

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

**MODELAGEM FARMACOCINÉTICA POPULACIONAL DA GLIMEPIRIDA EM
RATOS SADIOS E DIABÉTICOS**

Jaqueline Schneider Izolan Fabricio

Porto Alegre, 2016

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

MODELAGEM FARMACOCINÉTICA POPULACIONAL DA GLIMEPIRIDA EM
RATOS SADIOS E DIABÉTICOS

Dissertação apresentada por **Jaqueline Schneider Izolan
Fabricio** para obtenção do GRAU DE MESTRE em Ciências
Farmacêuticas

Orientadora: Profa. Dra. Bibiana Verlindo de Araujo

Porto Alegre, 2016

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, em nível de Mestrado, da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e aprovada em 05.04.2016 pela banca examinadora constituída por:

Profe. Dr. Cássia Virginia Garcia
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Profe. Dr. Sandra Elisa Haas
Universidade Federal do Pampa

Prof. Dr. Teresa Cristina Tavares Dalla Costa
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

CIP - Catalogação na Publicação

Schneider Izolan Fabricio, Jaqueline
MODELAGEM FARMACOCINÉTICA POPULACIONAL DA
GLIMEPIRIDA EM RATOS SADIOS E DIABÉTICOS / Jaqueline
Schneider Izolan Fabricio. -- 2016.
99 f.

Orientadora: Bibiana Verlindo de Araujo.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do
Rio Grande do Sul, Faculdade de Farmácia, Programa
de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Porto
Alegre, BR-RS, 2016.

1. Farmacocinética plasmática. 2. Modelagem
Farmacocinética. 3. Glimепirida. I. Verlindo de
Araujo, Bibiana , orient. II. Título.

Este trabalho foi desenvolvido no Centro Bioanalítico de Medicamentos e no Laboratório 405 da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. A autora recebeu bolsa de estudos da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

“A paciência é amarga, mas seu fruto é doce.”

Jean Jacques Rousseau

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais Laércio e Rosani pelos incentivos, ensinamentos e por construir meu caráter mostrando sempre a importância de estudar.

Ao meu amor Daniel, exemplo de persistência e dedicação. Agradeço pelo companheirismo, incentivos diários, paciência e carinho.

Aos meus colegas do CBIM: Priscila, Fernando, Daiane, Izabel, Bruna, Carolina, Juliana, Natália, Eduardo, João Victor, Letícia, Victória, Graziela e Fernanda pelos momentos de trocas e discussões. Como também pelos momentos de amizade e descontração.

À Andressa Braga pelo companheirismo e colaboração durante esses dois anos.

À Maiara Pigatto pela dedicação e contribuição de extrema importância na modelagem dos dados deste trabalho.

Agradeço de forma geral as amigas verdadeiras que surgiram ao longo deste período.

Ao Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas da UFRGS pela oportunidade em desenvolver este trabalho.

À CAPES pela bolsa de estudos que possibilitaram dedicação exclusiva a este trabalho.

À minha orientadora Profa. Dra. Bibiana Verlindo de Araujo não somente pela orientação deste trabalho, mas por toda a contribuição dada na minha formação acadêmica. Obrigada!

RESUMO

Objetivos: O objetivo deste estudo foi avaliar a influência do Diabetes Mellitus do tipo 2 na farmacocinética da glimepirida em ratos Wistar e descrever o perfil através de modelo farmacocinética populacional (popPK). **Metodologia:** Os experimentos com animais foram aprovados pelo CEUA/UFRGS (protocolo #27892). O diabetes foi induzido com administração intraperitoneal de 100 mg/kg de nicotinamida, 15 minutos antes da administração intravenosa de 65 mg/kg de STZ. Os animais com nível de glicemia > 250 mg/dL foram considerados diabéticos. A glimepirida foi administrada na dose de 5 mg/kg via i.v. nos animais saudáveis (n = 11) e diabéticos (n = 9) e quantificada por CLAE-UV. A ligação às proteínas plasmáticas foi determinada por método de ultracentrifugação (Centrifree[®]). A análise farmacocinética não compartimental (software Phoenix[®]) foi realizada, assim como a modelagem farmacocinética populacional (software Monolix[®]). **Resultados e Discussão:** A metodologia analítica para quantificação da glimepirida em plasma foi desenvolvida e validada, seguindo os critérios do FDA, apresentou sensibilidade, exatidão e precisão. O modelo de indução da diabetes produziu glicemia > 250 mg/dL. A ligação às proteínas plasmáticas não foi afetada pela doença ($LPP_{\text{Saudáveis}} = 99,3 \pm 0,09\%$, $LPP_{\text{Diabéticos}} = 99,13 \pm 0,075\%$, $p > 0,05$). O modelo farmacocinético populacional estrutural de 2 compartimentos com eliminação de primeira-ordem com covariável categórica (diabetes), foi usado para descrever os perfis plasmáticos de concentração-tempo da glimepirida após administração intravenosa na dose de 5 mg/kg a ratos saudáveis e diabéticos. O CL e a $ASC_{0-\text{inf}}$ dos animais diabéticos foram estatisticamente diferentes dos animais saudáveis, $CL_{\text{pop Saudáveis}} = 0,066 \text{ L/h}$ para $CL_{\text{pop diabéticos}} = 0,024 \text{ L/h}$ e $ASC_{\text{pop saudáveis}} = 19,24 \mu\text{g/mL.h}$ para $ASC_{\text{pop diabéticos}} = 59,64 \mu\text{g.h/mL}$, indicando que a eliminação foi alterada nos animais diabéticos induzidos STZ. **Conclusões:** A modelagem possibilitou identificação do parâmetro que atribuiu variabilidade entre os grupos. Desta forma, a variabilidade inter-individual foi quantificada e incluída no modelo. O modelo popPK final, nos permitiu elucidar os fatores que afetam a farmacocinética da glimepirida e prever mudanças na exposição em uma população específica.

Palavras-chave: Glimepirida, CLAE-UV, farmacocinética, modelo experimental de diabetes, ratos.

ABSTRACT

Population Pharmacokinetics Modeling of Influence of Diabetes Mellitus Type 2 in Pharmacokinetics Glimepiride in Rats

Objective: The aim of this study was to evaluate the influence of diabetes mellitus type 2 on the pharmacokinetics of glimepiride in rats and describe the profile in population pharmacokinetic model (popPK). Methods: The experiments with animals were approved by CEUA/UFRGS (protocol number). The diabetes was induced by intraperitoneal administration of NA (100 mg/kg) dissolved in saline 15 min before an intravenous administration of 65 mg/kg STZ in citrate buffer (pH 4.5) to overnight fasted rats. Animals with blood glucose level > 250 mg/dL were considered diabetic. After administered of glimepiride at a dose of 5 mg/kg i.v. *bolus* in healthy (n = 11) and diabetic animals (n = 9). Method HPLC-UV developed and validated quantified plasma concentrations. The plasma protein binding was determined by method ultracentrifugation (Centrifree®). Non-compartmental analysis of pharmacokinetic in Phoenix® software was performed, as well as the model pharmacokinetic population using Monolix®. Performed by Student's t-test for SigmaStat® software. Results and Discussion: The HPLC-UV method for quantification of glimepiride in plasma was developed and validated following requirements by FDA showing sensitivity, accuracy and precision. Induced diabetes model produced glucose > 250 mg / dL. The plasma protein binding was not affect by the disease (LPPSaudáveis = 99.3 ± 0.09%, LPPDiabéticos = 99.13 ± 0.075%, p > 0.05). The model pharmacokinetic population 2 compartments with eliminating first-order with categorical covariates diabetic was used to describe the plasma profile concentration-time glimepiride. The CL and AUC 0-inf of diabetic animals were significantly different. In healthy animals was Cl_{pop} Healthy = 0.066 L/h for diabetics Cl_{pop} = 0.024 L/h and healthy ASC_{pop} = 19.24 g/mL.h ASC_{pop} for diabetics = 59.64 g/mL.h, indicating that elimination was decreased in induced diabetic rats STZ. Conclusions: popPk enabled identification of the parameter assigned variability between the groups. Thus, the inter subject variability was measured and included in the model. The PBPK final model, allowed us to elucidate the factors that affect the pharmacokinetics of glimepiride and predict changes in exposure in a specific population.

Key-words: Glimepiride, HPLC-UV, pharmacokinetics, plasma.

TABELAS

REVISÃO DA LITERATURA

Tabela 1. Parâmetros de glicose plasmática para diagnóstico da Diabetes Mellitus.....	33
Tabela 2. Algumas características importantes das sulfoniluréias após administração oral.....	39

CAPÍTULO 1

Tabela 1. Precisão intra e inter-dia e Exatidão para determinação de glimepirida em plasma de ratos.....	54
Tabela 2. Estabilidade da glimepirida em plasma de ratos.....	56
Tabela 3. Parâmetros farmacocinéticos determinados pela análise não compartimental.....	58

CAPÍTULO 2

Tabela 1. Parâmetros farmacocinéticos da análise não compartimental em ratos saudáveis e diabéticos.....	72
Tabela 2. Estimativas dos parâmetros do modelo PK final da Glimepirida.....	76

FIGURAS

REVISÃO DA LITERATURA

Figura 1. Estruturas químicas das Sulfoniluréias	38
--	----

CAPÍTULO 1

Figura 1. Estrutura química da glimepirida.....	49
---	----

Figura 2. Cromatograma de plasma branco (a), plasma contaminado com glimepirida (1,15 µg/mL) e diazepam PI (1 µg/mL) (b) plasma coletado de rato	55
--	----

Figura 3. Perfil médio das concentrações plasmáticas da glimepirida <i>versus</i> tempo após administração intravenosa em ratos Wistar saudáveis.....	57
---	----

CAPÍTULO 2

Figura 1. Perfil médio das concentrações plasmáticas da glimepirida <i>versus</i> tempo após administração intravenosa em ratos Wistar saudáveis e diabéticos..	72
---	----

Figura 2. Modelo mamilário de 2 compartimentos com parametrização em micro constantes.....	73
--	----

Figura 3. Perfis plasmáticos individuais e populacionais após modelagem não-linear de efeito misto após dose única intravenosa de 5 mg/kg de Glimepirida (n = 20; 1-11 – saudáveis e 12-20 - diabéticos). Pontos pretos: observações; linha sólida: perfis individuais preditos; linha pontilhada: perfis populacionais preditos.	77
---	----

Figura 4. Gráficos de qualidade do ajuste do modelo popPK final. No gráfico de observações vs. predições populacionais e individuais (à esquerda), a linha de regressão linear é mostrada (linha preta) juntamente com a linha de identidade (linha pontilhada), enquanto os gráficos de resíduos (à direita) representam a tendência dos dados.....	77
--	----

Figura 5. *Visual predictive check* (VPC) do modelo popPK final baseado em 1000 replicatas simuladas a partir dos dados originais. Os *pontos cinzas* representam as observações ($n = 20$); as *linhas sólidas* representam os percentis 10th, 50th e 90th dos dados observados; as *linhas pontilhadas* representam os percentis 10th, 50th e 90th dos dados simulados; as *áreas cinzas sombreadas* representam o intervalo de predição de 90%..... 77

LISTA DE ABREVIATURAS

ASC _{0-∞}	Área sob a curva do tempo zero ao infinito
ASC _{ext}	Área sob a curva extrapolada
ASC _{0-t}	Área sob a curva do tempo zero ao tempo “t”
CL	<i>Clearance</i>
CLAE-UV	Cromatografia líquida de alta eficiência com detector Ultravioleta
CL _{tot}	<i>Clearance</i> total
C _{máx}	Concentração máxima
CQ	Controle de qualidade
CQA	Controle de qualidade alto
CQB	Controle de qualidade baixo
CQM	Controle de qualidade médio
DD	Dose diária
DMNID	Diabetes <i>mellitus</i> não-insulino-dependente
DP	Desvio Padrão
DPR	Desvio Padrão Relativo
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
fu	Fração livre
GLM	Glimepirida
HbA1c	Hemoglobina glicada A1c

i.v.	Administração intravenosa
i.p.	Administração intraperitoneal
k_e	Constante de velocidade de eliminação
LIQ	Limite inferior de quantificação
LPP	Ligação as proteínas plasmáticas
MRT	<i>Mean residence time</i> (tempo de residência médio)
n	Tamanho amostral
NA	Nicotinamida
PI	Padrão interno
popPK	Modelagem Farmacocinética Populacional
f_R	Excretado de forma inalterada via renal
STZ	Estreptozotocina
SUs-R	Receptor das sulfoniluréias
Sus	Sulfoniluréias
$t_{1/2}$	Meia-vida
$t_{máx}$	Tempo para atingir a concentração máxima
TOTG	Teste de tolerância à glicose
Vd	Volume de distribuição
λ	Constante de velocidade de eliminação (abordagem não-compartimental)

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	9
1. INTRODUÇÃO	23
2. OBJETIVOS	27
2.1 Objetivo Geral	29
2.2 Objetivos específicos	29
3. REVISÃO DA LITERATURA	31
3.1 Diabetes Mellitus	33
3.2 Tratamentos para o Diabetes Tipo 2	35
3.1.1 Biguanidas	35
3.1.2 Meglitinidas	36
3.1.3 Tiazolidinedionas	36
3.1.4 Inibidores da α -glicosidase	37
3.1.5 Terapias a base de incretinas	37
3.1.6 Inibidores da DPP-4	38
3.2.7 Sulfoniluréias	38
3.3 Glimepirida	40
3.4 Modelos animais aplicados na investigação de antidiabéticos	42
3.5 Influência do diabetes sob a farmacocinética dos fármacos	43
CAPÍTULO 1: VALIDAÇÃO MÉTODO BIOANALÍTICO DE CLAE-UV PARA QUANTIFICAÇÃO DE GLIMEPIRIDA EM PLASMA E APLICAÇÃO EM ESTUDOS DE FARMACOCINÉTICA	47
CAPÍTULO 2: MODELAGEM FARMACOCINÉTICA POPULACIONAL DA GLIMEPIRIDA EM RATOS SADIOS E DIABÉTICOS	63
4 DISCUSSÃO GERAL	83
5 CONCLUSÕES	87
REFERÊNCIAS	91
ANEXOS	97

O diabetes mellitus (DM) é uma doença metabólica que se origina de uma variedade de mecanismos patogênicos, resultando em hiperglicemia. Ela está classificada em tipo 1, tipo 2 e gestacional (Brunton et al., 2012).

Segundo a Federação Internacional do Diabetes (IDF) cerca de 90% dos casos de diabetes mellitus no mundo são do Tipo 2. Isso pode ser atribuído ao crescimento e envelhecimento populacional, à crescente prevalência da obesidade e sedentarismo, bem como a maior sobrevivência do paciente com diabetes. A hiperglicemia crônica não tratada pode levar a danos microvasculares e aceleração no desenvolvimento de problemas cardíacos (Cascio et al., 2012).

Para reduzir os danos diretos e indiretos relacionados ao diabetes é fundamental garantir um bom controle dos níveis glicêmicos, os quais podem ser alcançados, sob o ponto de vista farmacoterapêutico, através do uso de agentes hipoglicemiantes orais, anti-hiperglicemiantes, e em alguns casos, uso de insulina exógena (Silva, 2006; IDF, 2015).

Neste contexto, a metformina é o fármaco de primeira escolha no tratamento do diabetes tipo 2, indicada a pacientes que estão acima do peso ou obesos (Nice, 2008; Rojas, 2013). Seu mecanismo de ação consiste em suprimir a produção de glicose hepática e aumentar a sensibilidade insulínica aos tecidos periféricos, obtendo como ação farmacológica, a redução nos níveis plasmáticos de glicose basal e pós-prandial. Pode ser utilizado em monoterapia associado a prática de exercícios físicos e mudanças no estilo de vida, ou em associação com outros antidiabéticos (Gong et al., 2012).

Em pacientes de baixo peso corporal, ou para os quais o uso de metformina é contraindicada, e que necessitam de uma resposta rápida ao tratamento da hiperglicemia, as sulfoniluréias são os fármacos de escolha para o tratamento do diabetes *mellitus* tipo 2 (Nice, 2008; HEMMINGSEN et al., 2014).

As sulfoniluréias mais utilizadas atualmente são as de segunda geração representadas pela: glimepirida, glibenclamida, gliclazida e glipizida (HEMMINGSEN et al., 2014).

Segundo Langtry e Balfour (1998) a glimepirida possui eficácia semelhante as demais sulfoniluréias, no entanto, é capaz de reduzir a glicose plasmática mais

rapidamente que a gliclazida e glipizida, e gerar menos efeitos adversos como hipoglicemia e danos cardiovasculares que a glibenclamida. Sendo assim, é o fármaco mais seguro e eficaz dessa classe de hipoglicemiantes.

A glimepirida é um agente antidiabético oral cujas doses efetivas variam de 1 a 8 mg ao dia, administrada em dose única, seguida de alimentação. O fármaco se liga aos receptores das células β -pancreáticas, onde atua nos canais de potássio causando uma despolarização da membrana e a liberação de insulina.

O tratamento eficaz do diabetes *mellitus* do tipo 2 ainda é um desafio para a comunidade médica. Conseguir compreender com clareza os efeitos da doença sobre a farmacocinética dos fármacos é de extrema importância para um desenvolvimento de uma farmacoterapia mais adequada. Neste contexto, os estudos com animais para compreensão dos mecanismos fisiopatológicos do estado diabético e suas complicações são alternativas viáveis para esse entendimento. A indução química do diabetes em roedores é uma alternativa para a obtenção do estado diabético.

A estreptozotocina (STZ) é um agente químico amplamente utilizado como indutor do diabetes em animais. A sua similaridade molecular com a glicose faz com que a STZ seja facilmente transportada para dentro das células através receptor transportador de glicose 2. Dentro das células, a STZ gera efeitos tóxicos seletivos para células β , gerando apoptose. Com o objetivo de induzir uma diabetes mais branda e semelhante o diabetes tipo 2 em humanos, o uso da nicotinamida é relatado como agente protetor, pois sua ação antioxidante reduz a ação tóxica da STZ, mantendo parte das células β viáveis.

A influência do diabetes na farmacocinética da glimepirida ainda não foi relatada na literatura. A fim de modular e identificar as variações farmacocinéticas causadas pela doença, os dados obtidos após administração de 5 mg/kg de glimepirida em ratos Wistar saudáveis e diabéticos, foram determinados e modelados por abordagem populacional aplicando um modelo não-linear de efeito misto.

2.1 Objetivo Geral

Avaliar a influência do Diabetes Mellitus do tipo 2 induzido quimicamente por estreptozotocina/nicotinamida na farmacocinética da glimepirida em ratos Wistar, após administração da dose de 5 mg/kg por via intravenosa (i.v).

2.2 Objetivos específicos

- Desenvolver e validar metodologia analítica para quantificação de glimepirida em plasma por cromatografia líquida de alta eficiência com detecção ultravioleta;
- Avaliar a farmacocinética plasmática após dose de 5 mg/kg intravenosa de glimepirida a ratos Wistar machos saudáveis e diabéticos induzidos por estreptozotocina/nicotinamida;
- Estabelecer o modelo farmacocinético para caracterizar o perfil plasmático de concentração *versus* tempo e modelar os dados plasmático utilizando ferramenta de modelagem populacional através do software Monolix versão 4.3.3.

3.1 Diabetes Mellitus

O Diabetes Mellitus é uma doença metabólica crônica caracterizada pelo aumento dos níveis de glicose sanguínea denominada hiperglicemia. A hiperglicemia ocorre pela ausência ou redução na produção de insulina pelo pâncreas. A insulina é um hormônio responsável pelo transporte da glicose para as células do organismo onde é convertida em energia. Os efeitos crônicos da doença incluem danos renais, cardíacos, no sistema nervoso central e nos vasos sanguíneos. Ela está classificada em tipo 1, tipo 2 e gestacional (Brunton et al., 2012).

O diabetes *mellitus* tipo 1 origina-se principalmente por consequência de reação auto-imune, em que as células de defesa do organismo atacam as células β -pancreáticas secretoras de insulina. Ela é diagnosticada em geral em crianças e adultos jovens e relacionada principalmente a fatores genéticos (Grant et al., 2010).

O diabetes tipo 2, também conhecida como diabetes *mellitus* não-insulino-dependente (DMNID), é comumente manifestada em indivíduos na idade adulta (Brunton et al., 2012). É caracterizada pela desensibilização da insulina nos tecidos como músculo esquelético, fígado e tecido adiposo e pela deficiência na produção de insulina pelas células β -pancreáticas, resultando em hiperglicemia crônica e distúrbios no metabolismo de carboidratos, proteínas e gorduras (Olokoba et al., 2012). O estilo de vida sedentário, a falta de atividade física, obesidade e ingestão de uma dieta altamente calórica e rica em gorduras são fatores que contribuem para o desenvolvimento da doença (Forbes, 2013). A condição de hiperglicemia há longo prazo traz enormes prejuízos ao sistema cardiovascular, neurológico, renal e oftálmico (Fujioka, 2007; Biessels et al., 2006).

O diagnóstico do diabetes, conforme a Organização Mundial da Saúde (OMS) e o Diabetes Care (2015), é baseada no nível de glicemia em jejum, no valor da glicemia depois de uma administração oral de glicose e no nível de hemoglobina glicada A1c (HbA1c), conforme índices de referência descritos na Tabela 1. A medida do nível de glicemia em jejum é amplamente utilizada devido sua conveniência e baixo custo. Já HbA1c, um marcador dos níveis de glicemia que vem sendo cada vez mais utilizado para diagnosticar o diabetes pois ele infere a concentração média da glicemia no sangue ao longo de um período de 2 a 3

meses. É importante para uma avaliação mais crítica e apurada do estado glicêmico dos pacientes a complementação dos resultados de HbA1c com os outros testes descritos.

Tabela 1. Parâmetros de glicose plasmática para diagnóstico da Diabetes *Mellitus*.

CATEGORIA	Jejum (mg/dL)	TOTG (mg/dL)	HbA1c (%)
Glicemia Normal	< 100	< 140	
Glicose plasmática de jejum alterada	≥ 100 e < 126		
Tolerância diminuída à glicose	< 126	140 e < 200	
Diabetes mellitus	≥ 126	≥ 200	≥ 6,5

TOTG – teste de tolerância à glicose, HbA1c - hemoglobina glicada A1c (adaptado do Diabetes Care, 2015).

Tem sido relatado na literatura que a diabetes pode afetar a absorção, distribuição, biotransformação e excreção de diversos fármacos. As alterações farmacocinéticas na absorção são motivadas por alterações do fluxo sanguíneo nos tecidos musculares e adiposos, e no tempo de esvaziamento gástrico. Na distribuição ocorrem devido a glicoregulação não enzimática da albumina. Na biotransformação, as alterações são devidas a regulações enzimáticas envolvidas na metabolização dos fármacos ou nos seus transportadores. Já as alterações na excreção são relacionadas a nefropatia causada pela doença (Dostalek et al., 2012). Cerca de 30% dos pacientes que possuem insuficiência renal não demonstram aumento da concentração de albumina sérica, dificultando o diagnóstico da nefropatia (Zylka et al, 2015).

Segundo a Sociedade Brasileira do Diabetes atualmente mais de 13 milhões de pessoas vivem com diabetes no Brasil, o que representa 6,9% da população. Um a cada 11 adultos tem diabetes no mundo, representando 415 milhões de pessoas e em 2040 uma a cada 10 pessoas terá a doença representando 642 milhões. Dentre essa população, o diabetes do tipo 2 é o mais prevalente, responsável por mais de 90% dos casos (Federação Internacional do Diabetes, 2015).

O aumento dos casos de diabetes tipo 2 têm sido associados ao aumento da obesidade na população mundial. Sabe-se que a obesidade gera inflamação sérica crônica, esta inflamação mesmo que de baixo grau favorece o desenvolvimento da intolerância a glicose e resistência a insulina no fígado músculos e tecido adiposo (Sun, 2012).

O tratamento inadequado do diabetes está associado a eventos de cetoacidose diabética, onde as concentrações da glicose sanguínea ficam extremamente elevadas (hiperglicemia), ou a hipoglicemia, podendo levar ao coma e até mesmo a morte (Forbes, 2013).

Os tratamentos disponíveis para o diabetes trazem como consequência diversos efeitos colaterais. De um modo geral estão associados a ganho de peso, hipoglicemia, náuseas, efeitos gastrointestinais como cólicas, dor e flatulências.

3.2 Tratamentos para o Diabetes Tipo 2

Para reduzir os danos diretos e indiretos relacionados ao diabetes é fundamental garantir um bom controle dos níveis glicêmicos, o qual pode ser alcançado, através de dieta com redução da ingestão de calorias e prática de exercícios físico. Sob o ponto de vista farmacoterapêutico, através do uso de agentes hipoglicemiantes orais, anti-hiperglicemiantes, e em alguns casos, uso de insulina exógena (Silva, 2006).

3.1.1 Biguanidas

É a classe de agentes antidiabéticos orais cujo fármaco mais utilizado é a metformina. Geralmente usado em pacientes com sobrepeso ou obesos, sua ação consiste em suprimir a produção de glicose hepática, aumentar a captação da glicose pelo músculo e a sensibilidade à insulina, estimular a absorção de glicose por translocação transportador de glicose 4, aumentar a oxidação dos ácidos graxos e diminuir a absorção de glicose a partir do trato gastrointestinal. É um fármaco bem

tolerado, gerando raros eventos hipoglicemiantes. É o fármaco mais usado para o tratamento do diabetes tipo 2 em associação com outros fármacos, como os da classe das sulfoniluréias (Collier et al, 2006; Olokoba, 2012).

A metformina é excretada inalterada na urina, com meia vida de aproximadamente 5 h, com depuração média é de 510 ± 120 mL/min. É largamente distribuída nos tecidos com volume de distribuição ~ 26 L (Graham et al., 2011).

3.1.2 Meglitinidas

As meglitinidas são administradas antes das refeições para o controle da glicemia pós-prandial. Atuam sobre o canal de potássio dependente de ATP das células β -pancreáticas estimulando a liberação de insulina, semelhante à sulfoniluréia, embora o local de ligação das meglitinidas seja diferente. Têm baixo risco de hipoglicemia devido ao rápido início de ação e curta duração (4-6 horas) (Olokoba, 2012).

Repaglinida, a primeira da classe a ser lançada, é principalmente metabolizado no fígado com quantidades mínimas excretadas pelos rins, podendo ser administrada em pacientes com insuficiência renal. Outro fármaco da classe é a nateglinida, caracterizada por uma rápida absorção e eliminação, com biodisponibilidade de 73%. É extensivamente metabolizada, principalmente pelo citocromo P450 2C9, e eliminado principalmente pelos rins (McLeod, 2004).

3.1.3 Tiazolidinedionas

As tiazolidinodionas (TZD) ou glitazonas são agonistas dos receptores gama ativados pelo proliferador de peroxissomo (PPAR γ) que melhoram sensibilidade à insulina dos tecidos periféricos, como músculo esquelético, fígado e tecidos adiposos. Por esse motivo são indicados a pacientes que desenvolveram resistência à insulina (Tahrani et al, 2010).

O principal representante dessa classe é a pioglitazona após o Food and Drug Administration (FDA) restringir o uso da rosiglitazona devido o aumento de relatos de eventos cardiovasculares (Olokoba, et al. 2012).

A pioglitazona é bem tolerada, não gera evento de hipoglicemia e pode ser usada em pacientes jovens, idosos e com insuficiência renal. É contraindicada a pacientes com histórico de insuficiência cardíaca (Olokoba, et al. 2012).

A pioglitazona é administrada via oral uma vez ao dia, independentemente das refeições. Sua biodisponibilidade absoluta é de 83% e a concentração máxima é atingida em cerca de 1,5 horas. Seu $t_{1/2}$ é de 9 horas. Ela é metabolizada pelo sistema enzimático do citocromo P450 produzindo dois metabolitos ativos que contribuem principalmente ao prolongado efeito de redução da glicose (Hanefeld, 2001).

3.1.4 Inibidores da α -glicosidase

O principal representante dos inibidores da alfa-glicosidase é a acarbose. Estes agentes são mais eficazes na hiperglicemia pós-prandial, pois sua ação inibidora das α -glicosidases intestinais, gera um atraso na digestão e na absorção de carboidratos, diminuindo os picos de glicemia pós prandial. A sua utilização é limitada devido aos efeitos gastrointestinais, como náuseas e cólicas intestinais (Tahrani et al, 2010).

3.1.5 Terapias a base de incretinas

As incretinas são hormônios liberados pelo intestino, em resposta a ingestão de alimentos, capazes de potencializar a secreção de insulina. Existem duas incretinas conhecidas: peptídeo insulinotrópico dependente de glicose - GIP e peptídeo-1-glucagon-símile - GLP-1 (*glucagon-like-1*) (Kim, 2008).

O uso de GLP-1 no tratamento de diabetes *mellitus* do tipo 2 pode normalizar a glicemia, melhorando a função das células β e assim restaurando a secreção de insulina. Porém, a sua rápida eliminação ($t_{1/2}$ de aproximadamente 2 min) é um fator limitante para o emprego desta terapia. O GLP-1 é rapidamente degradada pela enzima dipeptidil peptidase-4 (DPP-4) que é amplamente expressa em diversos tecidos (Baggio e Drucker 2007; Kim, 2008).

3.1.6 Inibidores da DPP-4

Os inibidores da DPP-4 representam a nova geração de fármacos antidiabéticos orais que fornecem eficácia comparável aos lançados anteriormente. São eficazes como monoterapia e como adjuvante terapêutico na combinação com metformina, tiazolidinedionas, sulfoniluréias e insulina. Os inibidores da DPP-4 são bem tolerados, tem baixo risco de causar hipoglicemia e efeito neutro no peso corporal (Olokoba, et al. 2012).

Os inibidores DPP-4 inativam a degradação de GLP-1 e GIP, com isso aumentam os níveis desses hormônios melhorando a função das células β pancreática e o controle glicêmico na DM tipo 2. Os principais fármacos representantes dessa classe são: sitagliptina, vildagliptina e saxagliptina (Pathak e Bridgeman, 2010).

Os inibidores da DPP-4 são rapidamente absorvidos com $t_{m\acute{a}x}$ que variam de 2 a 4 horas. A vildagliptina tem biodisponibilidade absoluta é 85% e a ligação às proteínas plasmáticas é baixa, cerca de 9,3% (EMA, 2016). O volume médio de distribuição é de 71 L. Já a sitagliptina tem ligação as proteínas plasmáticas de 38% e volume de distribuição de 198 L. Sua meia vida de eliminação varia entre 11 e 13 horas. Sua biodisponibilidade oral é de 87% (Taharani et al., 2010).

3.2.7 Sulfoniluréias

São umas das classes mais utilizadas no tratamento DM tipo 2. A sulfoniluréias (SUs), também conhecidas como secretoras de insulina, estimulam a secreção da insulina através do fechamento dos canais de K^+ sensíveis a ATP (canais K_{ATP}) das células β -pancreáticas por ligação ao receptor sulfoniluréia 1 (SUR 1) pelas sulfoniluréias. Quando a atividade do canal é diminuída, gerando uma despolarização da membrana, isso conduz à abertura de canais de Ca_2^+ dependentes da voltagem, o que permite o influxo desse cátion. O aumento na concentração de cálcio intracelular resultante promove liberação de insulina (Seino

et al. 2012). Os canais de K_{ATP} estão presentes em muitos tecidos do corpo humano, incluindo células β -pancreáticas, músculo esquelético, coração e cérebro (Gribble, 2003). As Sus são bem toleradas, pois são secretoras endógenas de insulina.

As sulfoniluréias são classificadas como fármacos de primeira e segunda geração. Tolbutamida, acetohexamida, tolazamida, clorpropamida são sulfoniluréias de primeira geração. As de segunda geração, glipizida, gliburida, glimepirida e gliclazida, são mais utilizadas por apresentarem menos interações medicamentosas e efeitos adversos (Amond et al, 2012). As estruturas químicas desses hipoglicemiantes estão ilustradas na Figura 1.

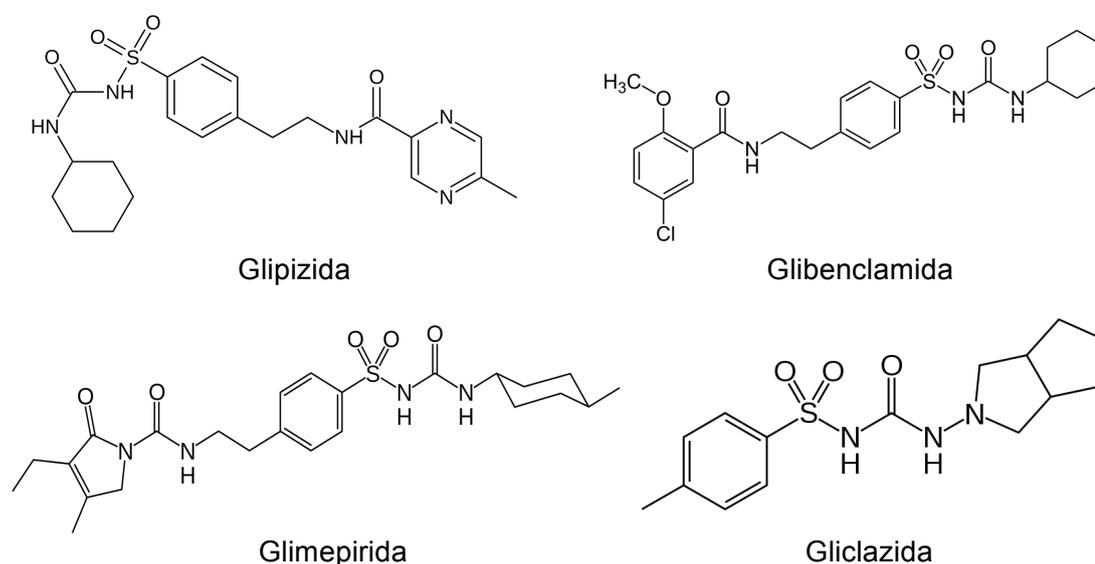


Figura 1. Estruturas químicas das sulfoniluréias (Brunton et al., 2012).

O mecanismo de ação das SUs é dependente da estimulação e funcionamento das células β -pancreáticas (Bonfilio et al., 2010). No entanto, o uso crônico da maioria das SUs afeta progressivamente as células β -pancreáticas gerando uma diminuição da secreção de insulina. Esse mecanismo de defesa não é bem compreendido, porém há relatos na literatura que a glibenclamida e tolbutamida induziram apoptose das células β -pancreáticas de ratos (Efanova *et al*, 1998; Seino *et al*, 2012).

Todas as sulfoniluréias possuem boa absorção após administração oral baixo volume de distribuição (faixa de 0,2 – 0,4 L/kg) e são altamente ligadas às proteínas plasmáticas (> 90%). Algumas são metabolizadas gerando metabólitos ativos e outras excretadas principalmente via renal, de forma inalterada (Tabela 2).

Tabela 2. Características importantes das sulfoniluréias administradas oralmente.

Fármaco	$t_{1/2}$ (h)	Duração da ação (h)	Via de depuração	DD	# de doses/dia
Tolbutamida	6-8	6-8	H	0,5–3 g	2-3
Clorpropamida	30-36	36-48	f_R , H	0,1-0,5 g	1
Glibenclamida	4-6	18-24	H	5-515 mg	1-2
Glipizida	3-5	12-18	H	5-20 mg	1-2
Gliclazida	8-20	12-24	H	40-240 mg	1-2
Glimepirida	5-7	24	H	1-6 mg	1

$t_{1/2}$ – meia vida de eliminação; DD – Dose diária; H – metabolizado pelo fígado; f_R – excretado de forma inalterada via renal. Adaptado: Silva, Farmacologia Médica, 2006.

3.3 Glimepirida

É um potente hipoglicemiante de uso oral cujas doses terapêuticas variam de 1 a 8 mg ao dia. Pertence a classe das sulfoniluréias de segunda geração, sua ação secretora de insulina confere um controle da glicemia por 24h. A glimepirida promove uma sensibilização dos tecidos periféricos a insulina e aumento da captação de moléculas de glicose pelos músculos e tecidos adiposos, desta forma contribuindo para um controle da glicemia mais eficaz (Bonfilio et al., 2010).

A glimepirida é rápida e completamente absorvida após administração oral e a ingestão de alimentos não gera nenhuma influência na sua absorção, sofrendo biotransformação oxidativa hepática por ação do citocromo P450 (isoenzima 2C9) que atua sobre a glimepirida gerando dois metabólitos (hidroxi e carboxi). A glimepirida é eliminada pelas fezes e urina com meia vida de 5 – 8h em humanos (Mass-Benedetti, 2002; Bonfilio, 2010).

A farmacocinética da glimepirida, após dose única em adultos saudáveis, é linear e o aumento de dose gera um aumento proporcional na ASC e pico de concentração ($C_{máx}$). A $C_{máx}$ é atingida 2,8h ($T_{máx}$) após sua administração. A glimepirida é 99,4% ligada as proteínas plasmáticas e seu volume de distribuição é de 8,8L, que é próximo ao da albumina (Yun et al., 2006).

A absorção intestinal da glimepirida foi investigada em estudo de absorção intestinal em ratos por Jing-xin e colaboradores, 2011, que indicam que absorção ocorre facilmente pelo intestino delgado, não mostrando diferença significativa nas diferentes porções que o constitui (jejuno, íleo e duodeno).

O pâncreas e o fígado são órgãos importantes para a eficácia das sulfoniluréias. A ação desta classe está ligada diretamente aos receptores SUR presentes na membrana celular do pâncreas, fazendo com que ele produza insulina endógena. A função hepática por sua vez é importante devido a extensiva metabolização hepática sob as SUs, como o estímulo a glicólise e inibição a gliconeogênese. Apesar de não haver receptores SUR no fígado, as SUs se ligam fortemente aos hepatócitos. A extração hepática da glimepirida determinada por Fanning e colaboradores em 2009, foi considerada moderada com valor de $0,49 \pm 0,12$ com clearance intrínseco de $0,65 \pm 0,72$ mL/min.g (Fanning et al, 2009).

No estudo de interação farmacocinética da glimepirida com ácido bowélico, principal constituinte do extrato de *Boswellia Serrata* (extrato muito utilizado na Índia para tratamento de doenças no sangue), a farmacocinética da glimepirida foi investigada após administração oral de 1 mg/kg isolada e em associação com esses dois compostos em ratos sadios e diabéticos induzidos por STZ. Para ratos saudáveis, os parâmetros obtidos após a administração de glimepirida foram: ASC, $C_{máx}$, $t_{1/2}$ e Vd correspondendo a $24,63 \pm 0,72$ µg/mL.h, $7,45 \pm 0,11$ µg/mL, $1,63 \pm 0,21$ h e $52,5 \pm 7,56$ mL, respectivamente. Já para os animais diabéticos os parâmetros ASC, $C_{máx}$, $t_{1/2}$ e Vd foram iguais a $51,83 \pm 2,08$ µg/mL.h, $11,33 \pm 0,36$ µg/mL, $1,69 \pm 0,25$ h e $36,2 \pm 7,56$ mL (Samala e Veersham, 2013). O estudo citado mostrou mudanças nos parâmetros farmacocinéticos entre os diferentes grupos, sadios e diabéticos, porém os autores não discutiram e investigaram as possíveis causas das alterações atribuídas pela doença. Fazendo com que, as causas das

alterações não tenham sido entendidas e relatadas na literatura para a glimepirida até o momento.

3.4 Modelos animais aplicados na investigação de antidiabéticos

Os distúrbios endócrinos como do diabetes tipo 1 e 2 são doenças bem complexas onde diferentes sistemas corporais estão envolvidos. Por isso, os modelos animais devem ser escolhidos cuidadosamente. O modelo animal deve se espelhar na fisiopatologia da doença em humanos e ser o mais semelhante possível da etiologia em humanos (Graham e Schuurman, 2015).

O diabetes tipo 2 é caracterizado pela resistência à insulina e a incapacidade das células β -pancreáticas de produzi-la. Assim sendo, os modelos animais de diabetes tipo 2 devem incluir modelos de resistência e/ou modelos de insuficiência de células β -pancreáticas produtoras de insulina (king, 2012).

Modelos utilizados para investigações do diabetes tipo 2 em roedores são classificados em: modelos espontâneos (genéticos) e não espontâneos (induzidos experimentalmente). O diabetes induzido experimentalmente, por ser mais simples e barato, é o mais utilizado pela comunidade científica. Essa indução pode ser feita através de administração de agente químicos, dieta hipercalórica ou cirurgia (Ghasemi et al, 2014).

A estreptozotocina (STZ) é um antibiótico produzido por *Streptomyces acromogenes*. Tem efeito tóxico seletivo para células β , o transporte da STZ para dentro das células ocorre pelo receptor GLUT 2, devido sua similaridade molecular a glicose, outros órgãos como rins, fígado e intestino também são danificados pela STZ (Ghasemi et al, 2014).

A STZ interfere na oxidação da glicose, diminui a síntese de insulina, interrompe o transporte da glicose e a atividade da glicoquinase. O dano celular é resultado de alquilação de bases de ácido desoxirribonucléico (DNA), causando injúria das células β por acarretarem depleção de nicotinamida-adenina dinucleotídeo (NAD) (Ghasemi et al, 2014).

A solução de STZ apresenta maior estabilidade quando preparada em tampão citrato (0,05 - 0,1 M - pH 4,5) imediatamente antes da administração. Sofre rápida metabolização hepática em ratos com $t_{1/2}$ é de 6-15 min. Doses baixas de STZ (< 35 mg/kg) não geram efeitos hiperglicêmicos (Islam, 2012; Ghasemi et al, 2014).

Masiello em 1998, a fim de estabelecer um estado de doença em ratos Wistar adultos semelhante ao da diabetes tipo 2 em humanos, investigou o efeito protetor da nicotinamida na indução química por estreptozotocina.

A nicotinamida (NA), vitamina B3 possui ação antioxidante que reduz a ação tóxica da STZ. Aumenta o crescimento, regeneração e inibe a apoptose das células β . Além disso tem uma meia-vida de 9 h e é eliminada principalmente pela urina. NA é dissolvido em solução salina e administrada por via intraperitoneal (Ghasemi et al, 2014).

Na maioria dos relatos da literatura citados por Ghasemi e colaboradores, 2014, as doses de STZ estão entre 45-65 mg/Kg após administração intraperitoneal ou intravenosa 15 minutos após administração intraperitoneal de NA, nas doses entre 60-290 mg/Kg.

Neste contexto, considerando que o diabetes é uma doença que atinge milhões de pessoas no mundo, e ainda, quando seu controle é deficiente gera diversos efeitos secundários graves à saúde, é necessário se compreender os efeitos desta doença na farmacocinética dos fármacos utilizados no tratamento diabetes tipo 2. Neste trabalho foram investigadas as alterações farmacocinéticas da glimepirida em ratos Wistar diabéticos induzidos com o protocolo de STZ associado a NA.

3.5 Influência do diabetes sob a farmacocinética dos fármacos

Os parâmetros farmacocinéticos de muitos fármacos são alterados pelo diabetes (Li, et al., 2012; Dostalek et al., 2012; Tripathi, et al 2014). Essas alterações farmacocinéticas podem ocorrer na absorção, distribuição, metabolização e eliminação dos fármacos (Dostalek et al.2012). O diabetes afeta o metabolismo dos carboidratos, lipídios, proteínas e dos sistemas que regulam as vias bioquímicas, em

muitos casos, envolvidas no transporte dos fármacos e na biotransformação (Gwilt et al., 1991).

A absorção oral dos fármacos em pacientes diabéticos pode ser afetada por distúrbios gastrointestinais, como diarreia, prisão de ventre e retardo no esvaziamento gástrico, esses são sintomas da gastroparesia que afetam entre 26% a 65% da população de diabéticos, o tempo de esvaziamento gástrico possui forte correlação com a progressão da doença. Mudanças na absorção também podem estar relacionados as alterações micro e macrovasculares causado pelo diabetes a longo prazo. Fármacos absorvidos mediante transportadores são fortemente influenciados pelo atraso no esvaziamento gástrico, já os que sofrem principalmente absorção passiva podem não ser tão susceptíveis as essas alterações (Dostalek et al.2012; Gwilt et al., 1991). A absorção da insulina após administração subcutânea em pacientes diabéticos se mostrou mais rápida em relação aos pacientes saudáveis. Essa alteração pode estar relacionada ao aumento do fluxo sanguíneo no tecido adiposo e subcutâneo nos pacientes diabéticos (Gwilt et al., 1991).

O distribuição dos fármacos, conhecido por volume de distribuição aparente, é um processo pelo qual o fármaco se distribui entre os fluídos intra e extra celulares após a absorção. No diabetes, o volume de distribuição pode ser correlacionado com o grau de obesidade, um fator de risco para o desenvolvimento do diabetes, nesse caso, os fármacos lipofílicos tem seu volume de distribuição alterados. O aumento dos níveis de glicose sanguínea em pacientes diabéticos leva a glicação não enzimática de várias proteínas incluindo a albumina. A glicação produz alterações conformacionais na estrutura da albumina, assim podendo aumentar a fração livre de fármacos ácidos em pacientes diabéticos (Dostalek et al.2012).

A biotransformação dos fármacos em pacientes diabéticos pode ser afetada pela frequente ocorrência de alterações na função hepática, especialmente esteato-hepatite não-alcóolica, esteatose macrovesicular, fibrose hepática e fígado gordo. E ainda, as alterações na biotransformação podem estar associadas a frequente obesidade nos pacientes diabéticos, gerando tem efeitos variáveis sob o citocromo P450. Em geral, o diabetes não tratado provoca um aumento global de enzimas CYP. A partir de biopsias de fígados de pacientes diabéticos foi observado aumentado significativo da CYP em pacientes com diabetes tipo 1 e diminuição em

pacientes diabéticos tipo 2. Os estudos clínicos que investigam o efeito da diabetes nas proteínas de transportadores dos fármacos são limitadas (Dostalek et al.2012).

O efeito da diabetes e da obesidade sobre a função renal não é bem estabelecido. No entanto, tem sido relatado que a filtração glomerular e de secreção tubular podem estar aumentadas em indivíduos obesos, já a reabsorção tubular pode ser diminuído, essa alteração não ocorrem linearmente com o aumento de peso dos pacientes (Dostalek et al.2012).

Embora a pesquisa pré-clínica e clínica obteve um significativo progresso na caracterização da fisiopatologia e base genética da diabetes, a informação disponível sobre o efeito da doença sobre a farmacocinética, eficácia e segurança dos medicamentos é limitado e inconsistente (Dostalek et al.2012).

Capítulo 1

**VALIDAÇÃO MÉTODO BIOANALÍTICO DE CLAE-UV PARA QUANTIFICAÇÃO
DE GLIMEPIRIDA EM PLASMA E APLICAÇÃO EM ESTUDOS DE
FARMACOCINÉTICA**

Validação de Método Analítico de CLAE-UV para Quantificação de Glimpirida em Plasma e Aplicação em Estudos de Farmacocinética

Jaqueline S Izolan Fabricio¹ e Bibiana Verlindo de Araújo^{1,2}

¹Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Ipiranga, 2752, Porto Alegre 90610-000, RS, Brasil.

²Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Ipiranga, 2752, Porto Alegre 90610-000, RS, Brasil

Resumo

No presente trabalho foi desenvolvido um método bioanalítico por cromatografia líquida de alta performance (CLAE) em fase reversa, sensível e simples para quantificação de glimepirida em plasma de ratos. A separação foi obtida usando coluna fase reversa C 18 (Phenomenex[®] Gemini 150 x 4,6 mm, 5µm; Torrance, CA, USA) e uma fase móvel composta de uma mistura de acetonitrila–tampão fosfato (pH 2,85; 0,02 M) (55:45; v/v) (contendo 0,4% de trietilamina na fase aquosa, v/v). O fluxo de trabalho foi de 1,0 mL/min e o volume de injeção de 35 µL. A detecção foi realizada por UV em 235 nm e empregou-se diazepam como padrão interno. A faixa da curva de calibração foi de 250 a 40000 ng/mL. A purificação da amostra de plasma foi realizada através de precipitação das proteínas plasmáticas com metanol. O método foi validado de acordo com FDA, analisando-se seletividade, exatidão, precisão, recuperação, curva de calibração e estabilidade. O método validado foi aplicado a estudos de farmacocinética da glimepirida em ratos Wistar saudáveis na dose de 1 mg/kg e permitiu a estimativa dos valores de Cl, $t_{1/2}$, Vd e AUC_{0-∞}.

Palavras chave: CLAE-UV, glimepirida (GLM), plasma, farmacocinética

1. Introdução

A glimepirida é uma sulfoniluréia amplamente utilizada para tratar diabetes *melittus* insulino não-dependente e seu mecanismo de ação envolve o estímulo da

produção endógena da insulina pelas células β -pancreáticas. Após administração oral a glimepirida é bem tolerada e sua eficácia máxima é alcançada na dose de 8 mg¹. A estrutura química da glimepirida está descrita na Figura 1.

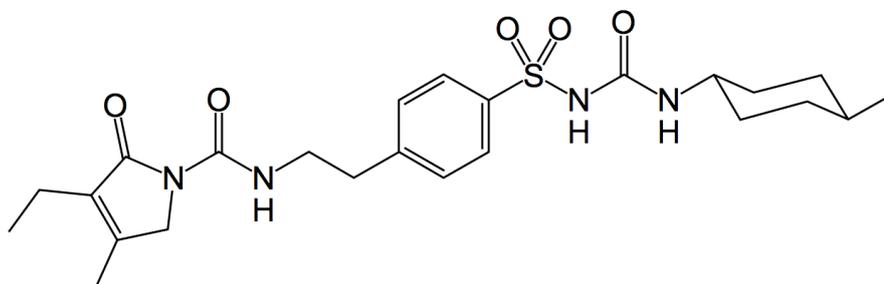


Figura 1. Estrutura química da glimepirida

Apesar de estar no mercado de medicamento desde 2005, estudos que versam sobre a farmacocinética da glimepirida no cenário pré-clínico continuam sendo publicados e no momento são em geral focados na avaliação do potencial de interações com outras substâncias utilizadas na prática clínica ou produtos de origem natural, pois a essa droga apresenta como propriedades farmacocinéticas metabolização mediada pela CYP 2C9 e é substrato da glicoproteína P (PgP)² características que criam um cenário propício para estudo de interações com outras substâncias que compartilhem da mesma rota metabólica ou sejam substratos/inibidores ou indutores dessa bomba de efluxo. Para que uma adequada avaliação farmacocinética seja realizada há necessidade de métodos analíticos sensíveis e exatos, que possam utilizar uma pequena quantidade de amostra biológica, permitindo uma amostragem seriada, a qual produz melhores estimativas dos parâmetros farmacocinéticos. Embora existam alguns métodos na literatura para o doseamento da glimepirida em plasma, soro e sangue, essa molécula apresenta algumas características químicas que dificultam sua análise em amostras biológicas, pois devido ao seu elevado Log P (3.5), solubilidade pH dependente e insolubilidade em água (> 73.6 mg/mL) sua extração de amostras biológicas é difícil. Além disso, devido a sua potência, as doses utilizadas em geral são baixas (1-5 mg.kg⁻¹), o que associado a um baixo volume de distribuição (0.052 L) torna necessário métodos com elevada sensibilidade, pois os níveis de concentração alcançados são na ordem de nanogramas.mL⁻¹. Na quantificação desse analito em plasma de rato a maioria dos métodos utilizados são por LC com

detecção por EM/EM^{3,4}, após processos complexos e dispendiosos de clean-up como extração em fase sólida e extração líquido-líquido. Os poucos métodos descritos que descrevem análise por CLAE-UV necessitam de um grande volume de amostra biológica^{5,6} impraticável para estudos pré-clínicos em roedores com amostragem seriada de um mesmo animal, ou longo tempo de processamento das amostras⁷, e ainda a derivatização da molécula⁷. Nesse sentido, esse estudo propõe um método bioanalítico alternativo para quantificação de glimepirida em estudos pré-clínicos, empregando uma reduzida quantidade de amostra (50 µL), uma ampla faixa de linearidade e uma sensibilidade suficiente para o doseamento do fármaco em plasma e determinação dos parâmetros farmacocinética desse fármaco por CLAE-UV, sem a necessidade do uso de agentes derivatizantes.

2. Experimental

2.1 Reagents

A glimepirida (pureza $\geq 99\%$) foi obtido da AvaChem Scientific (San Antonio, TX, USA); acetonitrila, metanol (grau CLAE), ácido fosfórico e a trietilamina foram adquiridos da Merck (Darmstadt, Alemanha). O uretano (carbamato de etila, pureza $\geq 99,0\%$) foi adquirido da Sigma-Aldrich (St. Louis, EUA). Heparina (5.000 UI.mL⁻¹) foi comprado de Cristália Produtos Químicos Farmacêuticos, Ltda (São Paulo, Brasil). Outros produtos químicos e reagentes utilizados eram de grau analítico e adquiridos de fontes comerciais. Água foi purificada por um sistema Milli-Q (Millipore®).

2.2 Preparação solução de Glimepirida e padrão interno

A solução estoque de glimepirida (GLM) foi preparada em 30 mL de NaOH 0,1 M e metanol obtendo uma solução de 400 µg/mL e volume final de 100 mL, a mistura foi sonicada, acondicionada em tubos âmbar a $-80^{\circ}\text{C} \pm 1$. O padrão interno (PI) utilizado foi o diazepam e este foi preparado em metanol na concentração nominal de 1 µg/mL. A partir da solução estoque, as soluções padrão de GLM foram preparadas em metanol:água (50:50, v/v) na faixa de 2,5 a 400 µg/mL. As soluções padrão foram utilizadas para construir a curva de calibração e os controles de qualidade.

2.3 Calibration Curves and quality control samples

As curva de calibração foram preparadas pela adição de 45 µL de plasma branco de rato com 5 µL da solução do PI (diazepam) e 5 µL da solução padrão correspondente de glimepirida para resultar em concentrações finais de 0,250 a 40 mg/mL no plasma. Os controles de qualidade (QC) foram preparados obtendo um controle baixo (CQB – 0,750 mg/mL), médio (CQM - 15 mg/mL) e alto (CQA - 32 mg/ml) concentrações no plasma, após o mesmo procedimento.

2.4 Tratamento das amostras de plasma

As amostras de plasma tiveram as proteínas precipitadas com a adição de metanol. Para isso, foram adicionados 100 µL de metanol acidificado com ácido fórmico (1,5%) em cada tubo de amostra que continha 50 µL de amostra de plasma. Após, as amostras foram agitadas por 5 min e centrifugadas a 12000 RPM durante 10 min, a 4 ± 2 ° C. O sobrenadante foi separado e injetado no CLAE para a quantificação.

2.5 Condições HPLC

O sistema de CLAE utilizado foi da Waters[®], equipado com bomba, controladora, auto-injetor e detector de absorvância 2487 (Waters, Milford, EUA). O software utilizado para obtenção dos dados analisados foi o Empower.

O método foi desenvolvido utilizado as seguintes condições: coluna fase reversa C18 (Phenomenex[®] Gemini 150 x 4,6 mm, 5µm; Torrance, CA, USA); mantida em temperatura ambiente, fase móvel isocrática obtida através da mistura de acetonitrila–tampão fosfato de sódio monobásico dihidratado 0,02 M (55:45; v/v). Na fase aquosa foi adicionado 0,4% de trietilamina e seu pH foi ajustado para $2,85 \pm 0,15$ com ácido ortofosfórico. O fluxo de trabalho foi de 1,0 mL/min, com volume de injeção 35 µL e detecção UV em 235 nm.

2.6 Validação do método

O método bioanalítico foi validado de acordo com a *Food and Drug Administration* (2001). Foram avaliados: Seletividade, exatidão, precisão, recuperação, curva de calibração e estabilidade.

A seletividade foi avaliada através da comparação dos perfis cromatográficos de plasma branco e de plasma adicionado com glimepirida e padrão interno, a fim de identificar presença de interferentes na corrida cromatográfica. As curvas padrão foram preparada em plasma de ratos com oito concentrações distintas dentro da faixa de concentração de 0,25 a 40 $\mu\text{g/mL}$.

A exatidão e a precisão intra-dia foi avaliada realizando seis determinações do CQs (0,75, 15 e 32 $\mu\text{g/mL}$) e o LIQ (0,250 $\mu\text{g/mL}$). A precisão inter-dia foi avaliada comparando as seis determinações dos CQs e o LIQ dos dois dias consecutivos. A precisão expressa como desvio padrão relativo (DPR%).

As recuperações das extrações foram realizadas comparando as áreas dos picos de glimepirida e do padrão interno nas amostras de plasmas extraídas com as áreas dos picos obtidas através das amostras em solvente nas mesmas concentrações (CQB, CQM, CQA).

A estabilidade das soluções-padrão foram investigadas em temperatura ambiente após 4 h da preparação, 12 h de autoinjeter, ciclos de congelamento-descongelamento e após 30 dias armazenadas a -80 ± 1 °C. Estudos de estabilidade das amostras foram realizadas em triplicata para o CQA e CQB. As amostras foram consideradas estáveis se os resultados estavam dentro dos limites aceitáveis de exatidão ($\pm 15\%$ da concentração nominal) e precisão ($\pm 15\%$ DPR).

2.7 Aplicação do método

Os procedimentos com animais foram aprovados pelo Comitê de Ética de Uso Animal - CEUA da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (protocolo # 27892). O método validado foi aplicado para os estudos de investigação da farmacocinética da glimepirida em ratos. Ratos Wistar (200-300 g) foram alojados com acesso livre a água e comida. Após anestesiados com carbamato de etila 1,25 g/Kg, as carótidas dos animais foram canuladas para coleta de sangue. Após administração intravenosa de 5 mg/kg de GLM pela veia femural, aproximadamente ~ 200 μL de amostras de sangue foram coletadas nos tempos: 0,09; 0,17; 0,25; 0,5. 0,75; 1; 1,5; 2; 4 e 6 horas. O plasma foi separado por centrifugação e armazenado a -80°C até a análise. Alíquotas de 50 μL de amostras de plasma foram processadas e analisadas para determinar as concentrações de glimepirida.

Os parâmetros farmacocinéticos (PK) foram determinados através da análise não compartimental usando o Software Phoenix® V.64 (Pharsight). Os parâmetros estimados foram constante de velocidade de eliminação (λ), meia vida de eliminação ($t_{1/2}$), área sob a curva ($ASC_{0-\infty}$), clearance (CL_{ss}), volume de distribuição (V_z) e tempo de residência médio (MRT). Os resultados foram expressos como médias e desvios padrão (D.P).

3. Resultados e discussões

4. 3.1 Seletividade e especificidade

Os cromatogramas de plasma branco e da amostra contendo glimepirida (7 minutos) e padrão interno (4,8 minutos), representada pelo CQM (Figura 2) indicam que há seletividade no método proposto, demonstrado pela ausência de picos interferentes no cromatograma nos tempos de retenção do fármaco e do padrão interno. O limite de detecção foi de 0,150 $\mu\text{g/mL}$ e o limite inferior de quantificação foi de 0.250 $\mu\text{g.mL}^{-1}$.

3.2 Validação do método

As curvas de calibração foram bem ajustados com coeficiente de determinação $> 0,998$. Para o ajuste da equação linear foi utilizando um fator de ponderação de $1/x^9$.

A exatidão e a precisão intra e inter-dia estão descritas na Tabela 1. Todos os controles de qualidade analisados demonstraram um desvio padrão relativo menor de 5% e uma boa exatidão (variação menor que 15% da concentração nominal). Dessa forma, o método foi considerado preciso, exato e reprodutível para quantificação de glimepirida em plasma de ratos. A glimepirida se mostrou estável nas condições testadas, conforme mostrado na Tabela 2.

As recuperações médias da extração de glimepirida foram maiores que 85% nas concentrações de 0.750 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, 15 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e 32 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Diferentes solventes orgânicos de extração foram avaliados, incluindo o metanol, acetonitrila, etanol e em condições diferentes (mudanças de pH e temperaturas das soluções). Metanol acidificado com ácido fórmico (1,5%) gelado provou ser o mais eficiente na

extração da glimepirida em plasma de ratos, atribuído a uma pequena variação nas recuperações da extração no intervalo das concentrações investigadas.

Tabela 1. Precisão intra e inter-dia e exatidão para determinação de glimepirida em plasma de ratos.

Concentração nominal ($\mu\text{g/mL}$)	Dia	Média das concentrações ^a \pm DP ^c ($\mu\text{g/mL}$)	DPR ^d (%)	Exatidão (%)
<i>Intra-dia</i>				
0,250	1	0,245 \pm 0,010	4,12	97,1
	2	0,259 \pm 0,098	3,78	103,9
0,750	1	0,683 \pm 0,0323	4,72	94,4
	2	0,750 \pm 0,0332	4,43	100,1
15	1	15,29 \pm 0,0635	4,16	101,9
	2	14,85 \pm 0,0610	4,11	98,2
32	1	32,18 \pm 1,269	3,95	100,6
	2	33,96 \pm 1,582	4,66	106,2
<i>Inter-dia^b</i>		Média ^b \pm DP ^c (ng/mL)		
0,250		0,255 \pm 0,010	4,08	101,2
0,750		0,715 \pm 0,035	4,99	98,1
15		15,074 \pm 0,630	4,18	99,8
32		32,737 \pm 1,231	3,76	103,3

^a Médias das replicatas

^b Média das replicatas dos 2 dias consecutivos

^c DP, desvio padrão

^d DPR, desvio padrão relativo (DP/Média*100)

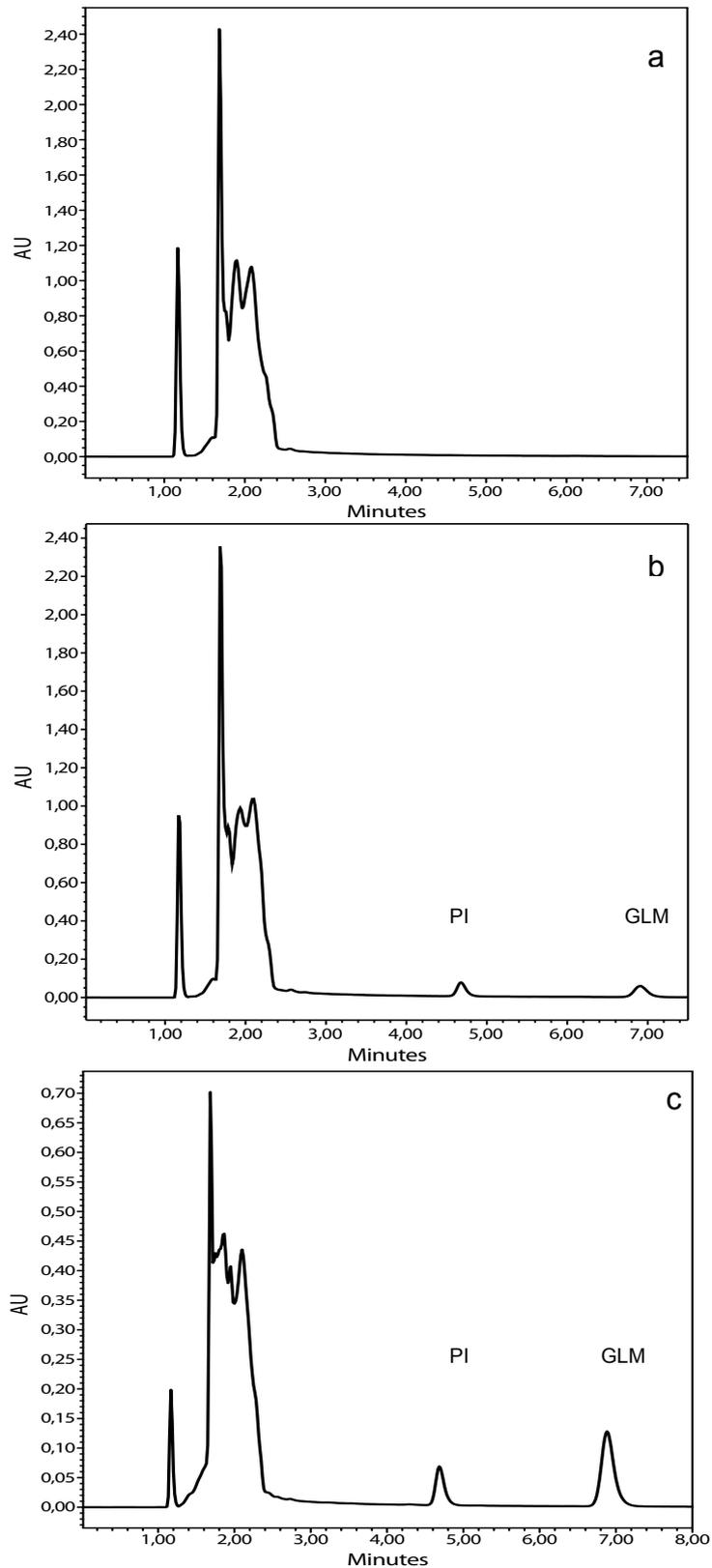


Figura 2. Cromatograma de plasma branco (a), plasma contaminado com diazepam PI (1 $\mu\text{g/mL}$) e glimepirida (1,5 $\mu\text{g/mL}$) (b) plasma coletado de rato (tempo = 5 minutos após administração do fármaco) (c).

Tabela 2. Estabilidade da glimepirida em plasma de ratos (n=3)

CQs (ng/mL)	Condição da estabilidade	Exatidão (%)	DPR (%)
0,750	4 h em temperatura ambiente	97,64	4,78
	12h em autoinjeter	98,16	4,03
	30 dias no Freezer - 80 °C	99,36	2,91
	3 ciclos gelo/degelo	98,51	5,90
32	4 h em temperatura ambiente	95,54	2,18
	12h em autoinjeter	90,67	4,99
	30 dias no Freezer - 80 °C	97,59	2,68
	3 ciclos gelo/degelo	95,60	4,21

Em geral, a maioria dos métodos relatados na literatura para o doseamento da glimepirida em fluidos biológicos apresentam algumas limitações como por exemplo a utilização de solventes orgânicos^{10,11} processamento das amostras para análise com técnicas de elevado custo, como extração em fase sólida¹² ou necessidade de elevada quantidade de amostra (1 mL)⁷. Tripathi e colaboradores¹³ utilizaram um sistema cromatográfico com a fase móvel composta de methanol: water (85:15 v/v) e coluna C18, com detecção UV em 230 nm para quantificação da glimepirida em plasma, que inclui uma etapa de *clean-up* via extração líquido-líquido com uso de considerável volume de solventes orgânicos como acetonitrile e diethyl ether (0.3/5 mL), esse procedimento além de gerar custos diretos, eleva o tempo de tratamento das amostras, pois inclui uma fase de evaporação de solvente.

Em outro trabalho publicado por Musmade¹², um sistema cromatográfico composto de acaetonitrila: tampão acetato de amônio pH 4.5 na razão 55:45 e uma coluna C18 foi utilizado para quantificação desse analito em plasma, com limite de quantificação inferior ao do nosso trabalho (50 ng.mL⁻¹ versus 250 ng.mL⁻¹), entretanto, novamente o *clean up* foi a etapa critica, pois envolveu extração em fase sólida, um técnica efetiva, mas bastante cara que eleva os custos de análises.

Os demais trabalhos na literatura que investigaram a farmacocinética da glimepirida no cenário pré-clínico frente a interações com outras substâncias (Gymnema e piperazina), empregaram detecção por EM/EM, um método mais sensível, entretanto, ainda pouco acessível em alguns laboratórios e utilizaram

extração líquido/líquido na etapa de *clean-up*, cujas desvantagens já foram relatadas acima. O método analítico por CLAE acoplado a detector UV proposto nesse artigo para doseamento da glimepirida em plasma de ratos, mostrou-se linear, preciso e exato em uma extensa faixa de concentração ($0,25 - 40 \text{ ng.mL}^{-1}$), empregando um reduzido volume de amostra ($50 \mu\text{L}$), ideal para análises pré-clínicas em roedores, com uma etapa única de *clean-up* mais rápida e barata que as utilizadas por outros autores.

3.2 Aplicação do método

O presente método foi aplicado com êxito na determinação das concentrações de glimepirida em amostras de plasma de ratos Wistar após dose i.v. *bolus* de 5 mg.kg^{-1} . O perfil de concentração plasmática média *versus* tempo está demonstrado na Figura 3. Os parâmetros farmacocinéticos foram determinados pela análise não compartimental estão apresentados na Tabela 3.

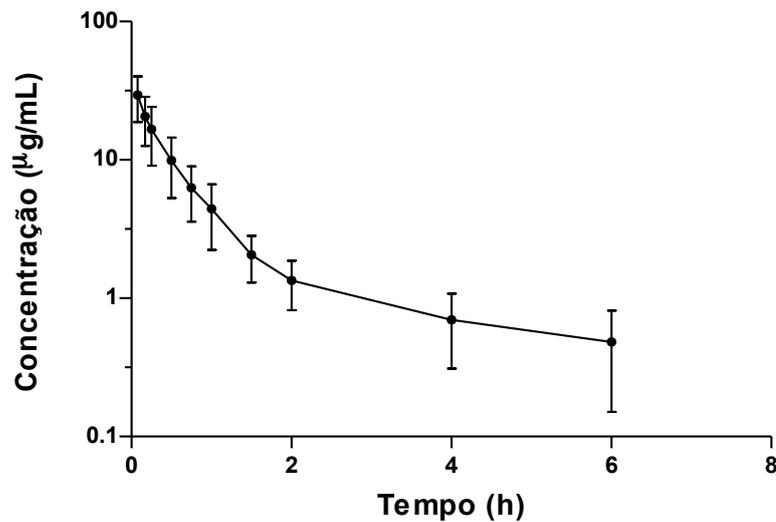


Figura 3. Perfil médio das concentrações plasmáticas da glimepirida *versus* tempo após administração intravenosa a ratos Wistar saudáveis da dose de 5 mg/kg ($n = 5$), média \pm desvio padrão.

Tabela 3. Parâmetros farmacocinéticos determinados para a glimepirida após administração da dose de 5 mg/kg por via iv (n=5) por análise não compartimental.

Parâmetros PK	Animais saudáveis ± DP
λ (h^{-1})	0,675 ± 0,5
$t_{1/2}$ (h)	1,768 ± 1,2
ASC _{0-∞} (mg/L*h)	20,49 ± 5,3
CL _{ss} (L/h)	0,079 ± 0,02
Vd (L)	0,109 ± 0,08
MRT (h)	1,335 ± 0,7

λ - velocidade de eliminação, $t_{1/2}$ - tempo de meia vida de eliminação, ASC_{0-∞} - área sob a curva, CL_{ss} - *clearance*, Vd - volume de distribuição, MRT - tempo de residência médio.

A farmacocinética da glimepirida foi investigada após administração oral de 1 mg/kg em ratos saudáveis e os parâmetros determinados foram $t_{1/2}$ de 1,63 ± 0,21 h, ASC_{0-∞} 24,63 ± 0,72 mg/L.h, CL_{ss} 9,34 ± 0,14 L/h e Vd 0,052 ± 0,007L.⁹

Dos parâmetros obtidos após análise não compartimental (Tabela 3), podemos observar similaridade no $t_{1/2}$ entre o estudo descrito acima ($t_{1/2}$ de 1,63 ± 0,21 h) com o obtido de 1,768 ± 1,232 h.

5. Conclusão

Os resultados mostram que o LIQ do método foi suficiente para a caracterização da fase de eliminação do fármaco, permitindo um tempo de amostragem superior a três meias-vidas, garantindo uma adequada estimativa dos parâmetros farmacocinéticos.

O conjunto dos resultados indica que o método bioanalítico desenvolvido e validado é adequado para quantificação da glimepirida em pequenos volumes (50 μL) de amostras, permitindo a investigação da sua farmacocinética em roedores.

6. Referencias

1. ROSENSTOCK J., SAMOLS E., MUCHMORE D., SCHNEIDER J. Glimepiride, a New Once-Daily Sulfonylurea: A Double-Blind Placebo-Controlled Study Of NIDDM Pa- tients. *Diabetes Care*, Vol. 19, p. 1194-1199, 1996.
2. GOKALP O., GUNES A., CAM H. et al. Mild hypoglycaemic attacks induced by sulphonylureas related to CYP2C9, CYP2C19 and CYP2C8 polymorphisms in routine clinical setting. *Eur J Clin Pharmacol*, 2011.
3. KIM E.Y., YU K., CHOI K., et al. Effect of Piperazine Dithioctate on the Oral Pharmacokinetics of Glimepiride in Rats. *Biol Pharm Bull*, v.38(8), p. 1161-8, 2015.
4. KAMBLE B., GUPTA A., MOOTHEDATH I., KHATAL L, JANRAO S., JADHAV A., DURAISWAMY, B. Effects of *Gymnema sylvestre* extract on the pharmacokinetics and pharmacodynamics of glimepiride in streptozotocin induced diabetic rats. *Chemico-Biological Interactions*, V. 245 p.30-38, Feb, 2016.
5. SAMALA S., TATIPAMULA R. S., VEERESCHAM C. Determination of Glimepiride in Rat Serum by RP-HPLC Method. *American J. of Analytical Chemistry*. v.2, p. 152 – 157, 2011.
6. NAHED M EL-ENANY, AMINA A ABDELAL, FATHALLA F BELAL, YOSHINORI I ITOH, AND MITSUHIRO N NAKAMURA. Development and validation of a repharsed phase- HPLC method for simultaneous determination of rosiglitazone and glimepiride in combined dosage forms and human plasma. *Chemistry Central Journal*, 2012.
7. SALEM II, IDRESS J., AL TAMIMI JI. Determination of glimepiride in human plasma by liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, v. 5;799(1), p. 03-9, Jan, 2004.
8. FDA. Food and Drug Administration; Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation, 2001.
9. ALMEIDA A.M., CASTEL-BRANCO M.M., FALCÃO A.C. Linear regression for calibration lines revisited: weighting schemes for bioanalytical methods. *J. Chrom. B* v.774, p.215-222, 2002.
10. GROGHARI A., DASH R., BHATT C., SINGH K., et al. Quantitative determination of saroglitazar, a predominantly PPAR alpha agonist, in human plasma by a LC-MS/MS method utilizing electrospray ionization in a positive mode. *Biomed Chromatogr*, May, 2016.

11. PISTOS C, KOUTSOPOULOU M, PANDERI I. Improved liquid chromatographic tandem mass spectrometric determination and pharmacokinetic study of glimepiride in human plasma. *Biomed Chromatogr.* v. 19(5), p
12. MUSMADE PB, TALOLE KB, DESHPANDE PB, KARTHIK A, PATHAK SM, PANDEY S, UDUPA N. Novel liquid chromatographic method for simultaneous estimation of piaglitazone and glimepiride in rat plasma by solid phase extraction: application to preclinical pharmacokinetic studies. *Arzneimittelforschung.* v. 61(1), p. 23-31 2011.
13. TRIPATHI A.S., DEWANI A.P., SHELKE P.G., BAKAL R.L., CHANDEWAR A.V., MAZUMDER P.M. Development and validation of RP-HPLC method for simultaneous estimation of glimepiride and sildenafil citrate in rat plasma-application to pharmacokinetic studies. *Drug Res (Stuttg)*, V.63(10), p. 510-4, Oct, 2013.

Capítulo 2

MODELAGEM FARMACOCINÉTICA POPULACIONAL DA GLIMEPIRIDA EM RATOS SADIOS E DIABÉTICOS

Modelagem Farmacocinética Populacional da Glimpirida em Ratos Sadios e Diabéticos

Jaqueline S Izolan Fabricio¹, Andressa Braga¹, Daiana M F Lima², Maiara Pigatto¹ e Bibiana Verlindo de Araújo^{1,2}

¹Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Ipiranga, 2752, Porto Alegre 90610-000, RS, Brasil.

²Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Ipiranga, 2752, Porto Alegre 90610-000, RS, Brasil

Resumo

Objetivo: O objetivo deste trabalho foi avaliar através, de abordagem farmacocinética populacional, a influencia do diabetes experimental na farmacocinética da glimepirida em ratos Wistar macho saudáveis e diabéticos.

Materiais e métodos: O diabetes foi induzido com dose única de 100 mg/kg de nicotinamida e 65 mg/kg de estreptozotocina (CEUA #27892) . A concentração da glimepirida foi determinada após administração intravenosa de 5 mg/kg do fármaco a ratos Wistar (n = 11). As amostras de sangue foram coletadas em tempos pré-determinados e o plasma foi separado por centrifugação. Após processamentos as amostras foram analisadas em CLAE-UV. A análise não compartimental foi feita pelo software Phoenix V.64 (Pharsight) e a modelagem farmacocinética populacional foi realizada através do Software Monolix versão 4.3.3. A análise estatística foi realizada por teste *t-student* pelo software SigmaStat[®].

Resultados e Discussão: O modelo farmacocinético estrutural de 2 compartimentos com eliminação de primeira-ordem foi usado para descrever os perfis plasmáticos de concentração-tempo da glimepirida após administração intravenosa na dose de 5 mg/kg em ratos saudáveis e diabéticos. Foram estatisticamente diferentes o CL e a ASC_{0-inf} entre os animais saudáveis, $CL_{pop\text{ Saudáveis}} = 0,066\text{ L/h}$ e $CL_{pop\text{ diabéticos}} = 0,024\text{ L/h}$ e $ASC_{pop\text{ saudáveis}} = 19,24\text{ }\mu\text{g/mL.h}$ para $ASC_{pop\text{ diabéticos}} = 59,64\text{ }\mu\text{g/mL.h}$, sugerindo que a eliminação foi alterada nos animais diabéticos. **Conclusão:** O modelo farmacocinético de dois compartimentos com covariável categórica

descreveu o dados adequadamente, pois observou semelhança entre os parâmetros farmacocinéticos determinados pelo modelo de farmacocinética populacional e pela análise não compartimental.

Palavras-chave: Modelagem farmacocinética populacional, Diabetes tipo 2, glimepirida.

1. Introdução

O diabetes *melittus* (DM) tipo 2 afeta cerca de 8,1% da população adulta no mundo.⁵ A glicemia mal controlada causa diversos efeitos secundários em tecidos e órgão e as complicações podem ser micro e macro vasculares. Deste modo, a DM pode afetar a farmacodinâmica e a farmacocinética de diversos fármacos. As alterações farmacocinéticas podem ocorrer na fase de absorção, distribuição, biotransformação e na excreção. As alterações na absorção são motivadas principalmente pelas alterações de fluxo sanguíneo nos tecidos e no esvaziamento gástrico. Já na distribuição, as alterações são atribuídas a glicorregulação não enzimática da albumina. Na biotransformação essas alterações podem ser devido a um diferencial na regulação enzimática das enzimas metabolizadoras e na excreção é geralmente ligada a nefropatias.²

As sulfoniluréias são uma das classes farmacológicas de primeira escolha para o tratamento com antidiabéticos orais.¹ A glimepirida (GLM) possui eficácia semelhante as demais sulfoniluréias, no entanto, gera menos efeitos adversos como hipoglicemia e danos cardiovasculares. Sendo assim é o fármaco mais seguro e eficaz dessa classe de hipoglicemiantes.⁶ A glimepirida possui farmacocinética linear, é altamente ligado as proteínas plasmáticas (> 99%), é biotransformada em dois metabólitos que são eliminados principalmente pela via renal e biliar. Não foi encontrado concentração significativa do fármaco inalterado na urina. A glimepirida é metabolizada pelo citocromo P450 e a isoenzima responsável é a CYP2C9.⁴

Com o objetivo de entender a influência do diabetes induzido experimentalmente na farmacocinética da glimepirida realizou-se um estudo de comparação da farmacocinética plasmática em animais saudáveis e diabéticos. De

posse desses dados, desenvolveu-se um modelo de farmacocinética populacional (popPK) para descrever a farmacocinética da glimepirida em ratos com diabetes *mellitus* tipo 2 induzidos por estreptozotocina.

2. Materiais e métodos

2.1 Reagentes

A glimepirida (pureza $\geq 99\%$) foi obtida da AvaChem Scientific (San Antonio, TX, USA); acetonitrila, metanol (grau HPLC), ácido fosfórico e a trietilamina foram adquiridos da Merck (Darmstadt, Alemanha). O uretano (carbamato de etila, pureza $\geq 99,0\%$) foi adquirido da Sigma-Aldrich (St. Louis, EUA). Heparina (5.000 UI/mL) foi comprado de Cristália Produtos Químicos Farmacêuticos, Ltda (São Paulo, Brasil). Outros produtos químicos e reagentes utilizados foram de grau analítico e adquiridos de fontes comerciais. Água foi purificada por um sistema Milli-Q (Millipore®).

2.2 Instrumentos e condições

A concentração de glimepirida plasmática dos animais foi quantificada por cromatografia líquida de alta eficiência utilizando cromatógrafo da Waters® equipado com uma bomba Waters® 600, controladora de bomba Waters® 600 e auto-injetor Waters® 717. Detector de absorvância Waters® 2487 dual λ e software Empower para obtenção dos resultados.

A separação cromatográfica ocorreu com coluna fase reversa C 18 (Phenomenex® Gemini 150 x 4,6 mm, 5 μm ; Torrance, CA, USA) mantida a temperatura ambiente. A fase móvel isocrática foi uma mistura de acetonitrila-tampão fosfato de sódio monobásico dihidratado 0,02 M, contendo 0,4% de trietilamina na fase aquosa (v/v) (55:45; v/v), com pH ajustado para $2,85 \pm 0,15$ com ácido ortofosfórico, o fluxo 1,0 mL/min, o volume de injeção 35 μL , e detecção UV a 235 nm, com corrida cromatográfica de 8 minutos. As amostras de plasma

coletadas foram precipitadas com metanol acidificado com ácido fórmico (1,5%). O método bioanalítico descrito foi validado seguindo o guia do FDA apresentando seletividade, exatidão, precisão, recuperação, estabilidade e curva de calibração (faixa 250 a 40000 ng/mL) e padrão interno diazepam (1000 ng/mL).

2.3 Animais

Os experimentos com animais foram aprovadas pelo Comitê de Ética de Uso Animal - CEUA (protocolo 27892) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Foram utilizados ratos Wistar machos (peso médio 280 g) obtidos do CREAL/UFRGS. Os animais foram mantidos com dieta padrão e acesso livre a água alojados em caixas padrão para ratos (5 ratos/caixas), sob condições controladas: 22 ± 2 °C, 65% de umidade com ciclos de 12h de luz e escuro.

2.4 Indução do diabetes

O DM tipo 2 foi induzido com administração intraperitoneal de uma solução 100 mg/kg de nicotinamida, 15 minutos antes da administração intravenosa de 65 mg/kg estreptozotocina, dissolvido em tampão citrato (pH 4,5). Após 72 h da indução, amostras de sangue foram coletadas por punção caudal e com auxílio de um glicosímetro Accu-Chek[®] Performa a glicemia dos animais foi determinada. Os animais com nível de glicemia > 250 mg/dL foram considerados diabéticos e utilizados após 3 semanas da indução a fim de evitar quaisquer interferente do agente indutor na farmacocinética da glimepirida.

3. Experimento Farmacocinética

No dia do experimento, os animais foram anestesiados com uretana (1,25 g/kg) por via intraperitoneal. A artéria carótida foi utilizada para coletar sangue através da inserção de uma cânula ligada a uma seringa com solução salina heparinizada (1%). A GLM foi dissolvida em solução salina, com 10% de álcool etílico e pH final de 8,0. Cinco mg/kg foram administrados i.v. *bolus* na veia femoral no dois grupos investigados. As amostras de sangue (~ 200 µL) foram coletadas em 0,08; 0,16; 0,25; 0,5; 0,75; 1; 1,5; 2; 4 e 6 horas. Após a dose o sangue foi coletado em tubo para microcentrifuga âmbar heparinizado e imediatamente centrifugado após a coleta durante 10 min (5000 rpm, $4 \pm 1^\circ \text{C}$). As amostras de plasma (50 µL) foram transferidas para tubos limpos e mantidas congeladas a $-80 \pm 2^\circ \text{C}$ até análise que ocorreu dentro de 7 dias após o experimento.

4. Ligação as proteínas plasmáticas

A ligação as proteínas plasmáticas (LPP) da GLM em ratos saudáveis e diabéticos foi investigada pelo método de ultracentrifugação usando dispositivo Centrifree (Millipore®). Para determinar a ligação as proteínas, 100 µL de glimepirida com diferentes concentrações foram adicionados a 900 µL de plasma branco de ratos saudáveis ou diabéticos para gerar concentrações finais de 80, 100 e 120 µg/mL (n = 3/grupo). Estas concentrações foram escolhidas baseadas na ligação as proteínas da GLM em humanos ($LPP_{\text{humanos}} > 99\%$), no estudo de investigação da farmacocinética da GLM e na sensibilidade do método analítico. O plasma contaminado com glimepirida foi transferida para o sistema Centrifree e centrifugado a 3400 g durante 20 min, a $21 \pm 1^\circ \text{C}$. Alíquotas do ultrafiltrado foram analisadas em CLAE-UV.

5. Análise Farmacocinética

5.1 Análise não-compartimental

A análise da farmacocinética não compartimental (NCA) dos perfis individuais dos ratos sadios e diabéticos foi realizada através do software Phoenix V.64

(Pharsight). Os parâmetros estimados foram constante de velocidade de eliminação (λ), meia vida de eliminação ($t_{1/2}$), área sob a curva ($ASC_{0-\infty}$), clearance (CL), volume de distribuição (Vd), área sob a curva de primeiro momento (ASMC) e tempo de residência médio (MRT). A análise estatística dos parâmetros entre os grupos (saudáveis e diabéticos) foi realizada por teste *t-student* pelo software SigmaStat® 3.5. O valor de $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente diferente. Todos os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão (D.P.).

5.2 Modelagem Farmacocinética Populacional

A análise farmacocinética populacional (popPK) foi realizada utilizando o software Monolix versão 4.3.3 (LIXOFT, Paris, França).

Modelos farmacocinéticos estruturais de um e dois compartimentos foram investigados, de acordo com os perfis de concentração *versus* tempo obtidos para a glimepirida.

A variabilidade interindividual (η) foi descrita utilizando o modelo exponencial:

$$P_i = P_{pop} \cdot \exp(\eta_{i,P}) \quad (\text{Equação 1})$$

onde P_i representa a estimativa do parâmetro do indivíduo com distribuição log-normal; P_{pop} é a estimativa do valor típico do parâmetro na população e $\eta_{i,P}$ representa o efeito aleatório distribuído normalmente com média 0 e variância Ω .

A variabilidade residual foi testada utilizando os modelos de erro aditivo, proporcional ou combinado.

O efeito da covariável categórica diabetes nos parâmetros farmacocinéticos da glimepirida foi investigado após a obtenção de um modelo estrutural e estatístico adequado para descrever os dados. O efeito da covariável foi testado utilizando como critérios o teste de razão de verossimilhanças (*LRT – likelihood ratio test*) e o teste de *Wald* ($p < 0.05$), a melhora na precisão dos parâmetros e os gráficos de qualidade de ajuste (*goodness of fit*).

A qualidade de ajuste do modelo foi avaliada através dos gráficos de valores populacionais e individuais previstos *versus* observados e dos gráficos de resíduos. A capacidade preditiva do modelo (*visual predictive check* - VPC) foi avaliada através da simulação de 1000 perfis de concentração-tempo da Glimepirida utilizando as estimativas dos parâmetros do modelo final.

O modelo final foi obtido comparando os modelos estruturais de um e dois compartimentos utilizando o Critério de Informação de Akaike (AIC), precisão das estimativas dos parâmetros e melhor ajuste dos dados através da análise dos gráficos de qualidade de ajuste e VPCs.

O teste de razão de verossimilhanças (LRT) incluindo log da verossimilhança, critério de informação de Akaike (AIC) e critério de informação Bayesiano (BIC) foram utilizados para testar diferentes hipóteses relacionadas ao modelo final como: efeito da covariável nos parâmetros farmacocinéticos, modelo de variabilidade residual (aditivo, proporcional ou combinado) e estrutura da matriz de variância para descrever a variabilidade interindividual dos parâmetros.

6. Resultados

6.1 Ligação as proteínas plasmáticas

A ligação da GLM as proteínas plasmáticas foi semelhante (>99 %) , tanto nas concentrações testadas como nas amostras de plasma de animais saudáveis e diabéticos, a fração não ligada foi $f_{u\text{saudáveis}}$ de $0,0703 \pm 0,004$ e $f_{u\text{diabéticos}}$ de $0,0763 \pm 0,0062$, respectivamente.

6.2 Análise não compartimental

Os parâmetros farmacocinéticos médios obtidos através da análise dos perfis plasmáticos de concentração de glimepirida *versus* tempo (Figura 1) estão expostos na Tabela 1. A diabetes tipo 2 induzida por STZ não gerou diferença entre os parâmetros dos animais sadios e diabéticos na constante de eliminação, na meia vida e no tempo de residência médio que foram de λ_{sadios} de $0,675 \pm 0,544$

h^{-1} e $\lambda_{\text{diabéticos}}$ de $0,452 \pm 0,353 h^{-1}$; $t_{1/2 \text{ sadios}}$ de $1,768 \pm 1,232 h$ e $t_{1/2 \text{ diabéticos}}$ de $2,698 \pm 1,987 h$; MRT_{sadios} de $1,335 \pm 0,775$ e $MRT_{\text{diabéticos}}$ de $2,744 \pm 1,519 h$. Por outro lado, pode-se observar diferenças significativas nos parâmetros de área sob a curva e *clearance* entre os grupos, os parâmetros médios dos animais sadios e diabéticos foram de $ASC_{0-\infty \text{ sadios}}$ de $20,492 \pm 5,263 \mu\text{g/mL.h}$ e $ASC_{0-\infty \text{ diabéticos}}$ de $46,540 \pm 16,347 \mu\text{g/mL.h}$; CL_{sadios} de $0,079 \pm 0,024 \text{ L/h}$ e $CL_{\text{diabéticos}}$ de $0,036 \pm 0,008 \text{ L/h}$.

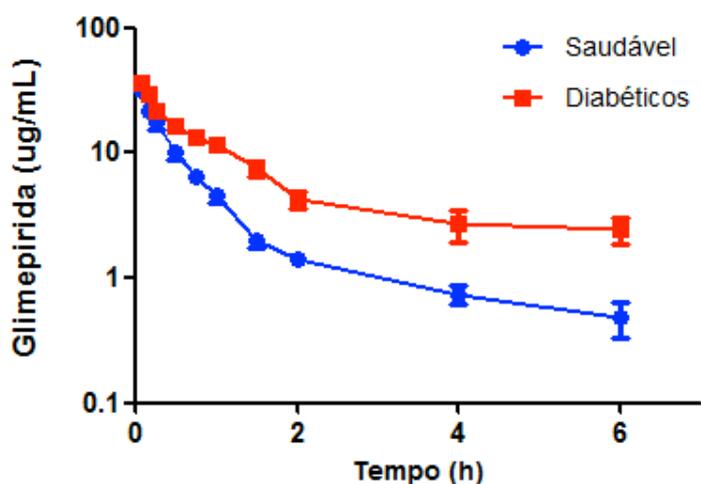


Figura 1. Perfil médio das concentrações plasmáticas da glibeipirida *versus* tempo após administração intravenosa em ratos Wistar saudáveis e diabéticos.

Tabela 1. Parâmetros farmacocinéticos obtidos por análise não compartimental em ratos saudáveis e diabéticos.

Parâmetros	Saudáveis \pm DP	Diabéticos \pm DP
λ (h^{-1})	$0,675 \pm 0,54$	$0,452 \pm 0,35$
$t_{1/2}$ (h)	$1,768 \pm 1,23$	$2,698 \pm 1,98$
$ASC_{0-\infty}$ ($\mu\text{g/mL.h}$)	$20,492 \pm 5,26$	$46,540 \pm 16,34^*$
MRT (h)	$1,335 \pm 0,77$	$2,744 \pm 1,51$
Vd (L)	$0,109 \pm 0,08$	$0,110 \pm 0,06$
CL (L/h)	$0,079 \pm 0,04$	$0,036 \pm 0,01^*$

DP – desvio padrão $n_{\text{saudáveis}} = 11$; $n_{\text{diabéticos}} = 9$

λ - constante de eliminação; $t_{1/2}$ - meia vida de eliminação; $ASC_{0-\infty}$ - área sob a curva do tempo zero ao infinito, CL - a depuração total; MRT - tempo médio de residência; * $p < 0,05$ (diferença estatística significativa entre os grupos saudáveis e diabéticos)

6.2 Modelagem Farmacocinética Populacional

O modelo farmacocinético estrutural de 2 compartimentos com eliminação de primeira-ordem foi o mais adequado para descrever os perfis plasmáticos de concentração-tempo da glimepirida após administração intravenosa da dose de 5 mg/kg a ratos saudáveis e diabéticos. O modelo estrutural final (Figura 2) mostrou um bom ajuste dos dados e previsões individuais e populacionais plasmáticas foram adequadamente descritas conforme mostrado na Figura 3. Os valores dos parâmetros estimados pelo modelo farmacocinético populacional estão apresentados na Tabela 2. Todos os parâmetros farmacocinéticos foram adequadamente estimados com valores de erro padrão relativo (EPR%) inferiores a 20 %.

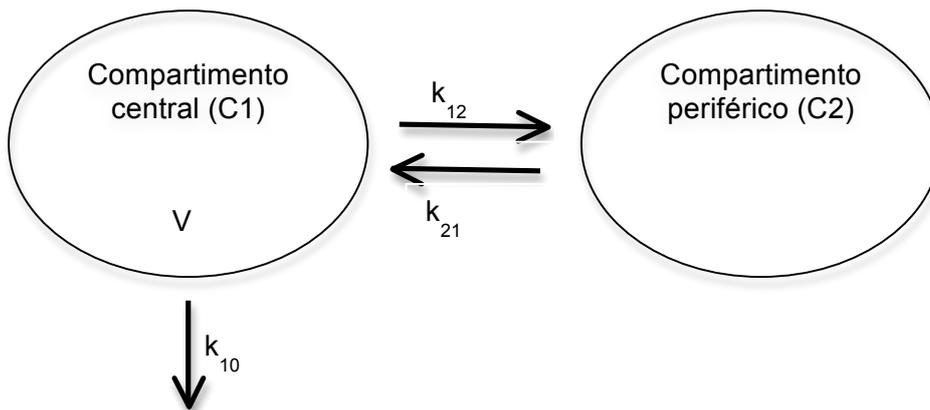


Figura 2. Modelo mamilário de 2 compartimentos com parametrização em micro constantes (V , K_{12} , K_{21} e K_{10}).

O sistema de equações diferenciais para o modelo final é dado nas Equações 2 a 3:

$$\frac{dC_1}{dt} = k_{12} \cdot C_2 - k_{10} \cdot C_1 \quad (\text{Equação 2})$$

$$\frac{dC_2}{dt} = k_{12} \cdot C_1 - k_{21} \cdot C_2 \quad (\text{Equação 3})$$

onde, V - volume de distribuição compartimento central, K_{12} - constante de distribuição do compartimento central (C1) para compartimento periférico (C2), K_{21} - constante de distribuição do C2 para C1 e K_{10} - constante de eliminação.

A inserção de variabilidade interindividual foi significativa em todos os parâmetros farmacocinéticos segundo o teste de razão de verossimilhança e, portanto, foi mantida em todos parâmetros. Baseado nos gráficos de qualidade de ajuste e nos testes de razão de verossimilhança, o modelo que melhor descreve o erro residual para as concentrações plasmáticas foi o modelo de erro proporcional mostrando um valor de 22% de variabilidade intraindividual. O erro combinado também foi testado, no entanto, a contribuição do erro aditivo foi negligenciável e então foi mantido somente o erro proporcional.

Na sequência, foi investigado se a covariável categórica diabetes poderia melhorar o ajuste dos dados e explicar a variabilidade. A covariável diabetes mostrou influência significativa em k_{10} ($p < 1.0^{-10}$, teste de Wald), representando uma redução de 30,58 pontos no valor de AIC. A equação 2 descreve o modelo da covariável:

$$k_{10pop,diabético} = k_{10pop,saudável} \cdot e^{\beta} \quad \text{(Equação 4)}$$

onde: $k_{10pop,diabético}$, constante de velocidade de eliminação do compartimento central populacional do grupo de animais diabéticos; $k_{10pop, saudável}$, constante de velocidade de eliminação do compartimento central populacional do grupo de animais saudáveis; β , coeficiente estimado.

Os gráficos de qualidade de ajuste e os VPCs são mostrados nas Figuras 4 e 5, respectivamente. Pode ser observado que os valores previstos individuais e populacionais estão de acordo com as concentrações observadas (Figura 3), com exceção de uma pequena subestimação em algumas concentrações plasmáticas altas que são *outliers*, ou seja, não correspondem ao perfil plasmático concentração-tempo da população. Além disso, os gráficos de resíduos mostram uma distribuição simétrica em torno do zero e nenhuma tendência sistemática nos valores, mostrando que o modelo estatístico foi escolhido de forma adequada. Por fim, através da análise do gráfico VPC observou-se que quase todas as observações estão dentro dos 90% de intervalo de predição (Figura 5), demonstrando que o modelo final é capaz de prever as concentrações observadas adequadamente.

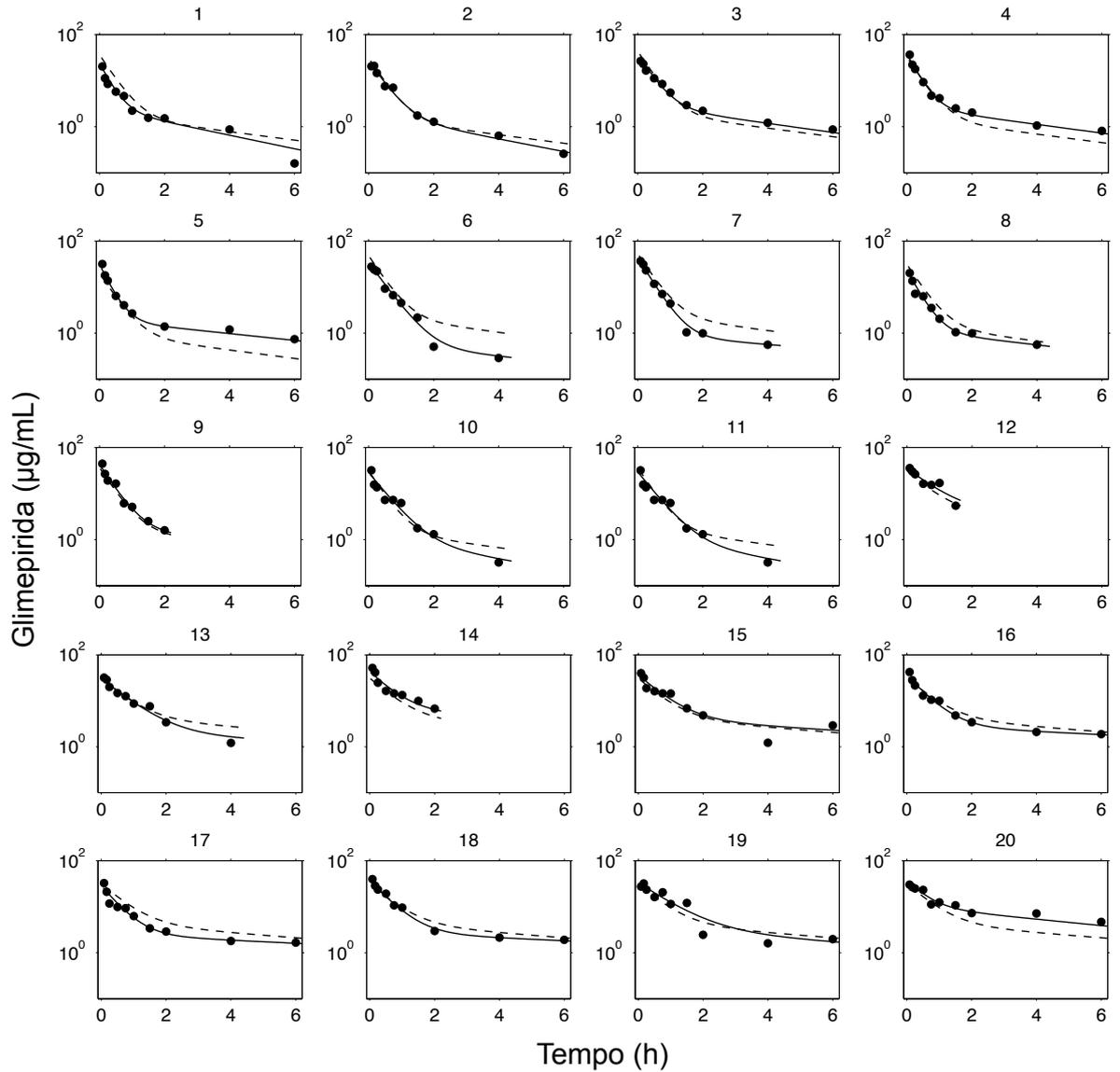


Figura 3. Perfis plasmáticos individuais e populacionais após modelagem farmacocinética populacional após dose única intravenosa de 5 mg/kg de glimepirida (n = 20; 1-11 – saudáveis e 12-20 - diabéticos). Pontos pretos: observações; linha sólida: perfis individuais previstos; linha pontilhada: perfis populacionais previstos.

Tabela 2. Estimativas dos parâmetros do modelo popPK final para glimepirida.

<i>Parâmetro</i>	<i>Estimativa (EPR%)</i>	<i>Variabilidade Inter-individual (EPR%)</i>
V_1 (L)	0,0408 (7)	0,246 (20)
β	-0,998 (14)	NA
$k_{10(\text{saudável})}$ (h^{-1})	1,63 (6)	0,132 (42)
$k_{10(\text{diabético})}$ (h^{-1})	0,6 (14)	0,132 (42)
k_{12} (h^{-1})	0,784 (14)	0,515 (21)
k_{21} (h^{-1})	0,329 (19)	0,482 (29)
Variabilidade residual		
Erro proporcional	0,22 (6)	NA
Estimativa log-verossimilhança (<i>log-likelihood</i>)		
AIC	805,94	NA

V_1 – volume de distribuição do compartimento central; k_{10} - constante de velocidade de eliminação do compartimento central; k_{12} e k_{21} – constante de velocidade de distribuição de primeira ordem, NA - não aplicável; EPR - erro padrão relativo.

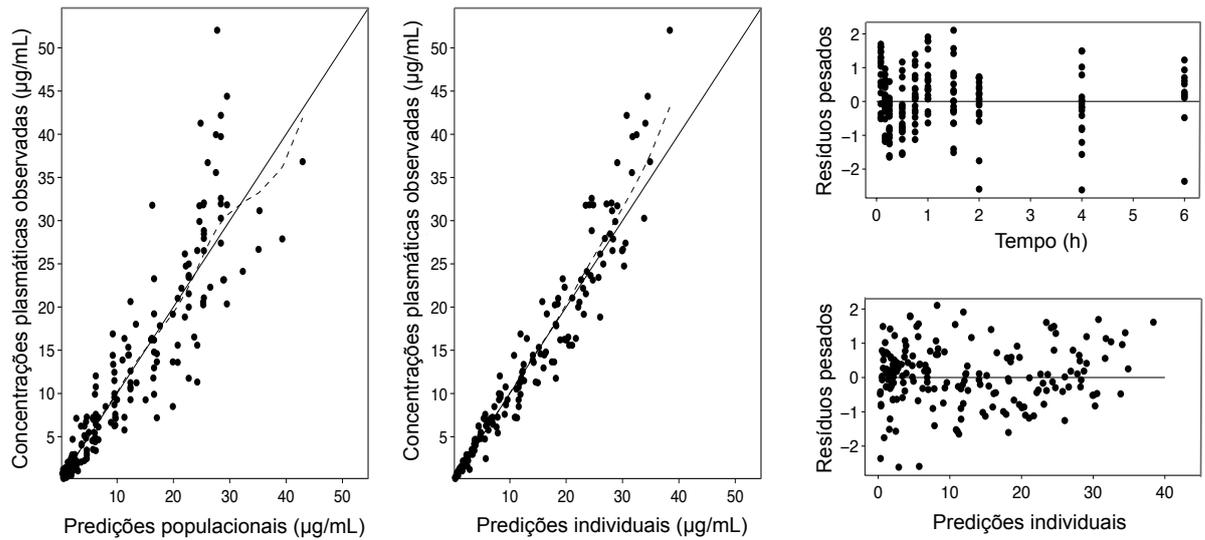


Figura 4. Gráficos de qualidade do ajuste do modelo popPK final. No gráfico de observações vs. previsões populacionais e individuais (à esquerda), a linha de regressão linear é mostrada (linha preta) juntamente com a linha de identidade (linha pontilhada), enquanto os gráficos de resíduos (à direita) representam a tendência dos dados.

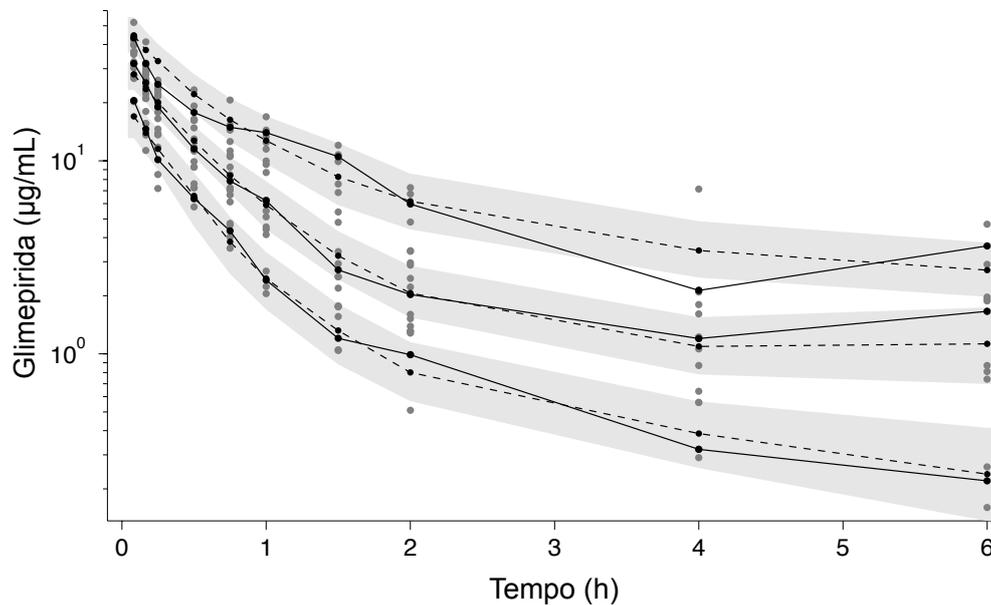


Figura 5. *Visual predictive check* (VPC) do modelo popPK final baseado em 1000 replicatas simuladas a partir dos dados originais. Os pontos cinzas representam as observações ($n = 20$); as linhas sólidas representam os percentis 10th, 50th e 90th dos dados observados; as linhas pontilhadas representam os percentis 10th, 50th e 90th dos dados simulados; as áreas cinzas sombreadas representam o intervalo de previsão de 90%.

7. Discussão

Nesta investigação, 5 mg/kg de glimepirida foram administrados via intravenosa a ratos saudáveis e diabéticos. Embora a farmacocinética da glimepirida em ratos já tenha sido relatada em outros estudos, a correlação das alterações dos parâmetros farmacocinética causadas pela diabetes nunca foi relatada na literatura para esse fármaco.

A glimepirida é um fármaco considerado de moderada extração hepática ($E = 0,49 \pm 0,12$)⁶, então espera-se que seu *clearance* hepático seja influenciado pela alteração na LPP, fluxo sanguíneo, *clearance* intrínseco e atividade enzimática. Nesse sentido a fração livre da glimepirida foi investigada em animais sadios e diabéticos. Como os resultados do ensaio de LPP não demonstraram alterações significativas entre animais saudáveis e diabéticos ($f_{u\text{saudáveis}}: 0,0703 \pm 0,004$ e $f_{u\text{diabéticos}}: 0,0763 \pm 0,0062$), acredita-se que uma das razões que influenciaram na diminuição do *clearance* total da glimepirida em animais diabéticos ($CL_{\text{saudáveis}} = 0,079 \pm 0,024$ L/h e $CL_{\text{diabéticos}} = 0,036 \pm 0,008$ L/h) (Tabela 1), seja as alterações nas enzimas metabolizadoras desse fármaco. Como consequência da redução do *clearance* total, a $ASC_{0-\infty}$ da glimepirida aumentou significativamente nos ratos diabéticos em relação aos saudáveis $ASC_{\text{saudáveis}} = 20,4 \pm 5,3$ µg/mL.h para $ASC_{\text{diabéticos}} = 46,5 \pm 16,3$ µg/mL.h).

Os resultados acima corroboram estudo semelhante, onde realizou a investigação da farmacocinética de uma outra sulfoniluréia, a glibenclamida, no qual observou-se um aumento significativo da $ASC_{0-\infty}$ nos animais diabéticos ($1528,28 \pm 214,48$ mg/L.min) quando comparado com os animais sadios ($509,52 \pm 56,13$ mg/L.min) e uma diminuição significativa do *clearance* de $7,61 \pm 1,53$ L/min.kg dos sadios para $2,66 \pm 0,7$ L/min.Kg dos diabéticos.⁷ A glibenclamida, da mesma forma que a glimepirida, é um fármaco de moderada extração hepática ($E = 0,52 \pm 0,04$), tendo seu *clearance* hepático fortemente influenciado por alterações na função das enzimas metabolizadoras, sendo a CYP2C9 também a principal enzima responsável pela metabolização da glibenclamida³. Segundo relatos na literatura, com base em análise de *Western blot* para detecção da CYP2C9 hepática em ratos saudáveis e diabéticos induzidos por STZ, observou-se a expressão de proteínas

CYP2C9 foi reduzida em 56,42% nos ratos induzidos quando comparados com a expressão nos ratos saudáveis⁷, indicando que as alterações observadas no *clearance* total esteja diretamente relacionado com as alterações nas enzimas metabolizadoras da glimepirida e glibenclamida.

Baseado nos parâmetros da NCA foi iniciada a construção de um modelo popPK. Para isso, foram utilizados os modelos farmacocinéticos de um e dois compartimentos, onde o modelo de dois compartimentos foi capaz de descrever os dados tanto dos animais saudáveis como dos diabéticos. A inserção da covariável diabetes no parâmetros k_{10} possibilitou uma melhor descrição da variabilidade entre os dois grupos de animais. O CL populacional, calculado através da equação $CL = k_{10} \cdot V_1$, utilizando o k_{10} de cada grupo, foi similar ao CL determinado pela análise não compartimental ($CL_{pop \text{ Saudáveis}} = 0,066 \text{ L/h}$; $CL_{NCA \text{ Saudáveis}} = 0,079 \pm 0,024 \text{ L/h}$; $CL_{pop \text{ diabéticos}} = 0,024 \text{ L/h}$; $CL_{NCA \text{ diabéticos}} = 0,036 \pm 0,008 \text{ L/h}$). A $ASC_{0-\infty}$ também foi calculada através da equação $ASC_{0-\infty} = \text{Dose}/CL$ e foi de $ASC_{pop \text{ saudáveis}} = 19,24 \mu\text{g/mL.h}$ e $ASC_{pop \text{ diabéticos}} = 59,64 \mu\text{g/mL.h}$, corroborando a ASC determinada na análise NC, como pode ser visto na Tabela 1 ($ASC_{\text{saudáveis}} = 20,492 \pm 5,263 \mu\text{g/mL.h}$ e $ASC_{\text{diabéticos}} = 46,540 \pm 16,347 \mu\text{g/mL.h}$). O volume de distribuição populacional foi calculado através da equação $V_d = CL/Ke$ que mostrou semelhança com o V_d dos dois grupos ($V_{d \text{ pop saudáveis}} = 0,13 \text{ L}$ e $V_{d \text{ pop diabéticos}} = 0,14 \text{ L}$). Para o cálculo do volume de distribuição o Ke compartimental foi estimado através da fórmula $ke = k_{10} \cdot k_{21}/k_{21} + k_{12}$ ($Ke_{pop \text{ saudável}} = 0,4 \text{ h}^{-1}$ e $Ke_{pop \text{ diabética}} = 0,2 \text{ h}^{-1}$). Tanto o Ke como o V_d populacional estimados corroboram com os determinados na análise não compartimental (Tabela 1).

8. Conclusões

Os resultados descritos mostram que o diabetes *mellitus* tipo 2 induzido quimicamente em ratos gera diminuição da eliminação deste sob a farmacocinética da glimepirida e conseqüente aumento da exposição desse fármaco.

O modelo de dois compartimentos com covariável categórica descreveu o dados adequadamente, gerando parâmetros farmacocinéticos semelhantes determinados pelo modelo farmacocinética populacional.

A modelagem popPK possibilitou identificação do parâmetro que atribuiu variabilidade entre os grupos. Desta forma, a variabilidade inter-individual foi quantificada e incluída no modelo. Com isso, o modelo desenvolvido possibilita a inferência dos dados farmacocinéticos em animais diabéticos baseado em estudos com animais saudáveis.

Agradecimentos

Este estudo foi financiado pela CAPES. Os autores agradecem ao CNPq e CAPES pelas bolsas de estudo.

Referencia

1. CLASSIFICATION AND DIAGNOSIS OF DIABETES. *Diabetes Care*, v. 38(Suppl.1), p. S8–S16; 2015.
2. DOSTALEK M., AKHLAGHI F., PUZANOVOVA M. Effect of diabetes mellitus on pharmacokinetic and pharmacodynamic properties of drugs. *Clin Pharmacokinet*, v.1;51(8), p. 481-99, 2012.
3. FANNING K.J., ANISSIMOV Y.G., ROBERTS M.S. Sulphonylurea physicochemical-pharmacokinetic relationships in the pancreas and liver. *J Pharm Sci*, v.98(8), p. 2807-21, 2009.
4. http://www.anvisa.gov.br/datavisa/fila_bula/frmVisualizarBula.asp?pNuTransacao=5363112014&pldAnexo=2110292 acessado em 30 de janeiro 2016.
5. <http://www.who.int/diabetes/en/> acessado dia 28 de fevereiro de 2016.
6. LANGTRY HD, BALFOUR JA. Glimpiride – a review of its use in the management of type 2 diabetes mellitus. *Drugs*, v. 55, p. 563–584. 1998.
7. LI Y., WEI Y., ZHANG F., WANG D., WU X.. Changes in the pharmacokinetics of glibenclamide in rats with streptozotocin-induced diabetes mellitus. *Acta Pharm. SinicaB*, v. 2(2), p.198-204, 2012.
8. POREPA L., RAY J.G., SANCHEZ-ROMEY P., BOOTH G.L. Newly

diagnosed diabetes mellitus as a risk factor for serious liver disease. *CMAJ*. v.10;182(11), p. 526-31, 2010.

9. YOO H.D., CHO HY, LEE YB. Population pharmacokinetic analysis of glimepiride with CYP2C9 genetic polymorphism in healthy Korean subjects. *Eur J Clin Pharmacol*. V.67(9), p.889-98, 2011.

A Federação Mundial do Diabetes estima que em 2040 aproximadamente 642 milhões de pessoas serão diabéticas. Sendo a Diabetes do Tipo 2 a mais prevalente, responsável por mais de 90% dos casos de diabetes no mundo. As perspectivas dos aumento da incidência da diabetes faz com que alternativas para o controle desta doença sejam necessárias.

Para isso, a avaliação da influência da diabetes na farmacocinética da glimepirida, com o objetivo de elucidar possíveis mecanismos associados à doença capazes de modificar a farmacocinética, os quais poderiam influenciar diretamente no desfecho do tratamento com esses fármacos são de extrema importância.

Neste trabalho foi utilizada a modelagem farmacocinética populacional para melhor compreensão e elucidação das alterações que o diabetes tipo 2 induzidos por STZ, pode gerar na farmacocinética da glimepirida em ratos Wistar. A glimepirida foi escolhida para o estudo, posto que pertence a classe de antidiabéticos de primeira escolha, as sulfoniluréias (Nice, 2008).

Para o desenvolvimento desta dissertação, fez-se necessário estabelecer a doença em ratos Wistar machos. A indução da diabetes foi realizada com base no método desenvolvido por Masiello em 1998, onde a administração combinada de STZ e nicotinamida a ratos Wistar adultos, levou ao desenvolvimento de uma síndrome diabética caracterizada por hiperglicemia moderada e estável, essa hiperglicemia foi associada a redução da insulina secretada pelo pâncreas (aproximadamente 40% do normal). Esta síndrome experimental é muito semelhante à diabetes *mellitus* não-insulino-dependente, visto que o método preserva a capacidade de resposta da insulina à glicose e as sulfoniluréias.

Visando atingir o objetivo geral deste trabalho, foi desenvolvida metodologia analítica para quantificação da glimepirida em plasma de ratos em cromatógrafo líquido de alta eficiência acoplado a detector ultravioleta. O método desenvolvido foi linear, envolveu a precipitação de proteínas com metanol acidificado utilizando diazepam como padrão interno. O mesmo demonstrou-se preciso, exato, específico e sensível, portanto adequada para a quantificação do fármaco e determinação dos parâmetros farmacocinéticos.

De posse do método analítico, foi possível iniciar a avaliação farmacocinética da glimepirida após administração de 5 mg/kg de glimepirida via i.v *bolus*. Os parâmetros da análise não compartimental foram usados como estimativas iniciais para o desenvolvimento do modelo farmacocinética populacional.

O modelo farmacocinético estrutural de 2 compartimentos com eliminação de primeira-ordem foi o mais adequado para descrever os perfis plasmáticos de concentração-tempo da glimepirida em ratos saudáveis e diabéticos. A inclusão da covariável categórica diabetes melhorou o ajuste dos dados, podendo assim, explicar a variabilidade entre os grupos. A covariável diabetes mostrou influência significativa na constante de velocidade de eliminação do compartimento central populacional.

Os parâmetros determinados, tanto pela análise não compartimental como na compartimental, indicaram mudanças significativas no clearance e na exposição da glimepirida em ratos diabéticos. A eliminação da glimepirida foi diminuída pelo diabetes e a ASC consequentemente, aumentada. A glimepirida é completamente metabolizada pela CYP2C9, isoenzima afetada pelo diabetes segundo Li (2012), que mostrou que o clearance da glibenclamida e do diclofenaco, dois fármacos extensivamente metabolizados pela mesma isoenzima, foram afetadas significativamente pela doença.

O modelo final mostrou um bom ajuste dos dados e as predições individuais e populacionais plasmáticas foram adequadamente descritas segundo a análise estatística. Assim, o modelo permitiu a identificação do parâmetro farmacocinético influenciado pela doença após administração intravenosa de glimepirida.

- A metodologia bioanalítica desenvolvida por CLAE-UV e foi adequado para quantificação da glimepirida em pequenos volumes (50 μ L) de plasma, permitindo a investigação da sua farmacocinética plasmática em roedores.
- O modelo farmacocinético de dois compartimentos com eliminação de primeira ordem, descreveu o dados da glimepirida adequadamente nos dois grupos estudados (ratos saudáveis e diabéticos);
- A modelagem popPk possibilitou identificação do parâmetro que atribuiu variabilidade entre os grupos. Desta forma, a variabilidade inter-individual foi quantificada e incluída no modelo.
- A farmacocinética da glimepirida apresentou baixa ligação as proteínas plasmáticas ($f_u = 0,07$) com tempo de meia-vida curto, aproximadamente 2 h e baixo volume de distribuição de $\sim 0,13$ L para os dois grupos investigados. Observou que a diabetes induzido diminuiu o *clearance* ($Cl_{\text{saudáveis}} = 0,066$ L/h para $Cl_{\text{diabéticos}} = 0,024$ L/h) e conseqüentemente aumentou a área sob a curva e $ASC_{\text{saudáveis}} = 19,24$ μ g/mL.h para $ASC_{\text{diabéticos}} = 59,64$ μ g/mL.h).

AMOND A., ASCOTT-EVANS B.H., BERG G., et al. The 2012 SEMDSA Guideline for the Management of Type 2 Diabetes (Revised). *JEMDSA*, v. 17, (Supplement 1), p. S1-S95, 2012.

BAGGIO LL. E DRUCKER DJ. Biology of incretins: GLP-1 and GIP. *Gastroenterology*, v. 132(6), p. 2131-57, 2007.

BIESSELS, G.J., STAEKENBORG, S., BRUNNER, E., BRAYNE, C., SCHELTENS, P. Risk of dementia in diabetes mellitus: a systematic review. *Lancet Neurol.* 5, 64–74, 2006.

BONFILIO, R.; DE ARAÚJO, M. B.; SALGADO, H. R. A Review of Analytical Techniques for Determination of Glimpiride: Present and Perspectives. *Therapeutic Drug Monitoring*, Volume 32(5), p. 550-559. Oct. 2010.

BRUNTON L.L., CHABNER B.A., KNOLLMANN B.C. Goodman & Gilman As Bases Farmacológicas da Terapêutica. McGraw Hill, 12^a ed. Pag.1237-1258, 2012.

CASCIO, G.; SCHIERA, G.; LIEGRO, I. DI. Dietary fatty acids in metabolic syndrome, diabetes and cardiovascular diseases. *Current diabetes reviews*, v. 8, n. 1, p. 2–17, 2012.

CLASSIFICATION AND DIAGNOSIS OF DIABETES. *Diabetes Care*; vol. 38(Suppl.1):S8–S16; 2015.

COLLIER CA, BRUCE CR, SMITH AC, LOPASCHUK G, DYCK DJ. Metformin counters the insulin-induced suppression of fatty acid oxidation and stimulation of triacylglycerol storage in rodents skeletal muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, v. 219(1), p.182-189, 2006.

DOSTALEK M., AKHLAGHI F., PUZANOVOVA M. Effect of diabetes mellitus on pharmacokinetic and pharmacodynamic properties of drugs. *Clin Pharmacokinet*, v. 51(8) p.481-99, 2012.

EFANOVA I.B., ZAITSEV S.V., ZHIVOTOVSKY B., et al. Glucose and tolbutamide induce apoptosis in pancreatic β -cells. A process dependent on intracellular Ca^{2+} concentration. *J Biol Chem*, v. 273, p. 33501– 33507, 1998.

EMA, Disponível em <http://www.ema.europa.eu/docs/pt_PT/document_library/EPAR_-_Product_Information/human/000771/WC500020327.pdf> acessado em 07 de março de 2016.

FANNING K.J., ANISSIMOV Y.G., ROBERTS M.S. Sulphonylurea physicochemical-pharmacokinetic relationships in the pancreas and liver. *J Pharm Sci.* v. 98(8), p. 2807-21, 2009.

FORBES, J.M.; COOPER, M.E. Mechanisms of diabetic complications. *Physiology review*, v. 93 p. 137-188, 2013.

FUJIOKA K. Pathophysiology of type 2 diabetes and the role of incretin hormones and beta-cell dysfunction, 2007.

GHASEMI A, KHALIFI S, JEDI S. Streptozotocin-nicotinamide-induced rat model of type 2 diabetes (Review). *Acta Physiologica Hungarica*, V. 101 (4), p. 408–420, 2014.

GONG, L.; GOSWAMI, S.; GIACOMINI, K. M.; ALTMAN, R. B.; KLEIN, T. E. Metformin pathways: pharmacokinetics and pharmacodynamics. *Pharmacogenetics and genomics*, v. 22, n. 11, p. 820–7, 2012.

GRAHAM G.G., PUNT J., ARORA M., DAY R., DOOGUE M.P., DUONG J.K., et al. Clinical pharmacokinetics of metformin. *Clin Pharmacokinet*, v. 50, p. 81–98. 2011.

GRANT SF, HAKONARSON H, SCHWARTZ S. Can the genetics of type 1 and type 2 diabetes shed light on the genetics of latent autoimmune diabetes in adults? *Endocr Rev*, v. 31(2), p. 183–93, 2010.

GRIBBLE FM., REIMANN F. Sulphonylurea action revisited: the post-cloning era. *Diabetologia*, v. 46, p. 875–891, 2003.

HANEFELD M. Pharmacokinetics and clinical efficacy of pioglitazone. *International Journal of Clinical Practice. Supplement*, v.121. p. 19–25; 2001.

HU E.A., PAN A., MALIK V., SUN Q. White rice consumption and risk of type 2 diabetes: meta-analysis and systematic review. *BMJ*, v. 5;344 p.1454, 2012.

IDF. International Diabetes Federation. IDF Diabetes Atlas, 7th edn; <<http://www.idf.org/diabetesatlas>>, 2015.

ISLAM MS1, WILSON RD. Experimentally induced rodent models of type 2 diabetes. *Methods Mol Biol*, v. 933, p.161-74, 2012.

JING-XIN F, WEN-JI Z, TING-XU Y, YING H, SHU-FANG N, WEI-SAN P. Intestinal absorption kinetics of actarit in rats. *Journal of Shenyang Pharmaceutical University*, 2011.

KIM W. E EGAN J.M. The Role of Incretins in Glucose Homeostasis and Diabetes Treatment. *Pharmacol Rev*, v. 60(4), p. 470-512, 2008.

KING A. The use of animal models in diabetes research. *British Journal of Pharmacology*, p. 877–894, 2012.

LANGTRY H.D, BALFOUR J.A. Glimepiride – a review of its use in the management of type 2 diabetes mellitus. *Drugs*, v. 55, p.563–584, 1998.

LI Y., WEI Y., ZHANG F., WANG D., WU X.. Changes in the pharmacokinetics of glibenclamide in rats with streptozotocin-induced diabetes mellitus. *Acta Pharm. SinicaB*, V. 2(2), p.198-204, 2012.

MASIELLO P., BROCA C., ROYE M. et al. Experimental NIDDM: development of a new model in adult rats administered streptozotocin and nicotinamide. *Diabetes*, v. 47(2), p. 224-9, 1998.

MASSI-BENEDETTI, MD. Glimepiride in Type 2 Diabetes Mellitus: A Review of the Worldwide. *Therapeutic Experience*, 2002.

MCLEOD M.J. Clinical Pharmacokinetics of Nateglinide. *Clinical Pharmacokinetics*, Vol.43, Issue 2, p. 97–120, 2004.

NICE (2008) CG66 type 2 diabetes: full guideline. In: NICE clinical guideline 66. www.nice.org.uk/nicemedia/pdf/CG66NICEGuideline.pdf.

OLOKOBA, A.B., OBATERU, O.A., OLOKOBA, L.B. Type 2 Diabetes Mellitus: A Review of Current Trends. *Oman Med J*, v. 27(4), p. 269–273, 2012.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. Use of Glycated Haemoglobin (HbA1c) in the Diagnosis of Diabetes Mellitus. 2011. Disponível em: http://www.who.int/cardiovascular_diseases/report-hba1c_2011_edited.pdf Acessado em janeiro/2016.

PATHAK R., BRIDGEMAN M.B. Dipeptidyl Peptidase-4 (DPP-4) Inhibitors In the Management of Diabetes. *Pharmacy and Therapeutics*, v. 35(9), p. 509-513, 2010.

SAMALA S., VEERESHAM C. Enhanced Bioavailability of Glimepiride in the Presence of Boswellic Acids in Streptozotocin-Induced Diabetic Rat Model. *Nat Prod Chem Res*, Vol 1, Issue 4, 2013.

SEINO S., TAKAHASHI H., TAKAHASHI T., SHIBASAKI T. Treating diabetes today: a matter of selectivity of sulphonylureas. *Diabetes, Obesity and Metabolism*, 14: 9–13, 2012.

SILVA, P. Farmacologia Médica. 5. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, pag.216-217, 2006.

SILVA, P. Farmacologia. 7. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, pag.1369, 2006.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES, disponível em: <http://www.diabetes.org.br/para-o-publico/diabetes/o-que-e-diabetes> acessado dia 21/01/2016.

TAHRANI AA, PIYA MK, KENNEDY A, et al. Glycaemic control in type 2 diabetes: Targets and new therapies. *Pharmacology & Therapeutics*. 125: 328-361, 2010.

YUN HY, PARK HC, KANG W, et al. Pharmacokinetic and pharmacodynamic modeling of the effects of glimepiride on insulin secretion and glucose lowering in healthy humans. *Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics*, v. 31, p.469–476, 2006.

ŻYŁKA A, GALA-BŁADZIŃSKA A, et al. Role of new biomarkers for the diagnosis of nephropathy associated with diabetes type 2. *Folia Med Cracov*, v. 55(4), p. 21-33, 2015.

ROJAS L.B., GOMES M.B. Metformin: an old but still the best treatment for type 2 diabetes. *Diabetol Metab Syndr*, v. 15;5(1):6, 2013.

HEMMINGSEN B., SCHOROL J.B. GLUUD C. et al. Sulfonylurea versus metformin monotherapy in patients with type 2 diabetes: a Cochrane systematic review and meta-analysis of randomized clinical trials and trial sequential analysis. *CMAJ Open*, v. 22;2(3) p.162-75, 2014.

TRIPATHI A.S., MAZUMDER P.M., CHANDEWAR A. Changes in the pharmacokinetic of sildenafil citrate in rats with Streptozotocin-induced diabetic nephropathy. *J Diabetes Metab Disord*, v. 7;13(1):8, 2014.

GWILT P.R, NAHHAS P.R., TRACEWELL W.G. The effects of diabetes mellitus on pharmacokinetics and pharmacodynamics in humans. *Clin Pharmacokinet*, V. 20(6), p. 477-90, 1991.



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

PRÓ-REITORIA DE PESQUISA

Comissão De Ética No Uso De Animais



CARTA DE APROVAÇÃO

Comissão De Ética No Uso De Animais analisou o projeto:

Número: 27892

Título: Avaliação farmacocinética dos níveis plasmáticos e teciduais da glimepirida em animais saudios e diabéticos induzidos por estreptozotocina

Pesquisadores:

Equipe UFRGS:

BIBIANA VERLINDO DE ARAUJO - coordenador desde 01/09/2014

Comissão De Ética No Uso De Animais aprovou o mesmo , em reunião realizada em 06/04/2015 - Campus Centro- Universidade Federal do Rio Grande do Sul - Porto Alegre, em seus aspectos éticos e metodológicos, para a utilização de 129 Ratos Wistar machos adultos, de acordo com as Diretrizes e Normas Nacionais e Internacionais, especialmente a Lei 11.794 de 08 de novembro de 2008 que disciplina a criação e utilização de animais em atividades de ensino e pesquisa.

Porto Alegre, Quarta-Feira, 22 de Abril de 2015

CRISTIANE MATTE
Vice Coordenador da comissão de ética