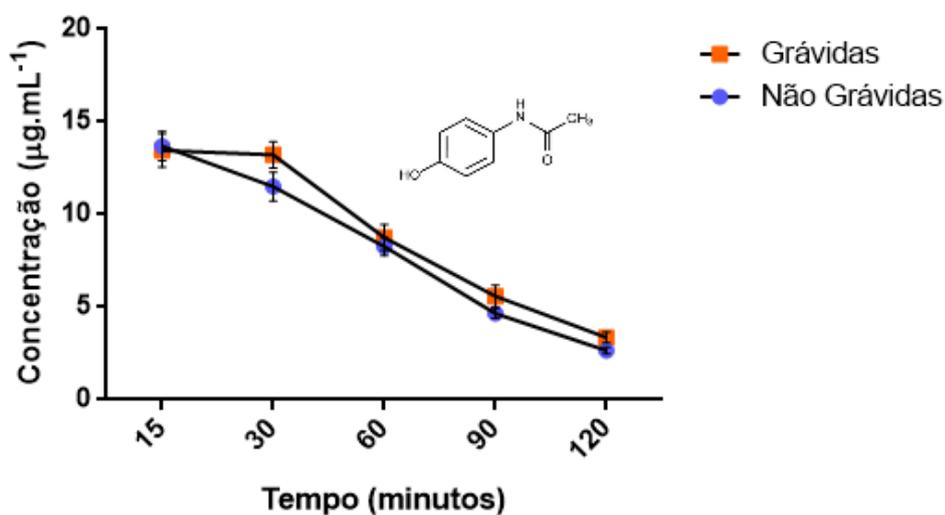
Tabela 18 - Concentrações plasmáticas médias do paracetamol ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) por tempo, após a administração por via oral de dose única de  $50 \text{ mg.kg}^{-1}$  em ratos fêmeas grávidas

Tempo (minutos)	Concentração Média ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ )	Desvio Padrão
15	13,46 <sup>a</sup>	2,22
30	13,22 <sup>a</sup>	1,73
60	8,76 <sup>b</sup>	1,71
90	5,59 <sup>c</sup>	1,45
120	3,37 <sup>c</sup>	0,71

Nota: A mesma letra indica não haver diferença significativa ( $p < 0,05$ ).

Fonte: A autora, 2016.

Figura 25 - Comparação das Médias das concentrações plasmáticas ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) do paracetamol por tempo, após a administração por via oral de dose única de  $50 \text{ mg.kg}^{-1}$  em ratos fêmeas grávidas e não grávidas.



Nota: Não houve diferença significativa entre as médias das concentrações dos dois tratamentos ao longo do tempo ( $p < 0,05$ ).

Fonte: A autora, 2016.

## 6 DISCUSSÃO

A partir do desenvolvimento do método de análise do paracetamol foi possível demonstrar a total ausência de interferentes no intervalo de tempo de retenção ( $t_R = 3,80 \pm 0,20$ ; janela cromatográfica), confirmando a seletividade do método (Figura 14). Foi demonstrado, ainda, (Tabela 3) que apenas mudanças na composição da fase móvel (acetronitrila / água ultrapura acidificada) foram necessárias para a elaboração do método. Outros parâmetros como fase estacionária, fluxo, pH da fase aquosa e temperatura do forno foram mantidos constantes: coluna cromatográfica ACE® 5 C18 (250 mm x 4,6 mm i.d., 5  $\mu\text{m}$ ); fluxo 1,0 mL/min<sup>-1</sup>; pH da fase aquosa 3,0 (ácido acético glacial); temperatura do forno 50 °C. A condição testada que apresentou o melhor fator de capacidade ou separação ( $\alpha = 1,9$ ), simetria de sinal ( $\sim 1,0$ ) e tempo total de análise (6 minutos) também foi **seletiva** para as soluções de tratamento com paracetamol, sulfato de morfina e com metoclopramida (Figuras 9, 10 e 11).

Após o desenvolvimento do método analítico, com base nos parâmetros cromatográficos elencados acima e na seletividade, foi necessário verificar a recuperação do método de extração para, então, proceder com a validação. A recuperação de um método avalia o quanto do analito é recuperado da matriz. A metodologia de extração empregada teve como base a metodologia desenvolvida e validada por Carmo (2015). O método baseia-se na precipitação de proteínas com posterior recuperação do analito em fase líquida com características similares à fase móvel usada em CLAE-DAD (no caso, mistura de acetonitrila/ água acidificada). Diversas condições foram testadas e chegou-se ao melhor resultado como especificado no esquema 2, tendo como base os resultados de recuperação, discutidos a seguir. Para determinação da recuperação do analito com o método empregado foram avaliados três níveis de concentração do paracetamol (0,22; 0,89 e 7,14  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ), nos plasmas de camundongo Suíço, DBA/2 e rato Wistar. Os resultados demonstraram que os menores percentuais de recuperação estão no plasma de rato, variando entre 87,4% e 91,3%. Comparando-se apenas os plasmas de camundongos DBA/2 e Suíços, a variação foi bem pequena entre as concentrações intermediária e alta. Na concentração mais baixa avaliada, o plasma de camundongos DBA/2 foi o que apresentou maior percentual de recuperação com 104,5% (Tabelas 6, 7 e 8). O percentual de recuperação maior do que 100% é explicado por distúrbios de linha base na janela cromatográfica do paracetamol. Durante o processo de validação, se o método analítico for exato e preciso, os valores de recuperação considerados dentro das normas legais estão entre 85% e 115% (ANVISA, 2003; INMETRO, 2007) (admite-se valor de recuperação ideal acima de 80% para matrizes

biológicas) (ANVISA, 2003). Portanto, apesar de pequenas variações nos três níveis de concentração testados e nos três diferentes tipos de plasma, os percentuais de **recuperação** estão dentro dos limites preconizados pela ANVISA (2003). O método de extração do paracetamol tem como principal vantagem o baixo custo. Como desvantagem tem o tempo total de extração que é estimado em 65 minutos.

Uma vez que o método analítico por CLAE-DAD-UV foi desenvolvido e de posse do método de extração para recuperação do analito da matriz, seguiu-se à validação, de acordo com os parâmetros analíticos preconizados pela ANVISA e pelo INMETRO: **linearidade, precisão, exatidão, limite de detecção, limite de quantificação e robustez** (ANVISA, 2003; INMETRO, 2007; ROCA *et al*, 2007; BRITO *et al*, 2003).

A linearidade do método deve ser observada pelos resultados das curvas de calibração, e são necessárias análises de no mínimo 5 concentrações diferentes (réplicas de três para matrizes não biológicas e de seis para matrizes biológicas), em três dias (ANVISA, 2003; INMETRO, 2007). No método elaborado foram utilizados 11 níveis de concentração que variaram entre 0,10 a 28,57  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ , em réplicas de seis, em três dias diferentes. As três curvas analíticas obtidas apresentaram excelente linearidade entre os pontos, com  $r = 0,9996$  (Figura 15). A dispersão entre os pontos foi homogênea e, portanto, homocedástica. Dessa forma, o método desenvolvido pode ser considerado **linear** para as concentrações que correspondem entre 80% e 120% dos valores obtidos com os tratamentos dos camundongos Suíços, DBA/2 e ratos Wistar (ANVISA, 2003; INMETRO, 2007).

A precisão e exatidão de um método analítico são fundamentais para garantir a confiança de medidas repetidas e feitas ao longo do mesmo dia e ao longo de dias diferentes, bem como para avaliar como os dados experimentais se relacionam com dados esperados (teóricos). O método desenvolvido é preciso, pois os resultados do teste de precisão demonstraram coeficientes de variação inferiores a 15 % para medições feitas no mesmo dia e em dias diferentes, além de não haver variação entre as médias intracorrída e intercorrída (Tabela 4). Em relação a exatidão, quando se comparou os valores esperados (teóricos) com os observados (experimentais) (Tabela 5), os resultados mostraram que a menor variação foi de 100,87% para 0,45  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  e a maior foi de 85,51% para 0,15  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ , estando, portanto, dentro dos limites preconizados (85 – 115%). Dessa forma, o método desenvolvido pode ser considerado **exato e preciso** (ANVISA, 2003; INMETRO, 2007).

O método desenvolvido nessa dissertação demonstrou ótima **sensibilidade**,

apresentando limites experimentais de detecção e quantificação do paracetamol de  $30 \text{ ng.mL}^{-1}$  e  $45 \text{ ng.mL}^{-1}$ , respectivamente. Em se tratando de um detector de ultravioleta, espera-se que a detecção fique na escala do nanograma ( $10^{-9}$ ). Substâncias com bom coeficiente de extinção molar, ou seja, aquelas com cromóforos que absorvem fortemente no ultravioleta, terão boa sensibilidade de detecção. Sendo assim, o detector empregado demonstra ser eficiente para detecção e quantificação do paracetamol no plasma nos experimentos dessa Dissertação, já que o menor teor quantificado do analito está cerca de 2,5 vezes acima do limite de quantificação (DBA/2, tempo 120 minutos, tratamento paracetamol + metoclopramida =  $150 \text{ ng.mL}^{-1}$ ).

O método também se mostrou **robusto**, pois as pequenas variações na análise do paracetamol, tais como aumento da taxa de fluxo de 1,0 para  $1,1 \text{ mL.min}^{-1}$ , diminuição da temperatura do forno de  $50^\circ\text{C}$  para  $45^\circ\text{C}$ , mudanças no percentual de acetonitrila na composição de fase móvel, passando de 20 para 21% de ACN e de 80 para 79% de água acidificada, pH da fase aquosa de 3,0 para 3,2 e visualização no comprimento de onda de 250 nm ao invés de 246 nm (Tabela 9), não influenciaram significativamente nas médias das áreas das duas concentrações avaliadas (teste de kruskal-wallis).

Em resumo, o método desenvolvido e validado neste trabalho é adequado para a análise do paracetamol em matriz biológica plasma. A técnica estabelecida permitiu, de acordo com as condições do laboratório, identificar e quantificar o paracetamol de forma simples e com baixo custo.

Diversos métodos analíticos estão disponíveis na literatura para análise do paracetamol, dentre alguns, destacam-se:

- ✓ A 5ª edição da Farmacopéia Brasileira (2010) apresenta uma metodologia de dosagem do paracetamol em comprimidos por CLAE, mas não em matriz biológica plasma. Ao realizar uma comparação entre o método preconizado pela Farmacopéia Brasileira e o método desenvolvido tem-se em comum o uso de uma coluna cromatográfica de sílica quimicamente ligada a um grupo octadecilsilano (RP-18) e o uso de um cromatógrafo provido de detector ultravioleta. A composição da fase móvel preconizada pela Farmacopéia Brasileira (2010) é de uma mistura de 75 % de água e 25 % metanol com um fluxo de  $1,5 \text{ mL.min}^{-1}$ . O método padronizado nessa Dissertação possui uma composição de fase móvel com maior percentual de água (80%), e acetonitrila em substituição do eluente metanol. O fluxo usado de fase móvel para validação da metodologia analítica é menor em comparação ao da Farmacopéia brasileira ( $1,0$

$\text{mL}\cdot\text{min}^{-1} \times 1,5 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1} = 50\%$  maior), o que permite a redução dos custos e diminuição do uso de solventes que são danosos ao meio ambiente;

- ✓ Clausen e colaboradores (2015) desenvolveram um método de análise do paracetamol por CLAE-DAD-UV em uma formulação contendo outros dois ativos, a orfenadrina e a cafeína. A composição de fase móvel (acetonitrila:água, 80:20) e a fase estacionária (Coluna C18) são semelhantes a do método desenvolvido nessa Dissertação. Porém, o pH da fase aquosa (2,5), o fluxo ( $1,2 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ ) e o tempo de análises (7 minutos) diferem, e os valores encontrados para limite de detecção e limite de quantificação foram maiores que o do método desenvolvido ( $50 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$  e  $170 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ , respectivamente) (CLAUSEN *et al*, 2015).
- ✓ Estudo conduzido por Rahman & Niaz (2004) estabeleceu a determinação de paracetamol em plasma humano, utilizando como eluente solução de 1,8% de tetrahidrofurano em 0,01 M de tampão acetato de sódio (pH = 4,5), detector de UV com leitura em 254 nm e fluxo de  $1,0 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ . O limite de detecção encontrado foi bem maior do que o método desenvolvido ( $100 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ).

A rápida absorção do paracetamol descrita na literatura (TYLENOL DC<sup>®</sup>, 2016) foi demonstrada nas duas linhagens de camundongos e nos ratos Wistar fêmeas não grávidas e grávidas do tratamento 1 (apenas paracetamol). Os máximos de concentração plasmática foram alcançados entre 5 e 15 minutos após a administração por via oral em dose única de  $50 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  de fármaco. No entanto, houve variações na concentração plasmática entre os animais.

Os camundongos DBA/2 apresentaram uma concentração plasmática alta de paracetamol após 5 minutos ( $9,52 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ), porém, a  $C_{\text{máx}}$  só foi atingida aos 15 minutos ( $12,52 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ), conforme tabela 10. Em se tratando dos camundongos Suíços, a  $C_{\text{máx}}$  foi atingida em 5 minutos ( $11,18 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ), e em 15 minutos a concentração plasmática diminui a metade ( $6,68 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) (Tabela 13). Conforme demonstram os resultados para ratos Wistar fêmeas não grávidas e grávidas, a  $C_{\text{máx}}$  também é atingida em 15 minutos ( $13,69 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  e  $13,46 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , respectivamente), tal qual para os camundongos DBA/2. Porém, diferente dos camundongos, a concentração plasmática de paracetamol nos ratos Wistar fêmeas diminui linearmente ao longo do tempo (Tabelas 16 e 18).

No tratamento 2 (paracetamol + metoclopramida), como era esperado e já descrito na literatura (GOINEAU *et al*, 2015; SHAUGHNESSY *et al*, 2013; PRESCOTT, 1980), a injeção da metoclopramida previamente a administração do paracetamol acelerou o tempo das  $C_{\text{máx}}$  nos

animais avaliados. Esse efeito se deve a metoclopramida possuir ação antagonista dos receptores dopaminérgicos e devido ao arranjo organizacional que esse fármaco provoca nas atividades gástrica, pilórica e duodenal, aumentando a atividade propulsiva, expulsando com mais rapidez o conteúdo gástrico (SHAUGHNESSY *et al*, 2013; CESARINI & FERREIRA, 1997). Para os camundongos DBA/2, a  $C_{\text{máx}}$  passa do tempo de 15 para 5 minutos (Tabelas 10 e 11). Para os camundongos Suíços, embora a  $C_{\text{máx}}$  tenha sido observada no tempo de 5 minutos após o tratamento com paracetamol puro ou em associação com metoclopramida, há um relevante e significativo ( $p > 0,05$ ) aumento da concentração do paracetamol no tratamento em associação (aumento de  $11,18 \mu\text{g.mL}^{-1}$  para  $21,37 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ). No tempo de 15 minutos as concentrações sofrem significativa diminuição ( $p > 0,05$ ) nos dois tratamentos ( $6,68 \mu\text{g.mL}^{-1}$  e  $3,86 \mu\text{g.mL}^{-1}$  - tratamentos 1 e 2, respectivamente) (Tabelas 13 e 14).

Os resultados obtidos demonstram que o modelo escolhido para estudo de esvaziamento gástrico (paracetamol + metoclopramida) é adequado para verificar aceleração na absorção de fármacos.

Goineau e colaboradores (2015) realizaram um estudo sobre os efeitos da clonidina, loperamida e metoclopramida em dois modelos de esvaziamento gástrico em ratos (vermelho de fenol e monitorização da concentração de paracetamol por CLAE-UV). Os autores compararam os conteúdos estomacais dos ratos através da quantidade restante de vermelho de fenol e também compararam com as concentrações de paracetamol obtidas por CLAE-UV. A monitorização por CLAE-UV nesse estudo foi obtida a partir de amostras de plasma de ratos machos e foram avaliadas nos tempos de 15, 30, 60, 120 e 240 minutos. A dose e a via de administração da metoclopramida foram as mesmas usadas nessa dissertação ( $10\text{mg.kg}^{-1}$ , via subcutânea). Como resultado, os autores citaram que a metoclopramida acelerou o esvaziamento gástrico quando comparado ao grupo controle e aumentou os níveis plasmáticos de paracetamol (GOINEAU *et al*, 2015), como esperado.

O tratamento dos animais com o sulfato de morfina mostrou efeito esperado para esse fármaco que é o retardo do esvaziamento gástrico (MILNE *et al*, 1996; MITTAL *et al*, 1986). Embora as curvas cinéticas obtidas para o tratamento dos camundongos DBA/2 e Suíços e ratos Wistar tenham perfil ligeiramente diferente, é possível verificar a diminuição das concentrações plasmáticas de paracetamol ao longo do tempo para todos os animais que receberam previamente sulfato de morfina (Figuras 18, 21 e 23). Portanto, o modelo escolhido para avaliar o retardo no esvaziamento gástrico é válido (paracetamol + morfina).

O ensaio para detectar alterações do esvaziamento validado nessa Dissertação foi

aplicado ao estudo dos efeitos da gravidez sobre a absorção de fármacos administrados por via oral. Assim investigamos se as concentrações plasmáticas de paracetamol que se seguiram à administração de uma mesma dose por via oral diferiram entre fêmeas (ratos) grávidas e não grávidas. Os resultados (ausência de diferenças de concentrações plasmáticas de paracetamol a cada intervalo pós-tratamento) sugeriram que a gravidez (à termo) não interferiu de forma evidente com o tempo de esvaziamento gástrico (Figura 24, Tabela 18). A ausência de efeito da gravidez sobre o esvaziamento pode ajudar a interpretar os resultados obtidos por estudos anteriores em relação a alterações da cinética da primaquina ao final da gestação de ratos e camundongos. Em estudo com camundongos, Carmo (2015)<sup>15</sup> notou que as concentrações plasmáticas da primaquina em grávidas são inferiores aquelas determinadas em não grávidas a cada intervalo após a administração oral de uma mesma dose do fármaco. Estudo realizado com ratos chegou a resultados semelhantes (CARVALHO, 2016). Sabe-se que as diversas alterações fisiológicas que ocorrem em mulheres grávidas podem influenciar na absorção de fármacos (CONSTANTINE, 2014; SANGHAVI & RUTHERFORD, 2014; CHEUNG & LAFAYETTE, 2013; CHANDRA *et al*, 2012; ZIELINSKI *et al*, 2015), destacando-se alterações no **esvaziamento gástrico** e no **volume de distribuição**. Entretanto como em ratos, a gravidez não alterou de forma discernível o tempo de esvaziamento gástrico essa possibilidade explicativa pode ser excluída.

## 7 CONCLUSÕES

- ✓ O método analítico desenvolvido neste estudo demonstrou ter seletividade adequada para determinação dos níveis de paracetamol, metoclopramida e sulfato de morfina no plasma. Os valores do percentual de recuperação do paracetamol no plasma de camundongos DBA/2 e Suíços e Ratos Wistar estão dentro dos limites preconizados pela ANVISA. Além disso, o método desenvolvido e validado apresentou excelente linearidade, precisão, exatidão e robustez. Os limites de detecção e de quantificação obtidos demonstraram que o método tem boa sensibilidade, sendo os limites de detecção e quantificação inferiores aos dos métodos publicados na literatura;
- ✓ O ensaio escolhido para estudar o efeito de intervenções sobre o esvaziamento gástrico respondeu como esperado ao tratamento com os fármacos metoclopramida e sulfato de morfina, ou seja, detectou o efeito de substâncias que aceleram (metoclopramida) e retardam (morfina) o esvaziamento gástrico sobre a absorção do paracetamol;
- ✓ As concentrações plasmáticas de paracetamol a cada tempo pós-tratamento e as cinéticas de eliminação (curvas da concentração plasmática de paracetamol versus tempo) não diferiram entre fêmeas não grávidas e grávidas (GD 21) sugerindo que a gravidez não altera o tempo de esvaziamento gástrico. Assim, o efeito da gravidez sobre a cinética da primaquina (níveis plasmáticos em grávidas menores do que em não grávidas) constatado no estudo com a administração de primaquina durante a gestação em camundongos<sup>15</sup> e ratos<sup>61</sup> não se deve a alterações do esvaziamento gástrico. Possivelmente outros fatores como alterações do volume de distribuição e ou da metabolização (*clearance*) são responsáveis pelas modificações das concentrações plasmáticas da primaquina durante a gestação.

## REFERÊNCIAS

ACHEAMPONG, A.; ADDAI-ARHIN, S.; APAU, J.; GYASI, W.O.; Development and validation of a RP-HPLC method with PDA detection for the simultaneous estimation of acetylsalicylic acid, paracetamol and caffeine in fixed dose combination tablets. **International Journal of Chemical and Biomolecular Science**. Vol. 1(4): 211-217, 2015.

ACOSTA, A.; CAMILLERI, M.; Prokinetics in Gastroparesis. **Gastroenterology Clinics of North America**. Vol. 44(1): 97-111, 2015.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (Brasil). **Farmacopéia Brasileira**. 5. ed. Brasília, DF, Vol. 2, 2010.

DIMORF® (Sulfato de morfina): comprimidos. Responsável técnico José Carlos Módolo: Itapira, SP: Cristália Prod. Quím. Farm. Ltda, 2014. Bula de remédio. [Disponível em: <[http://www.anvisa.gov.br/datavisa/fila\\_bula/frmVisualizarBula.asp?pNuTransacao=9554002014&pIdAnexo=2278524](http://www.anvisa.gov.br/datavisa/fila_bula/frmVisualizarBula.asp?pNuTransacao=9554002014&pIdAnexo=2278524)>. Acesso em 14 abr 2016].

TYLENOL DC ® (Paracetamol + Cafeína): Comprimidos revestidos. Responsável Técnico Patricia Meneguello da Silva Carvalho: São José dos Campos – SP: Johnson & Johnson INDUSTRIAL Ltda., 2014. Bula de remédio. [Disponível em:<[http://www.anvisa.gov.br/datavisa/fila\\_bula/frmVisualizarBula.asp?pNuTransacao=2666602014&pIdAnexo=2015019](http://www.anvisa.gov.br/datavisa/fila_bula/frmVisualizarBula.asp?pNuTransacao=2666602014&pIdAnexo=2015019)>. Acesso em 15 abr 2016].

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (Brasil). Resolução nº 899, de 29 de maio de 2003. **Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos**. Diário Oficial da União 02 jun 2003.

ALTAMIMI, M.I.; CHOONARA, I.; SAMMONS, H.; Inter-individual variation in morphine clearance in children. **Eur J Clin Pharmacol**. Vol.71: 649–655, 2015.

ALTUN, M.L.; HPLC method for the analysis of paracetamol, caffeine and dipyron. **Turk J Chem**. Vol. 26: 521-528, 2002.

AMERICAN SOCIETY OF HEALTH-SYSTEM PHARMACISTS. 2014. [Disponível em: <<https://www.nlm.nih.gov/medlineplus/druginfo/meds/a681004.html>>. Acesso em 19 jan 2016].

ATTIMARAD, M.; Simultaneous determination of paracetamol and lornoxicam by RP-HPLC in bulk and tablet formulation. **Pharm. Methods**. Vol. 2(1):61-66, 2011.

BASSINGTHWAIGHTE, J.B.; BUTTERWORTH, E.; JARDINE, B.; RAYMOND, G.M.; Compartmental modeling in the analysis of biological systems. **Methods Mol. Biol.**; Vol. (929):391-438, 2012.

BOSCH, M.E.; SANCHEZ, A.J.R.; ROJAS, F.S.; OJEDA, C.B.; Determination of paracetamol: Historical evolution. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**. Vol. 42(3) 291–321, 2006.

BRITO, N.M.; JUNIOR, O.P.A.; POLESE, L.; RIBEIRO, M.L.; Validação de métodos analíticos: estratégia e discussão. **Pesticidas: R. Ecotoxicol. E Meio Ambiente**. Curitiba. Vol.13:129-146, 2003.

CALINESCU, O.; BADEA, I.A.; VLĂDESCU, L.; MELTZER, V.; PINCU, E.; HPLC Separation of Acetaminophen and its Impurities Using A Mixed-mode Reversed-Phase/Cation Exchange Stationary Phase. **Journal of Chromatographic Science**. Vol. 50:335–342, 2012.

CARMO, A.P.B.; Estudo das alterações farmacocinéticas da primaquina durante a Gravidez e na Malária. **[Dissertação]**. Rio de Janeiro. 2015.

CARVALHO, L.R.; Farmacocinética do fármaco antimalárico primaquina em ratas grávidas e não grávidas. **[Dissertação]**. Rio de Janeiro. 2016.

CASCONE, S.; LAMBERTI, G.; TITOMANLIO, G.; PIAZZA, O; Pharmacokinetics of remifentanil: a three-compartmental modeling approach. **Transl. Med.** vol. 7(4): 18-22, 2013.

CESARINI PR, FERREIRA SRG, S.A. Gastroparesia diabética. **Rev Ass Med Brasil**. Vol. 43(2): 163-168, 1997.

CEFET QUÍMICA. Cromatografia líquida de alta resolução. [Disponível em: <[http://www.ifrj.edu.br/webfm\\_send/546](http://www.ifrj.edu.br/webfm_send/546)>. Acesso em 19 jan 2016].

CHANDRA, S.; TRIPATHI, A.K.; MISHRA, S.; AMZARUL, M.; VAISH, A.K.; Physiological changes in hematological parameters during pregnancy. **Indian J Hematol Blood Transfus**. Vol. 28(3):144–146, 2012.

CHEUNG, K.L.; LAFAYETTE, R.A.; Renal physiology of pregnancy. **Adv Chronic Kidney Dis.**; Vol. 20(3): 209–214, 2013.

CLAUSEN, D.N.; OLIVEIRA, F.M.; CASARIN, J.; SARTORI, E.R.; TARLEY, C.R.T.; Desenvolvimento de método por CLAE para quantificação de orfenadrina, paracetamol e cafeína em formulações farmacêuticas. **Rev. Virtual Quim**. Vol. 7 (6): 2066-2079, 2015.

COSTANTINE, M.; Physiologic and pharmacokinetic changes in pregnancy. **Front. Pharmacol**. Vol. 5 (65), 2014.

CHEN, L.K.; CHEN, S.S.; HUANG, C.H.; YANG, H.J.; LIN, C.J.; CHIEN, K.L.; *et al.* Polymorphism of mu-Opioid Receptor Gene (OPRM1:c.118A>G) Might Not Protect against or Enhance Morphine-Induced Nausea or Vomiting. **Pain research and treatment**. Vol. 2013 (ID 259306), 2013.

DEVILLIERS, M; BUSSEROLLES, J.; LOLIGNIER, S.; DEVAL, E.; PEREIRA, V; ALLOUI, A., *et al.* Activation of TREK-1 by morphine results in analgesia without adverse side effects. **Nature communications**. Vol. 4: 2941, 2013.

DICKINSON, R.S.; MORJARIA, J.B.; WRIGHT, C.E.; MORICE, A.H.; Is opiate action in cough due to sedation? **Therapeutic advances in chronic disease**. Vol. 5 (5):200-205, 2014.

DUARTE, D.F.; Farmacocinética e farmacodinâmica dos anestésicos venosos. **Rev. Bras.**

**Anesthesiol.** Vol. 44(1): 35-42, 1994.

GLARE, P.A.; WALSH, T.D.; Clinical pharmacokinetics of morphine. **Ther Drug Monit.** Vol.13(1):1-23, 1991.

GOINEAU, S.; GUILLAUME, P.; CASTAGNÉ, V; Comparison of the effects of clonidine, loperamide and metoclopramide in two models of gastric emptying in the rat. **Fund. & Clin. Pharmacol.** Vol. 29: 86-94, 2015.

HAYWARD, K.L.; POWELL, E.E.; IRVINE, K.M.; MARTIN, J.H.; Can paracetamol (acetaminophen) be administered to patients with liver impairment? **British Journal of Clin. Pharmacol.** Vol. 81(2): 210-222, 2016.

HIRATA, E.S.; MESQUITA, M.A.; FILHO, G.A.; TERRA, C.H.; O Esvaziamento Gástrico e a Insuficiência Renal Crônica. **Rev. Bras. Anesthesiol.**; 57: 4: 421-430, 2007.

ICH-Q2A; **International conference on harmonization (ICH) of technical requirements for the registration of pharmaceuticals for human use, validation of analytical procedures.** Geneva. 1995.

ICH-Q2B; **International Conference on Harmonization (ICH) of Technical Requirements for the Registration of Pharmaceuticals for Human Use, validation of analytical procedures: Methodology.** Geneva. 1996.

INMETRO - Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia. DOQ-CGCRE-008 - **Orientação sobre validação de Métodos analíticos.** Revisão 02, 2007. Disponível em: [http://www.inmetro.gov.br/Sidoq/Arquivos/CGCRE/DOQ/DOQ-CGCRE8\\_02.pdf](http://www.inmetro.gov.br/Sidoq/Arquivos/CGCRE/DOQ/DOQ-CGCRE8_02.pdf)

LANÇAS, F.M.; A Cromatografia Líquida Moderna e a Espectrometria de Massas: finalmente “compatíveis”? **Scientia Chromatographica.** Vol. 1 (2), 2009.

LEITÃO, B.M.; BARTOLO, M.J.; MARQUES, J.; CASTRO, J.P.; **Modelos compartimentais.** 2005; Disponível em: [http://www.fis.uc.pt/data/20042005/apontamentos/apnt\\_1354\\_42.pdf](http://www.fis.uc.pt/data/20042005/apontamentos/apnt_1354_42.pdf). Acesso em 15 abr 2016].

MEISSNER, K.; AVRAM, M.J.; YERMOLENKA, V.; FRANCIS, A.M.; BLOOD, J.; KHARASCH, E.D.; Cyclosporine-inhibitable blood-brain barrier drug transport influences clinical morphine pharmacodynamics. **Anesthesiology.** Vol.119 (4):941-53, 2013.

MILNE, R.W.; NATION, R.L.; SOMOGYI, A.A.; The disposition of morphine and its 3- and 6-glucuronide metabolites in humans and animals, and the importance of the metabolites to the pharmacological effects of morphine. **Drug metabolism reviews.** Vol. 28(3):345-472, 1996.

MORETTO, L.D.; MASTELARO, R.; Manual das denominações comuns brasileiras. **SINDUSFARMA.** São Paulo., 2013 (16).

MITTAL, R.K.; FRANKC, E.B.; LANGE, R.C.; MC CALLUM, R.W.; Effects of morphine and naloxone on esophageal motility and gastric emptying in man. **Diq. Dis. Sci.**; Vol. 31 (9), 936-42, 1986.

NOGUEIRA, N.M.; SOARES, B.T.M.; ANDRADE, A.B.N.; SINGH, A.K.; Méritos comparativos da cromatografia em fase líquida de alta eficiência em escala convencional e minituarizada. **Rev. Bras. de Farm.** Vol. 92(2):44-50, 2011.

NETO, M.G.; Modelagem farmacocinética e análise de sistemas lineares para predição da concentração de medicamentos no corpo humano. [**Dissertação**]. São Paulo: 2012.

NETO, A.J.S.; Como obter maior eficiência com partículas superficialmente porosas em HPLC. **Scientia Chromatographica**. Vol. 3(1):65-87, 2011.

PALLASCH, T.J.; Principles of pharmacotherapy: II.Pharmacokinetics. **Anesth. Prog.** Vol. (35): 133-146, 1988.

PAVEK, P.; CECKOVA, M.; STAUD, F.; Variation of drug kinetics in pregnancy. **Curr. Drug. Metab.** Vol. 10:520-529, 2009.

PEREIRA, D.G.; Importância do metabolismo no planejamento de fármacos. **Quím. Nova**. Vol. 30: 171-177, 2007.

PRESCOTT, L.F.; Kinetics and metabolism of paracetamol and phenacetin. **Br. J. Clin. Pharmac.** Vol. 10: 291-298, 1980.

RAFFA, R.B.; PERGOLIZZI, J.V.; TAYLOR, R.; DECKER, J.F.; PATRICK, J.T.; Acetaminophen (paracetamol) oral absorption and clinical influences. **Pain Practice**. Vol. 14: 668-677, 2014.

RAHMAN, N.U.; NIAZ, U.; HPLC assay for paracetamol and sulfapyridine in human plasma as markers of gastric emptying and orocecal transit. **J.Med.Sci.**, Vol. 4 (3): 232-235, 2004.

RANG, H.P.; DALE, M.M.; RITTER, J.M.; GARDNER, P.; Farmacologia. 6ª ed. **Elsevier**. 2007.

ROCA, M.F.L.; SOBRINHO, J.L.S.; NUNES, L.C.C.; NETO, P.J.R.; Desenvolvimento e validação de método analítico: passo importante na produção de medicamentos. **Rev. Bras. Farm.** Vol. 88(4): 177-180, 2007.

SHAUGHNESSY, T.K.; LARSON, K.J.; POLAKOWSKI, J.S.; MARTIN, R.L.; Pharmacological comparison of peristaltic effects in rats and mice. **Journal of Pharmacological and Toxicological Methods**. Vol. 67: 129-133, 2013.

SANGHAVI, M.; RUTHERFORD, J.D.; Cardiovascular management in pregnancy: Cardiovascular physiology of Pregnancy. **Circulation**. Vol. 130:1003-1008, 2014.

SEBBEN, V.C.; LUGOCH, R.W.; SCHLINKER, C.S.; ARBO, M.D.; VIANNA, R.L.; Validação de metodologia analítica e estudo de estabilidade para quantificação sérica de paracetamol. **J Bras Patol Med Lab**. Vol. 46 (2):143-148, 2010.

SEQUINEL, R.; Desenvolvimentos de novos procedimentos analíticos para a determinação de paracetamol em amostras de medicamentos. [**Dissertação**] Araraquara:Universidade Estadual Paulista, Instituto de Química. 2008.

SNYDER, L.R.; KIRKLAND, J.J.; GLAJCH, J.L. Practical HPLC method development. 2<sup>nd</sup> ed. New York: **Wiley-Interscience**, 1997.

STORPIRTIS, S.; GAI, M.N.; DE-CAMPOS, D.R.; GONÇALVES, J.E.; Farmacocinética Básica e Aplicada. Rio de Janeiro: **Guanabara Koogan**; 2011.

U.S. FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. Disponível em: <<http://www.fda.gov/Drugs/DrugSafety/InformationbyDrugClass/ucm165107.htm>>. Acesso em 19 Jan 2016].

VAN DER MEER, Y.G.; VENHUIZEN, W.A.; HEYLAND, D.K.; VAN ZANTEN, A.R.; Should we stop prescribing metoclopramide as a prokinetic drug in critically ill patients? **Critical care** (London, England). Vol.18 (5):502, 2014.

WILBY, K.J.; ENSOM, M.H.; Pharmacokinetics of antimalarials in pregnancy a systematic review. **Clin. Pharmacokinet.** Vol. 50: 705-723, 2011.

ZIELINSKI, R.; SEARING, K.; DEIBEL, M.; Gastrointestinal distress in pregnancy: prevalence, assessment, and treatment of 5 common minor discomforts. **J Perinat Neonatal Nurs.** Vol. 29(1):23-31, 2015.