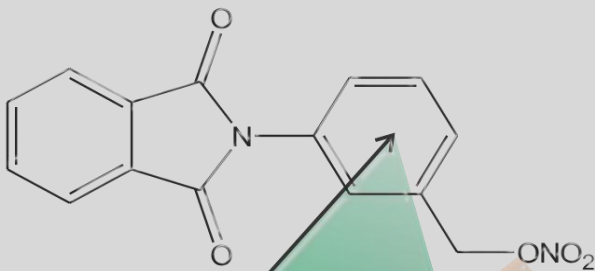


UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Faculdade de Ciências Farmacêuticas



*Farmacocinética e Farmacodinâmica de Derivado
Ftalimídico Planejado para o Tratamento a Anemia Falciforme*

Michel L. de Campos



Araraquara-SP
2015

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JULIO DE MESQUITA FILHO"
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
CÂMPUS DE ARARAQUARA
Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas

FARMACOCINÉTICA E FARMACODINÂMICA DE DERIVADO FTALIMÍDICO
PLANEJADO PARA O TRATAMENTO DA ANEMIA FALCIFORME

MICHEL L. DE CAMPOS

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de Pesquisa e Desenvolvimento de Fármacos e Medicamentos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências Farmacêuticas.

ORIENTADORA: Profa. Dra. Rosângela G. Peccinini

ARARAQUARA - SP

2015

Ficha Catalográfica

Elaborada Pelo Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
UNESP – Campus de Araraquara

C198f Campos, Michel Leandro de
Farmacocinética e farmacodinâmica de derivado ftalimídico planejado para o tratamento da anemia falciforme / Michel Leandro de Campos – Araraquara, 2015
75 f.

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista. “Júlio de Mesquita Filho”. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas

Orientador: Rosângela Gonçalves Peccinini

1. Farmacocinética. 2. Anemia falciforme. 4. Estabilidade química. 5. Ligação a proteínas plasmáticas. 6. Espectrometria de massas de alta resolução. I. Peccinini, Rosângela Gonçalves, orient. II. Título.

CAPES: 40300005

Candidato: Michel Leandro de Campos

**Farmacocinética e Farmacodinâmica de Derivado Ftalimídico Planejado para o
Tratamento a Anemia Falciforme**

A comissão julgadora dos trabalhos de defesa de Tese de Doutorado, em sessão pública realizada em 1 de outubro de 2015, considera o candidato:

APROVADO

REPROVADO

COMISSÃO EXAMINADORA

Profa. Dra. Vera Lucia Lanchote

Profa. Dra. Regina Helena Costa Queiroz

Profa. Dra. Rafael Victorio Carvalho Guido

Profa. Dra. Chung Man Chin

Profa. Dra. Rosângela Gonçalves Peccinini

Dedicatória

Dedicado às famílias **Ferreira de Souza** e **Alves de Campos**, pois me ensinaram a lutar, perseverar e jamais desistir.

Michel L. de Campos

Agradecimentos

Agradeço

A **DEUS** e a todas as forças boas visíveis e invisíveis do universo por cada pequena coincidência ou destino, cuja convergência levaram a obtenção desse título e ao término desse trabalho;

A meus pais, **Maria Ferreira de Souza e Jaime Alves de Campos** e a toda **minha família**, pelo apoio e pela torcida que me dedicaram;

A **Mayra Aparecida Lovezutte** por seu companheirismo e compreensão, que foram muito necessários nesse longo período de trabalho;

A **Profa. Dra. Rosangela Gonçalves Peccinini**, minha orientadora e amiga pela parceria e ensinamentos no decorrer dessa jornada;

I thank **Professor Demian R. Ifa PhD**, for having me in his laboratory at York University and for everything I have learned in this great period of my PhD.

I thank **Ifa's group**, especially **Consuelo Perez, Alessandra Tata** and **Dragos Lostum**, and all people from York University that in some way have helped me there.

Aos Professores **Dr. Álvaro José dos Santos Neto, Dr. Valdecir Farias Ximenes, Dra. Vera Lúcia Lanchote, Dra. Regina Helena Costa Queiroz, Dr. Rafael Victorio Carvalho Guido e Dra. Chung Man Chin**, pela contribuição durante o exame geral de qualificação e a defesa de tese.

A equipe do Laboratório de Bioequivalência, **Marcos, Kelly e Andréia**, e também a equipe do Laboratório de Toxicologia, **Valéria e Maria**.

A equipe de Pesquisa em Farmacocinética Pré-Clínica – UNESP, **Marcelo, Elias, Caroline, Juliana, Marco, e aos novos recrutas e aspirantes**.

Aos funcionários da biblioteca e da seção técnica de pós-graduação pelo atendimento de cada solicitação e pelo importante trabalho que realizam;

Ao **INCT-if, a CAPES, e a FAPESP** pelo apoio por meio de bolsa e auxílio financeiro, sem os quais, trabalhos como esse não poderiam ser realizados no âmbito acadêmico.

A **Faculdade de Ciências Farmacêuticas – UNESP** pelo suporte e por ser o continente de realização desse trabalho.

E a todos que contribuíram com a realização de trabalho, seja direta ou indiretamente.

“Nas grandes batalhas da vida, o primeiro passo para a vitória é o desejo de vencer.”
Mahatma Gandhi

“O sucesso nasce do querer, da determinação e persistência em se chegar a um objetivo. Mesmo não atingindo o alvo, quem busca e vence obstáculos, no mínimo fará coisas admiráveis.”
José de Alencar

RESUMO

A anemia falciforme é um distúrbio monogênico, cujas complicações resultam em um quadro debilitante, doloroso e fatal para os portadores. O planejamento, síntese e avaliação de novos compostos são imprescindíveis para renovar as esperanças daqueles acometidos por essa doença e os estudos de farmacocinética, relação PK/PD e de segurança são parte indispensável da continuidade de desenvolvimento de novos candidatos. O LAPDES-SCD03 é uma nova molécula candidata a fármaco que foi planejada para o tratamento sintomático dessa doença e demonstrou resultados promissores. Neste trabalho desenvolvemos os estudos de farmacocinética pré-clínica e de avaliação da atividade inibitória da produção de TNF- α em ratos Wistar, e as análises foram realizadas por cromatografia líquida de ultra eficiência e ensaio imunoenzimático, respectivamente. Os estudos em busca de metabólitos foram conduzidos em hepatócitos e analisados por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas de alta resolução. Nos parâmetros farmacocinéticos observados para o LAPDES-SCD03 destaca-se a meia-vida curta (4,7 minutos) e o clearance elevado (172,5 mL/min.kg) para administração IV. Na administração oral o MRT foi 10 vezes maior que na administração IV com meia-vida de eliminação de 30 minutos. No estudo de relação PK/PD, foi observada redução dos níveis de TNF- α tanto pela via intravenosa, quanto pela via oral. No estudo de metabolismo, tanto na presença dos hepatócitos funcionais quanto na incubação com os hepatócitos não funcionais, foi observada a existência de um metabólito formado por hidrólise na subunidade ftalimídica, que de acordo com estudos previamente publicados com a talidomida e seus metabólitos, pode resultar em atividade inibitória da produção de TNF- α . Em conclusão, o fármaco mostrou atividade e teve sua farmacocinética elucidada com a identificação de um provável metabólito ativo.

Palavras-chave: Farmacocinética. PK/PD. Anemia falciforme. UHPLC. Log P. Estabilidade química. Ligação a proteínas plasmáticas. Espectrometria de massas de alta resolução.

ABSTRACT

Sickle cell disease is a severe monogenic disorder, whose complications include the increase in the susceptibility to infections, acute splenic sequestration, aplastic crisis, acute thoracic syndrome, vaso-occlusive crisis, cerebrovascular disease, bone disease, priapism and leg ulcerations. The design, synthesis and evaluation of new compounds are necessary in order to renew the hopefulness of those affected by this disease, and the preclinical pharmacokinetic study, PK/PD study, metabolism study and safety evaluations, are an indispensable part of the development of these candidates as LAPDESF-SCD03. The preclinical pharmacokinetic and the TNF- α inhibition evaluation have been done using ultra performance liquid chromatography and immunoassay, respectively. The metabolite study has been made using Wistar rat hepatocytes and analyzed liquid chromatography coupled to high resolution mass spectrometry. The main results in the pharmacokinetic parameters were the short half-life (4.7 minutos) and the high clearance (172,5 mL/min.kg). In the oral administration, the MRT was ten-fold higher than the observed one in the iv administration, while the half-life was 30 minutes. In the PK/PD study, it was observed TNF- α reduction by both routes of administration, intravenous and oral. The metabolism study has addressed the formation of open ring metabolite, even though in the absence of the functional cells. Aftermath, the drug has shown activity and its pharmacokinetic was achieved, including the identification of a probable metabolite, which maybe can be pharmacologically active.

Keywords: Pharmacokinetics. PK/PD. Sickle cell disease. UHPLC. Log P. Chemical stability. Plasma protein binding. High resolution mass spectrometry.

LISTA DE ABREVIATURAS

ALT: alanina aminotransferase

ASC_{0-inf} : área sob a curva extrapolada ao infinito

$ASC_{i.v}$: área sob a curva após administração pela via intravenosa

ASC_{oral} : área sob a curva após administração pela via oral

AST: aspartato aminotransferase

C_{BD} : concentração de fármaco na solução de plasma

C_{BF} : concentração de fármaco na solução de plasma no filtrado

Cl: clearance

CQA: controle de qualidade alto

CQB: controle de qualidade baixo

CQD: controle de qualidade diluído

CQM: controle de qualidade médio

C_{SD} : concentração de fármaco no plasma

C_{SF} : concentração de fármaco no filtrado após ultrafiltração do plasma

CV: coeficiente de variação

DNS: Dinitrato de isosorbida

E: taxa de extração corporal

F: biodisponibilidade

FDA: Food and Drug Administration

$f_{u,p}$: fração de fármaco não ligado que está no plasma

$f_{u,T}$: fração de fármaco não ligado fora do plasma

Fu: *fraction unbound* ou fração não ligada

IV: administração intravenosa

IC95: intervalo de confiança 95%

IL-1: interleucina-1

IL-6: interleucina-6

IR: intermediário de reação

kel: constante de eliminação

LIQ: limite inferior de quantificação

LPS: lipopolissacarídeo

m/z: mass to charge ratio ou razão massa carga

MS/MS: análise por espectrometria de massas em *tandem*
NO: óxido nítrico
NSB: *nonspecific binding* ou ligação não específica
OECD: *Organisation for Economic Co-operation and Development* ou Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico
p.o.: per oral
PI: padrão interno
PK/PD: farmacocinética/farmacodinâmica
ppm: parte por milhão
PTFE: Politetrafluoretileno
PVDF: *Polyvinylidene fluoride* ou fluoreto de polivinilideno
SCD03: forma curta de LAPDES-F-SCD03
 $T_{1/2}$: meia-vida
TGO: transaminase oxalacética
TGP: enzimas transaminase pirúvica
TNF- α : fator de necrose tumoral- α
UHPLC: Cromatografia Líquida de ultra eficiência
UPLC®: Instrumento Waters de Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência
Vd: volume de distribuição
V_p: volume de plasma
V_{ss}: volume de distribuição no estado de equilíbrio
V_T: volume tecidual

LISTA DE EQUAÇÕES

Equação 1	55
Equação 2	65
Equação 3	65
Equação 4	70
Equação 5	71
Equação 6	71
Equação 7	85
Equação 8	96
Equação 9	101
Equação 10	102

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Planejamento estrutural usando a hibridação molecular. Retirado de Dos Santos e colaboradores (2011).....	25
Figura 2. Derivado ftalimídico selecionado para os estudos de farmacocinética, farmacodinâmica e avaliação da segurança hepática e renal.	27
Figura 3. Cromatograma da seletividade do método analítico. Intermediário de reação (250 ng/mL) e LAPDESF-SCD03 (750 ng/mL).	39
Figura 4. Curva de linearidade do LAPDESF-SCD03.....	40
Figura 5. Cromatograma em 226 nm demonstrando a seletividade do método. LAPDESF-SCD03 (250ng/mL) em 2,6 minutos e padrão interno em 1,9 minutos na amostra LAPDESF-SCD03 e na amostra zero.	42
Figura 6. Curva de linearidade do LAPDESF-SCD03 em plasma.	42
Figura 7. Linearidade de Log <i>k</i> versus Log P das substâncias selecionadas	56
Figura 8. Representação do impacto na concentração livre de uma mudança de 2% na taxa de ligação a proteínas plasmáticas e dois fármacos com diferentes taxas de ligação.	66
Figura 9. Estabilidade de LAPDESF-SCD03 em soluções (1500 ng/mL)..	72
Figura 10. Estabilidade de LAPDESF-SCD03 em plasma (1500 ng/mL).	73
Figura 11. Regime de dose como um feedback do efeito através da farmacocinética. Adaptado de Rolwland e Tozer (1995).	75
Figura 12. Causas de falha no desenvolvimento de fármacos entre 1991 e 2000 nas companhias farmacêuticas. Adaptado de Kola e Landis (2004).	76
Figura 13. Representação da presença dos processos ADME na disposição do fármaco.	78
Figura 14. Volumes de distribuição. Adaptado de Smith (2015) e Toutain (2004)...	80
Figura 15. Inter-relação entre farmacocinética, farmacodinâmica e PK/PD. Adaptado de Meihbohm e Derendorf (1997).	86
Figura 16. Perfil farmacocinético de LAPDESF-SCD-03 após administração intravenosa de 5,2 mg/kg e via gavagem de 300 mg/kg	98
Figura 17. Perfil farmacocinético de LAPDESF-SCD-03 via intravenosa (5,2 mg/kg) antes e após a administração de 100 µg/kg de LPS e via gavagem (300 mg/kg) 15 minutos antes da administração de 100 µg/kg de LPS.....	103

Figura 18. Curva das concentrações plasmáticas de tnf- α em ambos os grupos e inibição em função do tempo. Fármaco administrado no tempo 0 e LPS em 15 minutos. Média + IC95.	105
Figura 19. Curva das concentrações plasmáticas de tnf- α em ambos os grupos e inibição em função do tempo. LPS administrado no tempo 0 e fármaco em 40 minutos. Média + IC95.	107
Figura 20. Curva das concentrações plasmáticas de tnf- α em ambos os grupos e inibição em função do tempo. Fármaco administrado no tempo 0 e LPS em 15 minutos. Média + IC95.	107
Figura 21. Curvas de concentrações plasmáticas de LAPDESf-SCD03 e de inibição de TNF- α <i>versus</i> tempo após administração do fármaco e de LPS.	109
Figura 22. Curvas de efeito <i>versus</i> tempo com os valores previsto pelo modelo e os valores observados experimentalmente.	110
Figura 23. Valores de TGO e TGP.	112
Figura 24. Valores de Ureia e creatinina.	113
Figura 25. As moléculas LAPDESf-SCD03 e D4-LAPDESf-SCD03.	118
Figura 26. Espéctros de fragmentação dos íons 236 e 316.	122
Figura 27. Espectros das análises de amostras de controle positivo.	124
Figura 28. Espectros do metabólito de LAPDESf-SCD03.	126
Figura 29. Cromatogramas dos íons 316 e 339.	127

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Precisão e exatidão do método analítico	41
Tabela 2. Precisão e exatidão do método bioanalítico.	43
Tabela 3. Recuperação do LAPDESF-SCD03.....	44
Tabela 4. Estabilidade de LAPDESF-SCD03.	44
Tabela 5. Classificação de solubilidade.....	48
Tabela 6. Substâncias utilizadas na curva para a determinação do log P do LAPDESF-SCD03.....	54
Tabela 7. Ensaio de solubilidade (tampão ou água) nas diferentes condições avaliadas.....	55
Tabela 8. Taxas de Ligação a proteínas plasmáticas obtidas por meio de dois experimentos	74
Tabela 9. Parâmetros farmacocinéticos de LAPDESF-SCD03 em ratos após administração intravenosa de 5,2 mg/kg e oral de 300 mg/kg.....	99
Tabela 10. Estimativas iniciais dos parâmetros farmacocinéticos primários.....	100
Tabela 11. Parâmetros farmacocinéticos de LAPDESF-SCD03 em ratos após administração intravenosa de 5,2 mg/kg e oral de 300 mg/kg, calculados pelo software WinNonlin 6.3.....	101
Tabela 12. Parâmetros PK utilizados na modelagem PK/PD	104
Tabela 13. Parâmetros resultantes do modelo PK/PD.	111
Tabela 14. Resumo da análise por espectrometria de massas de alta resolução ..	121

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	23
JUSTIFICATIVA	29
OBJETIVO GERAL	29
CAPÍTULO 1 – MÉTODOS ANALÍTICOS DE QUANTIFICAÇÃO	31
1-1. Material e métodos	34
1-1.1 Reagentes, fármacos e solventes.....	34
1-1.2 Equipamentos.....	34
1-1.3 Correlatos	35
1-1.4 Softwares.....	35
1-1.5 Método analítico para determinação de LAPDESF-SCD03.....	35
1-1.5.1 Sistema cromatográfico	35
1-1.5.2 Validação.....	35
1-1.6 Método bioanalítico para determinação de LAPDESF-SCD03.....	36
1-1.6.1 Sistema cromatográfico	36
1-1.6.2 Preparo da amostra	36
1-1.6.3 Validação.....	37
1-2. Resultados e discussão	39
1-2.1 Validação do Método Analítico	39
1-2.1.1 Seletividade	39
1-2.1.2 Linearidade.....	40
1-2.1.3 Precisão e Exatidão.....	40
1-2.2 Validação do Método bioanalítico	41
1-2.2.1 Seletividade	41
1-2.2.2 Linearidade.....	42
1-2.2.3 Precisão e Exatidão.....	43
1-2.2.4 Recuperação	43
1-2.2.5 Estabilidade de armazenamento	44
1-3. Conclusão e Perspectivas	45
CAPÍTULO 2 – SOLUBILIDADE E LOG P	47
2-1. Material e métodos	51
2-1.1 Reagentes, fármacos e solventes.....	51
2-1.2 Equipamentos.....	51
2-1.3 Correlatos	52
2-1.4 Softwares.....	52
2-1.5 Solubilidade em água e tampões (1,2; 4,5 e 7,4)	52
2-1.6 Log P	54
2-2. Resultados e discussão	55
2-2.1 Solubilidade em água e tampões (1,2; 4,5 e 7,4)	55
2-2.2 Log P	56
2-3. Conclusão e Perspectivas	57

CAPÍTULO 3 - ENSAIOS <i>IN VITRO</i>.....	59
3-1. Material e métodos	68
3-1.1 Reagentes, fármacos e solventes	68
3-1.2 Equipamentos	68
3-1.3 Correlatos.....	69
3-1.4 Softwares	69
3-1.5 Estabilidade em água e tampões (pH 1,2 e 7,4)	69
3-1.6 Determinação da estabilidade de LAPDESF-SCD03 em plasma	69
3-1.7 Determinação da taxa de ligação proteínas plasmáticas	70
3-1.7.1 Experimento sem correção da ligação inespecífica	70
3-1.7.2 Experimento com correção da ligação inespecífica	70
3-2. Resultados e discussão	71
3-2.1 Estabilidade em água e tampões (1,2 e 7,4).....	71
3-2.2 Estabilidade de LAPDESF-SCD03 em plasma	72
3-2.3 Taxa de ligação a proteínas plasmáticas	73
3-3. Conclusão e Perspectivas	74
CAPÍTULO 4 - ENSAIOS <i>IN VIVO</i>	75
4-1. Material e métodos	87
4-1.1 Reagentes, fármacos e solventes	87
4-1.2 Equipamentos	87
4-1.3 Correlatos.....	87
4-1.4 Softwares	88
4-1.5 Veiculação da nova molécula.....	88
4-1.6 Protocolo Experimental	89
4-1.7 Implantação cirúrgica de cânulas em veia e artéria femorais	90
4-1.8 Estudo de farmacocinética pré-clínica.....	91
4-1.8.1 Desenho experimental do estudo de farmacocinética pré-clínica	91
4-1.8.2 Análise Farmacocinética	91
4-1.8.3 Análise Estatística	92
4-1.9 Estudo de relação farmacocinética/farmacodinâmica (PK/PD).....	92
4-1.9.1 Quantificação de TNF- α em plasma.....	93
4-1.9.2 Desenho experimental do estudo de relação PK/PD	93
4-1.9.2.1 Inibição de TNF- α pela via IV com LPS pós-administrado	94
4-1.9.2.2 Inibição de TNF- α pela via IV com LPS pré-administrado.....	94
4-1.9.2.3 Inibição de TNF- α pela via oral com LPS pós-administrado	95
4-1.9.3 Análise farmacodinâmica	95
4-1.9.4 Análise Estatística	96
4-1.9.5 Análise farmacocinética/farmacodinâmica	96
4-1.10 Avaliação preliminar de segurança hepática e renal	97
4-1.10.1 Determinação dos parâmetros bioquímicos hepáticos e renais	97
4-1.10.2 Análise estatística	97
4-2. Resultados e discussão	98
4-2.1 Perfil farmacocinético de LAPDESF-SCD03	98
4-2.2 Estudo da relação farmacocinética e farmacodinâmica	103

4-2.2.1 Análise farmacocinética.....	103
4-2.2.2 Análise farmacodinâmica.....	104
4-2.2.2.1 Inibição de TNF- α pela via IV com LPS pós-administrado.....	105
4-2.2.2.2 Inibição de TNF- α pela via IV com LPS pré-administrado	106
4-2.2.2.3 Inibição de TNF- α pela via oral com LPS pós-administrado	107
4-2.2.3 Análise farmacocinética/farmacodinâmica de LAPDESF-SCD03.....	108
4-2.3 Avaliação preliminar de segurança.....	112
4-3. Conclusão e Perspectivas.....	113
CAPÍTULO 5 – INVESTIGAÇÃO DE METABÓLITO	115
5-1. Material e métodos.....	116
5-1.1 Reagentes, fármacos e solventes.....	116
5-1.2 Equipamentos.....	117
5-1.3 Correlatos	117
5-1.4 Softwares.....	117
5-1.5 Obtenção do isótopo estável	117
5-1.6 Condições cromatográficas e espectrométricas	118
5-1.7 Estudo de metabolismo em hepatócitos de rato criopreservados	118
5-1.7 Procedimento de extração.....	119
5-1.8 Desenho experimental.....	120
5-2. Resultados e discussão	120
5-2.1 Produto de LAPDESF-SCD03 após incubação	120
5-2.2 Estudo de ionização por eletrospray em HRMS	121
5-2.3 Análise do controle positivo	123
5-2.4 Análise das amostras contendo LAPDESF-SCD03.....	125
5-3. Conclusão e Perspectivas.....	128
CONSIDERAÇÕES FINAIS	129
REFERÊNCIAS.....	131

INTRODUÇÃO

A anemia falciforme é um distúrbio monogênico severo, que se caracteriza por episódios de invalidez aguda e danos progressivos nos órgãos (Rees, Williams e Gladwin, 2010). As complicações mais frequentes incluem um aumento na suscetibilidade a infecções, captação esplênica aguda, crise aplástica, síndrome torácica aguda, crise vaso-oclusiva, doença vascular cerebral, doenças ósseas, priapismo e ulcerações nos membros inferiores (Dos Santos, Lanaro e Chin, 2011).

Sua incidência é maior nos países africanos e ocorre principalmente em indivíduos afrodescendentes (Dos Santos e Chung, 2012). No Brasil acomete os estados de forma diferente. A Bahia é o estado com maior incidência, onde se estima 1 por 650 recém-nascidos (Almeida *et al.*, 2006), no Rio Grande do Sul 1 por 39000 recém-nascidos (Sommer *et al.*, 2006), no Rio de Janeiro 1 a cada 1288 (Botler, Camacho e Cruz, 2012) e em São Paulo 1 a cada 5527 recém-nascidos (Brandelise *et al.*, 2004).

A anemia falciforme resulta de uma única mutação na posição 6 da cadeia β , onde o glutamato na hemoglobina é substituído pela valina na hemoglobina S (Safo *et al.*, 2004). Durante a fase de desoxigenação, a troca do glutamato, que é hidrofílico, pela valina, que é hidrofóbica, desencadeia interações com outros resíduos hidrofóbicos da cadeia de β -globina de outra hemoglobina S. Em baixa pressão de oxigênio, a desoxihemoglobina S polimeriza e se organiza em fibras poliméricas longas que deformam, enrijecem e enfraquecem a hemácia. A deformação origina o clássico contorno de foice dos eritrócitos falcêmicos, enquanto o enrijecimento e o enfraquecimento estão relacionados a vaso-oclusão e a anemia hemolítica, respectivamente (Odièvre *et al.*, 2011).

Dentre as complicações anteriormente citadas a crise vaso-oclusiva é a responsável pela maior parte da morbidade e mortalidade associadas à anemia falciforme e parece resultar do bloqueio do fluxo sanguíneo. Assim, durante a crise vaso-oclusiva, os pacientes sentem dores localizadas decorrentes da hipóxia tecidual devido à perfusão insuficiente. Essa condição em estado crônico resulta em dano degenerativo dos órgãos e em estado agudo pode progredir para acidente vascular encefálico, embolia, infarto cardíaco e até morte (Pathare *et al.*, 2003).

A vaso-occlusão ocorre devido à adesão dos eritrócitos falcêmicos ao endotélio ativado, adesão essa que é aumentada por interleucina-8, que por sua vez tem sua produção regulada por interleucina-1 (IL-1) e fator de necrose tumoral- α (TNF- α). Já a IL-1 e o TNF- α são liberados de monócitos ativados. Experimentos com anticorpos para TNF- α e IL-1 β mostraram um bloqueio da atividade destas citocinas, prevenindo a ativação endotelial pelos monócitos, portanto, tendo um potencial para a manipulação terapêutica (Pathare *et al.*, 2003).

Ainda, o TNF- α , juntamente com a IL-1 e a IL-6, modula a liberação de endotelina-1, um potente vasoconstritor, que se apresenta elevado durante a crise celular falcêmica e durante o estado de equilíbrio da doença falciforme contribuindo para a vaso-occlusão (Pathare *et al.*, 2003; Odièvre *et al.*, 2011). Essa ação vasoconstritora da endotelina-1 é um dos lados da balança que determina o tônus vascular, o outro lado é a ação vasodilatadora do óxido nítrico (NO). Na anemia falciforme, enquanto os níveis de endotelina-1 estão elevados em decorrência das altas concentrações de TNF- α e outras citocinas, os níveis de NO encontram-se baixos. Além disso, a depleção de NO também facilita a ativação de plaquetas e uma disfunção endotelial que culmina na liberação de moléculas de adesão endotelial (Odièvre *et al.*, 2011).

A liberação de NO é um dos mecanismos atribuídos ao efeito benéfico da hidroxiuréia no tratamento da anemia falciforme, único fármaco aprovado pelo FDA (Food and Drug Administration) como um agente modificador da doença (Hankins e Aygun, 2009). Entretanto, é estimado que cerca de 25% dos pacientes não respondem a esse tratamento e, em muitos casos, o efeito benéfico do tratamento em longo prazo é reduzido, chegando até a se extinguir por completo. Nesses casos há a necessidade de aumento da dose para alcançar efeito, com consequente aumento dos efeitos tóxicos, como a mielossupressão (Aliyu, Tumblin e Kato, 2006).

Assim, devido a escassez de tratamentos para anemia falciforme, Dos Santos e colaboradores (2011) planejaram, sintetizaram e avaliaram novos compostos para este fim. Duas observações foram consideradas no planejamento dos novos compostos:

- a primeira de que a liberação de óxido nítrico leva a vasodilatação, estimula a produção de hemoglobina fetal e inibe a agregação plaquetária;

- a segunda de que a talidomida possui propriedades inibitórias de TNF- α , que está aumentado nos pacientes de anemia falciforme.

A partir dessas observações, foi realizada hibridação molecular entre uma porção liberadora de óxido nítrico (Figura 1 A), semelhante a bioconversão da hidroxauréia e a subunidade ftalimídica (Figura 1 B), presente na talidomida e responsável pela inibição de TNF- α , resultando em estruturas com potencial para propriedades tanto de doadores de óxido nítrico, quanto de inibidores de TNF- α (Dos Santos, Lanaro, *et al.*, 2011).

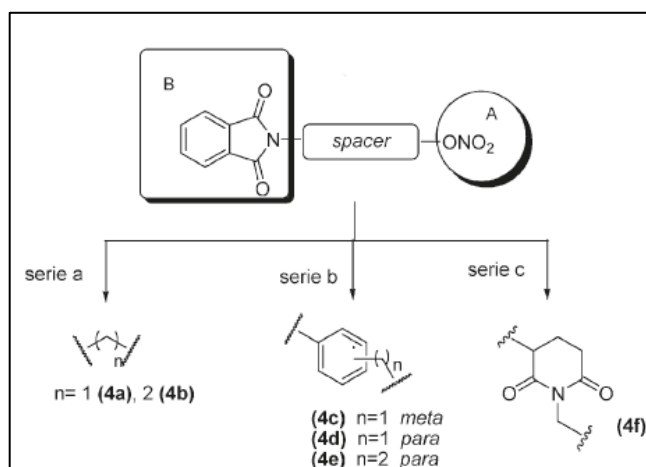


Figura 1. Planejamento estrutural usando a hibridação molecular. Retirado de Dos Santos e colaboradores (2011).

Foi avaliada, para esses compostos (4a-f), a capacidade de atuar como doadores de óxido nítrico pela reação de Griess. Todos os compostos mostraram-se capazes de liberar óxido nítrico em valores em torno de metade do valor apresentado pelo controle (dinitrato de isosorbida -DNS). Entretanto o DNS possui dois grupos (ONO₂) capazes de liberar óxido nítrico, contra apenas um grupo em cada molécula dos compostos 4a-f (Dos Santos, Lanaro, *et al.*, 2011).

Dos Santos e colaboradores (2011) também avaliaram a atividade anti-inflamatória por meio de dois ensaios nos quais os compostos 4a-f foram administrados pela via oral (p.o.) na dose de 300 μ mol/kg a camundongos Swiss: edema de orelha induzido por capsaicina e peritonite induzida por tioglicolato.

No ensaio de edema de orelha induzido por capsaicina todos compostos mostraram inibição entre 43 e 65% em relação ao grupo controle negativo, no qual foi administrado apenas veículo (Dos Santos, Lanaro, *et al.*, 2011).

Já no ensaio de peritonite induzida por tioglicolato, a administração dos compostos resultou em um número significativamente menor de leucócitos totais quando comparados ao grupo controle (Dos Santos, Lanaro, *et al.*, 2011).

A avaliação da atividade antinociceptiva foi realizada usando o teste de constrição abdominal induzida por ácido acético em camundongos. A dose de 100µmol/kg foi administrada p.o. tanto para os derivados ftalimídicos 4a-f, quanto para a dipirona, controle positivo. Todos os compostos foram eficazes, pois reduziram estatisticamente as constrições abdominais comparados ao controle. O composto 4d apresentou atividade superior à série avaliada e ao controle, com 66% de redução das constrições. Os compostos 4a, 4c, 4e e 4f mostraram atividade antinociceptiva semelhante a do controle positivo. E o composto 4b foi o que mostrou a menor redução nas constrições abdominais, com apenas 25% de redução (Dos Santos, Lanaro, *et al.*, 2011).

Ainda, Dos Santos e colaboradores (2011) realizaram um ensaio *in vitro* para avaliar a inibição de TNF α pelos derivados ftalimídicos 4c e 4d. Os dois derivados foram adicionados a culturas de monócitos em duas concentrações, 100 e 300 µmol/L e o controle positivo, dexametasona, foi adicionado na concentração de 1 µmol/L. O controle positivo inibiu 83% da produção de TNF α . O composto 4c inibiu 45 e 91% em 100 e 300µmol/L, respectivamente. Já o composto 4d inibiu 67 e 84% em 100 e 300µmol/L, respectivamente.

Em outra publicação, Dos Santos e colaboradores (2010) apresentam ensaios de mutagenicidade em cepas TA100 e TA102 de *Salmonella typhimurium*. Nesse ensaio os derivados ftalimídicos 4c e 4d mostraram-se menos mutagênicos que os demais.

Em ensaio de genotoxicidade todos os compostos e a hidróxiuréia foram avaliados com um teste de micronúcleo usando sangue periférico de rato. Todos mostraram-se menos genotóxicos (menos que 6 reticulócitos micronucleados) que a hidróxiuréia (33,7 reticulócitos micronucleados) (Dos Santos, Longhin Bosquesi, *et al.*, 2011).

Visto que a nova classe de compostos apresentou resultados favoráveis de atividade farmacológica é natural que avancem para a fase de avaliação de sua

farmacocinética e da sua relação com a farmacodinâmica, além de outros experimentos relevantes a continuidade de seu desenvolvimento.

A farmacocinética estuda a relação entre as concentrações plasmáticas do fármaco no corpo e o tempo (Tozer, 1981). A exposição do organismo ao fármaco é um determinante vital de sua ação, portanto, de sua eficácia e segurança. A exposição pode ser avaliada em função do tempo pela farmacocinética. Assim, há uma inter-relação entre fatores como eficácia, toxicidade e farmacocinética (Singh, 2006).

Para realização desses ensaios foi selecionado o composto 4c ou 3-(1,3-dioxo-1,3-diidro-2H-isoindol-2-il)benzil nitrato (Dos Santos, Lanaro, *et al.*, 2011). Esse derivado ftalimídico foi escolhido entre seus pares por apresentar mais informações e por ter se destacado, juntamente com o composto 4d ou 4-(1,3-dioxo-1,3-diidro-2H-isoindol-2-il)benzil nitrato, em alguns dos ensaios supracitados. O composto foi denominado LAPDESF-SCD03, pois foi sintetizado no Laboratório de Pesquisa e Desenvolvimento de Fármacos (LAPDESF) e difere de seus semelhantes pela substituição na posição 3 do espaçador arílico (Figura 2).

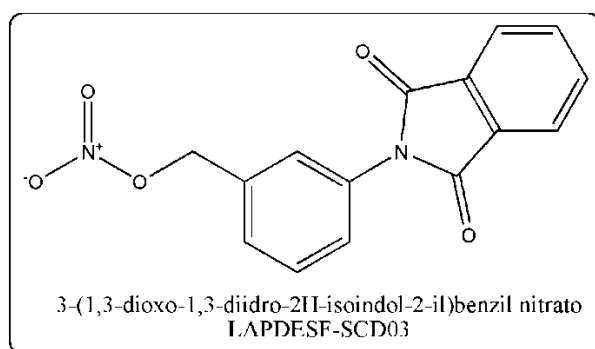


Figura 2. Derivado ftalimídico selecionado para os estudos de farmacocinética, farmacodinâmica e avaliação da segurança hepática e renal.

Os parâmetros farmacocinéticos são importantes para o cálculo de regimes posológicos em futuros estudos e para conhecer o movimento do fármaco no organismo. O ensaio de farmacodinâmica permitirá avaliar a ação do fármaco *in vivo* e sua relação com as concentrações plasmáticas observadas. Já o ensaio preliminar de segurança visa avaliar se os fármacos levam a alterações hepáticas ou renais que prejudiquem a continuidade de seu desenvolvimento, propriedades limitantes ao seu uso clínico futuro. E devido a uma estreita relação das propriedades físico-

químicas (solubilidade, log P, estabilidade) de um fármaco com sua disposição cinética, a investigação destas propriedades antes da avaliação do perfil farmacocinético em modelos animais pode ter valor preditivo do seu comportamento no organismo e auxiliar no planejamento do estudo *in vivo*.

Todos esses ensaios constituem informações pré-clínicas importantes no desenvolvimento do novo fármaco, que serão parte das justificativas na ocasião de um protocolo clínico de pesquisa (Brasil, 1997).

Esse trabalho está disposto em forma de capítulos que se iniciam pelos métodos analíticos de quantificação, passando por ensaios de solubilidade e log P, ensaios *in vitro*, ensaios *in vivo*, e finalizando com o estudo de identificação de metabólitos.

JUSTIFICATIVA

A escassez de tratamentos eficazes e seguros para a anemia falciforme e sua prevalência pelo mundo justificam a necessidade do desenvolvimento de alternativas terapêuticas para essa doença.

O planejamento e síntese de novos compostos são imprescindíveis para renovar as esperanças daqueles acometidos por essa doença, porém são inúteis se não houver continuidade nesses estudos.

O estudo apresentado nessa tese pretende dar continuidade a avaliação de um composto que se mostrou eficaz dentro do planejamento realizado, levando a diminuição de TNF- α e aumento de NO, duas substâncias que se encontram respectivamente, elevada e reduzida na anemia falciforme.

A realização dos estudos de farmacocinética pré-clínica, relação farmacocinética/farmacodinâmica, metabolismo e avaliação preliminar de segurança hepática e renal, traz informações relevantes para acelerar os estudos clínicos de fase I. Em curto prazo os resultados obtidos nessa tese permitirão o planejamento de estudos relacionados à segurança e eficácia do novo composto, que complementam as informações indispensáveis a sua aprovação para ensaios clínicos.

OBJETIVO GERAL

Avaliação pré-clínica da nova molécula 3-(1,3-dioxo-1,3-diidro-2H-isoindol-2-il)benzil nitrato (LAPDESF-SCD03), que apresentou potencial para o tratamento da anemia falciforme.

Capítulo 1 – Métodos Analíticos de Quantificação

Durante o desenvolvimento de novos fármacos, o uso de métodos de análise é imprescindível, e entre esses métodos, a cromatografia se destaca desde a síntese, seja pelo uso da cromatografia em camada delgada para o monitoramento da reação (Bala *et al.*, 2014) ou da cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE, ou HPLC de *High Performance Liquid Chromatography*) para análise de pureza (Weber *et al.*, 2014).

Na continuidade do desenvolvimento, a necessidade de análises quantitativas do fármaco em diferentes situações experimentais torna-se inevitável, levando a emersão dos métodos analíticos e bioanalíticos de quantificação, onde o HPLC permanece como método de primeira escolha (Nováková e Vlcková, 2009). Os métodos analíticos englobam as técnicas que permitem analisar quantitativamente um analito em diferentes tipos de amostra, enquanto os métodos bioanalíticos referem-se aos métodos de análise de fármacos e seus metabólitos, especificamente, em matrizes biológicas, como plasma, urina e tecidos (Snyder *et al.*, 2010).

A análise por HPLC não é uma análise instantânea, mas teve seu tempo total consideravelmente reduzido para ordem de apenas alguns minutos com uso de colunas empacotadas com partículas menores que 2 μm em sistemas de pressão mais elevada que sua pressão usual. Com essa evolução dos sistemas, denominada cromatografia líquida de ultra eficiência (CLUE, UHPLC de *Ultra-high Performance Liquid Chromatography*), não apenas um tempo menor de corrida analítica foi alcançado, mas também houve um incremento na eficiência do sistema, já que o volume total foi reduzido, reduzindo a dispersão. Além de uma redução no volume de amostra necessário para análise, mantido a 1% do volume da coluna, cujas dimensões são menores que aquelas utilizadas em sistema HPLC. O UHPLC, portanto, é uma técnica analítica mais rápida, com alta resolução e melhor sensibilidade, mesmo na detecção por ultravioleta (Nováková e Vlcková, 2009).

Para garantir a qualidade — ou o conjunto de características que sentenciam um produto a ser aceito ou rejeitado — dos resultados obtidos a partir do uso de um

método analítico ou bioanalítico é necessário submetê-lo ao procedimento de validação, que o tornará legítimo, por estabelecer seu alcance e limitações. Essa legitimidade, por sua vez, será transferida para a aplicação dos resultados obtidos com o método validado (Chasin *et al.*, 1998). Ou seja, o parecer elaborado ou aplicação realizada a partir da quantificação resultante do método validado serão tão precisos e exatos quanto o método em si, herdando também as consequências de suas limitações.

A validação de um método contempla um conjunto de parâmetros e critérios de aceitação, ambos determinados pela aplicação pretendida do método (Chasin *et al.*, 1998). Na determinação da maneira que a validação será conduzida podem ser utilizados, além da literatura acadêmica entre livros e artigos científicos, os vários guias disponibilizados e constantemente atualizados por diferentes agências como a *Food and Drug Administration (FDA)*, *International Conference on Harmonisation (ICH)*, *European Medicines Agency (EMA)*, *Ministry of Health, Labour and Welfare (MHLW)*, e Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA).

Segundo levantamento de Ruiz-Angel e seus colaboradores (2014), o número de artigos contendo os assuntos “method validation” e “liquid chromatography” no banco de dados Scopus® era menor que 250 no ano de 2001 e passou de 1500 por ano nos anos de 2012 e 2013.

As principais características de eficiência de métodos analíticos incluem a exatidão, a precisão (repetibilidade, precisão intermediária, reprodutibilidade), a especificidade, o limite de detecção, o limite de quantificação, a linearidade e robustez (Snyder *et al.*, 2010). Considerando a finalidade da validação do método analítico, segundo o guia da ANVISA (2003), o agrupamento dos parâmetros de validação resulta em 4 categorias, cuja mais próxima da finalidade pretendida na fase pré-clínica de desenvolvimento de um fármaco é a categoria III, excluindo apenas a robustez.

Já o método bioanalítico, em consequência da matriz biológica, consiste dos ensaios de seletividade (algumas vezes absoluta o suficiente para ser considerada especificidade), exatidão e precisão intracorridas, exatidão e precisão intercorridas recuperação, linearidade (curva de calibração), limite de quantificação, estabilidade, e efeito matriz, este último sendo especificamente relacionado a detecção por

espectrometria de massas (Anvisa, 2012; González *et al.*, 2014). Desconsiderando o efeito matriz, que está relacionado à espectrometria de massas, os dois parâmetros que emergem da existência da matriz biológica são a recuperação e a estabilidade.

A recuperação, cuja ausência no mais recente guia da ANVISA (2012) deve ser ressaltada, é um parâmetro de avaliação da eficiência do procedimento de extração já que o analito está contido em uma matriz biológica, contudo ainda figura no mais recente esboço do guia de validação de métodos bioanalíticos do FDA (2013). Apesar de não haver um critério de aceitação para a recuperação, esse parâmetro é uma importante informação do potencial de eficiência do procedimento de extração ou preparo da amostra. Diversas abordagens podem ser utilizadas para alcançar o máximo de recuperação com o mínimo de interferentes (maior seletividade) e essas abordagens constituem os principais procedimentos de preparo de amostras, como extrações líquido-líquido, precipitação de proteínas, e extração em fase sólida (Nováková e Vlcková, 2009).

A avaliação da estabilidade tem por objetivo evitar que o método subestime os valores da amostra devido a perdas de analito durante o armazenamento, pré ou pós-processamento, além de evitar superestimação dos valores da amostra por perda do analito em soluções estoque, que são usadas para a construção da curva de calibração. As avaliações de estabilidade de armazenamento devem cobrir as necessidades de condições de armazenamento que serão utilizadas na aplicação do método bioanalítico, ou limitar essas condições a partir dos resultados de estabilidade observados (Snyder *et al.*, 2010; González *et al.*, 2014).

No que tange os parâmetros de validação, enquanto a precisão e a linearidade são os mais reportados, presentes em quase 100 % dos estudos avaliados por Ruiz-Angel e colaboradores (2014), seguidos pela exatidão com pouco mais de 80 % de frequência, a estabilidade é insuficientemente avaliada, mesmo sendo um dos parâmetros mais importantes no planejamento de um estudo que necessite de um método validado.

Na descoberta e desenvolvimento de novos fármacos, o aumento da ênfase no entendimento das características farmacocinéticas dos candidatos a fármaco de forma mais prematura trouxe consigo a necessidade antecipada de desenvolvimento

de métodos bioanalíticos para esses candidatos a fármacos (Timmerman, De Vries e Ingelse, 2001).

A validação, por sua vez, não deve ser considerada como um passo meramente burocrático, regulatório, ou desnecessário no caminho das análises alvejadas, mas sim como uma maneira de garantir a confiabilidade das análises preservando a qualidade dos dados por todo o mundo (Ruiz-Angel *et al.*, 2014).

Neste capítulo serão abordados os procedimentos de validação dos métodos analítico e bioanalítico por UHPLC utilizados nesse trabalho. Isso garante o mais alto grau de confiabilidade nos valores de quantificação obtidos nos experimentos em que esses métodos foram aplicados.

1-1. Material e métodos

1-1.1 Reagentes, fármacos e solventes

O LAPDESF-SCD03 e seu intermediário de reação foram obtidos no laboratório de pesquisa e desenvolvimento de novos fármacos (LAPDESF) da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP de Araraquara. A água ultrapura foi obtida por sistema Milli-Q (Millipore®). Outros reagentes, fármacos e solventes, incluíram:

- Metanol, J. T. Backer;
- Acetonitrila, J. T. Backer;
- Ácido Metanóico, Scharlau;
- Diazepam, Sigma-Aldrich;

1-1.2 Equipamentos

- UPLC Acquity®, Waters;
- Banho ultrassônico, Ultrasonic Cleaner 2840DA, odontobrás;
- Vórtex AP56, Phoenix;
- Centrífuga Sorval Biofuge, Thermo scientific;

1-1.3 Correlatos

- Coluna BEH 2,1x50mm, 1,7µm, Waters®;
- Pré-coluna BEH 2,1x5mm, 1,7µm, Waters®;
- Filtro de seringa de PTFE, poro de 0,22µm, Flowsupply;

1-1.4 Softwares

- Empower 3, Waters®;
- Prism 5, GraphPad®;

1-1.5 Método analítico para determinação de LAPDESF-SCD03

O método analítico foi desenvolvido com o objetivo de determinar as concentrações do analito em solução aquosa e aquosa tamponada, além de sua aplicação no controle de qualidade das pré-formulações utilizadas na administração intravenosa.

1-1.5.1 Sistema cromatográfico

O sistema cromatográfico consistiu de um UPLC Acquity® com detector UV-Visível configurado para 254 nm. A separação foi realizada por uma coluna BEH 2,1x50mm, 1,7µm com pré-coluna BEH 2,1x5mm, 1,7µm. A fase móvel foi Acetonitrila:Ácido fórmico 0,1% (38:62) e vazão de 0,5 mL/min. As amostras foram mantidas a 10 °C até a injeção, enquanto a coluna foi mantida a 50 °C. O volume de injeção foi de 5 µL.

1-1.5.2 Validação

O método foi validado com base nas normas do Guia para Validação de Métodos Analíticos e Bioanalíticos da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) resolução 899/2003 (2003).

Seletividade

A seletividade é a capacidade do método de analisar a substância de interesse na presença de componentes previsivelmente passíveis de serem encontrados na amostra.

Linearidade e limite inferior de quantificação

A curva analítica foi construída para o LAPDESF-SCD03 plotando-se a área do pico de LAPDESF-SCD03 contra a concentração nominal do composto. O critério de aceitação da linearidade é um coeficiente de correlação igual ou superior a 0,99. O limite inferior de quantificação é expresso como a menor concentração do analito que pode ser quantificada com exatidão e precisão aceitáveis, desde que com relação sinal-ruído superior a 10:1.

Precisão e Exatidão

A precisão e a exatidão do método foram avaliadas intra-corridas e inter-corridas. Os resultados intra-corridas foram determinados por 3 replicatas dos controles de qualidade alto (CQA), médio (CQM), baixo (CQB) em um mesmo dia, já para os resultados de precisão e exatidão inter-corridas as determinações foram feitas em dois dias consecutivos. O critério de aceitação da precisão é um coeficiente de variação de até 5%, já para a exatidão, valores próximos de 100% são desejáveis.

1-1.6 Método bioanalítico para determinação de LAPDESF-SCD03

1-1.6.1 Sistema cromatográfico

O sistema cromatográfico consistiu de um UPLC Acquity® com detector UV-Visível configurado para 226 nm. A separação foi feita por uma coluna BEH 2,1x50mm, 1,7µm com pré-coluna BEH 2,1x5mm, 1,7µm. A fase móvel foi Acetonitrila:Ácido fórmico 0,1% (38:62) e vazão de 0,5 mL/min. As amostras foram mantidas a 10°C até a injeção, enquanto a coluna foi mantida a 50°C. O volume de injeção foi de 5 µL.

1-1.6.2 Preparo da amostra

Cada amostra de plasma humano ou de rato (0,1 - 0,05 mL) adicionada ou não de LAPDESF-SCD03 passou por um procedimento de precipitação de proteínas com mesmo volume de uma solução de diazepam (padrão interno) em acetonitrila na concentração de 550ng/mL. Após a adição desta solução, a mistura foi submetida

a 10 segundos de agitação em vórtex e 15 minutos de centrifugação a 13 000 x g a temperatura de 8°C. Logo após a centrifugação, o sobrenadante foi retirado e filtrado por filtro de seringa de PTFE de 0,22µm, em seguida 5 µL desse filtrado foi injetado no sistema cromatográfico.

1-1.6.3 Validação

A validação é a avaliação sistemática dos procedimentos utilizados no método bioanalítico desenvolvido com a finalidade de estabelecer os seus limites de confiança. Esta avaliação foi fundamentada nas normas da ANVISA de acordo com as resoluções 899/2003 (Anvisa, 2003) e 27/2012 (Anvisa, 2012), e da Food and Drug Administration (FDA) de acordo com o Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation, de maio de 2001 (Fda, 2001). Os parâmetros determinados foram: seletividade, linearidade, limite inferior de quantificação, precisão e exatidão, recuperação e estabilidades de armazenamento.

Seletividade

A seletividade é a capacidade do método de analisar a substância de interesse na presença dos componentes endógenos comuns a matriz biológica de interesse. Assim, não deve haver picos interferentes no tempo de retenção do fármaco ou do padrão interno.

Linearidade e Limite inferior de quantificação (LIQ)

A curva analítica foi construída para o LAPDESF-SCD03 plotando-se a razão da área do pico do composto e do padrão interno (área do composto/área do PI) contra a concentração nominal do composto. Os critérios de aceitação da linearidade incluem um coeficiente de correlação acima de 0,98 e exatidão de 85% a 115%, exceto para o limite inferior de quantificação (LIQ), para o qual a exatidão deve estar entre 80% e 120%. O limite inferior de quantificação é expresso como a menor concentração do analito que pode ser quantificada com exatidão de 80-120% e precisão de 0-20%, com no mínimo 5 replicatas.

Efeito residual

O ensaio de efeito residual tem por objetivo avaliar se há ocorrência de contaminações de uma injeção de amostra para outra. Consiste de analisar uma amostra branco seguida de uma amostra do maior ponto da linearidade e

novamente se analisa a amostra branco mais duas vezes. Deve ser observado se há picos interferentes no tempo de retenção do analito, que sejam superiores a 20% da resposta do analito, e do padrão interno, que sejam 5% superiores a resposta do padrão interno.

Precisão e Exatidão

A precisão e a exatidão do método foram avaliadas intra-corridas e inter-corridas. Os resultados intra-corridas foram determinados por 5 análises dos controles de qualidade diluído (CQD) alto (CQA), médio (CQM) e baixo (CQB) em um mesmo dia, já para os resultados de precisão e exatidão inter-corridas as determinações foram feitas em dois dias não consecutivos. Os critérios de aceitação foram precisão de 0-15% e exatidão de 85-115%.

Recuperação

A recuperação reflete a eficiência do procedimento de extração do analito, a partir do meio complexo que é a matriz biológica. Consiste da avaliação do analito no extrato final do procedimento de preparo, extraído e não extraído. As soluções não extraídas foram feitas por adição ao extrato final do processamento da amostra de concentrações conhecidas do composto. A recuperação foi calculada pelo percentual da área da amostra extraída de CQA e CQB em relação à amostra não extraída das mesmas concentrações.

Estabilidade de armazenamento

A estabilidade foi avaliada em função da necessidade de armazenamento das amostras após cada coleta ou após o processamento. Até a análise das amostras, estas não deverão ser mantidas armazenadas por tempo superior ao determinado nos ensaios de estabilidade.

Os ensaios de estabilidade realizados foram estabilidade pós-processamento (10°C) por 14 horas, curta duração (temperatura ambiente) por 15 minutos, longa duração (-20°C) por 35 dias e três ciclos de congelamento (-20°C) e descongelamento a cada 24 horas com análise após o terceiro descongelamento, em 72 horas.

O ensaio foi realizado nas concentrações do CQB e CQA em triplicata. Os compostos são considerados estáveis quando não se observa desvio maior que 15% do valor obtido nas amostras recém-preparadas.

Estabilidade das soluções matriz

As soluções preparadas pela dissolução de uma massa conhecida de LAPDES-F-SCD03 ou do padrão interno em solvente orgânico, como a acetonitrila, tiveram sua estabilidade constantemente avaliada por meio do método cromatográfico previamente descrito. Isso foi necessário para se determinar se havia a necessidade de preparo de nova solução em cada ocasião em que estas soluções foram necessárias no decorrer do estudo.

1-2. Resultados e discussão

1-2.1 Validação do Método Analítico

O método analítico foi validado para sua aplicação na quantificação de LAPDES-F-SCD03 em amostras não biológicas, como aquelas de estudos de solubilidade e estabilidade *in vitro*.

1-2.1.1 Seletividade

A seletividade foi avaliada em relação ao 2-(3-(hidroximetil)fenil)isoindoline-1,3-dione, que é o intermediário de reação (IR) imediatamente anterior na sequencia reacional que leva ao LAPDES-F-SCD03. A Figura 3 mostra o LAPDES-F-SCD03 (750 ng/mL) e o IR (250 ng/mL), em tempos de retenção diferente.

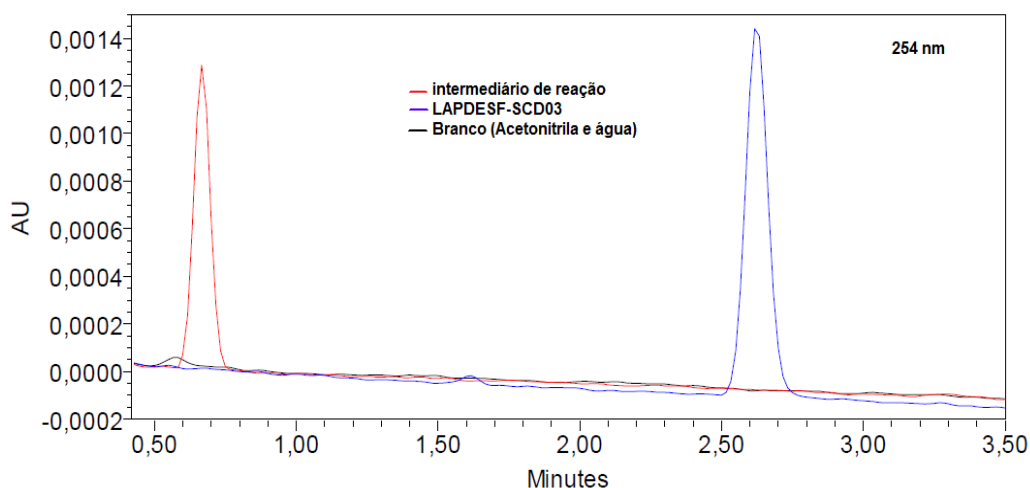


Figura 3. Cromatograma da seletividade do método analítico. Intermediário de reação (250 ng/mL) e LAPDES-F-SCD03 (750 ng/mL).

1-2.1.2 Linearidade

A linearidade foi avaliada pela construção de uma curva analítica por regressão linear nas concentrações de 50, 100, 250, 500, 750, 1500 e 3000 ng/mL em triplicata das concentrações (Figura 4), que foram preparadas a partir de uma solução matriz em acetonitrila. A equação da reta foi $y=11,24x + 39,00$, o coeficiente de correlação (r) foi de 0,9997 e o p -valor foi de $4,06 \times 10^{-9}$. A exatidão (concentração experimental / concentração nominal $\times 100$) dos pontos da curva foi de 87,3-104 %. O limite de quantificação foi de 50 ng/mL, sendo a menor concentração que apresentou precisão (CV %= 3,39) e exatidão (87,35%) aceitáveis com uma área do pico de interesse dez vezes maior que o ruído da amostra branco.

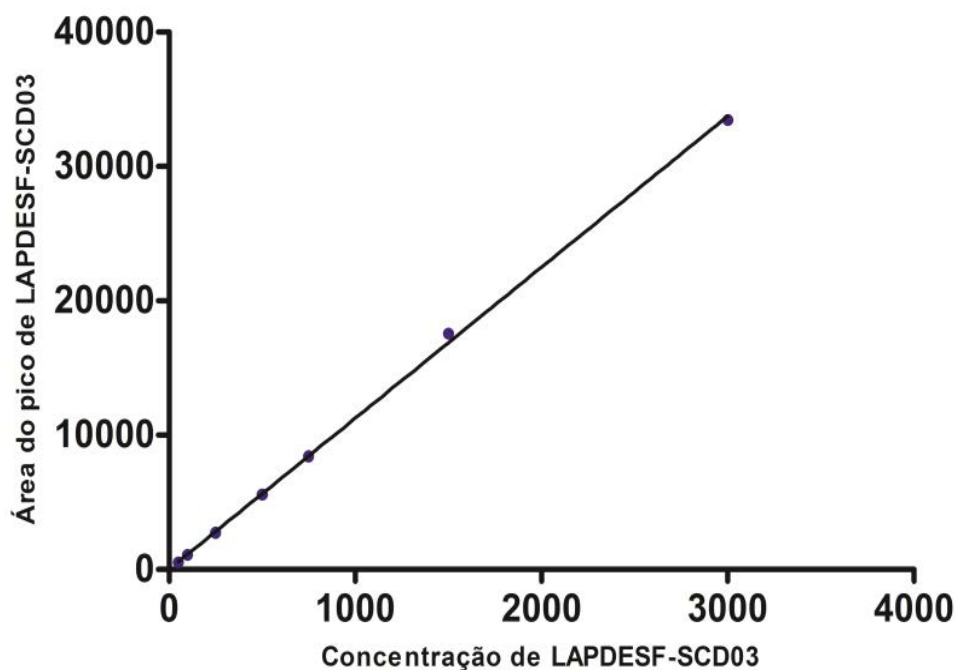


Figura 4. Curva de linearidade do LAPDESF-SCD03.

1-2.1.3 Precisão e Exatidão

Foi avaliada a precisão e a exatidão de três concentrações (CQB=100 ng/mL; CQM=750 ng/mL; e CQA=3000) em triplicatas, no mesmo dia e em dois dias não consecutivos, os resultados estão apresentados na Tabela 1.

Tabela 1. Precisão e exatidão do método analítico

		Concentração nominal (ng/mL)		
		100	750	3000
Replicatas intra-dia	Conc. Experimental (ng/mL)	87,1	708,7	2844,2
	Precisão (CV %)	2,8	0,9	0,8
	Exatidão (%)	87,1	94,5	94,8
	n	3	3	3
Replicatas inter-dia	Conc. Experimental (ng/mL)	86,6	727,6	2908,6
	Precisão (CV %)	1,5	1,3	1,5
	Exatidão (%)	86,6	97,0	97,0
	n	6	6	6

CV %= coeficiente de variação [(desvio padrão/média) x 100]

Exatidão % = [concentração experimental / concentração nominal) x 100]

Esses valores foram considerados adequados para a aplicação pretendida do método analítico.

1-2.2 Validação do Método bioanalítico

O método bioanalítico foi validado com a finalidade de quantificar o LAPDESF-SCD03 em plasma.

1-2.2.1 Seletividade

A seletividade foi avaliada quanto à existência de picos interferentes no tempo de retenção do LAPDESF-SCD03, principalmente os de origem biológica, já que não serão administrados outros fármacos concomitantemente a administração de LAPDESF-SCD03. Na Figura 5 podem ser vistos o pico de LAPDESF-SCD03 em 2,6 minutos, o padrão interno (zero) em 1,9 minutos e nenhum pico interferente (branco) nesses dois tempos de retenção.

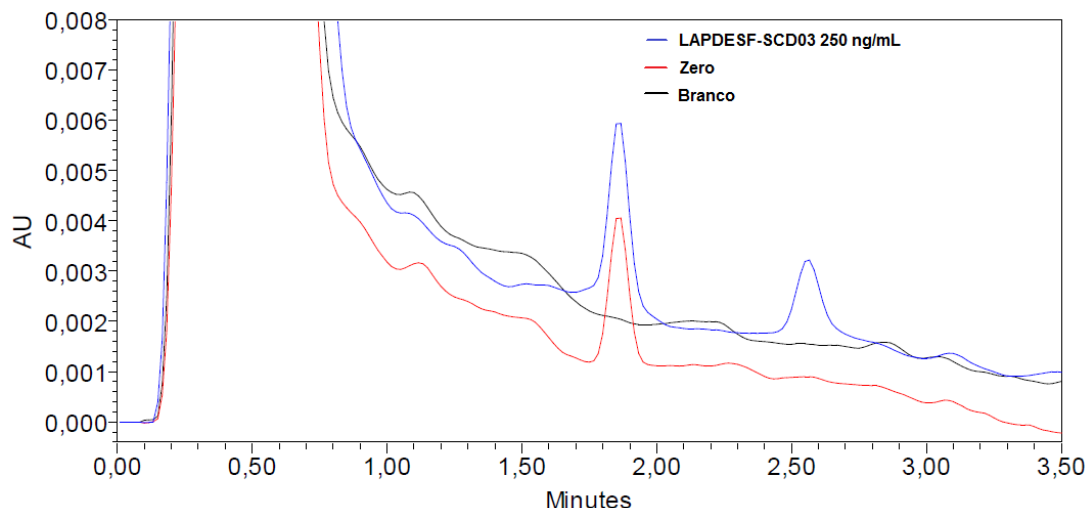


Figura 5. Cromatograma em 226 nm demonstrando a seletividade do método. LAPDESF-SCD03 (250ng/mL) em 2,6 minutos e padrão interno em 1,9 minutos na amostra LAPDESF-SCD03 e na amostra zero.

1-2.2.2 Linearidade

A partir da construção de uma curva de linearidade com a razão da área do pico de LAPDESF-SCD03 pela área do pico do padrão interno no eixo y e valores nominais de concentração previamente estabelecidos e preparados, foi calculada a equação de linearidade que permite calcular a concentração de valores desconhecidos do analito pela interpolação das razões de área e padrão interno nesse gráfico. A Figura 6 apresenta a curva construída com as concentrações: 100, 250, 500, 750, 1000, 2500, 4000 e 5000 ng/mL.

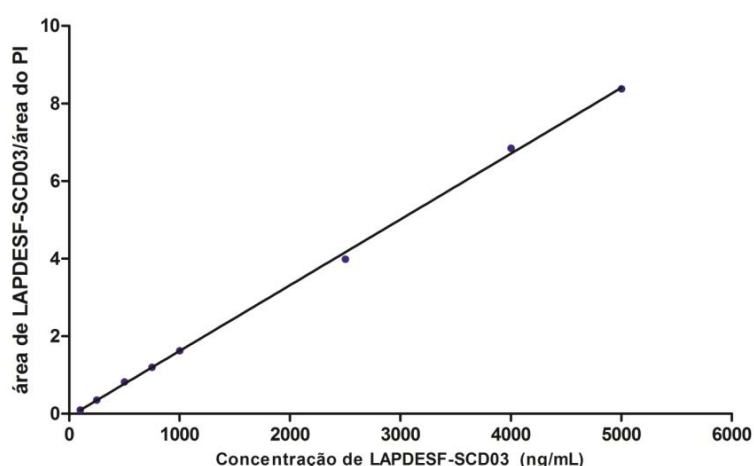


Figura 6. Curva de linearidade do LAPDESF-SCD03 em plasma.

A equação da reta foi $y=0,0017x-0,0756$, o r foi de 0,9996 e p -valor foi de $1,47 \times 10^{-10}$. A exatidão da curva de linearidade ficou entre 95,76 e 104,11. O LIQ foi de 100 ng/mL, pois foi a menor concentração que apresentou precisão (CV %=7,04) e exatidão (104,11%) dentro dos critérios de aceitação. O ensaio de efeito residual não apresentou picos no tempo de retenção do analito, que fossem superiores a 20% do LIQ, ou do padrão interno, que superassem 5% da resposta da concentração utilizada.

1-2.2.3 Precisão e Exatidão

A precisão e a exatidão do método foram avaliadas por meio dos controles de qualidade CQB (250 ng/mL), CQM (1000 ng/mL), CQA (4000 ng/mL) e CQD (15000 ng/mL) de acordo com a Tabela 2.

Tabela 2. Precisão e exatidão do método bioanalítico.

		Concentração nominal (ng/mL)			
		250	1000	4000	15000
intra-dia	Conc. Experimental (ng/mL)	254,5	886,9	3609,8	13430,2
	Precisão (%)	7,5	6,6	4,6	5,6
	Exatidão (%)	101,8	88,7	90,2	89,5
	n	5	5	5	5
inter-dia	Conc. Experimental (ng/mL)	243,1	958,6	3859,6	13086,6
	Precisão (%)	11,9	7,8	7,7	6,6
	Exatidão (%)	97,2	95,9	96,5	87,2
	n	15	15	15	15

CV %= coeficiente de variação [(desvio padrão/média) x 100]

Exatidão % = [concentração experimental / concentração nominal) x 100]

Os resultados da Tabela 2 encontram-se todos dentro dos limites de precisão (CV<15%) e exatidão (85-115%) propostos pelos guias de validação de métodos bioanalíticos. Isso permite o uso confiável do método validado para os estudos de quantificação do analito em amostras de plasma.

1-2.2.4 Recuperação

Os resultados de recuperação para o LAPDESF-SCD03 podem ser vistos na Tabela 3. A recuperação não possui critérios de aceitação, no entanto, recuperações

próximas de 100% são desejáveis. Assim, de acordo com esses resultados o método pode ser considerado de alta recuperação.

Tabela 3. Recuperação do LAPDESF-SCD03.

	250 ng/mL	4000 ng/mL
Recuperação (%)	105,1	94,2
CV (%)	10,9/4,8	3,7/1,5

CV %= CV de três replicatas extraído / CV de três replicatas não extraídas.

1-2.2.5 Estabilidade de armazenamento

O ensaio de estabilidade de armazenamento em plasma contido na validação do método bioanalítico, tem a função de determinar em que condições as amostras que serão quantificadas podem ser estocadas. Portanto, após a coleta de uma amostra ela deve ser armazenada em uma condição que tenha sido avaliada neste ensaio. A Tabela 4 apresenta os resultados dos ensaios de estabilidade de LAPDESF-SCD03 em plasma, já realizados. Ainda, mostra ensaio que devem ser realizados, e cuja condição de armazenamento será evitada até que o seja.

Tabela 4. Estabilidade de LAPDESF-SCD03.

	-20 8h	PP 14h 10°C	CD	CCD -20°C	LD -20°C
250 ng/mL					
N	3	5	3	3	3
CV (%)	5,2	8,9	0,6	FC	8,0
Exatidão (%)	108,5	93,2	86,8		95,4
4000 ng/mL					
N	3	5	3	3	3
CV (%)	6,9	9,1	4,1	FC	5,1
Exatidão (%)	97,1	93,6	87,9		109,6

CV %= Coeficiente de variação. -20 8h: amostras congeladas a -20°C por 8 horas; PP 14h 10°C: amostras reinjetadas após 14 horas de armazenamento a 10°C; CD: estabilidade de curta duração, 15 minutos na bancada; CCD -20°C: estabilidade após ciclos de congelamento e descongelamento a -20°C; LD -20°C: estabilidade de longa duração a -20°C por 35 dias; FC: faliu no critério.

Um analito é considerado estável quando não se observa desvio maior que 15% do valor obtido nas amostras recém-preparadas. Assim, o LAPDESF-SCD03 foi estável nas condições avaliadas.

1-3. Conclusão e Perspectivas

Os métodos analítico e bioanalítico foram completamente validados e seus limites de confiança determinados. Em caso de necessidade futura, o método bioanalítico pode alcançar maior sensibilidade utilizando-se procedimentos de preparo de amostra que permitam a concentração da amostra, como extrações do tipo líquido-líquido ou extrações em fase sólida, com secagem e reconstituição do extrato em volume menor que o volume de plasma utilizado na extração. Essas opções, principalmente a extração em fase sólida, têm ainda o potencial para aumentar a seletividade. Por fim, podem ser utilizados os sistemas de cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas propiciando a melhora de sensibilidade e a especificidade inerentes a essa técnica.

Capítulo 2 – Solubilidade e log P

A solubilidade em água é uma importante característica física e química de cada substância, assim como seu coeficiente de partição. Independente da via ou forma farmacêutica utilizada na administração de um fármaco, alguma solubilidade será necessária, seja para absorção ou para ação farmacológica. Substâncias com solubilidade menor que 10 mg/mL podem ser errática, incompleta ou lentamente absorvidas (Allen, Popovich e Ansel, 2005).

A medida de solubilidade dos novos fármacos na fase de descoberta aumentou expressivamente nos anos 90 devido a seu papel nos processos de absorção, distribuição, metabolismo, excreção, e toxicidade (ADMET). Em seguida, foi reconhecido o impacto da solubilidade em vários experimentos chaves da fase de descoberta de fármacos (Kerns, Di e Carter, 2008), além de um aumento na parcela de compostos pouco solúveis entrando na fase de desenvolvimento clínico (Curatolo, 1998; Avdeef, Berger e Brownell, 2000; Lipinski, 2000; Van De Waterbeemd *et al.*, 2001; Di, Kerns e Carter, 2009).

A falta de solubilidade suficiente pode afetar os resultados dos ensaios realizados nas fases iniciais de desenvolvimento e a capacidade para conseguir exposições relevantes para eficácia e toxicidade em animais. Ainda, esse aspecto afetará o desenvolvimento farmacotécnico, aumentando os esforços necessários para obtenção de formulações do fármaco (Chen *et al.*, 2006). A maior preocupação na ocasião da falta de solubilidade é o risco de absorção reduzida e variável após a administração oral (Williams *et al.*, 2013).

Deve sempre ser considerado que não há um único valor de solubilidade, pois é determinada pelas energias das interações das moléculas do soluto entre si, das moléculas do solvente entre si, e do soluto com o solvente. Assim, condições como pH, solvente, co-solvente, aditivos, tempo do experimento e temperatura podem afetar essas interações e, portanto, a solubilidade (Kerns, Di e Carter, 2008).

No decorrer do processo de desenvolvimento de fármacos, a solubilidade pode ser avaliada mais de uma vez. Há dois tipos de medições de solubilidade: a cinética e a termodinâmica (Locatelli *et al.*, 2012). Em todo caso, ambos os tipos de

medições necessitam de um método de determinação da concentração do analito como HPLC (Saal e Petereit, 2012).

A solubilidade cinética consiste de submeter o fármaco já dissolvido até o ponto em que o solvente o expulse da solução. Essa medição é feita com o soluto já molecularmente disperso em um solvente como o dimetil-sulfóxido, sendo em seguida adicionada gradualmente a água (ou meio em que se quer determinar a solubilidade) até que ocorra precipitação, ou seja o ponto em que o solvente não mais pode solvatar o soluto (Bhattachar, Deschenes e Wesley, 2006; Locatelli *et al.*, 2012; Saal e Petereit, 2012).

A solubilidade termodinâmica consiste basicamente da capacidade do composto de ser molécula a molécula dispersado no solvente a partir da forma sólida. Isso é alcançado pela adição do sólido ao solvente de escolha, água para obter a solubilidade em água, até atingir a saturação, agitação por tempo suficiente para o sistema alcançar o equilíbrio (24-72 horas) e quantificação da concentração livre do excesso não dissolvido (Bhattachar, Deschenes e Wesley, 2006; Locatelli *et al.*, 2012; Saal e Petereit, 2012).

A solubilidade é afetada por vários mecanismos, como a lipofilicidade, ligações de hidrogênio com o solvente, ligações de hidrogênio intramoleculares, e ionização. Devido a essa natureza multi-mecanística da solubilidade aquosa, a sua obtenção com base na estrutura química em modelos de predição é muito difícil. Valores de solubilidade aquosa, geralmente funcionam em um intervalo estreito apenas para compostos neutros e dentro de uma gama de compostos estruturalmente semelhantes (Lipinski, 2000).

Na Tabela 5 está apresentada a classificação de solubilidade de acordo com a farmacopeia brasileira e a conversão para valores de concentração.

Tabela 5. Classificação de solubilidade.

Solvente	Termo descritivo	Concentração
Muito solúvel	menos de 1 parte	>1.000 mg/mL
Facilmente solúvel	De 1 a 10 partes	100-1.000 mg/mL
Solúvel	De 10 a 30 partes	33-100 mg/mL
Ligeiramente solúvel	De 30 a 100 partes	10-33 mg/mL
Pouco solúvel	De 100 a 1000 partes	1-10 mg/mL
Muito pouco solúvel	De 1000 a 10000 partes	0,1-1 mg/mL
Praticamente insolúvel	Mais de 10000 partes	<0,1 mg/mL

Adaptado da Farmacopeia brasileira (Anvisa, 2010)

Outra propriedade físico-química importante dos novos fármacos é lipofilicidade, a qual é expressa pelo coeficiente de partição ($\log P$), uma medida da distribuição do fármaco em um sistema lipofílico-hidrofílico (Van De Waterbeemd e Gifford, 2003; Allen, Popovich e Ansel, 2005; Locatelli *et al.*, 2012).

Alguns trabalhos um pouco mais antigos desenvolveram vários cálculos de correlação entre a solubilidade em água e o $\log P$, junto com suas limitações e, às vezes usando outros parâmetros para melhorar essa correlação (Mackay *et al.*, 1980; Miller *et al.*, 1985; Isnard e Lambert, 1989). Apesar disso, essas duas propriedades são muito distintas em suas aplicações no desenvolvimento de fármacos. Não se deve, portanto, confundir um $\log P$ baixo com alta solubilidade em água ou vice-versa. Uma substância pode ter um $\log P$ em torno de 1, por exemplo, sendo altamente solúvel em água, basta que entre água e 1-octanol, ela tenha 10 vezes mais afinidade pelo octanol.

Contudo, em uma série de derivados estruturalmente relacionados, pode se supor uma redução da solubilidade em água com o aumento da lipofilicidade (Curatolo, 1998). Esse aumento tende a aumentar a absorção oral, ligação a proteínas plasmáticas e volume de distribuição, contudo aumenta a vulnerabilidade ao clearance metabólico. Apesar do esperado aumento na absorção, esse aumento de lipofilicidade alcança um ponto em que a absorção será limitada pela baixa solubilidade em água. Quanto à eliminação, a excreção urinária diminui drasticamente com o aumento da lipofilicidade devido a um aumento na importância do clearance metabólico (Van De Waterbeemd, Smith e Jones, 2001).

Os dois principais métodos de determinação do coeficiente de partição são o shake-flask (Organisation for Economic Co-Operation and Development., 1995b) e o método cromatográfico (HPLC) em fase reversa (Organisation for Economic Co-Operation and Development., 2004). A determinação do $\log P$ pode ser feita satisfatoriamente por ambos (shake-flask e HPLC) que diferem apenas em termos de metodologia e, em geral, os valores de $\log P$ obtidos para um composto através da aplicação destes métodos não apresentam diferenças relevantes (Locatelli *et al.*, 2012).

O desenvolvimento do ensaio de $\log P$ foi embasado na observação da necessidade dos fármacos de se difundirem por meios lipofílicos como as

membranas e meios aquosos como o meio intracelular e o meio extracelular até alcançarem seu local de ação. Assim foi proposto por Hansch, como uma medida de lipofilicidade, o coeficiente de partição P, entre 1-octanol e água (Hansch, Maloney e Fujita, 1962; Fujita, Hansch e Iwasa, 1964).

Além do log P, a lipofilicidade pode ser expressa pelo coeficiente de distribuição (log D), no qual a água é substituída por tampão 7,4 ou 6,5 no método experimental. Enquanto o cálculo de log P por meio de softwares tem aumentado devido a sua rapidez e certa segurança no resultado, os programas capazes de calcular o log D ainda são escassos (Van De Waterbeemd e Gifford, 2003).

Com a boa correlação nos valores de log P calculados por softwares, e outros descritores (propriedades estruturais ou físico-químicas de uma molécula ou de parte de uma molécula) foi estabelecida a regra dos 5, na qual conclui-se que os fármacos tem maior probabilidade de terem uma absorção limitada quando a massa molar é maior que 500 Da, o log P é maior que 5, o número de doadores de ligação de hidrogênio é maior que 5, e o número de aceptores de ligação de hidrogênio é maior que 10 (átomos de nitrogênio e oxigênio). Essa regra deve ser vista como um indicador qualitativo de absorção ou permeabilidade e não quantitativo (Lipinski *et al.*, 1997; Van De Waterbeemd *et al.*, 2001; Van De Waterbeemd e Gifford, 2003).

Assim, um composto deve ser solúvel e ainda ter uma certa lipofilicidade para facilitar sua passagem de ambientes aquosos, como o trato gastrintestinal, o sangue, e o fluido extracelular, para tecidos e células. Essa propriedade está envolvida em muitos eventos ligados à farmacocinética, como quando se observa uma diminuição da estabilidade metabólica em frações de células hepáticas conforme há um aumento do log P (Tsaioun e Kates, 2011).

Neste capítulo serão abordados os experimentos realizados com o objetivo de alcançar maior conhecimento quanto a essas propriedades físico-químicas do LAPDES-F-SCD03, como solubilidade e log P.

2-1. Material e métodos

2-1.1 Reagentes, fármacos e solventes

O LAPDESF-SCD03 foi obtido no laboratório de pesquisa e desenvolvimento de novos fármacos (LAPDESF) da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP de Araraquara. A água ultrapura foi obtida por sistema Milli-Q (Millipore®). Outros reagentes, fármacos e solventes, incluíram:

- Cloreto de potássio, QEL;
- Ácido clorídrico, Vetec;
- Fosfato de potássio, Synth;
- Hidróxido de sódio, Audaz;
- Acetato de sódio, J.T.Baker;
- Ácido acético, Quemis;
- Isoniazida, Lanza Pharmaceuticals;
- Butanona, Panreac;
- Acetanilida, Panreac;
- Fenobarbital, Sigma-Aldrich;
- Nifedipino, Lanza pharmaceuticals;
- Benzeno, Merck;
- Probenecida, ICN Biomedicals;
- Diazepam, Sigma-Aldrich;
- Clorobenzeno, Panreac;
- Timol, Merck;

2-1.2 Equipamentos

- Agitador magnético com aquecimento, Ethiktechnology;
- Banho ultrassônico, Ultrasonic Cleaner 2840DA, odontobrás;
- Vórtex AP56, Phoenix;
- Centrífuga Sorval Biofuge, Thermo scientific;
- Mini-centrífuga, Gilson;

2-1.3 Correlatos

- Filtro de seringa de PVDF, poro de 0,22 μ m, Flowsupply;
- Filtro de seringa de PTFE, poro de 0,22 μ m, Flowsupply;

2-1.4 Softwares

- Chemdraw® Ultra v. 8.0, CambridgeSoft Corporation;
- ALOGPS v. 2.1, VCCLAB;
- Prism 5, GraphPad®;

2-1.5 Solubilidade em água e tampões (1,2; 4,5 e 7,4)

A solubilidade em água e tampões foi determinada com base nos métodos descritos no Guideline 105 (1995a) da OECD (Organisation for Economic Co-operation and Development) e na publicação de Talluri e colaboradores (2009), considerando-se resultados de ensaios de estabilidade em água e tampões (pH 1,2, 4,5 e 7,4) (Capítulo 3 - Ensaios *in vitro*).

O estudo de solubilidade em água do LAPDESF-SCD03 foi realizado em água ultrapura (sistema Milli-Q) com pH 6,5. Abaixo se encontram as variações dos procedimentos realizados, todos em triplicata.

- Ensaio água 1 → Saturação de 1 mL de água com LAPDESF-SCD03, por 15 minutos de banho ultrassônico seguido de 24 horas de agitação em vórtex (26,5 \pm 1 °C), com subsequente centrifugação por 13000 x g por 15 minutos e filtração do sobrenadante por filtro de seringa de PVDF com poro de 0,22 μ m;
- Ensaio água 2 → Saturação de 1 mL de água com LAPDESF-SCD03, por 30 minutos de banho ultrassônico seguido de 24 horas de agitação em vórtex (26,7 \pm 0,8 °C), com subsequente centrifugação em 2150 x g por 5 minutos e filtração do sobrenadante por filtro de seringa de PTFE com poro de 0,22 μ m;
- Ensaio água 3 → Saturação de 1 mL de água com LAPDESF-SCD03, por 30 minutos de banho ultrassônico seguido de 24 horas de agitação em vórtex (26,7 \pm 0,8 °C) e nova adição de LAPDESF-SCD03 com 10 minutos adicionais de banho-ultrassônico, subsequente centrifugação em 2150 x g por 5 minutos

e filtração do sobrenadante por filtro de seringa de PTFE com poro de 0,22 μm ;

- Ensaio água 4 → Cerca de 5 mg de LAPDESF-SCD03 foram adicionados a 0,5 mL de água. Na sequencia permaneceu em banho ultrassônico por 5 minutos, seguido de 1 minuto em vórtex. A mistura foi centrifugada a 2150 x g por 5 minutos e 250 μL foram retirados para a filtração em filtro de seringa de PTFE com poro de 0,22 μm ;

O estudo de solubilidade em soluções tampão (1,2; 4,5 e 7,4) do LAPDESF-SCD03 foi realizado com os tampões de Clark-Lubs (pH 1,2), fosfato de potássio-hidróxido de sódio (pH 7,4) e o tampão ácido acético-acetato (pH 4,5) , preparados como segue:

- *Tampão de Clark-Lubs*: Foi preparada uma solução de cloreto de potássio na concentração de 0,2 M e uma solução de ácido clorídrico na concentração de 0,2 M. Em seguida 100 mL da solução de cloreto de potássio recebeu a solução de ácido clorídrico até alcançar o pH desejado de 1,2;
- *Tampão fosfato monopotássico-hidróxido de sódio*: Foi preparada uma solução de fosfato monopotássico na concentração de 0,1 M e uma solução de hidróxido de sódio na concentração de 0,1 M. Em seguida 100 mL da solução de fosfato monopotássico recebeu a solução de hidróxido de sódio até alcançar o pH desejado de 7,4;
- *Tampão de ácido acético-acetato*: foi preparada uma solução de acetato de sódio na concentração de 2 M e uma solução de ácido acético concentração de 2 M. Em seguida 100 mL da solução de acetato de sódio recebeu ca solução de ácido acético até alcançar o pH desejado de 4,5;

Cerca de 5 mg de LAPDESF-SCD03 foram adicionados a 0,5 mL de cada tampão. Na sequencia, a mistura permaneceu em banho ultrassônico por 5 minutos, seguidos de 1 minuto de agitação. A mistura foi centrifugada a 2150 x g por 5 minutos e 250 μL foram retirados para a filtração em filtro de seringa de PTFE com poro de 0,22 μm . Todas as soluções filtradas foram analisadas pelo método analítico do Capítulo 1.

2-1.6 Log P

O log P previsto do SCD-03 foi determinado pelos *software* ChemDraw® Ultra 8.0 e ALOGPS 2.1, cujos resultados foram 2,02 e 1,92, respectivamente. A partir desses resultados foi realizada a determinação experimental por método cromatográfico.

O sistema cromatográfico consistiu de um UPLC Acquity® com detector UV-Visível. A separação foi feita por uma coluna BEH 2,1x50mm, 1,7µm com pré-coluna BEH 2,1x5mm, 1,7µm, mantida a uma temperatura de 30° C. A fase móvel foi Metanol:Ácido fórmico 0,1% (70:30) pH 4 e vazão de 0,4 mL/min. O volume de injeção foi de 5µL.

O ensaio foi realizado com base no *Guideline* 117 (2004) da OECD e para a construção da curva foram selecionadas substâncias cuja curva de log *k* (log do fator de capacidade) versus o log P compreendesse o log P previsto para o LAPDESF-SCD03 (Tabela 6).

Tabela 6. Substâncias utilizadas na curva para a determinação do log P do LAPDESF-SCD03.

Substância	Log P
Isoniazida	-0,8
Butanona	0,3
Acetanilida	1
fenobarbital	1,47
Nifedipina	2
Benzeno	2,1
Probenecida	2,3
diazepam	2,7
Clorobenzeno	2,8
Timol	3,3

O fator de capacidade *k*, ou razão de distribuição das massas, é determinado dividindo-se a diferença entre o tempo de retenção do composto e o tempo morto pelo próprio tempo morto. O tempo morto por sua vez é definido como o tempo de detecção de uma substância não retida na coluna, ou pode ser aproximado pelas dimensões da coluna de acordo com a Equação 1.

$$t_0 = \frac{0,5 \times \pi \times r^2 \times C}{v}$$

Equação 1

Onde r é o raio interno da coluna em mm, C é o comprimento da coluna (somado a pré-coluna se houver) e v é a vazão do sistema em $\mu\text{L/mL}$.

Assim o $\log k$ de cada substância da Tabela 1 foi calculado e plotado em função de seu $\log P$ para construção da equação de regressão linear que foi utilizada para o cálculo do $\log P$ do LAPDESF-SCD03.

2-2. Resultados e discussão

2-2.1 Solubilidade em água e tampões (1,2; 4,5 e 7,4)

Os resultados de solubilidade são apresentados na Tabela 7, abaixo. Em geral nota-se que houve um coeficiente de variação demasiado alto em alguns dos ensaios.

Tabela 7. Ensaios de solubilidade (tampão ou água) nas diferentes condições avaliadas

Ensaios de Solubilidade	Média (ng/mL)	CV %
água 1	1133,3	18,4
água 2	1413,4	18,3
água 3	2351,5	3,7
água 4	868,7	30,3
pH 1,2	354,2	24,7
pH 4,5	1236,1	7,5
pH 7,4	596,2	24,8

A descrição detalhada de cada experimento esta no item **4.2.3**

O ensaio de solubilidade em água que levou a maior solubilidade foi o número 3, onde houve saturação de 1 mL de água com LAPDESF-SCD03, banho ultrassônico por 30 minutos, 24 horas de agitação em vórtex e nova adição de LAPDESF-SCD03 com 10 minutos adicionais de banho ultrassônico. Esse ensaio teve a finalidade de corrigir uma possível degradação do fármaco nos ensaios de número 1 e 2, já que nesses houve longo período de agitação ou banho ultrassônico. Quanto à diferença em relação ao ensaio número 4, há a probabilidade de que o tempo em banho ultrassônico e agitação tenha sido insuficiente. Portanto, dentre os ensaios realizados, o ensaio de número 3 é o que melhor parece

balancear o equilíbrio da solubilidade e potencial degradação aquosa do fármaco em 24 horas.

Os ensaios em tampão, apesar de não respeitarem um período de tempo razoável em banho e agitação, permitem observar que a solubilidade do fármaco é maior em pH 4,5. O curto período de tempo utilizado no ensaio foi em função da baixa estabilidade do composto em pH 7,4 e do desconhecimento de sua estabilidade em pH 4,5.

A partir desse resultado podemos inferir que o fármaco na forma cristalina avaliada é praticamente insolúvel. Isso poderá leva-lo a uma baixa solubilidade no trato gastrointestinal, levando a uma absorção errática ou incompleta quando administrado pela via oral (Van De Waterbeemd *et al.*, 2001). Uma biodisponibilidade oral reduzida, se o composto for administrado sem utilização de modificadores de solubilidade, poderá ser observada (Fasinu *et al.*, 2011).

2-2.2 Log P

A partir do log P previsto do LAPDESF-SCD03, determinado pelos *softwares* ChemDraw® Ultra 8.0 e ALOGPS 2.1, cujos resultados foram 2,02 e 1,92, respectivamente, foram selecionadas as substâncias cuja curva do log *k* versus o log P compreendesse esses valores.

A curva de linearidade dessas substâncias em triplicata permitiu o cálculo da equação $y=0,2576x - 0,2362$ e coeficiente de correlação, $r = 0,98$ (Figura 7). O log *k* do LAPDESF-SCD03 foi determinado a partir de seu tempo de retenção e interpolado na curva de linearidade de log *k* versus log P.

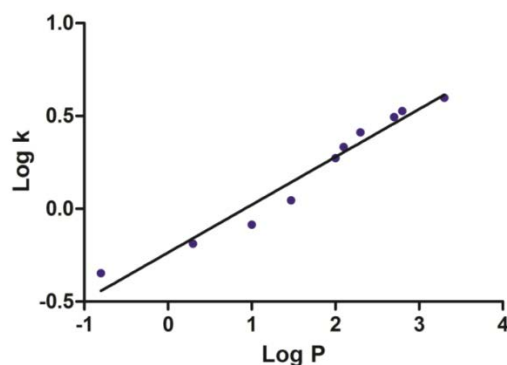


Figura 7. Linearidade de Log *k* versus Log P das substâncias selecionadas

O log P experimental alcançado foi de $2,6 \pm 0,1$, portanto os métodos calculados do *software* ChemDraw® Ultra 8.0 e ALOGPS 2.1 tiveram um desvio do valor experimental de -22,3 % e -26,2 %, respectivamente.

Esse log P observado de 2,6, além da massa molar de 298 Da, menos que 5 doadores de ligações de hidrogênio (nenhum NH ou OH) e menos que 10 aceptores de hidrogênio (7 O e N) aumentam as chances da molécula ter uma absorção ou permeabilidade viável (Lipinski *et al.*, 2001).

2-3. Conclusão e Perspectivas

Se por um lado o log P obtido categoriza o fármaco para uma boa absorção e permeabilidade, por outro lado, a solubilidade poderá ser um fator limitante a observação de uma biodisponibilidade completa. Assim o planejamento do estudo incluiu a administração de uma suspensão pela via oral em ratos.

Abordagens farmacotécnicas podem ser capazes de melhorar a solubilidade do fármaco. Um ensaio realizado utilizando poloxamer 407 em dispersão sólida e mistura física levou a uma melhora de 15 vezes na solubilidade do fármaco em água, mostrando um potencial de melhora desta propriedade (Apêndice A).

Modificações moleculares como a latenciação, gerando um pró-fármaco mais solúvel que a molécula matriz, também pode ser uma alternativa.

Capítulo 3 - Ensaios in vitro

A avaliação de propriedades do fármaco candidato através de ensaios *in vitro* permite a aquisição de uma série de informações que podem fundamentar o planejamento e a interpretação dos ensaios *in vivo*.

A estabilidade química é uma das mais importantes propriedades de fármacos candidatos, tendo grande influência na fase da descoberta e desenvolvimento, já que uma biodisponibilidade reduzida pode ser resultado da instabilidade do composto no local de administração, cujo mecanismo de degradação mais comum é a hidrólise. (Cannazza *et al.*, 2014).

Informações sobre a estabilidade de uma substância ativa ou novo fármaco são necessárias já nos estágios iniciais de seu desenvolvimento e obter prematuramente uma vasta base de informações pode evitar equívocos nas interpretações de resultados e situações inesperadas na sequência do trabalho de desenvolvimento (Berglund, Bystrom e Persson, 1990; Cannazza *et al.*, 2014). O objetivo dos estudos de estabilidade nessa fase é obter uma visão geral da estabilidade do fármaco em diversas situações de importância farmacêutica e identificar suscetibilidades que possam afetar o desenvolvimento do fármaco (Chen *et al.*, 2006).

A detecção e identificação de picos de prováveis produtos de degradação equivalentes a 1/1000 do pico do fármaco testado deveria ser alcançada em um ensaio ideal, contudo esta prática é de difícil execução nas fases iniciais e de descoberta de fármacos. A elucidação dos mecanismos de degradação é outro fator que, apesar de poder guiar a solução de problemas relacionados a estabilidade e planejamento de estratégias para melhorar a estabilidade, nem sempre são praticáveis na fase de descoberta (Gilard *et al.*, 1999; Chen *et al.*, 2006).

A avaliação da estabilidade permite um maior entendimento do comportamento do fármaco diante das características fisiológicas sob as quais será submetido e também o desenvolvimento de formas farmacêuticas adequadas. No que se refere a estabilidade pH dependente, ela pode ser avaliada a 37°C, com base na temperatura corporal, em pHs de 1 a 9 por período entre 1 e 9 dias (Chen *et al.*, 2006). De acordo com Di (2009) a maioria dos compostos tende a ser mais estável

em pH neutro, enquanto outros são mais estáveis em condições ácidas ou básicas. Os perfis de estabilidade sob condições de pH controladas podem ter várias formas, dependendo da estabilidade de certos grupos funcionais sob ação catalítica básica ou ácida (Di e Kerns, 2009).

A tendência é a instabilidade ocorrer em compostos com grupos funcionais suscetíveis. Os mecanismos de decomposição mais comum incluem a hidrólise, a hidratação, a oxidação, a ciclização intramolecular, a fotólise e a racemização. Muitas substâncias com carbonilas eletrofílicas são suscetíveis a hidrólise como ésteres, lactonas, amidas, e lactamas (Di e Kerns, 2009).

Quase todos os fármacos estão sujeitos a algum nível de instabilidade em soluções aquosas. A consequência mais comum é a perda na potência, contudo produtos de degradação com ações prejudiciais podem ser formados, como reações alérgicas que muitas vezes são devido a um produto de degradação e não ao fármaco matriz (Loukas, Vraka e Gregoriadis, 1998).

Os estudos de estabilidade ou hidrólise, por vezes focam-se no cálculo da constante de hidrólise (Moeker e Thiem, 2012; Wang *et al.*, 2013; Salmani *et al.*, 2014; See *et al.*, 2014), que permite a comparação das constantes em diferentes condições. Em outros avalia-se o decaimento percentual do fármaco matriz em função do tempo e usando o tempo zero como ponto de referência (Radford *et al.*, 1991; Chung *et al.*, 2009).

Os resultados observados no trabalho de Radford (1991) alertam ainda para a instabilidade que pode ocorrer com o aumento de temperatura para um fármaco que se mostrou estável a temperatura ambiente. Isso é importante visto que uma prática comum nos experimentos com fármacos é o uso de aquecimento para facilitar a dissolução antes da administração em um modelo animal, resultando em observações que tem o efeito de produtos de degradação térmica e não apenas do fármaco matriz.

Os ensaios de estabilidade ganham ainda mais importância quando se trata de pró-fármacos, cuja labilidade é uma premissa por definição. Se o objetivo for apenas melhorar aspectos como a solubilidade ou absorção, sua ativação rápida pode não ser um problema. Nesse caso o ensaio de estabilidade dará indícios da viabilidade do planejamento, pois pode ser observada se a formação da molécula

matriz está em acordo com a decomposição do fármaco ou se pode haver a formação de produtos inesperados (Teitelbaum *et al.*, 2013)

Em contrapartida, uma das aplicações da abordagem de pró-fármacos é a melhora da estabilidade, sendo esta uma estratégia que pode ser muito efetiva em resolver problemas não só de estabilidade, como de solubilidade, permeabilidade e outros que afetam a biodisponibilidade de fármacos (Chen *et al.*, 2006).

Além da avaliação da estabilidade química – soluções e tampões aquosos – deve ser avaliada também a estabilidade em plasma. Após estabilidade em tampões (pH 1,2 e 7,4) e uma rápida taxa de conversão hidrolítica em plasma, ambos em condições similares pode-se inferir que a suscetibilidade a ação enzimática é independente da reatividade intrínseca do composto em avaliação (Dhingra *et al.*, 2014).

Fármacos que são instáveis em plasma tendem a ter um clearance elevado, meia-vida curta, e fraca eficiência *in vivo*. Se o nível de instabilidade for muito grande, isso poderá afetar inclusive o método bioanalítico, já que a degradação continuará entre o momento da coleta e o da análise, a não ser que medidas de armazenamento validadas sejam aplicadas, desde o congelamento até o uso de inibidores enzimáticos (Di *et al.*, 2005).

A presença de metabólitos resultantes de hidrólise plasmática complica e desacelera o processo de desenvolvimento do fármaco, levando as companhias farmacêuticas a desistirem do desenvolvimento de compostos que apresentem degradação plasmática excessivamente rápida, exceto por pró-fármacos, *antedrugs* e outros casos especiais (Di *et al.*, 2005).

O ensaio de estabilidade em plasma pode ser realizado como uma forma menos dispendiosa de encontrar e avaliar as chances de diferenças farmacocinéticas específicas entre os ensaios pré-clínicos e em humanos. No trabalho de (Ge *et al.*, 2013), os decaimentos das concentrações do analito no ensaio de estabilidade em plasma humano e de rato não ficaram muito distantes, meias-vidas de 23,5 h e 31,8 h, enquanto em plasma suíno a meia-vida foi de 83,1 h, indicando alguma peculiaridade para o último.

Em uma série com dois ou mais derivados, esse tipo de ensaio pode mostrar quem é o mais estável em plasma de um mesmo modelo animal levando a um

parâmetro de decisão na continuidade do desenvolvimento, como no trabalho de Kumarasinghe (2014), onde o peptídeo cíclico 9 com meia-vida de quase 60 minutos foi mais estável que o peptídeo linear 7, com meia-vida inferior a 15 minutos.

Os ensaios em plasma são úteis ao ceder o primeiro indicativo do nível de acerto na abordagem de pró-fármacos, seja para características de administração do fármaco, as quais exigem uma rápida bioconversão ou de manutenção das concentrações, onde a estabilidade em plasma será mais apreciada, pois indica uma bioconversão mais lenta *in vivo* (Ettmayer *et al.*, 2004; Chung *et al.*, 2009).

Existe ainda a facilidade e robustez da incubação em plasma, cuja atividade enzimática se mantém mesmo após 24 horas do início da incubação a 37°C, aceita uma extensa faixa de concentração do analito sem perder a atividade (até 20 µM ou 6 µg/mL para um composto de 300 Da), que também se mantém mesmo após diluição 1:1 em tampão pH 7,4 e contendo até 2,5% de DMSO, na necessidade deste solvente para dissolução do fármaco (Di *et al.*, 2005)

A suscetibilidade a hidrólise plasmática está relacionada a presença de certos grupos funcionais, como ésteres, amidas, lactonas, lactamas, carbamidas e sulfonamidas. Devido a diferenças interespecies, o *screening* dessa estabilidade em plasma de modelos animais mais relevantes propicia informações úteis aos grupos de desenvolvimento e descoberta, permitindo-os modificar estruturas, diagnosticar resultados de ensaios *in vitro* e *in vivo*, e aumentar a qualidade de desenvolvimento dos candidatos (Di *et al.*, 2005).

Fármacos que apresentem estabilidade química, quando forem instáveis em plasma, permitem assumir que a ação enzimática é a causa da degradação. Todavia, se houver degradação no ensaio de estabilidade química, isso não determina o nível de instabilidade em plasma, já que outros fatores estarão envolvidos. Um desses fatores é a ligação a proteínas plasmáticas, já que o fármaco precisa estar livre para ser sujeito à ação enzimática do plasma.

A fração de fármaco ligado no plasma é determinada pela interação entre cada fármaco e as proteínas plasmáticas, representadas principalmente pela albumina, onde tipicamente se ligam compostos ácidos. A concentração de albumina tanto em humanos quanto em ratos Wistar é cerca de 4g/dL ou 0,6 mmol/L (Ccac, 1993; Rang e Dale, 2012). Sua capacidade de ligação é de 1,2 mmol/L (ou 1,2

$\mu\text{mol/mL}$) devido a seus dois sítios de ligação por molécula (Rang e Dale, 2012). Para um fármaco de 300 Da, a concentração necessária para se ligar a 100% da albumina disponível seria de 360 $\mu\text{g/mL}$, o que é bem acima de concentrações terapêuticas usuais.

A outra proteína de importância na taxa de ligação de fármacos é α_1 -glicoproteína ácida, cuja concentração está em torno de 0,016 $\mu\text{mol/mL}$ (Berezhkovskiy, 2008). Se considerado o mesmo fármaco de 300 Da, a concentração necessária para se ligar a toda α_1 -glicoproteína ácida seria de 4,8 $\mu\text{g/mL}$, um valor mais próximo de concentrações terapêuticas comumente observadas. Contudo, os compostos básicos apesar de se ligarem mais a α_1 -glicoproteína ácida, frequentemente também se ligam a albumina (Berezhkovskiy, 2008; Zhang *et al.*, 2012).

Entre os métodos frequentemente publicados, a ultrafiltração, a diálise de equilíbrio e a centrifugação são os métodos mais usados para determinação da fração livre em plasma (Berezhkovskiy, 2008; Howard *et al.*, 2010). São métodos que quantificam diretamente o fármaco livre, baseando-se no peso molecular ou na densidade (Vuignier *et al.*, 2010).

A ultracentrifugação se fundamenta na aplicação de elevadas forças gravitacionais (625.000 x g) para separar o fármaco livre do fármaco ligado. O fármaco ligado, devido à densidade maior das proteínas, se deposita no fundo do recipiente, enquanto o fármaco livre pode ser quantificado na fase intermediária, abaixo de lipoproteínas de baixa densidade e quilomícrons que ficam na superfície. Contudo, limitações como dificuldade na separação ideal das frações ligada e não ligada, longo período de centrifugação necessário, e uma mudança do equilíbrio durante o processo de centrifugação, tornam essa técnica desvantajosa em relação a ultrafiltração e a diálise de equilíbrio (Howard *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2012).

A diálise de equilíbrio parte do princípio de equilíbrio do fármaco entre dois continentes separados por uma membrana, a qual permite a difusão apenas do fármaco livre, assim a concentração do fármaco livre será a mesma em ambos os lados no equilíbrio (Berezhkovskiy, 2008). Entre suas desvantagens estão a mudança em condições de equilíbrio iniciais, ligação inespecífica, mudanças de volume, e vazamento de proteína pela membrana (Howard *et al.*, 2010). É o método

mais padronizado, “padrão ouro”, contudo pode ser problemático para fármacos instáveis devido ao tempo necessário para o equilíbrio (Zhang *et al.*, 2012).

A ultrafiltração usa a centrifugação para filtrar o plasma através de uma membrana que retém as proteínas e separa a água de plasma onde está o fármaco livre (Berezhkovskiy, 2008). Sua principal vantagem é a rapidez em comparação com o método mais utilizado que é a diálise em equilíbrio e, diferente do previamente estabelecido, coletando um volume menor que 10% do total no lado filtrado, não haverá perturbação do equilíbrio inicial. Sua maior limitação é a ligação inespecífica a membrana de filtração ou a câmara receptora, levando a uma subestimação dos valores de concentração livre do fármaco (Howard *et al.*, 2010). Porém, é o adequado para fármacos instáveis (Zhang *et al.*, 2012) e o mais frequentemente utilizado em laboratórios clínicos (Calvo *et al.*, 2006).

Nos estágios iniciais de desenvolvimento, a medição da fração ligada em uma concentração alta e outra baixa, em torno das concentrações esperadas no plasma é suficiente (Berezhkovskiy, 2008). O efeito da concentração livre pode ser correlacionado com a eficácia em modelos pré-clínicos e ser usada na extrapolação da eficácia através das espécies pré-clínicas até o humano. Obviamente a fração livre é requerida para suportar a estimativa consistente do clearance hepático a partir do clearance hepático intrínseco obtido em incubações *in vitro* (Berezhkovskiy, 2008).

A cinética da ligação a proteínas não deve ser considerada na maioria dos casos, já que o equilíbrio ocorre muito mais rápido que os processos farmacocinéticos (Berezhkovskiy, 2008).

A ligação a proteínas plasmáticas tem influencia significativa na taxa de difusão dos fármacos entre o plasma e os tecidos influenciando, portanto, o clearance e o volume de distribuição. O efeito da ligação a proteínas plasmáticas no clearance é dependente da rota majoritária de clearance do fármaco e da taxa de extração hepática do fármaco, no caso de fármacos eliminados hepaticamente (Bohnert e Gan, 2013). As definições e mais detalhes dos parâmetros clearance e volume de distribuição estão apresentados no

Capítulo 4.

Da mesma forma que a fração livre de fármaco é importante na extrapolação do clearance hepático intrínseco para o clearance hepático in vivo, em fármacos com baixa taxa de extração hepática, mudanças no valor da fração livre vão alterar o clearance hepático, como na Equação 2

Equação 2

$$Cl_{hep} \cong f_u \times Cl_{int}$$

em que Cl_{hep} é o clearance hepático, f_u é a fração livre e Cl_{int} é o clearance intrínseco.

Isso não ocorre com fármacos de alta taxa de extração onde o clearance hepático é aproximadamente igual ao fluxo sanguíneo para o fígado, portanto mudanças na fração livre não alteram o clearance (Bohnert e Gan, 2013).

Nos fármacos com eliminação preponderantemente renal, a depuração por mecanismos de filtração glomerular ou secreção ativa são dependentes da fração livre, desde que apenas o fármaco não ligado pode ser excretado por esses processos (Bohnert e Gan, 2013).

O volume de distribuição reflete a extensão da distribuição do fármaco e é determinado pela ligação do fármaco à proteínas no plasma e nos tecidos. Como pode ser observado na Equação 3, o volume de distribuição é diretamente proporcional a fração livre no plasma, enquanto a fração livre no tecido é inversamente proporcional ao volume de distribuição.

Equação 3

$$V_{ss} = V_P + V_T \frac{f_u}{f_{u,T}}$$

onde V_{ss} é o volume de distribuição, V_P é o volume de plasma, V_T é o volume do tecido, f_u é a fração livre no plasma, e $f_{u,T}$ é a fração livre no tecido. Entretanto, mudanças na fração livre no plasma nem sempre refletem mudanças da fração livre no tecido, tornando difícil estimar com exatidão como as mudanças da fração livre no plasma e no tecido vão afetar o V_{ss} (Rowland e Tozer, 2011).

Assumindo que tanto o clearance quanto o volume de distribuição são parcialmente afetados pela mudança na taxa de ligação a proteínas plasmáticas, os dois parâmetros determinantes da meia-vida, fica clara a importância de investigar a fração livre nas fases iniciais do desenvolvimento, permitindo incorporar a

concentração livre na discussão das relações de concentração e eficácia (Bohnert e Gan, 2013).

Quanto maior a taxa de ligação a proteínas plasmáticas, maior será o impacto de uma mudança no percentual de fármaco ligado na flutuação da concentração livre, a qual está relacionada com o efeito, não apenas farmacológico, mas também tóxico, sendo esta uma razão para evitar altas taxa de ligação durante a fase de desenvolvimento (Bohnert e Gan, 2013). Note pela Figura 8 como um aumento de 2% na taxa de ligação de dois fármacos com diferentes taxas de ligação levou a uma redução de 3 vezes na concentração livre de um dos fármacos, que pode resultar em perda de eficácia, enquanto houve uma redução de apenas 10 % na concentração livre do outro fármaco.

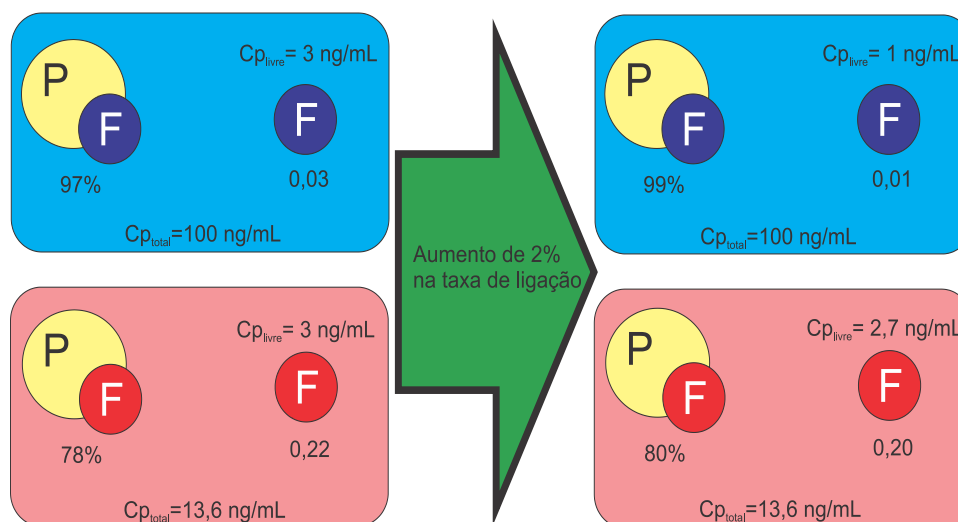


Figura 8. Representação do impacto na concentração livre de uma mudança de 2% na taxa de ligação a proteínas plasmáticas e dois fármacos com diferentes taxas de ligação.

Entretanto, algumas vezes, mesmo para um fármaco altamente ligado, as alterações da fração livre podem não levar a mudanças consideráveis no efeito terapêutico. O propofol é um fármaco altamente ligado (99%) e apesar de sua fração livre se alterar na diabetes, na insuficiência renal, na insuficiência hepática e em pacientes internados estado de crítico, apenas em alguns casos a farmacocinética ou a resposta foram afetadas (Calvo *et al.*, 2006).

A relação entre a concentração livre de fármaco e a eficácia é mais fácil de ser estabelecida para alvos farmacológicos no espaço extracelular (canais iônicos,

receptores acoplados a proteína G), já que a permeabilidade celular e transporte ativo não estão implicados. No caso onde os receptores alvos estão dentro da célula (enzimas e receptores nucleares) as correlações entre a concentração no plasma e a eficácia *in vivo* se tornam mais complexas de serem estabelecidas (Smith, Di e Kerns, 2010; Bohnert e Gan, 2013).

Contudo não deve ser assumido que reduzir a ligação a proteínas plasmáticas nas fases de desenvolvimento de fármacos para aumentar a fração livre irá garantir a otimização da eficácia *in vivo*. Modificar as estruturas para aumentar a fração livre com base em estudos *in vitro* de ligação a proteínas plasmáticas acreditando que isso resultará em aumento da concentração livre *in vivo* não assegura eficácia. Isso ocorre por que a fração livre não limita a penetração do fármaco nos tecidos e nem afeta concentração livre ou exposição, os quais determinam a eficácia (Smith, Di e Kerns, 2010; Bohnert e Gan, 2013). Fármacos que formam metabólitos ativos não obedecem a hipótese de que a atividade farmacológica é afetada pela concentração do fármaco livre, nesses casos a correlação pode ser complexa (Smith, Di e Kerns, 2010)

Aumentar a fração livre *in vivo* leva a um aumento no clearance total (exceto fármacos onde ocorre depuração irrestrita ou perfusão limitada, que são imunes a mudança na fração livre do fármaco) e diminui a exposição total, mas não a exposição ao fármaco livre, que conduz a eficácia (Smith, Di e Kerns, 2010; Bohnert e Gan, 2013). O zamifenacin e darifenacin, antagonistas antimuscarínicos, tem potência semelhante, mas suas frações livres tem uma diferença de 300 vezes. Apesar dessa diferença na fração livre desses fármacos, a dose diária de zamifenacin (fração livre de 0,02%) é apenas duas vezes maior que a dose diária do darifenacin (fração livre de 6%), ambos levando a uma resposta farmacodinâmica similar. Isso reflete a afinidade pelo receptor e o clearance intrínseco e não sua diferença de taxa de ligação a proteínas plasmáticas (Smith, Di e Kerns, 2010).

Não existe um valor ótimo de taxa de ligação a proteínas plasmáticas que garanta o sucesso de uma série de derivados, na verdade esses valores podem ser bem diferentes para cada série, mesmo que tenham o mesmo alvo. Apenas em caso de substâncias com potência e perfil farmacocinético similar, deve-se dar preferência

aos compostos com menor taxa de ligação a proteínas plasmáticas (Bohnert e Gan, 2013).

Em caso de avaliação de um composto individual como candidato ao desenvolvimento clínico, o uso da exposição total para aplicação das relações farmacocinéticas e farmacodinâmicas é bem sucedida ou se os compostos da série de derivados tiverem taxa de ligação a proteínas plasmáticas semelhantes. Contudo se o objetivo é a comparação de compostos com estruturas distintas, essa abordagem não é a ideal, já que as frações livres poderão ser diversas (Smith, Di e Kerns, 2010).

Neste capítulo serão abordados experimentos realizados *in vitro* para avaliar aspectos específicos como hidrólise em água e tampões, hidrólise plasmática, além de um ensaio para determinação da taxa de ligação a proteínas plasmáticas do LAPDESF-SCD03.

3-1. Material e métodos

3-1.1 Reagentes, fármacos e solventes

O LAPDESF-SCD03 foi obtido no laboratório de pesquisa e desenvolvimento de novos fármacos (LAPDESF) da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP de Araraquara. A água ultrapura foi obtida por sistema Milli-Q (Millipore®). Outros reagentes, fármacos e solventes, incluíram:

- Cloreto de potássio, QEL;
- Ácido clorídrico, Vetec;
- Fosfato de potássio, Synth;
- Hidróxido de sódio, Audaz;
- Acetato de sódio, J.T.Baker;

3-1.2 Equipamentos

- Agitador magnético com aquecimento, Ethiktechnology;
- Centrífuga Sorval Biofuge, Thermo scientific;
- Banho-maria 1147, Fanem;

3-1.3 Correlatos

- Dispositivo de ultrafiltração centriprep-30, Millipore®;
- Dispositivo de ultrafiltração Centrifree Ultracel 30K, Millipore®

3-1.4 Softwares

- Prism 5, GraphPad®;

3-1.5 Estabilidade em água e tampões (pH 1,2 e 7,4)

A estabilidade do composto foi realizada em triplicata com base no estudo publicado por Chung e colaboradores (2009), incluindo-se ensaios de estabilidade em água sem correção de pH. Para estabilidade em água foi utilizada água ultrapura (sistema Milli-Q) com pH 6,5. Enquanto para a estabilidade em tampões foi utilizado o tampão de Clark-Lubs (pH 1,2) o tampão fosfato de potássio-hidróxido de sódio (pH 7,4), preparados como descrito no item 2-1.5 Solubilidade em água e tampões (1,2; 4,5 e 7,4) no capítulo 2.

As soluções foram adicionadas de LAPDESF-SCD03 para uma concentração final de 1500 ng/mL a partir da solução matriz em acetonitrila. Alíquotas de 500 µL de cada solução foram coletadas nos tempos 0, 30 minutos, 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12 e 24 horas, e analisadas pelo método analítico validado. Três experimentos foram feitos sob agitação (agitador magnético) e controle de temperatura (manta aquecedora, 37°C) com água, tampão pH 1,2 e tampão pH 7,4. Além desses, foram realizados ainda experimentos em água, sem aquecimento (temperatura ambiente, 25°C) e sem agitação sob resfriamento (geladeira a cerca de 5,0 °C).

3-1.6 Determinação da estabilidade de LAPDESF-SCD03 em plasma

O ensaio foi realizado em triplicata em plasma de rato e em plasma humano. O plasma isento de analito foi adicionado de solução estoque de LAPDESF-SCD03 suficiente para produzir uma concentração nominal em plasma de 1500 ng/mL. Essa mistura foi mantida em agitação, por agitador magnético, e temperatura de 37°C, por

manta aquecedora, constantes até o fim do experimento. Nos tempos de 0, 5, 15, 30, 45, 60 e 75 minutos alíquotas de 0,1 mL foram coletadas e analisadas para determinar se o fármaco é suscetível ao metabolismo em plasma.

3-1.7 Determinação da taxa de ligação proteínas plasmáticas

Para esse ensaio foi considerado o resultado do ensaio de estabilidade em plasma, já que há a necessidade de submeter o analito a um tempo de incubação onde pode haver ação das enzimas plasmáticas sobre o composto.

O plasma foi adicionado de quantidades conhecidas de LAPDESF-SCD03 para produzir concentrações nominais de 4000 ng/mL e 15000 ng/mL. Essas amostras foram incubadas em banho-maria por 15 minutos a 37° C.

3-1.7.1 Experimento sem correção da ligação inespecífica

Em cada replicata uma alíquota de 0,1 mL foi coletada para a análise (concentração total no plasma) e o restante foi transferido para tubos de separação de proteínas (CENTRIPREP-30, Millipore®) e centrifugados por 15 minutos a 4000 x g na temperatura de 37°C. Após a centrifugação, 0,1 mL do filtrado foi analisado (concentração de fármaco livre no plasma). A taxa de ligação a proteínas plasmáticas (%) foi calculada através da aplicação da

Equação 4

Equação 4

$$\text{Taxa de Ligação (\%)} = (1 - Fu) \times 100$$

onde, Fu é a fração não ligada do fármaco (do inglês *unbound fraction*). Fu, por sua vez, é determinado como a divisão da concentração do fármaco no filtrado (ou livre) pela concentração total do fármaco no plasma (Park *et al.*, 2003).

3-1.7.2 Experimento com correção da ligação inespecífica

Primeiramente foi determinado o valor da ligação não específica (NSB, nonspecific binding). Para essa determinação foi realizada a dissolução da substância em plasma desprovido de proteínas com peso molecular maior que 30

KDa. Em seguida a substância foi quantificada antes e após ser filtrada através da membrana (Centrifree Ultracel 30K, Millipore®) que seria utilizada no ensaio de ligação a proteínas plasmáticas. NSB foi determinado de acordo com a Equação 5

Equação 5

$$NSB = \frac{C_{BD} - C_{BF}}{C_{BD}}$$

onde, NSB denota a ligação inespecífica, C_{BD} a concentração de fármaco no plasma desprovido de proteínas e C_{BF} a concentração de fármaco em água de plasma no filtrado.

Em seguida, uma alíquota de 0,05 mL foi coletada da amostra que estava incubada em incubada em banho-maria para a análise (concentração total no plasma) e o restante foi transferido para tubos de separação de proteínas (Centrifree Ultracel 30K, Millipore®) e Millipore®) e centrifugados por 10 minutos a 1315 x g. Após a centrifugação, 0,05 mL do mL do filtrado foi analisado (concentração de fármaco livre no plasma). A taxa de ligação a ligação a proteínas plasmáticas foi calculada através da aplicação da

Equação 6 seguida da

Equação 4.

Equação 6

$$Fu = \frac{C_{SF}}{(1 - NSB)C_{SD}}$$

onde, F_u é a fração não ligada do fármaco, C_{SF} a concentração de fármaco no filtrado após ultrafiltração do fármaco no plasma, NSB é ligação não específica e C_{SD} a concentração de fármaco no plasma (Zhang *et al.*, 2012).

3-2. Resultados e discussão

3-2.1 Estabilidade em água e tampões (1,2 e 7,4)

O LAPDESF-SCD03 foi quantificado em tempos determinados a partir de alíquotas retiradas das condições avaliadas em triplicata: água (37°C com agitação, temperatura ambiente com agitação e refrigerado sem agitação) tampão pH 1,2 e tampão pH 7,4. A quantificação dessas amostras pelo método analítico validado permitiu construir o gráfico de estabilidade apresentado na Figura 9.

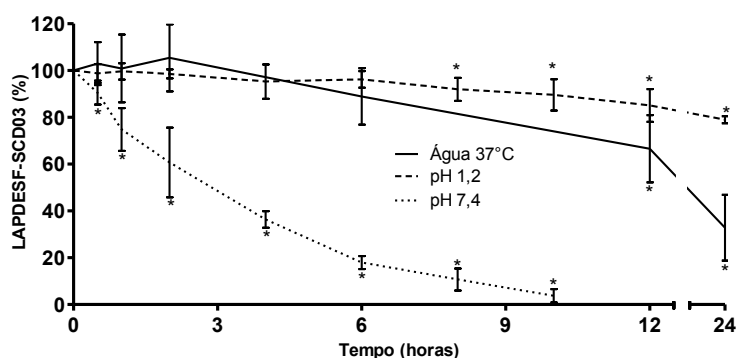


Figura 9. Estabilidade de LAPDESF-SCD03 em soluções (1500 ng/mL). * $p < 0,05$ em relação ao tempo 0 (ANOVA para medidas repetidas, seguido de tukey).

No pH de 1,2 o fármaco foi estável por 6 horas, apresentando desaparecimento estatisticamente significativo ($p < 0,05$) apenas a partir do tempo 8 horas. No pH 7,4 o LAPDESF-SCD03 teve desaparecimento estatisticamente significativo ($p < 0,05$) a cada tempo de análise em relação ao anterior. Além disso foi possível calcular a constante de decaimento das concentrações que obedeceu uma cinética de primeira ordem, cujo resultado foi $0,3210 \pm 0,0513$ (média \pm IC95) horas. O ensaio em água a temperatura ambiente mostrou perfil semelhante ao do pH 1,2, contudo o desaparecimento, estatisticamente significativo ($p < 0,05$), em relação ao tempo zero teve início em 4 horas. Neste ensaio, para cada tempo em relação ao anterior houve diferença apenas em 6 e 24 horas, em relação a 4 e 12, respectivamente.

No estudo de estabilidade em água (pH 6,5) na temperatura a 37°C , houve diferença estatisticamente significativa no tempo 12 horas. Já no ensaio onde o fármaco em água foi mantido em geladeira ($5,0\text{ C}$) por 24 horas, mas sem agitação, não houve degradação significativa.

3-2.2 Estabilidade de LAPDESF-SCD03 em plasma

O ensaio de estabilidade em plasma foi realizado para mimetizar a ação das enzimas plasmáticas, proveniente do sangue circulante, sobre o fármaco. A Figura 10 mostra a estabilidade plasmática do composto sob agitação e temperatura de 37°C .

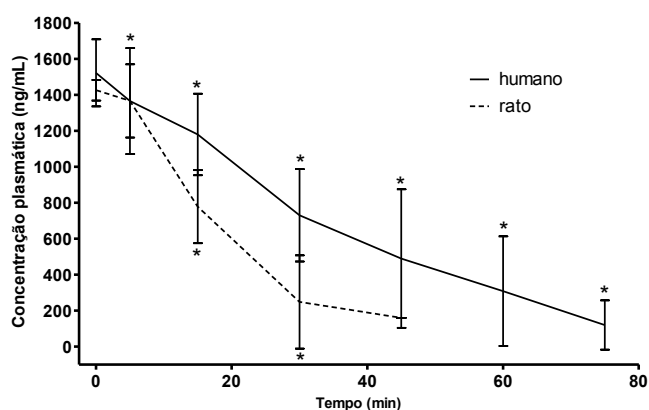


Figura 10. Estabilidade de LAPDESF-SCD03 em plasma (1500 ng/mL). * $p < 0,05$ em relação ao tempo 0 (ANOVA para medidas repetidas, seguido de tukey).

Houve diferença estatisticamente significativa para cada tempo em relação ao anterior a partir de 15 minutos para o plasma de rato. A diferença não foi demonstrada apenas no último tempo de cada experimento, devido a número insuficiente de replicatas. No ensaio em plasma humano houve diferença estatisticamente significativa a partir de 5 minutos em relação ao tempo anterior. É possível inferir que o fármaco em sua forma matriz está suscetível a biotransformação plasmática *in vivo*.

Foi comparada, ainda, a inclinação de decaimento dos dois experimentos. Não houve diferença estatisticamente significativa ($p > 0,05$ teste de Mann Whitney) na comparação das constantes de decaimento em plasma humano ($0,03267 \pm 0,01434 \text{ min}^{-1}$) e em plasma de rato ($0,05767 \pm 0,02387 \text{ min}^{-1}$). Ambas as constantes foram determinadas a partir de uma equação de decaimento monoexponencial.

3-2.3 Taxa de ligação a proteínas plasmáticas

O método mais utilizado para obter valores de ligação a proteínas plasmáticas é a diálise em equilíbrio, contudo sua principal limitação é a necessidade que de o fármaco teste ser estável. Como observado previamente, o LAPDESF-SCD03 possui uma estabilidade plasmática bastante limitada, levando a necessidade de se aplicar o método alternativo de obtenção da ligação a proteínas plasmáticas, a ultrafiltração. Assim, os ensaios foram realizados pelo método de ultrafiltração, que é

o ideal para fármacos com estabilidade em plasma insuficiente para a realização dos outros métodos disponíveis (Zhang *et al.*, 2012).

A Tabela 8 apresenta os resultados dos experimentos realizados com a finalidade de obter a taxa de ligação a proteínas plasmáticas para o LAPDESF-SCD03. Esse resultado ficou muito semelhante ao obtido *in silico* (Anexo I).

Tabela 8. Taxas de Ligação a proteínas plasmáticas obtidas por meio de dois experimentos

	% ligação a proteínas			
	Experimento 1		Experimento 2	
	4000 ng/mL	15000 ng/mL	4000 ng/mL	15000 ng/mL
1	91,0	98,6	88,6	71,9
2	91,9	98,7	88,5	75,0
3	89,3	98,8		
média	90,7	98,7	88,6	73,4
CV%	1,4	0,1	0,1	3,0

CV %= coeficiente de variação; A descrição detalhada de cada experimento esta no item 4.2.7

Ambos os ensaios realizados demonstraram que o novo fármaco tem uma elevada taxa ligação a proteínas plasmáticas (média total de 87,9%), apesar do restrito tempo de incubação.

3-3. Conclusão e Perspectivas

A estabilidade em pH 1,2 por 6 horas não deve ser um problema para a absorção oral no que se refere ao pH gástrico. Por outro lado o decaimento muito mais acentuado no pH 7,4 infere uma suscetibilidade do fármaco quando estiver em pH fisiológico, como o sanguíneo.

No ensaio de estabilidade em plasma não houve diferença na constante de decaimento das concentrações entre o plasma dos dois modelos animais testados. Além disso, o decaimento mais acentuado que o observado no ensaio em tampão de pH 7,4 sugere que há metabolismo enzimático, apesar de haver uma alta taxa de ligação a proteínas plasmáticas, que poderia amenizar a degradação ocorrida em pH 7,4 e a atividade enzimática.

Capítulo 4 - Ensaios *in vivo*

Após a administração de um fármaco, os eventos que se seguem podem ser divididos em duas fases: a fase farmacocinética, onde os elementos flexíveis dose, forma farmacêutica, frequência e via de administração estão relacionados a concentração do fármaco no corpo em função do tempo, e a fase farmacodinâmica, na qual as concentrações do fármaco no local de ação se relacionam com a magnitude do efeito farmacológico (Rowland e Tozer, 1995).

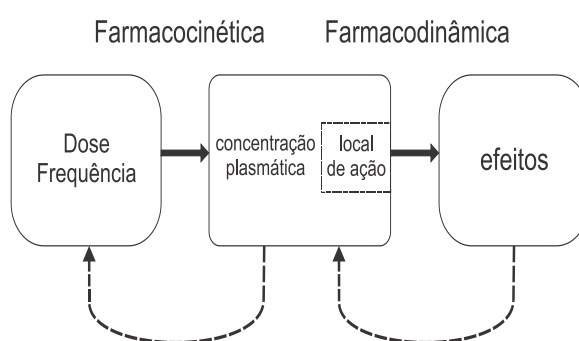


Figura 11. Regime de dose como um feedback do efeito através da farmacocinética. Adaptado de Rowland e Tozer (1995).

A Figura 11 ressalta a importância da farmacocinética como ponto de ajuste de um fármaco que pretenda levar a um efeito clínico, mesmo que o fármaco tenha a capacidade de se ligar a seu alvo terapêutico e produzir o efeito, é necessário que ele alcance esse lugar em uma determinada quantidade e por um tempo suficiente. Essa relação entre a concentração no organismo e o tempo que permanecerão em certo nível é traduzida pela farmacocinética na dose e frequência de administração do medicamento.

A farmacocinética é o estudo do curso temporal do fármaco no organismo, o qual permite o cálculo dos parâmetros farmacocinéticos, e incorpora os processos de absorção, distribuição, metabolismo, e excreção. (Smith, Waterbeemd e Walker, 2001). Assim, pode-se defini-la também como a “análise quantitativa dos processos de absorção, distribuição, metabolismo e excreção de um fármaco que determinam o seu tempo de ação” (Peccinini e Campos, 2015).

No caminho da descoberta e desenvolvimento de novos fármacos, as propriedades farmacocinéticas foram e continuam sendo uma razão significativa para a falha dos candidatos ao avanço como alternativas terapêuticas para o homem (Van De Waterbeemd e Gifford, 2003).

Comparada ao início dos anos 90, quando a farmacocinética era uma ferramenta descritiva como parte da caracterização dos compostos por parte dos grupos de descoberta e desenvolvimento de fármacos nas companhias farmacêuticas, houve um grande avanço no reconhecimento da necessidade da farmacocinética como parte imprescindível do planejamento das moléculas (Di *et al.*, 2013), já que mesmo que o fármaco tenha a capacidade de provocar o efeito em seu alvo, é necessário também que ele chegue a esse alvo, permaneça produzindo seu efeito por um tempo, e seja eliminado.

A farmacocinética passou a ser avaliada o quanto antes no desenvolvimento de fármacos, sendo suas propriedades utilizadas para aperfeiçoamento simultâneo dos processos ADME e da potência farmacológica (Di *et al.*, 2013). A Figura 12 mostra como a inclusão da farmacocinética como uma ferramenta de planejamento ao invés de apenas ser utilizada para a caracterização dos novos candidatos reduziu o percentual de compostos que falharam no decorrer do desenvolvimento por problemas farmacocinéticos em mais de 30% (Kola e Landis, 2004).

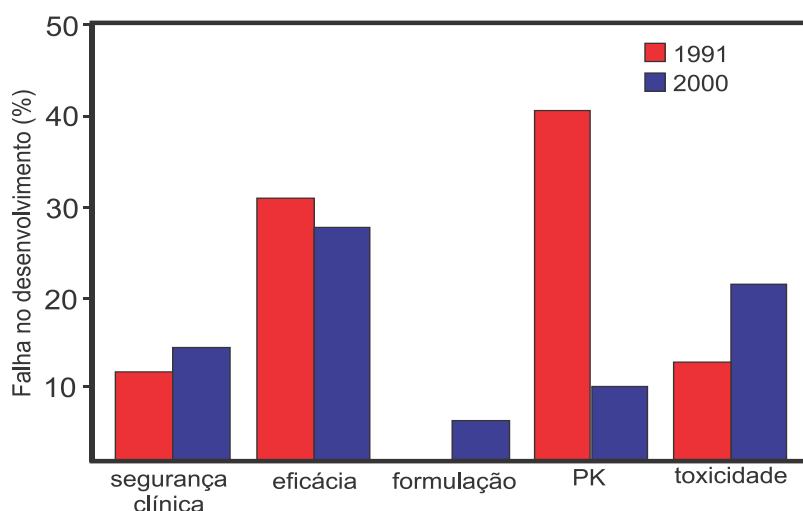


Figura 12. Causas de falha no desenvolvimento de fármacos entre 1991 e 2000 nas companhias farmacêuticas. Adaptado de Kola e Landis (2004).

Seria extremo concordar com Fan e Lannoy (2014) ao considerarem que para testar um composto, especialmente uma nova entidade química, *in vivo* sem o conhecimento de suas propriedades farmacocinéticas – mesmo a um nível rudimentar – pode ser um exercício de futilidade. Contudo há evidências de que avaliar o perfil farmacocinético antes no processo de desenvolvimento de fármacos pode aumentar a chance de alcance das fases II e III de ensaios clínicos (Kola e Landis, 2004).

Entre os modelamentos farmacocinéticos, apesar do crescimento dos modelos farmacocinéticos fisiologicamente baseados, que permitem uma integração de dados obtidos *in vitro* com dados obtidos *in vivo*, a análise farmacocinética compartimental continua sendo muito utilizada, principalmente em função de sua complexidade reduzida.

Nessa abordagem o movimento do fármaco no organismo é interpretado na forma de compartimentos. Um modelo monocompartimental emerge da curva de concentração pelo tempo em que apenas uma reta de decaimento é observada no gráfico de cinética de primeira ordem, o que significa que o fármaco se distribuiu para todos os locais em que poderia se distribuir em uma única velocidade. Já os perfis de concentração plasmática pelo tempo em que duas retas são observadas são melhor interpretados pelo modelo bibocompartimental, indicando que durante a distribuição do fármaco pelo organismo, ele encontrou tecidos onde pode se distribuir, mas sua entrada (equilíbrio) é regida por uma constante de distribuição que limita seus acesso instantâneo.

Um perfil farmacocinético (*in vivo*) é fundamentalmente influenciado por 4 processos, e são eles absorção, distribuição, metabolismo, e excreção, por vezes agrupados pela sigla ADME (Figura 13). Esses processos são distintos, embora estejam inter-relacionados em vários aspectos enquanto ocorrem entre administração e a eliminação (Fan e De Lannoy, 2014).

A absorção é um processo necessário na administração extravascular de fármacos para que alcancem a circulação. Entre as vias de administração extravasculares, a via oral é a mais utilizada (Han *et al.*, 2010). Rowland e Tozer (1995) definem a absorção como o processo pelo qual o fármaco (inalterado) passa do local de administração para o local em que ocorre sua medição no corpo, o que é

uma definição melhor da fração biodisponível, já que o local de medição é a circulação sistêmica e não a veia porta.

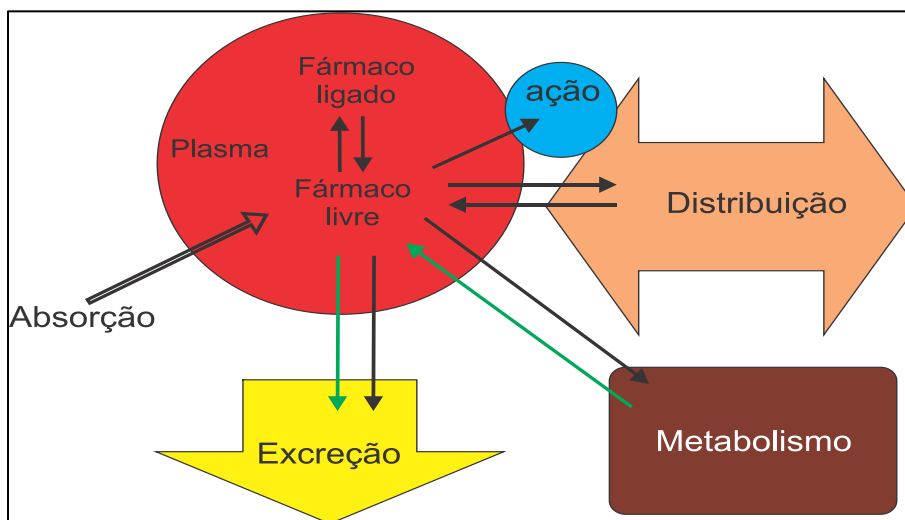


Figura 13. Representação da presença dos processos ADME na disposição do fármaco.

Antes que o fármaco seja absorvido é necessária sua dissolução no fluído do trato gastrintestinal. Fármacos em solução já estão prontos para iniciar o processo de absorção, enquanto formas sólidas como comprimidos, que precisam se desintegrar para iniciar a dissolução, e suspensões que ainda precisam ficar em solução, precisarão de mais tempo (Han *et al.*, 2010).

Uma dissolução incompleta pode resultar em fraca absorção e por conseguinte a uma baixa biodisponibilidade oral. Após estar em solução no fluído gastrintestinal o fármaco precisa resistir à degradação nesse meio (Benedetti *et al.*, 2009). O fármaco agora em solução, precisa então passar por pelo menos duas membranas celulares da barreira epitelial que separa o lúmen gastrintestinal da circulação mesentérica do estômago, intestinos ou cólon, sendo o intestino delgado o principal local de absorção. Durante essa travessia o fármaco pode ser metabolizado por enzimas metabolizadoras de fase I e fase II, além de proteínas de transporte como a P-glicoproteína que pode forçar o retorno do fármaco ao lúmen. Ao alcançar de forma intacta a circulação mesentérica, o fármaco pode ser considerado absorvido (Craig e Stitzel, 2004; Han *et al.*, 2010; Rang e Dale, 2012).

Antes de chegar a circulação sistêmica, o fármaco pode ainda ser extraído do sangue pela ação metabólica do fígado e subsequente excreção biliar, já que sua “porta” de entrada após passar pelas barreiras previamente descritas é a veia porta

hepática, destino de convergência da circulação mesentérica. Esse processo de extração do fármaco que se aplica a todo o fármaco absorvido por esta via é chamado de efeito de primeira passagem (Benedetti *et al.*, 2009). Embora seja um processo de metabolismo, o efeito de primeira passagem é, geralmente, levantado na análise do processo de absorção, o que se encaixa na definição supracitada de absorção segundo Rowland e Tozer (1995).

Para a administração oral durante os ensaios de farmacocinética pré-clínica é muito útil formular os compostos em solução para eliminar as dificuldades relacionadas a dissolução. Entretanto, a maioria dos candidatos nessa fase de desenvolvimento é de baixa solubilidade, impossibilitando a solução como uma formulação viável, especialmente se for necessário administrar doses elevadas. Uma abordagem comum neste caso é a veiculação do fármaco em uma suspensão contendo um polímero para auxiliar na suspensão e homogeneidade, como a metilcelulose, e um surfactante para auxiliar a molhagem e na dispersão das partículas, como o Tween 80 (Neervannan, 2006; Li e Zhao, 2007).

Uma vantagem das suspensões frente as soluções é capacidade de veicular altas doses (Li e Zhao, 2007). Contudo, altas doses em suspensão frequentemente têm problemas de estabilidade física, tais como alta viscosidade e agregação, levando a dificuldades na administração, dispersão heterogênea, inconsistência na concentração, e assim, variação na dose (Neervannan, 2006; Li e Zhao, 2007). No entanto o uso das suspensões proporciona uma resposta mais realística do futuro uso oral por meio de formas sólidas, que são a forma farmacêutica mais comum (Li e Zhao, 2007).

Apesar de ter um processo de absorção similar, a administração oral das suspensões nos ensaios pré-clínicos é por meio da gavagem, a qual consiste da introdução do fármaco formulado diretamente no estômago por meio de uma agulha de gavagem ou um tubo (Li e Zhao, 2007).

A absorção, como processo fundamental da farmacocinética, é caracterizada pelos parâmetros, concentração máxima (C_{max}), tempo de ocorrência do C_{max} (t_{max}), a área sob a curva (ASC), e por extensão dessa última, a biodisponibilidade oral (F_{oral}) (Benedetti *et al.*, 2009; Han *et al.*, 2010).

Uma vez que o fármaco resiste ao efeito de primeira passagem, ele chega a veia hepática e torna-se biodisponível para os outros processos, como a distribuição. A distribuição é o processo pelo qual o fármaco é transportado pela circulação sanguínea, permitindo alcançar outros tecidos e órgãos para os quais ele pode (ou não) se mover bidirecionalmente regido por uma constante de distribuição ou livremente (Rowland e Tozer, 1995; Benedetti *et al.*, 2009; Han *et al.*, 2010).

O conceito de retorno do fármaco para o sangue como principal aspecto determinante da distribuição é explicado por Rowland e Tozer (1995) no seguinte exemplo de um fármaco que seja suscetível ao ciclo entero-hepático: O fármaco pode sair da corrente sanguínea, ser armazenado na vesícula biliar e em seguida excretado para transitar no intestino delgado e ser reabsorvido para circulação. Nessa situação, o ciclo é considerado um componente de distribuição e não uma via de eliminação (Rowland e Tozer, 1995).

O parâmetro farmacocinético relacionado à distribuição é o volume de distribuição ou volume de distribuição aparente (V_d). O V_d é o volume aparente que seria necessário para conter todo fármaco do organismo na concentração observada no plasma (Peccinini e Campos, 2015). Assim, o V_d é uma constante de proporcionalidade entre a quantidade de fármaco no corpo e a concentração aferida no plasma. A interpretação fisiológica do V_d é possível, mas requer recorrer a modelos envolvendo a ligação a proteínas e tecidos (Toutain e Bousquet-Melou, 2004).

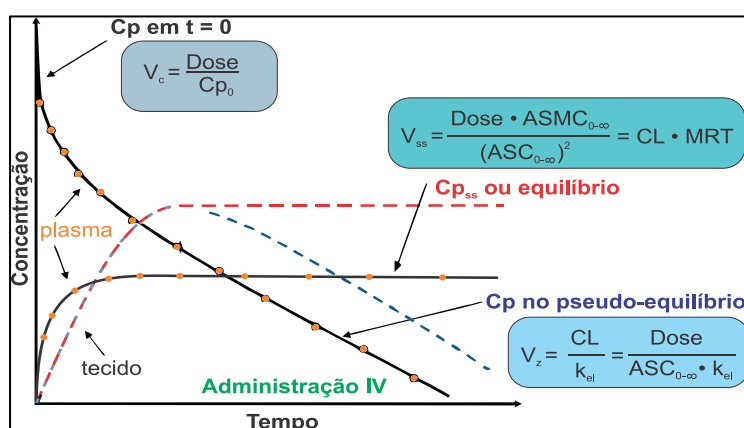


Figura 14. Volumes de distribuição. Adaptado de Smith (2015) e Toutain (2004).

Mais de um volume de distribuição pode ser calculado de acordo com a disposição do fármaco (Figura 14). O volume inicial (V_c) reflete a distribuição

aparente do fármaco logo após administração intravenosa desde que o fármaco se distribua a todos os seus locais de distribuição instantaneamente, ou seja, em um modelo monocompartimental (Toutain e Bousquet-Melou, 2004).

O volume de distribuição terminal (V_z) é calculado pela área sob a curva e pode ser calculado tanto em modelo monocompartimental, quanto em casos onde o modelo bicompartimental foi o que melhor se adaptou aos dados. Em ambos os casos, assume-se um pseudoequilíbrio, pois durante o decaimento das concentrações plasmáticas, há uma redução suave na concentração extravascular. Ou seja, há um equilíbrio relativo entre as concentrações plasmáticas e teciduais, mas não um equilíbrio absoluto já que estão direcionadas ao decaimento. Outra forma de analisar o V_z , mas exclusiva ao modelo bicompartimental é sua tempo-dependência. Devido a menor velocidade de acesso do fármaco ao segundo compartimento, o V_c imediatamente após a administração IV *bolus* se expande em função do tempo até se tornar o valor máximo V_z (Toutain e Bousquet-Melou, 2004).

O volume de distribuição no estado de equilíbrio (V_{ss}) é um volume de distribuição clearance independente, que assume um equilíbrio absoluto do fármaco distribuído. Portanto, o V_{ss} é uma constante de proporcionalidade entre a concentração plasmática no estado de equilíbrio e a quantidade de fármaco no corpo em condições de equilíbrio (taxa de entrada igual a taxa de saída do fármaco). Pode ser obtido pelos momentos estatísticos, que relaciona a dose intravenosa, o quadrado da área sob a curva, e área sob o momento da curva (Toutain e Bousquet-Melou, 2004).

Para os fármacos cuja distribuição ocorre imediatamente, sem nenhum reflexo no perfil de decaimento das concentrações plasmáticas, situação característica ao modelo monocompartimento, os três volumes de distribuição terão valores similares (Toutain e Bousquet-Melou, 2004).

No desenvolvimento de candidatos a fármaco, o V_{ss} é o volume de distribuição mais frequentemente calculado, por estar relacionado a concentrações em estado de equilíbrio, que é o modelo no qual a maioria dos fármacos é desenvolvido. (Smith *et al.*, 2015).

Modificações moleculares estruturais podem ser aplicadas para aumentar ou diminuir o V_{ss} enquanto mantem o clearance, mas o caminho para alcançar esse

objetivo pode ser bastante complexo, necessitando de planejamento e estratégias bem direcionadas. A principal abordagem para modulação de V_{ss} é o controle dos grupos funcionais básicos e da lipofilicidade, de um modo que não altere o clearance intrínseco livre (Smith *et al.*, 2015).

Eventualmente, a distribuição também pode desempenhar papel na resposta farmacológica, embora deva ficar claro que não há necessariamente uma correlação entre um alto volume de distribuição e a atividade farmacológica, apesar de um alto volume de distribuição estar relacionado a extensão de distribuição do fármaco (Benedetti *et al.*, 2009).

Aspectos do volume de distribuição relacionados a ligação a proteínas plasmáticas podem ser vistos no Capítulo 3.

Ao passo que ocorre a distribuição, já está em andamento o processo de metabolismo (ou biotransformação) uma das fases da eliminação. Esse processo pode ser responsável pela eliminação de um fármaco (Tang, 2003), pela ativação de um pró-fármaco (Huttunen *et al.*, 2013), ou ainda, pode ter impacto quase nulo no perfil farmacocinético, quando o fármaco é eliminado por excreção renal (Barr *et al.*, 1995).

O fígado é o principal órgão metabolizador, contudo o metabolismo pode ocorrer também no trato gastrintestinal, pulmões (Han *et al.*, 2010), rins, e até mesmo no sangue (Benedetti *et al.*, 2009).

A função do metabolismo é converter uma molécula que atravessa as membranas biológicas em uma que seja eliminada, geralmente na urina. Cada passo metabólico geralmente reduz a lipofilicidade em relação a molécula predecessora. As reações de metabolismo de fármacos são divididas em duas categorias gerais: reações de fase I e reações de fase II (Silverman e Holladay, 2014).

As transformações de fase I envolvem reações que introduzem ou expõem grupos funcionais, tais como oxidação, redução, carboxilação ou hidrólise e são frequentemente facilitadas pelas enzimas do citocromo P450. As transformações de fase II ligam pequenas moléculas endógenas polares como ácido glucurônico, sulfato, ou aminoácidos aos fármacos ou aos metabólitos de resultantes das transformações de fase I (Silverman e Holladay, 2014).

O metabolismo pode levar a exposição sistêmica de metabólitos possuindo a atividade farmacológica desejada em menor ou maior magnitude que o fármaco matriz. Esses metabólitos podem também apresentar atividades farmacológicas qualitativamente diferentes de seu predecessor. Em alguns casos, torna-se necessário avaliar não apenas a farmacocinética do fármaco matriz, mas também o perfil farmacocinético dos metabólitos ativos, para obter uma melhor correlação entre as concentrações e efeito (Han *et al.*, 2010).

No ambiente do desenvolvimento de novos fármacos, uma recente mudança no *status quo* dos ensaios relacionados a segurança de metabólitos levou a farmacocinética e a análise bioanalítica mais um passo adiante em sua importância nas fases iniciais de desenvolvimento. Ficou estabelecido pelo *guideline M3(R2) on non-clinical safety studies for the conduct of human clinical trials and marketing authorisation for pharmaceuticals* (Ich, 2009) e também pelo *Guidance for industry Safety Testing of Drug Metabolites* (Fda, 2008), entre outras coisas, que seja demonstrada a segurança de metabolitos circulantes observados em humanos que representem 10% ou mais que a exposição relacionada ao fármaco. Assim, quanto antes no desenvolvimento de fármacos, esses metabólitos, caso existam, forem conhecidos, mais tempo haverá para avaliá-los realizando os ensaios extras sem atrasos no projeto de desenvolvimento (Pellegatti, 2012).

A outra face da eliminação de um fármaco é a excreção, processo pelo qual uma substância é removida do corpo para o ambiente externo. O fígado, mas principalmente os rins são os mais importantes órgãos excretores, havendo ainda, uma pequena contribuição de outras vias de excreção, como a expiração, suor, lágrimas, leite, cabelo e unhas (Benedetti *et al.*, 2009)

.Os mecanismos fisiológicos mais comuns de excreção de fármacos são a filtração glomerular e a secreção tubular, proporcionado pelos rins, e secreção pela via biliar, realizada no fígado (Han *et al.*, 2010).

De forma conjunta, os processos de metabolismo e excreção representam a eliminação, que é a remoção irreversível do fármaco da circulação sistêmica, ou seja, indisponível para causar o efeito farmacológico. Isso se limita a cada substância individualmente, portanto a presença de um metabólito é prova de que o

fármaco matriz foi eliminado, mesmo que este ainda precise ser excretado (Tsaïoun e Kates, 2011).

O parâmetro farmacocinético relacionado à eliminação é o clearance (Cl), mais especificamente o clearance plasmático, que pode ser definido como o volume de plasma que é livrado do fármaco por unidade de tempo. Como supramencionado, são vários os mecanismos de remoção de fármacos da circulação assim, para remoção hepática, há o clearance hepático (Cl_H) e para a remoção renal há o clearance renal (Cl_r). Em geral, exceto se houver evidencia em contrário os outros mecanismos de clearance podem ser negligenciados. Por conseguinte, o clearance plasmático total (ou corporal) é a soma de Cl_H e Cl_r (Toutain e Bousquet-Mélou, 2004).

Apesar de presente em quase 100% das publicações que apresentam estudos de farmacocinética, poucas vezes se observa uma interpretação individual desse parâmetro, mesmo que isso seja facilmente alcançado por meio do cálculo da taxa de extração corporal, permitindo inclusive inferir a magnitude do clearance obtido no perfil farmacocinético conduzido (Toutain e Bousquet-Mélou, 2004).

Os estudos de estabilidade metabólica *in vitro* e a obtenção estimada do clearance intrínseco *in vivo* permitem um aperfeiçoamento racional de propriedades farmacocinéticas dos candidatos a fármaco, auxiliando no sucesso de seu desenvolvimento. Entretanto a estimativa do clearance intrínseco *in vivo* a partir do clearance intrínseco *in vitro* ainda tem limitações que podem levar a 80 vezes de diferença entre o valor estimado e o observado (Chiba, Ishii e Sugiyama, 2009).

As avaliações por meio de experimentos *in vitro* fornecem informações valiosas para o início do planejamento dos estudos *in vivo*, porém é necessário ter cautela, pois são ensaios conduzidos em ambiente controlado e de complexidade limitada, diferente do ambiente fisiológico. Por exemplo, nas fases iniciais do desenvolvimento de fármacos não existem informações sobre os mecanismos de biotransformação dos candidatos a fármacos e sua importância em relação a outros mecanismos de clearance. Somente através dos estudos *in vivo* os aspectos das interações fármaco-organismo podem ser satisfatoriamente observados (Masimirembwa, Bredberg e Andersson, 2003; Singh, 2006). Segundo Singh (2006):

“a farmacocinética é um importante fator no destino de um fármaco na clínica. Assim os compostos devem ser submetidos a tantas verificações *in vivo* quanto possível”.

Além disso, o clearance também é o ponto chave dos métodos de determinação da primeira dose humanos, abordagem necessária a qualquer fármaco que pretenda chegar a estudos clínicos de fase I. Como a extrapolação através das espécies animais dos estudos pré-clínicos para estimar o clearance em humanos, na correlação entre os clearances das espécies pré-clínicas e as respectivas doses administradas, ou na relação entre a área sob a curva do modelo animal que apresentou a menor NOAEL (*no observed adverse effect level* ou dose de efeito adverso não observado) com o clearance estimado em humanos, levando a dose equivalente em humanos (HED ou *human equivalente dose*) (Mahmood, Green e Fisher, 2003).

Por ser o determinante da quantidade e do intervalo de administração dos fármacos no regime de dose, o clearance pode ser considerado o parâmetro farmacocinético mais importante, como pode ser observado na Equação 7

Equação 7

$$\frac{Dose}{\tau} = \frac{Cl \times C_{pss_{alvo}}}{F}$$

onde dose é quantidade a ser administrada, τ (tau) é intervalo de administrações, Cl é o clearance plasmático, $C_{pss_{alvo}}$ é concentração efetiva média necessária para obter a resposta clínica desejada e F é fração biodisponível de uma dose administrada por via extravascular (Toutain e Bousquet-Mélou, 2004).

Segundo Toutain e Bousquet-Mélou (2004) a inspeção da Equação 7 apresenta a dose mais como uma variável PK/PD do que um parâmetro do fármaco, já que é influenciado pelo clearance (parâmetro PK), pela biodisponibilidade (variável PK), e por um parâmetro farmacodinâmico (PD), que é a concentração alvo, a qual reflete a potência do fármaco *in vivo*.

A dose administrada de um fármaco está relacionada à sua concentração no plasma e na biofase, que é sua farmacocinética, e a farmacodinâmica liga as concentrações observadas ou modeladas com o efeito terapêutico. Desde que o efeito em função do tempo não pode ser modelado *per se*, sua estimativa na variação de doses e estratégias só pode ser realizada na integração entre farmacocinética e farmacodinâmica (PK/PD) (Calvo *et al.*, 2006). Na definição de

Holford (1995), a farmacocinética é a ciência que permite a previsão da evolução no tempo do efeito do fármaco, transformando as concentrações em seu efeito através da farmacodinâmica.

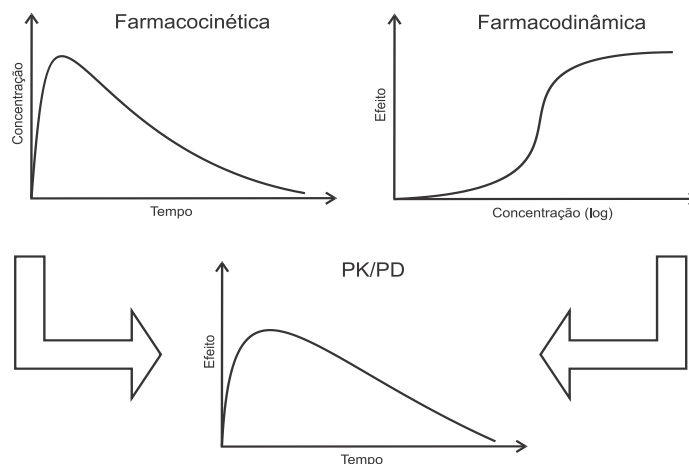


Figura 15. Inter-relação entre farmacocinética, farmacodinâmica e PK/PD. Adaptado de Meihbohm e Derendorf (1997)

Como a farmacocinética estuda a relação entre as concentrações plasmáticas de fármaco em função do tempo e a farmacodinâmica estuda a intensidade do efeito em função da concentração de fármaco, podemos dizer que o modelamento PK/PD cria uma ponte de ligação entre essas áreas, frequentemente distintas, permitindo sua aproximação para descrever o fenômeno de efeito em função da variável independente tempo (Derendorf e Meibohm, 1999).

No trabalho de Wang e colaboradores (2007) foi validado um protocolo de avaliação de um fármaco com atividade inibidora da liberação de TNF- α estimulada por lipopolissacarídeo (LPS) em ratos. Esse protocolo correlaciona o efeito redutor da liberação de TNF- α e a farmacocinética do fármaco para obter o modelo PK/PD proporcionando a integração da farmacocinética com a potência *in vivo* de fármacos para os quais se espera essa resposta.

A utilização de LPS como forma de elevar a citocina inflamatória TNF- α pode levar a alteração de parâmetros bioquímicos, principalmente hepáticos, como as enzimas transaminase pirúvica (TGP) e transaminase oxalacética (TGO) (Miyoshi *et al.*, 2011). Isso devido a uma ação mediada pelo próprio TNF- α (Czaja, Xu e Alt, 1995; Morio *et al.*, 2001), portanto é natural supor que uma ação inibitória do

aumento dos níveis de TNF- α pode ter efeito redutor na alteração hepática causada pelo LPS. Ainda, o óxido nítrico (NO) também pode causar um efeito hepatoprotetor, que pode ser mediado pela inibição de TNF- α (Morio *et al.*, 2001).

Neste capítulo estão detalhados os experimentos realizados *in vivo*, mais precisamente em modelos animais, que incluem o estudo do perfil farmacocinético do LAPDESF-SCD03, um estudo de relação farmacocinética e farmacodinâmica, além de uma avaliação preliminar de sua segurança renal e hepática, observando principalmente se o fármaco teste seria capaz de atenuar a alteração hepática causada pelo LPS.

4-1. Material e métodos

4-1.1 Reagentes, fármacos e solventes

O LAPDESF-SCD03 foi obtido no laboratório de pesquisa e desenvolvimento de novos fármacos (LAPDESF) da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP de Araraquara. A água ultrapura foi obtida por sistema Milli-Q (Millipore®). Outros reagentes, fármacos e solventes, incluíram:

- Acetonitrila, J. T. Backer;
- Propilenoglicol, Synth;
- Polietilenoglicol 400, Synth;
- N-metil-pirrolidona, Synth;
- Metilcelulose, Sigma-Aldrich;
- Tween 80, Synth.

4-1.2 Equipamentos

- Mini-centrífuga, Gilson;
- Banho-maria 1147, Fanem;
- Leitor de placas PowerWave HT, Biotek®;

4-1.3 Correlatos

- Kit Elisa KRC3012, Invitrogen®;

- Kit transaminase oxalacética (ref. 52), Labtest[®];
- Kit transaminase pirúvica (ref. 53), Labtest[®];
- Kit creatinina (ref. 35), Labtest[®];
- Kit uréia UV liquiform (ref. 104), Labtest[®];

4-1.4 Softwares

- Phoenix WinNonlin 6.3, Pharsight[®];
- Gen 5 versão 2.0, Biotek[®];
- Prism 5, GraphPad[®];

4-1.5 Veiculação da nova molécula

Para o ensaio de farmacocinética, a utilização de um veículo que permita a dissolução do fármaco é preferencial, exceto no grupo cuja administração será pela via intravenosa, onde uma solução é imprescindível. Como observado pelos ensaios de solubilidade em água previamente apresentados, uma solução em água pura não seria possível. Na administração pela via oral há a possibilidade de veicular o fármaco por uma suspensão, como foi feito no trabalho de Dos Santos e colaboradores (2011).

Para o grupo da via intravenosa foi utilizada uma mistura de n-metil-pirrolidona, polietilenoglicol 400 e propilenoglicol na proporção de 10:40:50 (v/v/v), essa mistura foi selecionada devido a sua capacidade de não alterar as concentrações de TNF- α (Wang *et al.*, 2007), permitindo a manutenção do mesmo veículo no ensaio de atividade farmacológica.

O preparo se iniciou com a mistura dos constituintes do veículo, seguida da adição de 11 mg de fármaco, agitação da mistura em vórtex por 5 minutos e banho ultrassônico por 20 minutos sem aquecimento. Em seguida essa mistura foi filtrada em membrana de PTFE (0,22 μ m) e quantificada. Para garantir a reprodutibilidade da solução, seu preparo foi avaliado em triplicata em dois dias diferentes e não consecutivos. O teor aferido da pré-formulação foi de 5,2 mg/mL com desvio padrão relativo de 3,2 %, que foi administrada em 1 mL/kg, levando a dose final de 5,2 mg/kg.

Na administração oral, a pré-formulação consistiu de uma suspensão aquosa com 2% tween 80 e 0,5% metilcelulose. A concentração da suspensão foi de 3,6 mg/mL no ensaio piloto com volume administrado de 5 mL/kg (18 mg/kg), e 30 mg/mL no ensaio final com volume administrado de 10 mL/kg levando a dose proposta de 300 mg/kg.

4-1.6 Protocolo Experimental

Foram utilizados ratos Wistar, com peso aproximado de 200-250 g, provenientes do biotério central da Universidade Estadual Paulista-UNESP. Os animais foram transferidos para o biotério do Departamento de Princípios Ativos Naturais e Toxicologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP de Araraquara, onde foram mantidos em condições controladas de temperatura ($23 \pm 1^\circ$ C), umidade ($55 \pm 5\%$) e luz (ciclo 12/12h, luzes acesas as 07h) e com ração balanceada e água ad libitum. Os experimentos foram realizados na fase de claro. O protocolo para uso de animais descrito nesse projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP/Araraquara, protocolo CEUA/FCF/CAr nº 34/2012 com parecer nº 58/2012 (Anexo II) e protocolo CEUA/FCF/CAr nº 06/2014 com parecer nº 11/2014 (Anexo III).

Como os derivados ftalimídicos são resultado de uma hibridação, possuem características derivadas tanto da hidroxiuréia quanto da talidomida. A dose mínima em humanos da hidroxiuréia é de 10 mg/kg, que convertida para ratos por extrapolação alométrica resulta em 40,88 mg/kg (537 μ mol/kg) (Lanzkron *et al.*, 2008). A talidomida não possui estudo de uso clínico ou pré-clínico na anemia falciforme, entretanto seu análogo estrutural, pomalidomida foi estudada em camundongos transgênicos para anemia falciforme, em a dose utilizada foi de 10 mg/kg, que convertida para ratos por extrapolação alométrica, resulta em 5,94 mg/kg (21,76 μ mol/kg) (Meiler *et al.*, 2011).

Nos ensaios de Dos Santos e colaboradores (2011) foram utilizadas doses de 100 (29,8 mg/kg) e 300 (89,4 mg/kg) μ mol/kg em camundongos, de acordo com o ensaio. Assim, seria utilizada para o ensaio de farmacocinética e de relação PK/PD uma dose de 60 μ mol/kg (18 mg/kg), resultante da extrapolação alométrica da dose de 100 μ mol/kg utilizada em camundongos. Contudo, a limitação de solubilidade

levou a redução da dose a ser administrada pela via intravenosa para 5,2 mg/kg (17,4 $\mu\text{mol/kg}$). Na administração pela via oral a dose de 18 mg/kg não apresentou níveis quantificáveis em estudo piloto, sendo em seguida elevada para 300 mg/kg.

A avaliação preliminar de segurança foi realizada nos animais que receberam administração do fármaco na dose de 300 mg/kg, mesmo grupo do ensaio de relação PK/PD pela via oral, contudo as amostras para essa avaliação foram coletadas 24 horas após administração do fármaco (Miyoshi *et al.*, 2011). Os grupos estão detalhados nos texto subsequentes.

Para o calculo do tamanho da amostra adotamos o método publicado por Chow e Wang (2001). Tal procedimento considera o nível de significância, o poder do teste e coeficiente de variação do parâmetro a ser estudado. Calculamos o tamanho amostral mínimo, com nível de significância de 0,05 e poder de 80%. O n considerado para início dos cálculos foi de 5 para os ensaios de farmacocinética, baseado na publicação de Yang e colaboradores (2005), e de 4 para o ensaio de atividade inibitória de TNF- α baseado na publicação de Wang e colaboradores (2007). Para ambos os estudo, o tamanho da amostra foi de 5.

4-1.7 Implantação cirúrgica de cânulas em veia e artéria femorais

A administração de fármacos e coleta seriada de sangue necessária aos estudos de farmacocinética requer acesso a veias e artérias de maneira precisa, garantindo a administração intravenosa e a coleta do material biológico no volume e tempo estabelecidos em protocolo. Desta forma, os animais submetidos ao experimento receberam o implante de cânulas por um procedimento cirúrgico.

Para a realização desse procedimento, os animais foram anestesiados através da administração intraperitoneal de uma associação contendo xilazina (5,5 mg/kg) e cetamina (73mg/kg). Em seguida foi realizada a tricotomia da face ventral da parte superior da pata traseira e da região dorsal próxima à nuca, onde a cânula foi externada. Uma incisão foi realizada na face ventral superior da pata traseira, onde por tato encontrou-se a pulsação da artéria femoral, e em seguida o feixe vaso-nervoso foi exposto. No feixe, o vaso a ser canulado foi isolado e através de pequena secção fez-se a inserção do tubo de polietileno P-10 fundido a um tubo polietileno P-50 e preenchido com heparina 100UI/mL em soro fisiológico para evitar

coagulação. Com auxílio de um trocater externou-se a cânula na região cervical do animal entrelaçando-a pela sutura do local. A face ventral da parte superior da pata traseira, onde a cânula foi implantada, foi suturada e o animal foi mantido em recuperação por um período de 24 horas. Após esse período o animal foi utilizado, sem superar o período máximo de 72 horas depois de finalizado a recuperação (Mactutus, Herman e Booze, 1994; De Paula *et al.*, 1999; Braga *et al.*, 2007; Tong, Ratnaraj e Patsalos, 2007; Loeffelbein *et al.*, 2010).

4-1.8 Estudo de farmacocinética pré-clínica

Os animais receberam LAPDESF-SCD03 por via intravenosa ou oral (gavagem) e foram submetidos a coletas seriadas através de cânula implantada na artéria femoral. Durante as coletas, os animais foram mantidos em caixas de polipropileno individuais para prevenir perda da cânula por intervenção de outros animais, recebendo água *ad libitum*. Em cada tempo de coleta foram coletados 0,1 mL de sangue, em seguida o plasma foi separado e armazenado até análise, respeitando-se as condições estabelecidas no estudo de validação.

4-1.8.1 Desenho experimental do estudo de farmacocinética pré-clínica

Abaixo estão descritos os grupos que resultaram no cálculo dos parâmetros farmacocinéticos de LAPDESF-SCD03 pelas vias intravenosa e oral em ratos Wistar.

Grupo PK IV LAPDESF-SCD03: tratados com 5,2 mg/kg de LAPDESF-SCD03 em mistura de n-metil-pirrolidona, polietilenoglicol 400 e propilenoglicol na proporção de 10:40:50 (v/v/v) via intravenosa. Coletas foram realizadas nos tempos 5, 10, 15, 20, 30, 45 e 60 minutos. Foram obtidas 5 amostras em cada tempo de coleta (n=5).

Grupo PK p.o. LAPDESF-SCD03: tratados com 300 mg/kg de LAPDESF-SCD03 em suspensão aquosa com 2% tween 80 e 0,5% metilcelulose via gavagem. Coletas foram realizadas nos tempos 10, 20, 30, 45, 60, 90, 120 e 150 minutos. Foram obtidas 5 amostras em cada tempo de coleta (n=5).

4-1.8.2 Análise Farmacocinética

Os parâmetros farmacocinéticos foram primeiramente calculados pelo método gráfico. Um modelo monocompartimental foi o que melhor se adaptou a curva de decaimento das concentrações plasmáticas em função do tempo, tanto para administração intravenosa, quanto para administração oral. Os parâmetros constante de eliminação (k_{el}), constante de absorção (k_a), meia-vida de absorção ($t_{1/2a}$), meia-vida de eliminação ($t_{1/2}$), área sob a curva de 0 ao último tempo (ASC_{0-t}), área sob a curva de 0 extrapolada ao infinito ($ASC_{0-\infty}$), biodisponibilidade (F), clearance (Cl), volumes de distribuição (V_{dc} , V_{dz} , V_{ss}), área sob o momento da curva de 0 ao último tempo ($ASMC_{0-t}$), área sob o momento da curva de 0 extrapolada ao infinito ($ASMC_{0-\infty}$) e tempo de residência médio (MRT) foram calculados por equações previamente publicadas (Gabrielsson e Weiner, 2006; Campos, 2012; Fan e De Lannoy, 2014). Os parâmetros concentração máxima (C_{max}) e tempo de ocorrência da concentração máxima (t_{max}) foram obtidos diretamente dos valores experimentais da curva de concentração por tempo.

Os valores de k_{el} e V_{dc} da administração intravenosa e os parâmetros k_{el} , k_a e V_{dc} da administração oral calculados pelo método gráfico foram utilizados como estimativas de parâmetro iniciais para o cálculo dos parâmetros farmacocinéticos por meio do *software* WinNonlin versão 6.3.

4-1.8.3 Análise Estatística

Os parâmetros farmacocinéticos estão apresentados como médias e medianas com intervalo de confiança de 95% (IC95%). Nenhuma comparação estatística foi realizada.

4-1.9 Estudo de relação farmacocinética/farmacodinâmica (PK/PD)

Nesse estudo o LAPDESF-SCD03 foi administrado em ratos com elevação de TNF- α induzida por administração de lipopolissacarídeo (LPS) de acordo com Wang e colaboradores (2007). O LPS (100 μ g/kg) foi administrado intravenosamente e coletas de sangue para quantificação de TNF- α e de LAPDESF-SCD03 foram realizadas em tempos específicos.

Os animais receberam LAPDESF-SCD03 por via intravenosa ou por via oral (gavagem) e foram submetidos a coletas seriadas através de cânula implantada na

artéria femoral. Durante o estudo os animais foram mantidos em caixas de polipropileno individuais para prevenir perda da cânula por intervenção de outros animais, recebendo água *ad libitum*. Em cada tempo de coleta foram coletados volumes variáveis de sangue, dependendo se a coleta era exclusiva para análise de LAPDESF-SCD03 ou também para análise de TNF- α . Após cada coleta, o plasma foi separado e armazenado até análise, respeitando-se as condições estabelecidas no estudo de validação e na bula do kit KRC3012 para análise de TNF- α de rato Wistar.

O volume máximo de sangue coletado foi de 3 mL, abaixo do volume necessário para causar um choque hipovolêmico e sem alterações hemodinâmicas que possam alterar o cálculo da meia-vida, já que o último ponto de coleta para a farmacocinética foi realizado em menos de 24 horas (Diehl *et al.*, 2001). Ainda, o hematócrito pré ($41,0 \pm 4,39$) e pós-coletas ($36,8 \pm 4,51$), foram ambos considerados dentro da normalidade com base nos valores publicados por Branco e colaboradores (2011).

4-1.9.1 Quantificação de TNF- α em plasma

Para essa análise foi utilizado *kit* para quantificação específica de TNF- α de ratos Wistar por ELISA e as leituras foram feitas em leitor de placas de 96 poços Biotek®, modelo powerwave HT, sob o comprimento de onda de 450 nm. As amostras de sangue foram coletadas, o plasma foi separado e uma alíquota foi utilizada para a quantificação de TNF- α .

4-1.9.2 Desenho experimental do estudo de relação PK/PD

O estudo de relação PK/PD consistiu de 3 experimentos individuais. Em dois deles o LAPDESF-SCD03 foi administrado pela via intravenosa diferindo pelo momento de administração do estimulador da formação de TNF- α , e no terceiro o LAPDESF-SCD03 foi administrado pela via oral (gavagem), seguido da administração intravenosa de LPS.

4-1.9.2.1 Inibição de TNF- α pela via IV com LPS pós-administrado

Nesse ensaio o fármaco ou veículo foi administrado no tempo 0 e o LPS em 15 minutos após a administração do fármaco ou veículo. Para esse estudo foram necessários os seguintes grupos.

Grupo PK/PD IV veículo+LPS: foi administrado 1 mL/kg da mistura de n-metil-pirrolidona, polietilenoglicol 400 e propilenoglicol na proporção de 10:40:50 (v/v/v) e 15 minutos depois foi administrado 100 μ g/kg de LPS. Coletas foram realizadas nos tempos 45, 60, 90, 120 e 180 minutos a contar da administração do veículo. Para cada tempo de coleta foram realizadas 5 replicatas (n=5).

Grupo PK/PD IV LAPDESF-SCD03+LPS: tratados com 5,2 mg/kg de LAPDESF-SCD03 em mistura de n-metil-pirrolidona, polietilenoglicol 400 e propilenoglicol na proporção de 10:40:50 (v/v/v) e 15 minutos depois foi administrado 100 μ g/kg de LPS. Coletas foram realizadas nos tempos 5, 10, 20, 30, 45, 60, 90, 120 e 180 minutos a contar da administração de LAPDESF-SCD03. Para cada tempo de coleta foram realizadas 5 replicatas (n=5).

4-1.9.2.2 Inibição de TNF- α pela via IV com LPS pré-administrado

Nesse ensaio o fármaco ou veículo foi administrado no tempo 40 min após a administração de LPS. Para esse estudo foram necessários os seguintes grupos.

Grupo PK/PD IV LPS+veículo: foi administrado a mistura 1 mL/kg de n-metil-pirrolidona, polietilenoglicol 400 e propilenoglicol na proporção de 10:40:50 (v/v/v) 40 minutos depois de administrado os 100 μ g/kg de LPS, ambos pela via intravenosa. Coletas foram realizadas nos tempos 30, 45, 60, 90, 120 e 180 minutos a contar da administração de LPS. Para cada tempo de coleta foram realizadas 5 replicatas (n=5).

Grupo PK/PD IV LPS+LAPDESF-SCD03: tratados com 5,2 mg/kg de LAPDESF-SCD03 em mistura de n-metil-pirrolidona, polietilenoglicol 400 e propilenoglicol na proporção de 10:40:50 (v/v/v) 40 minutos depois de administrado os 100 μ g/kg de LPS, ambos pela via intravenosa. Coletas foram realizadas nos tempos 30, 45 (5 min para o fármaco), 50 (10 min para o fármaco), 60 (20 min para o

fármaco), 70 (30 min para o fármaco), 85 (45 min para o fármaco), 90, 120 e 180 minutos a contar da administração de LPS. Para cada tempo de coleta foram realizadas 5 replicatas (n=5).

4-1.9.2.3 Inibição de TNF- α pela via oral com LPS pós-administrado

Nesse ensaio o fármaco ou veículo foi administrado pela via oral (gavagem) no tempo 0 min e o LPS foi administrado pela intravenosa 15 minutos após a administração do fármaco ou veículo. Para esse estudo foram necessários os seguintes grupos.

Grupo PK/PD oral veículo+LPS: foi administrado 10 mL/kg da suspensão aquosa com 2% tween 80 e 0,5% metilcelulose pela via oral e 100 μ g/kg de LPS IV em 15 minutos após a administração do veículo. Coletas foram realizadas nos tempos 30, 45, 60, 90, 120 e 180 minutos a contar da administração do veículo. Para cada tempo de coleta foram realizadas 5 replicatas (n=5).

Grupo PK/PD oral LAPDESF-SCD03+LPS: tratados com 300 mg/kg de LAPDESF-SCD03 em suspensão aquosa com 2% tween 80 e 0,5% metilcelulose pela via oral e 100 μ g/kg de LPS IV em 15 minutos após a administração do fármaco. Coletas foram realizadas nos tempos 15, 30, 45, 60, 90, 120, 150 e 180 minutos a contar da administração do fármaco. Para cada tempo de coleta foram realizadas 5 replicatas (n=5).

4-1.9.3 Análise farmacodinâmica

Uma curva de concentração de TNF- α por tempo foi construída para cada grupo que recebeu veículo (controle) e para cada grupo que recebeu o fármaco (tratado). As áreas sob a curva da concentração de TNF- α pelo tempo de 0 ao último tempo analisado foram utilizadas para expressar a redução ocorrida na exposição global ao TNF- α causada pelo tratamento com LAPDESF-SCD03. A curva de inibição pelo tempo foi construída utilizando-se a diferença percentual entre a média das concentrações do grupo controle em relação ao grupo tratado. Enquanto a inibição total é a diferença percentual entre a média das áreas sob a curva do grupo controle em relação ao grupo tratado.

4-1.9.4 Análise Estatística

As concentrações de TNF- α estão apresentadas através das médias com intervalo de confiança de 95% (IC95%). Assim as áreas sob a curva de TNF- α por tempo, que por sua vez, foram comparadas estatisticamente entre os grupos controle e tratado por teste t de Student unilateral com um nível de significância (α) de 0,05. A hipótese nula (H_0) foi de que a área sob curva de TNF- α observada no grupo tratado não é menor que a área sob curva observada no grupo controle, portanto a hipótese alternativa (H_1) foi de que a área sob curva de TNF- α do grupo tratado é menor que a área sob a curva do grupo controle. Assim, se a probabilidade de se obter uma estatística de teste igual ou mais extrema que aquela observada em uma amostra (valor-p) for menor que o nível de significância, a hipótese nula será rejeitada.

4-1.9.5 Análise farmacocinética/farmacodinâmica

Os parâmetros farmacocinéticos necessários a construção da relação PK/PD foram calculados como descrito na análise farmacocinética do estudo de farmacocinética pré-clínica (4-1.8.2 Análise Farmacocinética).

Os valores de inibição de TNF- α obtidos com o tratamento com LAPDESF-SCD03, independentemente da ocorrência de rejeição da hipótese nula na análise estatística, foram relacionados com o perfil farmacocinético do LAPDESF-SCD03 para obtenção do EC50, ou seja, a concentração que de acordo com o experimento é capaz de inibir a liberação de TNF- α em 50%. Para alcançar esse resultado, o modelo que melhor se adaptou aos dados foi a equação de Hill, um modelo Emax sigmoidal (Equação 8).

Equação 8

$$E = \frac{E_{max} \cdot C^\gamma}{EC_{50}^\gamma + C^\gamma}$$

Onde E é o efeito na concentração C, Emax é o efeito máximo, EC50 é a concentração que leva a metade do efeito máximo e γ é o fator de Hill ou fator de declividade.

4-1.10 Avaliação preliminar de segurança hepática e renal

Para essa avaliação foram coletadas amostras dos mesmos animais do estudo de relação farmacocinética/farmacodinâmica. As amostras foram coletadas 24 horas após a administração do veículo ou fármaco. Essa avaliação se limitou aos animais do estudo de relação farmacocinética/farmacodinâmica devido a baixa biodisponibilidade observada no estudo de farmacocinética, quando ainda era pretendido realizar o ensaio de segurança em estudo de doses repetidas. Assim, os animais do estudo de farmacocinética pré-clínica não tiveram amostras coletadas para essa avaliação preliminar de segurança.

Os resultados da avaliação preliminar de segurança representam dois grupos, a saber:

Grupo segurança controle: tratados com 10 mL/kg da suspensão aquosa com 2% tween 80 e 0,5% metilcelulose pela via oral e 100 µg/kg de LPS IV em 15 minutos após a administração do veículo (n=5).

Grupo segurança tratado com LAPDESF-SCD03: tratados com 300 mg/kg de LAPDESF-SCD03 em suspensão aquosa 2% tween 80 e 0,5% metilcelulose pela via oral e 100 µg/kg de LPS IV em 15 minutos após a administração do fármaco (n=5).

4-1.10.1 Determinação dos parâmetros bioquímicos hepáticos e renais

A atividade das enzimas transaminase pirúvica (TGP) e transaminase oxalacética (TGO), como biomarcadores da função hepática, foram quantificadas por método colorimétrico - reação de Reitman e Frankel - utilizando-se kits Labtest® Ref. 52 e 53, respectivamente. Ainda, foram avaliados os parâmetros bioquímicos ureia (kit Labtest® Ref. 104) e creatinina (kit Labtest® Ref. 35), como indicadores da função renal na avaliação preliminar de segurança. As análises foram realizadas em leitor de placas Powerwave HT da Biotek®.

4-1.10.2 Análise estatística

Os resultados dos parâmetros bioquímicos estão apresentados como média e intervalo de confiança 95%.

Os grupos controle e tratado foram comparados estatisticamente por teste t de Student bilateral com um nível de significância (α) de 0,05. A hipótese nula (H_0) foi de que os resultados para cada parâmetro bioquímico observados no grupo tratado não são diferentes dos resultados para o mesmo parâmetro bioquímico observados no grupo controle, portanto a hipótese alternativa (H_1) foi de que eles são diferentes. Assim, se a probabilidade de se obter uma estatística de teste igual ou mais extrema que aquela observada em uma amostra (valor-p) for menor que o nível de significância, a hipótese nula será rejeitada.

4-2. Resultados e discussão

4-2.1 Perfil farmacocinético de LAPDESF-SCD03

A solução de LAPDESF-SCD03 foi administrada intravenosamente na dose de 5,2 mg/kg (1mL/kg) e via gavagem na dose de 300 mg/kg (10 mL/kg). As análises das amostras coletadas a partir da artéria femoral permitiram a construção das curvas de concentração plasmática *versus* tempo que podem ser observadas na Figura 16.

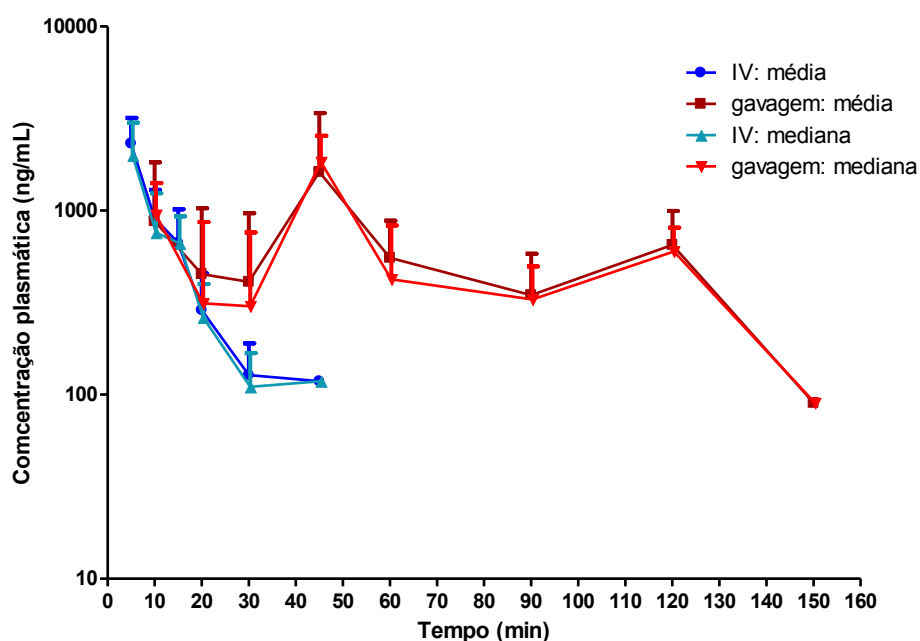


Figura 16. Perfil farmacocinético de LAPDESF-SCD-03 após administração intravenosa de 5,2 mg/kg e via gavagem de 300 mg/kg. Média + IC95 e mediana + quartil .

A menor variabilidade geral com maior concordância entre a média e a mediana para o grupo que recebeu o fármaco pela via intravenosa é comum se considerarmos que o processo de absorção é um fator a mais na variabilidade das concentrações que são observadas na curva de concentração plasmática pelo tempo. Contudo, nesse estudo podemos considerar, ainda, a variabilidade imposta pelo uso de uma suspensão no grupo que recebeu o fármaco pela via oral, já que alcançar uma dose uniforme e exata é mais difícil no uso de suspensões frente ao uso de soluções.

Assim, a partir da variabilidade inerente ao uso de suspensões, há ainda a baixa solubilidade em meio aquoso, o processo de absorção propriamente dito, e o efeito de primeira passagem, todos culminando em uma variabilidade elevada das concentrações plasmáticas do grupo oral. Em fármacos de meia-vida longa, principalmente em se tratando da alta estabilidade metabólica e da baixa excreção inalterado, haveria um acúmulo de fármaco na biofase de eliminação até o momento em que a influência dos processos que elevam as concentrações plasmáticas seria negligenciável, o que provavelmente, reduziria essa variabilidade.

Tabela 9. Parâmetros farmacocinéticos de LAPDESF-SCD03 em ratos após administração intravenosa de 5,2 mg/kg e oral de 300 mg/kg.

Parâmetros	IV		Oral	
	Média	±IC 95%	Média	±IC 95%
Cmax (ng/mL)	2317.24	873.68	1635.18	1042.36
tmax (min)	5		53	50.17
ka (min ⁻¹)			0.032	0.031
t _{1/2a} (min)			33.86	46.59
k _{el} (min ⁻¹)	0.115	0.026	0.020	0.024
t _{1/2} (min)	6.20	1.61	60.49	58.84
ASC _{0-t} (µg/mL.min)	30.65	11.70	68.77	32.60
ASC _{0-∞} (µg/mL.min)	31.75	11.83	114.52	99.90
Razão ASC	0.96	0.01	0.70	0.31
F _{0-∞} (%)			6.48	5.65
Cl (mL/min.kg)	174.74	57.36	169.65	0.00
V _{dc} (mL/kg)	1627.07	374.56		
V _{dz} (mL/kg)	1513.29	337.07	14807.21	14404.48
V _{ss} (mL/kg)	1383.5	313.8		
AUMC _{0-t} (µg/mL.min ²)	224.72	143.97	3975.48	2409.60
AUMC _{0-∞} (µg/mL.min ²)	269.26	168.04	16719.37	28649.59
MRT (min)	8.17	2.05	112.11	87.90

Um modelo monocompartimental foi aplicado considerando o decaimento das concentrações na fase de eliminação. Isso permitiu o cálculo dos parâmetros farmacocinéticos elencados na Tabela 9.

Além do cálculo pelo método gráfico, o uso de softwares especializados para análise farmacocinética é comum, e entre os mais utilizados está o software WinNonlin. Na entrada de dados desse software um ponto que pode melhorar a qualidade dos resultados é o uso das estimativas iniciais dos parâmetros constante de eliminação (k_{el}) e volume de distribuição (V_d) para perfis de administrações intravenosas, além da constante de absorção (k_a) para perfis de administrações pela via oral. Os valores utilizados como estimativas iniciais para esse estudo estão elencados na Tabela 10, que foram obtidos graficamente.

Tabela 10. Estimativas iniciais dos parâmetros farmacocinéticos primários.

Animal	IV		Oral		
	k_{el} (min^{-1})	V_{dc} (mL/kg)	k_{el} (min^{-1})	V_{dz}/F (mL/kg)	k_a (min^{-1})
1	0.126	1190.59	0.005	239976.5	0.009
2	0.083	1498.43	0.014	383140.6	0.034
3	0.140	1654.58	0.018	134216.3	0.027
4	0.116	1972.24	0.054	67304.62	0.056
5	0.111	1819.52	0.011	455199.1	0.032

A partir dos perfis farmacocinéticos individuais e dessas estimativas iniciais, a análise farmacocinética foi realizada, levando aos parâmetros apresentados na Tabela 11.

Entre os parâmetros farmacocinéticos observados para o LAPDESF-SCD03 após administração pela via intravenosa, destacam-se a meia-vida curta e o clearance elevado. A meia-vida curta não surpreende devido à observação de uma hidrólise rápida no estudo *ex vivo* realizado anteriormente. Na administração oral houve um aumento expressivo no volume de distribuição devido a ser calculado pelo método da área, que sofre influência dos valores obtidos para a constante de eliminação, os quais são muito menores que aqueles observados na administração intravenosa.

Tabela 11. Parâmetros farmacocinéticos de LAPDESF-SCD03 em ratos após administração intravenosa de 5,2 mg/kg e oral de 300 mg/kg, calculados pelo software WinNonlin 6.3.

Parâmetros	IV		Oral	
	Média	±IC 95%	Média	±IC 95%
C _{max} (ng/mL)	4747.53	1628.26	1091.50	586.13
t _{max} (min)	0		45.306491	37.74
k _a (min ⁻¹)			0.081	0.212
t _{1/2 a} (min)			31.61	34.83
k _{el} (min ⁻¹)	0.148	0.020	0.039	0.050
t _{1/2} (min)	4.71	0.57	31.49	24.60
ASC _{0-t} (µg/mL.min)			68.77	32.60
ASC _{0-∞} (µg/mL.min)	32.30	12.45	105.35	72.29
Razão ASC			0.76	0.37
F _{0-∞} (%)			5.65	3.88
Cl (mL/min.kg)	172.51	58.84		
Cl/F (mL/min.kg)			4360.82	4903.78
V _d (mL/kg)	1163.4	389.7		
V _d /F (mL/kg)			135932.19	105341.44
AUMC _{0-∞} (µg/mL.min ²)	221421	99348.7		
MRT (min)	6.79	0.83		

O clearance, por sua vez, deve ser avaliado em função da taxa de extração corporal que pode ser esperado do modelo animal utilizado. A Equação 9 permite o cálculo da taxa de extração máxima do modelo animal, bem como permite determinar qual é o valor máximo de clearance para esse modelo.

Equação 9

$$E = \frac{Cl}{180 \times m^{-0,19}}$$

Onde E é a taxa de extração corporal, Cl é o clearance e m é massa do animal em kg. Assim, com base no clearance de LAPDESF-SCD03 pela via intravenosa (172,51 mL/min.kg) a taxa de extração de LAPDESF-SCD03 é de 0,74 e o clearance corporal máximo considerando rins e fígado é de 117,12 ml/min/kg. Nota-se, portanto, que o Cl observado supera o máximo previsto para rins e fígado, indicando eliminação pulmonar ou mais provável, metabolismo direto na corrente sanguínea. Essa última hipótese é a mais plausível, já que foi observado metabolismo no ensaio de estabilidade em plasma, *ex vivo*.

Para avaliação do volume de distribuição (1163,4 mL/kg) é necessário recorrer a um modelo fisiológico, como o proposto por Toutain e Bousquet-Mélou (2004) (Equação 10)

Equação 10

$$V_{SS} = V_P + V_T \frac{fu_{,P}}{fu_{,T}}$$

onde V_{SS} é o volume de distribuição no estado de equilíbrio, que em um modelo monocompartimental IV não difere do V_d da tabela 9, V_P é o volume de plasma, V_T é o volume tecidual, $fu_{,P}$ é a fração de fármaco não ligado no plasma e $fu_{,T}$ é a fração de fármaco não ligado fora do plasma.

De acordo com Toutain e Bousquet-Mélou (2004), como o V_d de LAPDES-SCD03 é numericamente alto, podemos negligenciar V_P e V_T pode ser estimado em 1 L/kg de massa, já a fração não ligada será considerada como 0,12, obtido experimentalmente a partir dos dados do ensaio de ligação proteínas plasmáticas, onde foi observado 88% de taxa de ligação. Temos portanto

$$1,163 \text{ L/kg} = 1 \text{ L/kg} \frac{0,12}{fu_{,T}}$$

$$fu_{,T} = \frac{0,12}{1,163} = 0,10$$

Assim, podemos inferir que 90% do LAPDES-SCD03 que sai do plasma está ligado, em outras palavras o coeficiente de partição (K_P , que é a razão $fu_{,P}/fu_{,T}$) do fármaco livre é de 1,163. Apesar de haver apenas 1,2 vezes mais fração não ligada no plasma do que fora do plasma, devemos considerar que há uma grande quantidade de fármaco em locais extravasculares já que um V_d de 1163,4 mL/kg supera em muito o volume intravascular de um rato que é de aproximadamente 64 mL/kg.

A biodisponibilidade limitada pela via oral está em acordo com a baixa solubilidade previamente determinada. Outro reflexo dessa baixa solubilidade pode ser visto nos resultados de MRT, cuja diferença entre as duas vias foi maior que 10 vezes. Nesse caso, também pela característica da suspensão de prolongar a absorção, além de levar a uma alta variabilidade na maioria dos parâmetros. A meia-

vida da administração oral mantém a linha de influencia do processo de absorção no perfil farmacocinético como um todo.

Podemos sugerir a partir desses resultados que a propriedade físico-química solubilidade, além de forçar a necessidade de uso de uma suspensão como veículo de administração, levando a absorção errática e limitada, também provocou uma liberação sustentada do fármaco.

No entanto isso pode ter sido um aspecto positivo, o de limitar a eliminação do fármaco por sua absorção, já que a elevada taxa de extração corporal do fármaco eliminaria uma fração ainda maior caso a absorção fosse imediata, o que reduziria a extensão da exposição total ao fármaco a níveis mais baixos, provavelmente com um MRT mais próximo daquele observado na administração intravenosa.

4-2.2 Estudo da relação farmacocinética e farmacodinâmica

4-2.2.1 Análise farmacocinética

A Figura 17 apresenta os perfis farmacocinéticos dos grupos que receberam o fármaco pela via intravenosa (5,2 mg/kg) antes e após a administração de 100 µg/kg de LPS e o grupo que recebeu o fármaco por gavagem (300 mg/kg) 15 minutos antes da administração de 100 µg/kg de LPS.

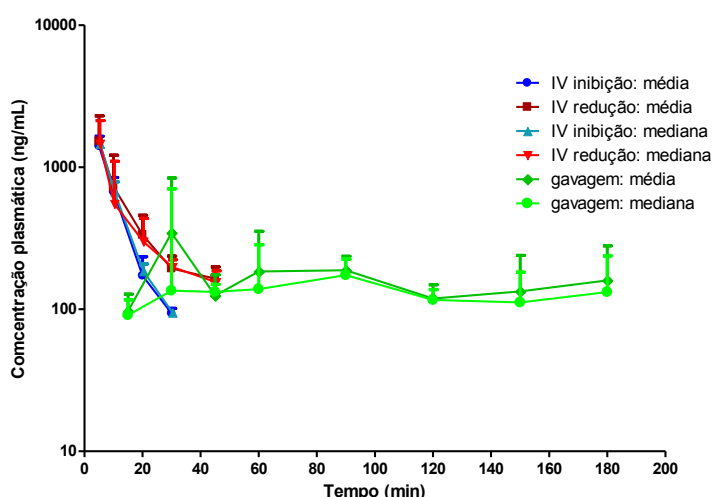


Figura 17. Perfil farmacocinético de LAPDES-F-SCD-03 via intravenosa (5,2 mg/kg) antes e após a administração de 100 µg/kg de LPS e via gavagem (300 mg/kg) 15 minutos antes da administração de 100 µg/kg de LPS. Média + IC95 e mediana + quartil.

A curva de concentração plasmática pelo tempo dos grupos que receberam o fármaco pela via intravenosa não apresentaram uma grande variabilidade entre os valores de cada tempo, enquanto médias e medianas ficaram bem próximas. O grupo que recebeu o fármaco antes do LPS apresentou perfil mais semelhante ao grupo que não havia recebido LPS, enquanto o grupo que recebeu o fármaco 40 minutos após a administração de LPS mostrou um decaimento menos acentuado. Na administração de LAPDES-F-SCD03 pela via oral a maior distância entre média e mediana ocorreu no tempo 30 minutos.

Como observado no gráfico de concentração plasmática pelo tempo, houve uma elevação na meia-vida de eliminação na administração intravenosa no grupo que recebeu o fármaco após a administração de LPS, o que também refletiu na permanência do fármaco no organismo, representada pelo MRT. Na administração pela via oral destaca-se que a exposição do organismo ao fármaco foi menor em relação ao grupo que recebeu o fármaco pela via oral sem administração de LPS, como pode ser notado pelos valores de biodisponibilidade e área sob a curva.

Os parâmetros farmacocinéticos de cada grupo foram calculados pelo método gráfico (Apêndice B) e obtidos os valores utilizados como estimativas iniciais (Apêndice C). A análise farmacocinética foi realizada, resultando nos parâmetros farmacocinéticos (Apêndice D), que levaram aos valores que foram utilizados na relação PK/PD, apresentados na Tabela 12.

Tabela 12. Parâmetros PK utilizados na modelagem PK/PD

Parâmetro	IV inibição	IV redução	Oral
Vd (mL/kg)	1811.16	2444.85	725937.54
Kel (min ⁻¹)	0.146	0.109	0.048
Ka (min ⁻¹)			0.017

4-2.2.2 Análise farmacodinâmica

Os experimentos foram planejados com o objetivo de observar a capacidade do fármaco teste, LAPDES-F-SCD03, em diminuir as concentrações plasmáticas de TNF- α elevadas por estímulo com LPS. Nesse experimento, o fármaco ou o veículo são administrados e observa-se se há ou não inibição na formação de TNF- α , onde o grupo que recebeu apenas veículo é considerado como a linha de base de não inibição.

4-2.2.2.1 Inibição de TNF- α pela via IV com LPS pós-administrado

O fármaco ou veículo foi administrado intravenosamente no tempo 0 e o LPS foi administrado intravenosamente 15 minutos após a administração do fármaco ou veículo. A Figura 18 apresenta as curvas das concentrações séricas de TNF- α no grupo que recebeu o fármaco teste (tratado) e no grupo que recebeu apenas o veículo (controle), além do percentual de inibição em cada tempo.

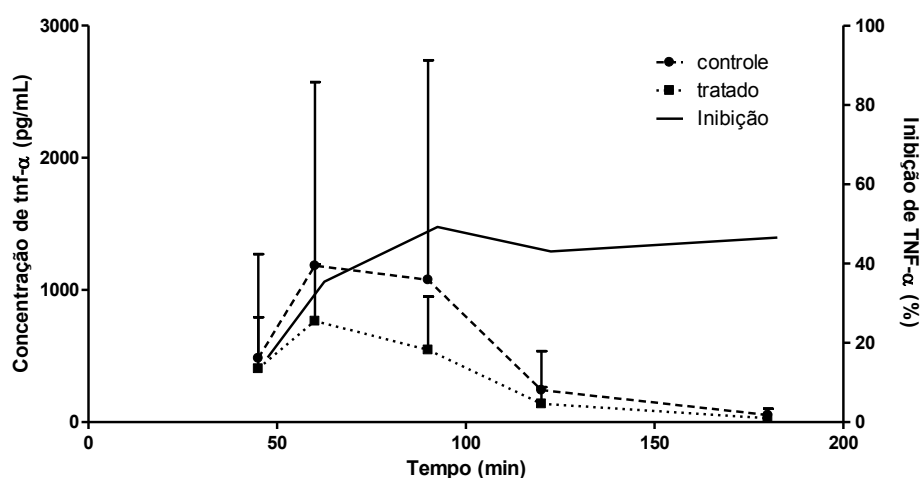


Figura 18. Curva das concentrações plasmáticas de tnf- α em ambos os grupos e inibição em função do tempo. Fármaco administrado no tempo 0 e LPS em 15 minutos. Média + IC95.

A comparação estatística das áreas sob a curva de TNF- α dos grupos controle (85883 ± 100599 pg.mL/h) e tratado (52771 ± 25498 pg.mL/h) não apresentou diferença significativa entre os grupos comparados, tratado e controle (teste t não pareado $p > 0,05$). Contudo a área sob a curva média do grupo que recebeu o fármaco foi 39 % menor que a do grupo que recebeu apenas veículo. Assim, considerando os resultados de atividade obtidos anteriormente (Dos Santos, Lanaro, *et al.*, 2011), podemos considerar esse valor como um forte indício de atividade do fármaco. A falta de diferença suficiente para ser traduzida em diferença estatisticamente significativa pode, portanto, estar relacionada a outros fatores que não a falta de atividade.

Como previamente observado, o fármaco possui uma meia-vida curta e tempo de residência médio de não mais que 8 minutos, e o LPS por sua vez, foi administrado 15 minutos após a administração do fármaco, sendo que a elevação de

TNF- α se inicia após pelo menos mais 15 minutos. Assumindo o princípio da navalha de Occam, podemos simplesmente concluir que a permanência curta foi responsável pela atividade reduzida.

Já a tendência ao efeito, cujo indício seria a inibição total de 39% junto aos efeitos observados em estudos anteriores, pode ser explicada pela existência de um metabólito ativo da substância, que quando administrada pela via oral tem sua formação privilegiada e quando administrado pela via intravenosa tem sua formação em velocidade ou em quantidade insuficientes para garantir a diferença estatística, mas suficiente para na ausência de concentrações quantificáveis do fármaco levar a atividade observável.

4-2.2.2.2 Inibição de TNF- α pela via IV com LPS pré-administrado

Como supracitado, a eliminação rápida do fármaco somada ao tempo necessário para que a elevação de TNF- α ocorra podem ser os fatores que resultaram em diferença insuficiente entre os grupos. A solução mais simples seria aproximar as concentrações quantificáveis de fármaco da elevação de TNF- α . Assim, o fármaco ou veículo foi administrado intravenosamente 40 minutos após a administração intravenosa de LPS. Na Figura 19 podem ser observadas concentrações de TNF- α no grupo que recebeu o fármaco teste (tratado) e no grupo que recebeu apenas o veículo (controle), além do percentual de inibição em cada tempo.

Nesse experimento, a área sob a curva de TNF- α do grupo que recebeu o fármaco (78194 ± 38651 pg.mL/h) foi estatisticamente (teste t não pareado $p < 0,05$) menor que aquela observada no grupo controle (263690 ± 229887 pg.mL/h). Ainda, a área sob a curva média do grupo que recebeu o fármaco foi 70 % menor que a do grupo que recebeu apenas o veículo.

Esse resultado é evidência da capacidade do fármaco matriz de produzir seu efeito, contudo não elimina a possibilidade de que haja a formação de um metabólito ativo. Exceto na abordagem de pró-fármacos, cujo objetivo é inativar uma substância ativa para que seu efeito ocorra apenas após a bioconversão, não é incomum que metabólitos e suas moléculas matrizes compartilhem seus efeitos farmacológicos.

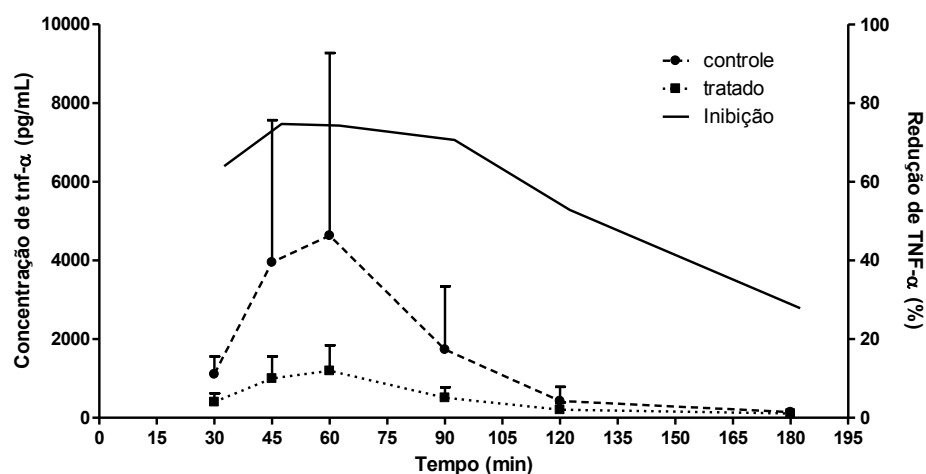


Figura 19. Curva das concentrações plasmáticas de tnf- α em ambos os grupos e inibição em função do tempo. LPS administrado no tempo 0 e fármaco em 40 minutos. Média + IC95.

4-2.2.2.3 Inibição de TNF- α pela via oral com LPS pós-administrado

Em estudos anteriores o LAPDESF-SCD03 mostrou atividade quando administrado pela via oral, apesar da baixa biodisponibilidade quando administrado por essa via veiculado por suspensão aquosa, como foi mostrado no estudo de farmacocinética. Além disso, a atividade por esta via é preponderante no futuro uso clínico de um fármaco em desenvolvimento.

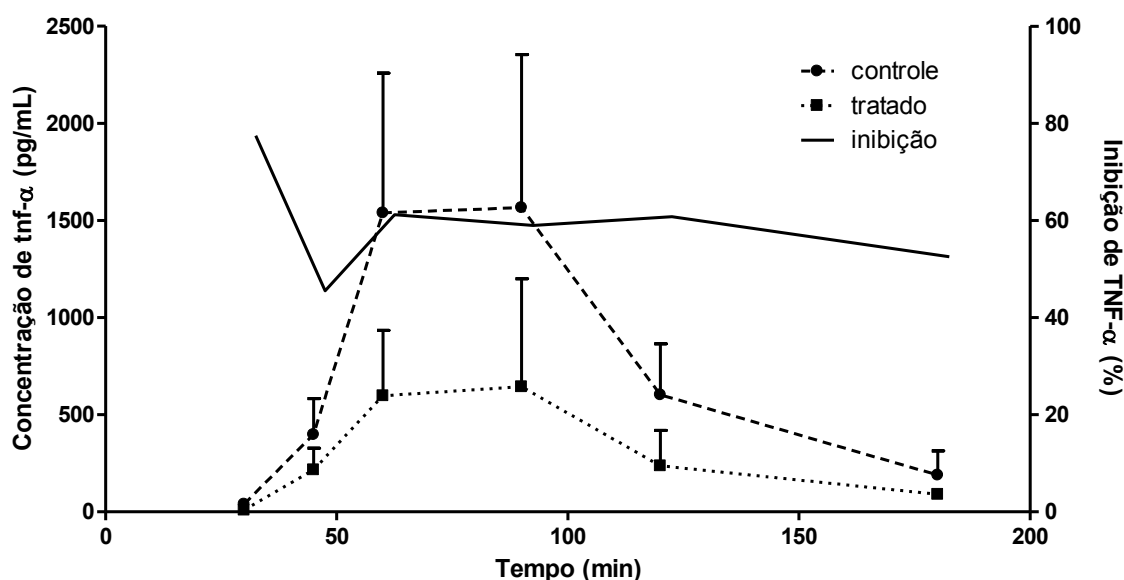


Figura 20. Curva das concentrações plasmáticas de tnf- α em ambos os grupos e inibição em função do tempo. Fármaco administrado no tempo 0 e LPS em 15 minutos. Média + IC95.

Nesse sentido, o fármaco ou veículo foi administrado via gavagem e 15 minutos após sua administração, LPS foi administrado pela via intravenosa. Na Figura 20 podem ser observadas as concentrações de TNF- α no grupo que recebeu o fármaco teste (tratado) e no grupo que recebeu apenas o veículo (controle), além do percentual de inibição em cada tempo.

Após a administração oral de fármaco ou apenas veículo, a área sob a curva de TNF- α do grupo que recebeu o fármaco (47664 ± 33598 pg.mL/h) foi estatisticamente (teste t não pareado $p < 0,05$) menor que aquela observada no grupo controle (126854 ± 54552 pg.mL/h). Ainda, a área sob a curva média do grupo que recebeu o fármaco foi 62 % menor que a do grupo que recebeu apenas o veículo.

4-2.2.3 Análise farmacocinética/farmacodinâmica de LAPDES-F-SCD03

Os dados de farmacocinética e farmacodinâmica alcançados pela quantificação de LAPDES-F-SCD03 e pela quantificação da inibição de TNF- α estimulada por LPS foram empregados na obtenção de um modelo PK/PD que descreve o curso temporal do efeito do fármaco.

O modelo que melhor se adequou aos valores de farmacocinética e farmacodinâmica foi um Emax sigmoidal (equação de Hill) com modelo PK/PD *link*-indireto.

A Figura 21 apresenta as concentrações plasmáticas de LAPDES-F-SCD03 e de inibição de TNF- α em função do tempo para os três experimentos realizados: administração de fármaco pela via intravenosa seguido da administração de LPS, administração de fármaco pela via intravenosa precedido pela administração de LPS e administração de fármaco pela via oral seguido da administração de LPS. Em todos os casos o LPS foi administrado pela via intravenosa.

Como pode ser observado, apesar de mostrar uma inibição média, mesmo que sem diferença estatística significativa ($p > 0,05$), o efeito observado no experimento que recebeu o fármaco IV seguido do LPS (15 minutos) não alcançou 50% de inibição (inibição máxima de 49,2%). Essa dificuldade de correlação entre o efeito observado e a farmacocinética do fármaco se refletiu na modelagem PK/PD,

onde não foi observada boa correlação (-0,754) entre os valores previstos pelo modelo e os valores observados.

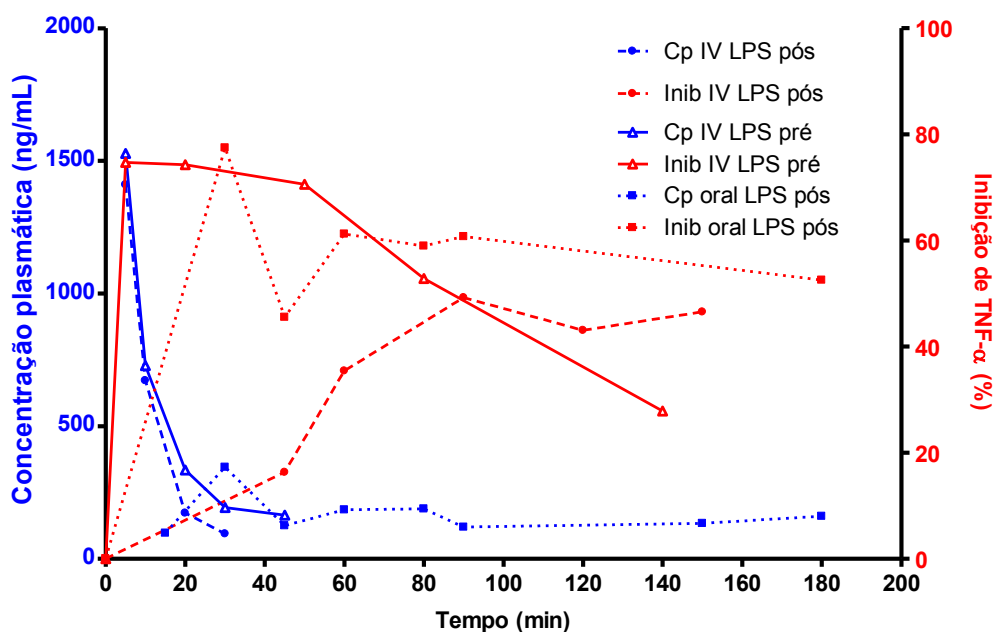


Figura 21. Curvas de concentrações plasmáticas de LAPDESF-SCD03 e de inibição de TNF- α versus tempo após administração do fármaco e de LPS.

A partir desse momento, consideremos apenas os experimentos restantes: administração de fármaco IV 40 minutos após o LPS e administração do fármaco oral 15 minutos antes do LPS.

Os resultados do experimento em que o fármaco foi administrado intravenosamente 40 minutos após a administração do LPS, com o objetivo de aproximar o fármaco da elevação de TNF- α , mostraram inibição máxima próxima de 74,7 % ainda no primeiro tempo de coleta. Esse experimento resultou ainda na melhor correlação (0,995) entre valores previstos pelo modelo e observados entre os experimentos de PK/PD (Figura 22b). O EC_{50} foi de 14,7 ng/mL e o k_{e0} foi de 0,05 min^{-1} , o que resulta em uma meia-vida do equilíbrio do fármaco no plasma e na biofase do efeito de 13,9 min.

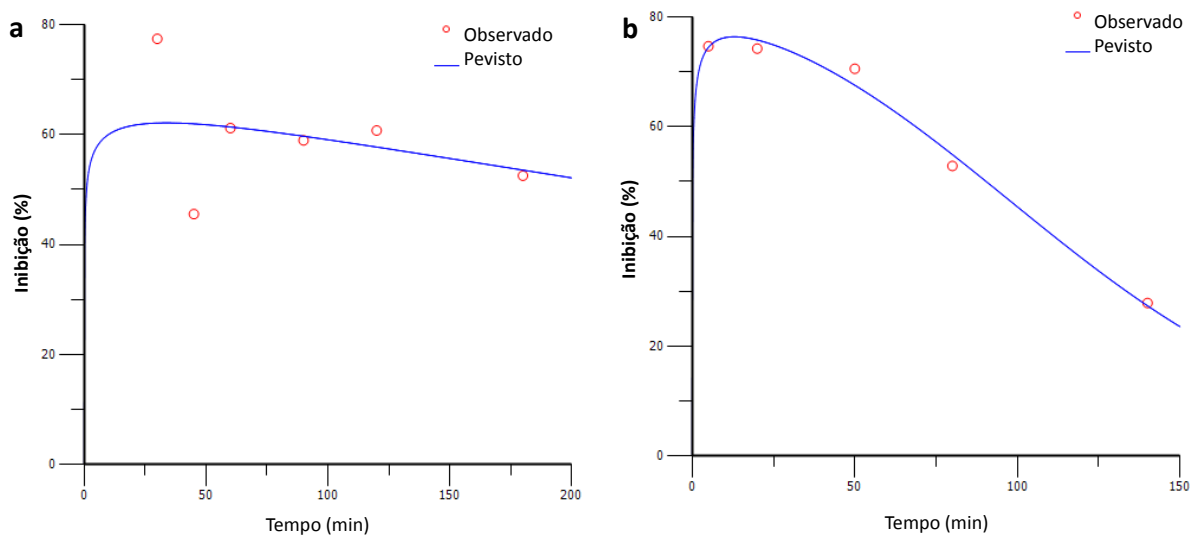


Figura 22. Curvas de efeito *versus* tempo com os valores previsto pelo modelo e os valores observados experimentalmente. a) Administração de 300 mg/kg pela via oral e b) administração de 5,2 mg/kg pela via intravenosa.

Para o experimento em que o fármaco foi administrado pela via oral pode ser observado na Figura 21 que a inibição persiste mais que após a administração intravenosa citada no parágrafo anterior, além de uma inibição máxima de 77,4 % seguido de um decaimento e uma nova elevação. Esse fenômeno pode ter ocorrido devido às oscilações de concentração inerentes a administração oral da suspensão, como pode ser visto nos valores de concentração plasmática (Figura 21).

No que se refere a modelagem PK/PD a Figura 22a apresenta o gráfico dos valores previstos e observados para esse experimento, cuja correlação foi de 0,309. Essa baixa correlação pode estar relacionada com a dificuldade do modelo de considerar as oscilações das concentrações plasmáticas, já que suaviza a linha de concentrações previstas, com as oscilações do efeito observado. O EC_{50} foi de 62,9 ng/mL e o k_{e0} foi de $2,6 \text{ min}^{-1}$, resultando em uma meia-vida do equilíbrio do fármaco no plasma e na biofase do efeito de 0,3 min.

Comparado ao k_{e0} observado na administração intravenosa, podemos concluir que o equilíbrio entre as concentrações no plasma e na biofase ocorre mais rapidamente após administração oral que após administração intravenosa, o que sugere um mecanismo de acesso a essa biofase que seja saturável. Ou seja, mesmo com a disponibilização imediata do fármaco no plasma houve um atraso para que se equilibrasse com a biofase, enquanto na administração oral, as

concentrações mais baixas, mas constantes alcançaram o equilíbrio mais rapidamente.

O EC_{50} de ambos os experimentos resultou em concentrações bem baixas em relação a outros inibidores de TNF- α , como aquele avaliado por Wang (2007) Contudo esses resultados ficaram abaixo do limite de quantificação do método bioanalítico utilizado, ou seja, metade do efeito máximo foi alcançado na faixa de concentração que jaz no modelo farmacocinético e não nos valores observados.

A Tabela 13 resume os resultantes apresentados nos parágrafos anteriores.

Tabela 13. Parâmetros resultantes do modelo PK/PD *link* indireto Emax sigmoidal.

Parâmetros	IV LPS pós	Oral LPS pré
EC_{50} (ng/mL)	14,7	62,9
k_{e0} (min^{-1})	0,0527	2,65
Correlação	0,995	0,309

Outro ponto a se considerar é a inversão entre as vias que levaram ao maior EC_{50} . No trabalho de Wang (2007) o fármaco teste levou a um efeito maior pela via oral do que pela via intravenosa, contudo não há qualquer menção a metabólitos ativos do fármaco teste. O LAPDES-SCD03 apresentou maior efeito em função da concentração pela via intravenosa em relação à via oral. Primeiramente, deve ser lembrado o elevado clearance observado no estudo de farmacocinética, inclusive superando o máximo para o fígado e rins, indicando que pode haver a formação de um metabólito ativo fora do tecido hepático. Assim, a observação de um efeito maior pela via intravenosa pode ser reflexo da maior formação desse metabólito, enquanto pela via oral, devido as concentrações mais baixas, também podem ter se mantido menores as concentrações do metabólito, levando a um efeito total menor em relação a concentração do fármaco.

No entanto, a presença de um metabólito ativo é apenas uma hipótese com base em fortes evidências, já que esse estudo não quantificou esse provável metabólito ativo. Outra consideração a se destacar é que na presença de observação de concentrações quantificáveis de outra substância ativa agindo simultaneamente a ação do LAPDES-SCD03, a ação intrínseca do LAPDES-SCD03 pode ser diferente.

4-2.3 Avaliação preliminar de segurança

A Figura 23 apresenta os resultados para a avaliação de TGO e TGP nos grupos controle e tratado. A média dos valores de TGO do grupo tratado (389,2±305,3 U/L) não foi estatisticamente diferente da média dos valores de TGO do grupo controle (707,3±629,0 U/L), contudo, este último apresentou uma média cerca de 4 vezes maior que valores de normalidade (Branco *et al.*, 2011). A média dos valores de TGP do grupo tratado (45,49±22,47 U/L) foi estatisticamente menor que a média dos valores de TGP do grupo controle (118,7±73,24 U/L), inclusive levando os valores de TGP do grupo que recebeu o fármaco para valores dentro da normalidade (Branco *et al.*, 2011).

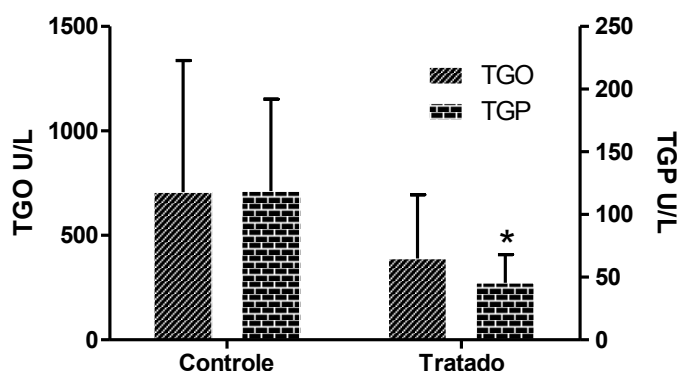


Figura 23. Valores de TGO e TGP após administração de 300 mg/kg de LAPDES-F-SCD03 e LPS em ratos Wistar. * Teste t de student relação ao grupo controle ($p < 0,05$). Média+IC95.

Visto que o LPS é um indutor de dano hepático, os resultados de menor alteração dos parâmetros bioquímicos no grupo tratado com LAPDES-F-SCD03 estão em acordo com o ensaio de atividade farmacológica. Inclusive, vale destacar a diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) ocorrida justamente na TGP, um biomarcado de dano hepático mais específico em relação a TGO, que está presente também em outros órgão como intestino, rins e coração.

A Figura 24 apresenta os resultados para a avaliação de ureia e creatinina nos grupos controle e tratado. Nesses resultados não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre a média dos valores de ureia do grupo tratado (40,43±10,25 mg/dL) e a média dos valores de ureia do grupo controle (55,94±37,91 mg/dL), bem como entre a média dos valores de creatinina do grupo tratado (0,3200±0,0637 mg/dL) e a média dos valores de creatinina do grupo controle

($0,2783 \pm 0,2480$ mg/dL). Todas as médias se encontram dentro da faixa de normalidade publicada por Branco e colabores (2011).

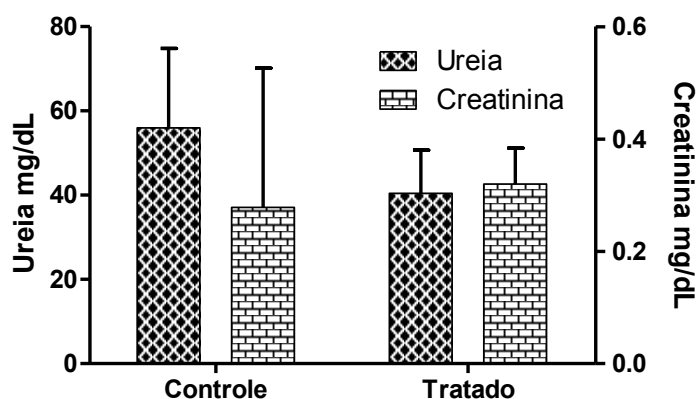


Figura 24. Valores de Ureia e creatinina após administração de 300 mg/kg de LAPDESF-SCD03 e LPS em ratos Wistar. Média+IC95.

Esses resultados demonstram que em uma dose suficiente para produzir efeito farmacológico, o LAPDESF-SCD03 não produziu dano a função renal que fosse refletida nos parâmetros ureia e creatinina.

Tanto para a avaliação de segurança hepática quanto para avaliação de segurança renal, a análise histopatológica mostrando ausência de lesão ou alterações estruturais significativas dos tecidos após a administração do fármaco seria uma evidência mais forte da segurança do fármaco. Contudo, em se tratando de uma avaliação preliminar em administração de dose única podemos afirmar que nas condições avaliadas o fármaco não apresenta evidência de toxicidade, bem como pode ter um potencial efeito hepatoprotetor em danos mediados por TNF- α .

4-3. Conclusão e Perspectivas

A avaliação da farmacocinética de LAPDESF-SCD03 foi realizada pelas vias intravenosa e oral, demonstrando que o fármaco pode ser classificado como de alta taxa de extração corporal e meia-vida curta pela via intravenosa, ao passo que tem uma absorção limitada com uma baixa biodisponibilidade.

O LAPDESF-SCD03 apresentou atividade inibitória da elevação de TNF- α estimulado por LPS nas vias intravenosa e oral, sendo possível inclusive, adaptar um modelo PK/PD aos efeitos observados. No mesmo grupo que foi tratado com o

LAPDESF-SCD03 pela via oral seguido da administração de LPS, foi observado também a não ocorrência de alteração hepática maior que a observada no grupo tratado apenas com veículo.

Um número maior de observações na curva de TNF- α , refinando ainda mais a caracterização do quão reduzida foi a exposição do modelo *in vivo* a citocina estimulada por LPS após administração de LAPDESF-SCD03, associado a uma sensibilidade ainda maior do método bioanalítico, por meio de técnicas como a cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas, seria capaz de aumentar a correlação PK/PD e dar evidências ainda mais fortes da atividade do fármaco avaliado.

Podemos sugerir também um aumento da solubilidade da molécula diminuindo a fração não biodisponível da dose administrada aferida como 0,95 nesse trabalho, acessando mais de sua atividade em potencial. Contudo seria necessário aumentar a estabilidade química e/ou metabólica da molécula, levando a uma redução do clearance com um aumento da meia-vida que seria benéfico na sua aplicação clínica em se tratando de intervalo de administrações. A produção de um pró-fármaco pode ser uma alternativa.

Por outro lado, a identificação e subsequente síntese do metabólito hipotético cuja atividade parece ser compartilhada com a molécula matriz, pode ser uma alternativa mais rápida. A partir dessa abordagem, seria possível elucidar a farmacocinética do metabólito e sua relação farmacocinética/farmacodinâmica, permitindo ainda rastrear a magnitude de sua formação, que se for inferior em estudos clínicos (ou relacionados a humanos) em relação aos estudos pré-clínicos levaria a isentá-lo da necessidade de realização de mais ensaios pré-clínicos de segurança além dos exigidos para a molécula matriz.

Capítulo 5 – Investigação de metabólito

Um passo importante no desenvolvimento de novos fármacos, como o LAPDESF-SCD03, é a avaliação de suas propriedades metabólicas (Kostiainen *et al.*, 2003). Segundo Waterbeemd e Gifford (2003), problemas no perfil farmacocinético estão entre as mais importantes razões para a falha de novos fármacos no desenvolvimento. Além disso, a preocupação com a formação de metabólitos desconhecidos apenas nas fases de ensaios clínicas tem aumentado cada vez mais (Pellegatti, 2012). Para evitar atrasos no desenvolvimento, a identificação de um metabólito nas fases iniciais de desenvolvimento do fármaco candidato deve ser feita, proporcionando informações essenciais sobre as rotas de eliminação e formação de potenciais metabólitos ativos (Brandon *et al.*, 2003; Masimirembwa, Bredberg e Andersson, 2003; Beuck, Schanzer e Thevis, 2011). Metabólitos ativos são uma das principais causas para problemas de segurança inesperados na pesquisa e desenvolvimento de fármacos (Baillie *et al.*, 2002; Leclercq *et al.*, 2009).

O método clássico de investigação do perfil metabólico de fármacos é o uso de composto radiomarcados, os quais são normalmente usados para a determinação de metabólitos nos estágios mais avançados do desenvolvimento. Contudo, nas fases iniciais esses fármacos marcados não estão disponíveis na maioria das vezes, devido ao alto custo, tempo despendido e riscos para a sua obtenção (Kostiainen *et al.*, 2003).

Uma alternativa ao uso de fármacos radioativamente marcados é o uso de isótopos estáveis como aqueles marcados com deutério. Misturas contendo o fármaco marcado e não marcado resultam em um padrão isotópico, o qual é característico e pode ser usado para auxiliar na identificação de metabólitos por meio de análises com cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas (Avula *et al.*, 2013; Li *et al.*, 2013). A incubação em culturas de hepatócitos é uma abordagem comum usada para formação e identificação de metabólitos de novos fármacos (Wind *et al.*, 2006; Avula *et al.*, 2013; Gandhi *et al.*, 2013; Wohlfarth *et al.*, 2013).

A identificação de metabólitos torna-se mais fácil usando isótopos estáveis. A melhor forma de realizar estudos de identificação de metabólitos é usando a espectrometria de massas em *tandem* e a análise por espectrometria de alta resolução (Thurman *et al.*, 2013; Omar *et al.*, 2014; Ballesteros-Gomez *et al.*, 2015). A espectrometria de massas de alta resolução pode separar razões massa/carga (m/z) com exatidão muito elevada, tais como 2 ppm ou menos (Kern *et al.*, 2015), a qual deve ser suficiente para revelar a composição elemental, enquanto resultados de dissociação induzida por colisão geram informações úteis na elucidação da estrutura por meio de m/z dos fragmentos observados (Pozo *et al.*, 2008; Hoff *et al.*, 2014).

Neste capítulo estão detalhados os experimentos relacionados à busca pelo provável metabólito de LAPDES-F-SCD03 utilizando espectrometria de massas de alta resolução, espectrometria de massas em *tandem* e uso de isótopo estável em incubação com hepatócitos de ratos.

5-1. Material e métodos

Esse estudo foi desenvolvido na *Faculty of Science, department of chemistry, Centre for research in Mass Spectrometry (CRMS)* da York University, Toronto Canadá, sob supervisão do Professor Demian R. Iffa (Anexo IV).

5-1.1 Reagentes, fármacos e solventes

O LAPDES-F-SCD03 e seu isótopo estável foram obtidos no laboratório de pesquisa e desenvolvimento de novos fármacos (LAPDES-F) da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP de Araraquara. A água ultrapura foi obtida por sistema Milli-Q (Millipore®). Outros reagentes, fármacos e solventes, incluíram:

- Metanol, J. T. Backer;
- Acetonitrila, J. T. Backer;
- Ácido Metanóico, Sigma-Aldrich;
- Acetato de Etila, Caledon Laboratories;
- Hidróxido de sódio, Audaz;
- Ácido tricloroacético, Fisher Scientific;
- Meio de lavagem InVitroGRO HT, Bioreclamation;

- Meio de incubação InVitroGRO KHB, Bioreclamation;
- Azul de tripan, Sigma-Aldrich.

5-1.2 Equipamentos

- NanoLC-Ultra, Eksigent;
- Espectrômetro de massas híbrido ion trap linear-orbitrap LTQ-Orbitrap Elite, Thermo Scientific;
- Agitador magnético com aquecimento, Ethiktechnology;
- Vórtex AP56, Phoenix®;
- Micro-centrífuga 5417R, Eppendorf®;

5-1.3 Correlatos

- Coluna C18 Biobasic 50 x 0.075mm, 5 μ m, Objective;
- Filtro de seringa de PTFE 4 mm, poro de 0,22 μ m, Fischer scientific®;
- Hepatócitos de rato criopreservados, Bioreclamation;

5-1.4 Softwares

- Chemdraw® Ultra v. 8.0, CambridgeSoft Corporation;
- Thermo Xcalibur 2.4;

5-1.5 Obtenção do isótopo estável

No procedimento de síntese do LAPDESF-SCD03 o anidrido ftálico foi substituído por anidrido ftálico deuterado contendo 4 deutérios em lugar de seus hidrogênios. Isso levou a formação de LAPDESF-SCD03 com 4 Da a mais que a molécula original, o qual foi denominado D4-LAPDESF-SCD03 (Figura 25).

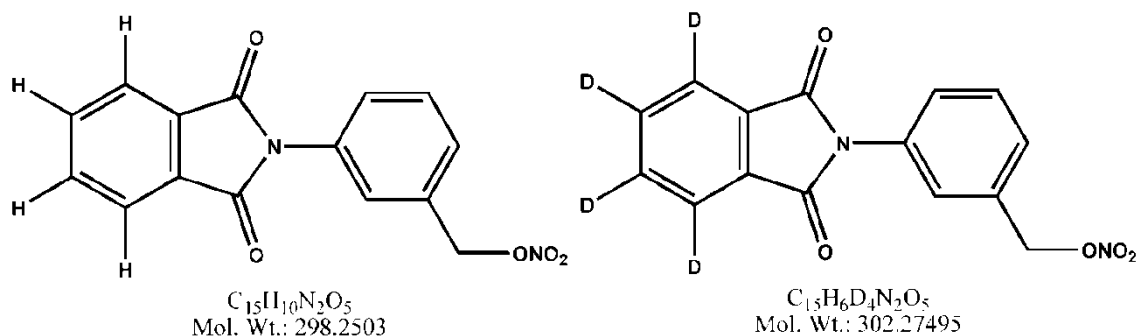


Figura 25. As moléculas LAPDESF-SCD03 e D4-LAPDESF-SCD03.

5-1.6 Condições cromatográficas e espectrométricas

Um sistema NanoLC-Ultra (Eksigent, Singapore) acoplado a um espectrômetro de massas híbrido ion trap linear-orbitrap (LTQ-Orbitrap Elite, Thermo Scientific, USA) foi usado. A injeção de amostra foi feita diretamente na válvula de 10 portas usando um loop de 2 μ L. A separação foi realizada através de uma coluna C18 Biobasic 50 x 0.075 mm com 5 μ m de tamanho de partícula. A fase móvel foi ácido fórmico 0,1%:acetonitrila (62:38) em uma vazão de 1000 nL/min. Todas as amostras foram filtradas por membrana de PTFE de 0,22 μ m antes da injeção.

O nano eletrospray foi obtido usando um emissor capilar PicoTip (New Objective, USA). A voltagem do spray foi configurada para 2 kV e a temperatura do capilar foi de 250° C. Espectros *full scan* foram adquiridos no modo de ion positivo em um alcance de *m/z* de 160-600, a resolução configurada foi de 30 000 e tipo de dados *profile*. Espectrometria de massas em *tandem* (MS/MS) foi realizada usando dissociação induzida por colisão com energia de colisão normalizada de 25-35 (unidade do fabricante), a qual ocorreu no analisador ion trap linear, enquanto a detecção ocorreu no Orbitrap com dados do tipo *centroid* e resolução configurada para 15 000. Para ambos os experimento, MS e MS/MS, a ativação Q foi de 0,25, tempo de ativação foi de 10 ms e a janela de seleção do ion precursor foi de 1 Da.

5-1.7 Estudo de metabolismo em hepatócitos de rato criopreservados

Hepatócitos de rato criopreservados foram obtidos comercialmente (Male Wistar Rat Cryopreserved Hepatocytes, Bioreclamation, Baltimore, Maryland, USA). As células foram descongeladas e lavadas em meio InVitroGRO HT (Bioreclamation,

Baltimore, Maryland, USA) e a incubação foi feita em meio InVitroGRO KHB (Bioreclamation, Baltimore, Maryland, USA). O número de hepatócitos foi determinado por contagem usando corante azul de tripan, levando a uma concentração final de $2,0 \times 10^6$ células/mL.

Para o procedimento de incubação, 0,5 mL de analito (triplicata) ou diclofenaco (controle positivo) em meio de incubação foram adicionados em nove poços de uma placa de 12 poços, 6 para o analito e 3 para o controle positivo. Em seguida, os hepatócitos em meio InVitroGRO KHB foram transferidos para 6 poços (0,5 mL cada), 3 contendo o analito e 3 contendo o controle positivo, e os 3 poços restantes contendo analito receberam hepatócitos não funcionais para o controle negativo.

As concentrações de LAPDESF-SCD03 e D4-LAPDESF-SCD03 foram 19,8 μ M cada, enquanto a concentração do diclofenaco foi de 20,3 μ M.

Antes de iniciar a incubação propriamente dita, 0,1 mL de meio foi coletado de cada poço representando a amostra de tempo zero, em seguida a mistura foi mantida a 37°C sob agitação por 2 horas. No decorrer desse período 0,1 mL de meio foi coletado de cada poço nos tempos 45 minutos, 1, 1,5 e 2 horas. Essas amostras foram divididas em alíquotas de 50 μ L cada. A incubação foi interrompida usando acetonitrila ou ácido tricloroacético 10%, os quais constituem o primeiro passo do processo de extração.

5-1.7 Procedimento de extração

O meio de incubação (50 μ L) foi preparado para injeção seguindo dois processos extrativos. O primeiro consistiu da adição de 10 μ L de acetonitrila e 40 μ L de NaOH 0,1 M, enquanto o segundo consistiu da adição de 50 μ L de ácido tricloroacético 10%. Em seguida, ambos receberam 1 mL de acetato de etila e foram agitados por 30 segundos. As misturas foram centrifugadas por 10 minutos a 20850 x g, os sobrenadantes foram transferidos para um novo tubo plástico de 1,5 mL e evaporados por 1 hora. Antes da injeção, as amostras, cujo solvente foi previamente evaporado, foram ressuspendidas usando 100 μ L de água e agitação em vórtex por 30 segundos. Então, cada amostra ressuspendida foi filtrada por membrana de PTFE de 0,22 e 10 μ L foram usados para carregar o loop de 2 μ L.

5-1.8 Desenho experimental

O experimento de análise por espectrometria de massas de alta resolução, além das condições supracitadas, foi desenhado utilizando a função de *data dependent*, na qual foram criados 11 eventos, sendo que o primeiro destes consistia de um *full scan* dentro do intervalo especificado. Os 10 eventos seguintes consistiam de análises em *tandem* dos íons presentes no *full scan* realizado no evento 1 que apresentassem sinal mínimo de 1×10^4 .

Como parte do refinamento desse experimento, foi criada uma lista com as massas (Apêndice E) de prováveis estruturas (Apêndice F) esperadas, de acordo com mecanismos de metabolismo de fármacos que pudessem ser exercidos sobre o fármaco teste, LAPDES-F-SCD03. Os eventos de fragmentação (2-11) realizados com as *m/z* observadas no *full scan* (evento 1) ocorriam prioritariamente com picos de *m/z* constantes da lista de prováveis *m/z*. Outra lista incluiu massas pré-selecionadas nas análises de amostras branco para constituir a lista de rejeições, evitando que durante a análise das amostras teste, dados sabidamente inúteis fossem coletados.

Assim, em resumo, durante cada segmento de análise (eventos de 1 a 11) era gerado um *full scan* no evento 1, e nos eventos seguintes era preferencialmente realizada a fragmentação dos dez íons mais abundantes que fossem constantes da lista de precursores, seguida dos mais abundantes do *full scan* que não estivessem presentes na lista de rejeição.

5-2. Resultados e discussão

5-2.1 Produto de LAPDES-F-SCD03 após incubação

Com base na forte evidência de uma ação compartilhada por um metabólito ativo, como a altamente suscetibilidade a conversão tanto em solução, quanto em plasma, a curta meia-vida e o efeito após administração pela via oral, apesar da baixa biodisponibilidade, tornou-se de interesse investigar que produtos poderiam se formar a partir de LAPDES-F-SCD03. Isso foi feito utilizando-se a espectrometria de

massas de alta resolução e a incubação em hepatócitos, além do uso de um isótopo estável.

5-2.2 Estudo de ionização por eletrospray em HRMS

O experimento foi realizado usando uma solução de LAPDESF-SCD03 e D4-LAPDESF-SCD03. Os resultados podem ser observados na Tabela 14.

Tabela 14. Resumo da análise por espectrometria de massas de alta resolução

	Formula	Massa exata (Da or mu)	Massa medida (Da or mu)	Exatidão (ppm)
SCD03-NO ₃	[C ₁₅ H ₁₀ NO ₂] ⁺	236.0706	236.07068	-0.34
D ₄ -SCD03-NO ₃	[C ₁₅ H ₆ D ₄ NO ₂] ⁺	240.09571	240.09551	0.83
SCD03+H	[C ₁₅ H ₁₁ N ₂ O ₅] ⁺	299.06625	299.06631	-0.20
D ₄ -SCD03+H	[C ₁₅ H ₇ D ₄ N ₂ O ₅] ⁺	303.09135	303.09126	0.30
SCD03+NH ₄	[C ₁₅ H ₁₄ N ₃ O ₅] ⁺	316.0928	316.09302	-0.70
D ₄ -SCD03+NH ₄	[C ₁₅ H ₁₀ D ₄ N ₃ O ₅] ⁺	320.1179	320.11771	0.59
SCD03+Na	[C ₁₅ H ₁₀ N ₂ O ₅ Na] ⁺	321.04819	321.04796	0.72
D ₄ -SCD03+Na	[C ₁₅ H ₆ D ₄ N ₂ O ₅ Na] ⁺	325.0733	325.07309	0.65
SCD03+K	[C ₁₅ H ₁₀ N ₂ O ₅ K] ⁺	337.02213	337.02217	-0.12
D ₄ -SCD03+K	[C ₁₅ H ₆ D ₄ N ₂ O ₅ K] ⁺	341.04724	341.04743	-0.56

A exatidão de massa para todos os íons propostos foi menor que 1 ppm. Os fragmentos após a dissociação induzida por colisão confirmaram os íons principais de *m/z* 236 e 316 como sendo uma fragmentação na fonte (perda de ONO₂) e o aduto de amônia, respectivamente (Figura 26).

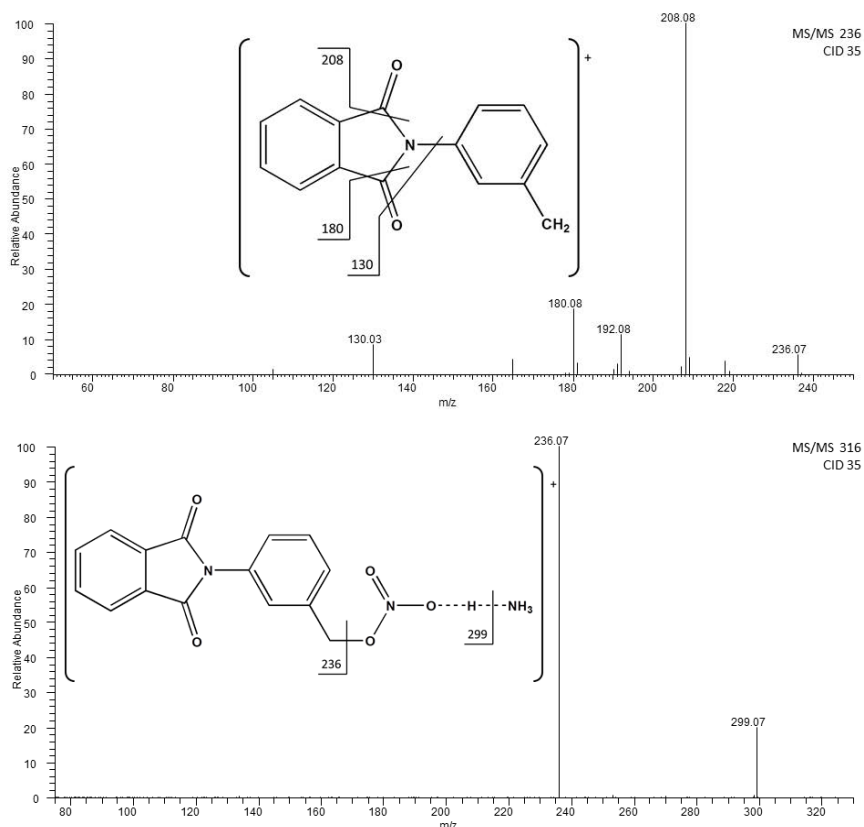


Figura 26. Espéctros de fragmentação dos íons 236 e 316.

O íon 236 é proveniente da fragmentação na ligação simples entre o oxigênio e o grupo metilênico em posição *meta* do anel, levando a formação de um carbocátion e a perda neutra de um nitrato. Com isso, um rearranjo pode ocorrer para formar um anel de sete membros como no íon tropílio devido a sua maior estabilidade. No espectro de MS/MS do íon 236 foram observados os fragmentos 208, como perda de um dos grupos carbonila, e 180 como perda do segundo grupo carbonila após um rearranjo entre o nitrogênio e o anel principal mantendo-os ligados. O fragmento de m/z 130 pode ocorrer pelo rompimento da ligação entre a ftalimida e o grupo fenil seguido pela perda de oxigênio a partir de um dos grupos carbonila levando a formação de uma dupla ligação entre o carbono e o nitrogênio e a formação de um carbocátion no mesmo carbono. A perda de um oxigênio do grupo carbonila provavelmente também aconteceu resultando na formação do fragmento 192 após a perda do primeiro grupo carbonila. Outra indicação dessas pressuposições é o padrão de fragmentação do íon precursor 240, o íon resultante da fragmentação na fonte da molécula deuterada. O MS/MS do íon com m/z 240

mostrou os fragmentos de m/z 212, 196, 184 and 134 garantindo que o anel ftalimídico permaneceu intacto em todos esses fragmentos.

A fragmentação do íon de m/z 316, o qual é a molécula matriz adicionada de um grupo NH_4^+ , é a perda neutra de NH_3 , levando ao m/z 299, seguida pela perda de HNO_3 deixando a carga positiva no carbono adjacente e resultando na m/z 236. No MS/MS da molécula deuterada, cuja m/z é 320, foram observados os fragmentos 303 e 240, ou seja, os mesmo fragmentos do 316, mas com 4 deutérios em lugar dos 4 hidrogênios na subunidade ftalimídica.

5-2.3 Análise do controle positivo

Diclofenaco foi usado como controle positivo para confirmar a viabilidade do sistema, sendo observado no tempo zero e confirmado pelo MS/MS na extração usando ácido tricloroacético 10%. A m/z monoisotópica protonada medida do diclofenaco (massa exata 296,0245) foi 296,0241 (exatidão de 1,39 ppm), enquanto o MS/MS apresentou os fragmentos 278 e 250, os quais são a perda do grupo hidroxila seguido pela perda do grupo carboxila (Figura 27).

O funcionamento do sistema metabólico de fase I foi confirmado pela presença do hidroxidiclofenaco (massa monoisotópica protonada exata de 312,0189) com massa monoisotópica protonada medida de 312,0190 (exatidão de -0,54 ppm). O MS/MS do metabólito supracitado mostrou os fragmentos 294 e 266 equivalentes a rompimentos nos mesmos locais da molécula precursora, mas com as 16 unidades a mais referentes a hidroxilação aromática, uma reação oxidativa (figura 16). Contudo, há duas posições nessa molécula onde o grupo hidroxila pode ocorrer, levando à seus dois principais metabólitos de fase I, o 5-hidroxidiclofenaco e o 4'-hidroxidiclofenaco, os quais são formados pelas enzimas do citocromo P450 2C8, 3A4, 2C19 and 2C9 (Sparidans *et al.*, 2008; Sarda *et al.*, 2012).

A observação do íon de m/z 472,0567 referente ao íon protonado do diclofenaco glucuronideo (massa monoisotópica protonada exata de 472,0561, exatidão de -1.27 ppm), corrobora o bom funcionamento do sistema metabólico de fase II com uma glucuronidação. Bem como, a observação do íon de m/z 488,0523 é referente ao hidroxidiclofenaco glucuronideo (massa monoisotópica protonada exata

de 488,0515, exatidão de -1.64), os quais são formados pela uridina glucuronil transferase (Sparidans *et al.*, 2008; Sarda *et al.*, 2012).

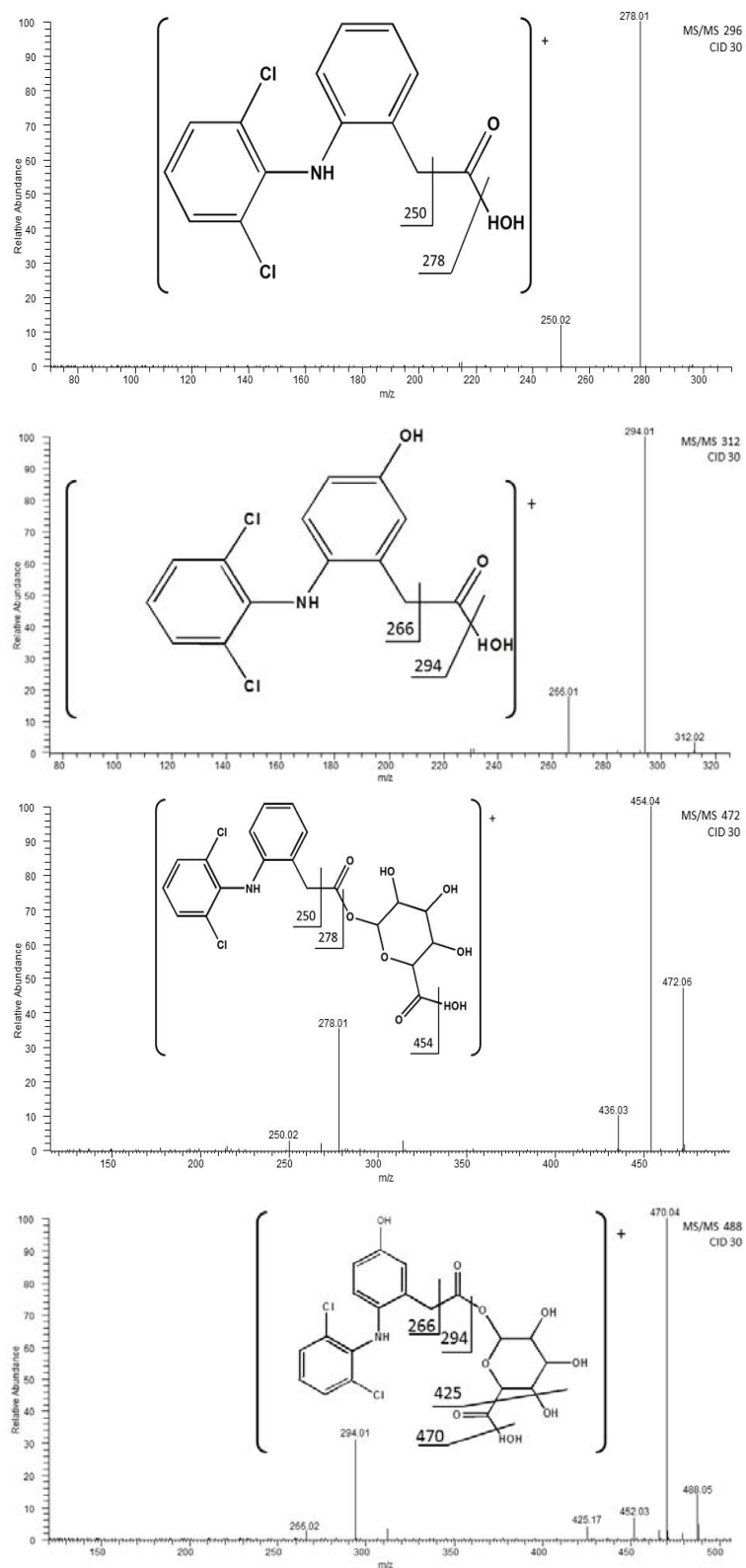


Figura 27. Espectros das análises de amostras de controle positivo.

5-2.4 Análise das amostras contendo LAPDES-F-SCD03

No estudo metabólico do LAPDES-F-SCD03, tanto na presença dos hepatócitos funcionais quanto na incubação com os hepatócitos não funcionais, foi observada a m/z 317,0774 ($[C_{15}H_{13}N_2O_6]^+$, massa exata 317,07736, exatidão de -0,13 ppm) como sendo o íon protonado do metabólito formado por hidrólise, e confirmado pela presença da m/z 321,1022 ($[C_{15}H_9D_4N_2O_6]^+$, massa exata 321,10192, exatidão de -0,87 ppm). Contudo, a intensidade do íon protonado não foi suficiente para resultar em dados de MS/MS conclusivos. Assim, foram avaliados os fragmentos resultantes da dissociação induzida por colisão do íon aduto sodiado 339,0591 ($[C_{15}H_{12}N_2O_6Na]^+$, massa exata 339,0593, exatidão 0,59 ppm) e seu íon deuterado 343,0845 ($[C_{15}H_8D_4N_2O_6Na]^+$, massa exata 343,0844, exatidão de -0,29 ppm) (Figura 28).

A m/z de alta resolução dos fragmentos de MS/MS esta em acordo com a análise elemental das estruturas propostas para os fragmentos de massa aferida 292,0581, 264,0632, e 171,0054 (massa exata de 292,0580, 264,0632, e 171,0054, respectivamente; exatidão de -0,34, -0,38, e -0,58 ppm). Fragmentos equivalentes foram observados na dissociação induzida por colisão do íon sodiado do metabólito deuterado, cujas exatidões foram 0,44, 0,19, e -0,91 ppm. Mesmo que com intensidade muito reduzida, o aduto potassiado também foi observado com m/z de 355,0325 (massa exata 355,0327, exatidão de 0,56 ppm) e m/z de 359,0575 (massa exata de 359,0578, exatidão de 0,84 ppm) para o aduto deuterado. Ainda, foi observado no mesmo tempo de retenção os íons com m/z 254,0810 e 258,1060, os quais são provavelmente resultantes da fragmentação na fonte (para deuterado e para não deuterado) do metabolito supracitado (massa exata 254,0812 e 258,1063; exatidões de 0,79 e 1,16 ppm). O local desta fragmentação é provavelmente o mesmo que forma o íon de m/z 236 na molécula matriz não deuterada. Uma ruptura na ligação simples entre o oxigenio e a metila em *meta* do anel não ftalimidico, levando a formação de um carbocátion e a perda neutra de nitrato, entretanto, nesse íon há o aumento de 18 Da resultantes da hidrólise em relação ao fragmentação na fonte ocorrida na molécula matriz. Essa reação de hidrólise no grupo ftalimídico

também ocorre para formar um dos principais metabólitos da talidomida, o ácido imida N-(o-carboxibenzoil)glutâmico (Chung *et al.*, 2004)(Chung *et al.*, 2004).

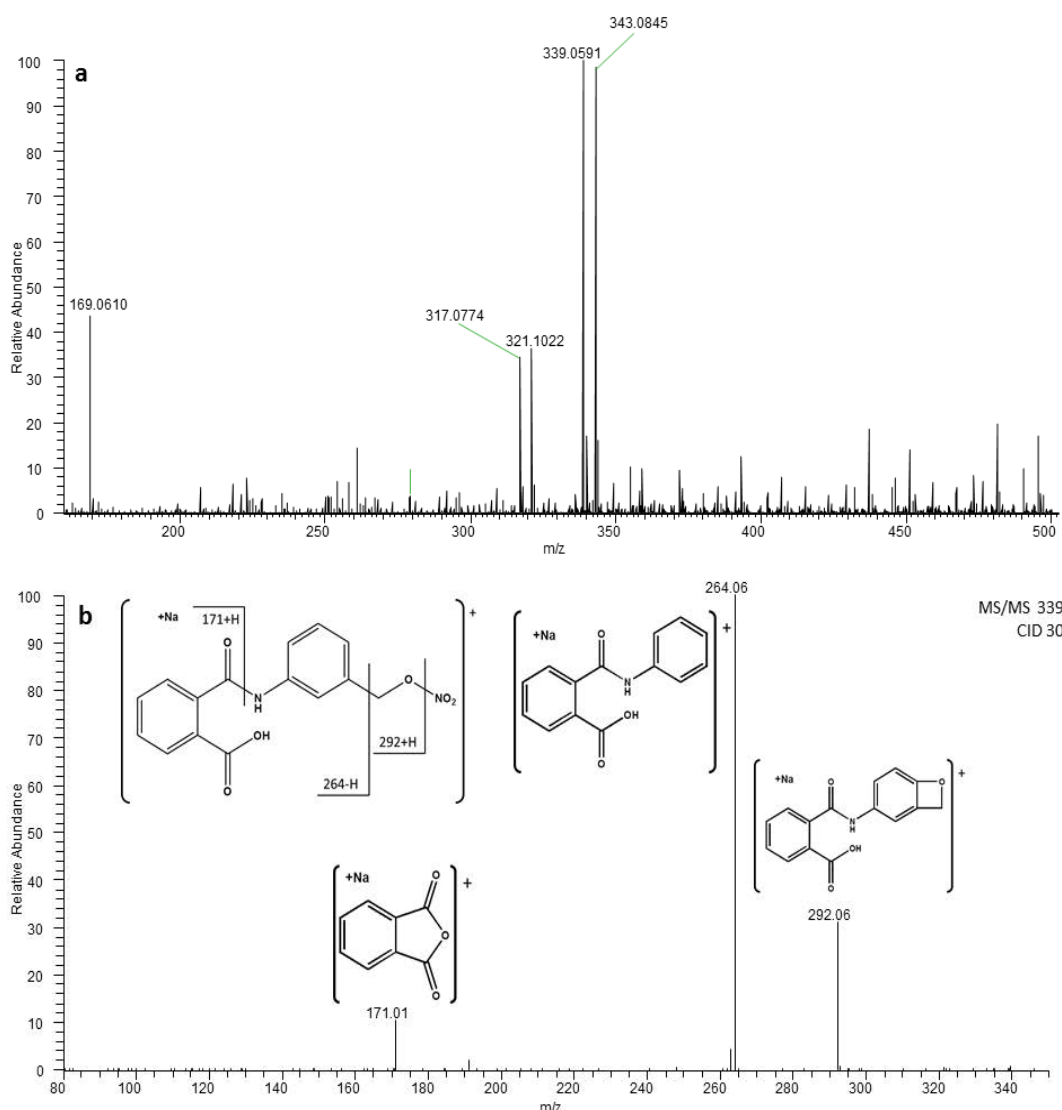


Figura 28. Espectros do metabólito de LAPDESF-SCD03. (a) Espectro mostrando o padrão isotópico dos íons protonado e sodiado. (b) Espectro em *Tandem* do íon sodiado em m/z 339.

Apesar de ser observado já no tempo zero do experimento, provavelmente devido a sua rápida formação, mesmo durante os poucos minutos em que o analito se encontrava no meio de incubação aguardando a adição dos hepatócitos, O metabólito de m/z 339 não é encontrado na análise de solução do padrão de LAPDESF-SCD03 (Figura 29).

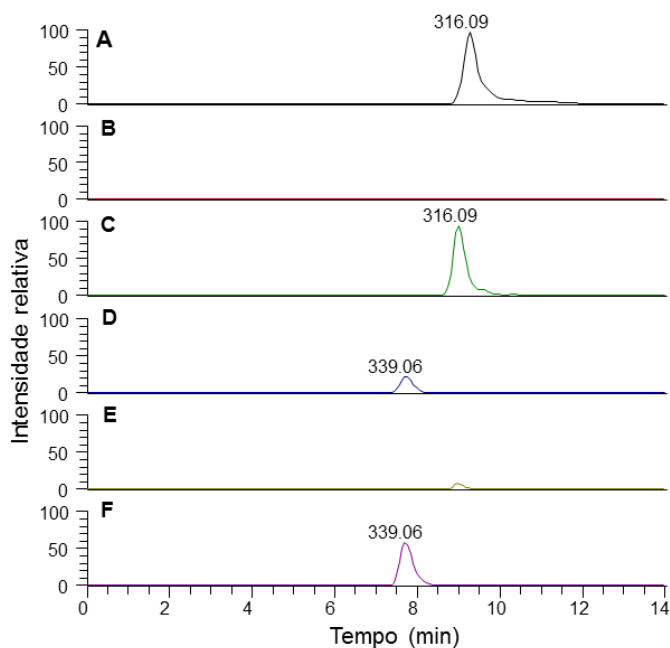


Figura 29. Cromatogramas dos íons 316 e 339. (A) solução de LAPDESF-SCD03 íon 316, de (B) solução de LAPDESF-SCD03 íon 339, de (C) extrato da incubação no tempo 0 íon 316, de (D) extrato da incubação no tempo 0 íon 339, de (E) extrato da incubação no tempo 45 minutos íon 316 e de (F) extrato da incubação no tempo 45 minutos íon 339.

O estudo para identificar os metabolitos do LAPDESF-SCD03 foi realizado em hepatócitos do mesmo vial dos que foram utilizados no controle positivo, os quais mostraram metabolitos de fase I e de fase II do diclofenaco. Baseado no metabolismo da talidomida (Chung *et al.*, 2004) (Chung *et al.*, 2004) já que o LAPDESF-SCD03 tem o mesmo grupo ftalimida, era esperado que ocorresse a hidroxilação do anel ftalimídico, a qual não foi observada sob as condições testadas nesse estudo. Outrossim, o metabólito hidroxiglucuronideo do LAPDESF-SCD03, resultante de uma reação de fase II de glucuronidação no ponto de hidroxilação prévia, também não foi encontrado.

Considerando o metabólito de LAPDESF-SCD03 resultante de hidrólise na subunidade ftalimídica, cumpre salientar que de acordo com os estudos de Nakamura e colaboradores (2007) com a talidomida e seus metabólitos, a hidrólise da subunidade ftalimídica pode resultar em atividade inibitória da produção de TNF- α *in vitro* consideravelmente elevada em relação à molécula matriz, com aumento de 32% da molécula matriz para 80% no metabólito.

5-3. Conclusão e Perspectivas

A estrutura proposta, além dos resultados analíticos, ainda é condizente com as observações de que pode haver uma contribuição de um metabólito para atividade final do LAPDESF-SCD03, que foi observada após a administração do fármaco matriz nos estudo *in vivo*.

A disponibilidade de uma pequena quantidade dessa substância seria útil na validação de um método bioanalítico capaz de determinar seu nível de exposição em relação a molécula matriz em estudo de administração do LAPDESF-SCD03. Seria suficiente também para condução de estudos *in vitro* de atividade e metabolismo. Por outro lado, para avaliação de seu próprio perfil farmacocinético, uma quantidade maior seria necessária com o intuito de administrá-lo a modelos animais pelas vias oral e intravenosa.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Como parte do desenvolvimento do fármaco LAPDESF-SCD03 foi avaliado seu perfil farmacocinético em modelos animais, além de ensaios de atividade e obtenção de algumas propriedades físico-químicas.

A solubilidade de 2,3 µg/mL é o provável fator limitante a observação de uma biodisponibilidade completa, por outro lado o fármaco deve possuir uma boa permeação, visto que houve absorção (F= 5,6 %) apesar da baixa solubilidade e da instabilidade em fluidos aquosos.

O metabolismo em plasma foi similar entre o plasma do modelo animal e o plasma humano, sugerindo inexistência de peculiaridades do modelo que necessitassem mais atenção no que se refere ao metabolismo plasmático. A taxa de ligação a proteínas plasmáticas de 88 % não foi suficiente para amenizar a degradação química somada ao metabolismo por enzimas plasmáticas.

Quanto ao movimento do fármaco no organismo, os parâmetros farmacocinéticos observados são forte evidência de uma rápida conversão (meia-vida de 5 min e clearance de 173 mL/min.kg) a uma ou mais formas ativas, no entanto não foi possível estabelecer que essa forma seja detentora exclusiva da atividade observada na administração do fármaco. Ainda, foi possível sugerir um dos prováveis produtos do LAPDESF-SCD03.

Esse trabalho confirma, uma vez mais, o potencial farmacológico *in vivo* do LAPDESF-SCD03, que é um dentre uma série de derivados ftalimídicos planejados para apresentar ação inibitória de TNF- α com objetivo de tratamento sintomático da anemia falciforme.

Referências

ALIYU, Z. Y.; TUMBLIN, A. R.; KATO, G. J. Current therapy of sickle cell disease. **Haematologica**, v. 91, n. 1, p. 7-10, Jan 2006. ISSN 1592-8721. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16434364> >.

ALLEN, L. V.; POPOVICH, N. G.; ANSEL, H. C. **Ansel's pharmaceutical dosage forms and drug delivery systems**. 8th. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2005. xi, 738 p. ISBN 0781746124.

ALMEIDA, A. D. M. et al. Assessment of Bahia Neonatal Screening Program in 2003 **Revista Brasileira de Saúde Materno Infantil**, v. 6, n. 1, p. 7, 2006.

ANVISA. **RE nº 899: Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos**. SANITÁRIA, A. N. D. V. 2003.

_____. **Farmacopeia Brasileira**. 5. Brasília: Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2010.

_____. **RDC N.º 27**. SANITÁRIA, A. N. D. V. 2012.

AVDEEF, A.; BERGER, C. M.; BROWNELL, C. pH-metric solubility. 2: Correlation between the acid-base titration and the saturation shake-flask solubility-pH methods. **Pharmaceutical Research**, v. 17, n. 1, p. 85-89, Jan 2000. ISSN 0724-8741. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000085543800014 >.

AVULA, B. et al. Profiling primaquine metabolites in primary human hepatocytes using UHPLC-QTOF-MS with ¹³C stable isotope labeling. **Journal of Mass Spectrometry**, v. 48, n. 2, p. 276-285, Feb 2013. ISSN 1076-5174. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000314478300017 >.

BAILLIE, T. A. et al. Drug metabolites in safety testing. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 182, n. 3, p. 188-196, Aug 1 2002. ISSN 0041-008X. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000177779300001 >.

BALA, S. et al. Design, synthesis, characterization, and computational studies on benzamide substituted Mannich bases as novel, potential antibacterial agents. **ScientificWorldJournal**, v. 2014, p. 732141, 2014. ISSN 1537-744X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24574915> >.

BALLESTEROS-GOMEZ, A. et al. In vitro metabolism of 2-ethylhexyldiphenyl phosphate (EHDPHP) by human liver microsomes. **Toxicology Letters**, v. 232, n. 1, p. 203-212, Jan 2015. ISSN 0378-4274. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000346175100023 >.

BARR, W. H. et al. PHARMACOKINETICS OF ISEPAMICIN. **Journal of Chemotherapy**, v. 7, p. 53-61, Jun 1995. ISSN 1120-009X. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:A1995TG37900007 >.

BENEDETTI, M. S. et al. Drug metabolism and pharmacokinetics. **Drug Metabolism Reviews**, v. 41, n. 3, p. 344-390, 2009 2009. ISSN 0360-2532. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000269410900004 >.

BEREZHKOVSIIY, L. M. Some features of the kinetics and equilibrium of drug binding to plasma proteins. **Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology**, v. 4, n. 12, p. 1479-1498, Dec 2008. ISSN 1742-5255. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000261785700002 >.

BERGLUND, M.; BYSTROM, K.; PERSSON, B. SCREENING CHEMICAL AND PHYSICAL STABILITY OF DRUG SUBSTANCES. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 8, n. 8-12, p. 639-643, 1990 1990. ISSN 0731-7085. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:A1990EW53900006 >.

BEUCK, S.; SCHANZER, W.; THEVIS, M. Investigation of the in vitro metabolism of the emerging drug candidate S107 for doping-preventive purposes. **Journal of Mass Spectrometry**, v. 46, n. 2, p. 112-130, Feb 2011. ISSN 1076-5174. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000288463700002 >.

BHATTACHAR, S. N.; DESCHENES, L. A.; WESLEY, J. A. Solubility: it's not just for physical chemists. **Drug Discovery Today**, v. 11, n. 21-22, p. 1012-1018, Nov 2006. ISSN 1359-6446. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000242055400009 >.

BOHNERT, T.; GAN, L. S. Plasma Protein Binding: From Discovery to Development. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 102, n. 9, p. 2953-2994, Sep 2013. ISSN 0022-3549. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000330240900010 >.

BOTLER, J.; CAMACHO, L. A.; CRUZ, M. M. Phenylketonuria, congenital hypothyroidism and haemoglobinopathies: public health issues for a Brazilian newborn screening program. **Cad Saude Publica**, v. 28, n. 9, p. 1623-31, Sep 2012. ISSN 1678-4464. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23033178> >.

BRAGA, V. A. et al. Involvement of L-glutamate and ATP in the neurotransmission of the sympathoexcitatory component of the chemoreflex in the commissural nucleus tractus solitarii of awake rats and in the working heart-brainstem preparation. **J Physiol**, v. 581, n. Pt 3, p. 1129-45, Jun 2007. ISSN 0022-3751. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17395636> >.

BRANCO, A. C. D. S. C. et al. Biochemical and Hematological Parameters of Wistar Rats and Swiss Mice in the Professor Thomas George Animal Laboratory **Revista Brasileira de Ciências da Saúde**, v. 15, n. 2, p. 6, 2011.

BRANDELISE, S. et al. Newborn screening for sickle cell disease in Brazil: the Campinas experience. **Clin Lab Haematol**, v. 26, n. 1, p. 15-9, Feb 2004. ISSN 0141-9854. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14738432> >.

BRANDON, E. F. A. et al. An update on in vitro test methods in human hepatic drug biotransformation research: pros and cons. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 189, n. 3, p. 233-246, Jun 15 2003. ISSN 0041-008X. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000183470200009 >.

BRASIL. **Resolução nº 251/97**. SAÚDE, C. N. D. 1997.

CALVO, R. et al. The role of unbound drug in pharmacokinetics/pharmacodynamics and in therapy. **Current Pharmaceutical Design**, v. 12, n. 8, p. 977-987, 2006. ISSN 1381-6128. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000235757900009 >.

CAMPOS, M. L. **Farmacocinética pré-clínica do composto 1-(2,6-diclorofenil)indolin-2-ona (DICCIC), pró-fármaco de diclofenaco**. 2012. 106 (Master's). Universidade Estadual Paulista. "Júlio de Mesquita Filho". Faculdade de Ciências Farmacêuticas., Araraquara - SP, Brasil.

CANNAZZA, G. et al. Development of an in vitro liquid chromatography-mass spectrometry method to evaluate stereo and chemical stability of new drug candidates employing immobilized artificial membrane column. **Journal of Chromatography A**, v. 1363, p. 216-225, Oct 10 2014. ISSN 0021-9673. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000343359100027 >.

CCAC. **Guide to the care and use of experimental animals**. Ottawa, Canada: Canadian Council on Animal Care, 1993. 298 ISBN 0-919087-18-3. Disponível em: < http://www.ccac.ca/Documents/Standards/Guidelines/Experimental_Animals_Vol1.pdf >.

CHASIN, A. A. D. M. et al. Validação de métodos em análises toxicológicas: uma abordagem geral. **Revista Brasileira de Toxicologia**, v. 11, n. 1, p. 6, 1998.

CHEN, X.-Q. et al. Discovery pharmaceuticals - Challenges and opportunities. **Aaps Journal**, v. 8, n. 2, p. E402-E408, 2006 2006. ISSN 1550-7416. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000238975700021 >.

CHIBA, M.; ISHII, Y.; SUGIYAMA, Y. Prediction of Hepatic Clearance in Human From In Vitro Data for Successful Drug Development. **Aaps Journal**, v. 11, n. 2, p. 262-276, Jun 2009. ISSN 1550-7416. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000269940800006 >.

CHOW, S. C.; WANG, H. S. On sample size calculation in bioequivalence trials. **Journal of Pharmacokinetics and Pharmacodynamics**, v. 28, n. 2, p. 155-169, Apr 2001. ISSN 1567-567X. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000168838100003 >.

CHUNG, F. et al. Thalidomide pharmacokinetics and metabolite formation in mice, rabbits, and multiple myeloma patients. **Clin Cancer Res**, v. 10, n. 17, p. 5949-56, Sep 2004. ISSN 1078-0432. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15355928> >.

CHUNG, M. C. et al. Synthesis, ex vivo and in vitro hydrolysis study of an indoline derivative designed as an anti-inflammatory with reduced gastric ulceration properties. **Molecules**, v. 14, n. 9, p. 3187-97, 2009. ISSN 1420-3049. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19783917> >.

CRAIG, C. R.; STITZEL, R. E. **Modern pharmacology with clinical applications**. 6th. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2004. xii, 824 p. ISBN 0781737621.

CURATOLO, W. Physical chemical properties of oral drug candidates in the discovery and exploratory development settings. **Pharmaceutical Science & Technology Today**, v. 1, n. 9, p. 387-393, Dec 1998. ISSN 1461-5347. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000077708200005 >.

CZAJA, M. J.; XU, J.; ALT, E. PREVENTION OF CARBON TETRACHLORIDE-INDUCED RAT-LIVER INJURY BY SOLUBLE TUMOR-NECROSIS-FACTOR RECEPTOR. **Gastroenterology**, v. 108, n. 6, p. 1849-1854, Jun 1995. ISSN 0016-5085. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:A1995RA37800030 >.

DE PAULA, P. M. et al. Hemodynamic responses to electrical stimulation of the aortic depressor nerve in awake rats. **American Journal of Physiology-Regulatory Integrative and Comparative Physiology**, v. 277, n. 1, p. R31-R38, Jul 1999. ISSN 0363-6119. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000081259900005 >.

DERENDORF, H.; MEIBOHM, B. Modeling of pharmacokinetic/pharmacodynamic (PK/PD) relationships: concepts and perspectives. **Pharm Res**, v. 16, n. 2, p. 176-85, Feb 1999. ISSN 0724-8741. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10100300> >.

DHILLON, S. **Basic pharmacokinetics / Soraya Dhillon and Kiren Gill**. ISBN 9780853695714.

DHINGRA, M. S. et al. Design, synthesis, physicochemical, and pharmacological evaluation of gallic acid esters as non-ulcerogenic and gastroprotective anti-inflammatory agents. **Medicinal Chemistry Research**, v. 23, n. 11, p. 4771-4788, Nov 2014. ISSN 1054-2523. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000342038900012 >.

DI, L. et al. A Perspective on the Prediction of Drug Pharmacokinetics and Disposition in Drug Research and Development. **Drug Metabolism and Disposition**, v. 41, n. 12, p. 1975-1993, Dec 2013. ISSN 0090-9556. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000327318700002 >.

DI, L.; KERNS, E. H. Stability Challenges in Drug Discovery. **Chemistry & Biodiversity**, v. 6, n. 11, p. 1875-1886, 2009. ISSN 1612-1872. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000272475700012 >.

DI, L.; KERNS, E. H.; CARTER, G. T. Drug-Like Property Concepts in Pharmaceutical Design. **Current Pharmaceutical Design**, v. 15, n. 19, p. 2184-2194, Jul 2009. ISSN 1381-6128. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000268234700003 >.

DI, L. et al. Development and application of high throughput plasma stability assay for drug discovery. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 297, n. 1-2, p. 110-119, Jun 2005. ISSN 0378-5173. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000229766400012 >.

DIEHL, K. H. et al. A good practice guide to the administration of substances and removal of blood, including routes and volumes. **Journal of Applied Toxicology**, v. 21, n. 1, p. 15-23, Jan-Feb 2001. ISSN 0260-437X. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000166838500003 >.

DOS SANTOS, J. L.; CHUNG, M. C. Anemia falciforme: desafios e avanços na busca de novos fármacos. **Química Nova**, v. 35, n. 4, p. 8, 2012.

DOS SANTOS, J. L.; LANARO, C.; CHIN, C. M. Advances in sickle cell disease treatment: from drug discovery until the patient monitoring. **Cardiovasc Hematol Agents Med Chem**, v. 9, n. 2, p. 113-27, Apr 2011. ISSN 1875-6182. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21401492> >.

DOS SANTOS, J. L. et al. Design, synthesis, and pharmacological evaluation of novel hybrid compounds to treat sickle cell disease symptoms. **J Med Chem**, v. 54, n. 16, p. 5811-9, Aug 2011. ISSN 1520-4804. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21766854> >.

_____. Assessment of the in vivo genotoxicity of new lead compounds to treat sickle cell disease. **Molecules**, v. 16, n. 4, p. 2982-9, 2011. ISSN 1420-3049. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21471937> >.

_____. Mutagenicity of new lead compounds to treat sickle cell disease symptoms in a Salmonella/microsome assay. **Int J Mol Sci**, v. 11, n. 2, p. 779-88, 2010. ISSN 1422-0067. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20386668> >.

ETTMAYER, P. et al. Lessons learned from marketed and investigational prodrugs. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 47, n. 10, p. 2393-2404, May 2004. ISSN 0022-2623. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000221183800001 >.

FAN, J.; DE LANNOY, I. A. M. Pharmacokinetics. **Biochemical Pharmacology**, v. 87, n. 1, p. 93-120, Jan 1 2014. ISSN 0006-2952. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000329950600007 >.

FASINU, P. et al. Diverse approaches for the enhancement of oral drug bioavailability. **Biopharmaceutics & Drug Disposition**, v. 32, n. 4, p. 185-209, May 2011. ISSN 0142-2782. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000290491100001 >.

FDA. **Bioanalytical Method Validation**. SERVICES, D. O. H. A. H. Rockville: U.S.: Food and Drug Administration (FDA)Center for Drug Evaluation and Research (CDER)Center for Veterinary Medicine (CVM) 25 p. 2001.

_____. **Guidance for Industry: Safety Testing of Drug Metabolites** ADMINISTRATION, F. A. D. Rockville, MD, USA: 14 p. 2008.

_____. **Draft Guidance: Bioanalytical Method Validation**. SERVICES, D. O. H. A. H. Rockville: U.S.: Food and Drug Administration (FDA)Center for Drug Evaluation and Research (CDER)Center for Veterinary Medicine (CVM) 34 p. 2013.

FUJITA, T.; HANSCH, C.; IWASA, J. NEW SUBSTITUENT CONSTANT PI DERIVED FROM PARTITION COEFFICIENTS. **Journal of the American Chemical Society**, v. 86, n. 23, p. 5175-&, 1964 1964. ISSN 0002-7863. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:A19643134B00032 >.

GABRIELSSON, J.; WEINER, D. **Pharmacokinetics and pharmacodynamic. Data analysis: Concepts and applications**. 2006. 1254 Swedish Pharmaceutical Press, Estocolmo, Suécia.

GANDHI, A. S. et al. First Characterization of AKB-48 Metabolism, a Novel Synthetic Cannabinoid, Using Human Hepatocytes and High-Resolution Mass Spectrometry. **Aaps Journal**, v. 15, n. 4, p. 1091-1098, Oct 2013. ISSN 1550-7416. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000325126300020 >.

GE, G. B. et al. The role of serum albumin in the metabolism of Boc5: Molecular identification, species differences and contribution to plasma metabolism. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 48, n. 1-2, p. 360-369, Jan 2013. ISSN 0928-0987. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000315613500040 >.

GILARD, V. et al. Chemical stability and fate of the cytostatic drug ifosfamide and its N-dechloroethylated metabolites in acidic aqueous solutions. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 42, n. 14, p. 2542-2560, Jul 15 1999. ISSN 0022-2623. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000081532500006 >.

GONZÁLEZ, O. et al. Bioanalytical chromatographic method validation according to current regulations, with a special focus on the non-well defined parameters limit of quantification, robustness and matrix effect. **J Chromatogr A**, v. 1353, p. 10-27, Aug 2014. ISSN 1873-3778. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24794936> >.

HAN, C. et al. **Evaluation of drug candidates for preclinical development**

pharmacokinetics, metabolism, pharmaceuticals, and toxicology. Wiley series in drug discovery and development. Hoboken, NJ: John Wiley & Sons,; x, 289 p. p. 2010.

HANKINS, J.; AYGUN, B. Pharmacotherapy in sickle cell disease--state of the art and future prospects. **Br J Haematol**, v. 145, n. 3, p. 296-308, May 2009. ISSN 1365-2141. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19222472> >.

HANSCH, C.; MALONEY, P. P.; FUJITA, T. CORRELATION OF BIOLOGICAL ACTIVITY OF PHENOXYACETIC ACIDS WITH HAMMETT SUBSTITUENT CONSTANTS AND PARTITION COEFFICIENTS. **Nature**, v. 194, n. 4824, p. 178-&, 1962 1962. ISSN 0028-0836. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:A19628768B00050 >.

HOFF, R. B. et al. Structural Elucidation of Sulfaquinoxaline Metabolism Products and Their Occurrence in Biological Samples Using High-Resolution Orbitrap Mass Spectrometry. **Analytical Chemistry**, v. 86, n. 11, p. 5579-5586, Jun 2014. ISSN 0003-2700. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000336953100055 >.

HOLFORD, N. H. G. THE TARGET CONCENTRATION APPROACH TO CLINICAL DRUG DEVELOPMENT. **Clinical Pharmacokinetics**, v. 29, n. 5, p. 287-291, Nov 1995. ISSN 0312-5963. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:A1995TF31900001 >.

HOWARD, M. L. et al. Plasma Protein Binding in Drug Discovery and Development. **Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening**, v. 13, n. 2, p. 170-187, Feb 2010. ISSN 1386-2073. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000274432800008 >.

HUTTUNEN, K. M. et al. Design, Synthesis, and Evaluation of Novel Cyclic Phosphates of 5-Aminosalicylic Acid as Cytochrome P450-Activated Prodrugs. **Molecular Pharmaceutics**, v. 10, n. 2, p. 532-537, Feb 2013. ISSN 1543-8384. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000314627400011 >.

ICH. **Guidance on Nonclinical Safety Studies for the Conduct of Human Clinical Trials and Marketing Authorization for Pharmaceuticals M3 (R2).** HARMONIZATION, I. C. O.: 31 p. 2009.

ISNARD, P.; LAMBERT, S. AQUEOUS SOLUBILITY AND NORMAL-OCTANOL WATER PARTITION-COEFFICIENT CORRELATIONS. **Chemosphere**, v. 18, n. 9-10, p. 1837-1853, 1989 1989. ISSN 0045-6535. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:A1989AF28700016 >.

KERN, S. E. et al. Isolation and structural characterization of a new tadalafil analog (2-hydroxyethylnortadalafil) found in a dietary supplement. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 103, p. 99-103, Jan 2015. ISSN 0731-7085. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000346691300014 >.

KERNS, E. H.; DI, L.; CARTER, G. T. In vitro solubility assays in drug discovery. **Curr Drug Metab**, v. 9, n. 9, p. 879-85, Nov 2008. ISSN 1389-2002. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18991584> >.

KOLA, I.; LANDIS, J. Can the pharmaceutical industry reduce attrition rates? **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 3, n. 8, p. 711-715, Aug 2004. ISSN 1474-1776. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000223005000021 >.

KOSTIAINEN, R. et al. Liquid chromatography/atmospheric pressure ionization-mass spectrometry in drug metabolism studies. **Journal of Mass Spectrometry**, v. 38, n. 4, p. 357-372, Apr 2003. ISSN 1076-5174. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000182653100001 >.

KUMARASINGHE, I. R.; WOSTER, P. M. Synthesis and Evaluation of Novel Cyclic Peptide Inhibitors of Lysine-Specific Demethylase 1. **Acs Medicinal Chemistry Letters**, v. 5, n. 1, p. 29-33, Jan 2014. ISSN 1948-5875. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000329677900008 >.

LANZKRON, S. et al. Systematic review: Hydroxyurea for the treatment of adults with sickle cell disease. **Annals of Internal Medicine**, v. 148, n. 12, p. 939-+, Jun 17 2008. ISSN 0003-4819. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000257425000006 >.

LECLERCQ, L. et al. Which Human Metabolites Have We MIST? Retrospective Analysis, Practical Aspects, and Perspectives For Metabolite Identification and Quantification in Pharmaceutical Development. **Chemical Research in Toxicology**, v. 22, n. 2, p. 280-293, Feb 2009. ISSN 0893-228X. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000263431800011 >.

LI, F. et al. Stable Isotope- and Mass Spectrometry-based Metabolomics as Tools in Drug Metabolism: A Study Expanding Tempol Pharmacology. **Journal of Proteome Research**, v. 12, n. 3, p. 1369-1376, Mar 2013. ISSN 1535-3893. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000315708000027 >.

LI, P.; ZHAO, L. Developing early formulations: Practice and perspective. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 341, n. 1-2, p. 1-19, Aug 16 2007. ISSN 0378-5173. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000249138300001 >.

LIPINSKI, C. A. Drug-like properties and the causes of poor solubility and poor permeability. **Journal of Pharmacological and Toxicological Methods**, v. 44, n. 1, p. 235-249, Jul-Aug 2000. ISSN 1056-8719. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000167835400001 >.

LIPINSKI, C. A. et al. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 23, n. 1-3, p. 3-25, Jan 15 1997. ISSN 0169-409X. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:A1997WH25900002 >.

_____. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. **Adv Drug Deliv Rev**, v. 46, n. 1-3, p. 3-26, Mar 2001. ISSN 0169-409X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11259830> >.

LOCATELLI, M. et al. Recent application of analytical methods to phase I and phase II drugs development: a review. **Biomed Chromatogr**, v. 26, n. 3, p. 283-300, Mar 2012. ISSN 1099-0801. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21853452> >.

LOEFFELBEIN, D. J. et al. Effects of ciclosporin therapy on xylazine/ketamine anaesthesia in a rat model. **J Vet Pharmacol Ther**, v. 33, n. 1, p. 100-2, Feb 2010. ISSN 1365-2885. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20444032> >.

LOUKAS, Y. L.; VRAKA, V.; GREGORIADIS, G. Drugs, in cyclodextrins, in liposomes: a novel approach to the chemical stability of drugs sensitive to hydrolysis. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 162, n. 1-2, p. 137-142, Mar 20 1998. ISSN 0378-5173. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000072921500017 >.

MACKAY, D. et al. RELATIONSHIPS BETWEEN AQUEOUS SOLUBILITY AND OCTANOL-WATER PARTITION-COEFFICIENTS. **Chemosphere**, v. 9, n. 11, p. 701-711, 1980 1980. ISSN 0045-6535. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:A1980KZ37900004 >.

MACTUTUS, C. F.; HERMAN, A. S.; BOOZE, R. M. Chronic intravenous model for studies of drug (Ab)use in the pregnant and/or group-housed rat: an initial study with cocaine. **Neurotoxicol Teratol**, v. 16, n. 2, p. 183-91, 1994 Mar-Apr 1994. ISSN 0892-0362. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8052193> >.

MAHMOOD, I.; GREEN, M. D.; FISHER, J. E. Selection of the first-time dose in humans: comparison of different approaches based on interspecies scaling of clearance. **J Clin Pharmacol**, v. 43, n. 7, p. 692-7, Jul 2003. ISSN 0091-2700. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12861964> >.

MASIMIREMBWA, C. M.; BREDBERG, U.; ANDERSSON, T. B. Metabolic stability for drug discovery and development - Pharmacokinetic and biochemical challenges. **Clinical Pharmacokinetics**, v. 42, n. 6, p. 515-528, 2003 2003. ISSN 0312-5963. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000184047900002 >.

MEIBOHM, B.; DERENDORF, H. Basic concepts of pharmacokinetic/pharmacodynamic (PK/PD) modelling. **International Journal of Clinical Pharmacology and Therapeutics**, v. 35, n. 10, p. 401-413, Oct 1997. ISSN 0946-1965. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:A1997YC54600002 >.

MEILER, S. E. et al. Pomalidomide augments fetal hemoglobin production without the myelosuppressive effects of hydroxyurea in transgenic sickle cell mice. **Blood**, v. 118, n. 4, p. 1109-12, Jul 2011. ISSN 1528-0020. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21536862> >.

MILLER, M. M. et al. RELATIONSHIPS BETWEEN OCTANOL WATER PARTITION-COEFFICIENT AND AQUEOUS SOLUBILITY. **Environmental Science & Technology**, v. 19, n. 6, p. 522-529, 1985 1985. ISSN 0013-936X. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:A1985AJC4700011 >.

MIYOSHI, M. et al. Oral administration of tributyrin increases concentration of butyrate in the portal vein and prevents lipopolysaccharide-induced liver injury in rats. **Clinical Nutrition**, v. 30, n. 2, p. 252-258, Apr 2011. ISSN 0261-5614. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000290009800018 >.

MOEKER, J.; THIEM, J. Synthesis and hydrolysis studies of novel glyco-functionalized platinum complexes. **Carbohydrate Research**, v. 348, p. 14-26, Feb 1 2012. ISSN 0008-6215. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000300926300002 >.

MORIO, L. A. et al. Distinct roles of tumor necrosis factor-alpha and nitric oxide in acute liver injury induced by carbon tetrachloride in mice. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 172, n. 1, p. 44-51, Apr 1 2001. ISSN 0041-008X. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000168067700006 >.

NAKAMURA, T. et al. Hydrolyzed metabolites of thalidomide: synthesis and TNF-alpha production-inhibitory activity. **Chem Pharm Bull (Tokyo)**, v. 55, n. 4, p. 651-4, Apr 2007. ISSN 0009-2363. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17409565> >.

NEERVANNAN, S. Preclinical formulations for discovery and toxicology: physicochemical challenges. **Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology**, v. 2, n. 5, p. 715-731, Oct 2006. ISSN 1742-5255. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000246480000005 >.

NOVÁKOVÁ, L.; VLCKOVÁ, H. A review of current trends and advances in modern bio-analytical methods: chromatography and sample preparation. **Anal Chim Acta**, v. 656, n. 1-2, p. 8-35, Dec 2009. ISSN 1873-4324. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19932811> >.

ODIÈVRE, M. H. et al. Pathophysiological insights in sickle cell disease. **Indian J Med Res**, v. 134, p. 532-7, Oct 2011. ISSN 0971-5916. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22089617> >.

OMAR, K. et al. The complex degradation and metabolism of quercetin in rat hepatocyte incubations. **Xenobiotica**, v. 44, n. 12, p. 1074-1082, Dec 2014. ISSN 0049-8254. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000344867400003 >.

ORGANISATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT. **Test No. 105: Water Solubility. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 1: Physical-Chemical properties.** France: OECD Publishing,; 1 online resource. p. 1995a.

_____. **Test No. 107: Partition Coefficient (n-octanol/water): Shake Flask Method.** OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 1: Physical-Chemical properties. France: OECD Publishing, : 1 online resource. p. 1995b.

_____. **Test No. 117: Partition Coefficient (n-octanol/water), HPLC Method.** OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 1: Physical-Chemical properties. France: OECD Publishing, : 1 online resource. p. 2004.

PARK, Y. S. et al. Pharmacokinetics and bioavailability of oral cephalosporins, KR-984055 and its prodrugs, KR-999001 and KR-999002, in the rat. **Archives of Pharmacal Research**, v. 26, n. 1, p. 83-88, Jan 2003. ISSN 0253-6269. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000180677800016 >.

PATHARE, A. et al. Cytokines in sickle cell disease. **Hematology**, v. 8, n. 5, p. 329-37, Oct 2003. ISSN 1024-5332. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14530175> >.

PECCININI, R. G.; CAMPOS, M. L. Fundamentos de Farmacocinética Clínica. In: AIZENSTEIN, M. L. (Ed.). **Fundamentos para o uso racional de medicamentos**. 2. São Paulo, Brasil: Clube de Autores, 2015. p.105. ISBN 978-85-919203-9-6.

PELLEGATTI, M. Preclinical in vivo ADME studies in drug development: a critical review. **Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology**, v. 8, n. 2, p. 161-172, Feb 2012. ISSN 1742-5255. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000299288100003 >.

POZO, O. J. et al. Collision-induced dissociation of 3-keto anabolic steroids and related compounds after electrospray ionization. Considerations for structural elucidation. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 22, n. 24, p. 4009-4024, Dec 2008. ISSN 0951-4198. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000262293100005 >.

RADFORD, J. A. et al. THE STABILITY OF IFOSFAMIDE IN AQUEOUS-SOLUTION AND ITS SUITABILITY FOR CONTINUOUS 7-DAY INFUSION BY AMBULATORY PUMP (REPRINTED FROM CANC CHEMOTHER PHARMACOL, VOL 26, PGS 144-146, 1990). **Journal of Cancer Research and Clinical Oncology**, v. 117, p. S154-S156, 1991. ISSN 0171-5216. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:A1991HG40900007 >.

RANG, H. P.; DALE, M. M. **Rang & Dale's pharmacology**. 7th. Edinburgh ; New York: Elsevier/Churchill Livingstone, 2012. xxii, 777 p. ISBN 9780702034718 (pbk) 0702034711 (pbk).

REES, D. C.; WILLIAMS, T. N.; GLADWIN, M. T. Sickle-cell disease. **Lancet**, v. 376, n. 9757, p. 2018-31, Dec 2010. ISSN 1474-547X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21131035> >.

ROWLAND, M.; TOZER, T. N. **Clinical pharmacokinetics : concepts and applications**. 3rd. Baltimore: Williams & Wilkins, 1995. xiv, 601 p. ISBN 0683074040.

_____. **Clinical pharmacokinetics and pharmacodynamics : concepts and applications**. 4th. Philadelphia: Wolters Kluwer Health/Lippincott William & Wilkins, 2011. xxii, 839 p. ISBN 9780781750097
0781750091.

RUIZ-ANGEL, M. J. et al. Are analysts doing method validation in liquid chromatography? **J Chromatogr A**, v. 1353, p. 2-9, Aug 2014. ISSN 1873-3778. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24947888> >.

SAAL, C.; PETEREIT, A. C. Optimizing solubility: Kinetic versus thermodynamic solubility temptations and risks. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 47, n. 3, p. 589-595, Oct 2012. ISSN 0928-0987. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000309800900006 >.

SAFO, M. K. et al. Structural basis for the potent antisickling effect of a novel class of five-membered heterocyclic aldehydic compounds. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 47, n. 19, p. 4665-4676, Sep 9 2004. ISSN 0022-2623. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000223699600006 >.

SALMANI, J. M. M. et al. Aqueous Solubility and Degradation Kinetics of the Phytochemical Anticancer Thymoquinone; Probing the Effects of Solvents, pH and Light. **Molecules**, v. 19, n. 5, p. 5925-5939, May 2014. ISSN 1420-3049. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000337113000029 >.

SARDA, S. et al. Diclofenac metabolism in the mouse: novel in vivo metabolites identified by high performance liquid chromatography coupled to linear ion trap mass spectrometry. **Xenobiotica**, v. 42, n. 2, p. 179-94, Feb 2012. ISSN 1366-5928. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21955289> >.

SEE, E. et al. Physicochemical characterization of asulacrine towards the development of an anticancer liposomal formulation via active drug loading: Stability, solubility, lipophilicity and ionization. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 473, n. 1-2, p. 528-535, Oct 2014. ISSN 0378-5173. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000342656800058 >.

SILVERMAN, R. B.; HOLLADAY, M. W. Drug Metabolism. In: (Ed.). **The Organic Chemistry of Drug Design and Drug Action**. 3. Oxford, United Kingdom: Academic Press, 2014. cap. 8,

SINGH, S. S. Preclinical pharmacokinetics: an approach towards safer and efficacious drugs. **Curr Drug Metab**, v. 7, n. 2, p. 165-82, Feb 2006. ISSN 1389-2002. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16472106> >.

SMITH, D. A. et al. Volume of Distribution in Drug Design. **J Med Chem**, Apr 2015. ISSN 1520-4804. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25799158> >.

SMITH, D. A.; DI, L.; KERNS, E. H. The effect of plasma protein binding on in vivo efficacy: misconceptions in drug discovery. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 9, n. 12, p. 929-939, Dec 2010. ISSN 1474-1776. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000284871900024 >.

SMITH, D. A.; WATERBEEMD, H. V. D.; WALKER, D. K. **Pharmacokinetics and metabolism in drug design**. Weinheim ; New York: Wiley-VCH, 2001. xi, 149 p. ISBN 3527301976 (alk. paper).

SNYDER, L. R. et al. **Introduction to modern liquid chromatography**. Hoboken, N.J.: Wiley: 1 online resource. p. 2010.

SOMMER, C. K. et al. [Neonatal screening for hemoglobinopathies: a one-year experience in the public health system in Rio Grande do Sul State, Brazil]. **Cad Saude Publica**, v. 22, n. 8, p. 1709-14, Aug 2006. ISSN 0102-311X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16832542> >.

SPARIDANS, R. W. et al. Liquid chromatography-tandem mass spectrometric assay for diclofenac and three primary metabolites in mouse plasma. **J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci**, v. 872, n. 1-2, p. 77-82, Sep 2008. ISSN 1570-0232. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18674973> >.

TALLURI, R. S. et al. Disposition kinetics of a dipeptide ester prodrug of acyclovir and its metabolites following intravenous and oral administrations in rat **Clin. Res. Regul.**, v. 26, n. 3, p. 8, 2009.

TANG, W. The metabolism of diclofenac - Enzymology and toxicology perspectives. **Current Drug Metabolism**, v. 4, n. 4, p. 319-329, Aug 2003. ISSN 1389-2002. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000184596900005 >.

TEITELBAUM, A. M. et al. Synthesis, pH-dependent, and plasma stability of meropenem prodrugs for potential use against drug-resistant tuberculosis. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 21, n. 17, p. 5605-5617, Sep 2013. ISSN 0968-0896. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000323294600079 >.

THURMAN, E. M. et al. Identification of imidacloprid metabolites in onion (*Allium cepa* L.) using high-resolution mass spectrometry and accurate mass tools. **Rapid Commun Mass Spectrom**, v. 27, n. 17, p. 1891-903, Sep 2013. ISSN 1097-0231. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23939955> >.

TIMMERMAN, P. M.; DE VRIES, R.; INGELSE, B. A. Tailoring bioanalysis for PK studies supporting drug discovery. **Curr Top Med Chem**, v. 1, n. 5, p. 443-62, Nov 2001. ISSN 1568-0266. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11899107> >.

TONG, X.; RATNARAJ, N.; PATSALOS, P. N. The pharmacokinetics of vigabatrin in rat blood and cerebrospinal fluid. **Seizure-European Journal of Epilepsy**, v. 16, n. 1, p. 43-49, Jan 2007. ISSN 1059-1311. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000243625700006 >.

TOUTAIN, P. L.; BOUSQUET-MELOU, A. Volumes of distribution. **Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics**, v. 27, n. 6, p. 441-453, Dec 2004. ISSN 0140-7783. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000226256000005 >.

TOUTAIN, P. L.; BOUSQUET-MÉLOU, A. Plasma clearance. **J Vet Pharmacol Ther**, v. 27, n. 6, p. 415-25, Dec 2004. ISSN 0140-7783. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15601437> >.

TOZER, T. N. Concepts basic to pharmacokinetics. **Pharmacol Ther**, v. 12, n. 1, p. 109-31, 1981. ISSN 0163-7258. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7255535> >.

TSAIOUN, K.; KATES, S. A. **ADMET for Medicinal Chemists: A Pratical Guide**. Hoboken, New Jersey: John Wiley & Sons, 2011. 524.

VAN DE WATERBEEMD, H.; GIFFORD, E. ADMET in silico modelling: Towards prediction paradise? **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 2, n. 3, p. 192-204, Mar 2003. ISSN 1474-1776. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000181201600014 >.

VAN DE WATERBEEMD, H. et al. Property-based design: Optimization of drug absorption and pharmacokinetics. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 44, n. 9, p. 1313-1333, Apr 26 2001. ISSN 0022-2623. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000168443100001 >.

VAN DE WATERBEEMD, H.; SMITH, D. A.; JONES, B. C. Lipophilicity in PK design: methyl, ethyl, futile. **Journal of Computer-Aided Molecular Design**, v. 15, n. 3, p. 273-286, Mar 2001. ISSN 0920-654X. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000166992100007 >.

VUIGNIER, K. et al. Drug-protein binding: a critical review of analytical tools. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 398, n. 1, p. 53-66, Sep 2010. ISSN 1618-2642. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000280807500007 >.

WANG, D. et al. Ternary system of dihydroartemisinin with hydroxypropyl-beta-cyclodextrin and lecithin: Simultaneous enhancement of drug solubility and stability in aqueous solutions. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 83, p. 141-148, Sep 2013. ISSN 0731-7085. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000321085800019 >.

WANG, Q. et al. A rat pharmacokinetic/pharmacodynamic model for assessment of lipopolysaccharide-induced tumor necrosis factor-alpha production. **J Pharmacol Toxicol Methods**, v. 56, n. 1, p. 67-71, 2007 Jul-Aug 2007. ISSN 1056-8719. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17391989> >.

WEBER, F. et al. Synthesis, pharmacological evaluation, and σ_1 receptor interaction analysis of hydroxyethyl substituted piperazines. **J Med Chem**, v. 57, n. 7, p. 2884-94, Apr 2014. ISSN 1520-4804. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24617836> >.

WILLIAMS, H. D. et al. Strategies to Address Low Drug Solubility in Discovery and Development. **Pharmacological Reviews**, v. 65, n. 1, p. 315-499, Jan 2013. ISSN 0031-6997. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000316059800003 >.

WIND, M. et al. Investigation of low-abundant in vitro metabolites of stable isotope-labelled BAL4815 by accurate mass capillary-LC-ESI-qTof-MS and MS/MS. **Journal of Mass Spectrometry**, v. 41, n. 7, p. 903-910, Jul 2006. ISSN 1076-5174. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000239291500007 >.

WOHLFARTH, A. et al. First Metabolic Profile of XLR-11, a Novel Synthetic Cannabinoid, Obtained by Using Human Hepatocytes and High-Resolution Mass Spectrometry. **Clinical Chemistry**, v. 59, n. 11, p. 1638-1648, Nov 2013. ISSN 0009-9147. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000328281800015 >.

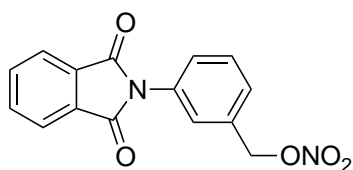
YANG, X. X. et al. Determination of thalidomide by high performance liquid chromatography: Plasma pharmacokinetic studies in the rat. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 39, n. 1-2, p. 299-304, Sep 1 2005. ISSN 0731-7085. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000232209600042 >.

ZHANG, F. et al. Compilation of 222 drugs' plasma protein binding data and guidance for study designs. **Drug Discovery Today**, v. 17, n. 9-10, p. 475-485, May 2012. ISSN 1359-6446. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000304297100011 >.

ANEXOS

Anexo I

In silico Pharmacokinetic data



Property	Model Name	Predicted Value	Unit
Absorption	Water solubility	-4.461	Numeric (log mol/L)
Absorption	Caco2 permeability	1.102	Numeric (log Papp in 10 ⁻⁶)
Absorption	Intestinal absorption (human)	99.132	Numeric (% Absorbed)
Absorption	Skin Permeability	-3.15	Numeric (log Kp)
Absorption	P-glycoprotein substrate	Yes	Categorical (Yes/No)
Absorption	P-glycoprotein I inhibitor	No	Categorical (Yes/No)
Absorption	P-glycoprotein II inhibitor	No	Categorical (Yes/No)
Distribution	VDss (human)	-0.693	Numeric (log L/kg)
Distribution	Fraction unbound (human)	0.114	Numeric (Fu)
Distribution	BBB permeability	-0.558	Numeric (log BB)
Distribution	CNS permeability	-2.333	Numeric (log PS)
Metabolism	CYP2D6 substrate	No	Categorical (Yes/No)
Metabolism	CYP3A4 substrate	No	Categorical (Yes/No)
Metabolism	CYP1A2 inhibitor	Yes	Categorical (Yes/No)
Metabolism	CYP2C19 inhibitor	No	Categorical (Yes/No)
Metabolism	CYP2C9 inhibitor	No	Categorical (Yes/No)
Metabolism	CYP2D6 inhibitor	No	Categorical (Yes/No)
Metabolism	CYP3A4 inhibitor	No	Categorical (Yes/No)
Excretion	Total Clearance	0.265	Numeric (log ml/min/kg)

Property	Model Name	Predicted Value	Unit
Excretion	Renal OCT2 substrate	No	Categorical (Yes/No)
Toxicity	AMES toxicity	Yes	Categorical (Yes/No)
Toxicity	Max. tolerated dose (human)	1.148	Numeric (log mg/kg/day)
Toxicity	hERG I inhibitor	No	Categorical (Yes/No)
Toxicity	hERG II inhibitor	No	Categorical (Yes/No)
Toxicity	Oral Rat Acute Toxicity (LD50)	2.309	Numeric (mol/kg)
Toxicity	Oral Rat Chronic Toxicity (LOAEL)	2.148	Numeric (log mg/kg_bw/c)
Toxicity	Hepatotoxicity	No	Categorical (Yes/No)
Toxicity	Skin Sensitisation	No	Categorical (Yes/No)
Toxicity	<i>T.Pyriformis</i> toxicity	1.468	Numeric (log ug/L)
Toxicity	Minnow toxicity	0.297	Numeric (log mM)

Anexo II

Protocolo CEUA/FCF/CAR nº 34/2012

Interessado: MICHEL LEANDRO DE CAMPOS

Orientador: Prof^aDr^a Rosângela Gonçalves Peccinini

Projeto: Farmacocinética pré-clínica, estudo de relação pk/pd e avaliação preliminar de segurança hepática e renal de derivados ftalimídicos em ratos

Parecer nº 58/2012 – Comissão de Ética no Uso de Animais

O Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais, desta Faculdade, aprovou **ad-referendum** as adequações feitas no protocolo do projeto de pesquisa “Farmacocinética pré-clínica, estudo de relação pk/pd e avaliação preliminar de segurança hepática e renal de derivados ftalimídicos em ratos”, apresentado pelo pós-graduando MICHEL LEANDRO DE CAMPOS, sob orientação da Professora Doutora Rosângela Gonçalves Peccinini, desta Faculdade.

Um relatório parcial do protocolo de pesquisa deverá ser entregue em FEVEREIRO de 2014 e um final em ABRIL 2015, em formulário para este fim.

Araraquara, 23 de novembro de 2012.



Prof.Dr. CARLOS CESAR CRESTANI
Coordenador da CEUA

Anexo III

Protocolo CEUA/FCF/CAR nº 06/2014

Interessada: MICHEL LEANDRO DE CAMPOS

Supervisor: Prof^a Dr^a Rosângela Gonçalves Peccinini

Projeto: Farmacocinética pré-clínica, estudo de relação pk/pd e avaliação preliminar de segurança hepática e renal de derivados ftalimídicos em ratos

Parecer nº 11/2014 – Comissão de Ética no Uso de Animais

O Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais, desta Faculdade, aprovou **ad-referendum** as adequações feitas no protocolo do projeto de pesquisa “Farmacocinética pré-clínica, estudo de relação pk/pd e avaliação preliminar de segurança hepática e renal de derivados ftalimídicos em ratos”, apresentado pelo Pós-graduando MICHEL LEANDRO DE CAMPOS, sob orientação da Professora Doutora Rosângela Gonçalves Peccinini, do Departamento de Princípios Ativos Naturais e Toxicologia desta Faculdade.

O relatório final do protocolo de pesquisa deverá ser entregue em OUTUBRO de 2015, em formulário para este fim.

Araraquara, 11 de abril de 2014.



Prof. Dr. CARLOS CÉSAR CRESTANI
Coordenador da CEUA

December 16th, 2014

FACULTY OF SCIENCE

Department of
Chemistry

Centre for Research in
Mass Spectrometry
(CRMS)

4700 KEELE ST
TORONTO ON
CANADA M3J 1P3
T 416 650 8426
F 416 736 5936

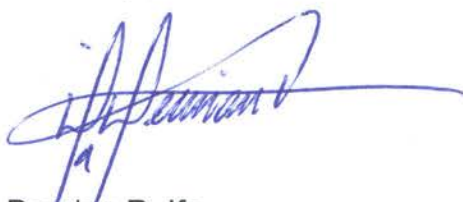
nicolec@yorku.ca

www.chem.yorku.ca/CRMS

To whom it may concern:

This letter is to confirm that Mr. Michel Leandro de Campos, from School of Pharmaceutical Sciences - São Paulo State University, was an exchange PhD student in my research group at Faculty of Science and Engineering - York University, from May 8th to December 16th of 2014. He developed a project entitled "*Structural elucidation of metabolites from phthalimide derivatives (LAPDESF-SCD03) by high-resolution mass spectrometry (HRMS)*" using a NanoLC-Ultra System coupled to a hybrid linear ion trap-orbitrap mass spectrometer as an analytical tool. Furthermore, he also worked on the application of desorption electrospray ionization (DESI) mass spectrometry imaging to the analysis of natural products and fungal networking using a DESI source coupled to a linear ion trap instrument.

Sincerely,



Demian R. Ifa

Assistant Professor



APÉNDICES

APENDICE A

Preparo e avaliação da solubilidade da dispersão sólida e da mistura física

A dispersão sólida contendo LAPDESF-SCD03 e poloxamer 407 na proporção de 1:9 foi preparada utilizando acetonitrila como solvente de dissolução. O fármaco e o poloxamer 407 foram dissolvidos no solvente e em seguida o solvente foi evaporado à temperatura ambiente em agitação com barra magnética. Na sequência, o produto foi estocado sem agitação por 48 horas para garantir a completa evaporação da acetonitrila e após esse período foi realizada uma pulverização com almofariz e pistilo para reduzir o tamanho das partículas. Por fim, o pó residual foi tamisado para obtenção de partículas menores que 0,59 mm de diâmetro.

A mistura física foi preparada em almofariz juntando-se o fármaco e o poloxamer na proporção de 1:9 e misturando os dois com auxílio de pistilo.

A solubilidade do LAPDESF-SCD03 puro, na dispersão sólida e na mistura física foi avaliada pela adição de 5 mg de fármaco puro, 10 mg de dispersão sólida (1 mg de fármaco) e 10 mg de mistura física (1 mg de fármaco) a, respectivamente, 1000 µL, 200 µL e 200 µL de água. Todas as soluções se mostraram saturadas. Em seguida, as três preparações foram mantidas em agitação por vórtex por um período de 24 horas em temperatura ambiente. Após transcorrido esse período, as amostras foram filtradas (0,22 µm) e analisadas por cromatografia líquida (n=3). As amostras que apresentaram valores acima da linearidade do método foram diluídas (1/10) em água e reanalisadas.

Ensaio de solubilidade de LAPDESF-SCD03 puro, em mistura física e em dispersão sólida, ambas com poloxamer 407.

Ensaio de Solubilidade	Média (ng/mL)	CV %
Puro	2381,88	8,02
Dispersão sólida	38625,22	25,99
Mistura física	35966,20	10,73

Houve um aumento de aproximadamente 15 vezes na solubilidade em comparação com o fármaco puro em ambas as técnicas de preparo. Entretanto houve maior variabilidade da dispersão sólida, cujos valores mínimo e máximo foram 29,8 µg/mL e 49,6 µg/mL. Essa estratégia será considerada na eventualidade de um novo experimento utilizando a via oral.

Apendice B. Parâmetros farmacocinéticos obtidos graficamente de LAPDESF-SCD-03 via intravenosa (5,2 mg/kg) antes e após a administração de 100 µg/kg de LPS e via gavagem (300 mg/kg) 15 minutos antes da administração de 100 µg/kg de LPS.

Parâmetros	IV inibição			IV redução			oral		
	Média	Mediana	IC 95%	Média	Mediana	IC 95%	Média	Mediana	IC 95%
C _{max} (ng/mL)	1409.74	1469.57	244.88	1527.59	1461.63	776.90	454.72	385.75	414.45
t _{max} (min)	5	5		5	5		78	60	77.24
k _a (min ⁻¹)							0.031	0.024	0.017
t _{1/2 a} (min)							26.57	28.88	14.62
k _{el} (min ⁻¹)	0.122	0.113	0.028	0.057	0.060	0.017	0.008	0.008	0.004
t _{1/2} (min)	5.81	6.13	1.07	12.72	11.55	3.77	96.30	86.63	57.57
ASC _{0-t} (µg/mL.min)	19.87	20.71	3.54	23.85	19.33	10.76	26.51	25.68	5.33
ASC _{0-∞} (µg/mL.min)	20.65	21.57	3.69	26.92	22.19	10.57	46.38	49.22	7.70
Razão ASC	0.96	0.96	0.002	0.88	0.88	0.06	0.58	0.57	0.14
F _{0-∞} (%)							3.89	4.13	0.65
Cl (mL/min.kg)	256.67	241.13	53.02	207.15	234.31	69.64	251.78	251.78	0
V _{dc} (mL/kg)	2258.66	2192.52	173.02	3500.52	2961.44	2174.19			
V _{dz} (mL/kg)	2110.48	2041.79	160.59	3911.86	3192.46	2195.69	34986.51	31472.64	20917.10
V _{ss} (mL/kg)	1900.62	1850.17	155.76	3747.38	3051.16	2222.36			
AUMC _{0-t} (µg/mL.min ²)	129.53	137.66	42.90	267.86	227.59	120.26	2222.09	2168.27	517.58
AUMC _{0-∞} (µg/mL.min ²)	158.70	170.90	52.64	455.68	467.25	137.80	8633.51	8964.56	4418.46
MRT (min)	7.56	7.92	1.49	17.52	15.96	5.52	182.64	184.52	74.93

Apêndice C. Estimativas iniciais dos parâmetros farmacocinéticos primários

Animal	IV inibição		IV redução		Oral		
	kel (min ⁻¹)	Vdc (mL/kg)	kel (min ⁻¹)	Vdc (mL/kg)	kel (min ⁻¹)	Vdz/F (mL/kg)	ka (min ⁻¹)
1	0.11	2125.746	0.06	2961.444	0.004	1451927.92	0.043
2	0.113	2309.366	0.064	2194.371	0.013	542379.00	0.048
3	0.162	2192.52	0.043	6532.827	0.01	587041.59	0.016
4	0.111	2477.842	0.044	2477.842	0.008	1002929.30	0.024
5	0.114	2187.816	0.074	3336.113	0.007	870652.47	0.023

Apendice D. Parâmetros farmacocinéticos de LAPDES-F-SCD-03 via intravenosa (5,2 mg/kg) antes e após a administração de 100 µg/kg de LPS e via gavagem (300 mg/kg) 15 minutos antes da administração de 100 µg/kg de LPS, calculados pelo software WinNonlin 6.3

Parâmetros	IV inibição			IV redução			oral		
	Média	Mediana	IC 95%	Média	Mediana	IC 95%	Média	Mediana	IC 95%
Cmax (ng/mL)	2909.60	2771.25	480.27	2580.09	2876.34	1460.38	296.92	229.19	361.63
tmax (min)	0			0			41.88658	34.24934	46.96
ka (min ⁻¹)							0.048	0.036	0.080
t1/2 a (min)							19.15	19.48	26.80
kel (min ⁻¹)	0.146	0.141	0.026	0.109	0.109	0.029	0.017	0.010	0.040
t1/2 (min)	4.83	4.91	0.90	6.63	6.37	1.83	70.03	68.78	127.51
ASC 0-t (µg/mL.min)							29.11	29.90	7.73
ASC 0-inf (µg/mL.min)	20.20	21.78	3.95	23.48	20.22	11.93	40.21	42.23	10.59
Razão ASC							0.73	0.69	0.37
F, 0-inf (%)							3.45	3.62	0.91
Cl (mL/min.kg)	263.72	238.73	61.99	249.65	257.17	110.07	221.48	221.48	0.00
Cl/F (mL/min.kg)							7520.54	7104.13	2104.51
Vdz (mL/kg)	1811.16	1876.41	280.88	2444.84	1807.85	1527.24	22374.90	21976.73	40742.54
Vdz/F (mL/kg)							725937.67	690840.70	1260649.95
AUMCO-inf (µg/mL.min ²)	142583.05	140274.10	47989.86	219825.48	208294.30	108048.89			
MRT (min)	6.97	7.09	1.30	9.56	9.19	2.63			

Apêndice E. Massas de íons de metabólitos possíveis

	M	Formula	Massa exata	H+	NH4+	Na+	K+
1	M166	C ₈ H ₆ O ₄	166.0266	167.03	184.06	189.02	204.99
	M166-D4	C ₈ H ₂ D ₄ O ₄	170.0517	171.06	188.09	193.04	209.01
2	M316	C ₁₅ H ₁₂ N ₂ O ₆	316.0695	317.08	334.10	339.06	355.03
	M316-D4	C ₁₅ H ₈ D ₄ N ₂ O ₆	320.0946	321.10	338.13	343.08	359.06
3	M314	C ₁₅ H ₁₀ N ₂ O ₆	314.0539	315.06	332.09	337.04	353.02
	M314-D4	C ₁₅ H ₆ D ₄ N ₂ O ₆	318.0790	319.09	336.11	341.07	357.04
	M314-D3	C ₁₅ H ₇ D ₃ N ₂ O ₆	317.0727	318.08	335.11	340.06	356.04
4	M330	C ₁₅ H ₁₀ N ₂ O ₇	330.0488	331.06	348.08	353.04	369.01
	M330-D4	C ₁₅ H ₆ D ₄ N ₂ O ₇	334.0739	335.08	352.11	357.06	373.04
5	M271	C ₁₅ H ₁₃ NO ₄	271.0845	272.09	289.12	294.07	310.05
	M271-D4	C ₁₅ H ₉ D ₄ NO ₄	275.1096	276.12	293.14	298.10	314.07
6	M253	C ₁₅ H ₁₁ NO ₃	253.0739	254.08	271.11	276.06	292.04
	M253-D4	C ₁₅ H ₇ D ₄ NO ₃	257.0990	258.11	275.13	280.09	296.06
7	M284	C ₁₅ H ₁₂ N ₂ O ₄	284.0797	285.09	302.11	307.07	323.04
	M284-D4	C ₁₅ H ₈ D ₄ N ₂ O ₄	288.1048	289.11	306.14	311.09	327.07
8	M268	C ₁₅ H ₁₂ N ₂ O ₃	268.0848	269.09	286.12	291.07	307.05
	M268-D4	C ₁₅ H ₈ D ₄ N ₂ O ₃	272.1099	273.12	290.14	295.10	311.07
9	M251	C ₁₅ H ₉ NO ₃	251.0582	252.07	269.09	274.05	290.02
	M251-D4	C ₁₅ H ₅ D ₄ NO ₃	255.0833	256.09	273.12	278.07	294.05
10	M169	C ₇ H ₇ NO ₄	169.0375	170.04	187.07	192.03	208.00
11	M168	C ₇ H ₈ N ₂ O ₃	168.0535	169.06	186.09	191.04	207.02
12	M490	C ₂₁ H ₁₈ N ₂ O ₁₂	490.0860	491.09	508.12	513.08	529.05
	M490-D3	C ₂₁ H ₁₅ D ₃ N ₂ O ₁₂	493.1048	494.11	511.14	516.09	532.07
13	M445	C ₂₁ H ₁₉ NO ₁₀	445.1009	446.11	463.13	468.09	484.06
	M445-D3	C ₂₁ H ₁₆ D ₃ NO ₁₀	448.1197	449.13	466.15	471.11	487.08
14	M508	C ₂₁ H ₂₀ N ₂ O ₁₃	508.0965	509.10	526.13	531.09	547.06
	M508-D3	C ₂₁ H ₁₇ D ₃ N ₂ O ₁₃	511.1154	512.12	529.15	534.10	550.08
15	M429	C ₂₁ H ₁₉ NO ₉	429.1060	430.11	447.14	452.10	468.07
	M429-D4	C ₂₁ H ₁₅ D ₄ NO ₉	433.1311	434.14	451.16	456.12	472.09
16	M447	C ₁₅ H ₁₃ NO ₄	447.1166	448.12	465.15	470.11	486.08
	M447-D4	C ₁₅ H ₉ D ₄ NO ₄	451.1417	452.15	469.18	474.13	490.10
17	M339	C ₁₄ H ₁₃ NO ₉	339.0590	340.07	357.09	362.05	378.02
	M339-D3	C ₁₄ H ₁₀ D ₃ NO ₉	342.0779	343.09	360.11	365.07	381.04
18	M492	C ₂₁ H ₂₀ N ₂ O ₁₂	492.1016	493.11	510.14	515.09	531.06
	M492-D4	C ₂₁ H ₁₇ D ₃ N ₂ O ₁₂	496.1267	497.13	514.16	519.12	535.09
19	M558	C ₂₅ H ₂₆ N ₄ O ₉ S	558.1421	559.15	576.18	581.13	597.11
	M558-D3	C ₂₅ H ₂₃ D ₃ N ₄ O ₉ S	561.1609	562.17	579.19	584.15	600.12
20	M560	C ₂₅ H ₂₈ N ₄ O ₉ S	560.1577	561.16	578.19	583.15	599.12
	M560-D4	C ₂₅ H ₂₄ D ₄ N ₄ O ₉ S	564.1828	565.19	582.22	587.17	603.15
21	M394	C ₁₅ H ₁₀ N ₂ O ₉ S	394.0107	395.02	412.04	417.00	432.97
	M394-D3	C ₁₅ H ₇ D ₃ N ₂ O ₉ S	397.0295	398.04	415.06	420.02	435.99
22	M356	C ₁₇ H ₁₂ N ₂ O ₇	356.0645	257.07	274.10	279.05	295.03
	M356-D3	C ₁₇ H ₉ D ₃ N ₂ O ₇	359.0833	260.09	277.12	282.07	298.05
23	M379	C ₁₅ H ₁₁ N ₂ O ₈ S ⁺	379.0231	190.02	198.53	201.01	208.99
	M379-D4	C ₁₅ H ₇ D ₄ N ₂ O ₈ S ⁺	383.0482	192.03	200.54	203.02	211.01
24	M333	C ₁₅ H ₁₁ NO ₆ S	333.0307	334.04	351.06	356.02	371.99
	M333-D4	C ₁₅ H ₇ D ₄ NO ₆ S	337.0558	338.06	355.09	360.05	376.02

25	M295	$C_{17}H_{13}NO_4$	295.0845	296.09	313.12	318.07	334.05
	M295-D4	$C_{17}H_9D_4NO_4$	299.1096	300.12	317.14	322.10	338.07
26	M227	$C_8H_5NO_5S$	226.9888	228.00	245.02	249.98	265.95
	M227-D4	$C_8HD_4NO_5S$	231.0139	232.02	249.05	254.00	269.98
27	M189	$C_{10}H_7NO_3$	189.0426	190.05	207.08	212.03	228.01
	M189-D4	$C_{10}H_3D_4NO_3$	196.0677	197.07	214.10	219.06	235.03

Apêndice F. Estruturas dos metabólitos citados no apêndice A.

