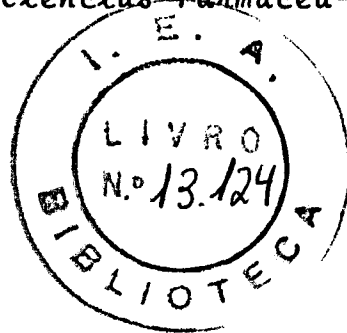


JOSÉ CARLOS BARBERIO

UTILIZAÇÃO DE TRAÇADOR RADIOATIVO NO ESTUDO FARMACOCINÉTICO
DO 2,6-diiodo-4-nitrofenol (Disofen-Disofenol).

Tese apresentada à Comissão Julgadora do Concurso à Livre-Docência, na Disciplina de Metodologia e Aplicações de Radioisótopos do Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental da Faculdade de Ciências Farmacêuticas.



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

1 9 7 3

A

*Julio Kieffer,
Uriel Franco Rocha e
Carlos Henrique de Mesquita*

*sem cuja preciosa colaboração este trabalho não
teria sido sequer iniciado.*

Aos Professores Durval Mazzei Nogueira e Rômulo Ribeiro Pieroni, Diretor e Superintendente, respectivamente, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas e Instituto de Energia Atômica, os agradecimentos de que sou devedor pelas constantes manifestações de incentivo e disposição de auxiliar.

À Professora Maria Aparecida Pourchet Campos por tudo que lhe devo.

A Paulo Carvalho Ferreira, com sauda-
de imensa.

AGRADECIMENTOS

A Antonio S. Gouveia pelo incansável trabalho na computação dos dados analíticos e subsídios biomatemáticos.

A Sagramor C.C. e Mello Persano e Pablo Podlech pelo apoio e realização de parte experimental.

A Paulo Roberto Leme, pelo valioso auxílio no planejamento inicial do trabalho.

A Eduardo Américo Cordeiro Junior, cujo trabalho técnico esteve presente durante toda a realização da pesquisa.

A Paulo Baptista da Cunha, Auxiliar de Laboratório, cuja exemplar dedicação e responsabilidade permitiu a ininterrupta coleta de material.

A meus caríssimos companheiros da Divisão de Radiofarmácia, Farmacêuticos-Bioquímicos, Iza Hirata, Regina B. Brown, Maria Aparecida T.M. de Almeida, Sanae Shimizu, Paulette Miranda Lopes, Nilda Soza de Pereira e Rodza da Silva V. Gonçalves, pelo auxílio constante.

Aos Técnicos de Laboratório da mesma Divisão, Marcia V.J. Cordeiro, Therezinha B. Peres Mesquita e José Cesar de Bonis, pelo valioso trabalho auxiliar.

Ao Dr. Cibar C. Aguilera, Chefe do Centro de Processamento de Dados do IEA de São Paulo, pelas facilidades na utilização do Computador IBM-1620.

Aos Laboratórios USAFARMA, na pessoa de seu Diretor, Dr. Arnaldo Picosse, pela constante colaboração, traduzida ora em matéria-prima, ora adquirindo os carneiros, animais utilizados no trabalho.

Ao Conselho Federal de Farmácia, nas pessoas de Amaury Ferreira Brandão, Halmi Hirai, Leda Maria M. de Carvalho, Mauricio Yazumoto, Wilken M. Nogueira e Dilermando Cattani, meus melhores agradecimentos.

À Marisa Valentina F. Ferreira pelos trabalhos finais de datilografia.

Aos Drs. Shirley P. Oba, Rachel G. Serra, Oswaldo P. Serra, Claudia Rocha e Orlando Ferrari, da Faculdade de Medicina Veterinária, pela inestimável cooperação no campo da medicina veterinária.

Aos funcionários da mesma Faculdade, Márcio dos Santos, Ismael F. Ribeiro e Augusto Avelino dos Santos, pela ajuda constante.

A Fernanda I. Piocchi e colaboradores, pelo precioso auxílio na parte bibliográfica.

A Neuza B. Camargo, Secretária da Divisão de Radiofarmácia do IEA, os agradecimentos pelos inúmeros rascunhos que datilografou com permanente disposição.

A Dulce Oliveira de Almeida, Auxiliar de Ensino da Disciplina de Metodologia e Aplicações de Radioisótopos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP pela irrestrita colaboração em várias etapas do trabalho.

Ao Dr. Geraldo Leme da Rocha, Diretor do Instituto de Zootecnia, pelas facilidades proporcionadas na confecção dos coletores de excretas.

A Therezinha O. Silveira Santos, Chefe do Serviço de Expediente do Instituto de Energia Atômica, pelas inúmeras atenções e amizade.

A Todos que, de uma forma ou de outra, contribuíram para a realização deste trabalho.

-o-o-o-

S U M Á R I O

	<u>PÁGINA</u>
1 - Introdução	1
2 - Revisão da Literatura	6
3 - Propósito do trabalho	9
4 - Material e Métodos	10
4.1 - <u>Material</u>	
4.1.1 - Animais	10
4.1.2 - Soluções radioativas	10
4.1.3 - Instrumentação	11
4.2 - <u>Métodos</u>	13
4.2.1 - Preparação do Disofenol marcado com I-131	13
4.2.2 - Contrôles radioquímico da preparação	14
4.2.3 - Estudo da influência de variáveis diversas no rendimento radioquímico da preparação	17
4.2.4 - Ensaios biológicos	21
4.2.5 - Parâmetros estudados	26
4.2.6 - Procedimento experimental	32
4.2.7 - Tratamento dos dados experimentais e cálculo dos parâmetros do sistema	38
5 - Resultados	42
5.1 - Atividade plasmática global	42
5.2 - Atividade corpórea global residual	42

	PÁGINA
5.3 - Atividade das fezes	42
5.4 - Atividade das urinas	46
6 - Comentários	60
7 - Conclusões	68
8 - Referências bibliográficas	70
9 - Apêndice	77

-o-o-

1 - INTRODUÇÃO
=====

Adotando como princípio o fato de que não existe setor algum da atividade humana onde os radioisótopos não tenham sido utilizados, parecem ficar plenamente justificadas as razões que levam os especialistas em radioisótopos, a participarem de diversas searas da ciência.

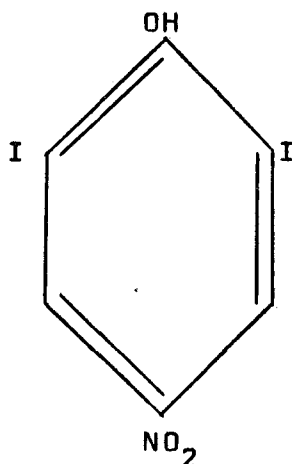
É o caso do presente trabalho, para a realização do qual participamos dos problemas ligados à parasitologia animal, com vistas a um propósito inicial de saber de que maneira poderíamos acompanhar no organismo uma droga, cuja importância terapêutica apresentava destaque em Veterinária.

Deste modo, fica caracterizada a filosofia atual que se tem sobre os radioisótopos e seus usos. tendo em vista, principalmente, o senso comum de definir essa área de conhecimento sob o contexto de Metodologia e Aplicações.

O presente trabalho propõe uma metodologia na utilização de um determinado radionuclídeo, com a finalidade de aplicá-lo num certo campo da investigação científica.

Assim é que, verificada a possibilidade de se incorporar um isótopo radioativo à estrutura de um composto dotado de ação farmacológica, estabelecemos um plano de trabalho, capaz de permitir o acompanhamento da droga através do organismo, com vistas a ulteriores informações acerca de seu modo de ação e metabolismo.

O composto 2,6-diiodo-4-nitrofenol, com fórmula estrutural reproduzida a seguir, e que toma entre outras as denominações comerciais de DNP, Disofenol, Ancylol⁽²⁶⁾ e Disofen, é utilizado em medicina veterinária no combate a helmintoses diversas.



Sua atividade farmacológica foi, pela primeira vez, verificada por WOOD e colaboradores⁽⁵³⁾ no ano de 1961, utilizando cães infestados, natural e experimentalmente, com Ancylostoma caninum e braziliense e Uncinaria stenocephala.

O efeito terapêutico foi demonstrado através da eficiente ação da droga sobre formas adultas desses helmintos, permitindo aos autores estabelecerem a dose ideal, cerca de quatro vezes menor que a dose tóxica.

Em 1964, DARNE e WEBB⁽¹³⁾ confirmaram a ação da droga, através de ensaios realizados em cães infestados com ancilostomídeos.

A repercussão de sua eficiente ação terapêutica chegou até nós, o que levou ROCHA e colaboradores⁽³⁹⁾ em 1965 a experimentarem o Disofen contra a hemoncose

ovina, concluindo pela eficácia total do mesmo, na dose de 7,5mg por quilo de peso vivo, por via sub-cutânea, idêntica àquela preconizada por WOOD e colaboradores, em 1961⁽⁵³⁾.

ROCHA e colaboradores⁽⁴⁰⁾⁽⁴¹⁾ em 1966 e 1967, utilizando a droga no tratamento da Ancilostomíase e da Tricuríase em cães naturalmente infestados, concluíram pela eficiência da mesma apenas na ancilostomíase, tanto pela via sub-cutânea como pela administração oral.

Em 1967, ainda, ROCHA e colaboradores⁽⁴²⁾ entusiasmados com a nova droga, realizaram estudo comparativo das atividades terapêuticas do Disofenol e Tiabendazol [benzimidazol 2-(4-thiazolyl)] em ovinos e puderam revelar a maior eficiência do Disofenol contra formas imaturas de nematóides.

Nesse mesmo ano, ROCHA e colaboradores⁽⁴³⁾, ao seguirem os efeitos tardios do Disofen nas infestações de suínos e ovinos, surpreenderam-se ao constatar a ausência de ovos de nematóides, mesmo depois de decorridos oito meses do tratamento. Os lotes testemunhas, ao contrário, apresentaram alto nível de infestação. Esses achados foram, então, interpretados como decorrentes de um eventual "efeito residual".

Movidos por esse achado singular, revimos a literatura pertinente verificando que, em 1962, AMAYA⁽¹⁾, na Colômbia, chamou a atenção para fato comparável registrado para o lado do sangue humano; sessenta e três dias depois da administração do Disofen ainda era anormalmente elevada a concentração plasmática.

Tendo aquele autor encontrado um valor igual a 20 ug/ml de sangue e sabendo que a dose administrada fo

ra da ordem de 3 mg/quilo de peso corpóreo, verifica-se que cerca da metade da dose ainda se encontrava confinada ao volume sanguíneo, decorridos sessenta e três dias!

Este fato poderia explicar o demorado efeito terapêutico observado nos animais por ROCHA e colaboradores⁽⁴³⁾, já que estes utilizaram doses bem mais elevadas que aquelas de AMAYA⁽¹⁾.

A partir desses achados, novos aspectos podem e devem ser considerados: o primeiro deles relacionado com a possibilidade de se estabelecer a dose de manutenção ideal; o segundo, corolário do primeiro, reflete-se no fato de se poder limitar os efeitos tóxicos da droga pelo manuseio adequado das doses iniciais e de manutenção, através de doses de "reforço" devidamente espaçadas.

É evidente que o horizonte que se abre, ao serem considerados os aspectos referidos, deve ser antes de tudo muito mais importante do ponto de vista prático do que do ponto de vista puramente acadêmico. Como lado prático, queremos enfatizar os reflexos econômicos que aparecem quando a criação animal está afetada. Resta saber pois, se compensa investigar amplamente a droga a fim de criar melhores condições para a sua utilização em terapêutica.

Vejamos pois alguns dados sobre a utilização do Disofenol em parasitologia animal, bem como salientar possíveis efeitos da mesma.

Diz-se em parasitologia que, do ponto de vista econômico, os vermes de maior importância quanto ao prejuízo causado aos animais domésticos são:

- 1 - Nematóides
- 2 - Cestóides
- 3 - Trematóides,

sendo os mais numerosos e os que mais atacam os rebanhos os nematóides⁽⁵⁰⁾; a maioria das espécies patogênicas habita o aparelho digestivo, algumas se localizam nos pulmões, outras nos rins, músculos e olhos.

O Disofenol é largamente utilizado para combater esses nematóides, quando parasitas de bovinos, ovinos e caprinos, principalmente. A sintomatologia que se verifica nos animais parasitados é alarmante já que a espoliação leva o rebanho à debilidade, traduzida pelo retardo do crescimento e perda de condições físicas. Haverá, é óbvio, uma acentuada diminuição dos rendimentos em carne, lã, leite, levando, finalmente, ao prejuízo econômico de repercussão nacional.

É fácil avaliar os prejuízos decorrentes de uma baixa produção de lã e o que ela representa; sabemos que até sessenta por cento da produção de lã é perdida quando os rebanhos de ovinos estão atacados.

No caso do Disofenol, sua importância é ressaltada, exatamente, porque age em nematóides considerados de distribuição universal, acarretando os maiores danos às criações pela ação espoliadora que exercem.

Os principais nematóides pertencem aos gêneros Haemonchus Cobb, 1898; Ostertagia Ranson, 1907; Bunostomum Railliet, 1902 e Oesophagostomum Molin, 1861.

Não é pois sem interêsse que o Disofen, desde 1965, vem sendo intensamente utilizado entre nós, estimando-se seu consumo, em 1972, em cerca de quatro toneladas⁽⁵¹⁾.

2 - REVISÃO DA LITERATURA

=====

Foram WOOD e colaboradores⁽⁵³⁾ os primeiros a estabelecer estudos de toxicidade do Disofen. Verificaram dentre tantas observações que, quando a droga é administrada repetidas vezes, pode ocorrer o fenômeno de acumulação, tendo em vista os efeitos tóxicos manifestados.

KAISER⁽²²⁾ em 1960, pela primeira vez, relatava observações sobre o 2,6 diodo-4-nitrofenol em cães, como parte de uma investigação farmacológica, para merecer um estudo mais amplo e comparativo em 1963 e publicado em 1964⁽²³⁾. Com efeito, trabalhando com ratos e cães, o autor pôde estabelecer um paralelo do ponto de vista toxicológico, entre o Disofenol e o Dinitrofenol.

Verificou, por exemplo, efeitos tóxicos similares do ponto de vista qualitativo, tais como alterações de ritmo cardíaco, aumento da respiração e aumento de temperatura corporal; mas quantitativamente, uma pronunciada distinção entre os efeitos das drogas como na intoxicação aguda onde o disofenol mostrou ser menos tóxico que o dinitrofenol, quando se utilizaram ratos e camundongos e, ainda, o fato de que, em cães, a administração repetida fêz com que o Disofenol fosse considerado mais tóxico que o 2-4 nitrofenol. De fato, enquanto aquele sugeria uma acumulação, este último se excretava mais rapidamente. KAISER verificou, igualmente,⁽²³⁾ que, após repetidas doses diárias de 12,5mg por quilo de peso ou mais, a morte dos cães ocorria quando a

dose total incorporada se situava entre 60 e 100 mg por quilo de peso.

Em 1967, BORAY e colaboradores⁽⁸⁾ ao estudar a eficiência de vários antihelmínticos, destacaram a ação do Disofen na Fasciolose, alertando porém para o fato de que muitos carneiros morriam, provavelmente pela dose que recebiam, cerca de 50mg/kg. WANG, em 1970⁽⁵²⁾ utilizando o Disofen em cães pequenos, infestados com *Ancylostoma caninum*, informava que administrada subcutaneamente, a droga era efetiva nas concentrações de 10, 20, 30 e 40mg por quilo de peso; assinalava, porém, a morte de dois entre quatro cães que receberam 40mg por quilo de peso e evidentes sinais de intoxicação em cães que receberam 20 e 30mg por quilo de peso.

O problema do perigo do emprego de doses tóxicas durante a terapêutica pelo Disofen foi diminuindo, à medida que se confirmavam os trabalhos originais que recomendavam doses de 7,5 a 10mg por quilo de peso, principalmente, nas infestações por *Ancylostoma*. E, em 1971, FOWLER⁽¹⁶⁾ demonstrava que dentre tantos antihelmínticos, o tetracloreto de carbono, administrado por via oral, revelava-se o mais tóxico para ovelhas infestadas por *Fasciola hepática*; o Disofen, ao contrário, mostrou-se bem tolerado, comparado a outras drogas.

Toda essa preocupação, com efeito, se justificava tendo em vista a importância dos dinitrofenóis, largamente utilizados como herbicidas na agricultura e, sabidamente,⁽²⁴⁾ conhecidos por sua ação tóxica.

Uma evidência manifestou-se, finalmente, a pós tantos trabalhos: o de que, mesmo nas doses consideradas seguras, o perigo de intoxicação poderia manifes

tar-se após administração de doses repetidas que, por efeito residual alcançando uma determinada concentração no organismo, poderia trazer consequências fatais para o mesmo.

Este foi, pois, o ponto de partida para nossa investigação: a evidência de que a droga por um lado, podendo acumular-se no organismo, apresentava perigo potencial e, por outro, a importante propriedade terapêutica de uma ação lenta e duradoura.

De outro lado, afortunadamente, para nossas intenções, a estrutura química do Disofen apresentando dois átomos de Iôdo permitiria sua substituição através de seus isótopos radioativos.

Este fato - de indiscutível importância - foi prioritário para o estabelecimento de um plano de trabalho, compatível com as exigências propostas.

3 - PROPÓSITO DO TRABALHO =====

O propósito do presente trabalho foi duplo, a saber:

- 1º) numa primeira etapa, preparar o 2,6 di-iodo-4-nitrofenol marcado com I-131 e estabelecer a sua meia vida biológica;
- 2º) estabelecer a cinética da droga com o fim eventual de caracterizar doses terapêuticas, ou outras.

Com vistas a esse objetivo traçamos um plano de trabalho que assegurou:

- a) a preparação do composto marcado, já objeto de comunicação prévia⁽³⁾;
- b) o estabelecimento da meia vida desse composto usando carneiros como material de ensaio;
- c) verificação da cinética da droga, caracterizando, o tempo de permanência da mesma no organismo animal, a sua distribuição, e o possível modo de ação.

Esse plano constou de uma fase que chamamos de "pré-experimental", na qual administramos a droga a ratos, para ter informações globais sobre a sua distribuição nos vários órgãos, e riqueza relativa.

Com base nessas informações preliminares, passamos à fase experimental propriamente dita, utilizando os carneiros como material de experiência.

4 - MATERIAL E MÉTODOS

4.1 - Material

4.1.1 - Animais

Para a fase considerada pré-experimental , utilizamos doze ratos adultos, sem distinção de sexo, da raça Wistar, mantidos sob dieta normal no Biotério do Instituto de Energia Atômica de São Paulo.

Para a fase experimental foram utilizados oito carneiros adultos, da raça Corriedale, enviados pelo Posto de ovinos e caprinos do Instituto de Zootecnia da Secretaria da Agricultura do Estado de São Paulo. Estes animais foram mantidos no Biotério da Faculdade de Medicina Veterinária e, durante a fase experimental, conduzidos ao Instituto de Energia Atômica apenas para efeito de medidas de radioatividade e colheita de sangue.

4.1.2 - Soluções Radioativas

4.1.2.1 - NaI-131

Como matéria prima para a preparação de Disofenol-I-131, utilizamos uma solução de Iodeto de Sódio (Na^{131}I), cujo Iodo-131 radioativo foi produzido no Instituto de Energia Atômica a partir de Telúrio irradiado.

Nas condições exigidas, utilizamos soluções de Na^{131}I , livres de carregador e redutor, com atividade

des específicas da ordem de 15 mCi/ml.

4.1.2.2 - Disofenol não radioativo

Utilizamos a droga Disofen, nome comercial do 2,6 diiodo-4-nitrofenol, entre nós sintetizada e comercializada pela Usafarma S.A. Indústria Farmacêutica.

4.1.2.3 - Disofenol I-131

O produto obtido a partir de reação de Disofenol não radioativo com NaI-131, constituiu-se na droga marcada.

As preparações utilizadas acusaram, em média, as características seguintes: concentração radioativa \approx 500 μ Ci/ml ; atividade específica \approx 50 μ Ci/mg e concentração \approx 10mg/ml.

4.1.3 - Instrumentação

Para a medida da radioatividade das soluções, materiais biológicos e dos próprios animais, utilizamos os seguintes equipamentos:

- a) calibrador de soluções radioativas MEDIAC (Nuclear - Chicago)
- b) detetor de cintilação, dotado de cristal de iodeto de sódio ativado com tálio NaI (Tl), de poço e contador modelo ULTRASCALER II (Nuclear - Chicago)
- c) medidor de atividade corpórea total (con

tador de corpo inteiro - CCI) dotado de detector constituído por cristal cilíndrico de iodeto de sódio ativado com tálio (NaI (Tl)), medindo 20,3cm de diâmetro por 12,7cm de altura. A fim de reduzir a radiação de fundo, o detector acha-se instalado numa célula de contagem de cerca de 2x2x2m, com paredes de 12 cm de espessura construídas com chapas de ferro. Internamente o ferro está revestido por uma lâmina de 1,6mm de chumbo, e cujo equipamento eletrônico é constituído por:

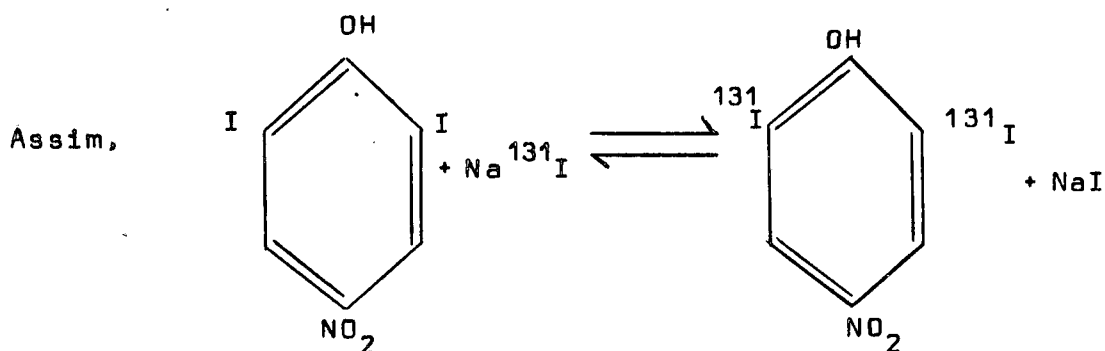
- 1) Analisador de altura de pulsos multicanal (400 canais), marca Technical Measurements Corporation - TMC modelo 401;
- 2) Integrador de contagens TMC modelo 522;
- 3) Unidade de alimentação de alta tensão e saída de dados por máquina de escrever, marca TMC modelo 520P.

O conjunto é abrigado em prédio próprio , projetado de modo a reduzir ao mínimo possível qualquer contaminação radioativa externa.

4.2 - Métodos

4.2.1 - Preparação do Disofenol marcado com I-131

O método de preparação da droga foi desenvolvido por nós mesmos⁽³⁾, estabelecendo uma reação de troca isotópica, onde o Iodo-131, radioativo, troca com o Iodo estável presente na estrutura do Disofenol.



A análise de diversas variáveis dependentes, tais como concentração de Disofenol, tempo de reação, temperatura de reação e ação fotoquímica, levou-nos ao estabelecimento da seguinte técnica, que permitiu alcançar até 90% de rendimento radioquímico:

em tubo de centrifugação provido de tampa esmerilhada, dissolvemos cerca de 100mg de Disofenol em 0,5ml de carbowax 400 e 1,0ml de água destilada. Ajustamos o pH em 5,5, adicionamos a seguir o Iodo radioativo, na forma de $\text{Na } ^{131}\text{I}$, livre de carregador e redutor (1 a 10 milicurie) e duas gotas de solução de cloramina T (3,5mg/ml.). Arrolhamos o tubo fixando ulteriormente a tampa com fita adesiva e levamos em banho-maria, ajustando-se

a 15cm de distância, uma lâmpada comum de 150 W. Ao cabo de 30 minutos sustamos a reação adicionando uma gota de solução de tiosulfato de sódio molar. Esfriamos e purificamos (remoção dos excessos de reagentes, em particular ^{131}I não ligado) o Disofen precipitando-o com HCl N, em gelo; centrifugamos e retomamos o precipitado com NaOH N. A operação foi repetida mais uma vez para finalmente, após redissolução do precipitado com NaOH ajustamos o pH final a 7-7,5. A solução foi então filtrada em filtro Milipore bacteriológico, de porosidade igual a $0,22 \mu$ e diâmetro de 25mm.

4.2.2 - Contrôle radioquímico da preparação .

Este controle é importante e diz respeito ao teor de Iodo-131 não incorporado à estrutura orgânica . Normalmente, admite-se uma percentagem máxima de 5% de Iodo livre, em relação ao produto marcado.

Cerca de vinte preparações de Disofenol, por nós realizadas, apresentaram teor máximo de Iodo livre igual a 1%, encontrando-se uma média de 0,54% (Tabela I).

Para a realização do controle radioquímico utilizamos as técnicas descritas a seguir e que representam a adaptação, por nós realizada, dos métodos eletroforéticos e cromatográficos convencionais:

a) Eletroforese de zona:

Suporte: papel Whatmann n° 1

Tiras de 2,5 x 30cm

Tensão: 300 volt

Gradiente de tensão: 10 v/cm

Tampão: Acetato-acético pH 5,6
Mobilidade eletroforética do Disofen ^{131}I
 $0,00083 \text{ cm}^2/\text{volt/s}$
Mobilidade eletroforética do ^{131}I
 $0,0035 \text{ cm}^2/\text{volt/s}$

b) Cromatografia em papel ascendente:

Papel Whatmann nº 1
Solvente: n butanol: ácido acético:
Água (4:4:2)
Tempo de migração: 90 minutos - 15 cm
Rf Disofen- ^{131}I - 0,90
Rf Iodeto (^{131}I)- 0,40
Revelador: Acetato de chumbo (sol. a 10%)

c) Cromatografia em camada delgada:

Fase estacionária: Sílica gel G
Placa: lâmina de microscopia(2,5x7,5 cm)
Espessura da camada: 250μ
Solvente: n butanol: amônia (5:1)
Tempo de migração: 15 minutos
Rf Disofen- ^{131}I - 0,55
Rf Iodeto (^{131}I) - 0,27

TABELA I

=====

Preparação nº	% de Radioiodo livre
1	0,44
2	0,60
3	0,83
4	0,58
5	0,33
6	0,52
7	0,52
8	0,46
9	0,71
10	1,00
11	0,40
12	0,50
13	0,39
14	0,45
15	0,51
16	0,50
17	0,90
18	0,35
19	0,28
20	0,58
Média	0,54

4.2.3 - Estudo da influência de variáveis diversas no rendimento radioquímico da preparação

Os resultados para cada variável ou para conjunto de variáveis acham-se reunidos nas Tabelas II, III, IV, V. Cada dado representa a média de três determinações. O asterisco identifica as condições por nós escolhidas para cada variável.

4.2.3.1 - Influência da massa de Disofenol na reação (volume da ordem de 1,5 ml).

T A B E L A II
=====

Disofenol mg	Rendimento Percentual
20	35
40	40
50	62
75	79
100*	93
200	80
400	54

4.2.3.2 - Influência do pH para 15 e 30 minutos de tempo de reação.

T A B E L A I I I

pH	Rendimento Percentual	
	15 min.	30 min.
4,0	11	15
4,2	10	20
4,5	13	22
4,7	29	37
5,0	53	66
5,2	62	77
5,5 *	82	90 *
5,7	81	88
6,0	76	84
6,5	75	79
7,0	70	79
8,0	59	67

4.2.3.3 - Influência do tempo de reação para 50°, 80° e 100°C de temperatura.

T A B E L A I V
=====

Tempo de reação (min.)	Rendimento Percentual		
	50°C	80°C	100°C
10	17	25	45
20	35	44	77
30*	47	75	92*
40	50	84	90
60	75	85	81
90	72	80	80
120	75	77	77
180	70	78	80

T A B E L A V
=====

4.2.3.4 - Influência da luz e do tempo de reação para
pH 5,5 e massa de 100 mg a 100°C

Tempo de reação (min.)	Rendimento Percentual	
	sem luz	com luz
10	32	46
20	40	72
30 *	62	90 *
40	65	90
60	70	82
90	78	80

Nota - Foi preferida a reação de 30 minutos por ser mais rápida.

4.2.4 - Ensaio biológicos

4.2.4.1 - Teste de distribuição em ratos

Em face da total inexistência de dados relativos à distribuição da droga em animais de experimentação e, com o objetivo de obter dados iniciais como orientação para as experiências seguintes, programamos um ensaio preliminar em ratos, aceitando a presunção de que, nestes, não teria a droga distribuição particularmente diferente da de outros mamíferos, ressalvadas as características dinâmicas. Esses dados facultariam, outrossim, sugerir eventuais aspectos interpretativos à distribuição estudada em carneiros que, por não deverem ser sacrificados, não permitiriam a amostragem de órgãos.

Para tanto, administramos a droga, na mesma dose por 100mg de peso e por via endovenosa a três lotes de três ratos cada. Decorridos 15, 30 e 60 minutos, sacrificamos todos os animais de cada lote, procedendo-se à medição da radioatividade do sangue, e dos seguintes órgãos: pulmão, fígado, rins, coração, intestino, pâncreas, baço e estomago. Os resultados foram expressos em contagens líquidas por ml para o sangue e, por grama de tecido fresco para os órgãos, sendo reunidos na Tabela VI.

A análise da mesma mostra que as maiores concentrações foram registradas para o lado do sangue e de órgãos altamente vascularizados (fígado, rins e pulmão), o que sugere a permanência, no compartimento vascular, de elevadas concentrações.

Desejando aquilatar indiretamente a absorção cutânea do Disofen marcado, administramos igual dose por 100 g de peso pela via subcutânea a três ratos que foram sacrificados decorridos 120 minutos. Determinamos a atividade sanguínea e a dos mesmos órgãos. Os resultados foram reunidos na mesma Tabela VI para permitir o cotejo com os decorrentes da administração endovenosa. Como se percebe, a ordem de magnitude é sensivelmente análoga, sugerindo que decorridos 120 minutos foi alcançada uma distribuição próxima da de 60 minutos da administração endovenosa.

T A B E L A VI
=====

DISOFEN ¹³¹I - Atividade dos diferentes órgãos, expressa em contagem/minuto/grama(cpm/g) de órgão

Ó R G Ã O S	Ratos 1.2 e 3	Ratos 4.5 e 6	Ratos 7,8 e 9	Ratos 10,11 e 12
	Injeção Intravenosa			
	15 min.	30 min.	60 min.	120 min.
(*)				
Sangue	167.264	195.836	213.000	199.550
Pulmão	193.760	234.520	239.050	176.922
Fígado	177.918	168.472	152.230	120.730
Rim	137.834	126.770	196.305	106.165
Coração	54.205	51.365	48.540	35.360
Intestino	31.870	29.180	29.177	24.170
Pâncreas	27.830	33.395	30.735	23.725
Baço	25.080	26.115	25.130	16.585
Estomago	12.800	16.080	26.622	17.074

(*) cpm/ml

4.2.4.2 - Estudo da dinâmica do Disofen marcado em carneiros

Sendo meta fundamental do presente trabalho, o estudo da dinâmica do Disofen marcado em carneiros, acreditamos oportuno ao lado da descrição dos métodos empregados, justificar o porquê de uma série de opções referentes a técnicas de obtenção de dados, tratamento dos mesmos e escolha do animal de experimentação.

A premissa básica para este trabalho foi a aceitação de que o Disofenol marcado não diferisse, biologicamente, do Disofenol "frio". cremos que nesse sentido não necessitamos nos escudar em qualquer ensaio experimental uma vez que o composto "frio" contém iodo, e o processo de marcação apenas substitui alguns poucos átomos de ^{127}I por outros tantos de ^{131}I ($2,47 \times 10^{-6}$ átomos ^{131}I /molécula de Disofen). O único eventual problema poderia ser ligado ao efeito isotópico que, no caso presente, podemos considerar inteiramente desprezível. Com efeito, toda a experimentação animal e humana no campo da tireoidologia poderia sofrer de igual dúvida. No entanto, jamais foi o efeito isotópico levado em conta, mesmo nos mais refinados estudos da cinética do iôdo. (6) (14) (29) (37)

Acreditamos, assim, poder aceitar o fato de que o Disofen marcado é o traçador legítimo e adequado do Disofen "frio".

Dentre os numerosos animais de experimentação disponíveis, recorreremos ao carneiro por representar espécie na qual as experiências e o uso prático do Disofen são particularmente amplos e por terem os animais adultos porte e massa muito próximos dos do homem, facilitando desta forma a extensão, a eles, da experiência adquirida anteriormente com o emprego do contador de corpo inteiro (CCI) no homem.

4.2.5 - Parâmetros estudados

Para o estudo da dinâmica da droga marcada aceitamos que o conhecimento da variação da concentração da mesma no compartimento de introdução (plasma) em função de tempo, da fração percentual residual da dose administrada em função de tempo e das frações percentuais de dose eliminadas pelas fezes e pela urina, constituem um conjunto de informações que permite estruturar modelos dinâmicos consentâneos com a realidade experimental e compatíveis com modelos matemáticos correspondentes. (2) (4) (38)

Esta maneira de estudo, desenvolvida inicialmente por SCHOENHEIMER e RITTENBERG em 1935 (44) e, posteriormente, enriquecida pelas contribuições de SCHOENHEIMER em 1942⁽⁴⁵⁾ e RESCIGNO em 1954⁽³⁵⁾ e 1956⁽³⁶⁾ já se tornou hoje clássica, constituindo a base metodológica da moderna farmacocinética⁽⁵⁾⁽⁹⁾⁽¹⁰⁾⁽¹¹⁾⁽¹²⁾⁽¹⁵⁾⁽¹⁷⁾⁽⁴⁹⁾ e dos estudos dinâmicos de constituintes corpóreos⁽³³⁾⁽³⁴⁾, vitaminas⁽²¹⁾, elementos maiores⁽¹⁸⁾ (28), micronutrientes⁽³¹⁾⁽³²⁾, etc.

Decorre ela, como é sabido, da análise das funções experimentais através de suas decomposições nos diferentes termos exponenciais que as geraram. Do número de componentes exponenciais, inferimos o número de compartimentos em que se subdivide a fase em estudo, que se admite estar em equilíbrio dinâmico. O conhecimento de dados inerentes à distribuição, aos efeitos farmacológicos, à metabolização e excreção do fármaco em estudo levam a criar, com base no número de compartimentos encontrados, um modelo dinâmico compatível com

soluções analíticas várias.⁽⁴⁷⁾ Dentre elas, devemos selecionar a que melhor reproduza os dados experimentais, ao mesmo tempo que atenda ao que se conhece com relação às vicissitudes biológicas da substância em exame.

Cumpra, sempre, ter em mente que a elaboração de modelos dinâmicos e de modelos matemáticos representa tão somente uma aproximação do problema biológico, e que nem sempre e necessariamente todas as consequências analíticas do modelo são encontradas na prática. A dificuldade na elaboração e seleção dos modelos dinâmicos reside e decorre, fundamentalmente, da inacessibilidade da maioria dos compartimentos que, não podendo ser diretamente amostrados, tornam impossível a direta comprovação da veracidade analítica. Malgrado essas limitações que devem ser conhecidas e valorizadas, as técnicas de estudo deste tipo constituem-se em ferramentas extraordinárias para a análise de um sem número de problemas dinâmicos, cada vez mais importantes à medida que nos aproximamos da essência dos fenômenos biológicos.

4.2.5.1 - Variação da atividade plasmática em função de tempo

Visa a obtenção de dados experimentais relativos às variações da concentração radioativa no comportamento de introdução e de amostragem. Mercê des estes dados, devidamente manipulados, teremos acesso aos parâmetros seguintes:

- a) volume de distribuição do compartimento de introdução (V_1), no caso identificável com o próprio volume plasmático em virtude de termos verificado, em uma série de experiências colaterais, que a atividade se conserva sempre limitada à fase líquida do sangue, não se incorporando à fase celular;
- b) volume de distribuição da fase do radiofármaco (V_T), ou seja, volume global que este atinge quando de sua definitiva e uniforme distribuição ao organismo do animal de experimentação;
- c) ritmo de remoção da fase do radiofármaco (λ_1);
- d) meio tempo de desaparecimento ($t_{1/2}$);
- e) número de componentes exponenciais em que pode ser decomposta a função experimental;
- f) respectivos valores das intersecções com a ordenada em $t=0$ (a_1, a_2, \dots, a_n);
- g) respectivos coeficientes angulares ($\lambda_1, \lambda_2, \dots, \lambda_n$);

4.2.5.2 - Fração percentual residual da dose administrada em função de tempo

A cada intervalo de tempo considerado , mercê da medição da atividade corpórea total em contador de corpo inteiro (CCI), determinamos a fração da dose administrada que residuou. O valor residual independe do número e natureza das vias de remoção, englobando-as como se fossem uma única. A reunião dos dados experimentais em função de tempo permite definir a função representativa da variação temporal da atividade global corpórea. A análise desta função facilita a obtenção dos dados seguintes:

- a) valor da fração percentual residual em qualquer tempo;
- b) meio-tempo de remoção do radiofármaco ($t_{1/2}$) ;
- c) ritmo de remoção do radiofármaco do organismo. Este dado se constitui em elemento de controle do dado experimental de igual conteúdo ($\alpha 1$) obtido pela análise da função representativa da variação da atividade plasmática em função de tempo;
- d) número de componentes exponenciais em que pode ser decomposta a função experimental.

4.2.5.3 - Frações percentuais da dose administra-
da eliminadas pelas fezes e pelas uri-
nas.

No caso particular apenas foi possível determinar experimentalmente a fração excretada pelas fezes, pois logramos adaptar dispositivo de coleta seletiva de fezes em condições que garantissem sua coleta total⁽²⁵⁾ isenta de qualquer tipo de contaminação. Coleta igual não foi possível no que toca a urina. A atividade fecal assim determinada para intervalos definidos de tempo (dias) representa a fração que acrescida a da excreção urinária perfaz a excreção global diária. Consequentemente, aceitamos serem urina e fezes as únicas duas vias possíveis de eliminação do radiofármaco e ou do radioiodo decorrente de sua degradação metabólica (descuramos, assim, as chamadas perdas insensíveis: suor, vapor d'água expirado, etc.).

Aceita esta premissa, era lícito calcular a fração percentual de dose excretada pelas urinas como a diferença entre a redução correspondente a determinado intervalo de tempo da dose residual (CCI) e a excreção fecal do mesmo período.

O conhecimento destas duas frações da excreção global diária do radiofármaco poderia adquirir importância decisiva na determinação do modelo cinético mais adequado para a representação dos dados experimentais.

Os dados assim reunidos permitiriam, as

sociados aos conhecimentos relativos à farmacologia da droga, elaborar um modelo dinâmico compatível com uma ou mais soluções matemáticas. As soluções seriam então ensaiadas através de programa computacional adequado. Mercê das soluções matemáticas inerentes ao modelo escolhido, poderiam ser calculados os valores numéricos de certos parâmetros e dados para posterior cotejo com os correspondentes valores experimentais. Desse cotejo resultaria a solução mais provável para o modelo aceito como representativo da distribuição e dinâmica do Disofen.

4.2.6 - Procedimento experimental

Com antecedência de 24 a 48 horas do início da experiência, administramos pela via subcutânea 200 mg de iodo sob forma de solução de iodeto de sódio, com o fim de expandir a fase iodeto extratireoidea e minimizar, assim, a captação por parte da glândula tireóide de radioiodo liberado da molécula de Disofen marcado.

Todos os carneiros foram submetidos a tratamento igual, recebendo por via endovenosa de 7-8 uCi/kg de peso de Disofen marcado, veiculados por Disofen "frio" (*) na dose de 10 mg/kg, a fim de garantir carreador com massa análoga à correspondente ao emprego terapêutico para a espécie.

Todos os animais foram submetidos a coletas repetidas de sangue e fezes e a determinação da atividade residual corpórea segundo os esquemas e procedimentos seguintes

- o -

* Como carreador empregou-se Disofen em sua preparação comercial habitual, própria para uso subcutâneo ou endovenoso.

4.2.6.1 - Amostras de sangue

A veia femural foi empregada para a infusão da droga e sua contralateral para a colheita das amostras de sangue (5-10 ml com seringa heparinizada) que obedeceram ao seguinte esquema cronológico a partir da administração do radiofármaco: 15 e 30 minutos, 1,2,3,6,12,24,48 e 72 horas; a partir do terceiro dia, as amostras foram colhidas em dias alternados, sempre que possível, prolongando-se o intervalo da colheita até 40-45 dias.

Os plasmas das amostras de sangue de cada carneiro eram separados e suas atividades determinadas em detector de "poço". Mercê de soluções de referência adequada, a magnitude da dose administrada era quantificada em contagem/minuto para esta geometria.

As contagens líquidas/ml de plasma eram lançadas na ordenada funcional de gráfico semi-logarítmico contra tempo. A esses pontos ajustávamos, graficamente, a curva que melhor os satisfizesse. A seguir a curva era extrapolada retrogradamente até o eixo das ordenadas, permitindo calcular a concentração radioativa por ml de plasma para $t=0$.

Mercê da razão: dose/concentração plasmática para $t=0$ calculávamos o volume de distribuição do radiofármaco quando a totalidade da dose se achava confinada, ao volume do compartimento de introdução.

A seguir, expressávamos a dose residual no compartimento de introdução em percentagem da dose

administrada. Os valores numéricos correspondentes eram tabulados e lançados na ordenada funcional de gráfico semilogarítmico.

4.2.6.2 - Atividade corpórea global residual

Mediante o CCI IEA-1, cujas características foram descritas, procedemos à determinação da atividade corpórea global logo após a administração intravenosa do radiofármaco e, a partir daí, diariamente, durante os primeiros 8-10 dias e a seguir em dias alternados, sempre que possível, até 40-45 dias.

A sequência operacional das medições foi sempre a mesma e obedeceu ao esquema seguinte de determinações das atividades:

- a) de fundo
- b) de uma solução de referência de radioiodo-131 (padrão de eficiência)
- c) do carneiro em decúbito lateral direito e em decúbito lateral esquerdo
- d) do padrão de eficiência
- e) de fundo.

Em todas as medições integramos apenas as contagens relativas à faixa de energia correspondente a 95% do fotópico de 364 KeV do radioiodo-131.

As contagens líquidas correspondentes à soma das determinações em ambos os decúbitos, eventualmente corrigidas quanto a diferenças de eficiência

global do sistema, apreciadas pela medição do padrão de eficiência, foram expressas como percentagem de contagem inicial realizada logo após a administração da dose e considerada representativa de 100% da mesma.

A estabilidade do sistema de contagem pode ser apreciada e controlada durante todo o tempo de emprego do CCI através da curva de decaimento do padrão de eficiência (I-131) cujo meio-tempo foi de 7,87 dias, contra 8,065 dias, que é o valor normalmente utilizado referido pela literatura (Graf.1-Tabela VII).

Os valores percentuais registrados, representativos da fração residual da dose administrada, foram lançados na ordenada funcional de gráfico semi-logarítmico contra tempo.

4.2.6.3 - Coleta das fezes

Após a administração do Disofen marcado, adaptávamos ao carneiro coletor de fezes especialmente desenhado para esses animais, que era removido para a coleta das mesmas do intervalo correspondente, pela manhã. O coletor era lavado exaustivamente para evitar transferência de atividade e recolocado. O intervalo de coleta das fezes se prolongou até 35-40 dias.

A totalidade das fezes correspondente a cada intervalo de tempo considerado tinha sua atividade determinada utilizando-se o detector do Contador de Corpo Inteiro (CCI). Com base na alíquota da dose administrada, cuja atividade era mensurada de maneira idêntica, as contagens líquidas das fezes puderam ser expressas em percentagem da dose administrada.

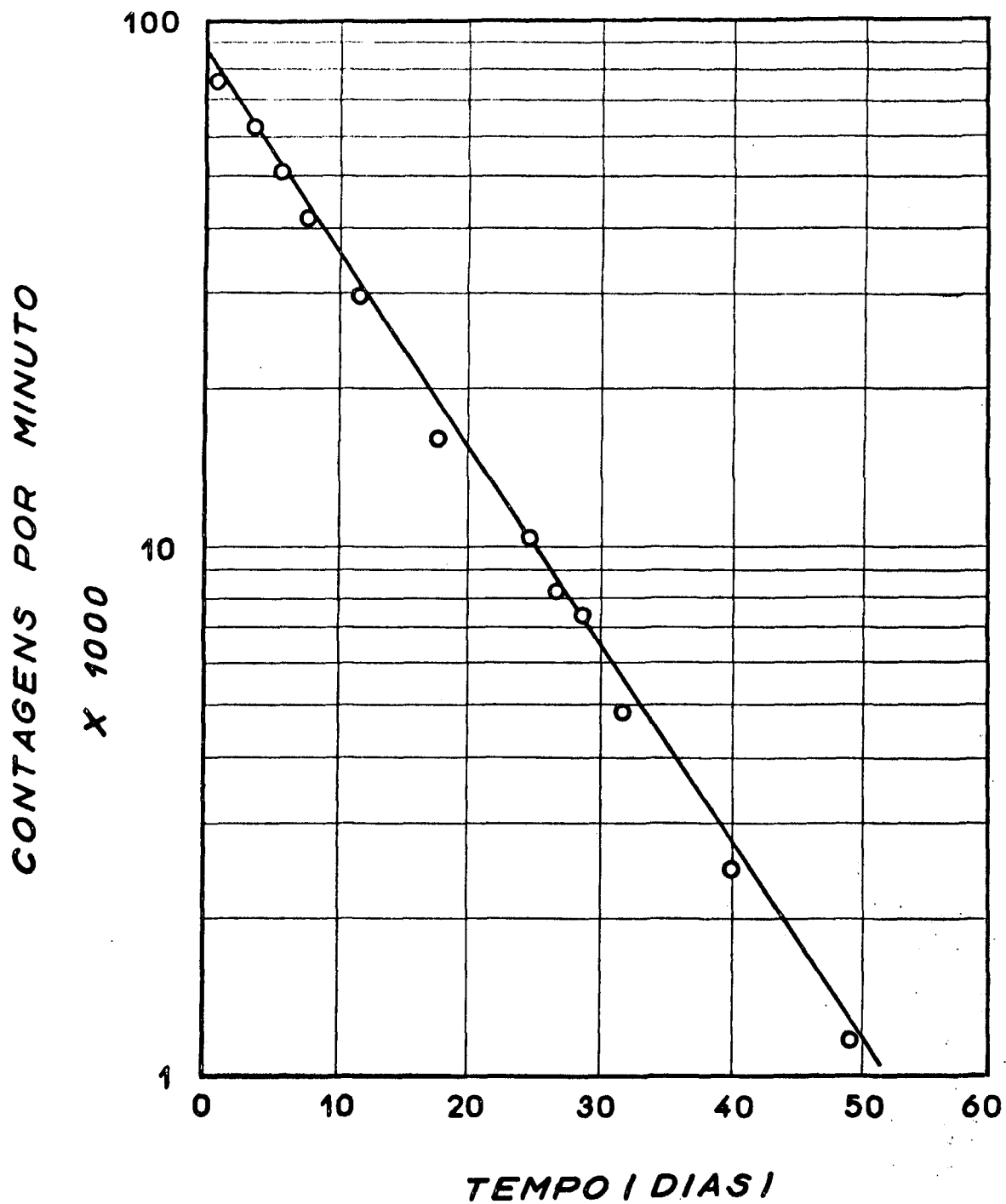


GRÁFICO. 1 - Curva de decaimento do padrão de eficiência (I-131).

T A B E L A VII

Tempo em dias	Contagens por minuto
0	85.913
1	76.475
4	62.620
6	51.314
8	41.820
12	30.052
18	16.102
20	17.223
25	10.347
27	8.208
29	7.405
32	4.836
34	5.034
40	2.449
49	1.187
56	580

4.2.7 - Tratamento dos dados experimentais e cálculo dos parâmetros do sistema.

4.2.7.1 - Dados relativos à atividade plasmática

Pelos valores numéricos representativos da atividade plasmática, expressa como percentagem da dose administrada e lançados na ordenada funcional de gráfico semi-logarítmico, traçamos graficamente a curva que melhor se lhes ajustasse. Ao trecho linear de curva experimental assim obtida, mercê de programa adequado para o computador Hewlett-Packard, modelo 9100 B, foi ajustada a primeira componente exponencial pelo método dos mínimos quadrados, calculando seu coeficiente angular α_1 e o valor da intersecção com o eixo das ordenadas a_1 .

A curva experimental foi submetida ao processo de subtração ("curve peeling")⁽²⁰⁾ e repetindo se o processo anterior obtivemos α_2 e a_2 . Através de subtrações sucessivas e do emprego do método dos mínimos quadrados para ajuste de cada porção linear da curva, determinamos os demais parâmetros $\alpha_3 \dots \alpha_n$ e $a_3 \dots a_n$.

Comparando os pares de valores obtidos experimentalmente e pela combinação linear de termos exponenciais, determinamos o valor do coeficiente de correlação linear "r" a fim de se aquilatar da qualidade do ajuste⁽⁴⁶⁾.

O valor de α_1 , coeficiente da função de decaimento menor, traduz o ritmo de renovação da própria fase, pois reflete o comportamento desta quando

todos os seus compartimentos estão em equilíbrio.

A razão da dose administrada pela concentração corresponde à intercessão da reta representativa desta função com a ordenada de $t=0$, ou seja, a_1 , permite obter o volume de distribuição global V_T do radiofármaco.

4.2.7.2 - Dados relativos à atividade corpórea global residual

Pelos valores numéricos percentuais da atividade corpórea residual lançados na ordenada funcional de gráfico semi-logarítmico em função de tempo fizemos passar a curva que melhor se lhes ajustasse. Submetidos os dados ao processo de subtração, ajustamos aos dados experimentais, mercê de programa adequado de regressão por mínimos quadrados, a função que melhor os satisfizesse. A qualidade do ajuste foi apreciada pelo valor do coeficiente de correlação "r". Definida a função, os valores de $\alpha_1, \alpha_2, \dots, \alpha_n$ seriam calculados, bem como os de intersecção com a ordenada de $t=0$, a_1, a_2, \dots, a_n .

4.2.7.3 - Dados relativos às excreções fecal e urinária

Os valores numéricos relativos à excreção fecal, expressa em percentagem da dose administrada, foram tabulados.

Utilizando-se fórmula adiante reproduzida, pudemos calcular, para os mesmos intervalos de tempo, a excreção urinária, complemento da fecal para a excreção global dedutível da medida de CCI.

$$\text{Excreção urinária \%} = 100 - (C + F)$$

onde C é a percentagem de dose remanescente no organismo e F a fração percentual eliminada pelas fezes, para o mesmo intervalo de tempo.

Os valores da excreção urinária assim calculados foram tabulados.

4.2.7.4- Equacionamento do modelo analítico, cálculo dos coeficientes de transferência entre compartimentos e dos volumes dos compartimentos.

Cientes do número de componentes exponenciais da função experimental representativa da atividade plasmática, concebemos modelo analítico com igual número de compartimentos em equilíbrio entre si.

Dentre os diversos possíveis modelos analíticos compatíveis com o número encontrado de compartimentos, analisamos e desenvolvemos numericamente somente aquele correspondente à alternativa mais consonante com os conhecimentos da farmacologia da droga e com os dados experimentais das excreções fecal e urinária (30).

Solvidas numericamente as equações peculiares ao modelo escolhido, tomando-se como base os

valores a_1, a_2, \dots, a_n , e $\alpha_1, \alpha_2, \dots, \alpha_n$, obtidos da decomposição da curva experimental, calculamos os valores numéricos dos coeficientes de transferência entre compartimentos e com o exterior. Calculamos, outrossim, os valores dos volumes dos compartimentos $V_1, V_2 \dots V_n$.

Obtidos os dados decorrentes do desenvolvimento analítico das diferentes soluções do modelo proposto, estabelecemos comparações entre estas e os valores obtidos experimentalmente com o objetivo de identificar a solução que se apresentasse como mais próxima da realidade biológica.

Todos os cálculos e manipulações matemáticas aqui referidas foram, evidentemente, aplicadas aos dados de cada um dos carneiros estudados.

5 - R E S U L T A D O S =====

5.1 - Atividade plasmática global

Os valores numéricos da atividade plasmática total expressos em percentagem da dose administrada para cada intervalo de tempo considerado e de cada um dos carneiros estudados, acham-se reunidos na Tabela VIII.

5.2 - Atividade corpórea global residual

Os valores numéricos representativos da atividade corpórea global residual, expressos em percentagem da dose administrada, para cada um dos intervalos de tempo considerados e de cada animal estudado estão consignados na Tabela IX.

5.3 - Atividade das fezes

Os valores numéricos da atividade fecal cumulativa para os diferentes intervalos de tempo considerados de cada um dos carneiros estudados foram lançados na Tabela X expressos como percentagem da dose administrada.

T A B E L A VIII

Atividade plasmática total para cada intervalo de tempo considerado e para cada carneiro estudado, expressa em percentagem da dose administrada.

Tempo	A N I M A L							
	1	2	3	4	5	6	7	8
15 min.	-	94,81	93,66	97,02	96,32	94,40	-	-
20 min.	103,57	-	-	-	-	-	-	-
30 min.	101,80	92,77	91,90	94,95	92,90	89,85	-	-
1 hora	94,34	84,24	87,59	90,61	90,85	88,22	-	-
2 h.	86,26	76,96	82,77	88,55	84,78	79,00	-	-
3 h.	-	-	-	-	-	-	72,50	71,57
6 h.	71,74	64,40	69,65	77,08	70,00	65,54	52,05	61,05
12 h.	-	-	58,80	69,44	-	-	47,54	57,20
16 h.	-	53,71	-	-	-	-	-	-
18 h.	60,37	-	-	-	61,55	57,15	-	-
1 dia	55,04	49,27	45,00	67,50	58,30	51,05	40,62	47,96
2 d.	-	-	-	66,28	56,15	48,80	39,28	47,42
3 d.	52,00	-	42,12	-	52,40	-	37,93	45,08
4 d.	-	46,58	-	64,00	-	46,58	35,55	44,44
5 d.	-	43,95	-	-	-	-	-	-
6 d.	48,93	-	41,93	62,37	46,00	45,70	-	40,05
7 d.	-	44,00	41,20	61,49	-	-	-	-
8 d.	45,78	-	40,33	59,81	45,18	44,10	34,32	37,83
10 d.	44,32	-	39,87	-	44,03	43,00	34,19	37,50
11 d.	-	40,58	-	57,10	-	-	-	-
12 d.	41,50	-	-	-	43,00	42,00	-	-
13 d.	-	-	38,00	-	-	-	-	-
14 d.	-	35,95	-	54,13	42,19	40,70	33,28	-
15 d.	39,72	-	-	-	-	-	-	-
16 d.	-	-	37,19	-	40,85	39,86	32,22	34,41
18 d.	38,26	-	-	50,76	40,00	39,00	-	34,07
20 d.	-	-	35,78	-	39,22	37,81	31,35	-
21 d.	36,96	34,58	-	49,19	-	-	-	-
22 d.	-	-	-	-	37,96	37,00	30,12	32,06
24 d.	36,03	-	-	-	37,20	35,94	-	-
25 d.	-	34,50	-	45,51	-	-	29,66	30,85
26 d.	-	34,40	-	-	36,41	35,06	-	-
27 d.	34,75	-	32,81	-	-	-	-	-
28 d.	-	-	-	42,44	35,65	-	28,20	30,00
30 d.	32,45	-	31,77	-	34,70	33,50	27,86	28,98
31 d.	-	27,80	-	-	-	-	-	-
32 d.	-	-	-	39,94	-	32,42	-	-
33 d.	30,74	-	-	-	-	-	-	-
34 d.	-	21,96	30,30	38,35	33,10	31,66	26,50	27,79
36 d.	29,56	-	-	37,82	-	-	26,40	26,66
40 d.	27,82	20,06	-	-	30,80	29,20	-	-
44 d.	-	19,90	26,20	32,17	-	-	-	-
48 d.	-	18,33	-	-	-	-	-	-

T A B E L A IX

=====

Atividade corpórea global residual (CCI) em função de tempo, de cada carneiro, expressa em percentagem da dose administrada.

Tempo em dias	A N I M A L,							
	1	2	3	4	5	6	7	8
0	100	100	100	100	100	100	100	100
1	99,30	93,45	99,68	99,84	97,52	97,90	99,67	99,53
2	98,51	-	99,26	-	-	-	99,08	98,57
3	96,44	93,13	98,28	-	-	-	-	-
4	-	-	-	98,24	95,20	92,35	95,55	95,97
5	93,15	90,11	-	98,00	93,33	-	-	-
6	91,39	89,70	97,96	97,77	92,00	90,71	-	-
7	88,04	-	96,63	94,30	-	87,55	-	-
8	84,58	88,93	94,86	93,12	89,47	85,85	93,69	93,69
9	-	-	92,57	-	-	-	-	-
10	-	87,83	91,99	-	-	-	-	-
11	-	-	-	87,39	-	-	-	-
12	81,14	-	-	-	-	83,10	-	-
13	-	-	84,87	-	-	-	85,48	86,00
14	-	-	-	83,50	-	-	-	-
15	81,10	85,97	-	-	-	-	-	-
16	-	-	79,61	-	81,40	-	83,70	83,04
17	-	85,45	-	-	-	-	-	-
18	74,88	-	-	80,62	79,32	79,54	-	-
20	70,71	81,05	75,41	-	79,11	77,76	78,71	77,91
21	70,00	-	-	75,94	-	-	-	-
22	68,75	-	-	-	-	-	-	-
24	66,50	68,24	-	-	-	-	76,83	75,66
25	-	-	-	69,80	74,28	74,10	-	-
26	-	67,86	-	-	-	-	-	-
27	63,28	-	66,12	-	70,93	71,06	-	-
28	-	-	-	66,07	-	-	71,00	71,28
29	62,33	67,28	-	-	70,00	-	-	-
30	61,12	-	62,81	-	-	-	70,20	70,40
32	-	60,94	-	-	69,27	-	69,50	68,88
34	-	-	60,31	64,16	68,64	68,57	68,86	67,41
36	55,27	59,73	-	-	-	-	68,19	66,37
40	51,19	54,90	-	-	65,19	64,30	-	-
45	-	50,13	56,72	54,37	-	-	-	-

TABELA X
=====

Atividade fecal cumulativa em função de tempo de cada carneiro, expressa em porcentagem da dose administrada.

Tempo em dias	A N I M A L							
	1	2	3	4	5	6	7	8
1	0,67	0,54	0,82	0,71	0,74	0,80	0,52	1,03
2	1,00	-	1,12	1,12	0,97	1,22	0,76	1,42
3	1,14	1,19	1,50	1,40	1,21	1,65	1,10	1,70
4	1,50	1,48	1,81	1,49	1,82	2,14	1,28	1,88
5	2,17	2,00	1,98	1,77	2,00	2,56	-	-
6	2,35	2,33	2,20	1,92	2,61	-	1,93	2,54
7	2,85	2,70	2,60	2,35	3,20	3,40	2,07	2,67
8	3,00	3,12	2,93	2,41	3,53	3,83	2,25	2,80
9	3,49	3,23	3,00	2,69	3,96	4,10	2,45	-
10	3,58	3,95	3,18	2,90	4,27	4,75	3,20	2,98
11	-	4,00	-	2,96	5,00	5,19	4,24	3,90
12	4,46	4,16	3,85	-	5,25	5,70	-	-
13	-	-	4,22	-	5,90	6,00	4,96	5,24
14	-	-	4,51	3,44	6,17	6,66	5,14	5,66
15	5,38	4,87	-	-	6,50	7,14	5,44	5,81
16	-	-	5,00	-	-	-	5,61	5,94
17	-	6,10	-	-	-	-	5,92	6,08
18	-	-	5,95	4,00	7,80	8,32	6,26	6,36
20	7,45	7,25	6,15	4,75	8,80	9,00	6,79	6,58
21	7,58	-	-	-	-	-	7,05	6,77
22	8,00	7,50	7,20	-	-	10,50	7,24	7,06
23	-	-	-	-	-	-	7,37	7,22
24	8,22	-	7,50	5,60	-	11,28	7,56	7,34
25	8,32	8,18	-	-	11,00	11,88	7,99	7,69
26	-	-	-	6,22	-	12,04	-	-
27	-	-	-	-	-	-	8,90	7,94
28	9,00	-	8,34	6,50	-	12,61	9,43	8,72
29	9,24	-	-	-	-	-	9,76	9,05
30	10,18	9,92	8,94	6,95	12,95	13,86	10,01	9,26
31	-	-	-	-	-	-	10,24	9,58
32	-	11,17	-	7,30	-	-	10,53	9,86
34	-	12,00	-	7,68	-	-	11,15	10,53
35	12,30	-	-	-	-	-	-	-
36	-	12,26	10,98	8,00	15,46	16,49	-	11,09
40	13,75	13,66	11,50	9,15	17,18	18,19	-	-

5.4 - Atividade das urinas

Os valores numéricos da atividade urinária cumulativa para os diferentes intervalos de tempo considerados de cada um dos carneiros estudados, acham-se reunidos na Tabela XI expressos como percentagem da dose administrada.

Os gráficos de nº 4 a 11 do apêndice apresentam as curvas representativas da atividade residual corpórea e da atividade plasmática em função de tempo para cada carneiro estudado.

Todas as curvas experimentais representativas da variação da atividade plasmática em função de tempo resultaram decomponíveis em três termos exponenciais. Exemplo desta decomposição acha-se representado no Graf.2.

Na Tabela XII reunimos os valores numéricos correspondentes aos coeficientes angulares α_1 , α_2 e α_3 bem como os das intersecções a_1 , a_2 e a_3 para cada uma das curvas de atividade plasmática dos animais estudados.

Os dados representativos da atividade residual corpórea, em todos os animais estudados, foram traduzidos por uma reta, evidenciando que o ritmo de desaparecimento da atividade obedece a função exponencial única de equação:

$$A(t) = A_0 e^{-\alpha t}$$

TABELA XI

Atividade urinária cumulativa em função de tempo de cada carneiro, expressa em percentagem da dose administrada.

Tempo em dias	A N I M A L							
	1	2	3	4	5	6	7	8
1	0,03	6,01	-	-	1,74	-	-	-
2	-	-	-	-	-	-	0,16	0,01
3	2,42	-	0,22	-	-	-	-	-
4	-	-	-	0,27	2,98	5,51	3,17	2,15
5	4,68	7,89	-	-	-	-	-	-
6	6,26	-	-	0,31	5,39	6,19	-	-
7	-	-	-	3,35	-	-	-	-
8	12,42	7,96	2,21	-	7,00	10,32	4,06	5,07
9	-	-	4,44	-	-	-	-	-
10	-	8,22	4,83	-	-	-	-	-
11	-	-	-	9,65	-	-	-	-
12	14,40	-	-	-	11,98	11,20	-	-
13	-	-	10,91	-	-	-	9,56	8,76
14	-	-	-	13,06	-	-	-	-
15	-	9,16	-	-	-	-	-	-
16	-	-	15,39	-	-	-	10,69	11,02
18	-	-	-	15,38	12,88	12,14	-	-
20	21,84	11,70	18,44	-	-	13,24	14,50	15,51
21	22,42	-	-	-	-	-	-	-
22	23,25	-	-	-	-	-	-	-
24	25,28	-	-	-	-	-	15,61	17,00
25	-	-	-	-	14,72	14,02	-	-
28	-	-	-	27,43	-	-	19,57	20,00
29	28,43	-	-	-	-	-	-	-
30	28,70	-	28,25	-	-	-	-	20,34
32	-	27,89	-	-	-	-	19,97	21,26
34	-	-	-	28,16	-	-	20,00	22,06
36	-	28,01	-	-	-	-	-	22,54
40	-	31,44	29,92	-	17,63	17,51	-	-

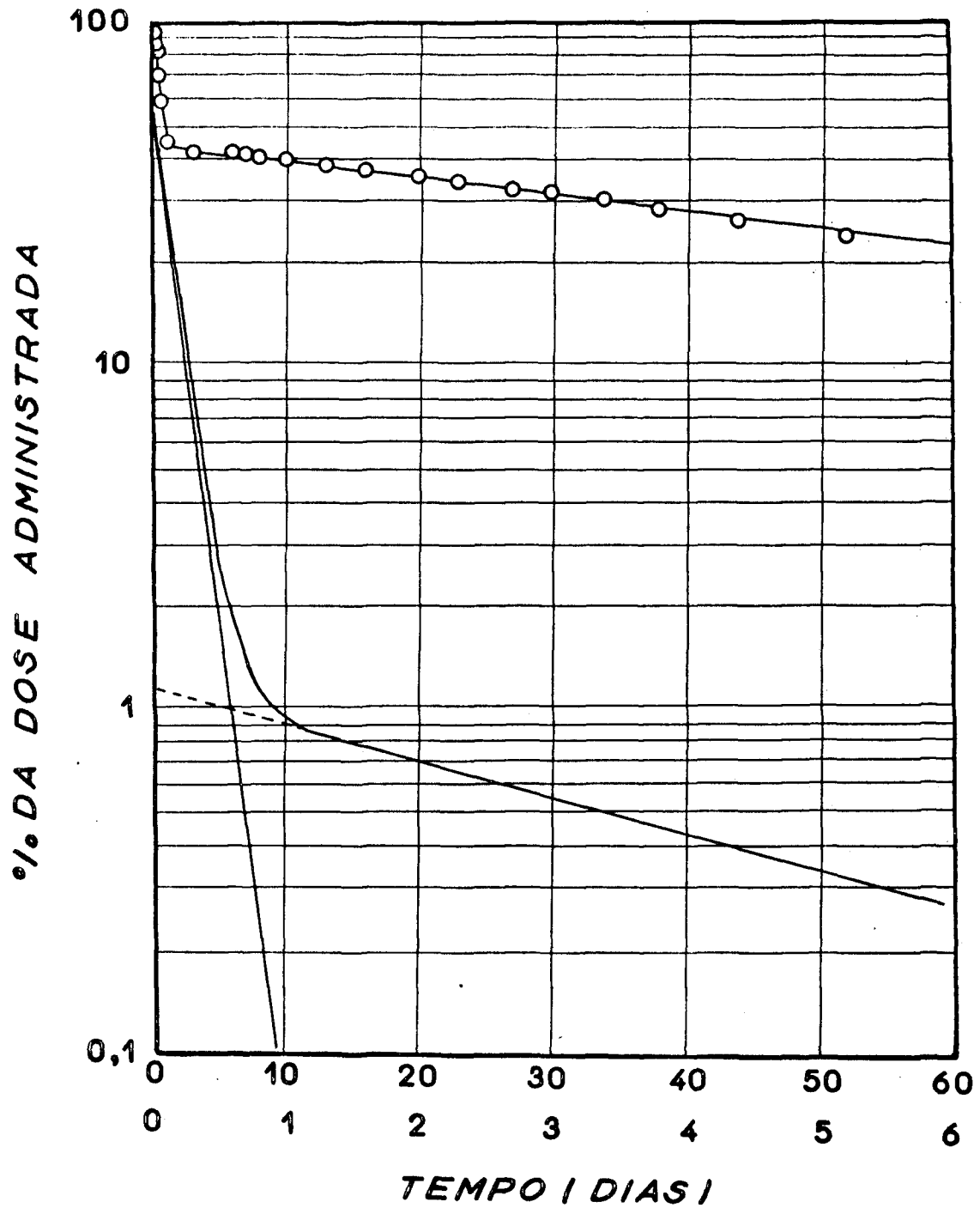


GRÁFICO 2 - Decomposição da curva experimental representativa da variação da atividade plasmática, em três termos exponenciais (Carneiro 1)

TABELA XIII

Valores numéricos dos coeficientes angulares e das interseções com o eixo das ordenadas das funções exponenciais decorrentes da decomposição da curva de atividade plasmática em soma de termos exponenciais de cada carneiro estudado.

C A R N E I R O	α_1	a_1	α_2	a_2	α_3	a_3
1	0,0142	49,68	0,186	7,76	11,33	42,54
2	0,0143	47,17	0,184	1,74	7,45	51,08
3	0,0123	45,50	0,253	1,15	7,23	53,33
4	0,0171	69,16	0,404	1,92	5,90	28,90
5	0,0119	49,61	0,203	12,05	5,53	38,33
6	0,0118	47,95	0,286	5,29	6,73	46,75
7	0,0108	38,69	0,440	3,47	6,23	57,82
8	0,0137	44,25	0,208	5,63	6,37	50,11

Os valores dos coeficientes angulares correspondentes à função representativa da atividade residual de cada um dos carneiros estudados estão reunidos na Tabela XIII.

Em face de todas as curvas de atividade plasmáticas terem resultado compatíveis com decomposição em três termos exponenciais, aceitamos que a distribuição do Disofen deveria corresponder a um sistema dinâmico tricompartmentalizado. Dos três compartimentos, um seria representado pelo compartimento de introdução e de amostragem (compartimento plasmático) e os demais seriam extravasculares.

A um sistema tricompartmentalizado deste tipo, podem corresponder modelos diversos, cada qual com sua solução analítica. Dentre os diferentes modelos cabíveis, elegemos para desenvolvimento analítico e cálculo dos ritmos de transferência o representado na Figura 1.

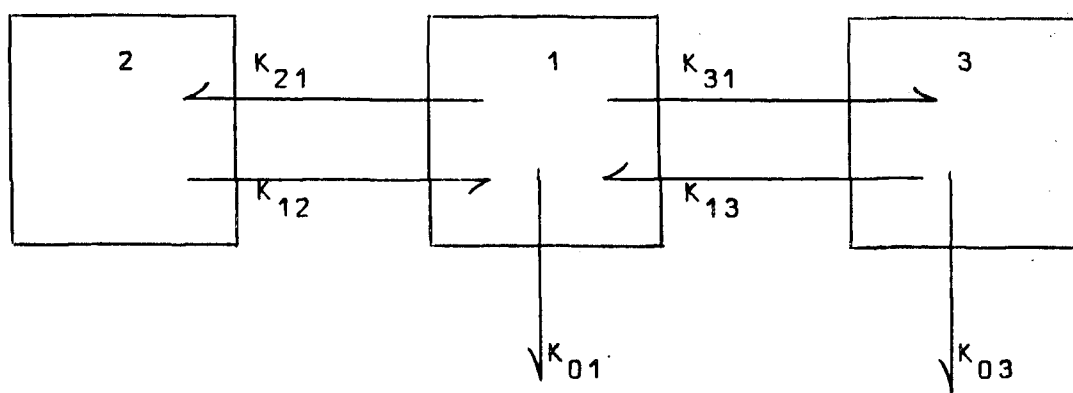


Figura 1

T A B E L A X I I I
=====

Coefficiente angular da função exponencial representativa da atividade corpórea residual de cada animal

Carneiro	Coefficiente Angular (α) da Atividade Residual
1	0,0165
2	0,0153
3	0,0127
4	0,0127
5	0,0121
6	0,0128
7	0,0114
8	0,0117

Ao modelo escolhido correspondem as seguintes equações diferenciais lineares a coeficientes constantes:

$$\frac{dX_1(t)}{dt} = - (K_{01} + K_{21} + K_{31}) X_1(t) + K_{12} X_2(t) + K_{13} X_3(t)$$

$$\frac{dX_2(t)}{dt} = - K_{12} X_2(t) + K_{21} X_1(t)$$

$$\frac{dX_3(t)}{dt} = - (K_{03} + K_{13}) X_3(t) + K_{31} X_1(t)$$

$$\text{com } X_1(0) = 100, \quad X_2(0) = 0 \quad \text{e} \quad X_3(0) = 0$$

onde: $X_i(t)$ ($i = 1, 2, 3$) representa a percentagem de dose no instante t no compartimento i .

e K_{ij} constante de transferência, representando a fração constante de material transferida na unidade de tempo do compartimento j para o compartimento i .

Como decorre da Fig.3, trata-se de modelo no qual o compartimento de introdução e de amostragem do traçador-Compartimento 1- estaria em equilíbrio dinâmico com os compartimentos 2 e 3 mercê das constantes de transferência K_{12} - K_{21} e K_{13} - K_{31} . O compartimento 1 é drenado irreversivelmente pela constante de transferência K_{01} , e o 3 pelo coeficiente K_{03} representativos, respectivamente, das excreções urinária e fecal.

Fixamo-nos neste modelo por ser, dentre os possíveis, aquele que é frequentemente aplicável ao estu-

do da dinâmica de fármacos. Com efeito, o compartimento de introdução - sangue - é o compartimento central responsável pela distribuição do fármaco aos territórios extravasculares, sejam eles representados pelas áreas efetoras, pelas de metabolização ou de mero acúmulo.

A identificação anatômica dos demais compartimentos exigiria a amostragem direta dos mesmos, o que, momentaneamente, escapou às possibilidades deste trabalho.

Conhecedores, pelos dados experimentais, de que 70% da atividade removida do sistema o abandona pela via urinária, localizamos esta saída no compartimento 1, pois a excreção urinária está intimamente vinculada ao compartimento plasmático, por ser este diretamente depurado pela filtração glomerular ou pelo trabalho tubular renal.

Os restantes 30%, correspondentes à fração da atividade recuperada nas fezes, poderiam ser devidos a fenômenos com sede em qualquer dos compartimentos do sistema em estudo. O que escolhemos como saída do compartimento 3, resultou ser, como veremos, o mais adequado para a reprodução dos achados experimentais.

Escolhido assim o modelo cinético com as características descritas, obtivemos os valores numéricos das constantes de transferência inerentes ao mesmo através do programa computacional escrito em Fortram II, utilizado no Computador IBM 1620, modelo II. Eles estão reunidos, para cada um dos carneiros estudados, na Tabela XIV.

Como ulterior desenvolvimento das consequências analíticas do modelo escolhido, obtivemos os va

lores numéricos dos restantes parâmetros do sistema, a saber: os volumes global, e dos compartimentos, os quais também foram consignados na Tabela XIV.

A Tabela XV reúne, para cada carneiro, todos os valores numéricos dos diferentes parâmetros, quer sejam eles decorrentes dos dados experimentais, quer do desenvolvimento analítico do modelo aceito até esta fase dos trabalhos.

As Tabelas XVI, XVII e XVIII apresentam as saídas do programa computacional para exemplificar, usando o Carneiro 1. Elas dizem respeito aos valores do plasma, experimentais e ajustados (compartimento 1) e os calculados para os compartimentos extraplasmáticos (Tabela XVI) bem como os valores experimentais e calculados, para as fezes e urina (Tabela XVII e XVIII), expressos em percentagem de dose.

O gráfico nº 3 apresenta a simulação analógica em percentagem de dose das soluções dos diversos compartimentos e saídas correspondentes, para o caso do Carneiro 1.

TABELA XIV

Valores numéricos das constantes de transferência entre compartimentos e com o exterior do sistema:
valores numéricos dos volumes global e dos compartimentos

C A R N E I R O	Constantes de transferência em (T^{-1})							Volumes (em litros)			
	K ₂₁	K ₁₂	K ₃₁	K ₁₃	K ₀₁	K ₀₃	V ₁	V ₂	V ₃	V _T	
1	0,0376	0,163	4,78	6,51	0,0207	0,0103	1,23	0,29	0,91	2,43	
2	0,0119	0,178	3,78	3,64	0,0200	0,0099	1,30	0,87	1,36	3,53	
3	0,0131	0,246	3,83	3,38	0,0190	0,0070	1,40	0,74	1,58	3,72	
4	0,0149	0,394	1,70	4,17	0,0107	0,0346	1,33	0,50	0,54	2,37	
5	0,0579	0,165	2,08	3,42	0,0150	0,0142	1,87	0,66	1,13	3,66	
6	0,0521	0,258	3,10	3,59	0,0154	0,0106	1,78	0,36	1,53	3,67	
7	0,0981	0,401	3,50	2,65	0,0185	0,0070	1,93	0,47	2,54	4,94	
8	0,0429	0,185	3,15	3,19	0,0176	0,0131	2,00	0,46	1,97	4,43	
Media	0,04106	0,2488	3,240	3,819	0,01717	0,01334					
desvio padrão	0,0292	0,0984	0,987	1,169	0,00328	0,00898					

T A B E L A XV

=====

Valores numéricos dos parâmetros farmacocinéticos
de cada um dos carneiros estudados.

Parâmetros	C A R N E I R O							
	1	2	3	4	5	6	7	8
V_T (l) *	2,43	3,53	3,72	2,37	3,66	3,67	4,94	4,43
V_1 (l)	1,23	1,30	1,40	1,33	1,87	1,78	1,93	2,00
V_2 (l)	0,29	0,87	0,74	0,50	0,66	0,36	0,47	0,46
V_3 (l)	0,91	1,36	1,58	0,54	1,13	1,53	2,54	1,97
a_1 (%)	49,68	47,17	45,50	69,16	49,61	47,95	38,69	44,25
a_2 (%)	7,76	1,74	1,15	1,92	12,05	5,29	3,47	5,63
a_3 (%)	42,54	51,08	53,33	28,90	38,33	46,75	57,82	50,11
λ_1 (T ⁻¹)	0,0142	0,0143	0,0123	0,0171	0,0119	0,0118	0,0108	0,0137
λ_2 (T ⁻¹)	0,186	0,184	0,253	0,404	0,203	0,286	0,440	0,208
λ_3 (T ⁻¹)	11,33	7,45	7,23	5,90	5,53	6,73	6,23	6,37
K_{21} (T ⁻¹)	0,0376	0,0119	0,0131	0,0149	0,0579	0,0521	0,0981	0,0429
K_{12} (T ⁻¹)	0,163	0,178	0,246	0,394	0,165	0,258	0,401	0,185
K_{31} (T ⁻¹)	4,78	3,78	3,83	1,70	2,08	3,10	3,50	3,15
K_{13} (T ⁻¹)	6,51	3,64	3,38	4,17	3,42	3,59	2,65	3,19
K_{01} (T ⁻¹)	0,0207	0,0200	0,0190	0,0107	0,0150	0,0154	0,0185	0,0176
K_{03} (T ⁻¹)	0,0103	0,0099	0,0070	0,0346	0,0142	0,0106	0,0070	0,0131

*(l) = litro

T A B E L A XVI

=====

Tempo em dias	Compartimento 1 Experimental	Compartimento 1 Ajustado	Compartimento 2 Calculado	Compartimento 3 Calculado
0,01	103,57	95,42	0,03	4,52
0,02	101,80	91,32	0,07	8,55
0,04	94,34	84,40	0,13	15,37
0,08	86,26	74,46	0,25	25,12
0,25	71,74	59,42	0,65	39,47
0,75	60,37	55,92	1,62	41,20
1	55,04	55,43	2,07	40,85
3	52,00	52,05	4,93	38,33
6	48,93	48,16	7,47	35,43
8	45,78	46,09	8,41	33,89
10	44,32	44,30	8,97	32,57
12	41,50	42,72	9,26	31,40
15	39,72	40,61	9,39	29,84
18	38,26	38,73	9,29	28,46
21	36,96	37,01	9,07	27,19
24	36,03	35,40	8,79	26,01
27	34,75	33,88	8,48	24,89
30	32,45	32,45	8,15	23,84
33	30,74	31,08	7,83	22,83
36	29,56	29,78	7,51	21,87
40	27,82	28,12	7,11	20,66

T A B E L A X V I I

=====

Tempo em dias	Saída Compartimento 3 Experimental	Saída Compartimento 3 Calculado
1	0,67	0,39
2	1,00	0,80
3	1,14	1,20
4	1,50	1,59
5	2,17	1,97
6	2,35	2,35
7	2,85	2,71
8	3,00	3,06
9	3,49	3,41
10	3,58	3,75
12	4,46	4,41
15	5,38	5,36
20	7,45	6,84
21	7,58	7,13
22	8,00	7,40
24	8,22	7,95
25	8,32	8,22
28	9,00	9,00
29	9,24	9,25
30	10,18	9,50
35	12,30	10,68
40	13,75	11,79

T A B E L A X V I I I
=====

Tempo em dias	Saída Compartimento 1 Experimental	Saída Compartimento 1 Calculado
1	0,03	1,24
3	2,42	3,46
5	4,68	5,56
6	6,26	6,57
8	12,42	8,52
10	11,45	10,39
12	14,40	12,19
15	13,52	14,77
20	21,84	18,81
21	22,42	19,58
22	23,25	20,34
24	25,28	21,83
29	28,43	25,36
30	28,70	26,04

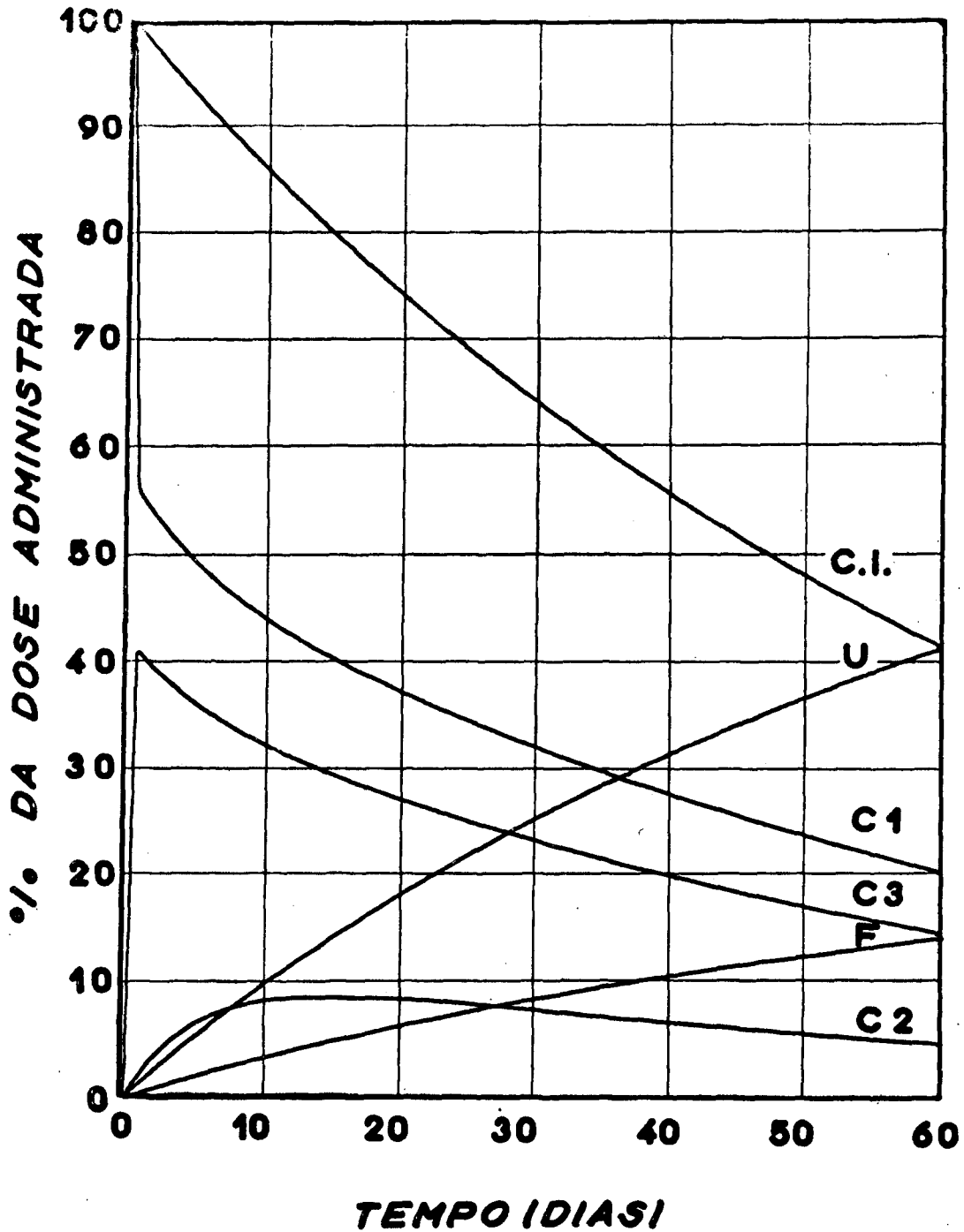


GRÁFICO 3 - Simulação analógica em percentagem de dose

das soluções dos diversos compartimentos e
saídas correspondentes, para o caso do Carneiro 1.

C.I. - Corpo Inteiro
C 1 - Compartimento 1
C 2 - Compartimento 2

C 3 - Compartimento 3
F - Fezes
U - Urina

6 - COMENTÁRIOS
=====

Dos resultados colhidos neste trabalho de duzimos que o Disofen, quando introduzido diretamente na torrente circulatória, se distribui e movimenta no organismo vivo do carneiro, segundo o modelo da Figura 1.

O compartimento 1," de introdução e amostragem", deve ser identificado com o próprio plasma sanguíneo pelos motivos seguintes:

- 1º) O volume de distribuição do radiofármaco, para o $t=0$, obtido pela extrapolação retrógrada para o eixo das ordenadas da curva experimental de atividade plasmática, em função de tempo, forneceu valores que variaram de 1,23 a 2,00 litros (Tab.XIV); esses valores foram correspondentes a valores expressos em percentagem de peso corpóreo, que variaram de 3,10 a 3,54%, com o valor médio de 3,30% perfeitamente superponível a valor médio de 3,24% encontrado na literatura⁽⁷⁾.
- 2º) Através de série de ensaios, parte desta investigação, pudemos verificar que a atividade do sangue está limitada apenas à fase líquida (plasma), não havendo qualquer ligação ou incorporação do material marcado aos elementos figurados do sangue.
- 3º) Estudos eletroforéticos (gel de agar) de soro de animais que receberam Disofen mar

cado, decorridos de 5 minutos a 30 dias da administração⁽⁴⁾ levaram a estabelecer que a atividade da droga se distribui da forma seguinte:

fração ligada à albumina..... 97%
Disofen livre e radioiodo livre(¹³¹I).. 3%

Conseqüentemente, a atividade sanguínea no compartimento de amostragem se mantém confinada à fase líquida do sangue durante todo o período coberto pela investigação.

4º) O modelo cinético apresentado parece satisfatório, analiticamente, se se atribuir a maior cota de drenagem à urina com saída pelo compartimento 1, o que é consentâneo com a idéia de que o mesmo seja representado pelo volume plasmático, uma vez que este é diretamente drenado pela via excretora renal.

Estamos, assim, convencidos de que não devem pairar dúvidas quanto à identificação do compartimento 1 que, como frizamos reiteradas vezes, foi o de introdução, e de amostragem do radiofármaco.

Se admitirmos que o compartimento 1 é intravascular, certamente os dois remanescentes serão extravasculares. Sua identificação está sendo, no entanto, inteiramente especulativa, pois não tivemos acesso direto a nenhum deles para amostrá-los, não podendo, portanto, dispor de elementos de evidência experimental a respeito deles.

Analisando o volume do espaço global de distribuição (*) do Disofen marcado, verificamos que o mesmo é, em média, da ordem de 7,3% do peso corporal (densidade 1 para fins de cálculo), com uma relação volume extravascular/volume intravascular (V_2+V_3/V_1) de cerca de 1,2.

Esses dados parecem extremamente sugestivos, particularmente por tratar de uma substância que se liga à albumina. Com efeito, os espaços de distribuição da albumina (**), inclusive quanto à relação extravascular/intravascular, sobrepõem-se aos aqui registrados, o que nos leva a aceitar a hipótese de que o Disofen tem para com a albumina um poder de ligação tão elevado que passa a acompanhá-la em seu esquema de distribuição geral.

Esta hipótese, nos leva a valer-nos dos conhecimentos relativos ao esquema de distribuição da albumina para localizar topograficamente o Disofen. Nesse sentido podemos imaginar que a fração extravascular deve estar essencialmente distribuída no espaço intersticial (extravascular intersticial), em particular do tecido celular subcutâneo, reconhecidamente o setor de armazenamento da albumina extravascular do homem ⁽⁴⁸⁾.

** Permitimo-nos lembrar aqui que o espaço de distribuição de uma substância tem sentido teórico, raras vezes sobreponível a um espaço físico do organismo. Corresponde ele ao volume que seria ocupado pela substância em estudo, se sua concentração, na fase de equilíbrio de distribuição, fosse igual à do plasma.*

*** Esta identidade esteia-se em dados relativos ao homem que, por sua vez, apresenta estreita analogia com o cão.*

Ocorre, que a fração extravascular do Disofen está distribuída por dois compartimentos com ritmos de troca muito diversos: compartimento 2 de trocas lentas (K_{21} e K_{12}), e compartimento 3, de trocas rápidas (K_{31} e K_{13}).

Como ao compartimento 3 se deve atribuir a via de saída correlacionada com a excreção fecal, uma vez que o modelo analítico que a inclui foi o que melhor simulou os dados experimentais, se aceitarmos, como hipótese de trabalho, que o Disofen, à semelhança de outros fenóis, é depurado pela célula hepática e excretado via bile, poderíamos compreender como se cria um compartimento cinético (compartimento 3) representado pelo fígado e intestino. Neste compartimento, parte do material, ativamente e rapidamente, é transferido do sangue (lembramos que se trata de um compartimento de trocas rápidas e de volume pequeno) e parte é perdida para o organismo pela excreção fecal (K_{03}).

Procurando esquematizar o que acabamos de dizer, podemos representar o modelo bio-analítico da dinâmica do Disofen como na Figura 2.

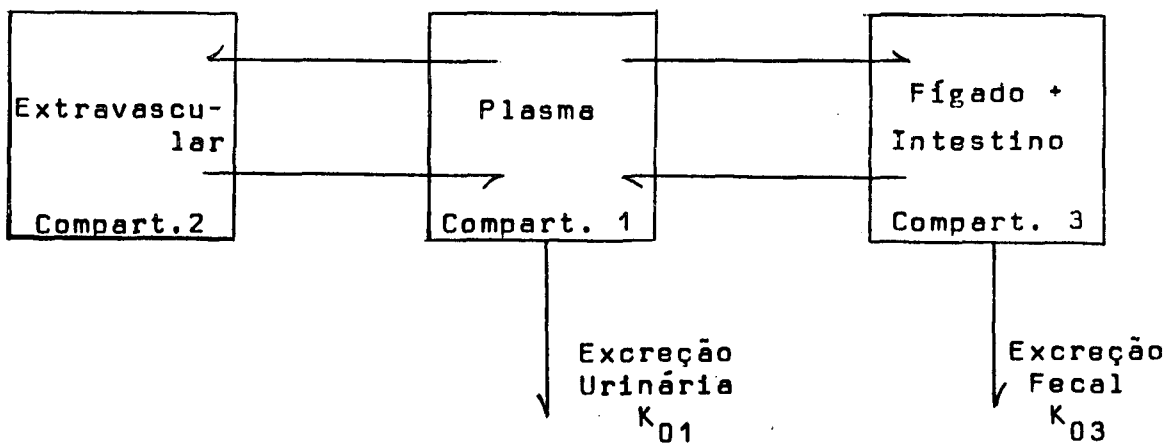


FIGURA 2

A favor desta conceituação podemos trazer os dados de distribuição do Disofen marcado obtidos para ratos (Tabela VI); nesses, fígado e rins acusaram elevados valores de concentração radioativa por unidade de massa, enquadrando-se no esquema os próprios achados da riqueza do pulmão, pois é conhecida a riqueza em albumina do interstício pulmonar.

Como já dissemos, esta esquematização é puramente especulativa e necessita de apoio experimental, agora passível de ser planejado, o que não era viável antes dos resultados deste trabalho. Cumpre pois que essa linha de investigação seja continuada, o que, aliás, já está em andamento. Coletas de materiais como bile, conteúdo intestinal, biópsias de pele e medições sobre territórios específicos entre outras determinações, poderão trazer os elementos necessários ao robustecimento dessa hipótese, ou mesmo à sua validação.

Procuraremos agora analisar o conteúdo de alguns dos parâmetros dinâmicos estudados e algumas das implicações farmacológicas decorrentes dos conhecimentos adquiridos.

O valor médio do coeficiente angular α_1 , que caracteriza o ritmo pelo qual o Disofen é removido quando da fase de equilíbrio de distribuição, informa-nos de que apenas 1,3% da dose administrada é removida por dia. A esse ritmo de remoção corresponde uma meia vida biológica de cerca de 52 dias.*

** Se calcularmos a meia-vida pelas medidas de corpo inteiro, chegaremos ao resultado de 53 dias, valor que traduz excelente concordância dos dois métodos, informando sobre a correção dos dados obtidos.*

A relativamente longa meia vida biológica do fármaco justifica seu efeito terapêutico prolongado em face das doses empregadas convencionalmente.

O conhecimento da meia-vida biológica e o do longo efeito terapêutico útil, levantam o problema da dose realmente eficaz. Certamente a dose útil para uma aplicação única poderia ser extremamente mais baixa do que a convencional. Será oportuno ter em mente que a dose poderá talvez ser diminuída sensivelmente, com o intuito de garantir melhor e mais ampla margem de segurança, sem interferir criticamente nos efeitos terapêuticos.

O conhecimento da meia-vida biológica do Disofen nos dá perfeita conta dos inconvenientes registrados na administração de doses repetidas a curto prazo, e que levam a atingir a dose cumulativa letal⁽²³⁾.

Aceita a informação de que animais tratados com uma única dose de Disofen da ordem de 10mg/ kg se mantêm desinfestados em ambiente contaminado, por período de cerca de oito meses⁽⁴⁵⁾, podemos presumir que até esse prazo a concentração plasmática do fármaco é terapêuticamente útil. A partir desta premissa é lícito supor que a concentração útil será alcançada por dose correspondente a 4,7% da convencional, ou seja, deveria ser suficiente administrar 0,47 mg/kg de peso do animal.

Esses dados estão baseados no ritmo de remoção do Disofen determinado em animais desinfestados, devendo, portanto, traduzir essencialmente o ritmo de remoção metabólica. No caso de animais infestados por vermes hematófagos tal ritmo poderá alterar-se provavelmente para valores maiores, em virtude da fração de plasma que será sugado pelos próprios helmintos.

Um argumento a favor da dose útil dever ser realmente inferior à administrada classicamente advem, ainda, de alguns dados experimentais que pertencem à nossa linha de investigação em curso.

Em ensaio preliminar já verificamos que ovelhas em lactação que receberam Disofen marcado, apresentaram, diariamente, uma dose eliminada pela secreção láctea. Foi da ordem de 0,3% da dose administrada. De acordo com GORDON⁽¹⁹⁾ borregos de mães tratadas com Disofen se mantêm livres de infestação ainda que estando em áreas infestadas. Este comportamento tem sua explicação se aceitarmos como eficaz a dose transferida pelo leite e, em menor escala, aquela cedida via placenta, pois verificamos que o Disofen atravessa esta barreira (dados não publicados ainda).

A constatação de que o compartimento plasmático encerra, a partir do momento do equilíbrio de distribuição, cerca de 43% da dose residual global parece nos sugestiva de que os parasitas recebam sua dose letal via sangue, pois têm livre acesso ao compartimento onde a concentração de oferta é sempre mais elevada.

Em toda a nossa investigação aceitamos que a atividade registrada fosse representativa do fármaco marcado. Esta suposição deverá ser comprovada, futuramente, através de novas investigações, especialmente se desejarmos melhor conhecer as características metabólicas da droga. Com efeito, ao estabelecer as atividades das excreções urinária e fecal, não cuidamos, na fase atual dos trabalhos, de verificar se a mesma é representada apenas por radioiodo liberado da molécula do radiofármaco pelo processo de catabolismo, ou se frações íntegras ou me-

tabolitos intermediários foram excretadas pelas duas vias. O conhecimento desse fracionamento eventual da atividade excretada é, por certo, muito importante para o refinamento dos conhecimentos inerentes à própria cinética da droga e quiçá possam trazer luzes no que toca à sequência metabólica do fármaco.

Cumprе assinalar, no entanto, que o conhecimento desses aspectos não invalida as informações aqui trazidas, apenas limitando o âmbito de algumas interpretações por nós feitas, mas nem sequer abordadas na fase atual.

7 - CONCLUSÕES

=====

Em vista dos dados experimentais colhidos no decorrer do desenvolvimento deste trabalho, dentro do planejamento estabelecido, parece-nos lícito chegar às conclusões seguintes:

7.1 - O 2,6 diiodo-4-nitrofenol pode ser marcado com radioiodo (^{131}I) por troca isotópica.

7.2 - As condições ideais das reações de marcação apreciadas pelo rendimento radioquímico da preparação no que toca à magnitude da massa de fármaco posta a reagir, pH ótimo, tempo e temperatura de reação e influência da luz foram padronizadas em: 100 mg de Disofenol, pH 5,5, reação a 100°C durante 30 minutos, com iluminação correspondente à fornecida por lâmpada de 100 wats a 20 cm de distância.

7.3 - O Disofen se distribui dinamicamente a três compartimentos que entram em equilíbrio entre si, sendo um intravascular, o próprio volume plasmático, sede da introdução do fármaco, e dois extravasculares.

7.4 - Ocorre a ligação do Disofen com a proteína plasmática — albumina — (cerca de 97%) fato de grande importância no conhecimento de suas propriedades farmacocinéticas (27).

7.5 - Um modelo bio-matemático representativo da cinética do Disofen, mostrou que o ritmo de remoção pela via urinária seria representado por K_{01} , enquanto K_{03} traduziria a remoção por via fecal.

7.6 - Parece estar a última saída do Disofen localizada no compartimento 3, de trocas mais rápidas, identificado provisoriamente como constituído pelo fígado e intestino.

7.7 - Em decorrência dos valores numéricos do ritmo de remoção global do Disofen, calculamos a meia-vida biológica do fármaco que resultou ser em média de 53 dias.

7.8 - Como corolário da meia-vida biológica pudemos estimar que a dose útil, terapêuticamente, deva ser muito inferior à empregada atualmente, cerca de 4,7% da mesma.

7.9 - Os conhecimentos e dados reunidos na presente investigação abrem amplo campo de experimentação futura, especialmente orientado no sentido de melhor se caracterizarem as sedes anatómicas dos compartimentos, as etapas metabólicas intermediárias do fármaco e aspectos especiais de seu mecanismo de ação terapêutica.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

=====

- 1 - AMAYA, F. - Resultados clinicos del diiodo dinitro fenol en el hombre. Rev. Fac. Med., Bogotá, 30: 45-50, 1962.
- 2 - BARBÉRIO, J.C.; ROCHA, U.F.; MELLO, S.C.C. - 2,6 diiodo-4-nitrofenol-¹³¹I (Disofen). Mecanismo de ação da droga em carneiros. Ciênc. e Cult., S. Paulo, 21(2) ; 426-427, 1969.
- 3 - BARBÉRIO, J.C. - Preparation of ¹³¹I - 2,6-diiodo-4-nitrofenol (Disophenol-Disophene) In: RADIOISOTOPE production. Vienna, International Atomic Energy Agency, 125: 149-54, 1969.
- 4 - BARBÉRIO, J.C. & LEME, P.R. - Distribución compartimental cinética y proteina de transporte del 2,6-diiodo-4-nitrofenol ¹³¹I, em carneros. (Nota preliminar). Apresentado ao Congresso de la Asociación Latino-Americana de Sociedades de Biología y Medicina Nuclear, 3º México, D.F., 1970.
- 5 - BECKETT, A.H.; BOYES, R.N.; APPLETON, P.J. - The metabolism and excretion of lignocaine in man. J. Pharm. Pharmacol., London, 18, supl. 76S-81S, 1966.

* De acordo com as normas preconizadas pela ABNT (Associação Brasileira de Normas Técnicas). As abreviaturas dos títulos de periódicos de acordo com o WORLD MEDICAL PERIODICALS New York, 1961.

- 6 - BERSON, S.A. & YALOW, R.S. - Quantitative aspects of iodine metabolism. The exchangeable organic pool, and the rates of thyroïdal excretion, peripheral degradation and fecal excretion of endogenously synthesized organically bound iodine. J.Clin. Invest., New York, 33: 1533-1552, 1954.
- 7 - BLOOD and other fluids. Analysis and compilation by Philip L. Altman. Edited by Dorothy S. Dittmer. Washington, Federation of American Societies for Experimental Biology, 1961, p. 5 (Biological Handbooks, n° 1).
- 8 - BORAY, J.C.; HAPPICH, F.A.; ANDREWS, J.C. - Comparative chemotherapeutics tests in sheeps infectec with immature and mature Fasciola hepatica. Vet. Rec., London, 80 (6): 218-224, 1967.
- 9 - CAHEN, R. - La pharmacocinétique. I. Implication de la biotransformation d'un médicament sur sa potentialité thérapeutique et les dangers de son emploi. J. Pharmacol. Clin. Human Pharmacol. Drug Res., Paris, 0 (3): 67-80, 1972.
- 10 - COHEN, Y. - Application des modeles a s'étude de mecanismes pharmacodynamiques. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON RADIOACTIVE ISOTOPES IN PHARMACOLOGY, Geneva, 1967 p.391-408.
- 11 - COHEN, Y. - Les radioéléments en pharmacocinétique. Bull. Inform. Sci. Thech., Paris, 147:56-62, 1970.
- 12 - COHEN, Y. - Nouveaux développements dans l'étude des métabolismes de médicaments, en relation avec la pharmacocinétique. J. Pharmacol. Clin., Paris, 0 (1): 19-29, 1972.

- 13 - DARNE, A. & WEBB, J.L. - The treatment of ankylostomiasis and of spirocercosis in dogs by the new compounds, 2,6-diiodo-4-nitrophenol. Vet.Rec., London, 76(6) : 171-172, 1964.
- 14 - DE GROOT, L.J. - Kinetic analysis of iodine metabolism. J.Clin.Endocr., Filadelfia, 26: 149-173, 1966.
- 15 - DOLLERY, C.T. - The pharmacokinetic basis of individual differences in response to drugs. J.Pharmacol.Clin. Human Pharmacol. Drug Res., Paris, 0 (2): 35-36 , 1972.
- 16 - FOWLER, J.S.L. - Toxicity of carbon tetrachloride and other fasciocidal drugs in sheep and chickens. Brit.Vet.J., London, 127 (7): 304-312, 1971.
- 17 - GIBALDI, M. - Pharmacokinetic aspects of drug metabolism Ann.N.Y.Acad.Sci., 179: 19-31, 1971.
- 18 - GINSBURG, J.M. & WILDE, W.S. - Distribution kinetics of intravenous radiopotassium in the circulation. Am. J. Physiol., Baltimore, 179: 63-75, 1954.
- 19 - GORDON, H.Mc.L. - Correspondência particular com o Prof. Uriel Franco Rocha. Faculdade de Medicina Veterinária/USP.
- 20 - GORDON, L.B.; BERMAN, M; ROBERTSON, J.S. - Nomenclature for tracer kinetics. Int.J.appl.Radiat., New York, 19: 249-262, 1968.
- 21 - HEISSEL, R.M.; BOZIAN, R.C.; DARBY, W.J. - Turnover of vitamin B₁₂ in man. In: SYMPOSIUM DYNAMIC CLINICAL STUDIES. 3^o Oak Ridge, 1963, p.497-518.

- 22 - KAISER, J.A. - Pharmacology of 2,6-diiodo-4-nitrophenol in dogs. Pharmacologist, Washington, 2:85, 1960.
- 23 - KAISER, JOSEPH A. - Studies in the toxicity of Disophenol (2,6-diiodo-4-nitrophenol) to dog's and rodents plus some comparisons with 2,4-Dinitrophenol. Toxicol.appl.pharmacol., New York, 6: 232-44, 1964
- 24 - KONECNY, V.; DOLEZAL, J.; DRABEK, J.; KUBALA, V. - Herbicidal and fungicidal 2,6-dihalo-4-nitrophenols. Czech Pat. 134,647, 18 jul. 1968, 6. Apud Chem.Abstr. Easton, 75: 19932a, 1971.
- 25 - MAYNARD, L.A. & LOOSLI, J.K. - Nutrição Animal. Rio de Janeiro, USAID, 1966.p.319-324.
- 26 - MERCK INDEX. 8th.ed. Rahway, 1968, p.369.
- 27 - MEYER, M.C. & GUTTMAN, D.E. - The binding of drugs by plasma proteins. J.Pharm.Sci., Washington, 57 (6) :895-918, 1968.
- 28- NEER, R.; BERMAN, M; FISHER, L; ROSENBERG, L.E. - Multi-compartmental analysis of calcium kinetics in normal adult males. J.Clin.Invest., Baltimore, 46 (8): 1364-1379, 1967.
- 29 - NICOLAU, W. - Estudo, no homem, do metabolismo do iôdo com o auxilio da análise compartimental. São Paulo, 1970. 102p. (Tese-Faculdade de Medicina da USP).
- 30 - NODINE, J.H.; PLATT, J.M.; CARRANZA, J.; DYKYJ, R.; MAPP, Y. - Digital computer analysis of human isotopic drug kinetics. Int.J.appl.Radiat., New York, 15: 263-268, 1964.

- 31 - OWEN, C.A. Jr. - Copper metabolism and Wilson's disease. In: SYMPOSIUM DYNAMIC CLINICAL STUDIES, 3rd, Oak Ridge, 1963. p.581-606.
- 32 - PRICE, D.C. - Iron Turnover in man. In: SYMPOSIUM DYNAMIC CLINICAL STUDIES, 3rd, Oak Ridge, 1963. p. 537-563.
- 33 - REEVE, E.B. - The plasma albumin system. A first attempt at a kinetic description. In: SYMPOSIUM DYNAMIC CLINICAL STUDIES, 3rd, Oak Ridge, 1963, p.445-472.
- 34 - REGOECZI, E. - The use of ¹³¹I-fibrinogen for in vivo studies. In: LABELLED proteins in tracer studies. Pisa, European Atomic Energy Community-EURATOM, 1966, p.85-97.
- 35 - RESCIGNO, A. - A contribution to the theory of tracer methods. Bioch. Biophys. Acta., Amsterdam, 15: 340 - 344, 1954.
- 36 - RESCIGNO, A. - Ibidem. Part. II. Bioch. Biophys. Acta. Amsterdam, 21: 111-116, 1956.
- 37 - RIGGS, D.S. - Quantitative aspects of iodine metabolism in man. Pharmacol. Rev., Baltimore, 4: 284-370, 1952.
- 38 - ROBERTSON, J.S. - Theory and use of tracers in determining transfer rates in biological systems. Physiol. Rev., Washington, 37 (2):133-154, 1957.
- 39 - ROCHA, U.F.; CAMPOS, M.S.; PRUCULI, J.O.; SERRA, R.G.; ROCHA, C.A.; FONSECA, N. - Disofenol, novo anti-helmíntico injetável contra a hemoncose ovina (nota prévia). O Biológico, São Paulo, 31:195-97, 1965.

- 40 - ROCHA,U.F.; CAMPOS,M.S.; SERRA,R.G.; ROCHA,C.A. - Ensaio do tratamento da Ancilostomíase e da Tricuríase, em cães naturalmente infestados, por meio do 2,6-diiodo-4-nitrofenol (Disofen) administrado por via oral. Rev.Med.vet., São Paulo, 2 (1) : 23-33, 1966.
- 41 - ROCHA,U.F.; CAMPOS M.S.; SERRA,R.G.; ROCHA,C.A.; RODRIGUES,F.W. - Ensaio do tratamento da Ancilostomíase e da Tricuríase, em cães naturalmente infestados, por meio do 2,6-diiodo-4-nitrofenol (Disofen) injetado por via subcutânea. Estudo sobre a correlação entre contagem de ovos por gramas de fezes e contagem de vermes nos hospedeiros. Rev. Med.Vet., São Paulo, 2 (3): 213-25, 1967.
- 42 - ROCHA,U.F.; CAMPOS,M.S.; PRUCOLI, J.O.; GONÇALVES,P.C. SERRA,R.G.; ROCHA,C.A. - Estudo comparativo das atividades de 2,6-diiodo para nitrofenol (Disofen) e de 2-para-tiazolil benzimidazol (Tiabendazol) como antihelmínticos para ovinos. Bol.Ind.Anim., São Paulo, 24: 89-103,1967.
- 43 - ROCHA,U.F.; SERRA,R.G.; MENDES,M.F.M.; ROCHA,C.A.; CAMPOS,M.S.; PRUCOLI,J.O.; COSTA,J.W.; RIBEIRO,R. - O poder residual do 2,6-diiodo-para-nitrofenol (Disofen) no tratamento de nematodíases de ovinos e bovinos. Bol.Ind.Anim., São Paulo, 24: 105-110, 1967.
- 44 - SCHOENHEIMER,R. & RITTENBERG,D. - Deuterium as a indicator in the study of intermediary metabolism . III. The role of the fat tissues. J.Biol.Chem. , Baltimore, 111: 175, 1935.

- 45 - SCHOENHEIMER, R. - The dynamic state of body constituents. Cambridge, Haward Un.Preass, 1942, Apud MONASTERIO, G. & DONATO, L. - I radioisotopi nell'indagine medica. Pisa, Ed. Minerva Medica, 1960, p.20-21.
- 46 - SNEDECOR, G.W. & COHRAN, W.G. - Statistical methods. 6th, Ames, 1972. p.172-198.
- 47 - SOLOMON, A.K. - The kinetics of biological processes special problems connected with the use of tracers. Advanc. Biol. med. Phys., New York, 3: 65-97, 1953.
- 48 - STERLING, K. - The turnover rate of serum albumin in man as measured by I-131 tagged albumin. J. Clin. Invest., New Haven, 30: 1228-1237, 1951.
- 49 - STROLIN-BENEDETTI, M. - Apport des éléments marqué dans l'étude de la pharmacocinétique et du métabolisme des médicaments. J. pharmacol. Clin., Paris, 0 (4) : 5-18, 1972.
- 50 - USAFARMA S.A. Indústria Farmacêutica - Verminoses animais e seu combate. São Paulo, s.d. 20p.
- 51 - USAFARMA S.A. Indústria Farmacêutica - Informação pessoal.
- 52 - WANG, Guang-Tsan - Toxicity of Disophenol at excessive dosages in newly weaned pups. J. Amer. vet. med. Ass., Chicago, 157 (8): 1077-81, 1970.
- 53 - WOOD, I.B.; PANKAVICH, J.A.; WALLACE, M.S.W.S.; THORSON, R. E.; BURKHART, R.L.; WALETZKY, E. - Disophenol, an injectable anthelmintic for canine hookworms. J. Amer. vet. med. Ass., Chicago, 139(10): 1101-1105, 1962.

9 - APÊNDICE
=====

Os gráficos de n^os. 4 a 11, apresentados a seguir, referem-se às curvas representativas da atividade residual corpórea (curva A) e da atividade plasmática (curva B) em função de tempo, para cada carneiro estudado.

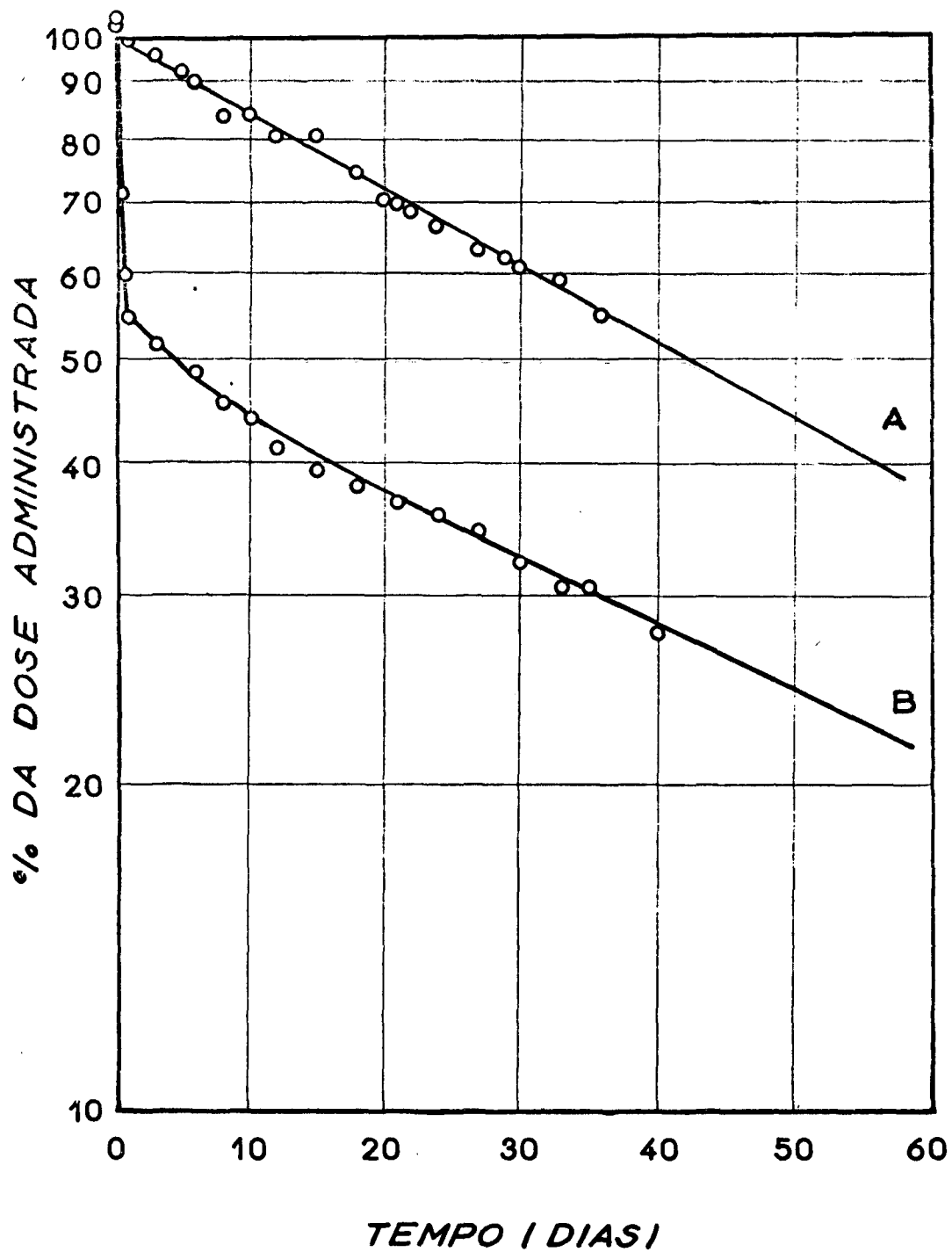


GRÁFICO 4 - Carneiro 1

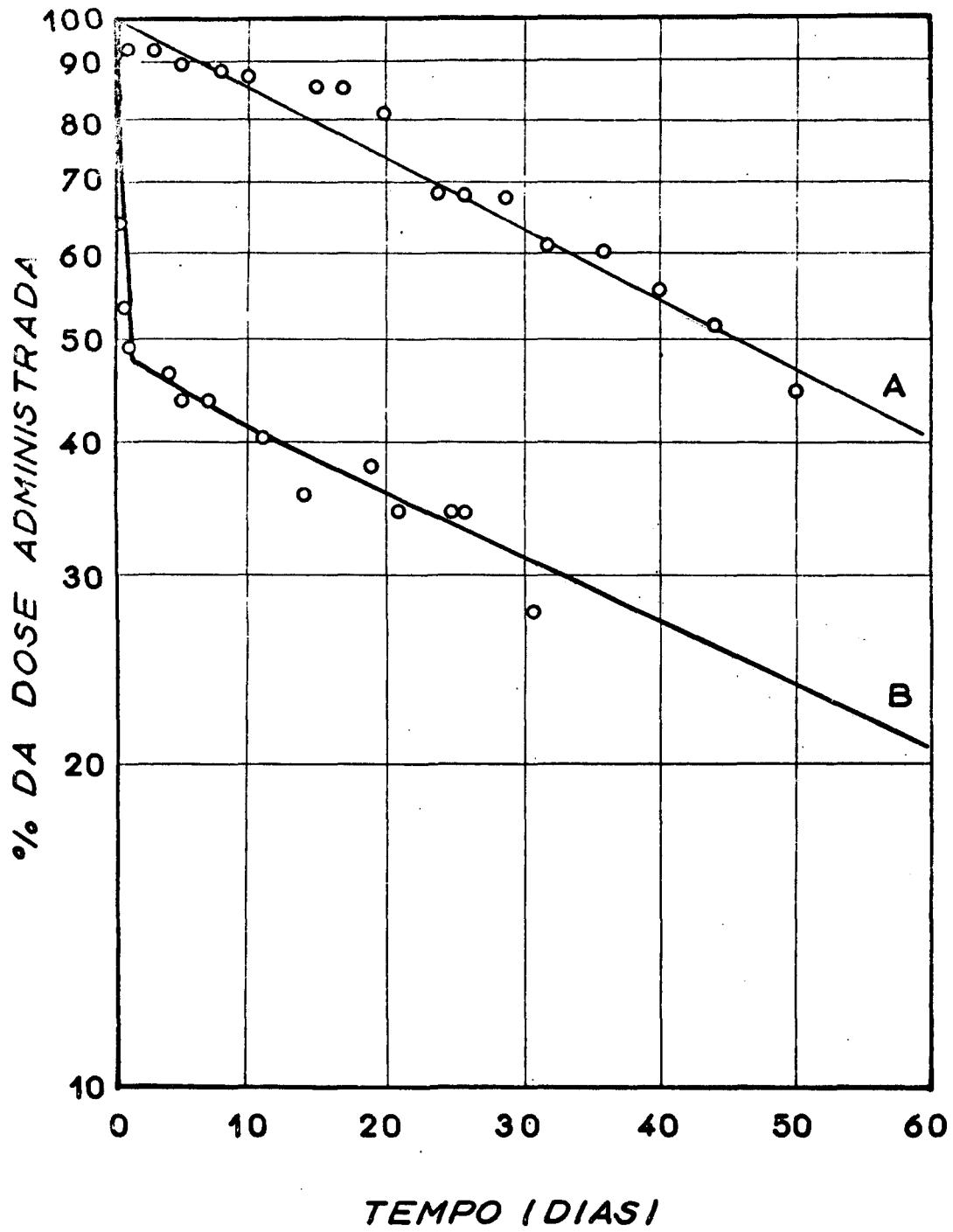


GRÁFICO - 5 - Carneiro 2
.....

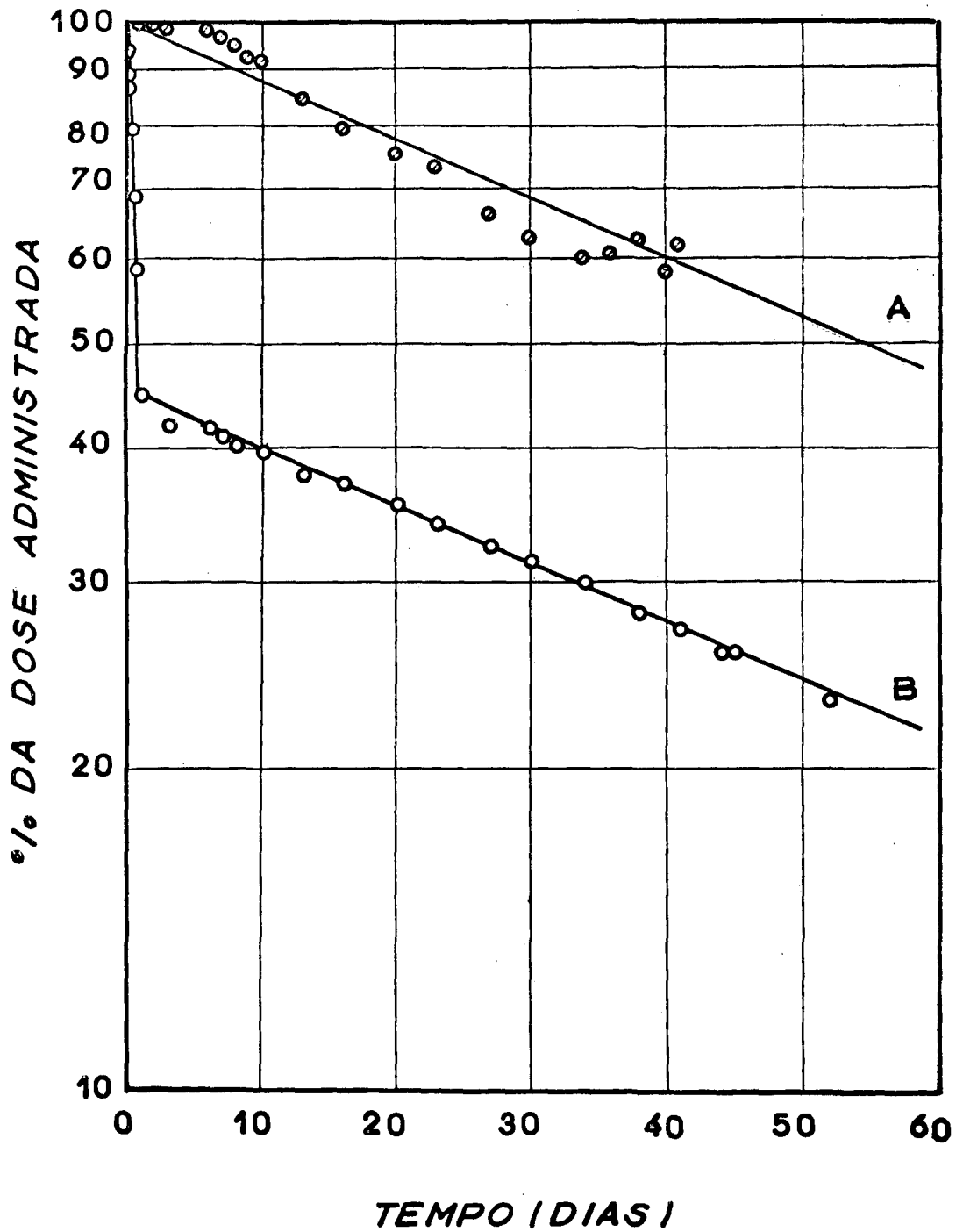


GRÁFICO 6 - Carneiro 3

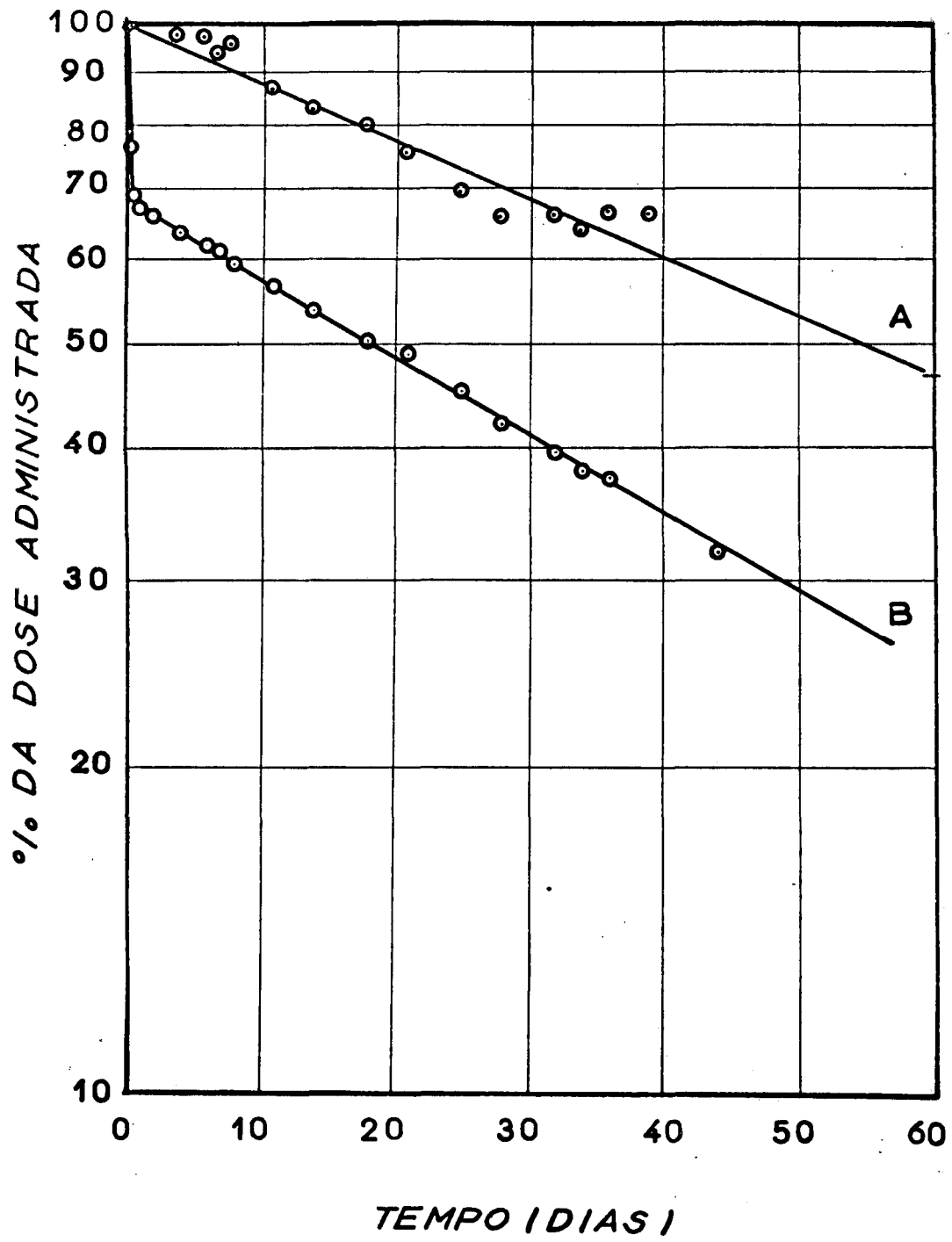


GRÁFICO 7 - Carneiro 4

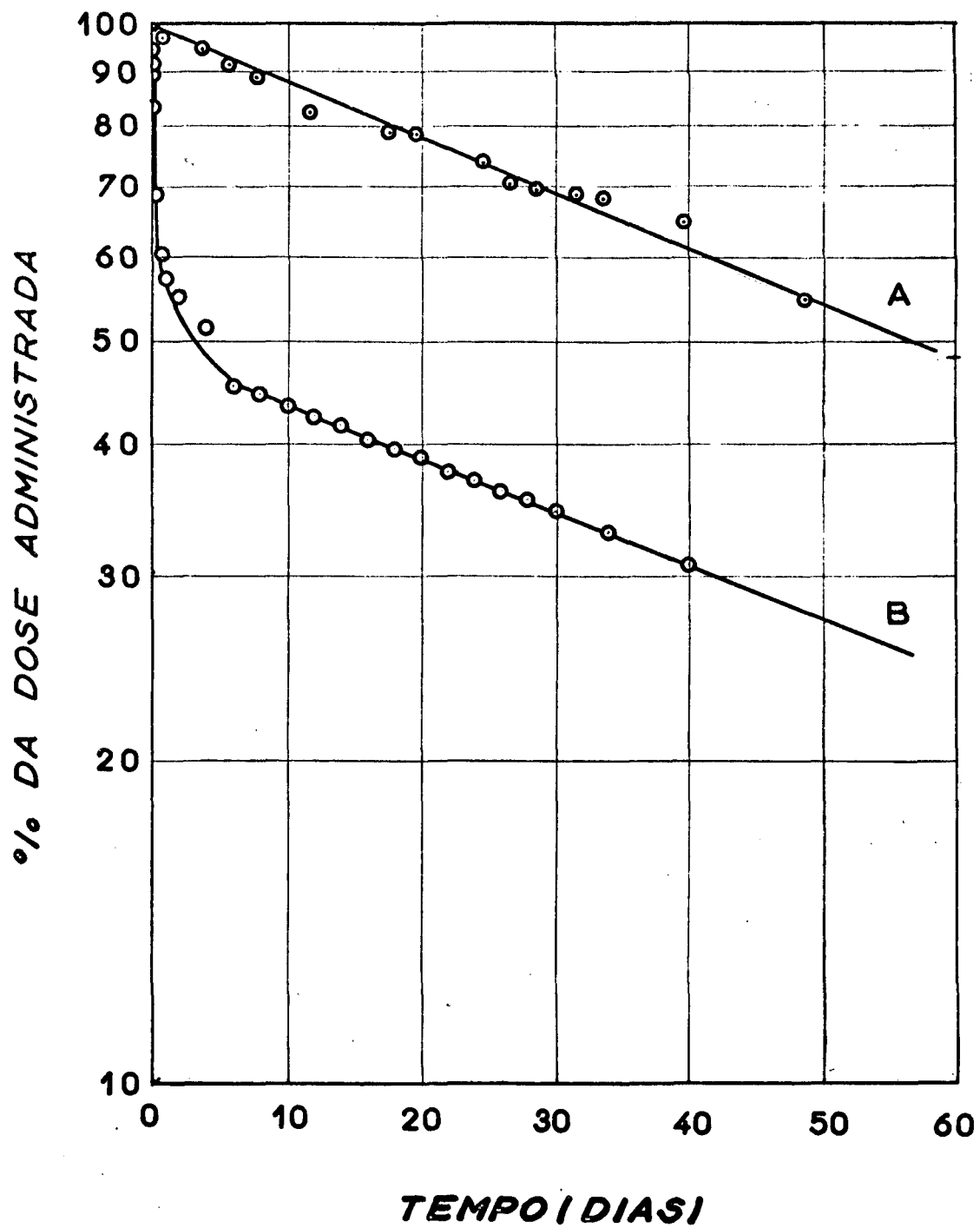


GRÁFICO 8 - Carneiro 5

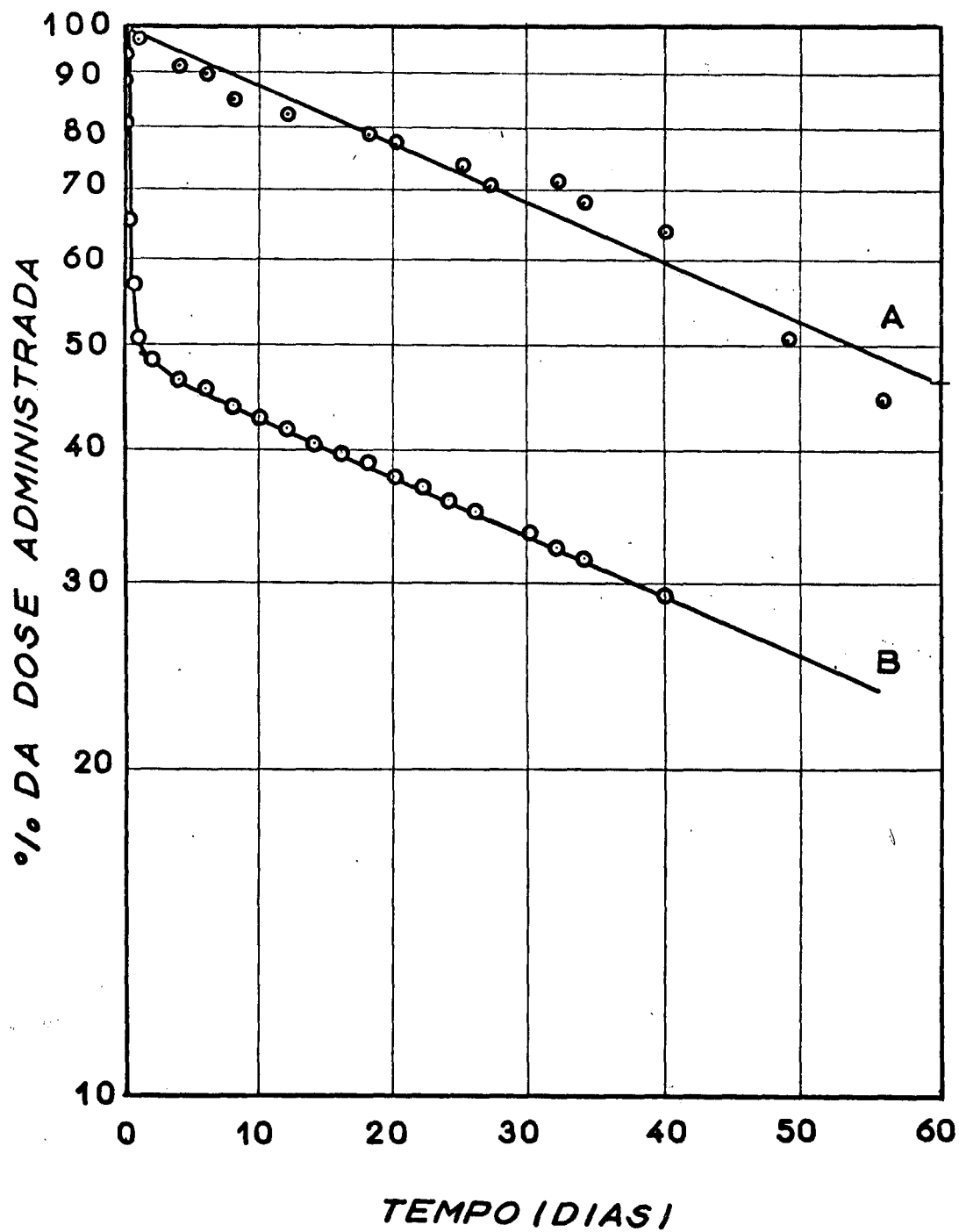


GRÁFICO 9 - Carneiro 6

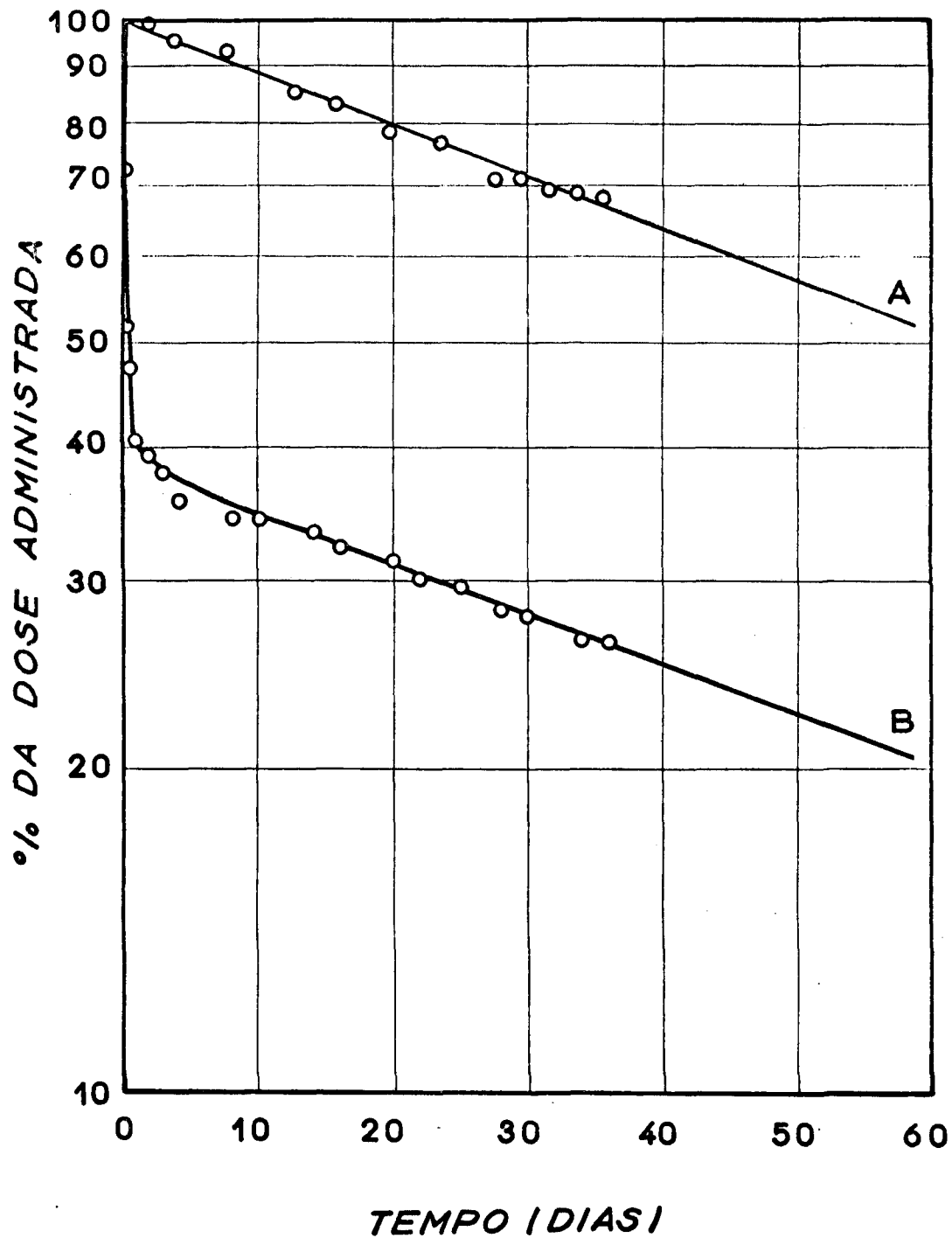


GRÁFICO 10 - Carneiro 7

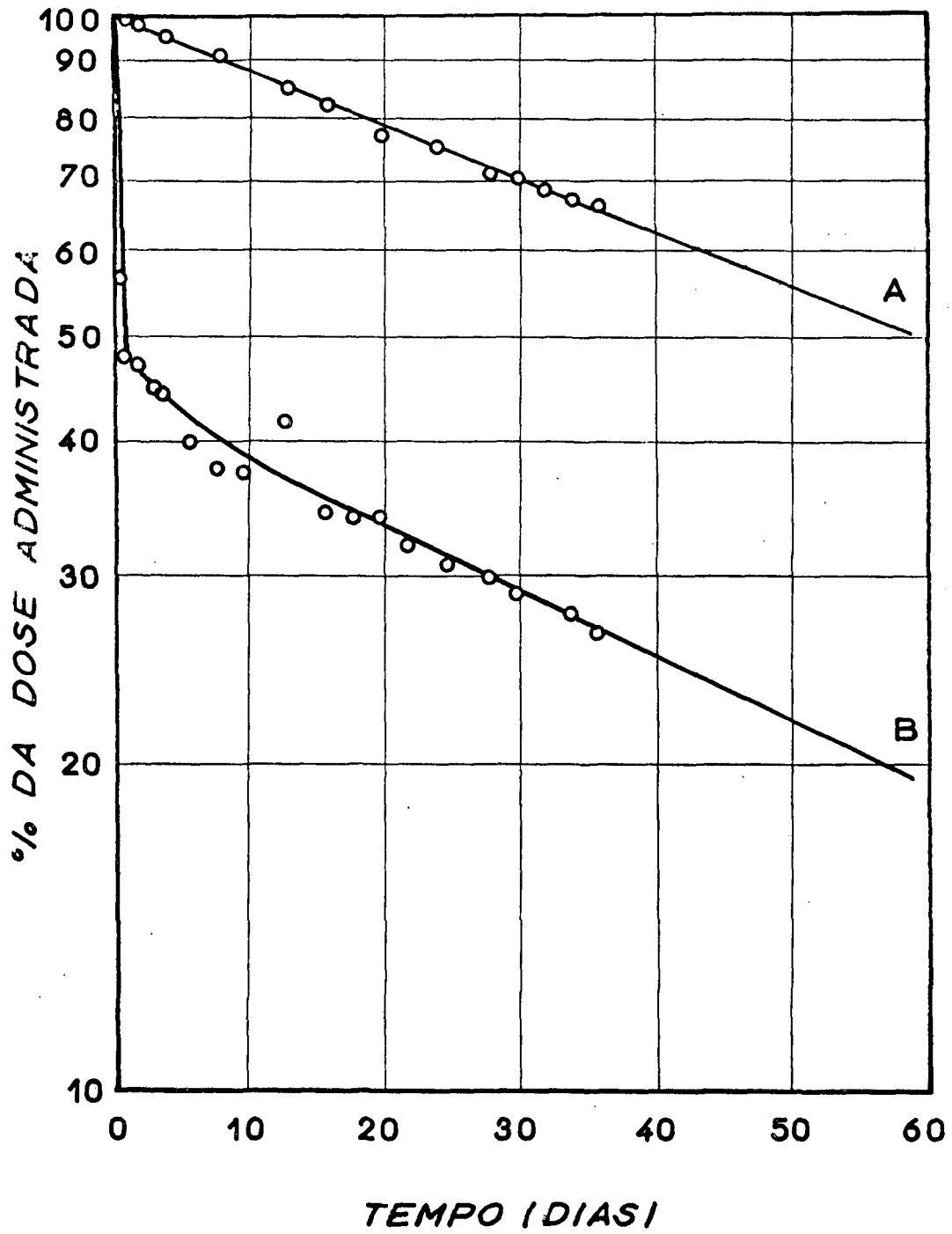


GRÁFICO 11 - Carneiro 8
