

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

ELIAS CARVALHO PADILHA

**SCREENING FARMACOCINÉTICO E ESTUDOS *IN VITRO* PARA A SELEÇÃO DE
TIAZOLIDINODIONAS PROMISSORAS À ADMINISTRAÇÃO ORAL**

Processo FAPESP nº 2014/20833-0

Araraquara-SP

2017

ELIAS CARVALHO PADILHA

**SCREENING FARMACOCINÉTICO E ESTUDOS *IN VITRO* PARA A SELEÇÃO DE
TIAZOLIDINODIONAS PROMISSORAS À ADMINISTRAÇÃO ORAL**

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: Prof. Dr. Rosângela Gonçalves Peccinini

Processo FAPESP nº 2014/20833-0

Araraquara-SP

2017

Ficha Catalográfica

Elaborada Por Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
UNESP – Campus de Araraquara

P123s Padilha, Elias Carvalho
Screening farmacocinético e estudos *In Vitro* para a seleção de tiazolidinodionas promissoras à administração oral / Elias Carvalho Padilha. -- Araraquara, 2017.
158 f. : il.

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista. "Júlio de Mesquita Filho".
Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas,
Área de Pesquisa e Desenvolvimento de Fármacos e Medicamentos.

Orientadora: Rosângela Gonçalves Peccinini.

1. *Screening* farmacocinético. 2. Caco-2. 3. Estabilidade química. 4. Diabetes Mellitus tipo 2. 5. Absorção. I. Peccinini, Rosângela Gonçalves, orient. II. Título.

CAPES: 4050000

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: Screening farmacocinético e estudos in vitro para a seleção de tiazolidinodionas promissoras à administração oral

AUTOR: ELIAS CARVALHO PADILHA


ORIENTADORA: ROSANGELA GONCALVES PECCININI

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Doutor em CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS, área de conhecimento: SEM ÁREA DE CONHECIMENTO pela Comissão Examinadora:




Profa. Dra. ROSANGELA GONCALVES PECCININI
Depto de Princípios Ativos Naturais e Toxicologia / Faculdade de Ciências Farmacêuticas do Câmpus de Araraquara da UNESP


Dra MARINA GALDINO DA ROCHA PITTA
Núcleo de Pesquisa em Inovação Terapêutica Suely Galdino / Universidade Federal de Pernambuco
(Membro participante por meio de vídeo-conferência)



Prof. Dr. ANDERSON RODRIGO MORAES DE OLIVEIRA
Depto de Química / Faculdade de Filosofia Ciências e Letras do Câmpus de Ribeirão Preto da USP



Prof. Dr. MARCELO TADEU MARIN
Depto de Princípios Ativos Naturais e Toxicologia / Faculdade de Ciências Farmacêuticas do Câmpus de Araraquara da UNESP



Prof. Dr. MARLUS CHORILLI
Depto de Fármacos e Medicamentos / Faculdade de Ciências Farmacêuticas do Câmpus de Araraquara da UNESP

Araraquara, 23 de outubro de 2017

Dedicatória

Dedicado à minha Família que me apoiou e deu suporte ao longo deste trabalho

Agradecimentos

Agradeço a **Deus** pela realização deste trabalho, por me ouvir nos momentos difíceis e me ajudar a compreender da onde vem a minha força.

Aos meus pais, **Fátima Aparecida Carvalho Padilha** e **Jorge Padilha** por todo o apoio durante estes anos de estudo, pelos conselhos valiosos que me abriram minha mente por diversas vezes e por me entenderem independente do caminho profissional que escolhi.

À minha esposa, minha rocha, **Juliana Ferreira de Sousa**. Trilhou comigo diversos caminhos tortuosos nesta jornada. Fizemos diversos sacrifícios para que chegássemos a este momento, tenho certeza que a estrada não será mais fácil de agora em diante, nós que ficaremos mais fortes.

À minha orientadora, professora **Rosângela Gonçalves Peccinini**. Palavras não podem expressar o quanto sou agradecido por tudo que você fez por mim, por ter nos tratado como família, por ser amiga, conselheira e salva vidas. Provavelmente devo minha graduação, mestrado, doutorado e (quixá) pós-doutorado a você e seu esforço para me ajudar sempre que precisei.

I thank **Dr. Xin Xu** for having me at her laboratory at NCATS, I grew and learned a lot during this experience.

To Dr. Xu's group, **Pranav, Amy, Eric & Erik, MD, Kaylee, Katherine, Marc** and laboratory support team for welcoming me and helping me during this learning period.

À equipe do Laboratório de Bioequivalência, Marcos, Kelly e Andréia, etambém a equipe do Laboratório de Toxicologia, Valéria e Maria.

À equipe e amigos de Pesquisa em Farmacocinética Pré-Clínica – UNESP, **Michel, Marco, Caroline, Evelin, Emiliana, Manuel, Jonata, Taísa, Bruna** e aos **novos recrutas e aspirantes**.

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.

À 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.

RESUMO

As tiazolidinodionas (TZDs) são fármacos utilizados no tratamento de Diabetes Mellitus tipo 2 (DM2), seu mecanismo de ação é a ativação dos receptores PPAR- γ do núcleo celular. Além de sua atividade sobre o metabolismo glicídico e lipídico, há um particular interesse em sua atividade sobre a aterosclerose decorrente da síndrome metabólica que acomete estes pacientes. Tendo em vista a ampla aplicação das TZDs e a presença de apenas uma alternativa terapêutica relativamente segura no mercado, a pioglitazona, pesquisadores do Laboratório de Planejamento e Síntese de Fármacos da Universidade Federal de Pernambuco sintetizaram e selecionaram TZDs promissoras em relação à atividade anti-aterosclerose. Dentre elas destacaram-se as GQ-2, GQ-11, GQ-19 e GQ-177. Tendo em vista a maior aceitação da administração oral de medicamentos, prever a absorção destas novas moléculas para esta via empregando métodos de *screening* farmacocinético pode acelerar o desenvolvimento do produto farmacêutico. Neste estudo utilizou-se o método de *screening* farmacocinético *Cassette Accelerated Rapid Rat Screen* (CARRS), o *screening* físico-químico, principalmente através da avaliação do Log P, e *screening in vitro*, utilizando modelo de monocamadas de células Caco-2, para obter informações preditivas acerca da biodisponibilidade de moléculas. Estas técnicas foram utilizadas para selecionar dentre as TZDs - GQ-2, GQ-11, GQ-19 e GQ-177 - o(s) candidato(s) com características mais apropriadas para a continuidade dos estudos pré-clínicos. O *screening* físico químico apontou as GQ-19 e GQ-177 como favoráveis à absorção oral. Contudo, no *screening in vitro*, apenas a GQ-19 apresentou permeação no modelo de células Caco-2. No *screening in vivo*, a GQ-19 apresentou-se instável em plasma animal, degradando-se completamente em menos de 20 minutos. Para as demais moléculas, no *screening in vivo*, foram confirmadas as expectativas decorrentes do comportamento observado nos ensaios *in vitro* e não foram observadas concentrações quantificáveis no plasma dos animais. Desta forma, a priori, nenhuma das moléculas apresenta biodisponibilidade favorável à continuidade dos estudos pré-clínicos sem a avaliação de metabólitos ou a elaboração de formulações para viabilizar sua utilização pela via oral. Os métodos utilizados para *screening in vitro* forneceram informações importantes para a compreensão do perfil *in vivo* observado e para propor

estratégias que viabilizem a continuidade do desenvolvimento de produtos com estas novas moléculas.

Palavras-chave: Screening farmacocinético. Caco-2. Estabilidade química. Diabetes Mellitus tipo 2. Absorção.

ABSTRACT

Thiazolidinediones (TZDs) are drugs used to treat type 2 diabetes mellitus (DM2); its mechanism of action is the activation of the cell nucleus receptor PPAR- γ . In addition to its activity on glucose and lipid metabolism, there is a particular interest in its activities on atherosclerosis that is caused by the metabolic syndrome that affects these patients. Given the wide application of TZDs and the presence of a single therapeutic alternative in the market, the pioglitazone, the researchers from the Laboratório de Planejamento e Síntese de Fármacos from Universidade Federal de Pernambuco synthesized and selected promising TZDs in relation to anti-atherosclerosis activity. Among them stood out the GQ-2, GQ-11, GQ-19 and GQ-177. Taking into account the greater acceptance oral administered drugs, to predict the absorption of these new molecules for this route using pharmacokinetic *screening* methods can accelerate the development of a pharmaceutical product. In this study we used the *screening* method CARRS (PK), the physico-chemical *screening*, particularly by evaluating the Log P, and *in vitro screening* using Caco-2 cell monolayer model to obtain predictive information regarding the bioavailability of molecules. These techniques were used to select among the TZDs - GQ-2, GQ-11, GQ-19 and GQ-177 - the candidate(s) with the most appropriate characteristics for the continuation of pre-clinical studies. The physico-chemical *screening* showed that the GQ-19 and GQ-177 as favorable oral absorption, but in the *in vitro screening*, only the GQ-19 showed permeation in Caco-2 cell model. In *in vivo screening*, GQ-19 appeared unstable in animal plasma, degraded completely in less than 20 minutes. For other molecules, during the *in vivo screening*, the expectations arisen from the behavior observed in *in vitro* tests were confirmed; the results confirmed the absence of measurable plasma concentrations. Thus, a priori, any of the molecules showed favorable bioavailability for the continuity of preclinical studies without evaluation of metabolites or the preparation of formulations to allow its use by the oral route. The methods used for *in vitro* screening provided important information for the understanding of the *in vivo* profile observed and to propose strategies that allow the continuity of product development with these new molecules.

Keywords: Pharmacokinetic Screening. Caco-2. Chemical Stability. Type 2 Diabetes Mellitus. Absorption.

Lista de abreviaturas

ABC: Cassete de ligação a ATP - *ATP-Binding Cassette*

ACN: Acetonitrila

AMB: Anfotericina B

ANVISA: Agência Nacional de Vigilância Sanitária

ASC: Área Sob a Curva

BCS: Sistema de Classificação Biofarmacêutica - *Biopharmaceutic Classification System*

BDDCS: Sistema de Classificação Biofarmacêutica da Disposição de Fármacos - *Biopharmaceutic Drug Disposition Classification System*

BZN: Benzonidazol

CA: Análise em Cassete - *Cassette Analysis*

CARRS: *Cassette Accelerated Rapid Rat Screen*

CD: Dosagem em Cassete - *Cassette Dosing*

CIVIV: Correlações *in vitro in vivo*

Cl: Clearance

CQA: Controle de Qualidade Alto

CQB: Controle de Qualidade Baixo

CQM: Controle de Qualidade Médio

DDT: diclorodifeniltricloroetano

DM2: Diabetes Mellitus tipo 2

eNOS: Liberação de Óxido Nítrico

HTS: High Throughput Screening

LIQ: Limite Inferior de Quantificação

MDCK: Madin-Darby Canine Kidney

MDR: Resistência Múltipla a Fármacos - *Multidrug Resistance*

MMP9: Metaloprotease-9

MRT: Tempo de residência Média – *Mean Residence Time*

NAFLD: Doença Hepática Não Alcoólica – *Non-alcoholic Fatty Liver Disease*

OATPs: Polipeptídeo Transportador de Compostos Orgânicos Aniônicos

OCTs: Transportadores de Cátions Orgânicos

OECD: Organização para a Cooperação Econômica e Desenvolvimento - *Organization for Economic Co-operation and Development*

PAMPA: Ensaio de Permeação em Membrana Artificial - *Parallel Artificial Membrane Permeation Assay*

Papp: Permeabilidade Aparente

PBS: Tampão fosfato em solução salina - *Phosphate Buffer Saline*

PI: Padrão Interno

PK: Farmacocinética

PPAR: Receptor ativado da proliferação de peroxissomos - *Peroxisome Proliferator Activated Receptor*

QSAR: Relação estrutura atividade quantitativa - *Quantitative Structure-Activity Relationship*

SLCO: Transportadores de Solute

TEER: Resistência elétrica transepitelial - *Transepithelial Electrical Resistance*

TZD: Tiazolidinodionas

UPLC: Cromatografia Líquida de Ultra Desempenho - *Ultra Performance Liquid Chromatography*

Índice de Figuras

Figura 1 – Estrutura das GQ-11, GQ-2, GQ-19 e GQ-177	2
Figura 2 - Cromatograma GQ-11, concentração de 0,625 µg/mL em coluna HSS SB 2,1x50mm com fase móvel acetonitrila:água (75:25) com fluxo de 0,4 µL/min	16
Figura 3 - Curva analítica construída para GQ-11, com equação e r^2	17
Figura 4 -Cromatograma GQ-19 e GQ-177, concentração de 10 µg/mL em coluna HSS SB 2,1x50mm com fase móvel acetonitrila:água (65:35) com fluxo de 0,4 µL/min	18
Figura 5 - Curva analítica construída para GQ-177, com equação e r^2 (n=3).....	19
Figura 6 - Curva analítica construída para GQ-19, com equação e r^2	20
Figura 7 - Estabilidade do GQ-11 em pH 1,2 e 7,4	21
Figura 8 - Estabilidade do GQ-177 em pH 1,2 e 7,4	22
Figura 9 - Estabilidade do GQ-19 em pH 1,2 e 7,4	23
Figura 10 - Gráfico de Log k vs Log P dos padrões juntamente com os fármacos de interesse .	24
Figura 11 – Possíveis Rotas de absorção de fármacos. 1- Transporte transcelular. 2- Transporte paracelular. 3 – Transporte por transporte ativo da membrana apical e basolateral. 4 – Transportadores de efluxo	28
Figura 12 – Resultados de permeabilidade aparente obtidos em monocamadas de células Caco-2. LIQ: Limite Inferior de Quantificação	39
Figura 13–Placa padrão do modelo CARRS adaptado de Korfmacher et al (7)	49
Figura 14 -Estabilidade de GQ-19 em plasma normal e acidificado	56
Figura 15 - Ensaio de estabilidade da GQ-11 em plasma.	58
Figura 16 - Ensaio de estabilidade da GQ-177 em plasma. O * representa diferença estatística em relação ao tempo zero.	59

Índice de Tabelas

Tabela 1 - Métodos analíticos para a determinação dos GQs 11, 19 e 177.....	12
Tabela 2 - Substâncias utilizadas na curva para a determinação do Log P.	14
Tabela 3 - Precisão e exatidão dos controles de qualidades usados na validação analítica das GQ-11, GQ-177 e GQ-19.....	20
Tabela 4 - Valores de Log P obtidos e outros parâmetros utilizados na regra dos 5 de Lipinski para cada GQ.	25
Tabela 5 -Métodos analíticos para a determinação das substâncias de interesse em PBS para o ensaio de permeação em células Caco-2 (n=3).	37
Tabela 6 - Concentrações utilizadas no teste da resazurina e resultado do teste da resazurina em % de inibição	37
Tabela 7 - Solubilidade a partir de DMSO em PBS	38
Tabela 8 - Curva bioanalítica GQ-11, valores com precisão, exatidão e regressão linear.	54
Tabela 9 - Curva bioanalítica GQ-11, valores com precisão e exatidão	55
Tabela 10 - Precisão e exatidão interensaios das GQ-11 e GQ-177.....	57
Tabela 11 - Áreas obtidas pós processamentos de amostras de animais administrados de GQ-11	60
Tabela 12 - Áreas obtidas pós processamentos de amostras de animais administrados de GQ-177	60

SUMÁRIO

I.	INTRODUÇÃO	1
II.	Histórico das Moléculas	4
1.	GQ-2 - (5-(4-cloro-benzilideno)-3-(4-metilbenzil)-tiazolidina-2,4-diona)	4
2.	GQ-19 - 3-(4-metilbenzil)-5-(4-nitrobenzilideno)tiazolidina-2,4-diona	6
3.	GQ-11 - (5-(indol-3-il-metileno)-3-(4-metilbenzil)-tiazolidina-2,4-diona).....	6
4.	GQ-177 - (3-(3-bromobenzil)-5-(4-metilsulfonil-benzilideno)-tiazolidina-2,4-diona).....	7
III.	OBJETIVO GERAL	7
	CAPÍTULO 1 - <i>SCREENING</i> FÍSICO-QUÍMICO	9
1.	Introdução	9
2.	Materiais e Métodos	11
2.1	Desenvolvimento e Validação de Métodos Analíticos para a determinação dos GQ-11, 177 e 19.....	11
2.2	Ensaio de estabilidade em pHs 1,2 e 7,4.....	13
2.3	Ensaio de Log P pelo método cromatográfico	14
2.4	Análise estatística	15
3.	Resultados	15
3.1.	Método analítico para a determinação de GQ11	15
3.3.	Método analítico para a determinação de GQ177 e GQ 19	17
3.3.	Validação analítica.....	20
3.4.	Estabilidade química das GQ-11, GQ-177 e GQ-19.....	21
3.5.	Log P	24
4.	Conclusão	25
	CAPÍTULO 2 - <i>SCREENING</i> IN VITRO	27
1.	Introdução	27
2.	Materiais e Métodos	34
2.1.	Determinação de GQ-2, GQ-11, GQ-19 e GQ-177 em PBS para estudo de permeação em células Caco-2.....	34
2.2.	Experimento de citotoxicidade pelo teste da resazurina.....	35
2.3.	Experimentos de permeabilidade	35
3.	Resultados	36
3.1.	Adaptação do método analítico para a determinação das GQ-2, GQ-11, GQ-177, GQ-19, benznidazol e anfotericina B em PBS.....	36
3.2.	Citotoxicidade pelo teste da Resazurina	37

3.3.Solubilidade dos candidatos a fármaco em solventes necessários ao teste de permeabilidade	38
3.4.Teste de permeação em Caco-2.....	38
4. Conclusão	40
CAPÍTULO 3 - <i>SCREENINGIN VIVO</i>	43
1. Introdução	43
2. Materiais e Métodos	52
2.1.Métodos bioanalíticos para a determinação da GQ-11, GQ-177 e GQ-19 em plasma .	52
2.2. <i>Screening</i> Farmacocinético das GQ-2, GQ-11, GQ-177 e GQ-19.....	53
Modelo animal	53
3. Resultados	54
3.1.MétodosBioanalíticos.....	54
3.2. <i>Screeningin vivo</i>	59
4. Conclusão	60
III.DISSCUSSÃO E CONCLUSÃO	62
IV. PERSPECTIVAS	67
APÊNDICE I – FARMACOCINÉTICA DA GQ-11 EM RATOS WISTAR	68
APÊNDICE II – ESTÁGIO DE TREINAMENTO NO NCATS/NIH - INTERNSHIP AT NCATS/NIH	72
APÊNDICE III – MANUSCRITO SUBMETIDO PARA PUBLICAÇÃO NA THE JOURNAL OF PHARMACOLOGY AND EXPERIMENTAL THERAPEUTICS	92
REFERÊNCIAS.....	129
ANEXO I – APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA PARA A REALIZAÇÃO DO EXPERIMENT EM ANIMAIS	144

I. INTRODUÇÃO

As tiazolidinodionas (TZDs), também conhecidas por glitazonas, são fármacos utilizados no tratamento de Diabetes Mellitus tipo 2 (DM2) e agem principalmente reduzindo a resistência periférica à insulina. As TZDs atuam ativando o receptor do núcleo celular, PPAR- γ (*peroxisome proliferator activated receptor*). Este receptor, quando ativado, regula a expressão de genes que afetam o metabolismo glicídico e lipídico levando ao aumento da captação de glicose mediada por insulina nos tecidos periféricos e diferenciação de pré-adipócitos em adipócitos, ação que demanda captação de ácidos graxos da circulação sanguínea. Desta forma, a ativação dos receptores PPAR- γ resulta em diminuição da glicose e de ácidos graxos da circulação. Ainda, a atividade deste receptor também resulta em ação anti-inflamatória e diminuição da pressão arterial. Portanto, o mecanismo de ação das TZDs não somente se direciona à redução da glicemia em pacientes com DM2, mas também atenua os riscos cardiovasculares decorrentes da doença, principalmente sobre a progressão da aterosclerose decorrente desta síndrome metabólica (1).

Atualmente a única TZD no mercado é a pioglitazona, porém este fármaco está sob monitoramento da ANVISA. Seu uso é contraindicado para pacientes que apresentam insuficiência cardíaca classe III ou IV, doença hepática ou níveis de transaminases séricas aumentados, insuficiência cardíaca sintomática, cetoacidose diabética, DM1 ou hipersensibilidade ao cloridrato de pioglitazona (2, 3).

Tendo em vista a ampla aplicação das TZDs e a restrição de alternativas terapêuticas disponíveis no mercado, pesquisadores do Laboratório de Planejamento e Síntese de Fármacos da Universidade Federal de Pernambuco selecionaram diversos derivados de TZDs promissores em relação à atividade anti-aterosclerose. Entre os compostos com melhores performances destacaram-se as GQ-2 (5-(4-cloro-benzilideno)-3-(4-metilbenzil)-tiazolidina-2,4-diona), GQ-11 (5-(indol-3-il-metileno)-3-(4-metilbenzil)-tiazolidina-2,4-diona), GQ-19 3-(4-metilbenzil)-5-(4-nitrobenzilideno)tiazolidina-2,4-diona e

GQ-177 (3-(3-bromobenzil)-5-(4-metilsulfonil-benzilideno)-tiazolidina-2,4-diona) cujas estruturas estão expostas na Figura 1 (4-6).

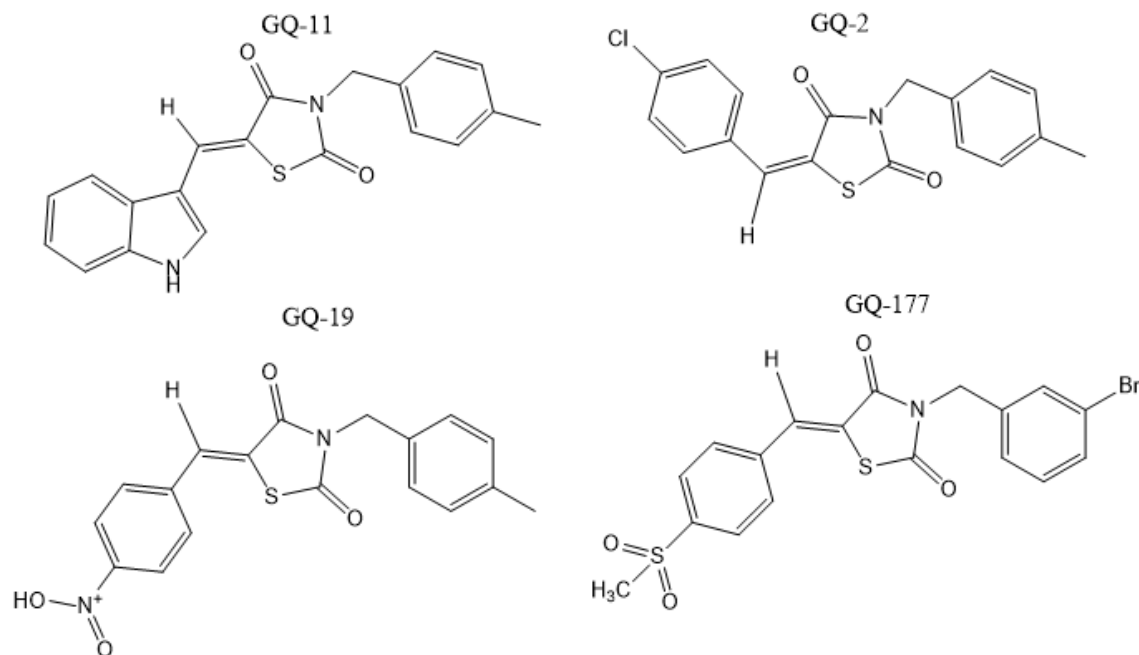


Figura 1 – Estrutura das GQ-11, GQ-2, GQ-19 e GQ-177

A série de GQs selecionada em ensaios anteriores é consequência do estabelecimento de métodos cada vez mais rápidos - como o high throughput *screening* - para a descoberta e síntese de substâncias com potencial aplicação na terapêutica. Para selecionar os melhores candidatos, é premente a aplicação de avaliações sistemáticas para determinar o comportamento destes fármacos no sistema biológico. Estas avaliações podem auxiliar na seleção do candidato a fármaco mais promissor dentro de uma vasta biblioteca e no direcionamento da realização de estudos *in vivo* para aqueles candidatos mais promissores (7, 8).

Segundo Waterbeend e Grifford (9), cerca de 40% do insucesso da introdução de novos fármacos e medicamentos no mercado é devido ao desfavorável perfil farmacocinético. Portanto a farmacocinética deve ser investigada precocemente no desenvolvimento de novos fármacos, pois tende a evidenciar características determinantes para o sucesso de um candidato à fármaco. No entanto, o estudo da farmacocinética completa envolve a administração do composto ao menos pela via intravenosa, oral e intraperitoneal, em cinco réplicas para cada tempo e com pelo menos 10

tempos de coleta, o que o caracteriza como um estudo de longo prazo, com utilização de um grande número de animais e de alto custo (10).

Neste sentido têm sido criados diversos métodos de *screening* farmacocinético para que esses ensaios sejam de maior produtividade e mais fármacos possam ser analisados com menor uso de animais e menor número de amostras. Métodos como "rapid pk", "cassette dosing", "cassette analysis", "cassette accelerated rapid rat screen (CARRS)" e "snapshot pk" tem sido empregados por indústrias farmacêuticas para aumentar a produtividade dos *screenings* farmacocinéticos com bons resultados (7, 10).

Entre os métodos de *screening* que utilizam menor número de animais e que não apresentam riscos de interações entre substâncias está o CARRS, descrito por Korfmacher e colaboradores do Instituto de Pesquisa da Schering-Plough (7). Neste método utilizam-se apenas 2 animais por fármaco, administrado pela via oral, e 6 tempos de coleta ao longo de 6 horas.

Considerando que a disposição cinética de um fármaco possui estreita relação com algumas de suas propriedades físico-químicas, a investigação destas propriedades pode ter valor preditivo do seu comportamento no organismo. O Log P, por exemplo, tem influência direta nos eventos que sucedem a administração enteral dos fármacos, pois relaciona-se diretamente com a solubilidade do composto nos fluidos gástricos e intestinais e, ainda, influencia na permeabilidade do fármaco através das membranas celulares envolvidas no processo de absorção (9). A estabilidade química é também uma característica determinante a ser observada para propor a administração do produto pela via oral, pois um perfil farmacocinético desfavorável pode ser explicado por suas características de estabilidade química (11).

Enquanto o Log P oferece informações teóricas sobre como uma molécula tende a reagir no meio biológico, os testes *in vitro* demonstram com maior precisão como estas moléculas se comportam frente a membranas biológicas semelhantes às que farão oposição à absorção do fármaco quando inserido num organismo. O modelo de monocamadas de células Caco-2 mimetiza a parede intestinal em diversos aspectos, como a expressão das junções celulares, borda em escova, expressam proteínas de transporte na

membrana além de enzimas metabolizadoras, constituindo um modelo com alta correlação com as características de absorção observadas em ensaios de farmacocinética. Sua relevância para o desenvolvimento de fármacos é reconhecida pelas principais agências reguladoras, que indicam este teste para prever a absorção oral de fármacos (12-14).

Para atingir as expectativas do mercado, esta nova série de moléculas necessitam que sua forma farmacêutica final seja de liberação compatível com a via oral, uma vez que se trata da terapêutica da diabetes ou da aterosclerose decorrente da evolução da síndrome. A vasta gama de alternativas terapêuticas disponíveis no mercado para o tratamento destas doenças são de administração não invasiva (via oral) e portanto bem aceitas pelos pacientes, o que faz com que novos medicamentos necessitem destas características para apresentar alguma vantagem competitiva em relação aos seus pares (15).

O presente trabalho tem como objetivo utilizar o *screening* farmacocinético por CARRS, o modelo de monocamadas de células Caco-2 e características físico químicas para selecionar dentre os compostos derivados de tiazolidinodionas - GQ-2, GQ-11, GQ-19 e GQ-177 - o(s) candidato(s) com características mais apropriadas para a continuidade dos estudos pré-clínicos. Este texto foi organizado em três capítulos (Capítulo 1: *screening* físico-químico; Capítulo 2: *screening in vitro* e; Capítulo 3, *screening in vivo*) com o objetivo de melhorar a compreensão das metodologias utilizadas em cada etapa com resultados e discussão preliminar dispostos nos capítulos específicos.

II. Histórico das Moléculas

1. GQ-2 - (5-(4-cloro-benzilideno)-3-(4-metilbenzil)-tiazolidina-2,4-diona)

Com o objetivo de sintetizar novos candidatos a fármaco com potencial para o tratamento da diabetes, Mourão e colaboradores (6) sintetizaram uma série de tiazolidinodionas derivados substituídos por grupamentos benzidileno e acridinil. Neste trabalho, está publicada a síntese da GQ-2, como o composto 3a, assim como a atividade por via oral em camundongos diabéticos na dose

de 10 e 30 mg/kg. Depois de 15 dias de tratamento, na dose de 30 mg/kg, a GQ-2 demonstrou ser capaz de reduzir a glicemia em 23% e os níveis de triglicerídeos em 48% em relação aos animais diabéticos do grupo controle. Sua atividade aliada à baixa toxicidade da molécula, também evidenciada neste trabalho, encorajou a continuidade dos estudos.

Estudos subsequentes foram realizados quanto a atividade de GQ-2 e GQ-16 sobre aterosclerose e lipidemia. Os compostos foram comparados com o padrão pioglitazona (16). A GQ-2 se mostrou a única a reduzir a formação de lesões ateroscleróticas nas aortas dos animais, porém não influenciou na lipidemia dos animais tratados. Ainda, a GQ-2 induziu a formação dos biomarcadores relacionados a danos às paredes vasculares, a metaloprotease-9 (MMP9) e a liberação de óxido nítrico (eNOS). A GQ-2 também foi avaliada, no trabalho de Soares e Silva e colaboradores (17), para o tratamento de doença hepática não alcoólica (NAFLD). Neste estudo, camundongos LDR -/- tratados com dieta aterogênica, receberam GQ-2 ou pioglitazona por 15 dias na dose de 30 mg/kg. A dieta se mostrou eficaz em causar as características de NAFLD ao mesmo tempo que aumentou gordura, fibrose hepática, inflamação e resistência à insulina. O tratamento demonstrou que a GQ-2 foi capaz de diminuir a lesão hepática através da diminuição da resistência à insulina e diminuição da formação de diversos marcadores pró-inflamatórios. Um estudo mais aprofundado sobre a influência da GQ-2 sobre o metabolismo lipídico hepático foi realizado por Araújo e colaboradores (18), que descreveram melhor a influência das tiazolidinodionas sobre esta via metabólica. Neste trabalho demonstraram que a ativação de PPAR- α levando a ativação da via PPAR- α /AMPK/FoxO1/ATGL que pode levar à lipólise hepática. Ainda a inibição de outra via, AMPK/LXR/SREBP-1c/ACC/FAZ, é inibitória da lipogênese hepática também contribuindo para o tratamento de NAFLD.

Os estudos de atividade do GQ-2 motivaram o nosso grupo a estudar o perfil farmacocinético da molécula para a progressão deste candidato para etapas pré-clínicas de desenvolvimento. No estudo de Vieira e colaboradores (19) além de apresentarmos o método bioanalítico para a determinação de GQ-2 em plasma animal, apresentamos a farmacocinética da GQ-2 pela via intravenosa em ratos Wistar na dose de 3 mg/kg. A GQ-2 apresentou meia vida

de eliminação de 4,44 h, clearance de 8,00L/h.kg, volume de distribuição de 45.60 L/kg e MRT de 3.79h, todos adequados para uma posologia consistente no futuro. Contudo, não foram observadas concentrações quantificáveis de GQ-2 pela via oral. O que nos levou a avaliar esta molécula quanto a sua biodisponibilidade neste estudo.

Estudos com a GQ-2 ainda estão sendo publicados, principalmente em relação a sua atividade anti-inflamatória e no tratamento de esteatose hepática, o estudo de Silva e colaboradores (20) demonstrou o potencial da GQ-2 em prevenir o aparecimento de lesões relacionadas a aterosclerose. A combinação destas atividades da GQ-2 mantém a molécula como um forte candidato a terapia da diabetes e a síndrome metabólica decorrente da mesma.

2. GQ-19 - 3-(4-metilbenzil)-5-(4-nitrobenzilideno)tiazolidina-2,4-diona

A síntese da GQ-19 foi publicada no artigo de da Costa Leite e colaboradores (21) como o composto 12. Neste artigo os compostos de 1 a 12 derivados 5-arylidene-3-(4-metil-benzil)-tiazolidina-2,4-dionas, foram preparados por adição nucleofílica de 3-(4-metil-benzil)-tiazolidina-2,4-diona aos derivados aril-substituídos etil-(2-ciano-3-fenil)-acrilatos correspondentes. Além da síntese, a atividade dos compostos foi avaliada em camundongos com diabetes induzida por aloxana. Os animais receberam os compostos 1-12 pela via oral por 15 dias em doses que variaram de 5 a 40 mg/kg e tiveram sua glicemia e os triglicérides séricos avaliados ao final do período de tratamento. O GQ-19 foi capaz de reduzir os triglicérides séricos em 11% e a glicemia em 7%. A dockagem do GQ-19 neste trabalho também revelou alta afinidade da molécula pelos receptores PPAR- α e PPAR- γ (-8,62 e -10,45 kcal/mol, respectivamente), com energia de ligação com PPAR- γ um pouco maior do que a do composto referência, a rosiglitazona (-10,22 kcal/mol).

3. GQ-11 - (5-(indol-3-il-metileno)-3-(4-metilbenzil)-tiazolidina-2,4-diona)

A síntese da GQ-11 pode ser encontrada no trabalho publicado por Paula (5) no 3º Encontro Brasileiro para Inovação Terapêutica. Neste trabalho, além da síntese, os autores avaliaram a atividade hipoglicemiante e hipolipemiante da molécula comparada ao padrão rosiglitazona. A GQ-11

administrada pela via oral (10mg/kg) demonstrou ser tão eficiente quanto a rosiglitazona para diminuir a glicemia e lipemia de ratos diabéticos (induzidos com 42 mg/kg de estreptozotocina).

4. GQ-177 - (3-(3-bromobenzil)-5-(4-metilsulfonil-benzilideno)-tiazolidina-2,4-diona)

A atividade da GQ-177 foi abordada no trabalho de Silva e colaboradores (4). Neste estudo, camundongos tratados com dieta indutora de obesidade por 24 semanas foram tratados com rosiglitazona ou GQ-177 (ambos a 20mg/kg) pela via oral por 4 semanas, uma vez ao dia. Os autores analisaram os efeitos da GQ-177 na indução de marcadores anti-ateroscleróticos e relacionados ao metabolismo glicídico e lipídico. Como resultado, a GQ-177 foi capaz de reduzir a resistência à insulina e melhorar o perfil lipídico dos animais sem afetar a densidade óssea. Ainda, a GQ-177 foi capaz de inibir a formação de placas de aterosclerose no arco aórtico dos camundongos, além de promover redução da glicemia e aumento de HDL nos animais tratados. Em geral, o composto apresentou resultados promissores para o tratamento de diabetes e prevenção de aterosclerose sem perda de densidade óssea ou acúmulo de gordura, característico das tiazolidinodionas do mercado.

III. OBJETIVO GERAL

Aplicar o *screening* farmacocinético por CARRS, o modelo de monocamadas de células Caco-2 e caracterização físico-química para selecionar dentre os compostos derivados de tiazolidinodionas - GQ-2, GQ-11, GQ-19 e GQ-177 - o(s) candidato(s) com características mais apropriadas para a continuidade dos estudos pré-clínicos. A condução do estudo de farmacocinética completa de cada candidato será definida a partir dos resultados obtidos nos *screenings*. Ainda, a implementação dos ensaios de *screening* no grupo de pesquisa em farmacocinética e toxicologia de novos fármacos e medicamentos, para otimizar a obtenção de informações sobre os

candidatos à fármacos mais promissores, constitui-se também como objetivo geral deste trabalho.

Objetivos Específicos

Capítulo 1 - *Screening* físico químico

- Validar método analítico para determinação das concentrações das GQ-11, GQ-19 e GQ-177 em solução
- Realizar a determinação do Log P das GQs pelo método cromatográfico
- Realizar o ensaio de estabilidade química das GQs nos pHs 1,2 e 7,4.

Capítulo 2 – *Screening in vitro*

- Adaptar o método analítico desenvolvido para determinação das GQs em PBS
- Realizar ensaio preliminar de citotoxicidade das GQs em células Caco-2
- Realizar o ensaio de permeação em Caco-2

Capítulo 3 – *Screening in vivo*

- Desenvolver e validar método bioanalítico para a determinação das GQs em plasma
- Utilizar o método CARRS para *screening* das GQs em ratos Wistar pela via oral.

CAPÍTULO 1 - SCREENING FÍSICO-QUÍMICO

1. Introdução

A disposição cinética de um fármaco possui estreita relação com algumas de suas propriedades físico-químicas. 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*.

A biodisponibilidade depende de vários fatores, dos quais apenas um deles é de fato a absorção. Há também a influência de degradação e solubilidade no trato gastrointestinal, metabolismo de parede intestinal, metabolismo de primeira passagem hepático, metabolismo pulmonar, entre outros percalços antes da molécula atingir a circulação sistêmica, e a quantidade de fármaco que passa por todos estes obstáculos é de fato, a fração biodisponível (22).

Propriedades físico químicas como solubilidade, lipofilicidade e ionização são consideradas as mais importantes para a previsão do comportamento de absorção de uma molécula (23).

Lipinski e colaboradores (24) realizaram uma análise das propriedades físico-químicas de 2.200 compostos do "World Drug Index" em relação à características de solubilidade, permeabilidade em testes clínicos de fase 2. Este estudo resultou na "regra dos cinco", que estabelece alguns requisitos gerais que determinam êxito para a maioria das moléculas no mercado. A "regra dos cinco de Lipinski" descreve como desejáveis para um perfil farmacocinético os seguintes parâmetros: $\text{Log } P < 5$; Peso molecular $< 500 \text{ Da}$; Número de ligações de hidrogênio < 5 e Número de aceptores de hidrogênio < 10 . Esta regra pode ser utilizada como critério de seleção dentre um rol de compostos.

O $\text{Log } P$ tem influência direta nos eventos que sucedem a administração enteral dos fármacos, pois relaciona-se diretamente com a solubilidade do composto nos fluidos gástricos e intestinais e, ainda, influencia na

permeabilidade do fármaco através das membranas celulares envolvidas no processo de absorção (9).

Embora a estabilidade química do composto em diferentes pHs não faça parte da regra estabelecida por Lipinski, esta característica é fundamental para prever o comportamento farmacocinético, particularmente na administração enteral (11).

Markopoulos e colaboradores (25) apresentam uma série de propostas para a avaliação de estabilidade de moléculas, sob diferentes níveis de complexidade, cujo objetivo é mimetizar as condições do trato digestório e assim prever as possibilidades de degradação previamente à absorção. A avaliação de menor complexidade (nível 0) e o estudo de estabilidade em diferentes pHs pode ser aplicado para correlações *in vitro/in vivo* (CIVIV) iniciais.

Tendo em vista que o estudo de *screening* é um estudo desenhado para conferir agilidade ao processo ao qual é destinado, não convém adicionar estudos mecanísticos elaborados em modelos complexos, como o modelo celular e modelo animal para a obtenção de informações profundas quanto à biodisponibilidade da substância (12). Desta forma, um estudo de estabilidade da molécula em trato gastrointestinal de nível 0 apresenta-se como uma ferramenta compatível com a velocidade requerida por um estudo de *screening* e oferece informações importantes acerca da biodisponibilidade de substâncias candidatas à fármaco (25). Desta forma, o estudo de estabilidade em ambiente estomacal foi realizado em pH 1,2, mimetizando o pH observado neste local com o intuito de inferir sobre a estabilidade das substâncias durante seu trajeto pelo trato gástrico. Por outro lado, o pH 7,4 é importante para a avaliação da estabilidade das novas moléculas tanto em plasma, que pode gerar resultados de clearance inconclusivos no estudo de farmacocinética pré-clínica, quanto nos estudos *in vitro*, que serão realizados em tampão PBS, cujo pH também é 7,4.

O ensaio mais simples para a determinação de Log P de substâncias é o *shake flask*, cujo ensaio é a definição literal do coeficiente. Contudo, o procedimento para a realização do ensaio consiste em colocar em contato dois

solventes imiscíveis, um deles geralmente é a água e o outro pode variar - classicamente, utiliza-se o 1-octanol. Esta técnica exige que a mistura seja agitada em tempo suficiente para que haja saturação de ambas as fases e um método analítico para a determinação da substância de interesse em cada fase. Ainda, o método apresenta limitações quanto à substância teste, pois em alguns casos a mistura pode resultar em emulsões acarretando prejuízos à quantificação do analito de interesse. O método cromatográfico para a determinação do Log P proposto por Veith e colaboradores (26) e adotado pela OECD (*Organization for Economic Co-operation and Development*) no guia de 2004, estabelece a utilização de padrões de Log P conhecidos e, num sistema cromatográfico pré-estabelecido, correlaciona o coeficiente de partição dos padrões com seu fator de capacidade ($\log k$), que é proporcional ao tempo de retenção de cada fármaco. Este método permite avaliar diversos fármacos num mesmo ensaio com apenas um método analítico. Desta forma este método é mais apropriado para um estudo de *screening* devido à agilidade da obtenção de resultados.

É importante ressaltar que ambos os ensaios de estabilidade química e Log P da GQ-2 já foram realizados previamente pelo grupo e os resultados divulgados na dissertação da acadêmica Carla Monalizi Vieira e publicado em Vieira e colaboradores (19). Seus resultados revelaram que a GQ-2 foi estável em pH 1,2 até 15 minutos e em pH 7,4 até 6 horas. O Log P da molécula extrapolado da curva de Log k vs Log P foi de 6,2.

Portanto, o Capítulo 1 – *Screening* Físico-químico abordará a avaliação da estabilidade química em pH 1,2 e 7,4 e Log P dos GQ-11, GQ-177 e GQ-19; assim como o desenvolvimento e validação dos métodos analíticos para tais avaliações.

2. Materiais e Métodos

2.1 Desenvolvimento e Validação de Métodos Analíticos para a determinação dos GQ-11, 177 e 19.

Sistema Cromatográfico

O desenvolvimento do método analítico para a determinação das GQs em solução envolveu a utilização um sistema de cromatografia líquida de ultra eficiência Waters UPLC H-Class® equipado com detector UV-Visível. Os comprimentos de onda mais apropriados para a detecção das moléculas foram determinados através de varredura em espectrofotômetro PoweWaveBiotek HT. A saber: GQ-11 em 380nm, GQ-177 e 19 em 311 nm. A coluna que melhor se adaptou aos compostos foi a coluna HSS SB C18 1,8µm, 2,1x50mm com coluna guarda HSS C18 1,7µm, 2,1x5mm.

A fase móvel selecionada foi constituída de 25:75 água:acetonitrila (v/v) para a eluição da GQ-11 e 35:65 para GQs 19 e 177. Os padrões foram solubilizados em acetonitrila para compor a solução de estoque. A vazão de 0,4 mL/min e volume de injeção de 1µL foram utilizados em ambos os métodos e a coluna foi mantida a 30°C além do auto-injetor mantido a uma temperatura de 10°C para a conservação das amostras até sua injeção. Foi possível detectar as GQs 19 e 177 no detector UV-Vis no mesmo cromatograma devido à absorbância máxima de ambas as moléculas serem próximas, além dos tempos de retenção e a resolução entre os picos apresentarem-se apropriados para a separação dos mesmos. O comprimento de onda selecionado para a detecção das duas moléculas foi 311 nm, e para a detecção de GQ-11 foi 380nm. Um resumo dos métodos analíticos desenvolvidos está apresentado na Tabela 1.

Tabela 1 - Métodos analíticos para a determinação dos GQs 11, 19 e 177

	Coluna	Vazão	Fase Móvel (Água:ACN)	Detecção UV	Tempo de Retenção
GQ-11	HSS SB 5cm	0,4 mL/min	25:75	380 nm	0,8 min
GQ-19	HSS SB 5cm	0,4 mL/min	35:65	311 nm	0,62 min
GQ-177	HSS SB 5cm	0,4 mL/min	35:65	311 nm	0,8 min

Validação analítica para os métodos dos GQs 11, 177 e 19.

Os parâmetros avaliados na validação do método são aqueles definidos pela RDC 899/2003(27), a saber: especificidade, linearidade, precisão (repetibilidade e intermediária) e exatidão.

Os controles de qualidade avaliados para os 3 compostos foram:

Limite superior de quantificação (LSQ), 10 µg/ml. Controle de qualidade alto (CQA), 8 µg/ml. Controle de qualidade médio (CQM), 1 µg/ml. Controle de qualidade baixo (CQB), 0,1 µg/mL. Limite inferior de quantificação (LIQ), 0,08 µg/mL).

A especificidade foi constatada comparando a área de um branco no mesmo tempo de retenção do analito. A área do branco deve ser duas vezes menor do que a área do limite de quantificação de cada método.

A linearidade foi avaliada através do coeficiente de correlação (r^2) da curva de calibração em cada matriz e pela aprovação da exatidão das amostras em diversos tempos

A precisão foi expressa como coeficiente de variação e avaliada em triplicata para cada ponto da curva em um dia (intraensaios) e em três dias diferentes (interensaios). Uma precisão com coeficiente de variação menor do que 10% foi utilizado como limite do ensaio.

A exatidão foi avaliada como desvio padrão relativo e foi avaliada em triplicata para cada ponto da curva em um dia (intraensaios) e em três dias diferentes (interensaios).

2.2 Ensaio de estabilidade em pHs 1,2 e 7,4

Para o ensaio de estabilidade química das moléculas, as concentrações no CQA e CQB foram submetidas às condições de pH 1,2 (tampão Clark-Lubs, cloreto de potássio e ácido clorídrico) e de pH 7,4 (tampão fosfato de potássio/ácido clorídrico). As misturas em triplicata foram mantidas sob agitação e temperatura (37°C) constantes com o auxílio de um agitador magnético e manta aquecedora. As amostras foram coletadas nos tempos: 0; 0,16; 0,5; 0,75; 1; 2; 4 e 8 horas. As amostras foram analisadas pelo método

cromatográfico previamente desenvolvido. Os valores de área nos diferentes tempos de coleta foram comparados com os valores obtidos no tempo zero e o composto foi considerado estável quando os resultados apresentaram valores com variação menor ou igual a 10%.

2.3 Ensaio de Log P pelo método cromatográfico

O coeficiente de partição (Log P) de cada molécula foi determinado de acordo com o guia da OECD/2004 (*Organization for Economic Co-operation and Development*) pelo método cromatográfico. O valor de Log P de cada composto foi obtido através da confecção de uma curva de Log P por Log k (fator de capacidade), a curva foi construída com substâncias referências recomendadas pelo guia, utilizando substâncias cuja curva de Log k (log do fator de capacidade) versus o Log P compreendesse valores entre 1 e 6,2 (Tabela 2).

Foi utilizado para esse experimento um sistema UPLC Acquity® com detector UV-Visível. A separação foi feita por uma coluna BEH 2,1x50mm, 1,7 μ m com pré-coluna BEH 2,1x5mm, 1,7 μ m, mantida a 30° C. A fase móvel foi metanol:água com ácido fórmico 0,1% (70:30) com vazão de 0,4 mL/min. O volume de injeção foi de 1 μ L.

Tabela 2 - Substâncias utilizadas na curva para a determinação do Log P.

Substância	Log P
Acetanilida	1,0
Nifedipino	2,0
Benzeno	2,1
Probenecida	2,3
Diazepam	2,7
Clorobenzeno	2,8
Timol	3,3
Fenantreno	4,5
Trifenilamina	5,7
DDT	6,2

Para construção da curva de Log k versus Log P dos padrões de calibração foi necessário calcular seus respectivos fatores de capacidade k , que é determinado dividindo-se a diferença entre o tempo de retenção do composto e o tempo morto do sistema pelo próprio tempo morto do sistema. O

tempo morto utilizado nessa equação foi calculado a partir das dimensões da coluna cromatográfica, resultando em 0,238 min.

O $\log k$ das substâncias teste (GQ-11, GQ-19 e GQ-177) foi determinado a partir de seu tempo de retenção e interpolado na curva de linearidade de $\log k$ versus $\log P$ para obtenção do $\log P$ de cada substância teste pelo método cromatográfico.

2.4. Análise estatística

Para os testes de estabilidade, foi aplicado um teste de ANOVA pareado paramétrico entre as concentrações das amostras ao longo do tempo do estudo, de 0 a 8 horas, com o intuito de identificar as concentrações que se diferenciam estatisticamente do tempo zero, e assim determinar o momento que determinada molécula é considerada instável em relação à concentração inicial. Em seguida foi aplicado um teste t pareado entre os pHs e entre as concentrações CQA e CQB a fim de determinar se em alguma destas situações há degradação diferenciada da substância. Os gráficos com os pontos de decaimento da concentração de cada molécula foram expressos em porcentagem, sendo 100% a concentração inicial. Foram consideradas instáveis as concentrações inferiores a 10% da concentração inicial, com diferença estatística significativa.

3. Resultados

3.1. Método analítico para a determinação de GQ11

Através do método analítico desenvolvido para a detecção de GQ-11, foi obtida a eluição da GQ-11 aos 0,7 minutos e o tempo de corrida foi 2 minutos como pode ser observado na Figura 2.

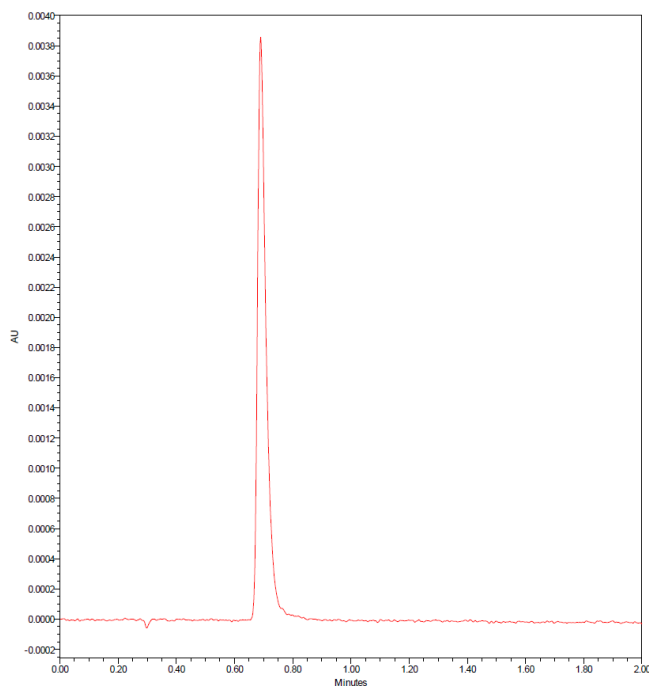


Figura 2 - Cromatograma GQ-11, concentração de 0,625 µg/mL em coluna HSS SB 2,1x50mm com fase móvel acetonitrila:água (75:25) com fluxo de 0,4 µL/min

O método foi reprodutível e pôde-se construir uma curva analítica para a molécula.

Curva analítica GQ-11

Foram utilizadas as concentrações de 10, 5, 2,5, 1,25, 0,62 e 0,31 µg/mL. Foi obtido um r^2 de 0,99 e r de 0,99, a equação que descreve a curva obtida foi $y=11669,32x+172,76$, como pode ser observado na Figura 3. Desta forma, a linearidade do método foi contemplada com coeficiente de correlação acima de 0,99, não houveram picos interferentes da matriz (acetonitrila), assim, o método também foi considerado seletivo. A exatidão da curva foi de 98,68% a 100,59%.

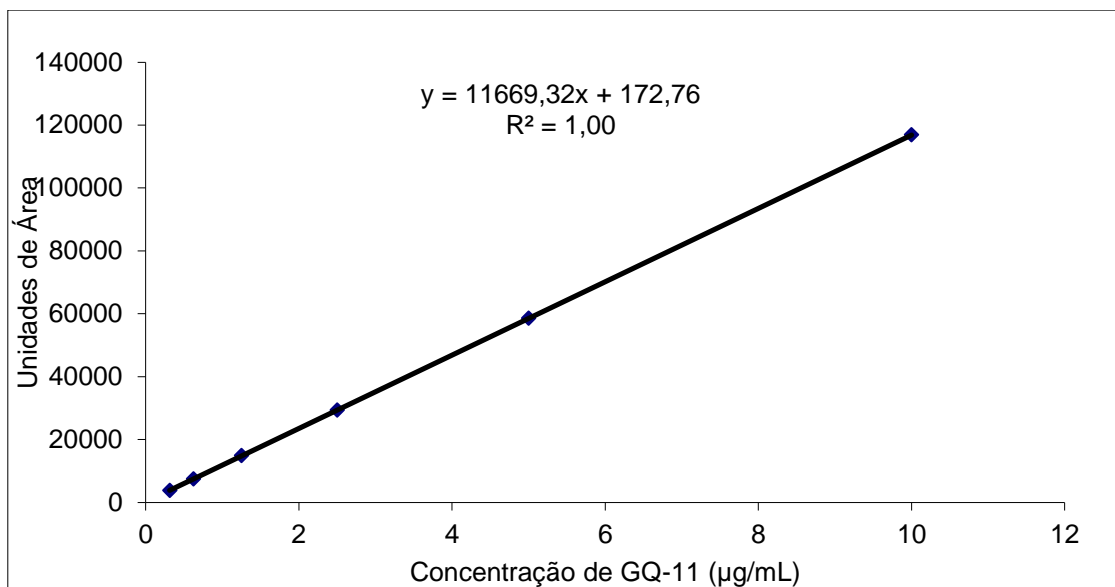


Figura 3 - Curva analítica construída para GQ-11, com equação e r^2 .

3.3.Método analítico para a determinação de GQ177 e GQ 19

O método utilizado foi aquele descrito no item 2.1.1 O resultado foi a eluição da GQ-177 aos 1,83 minutos e o tempo de corrida foi 2 minutos como pode ser observado na Figura 4.

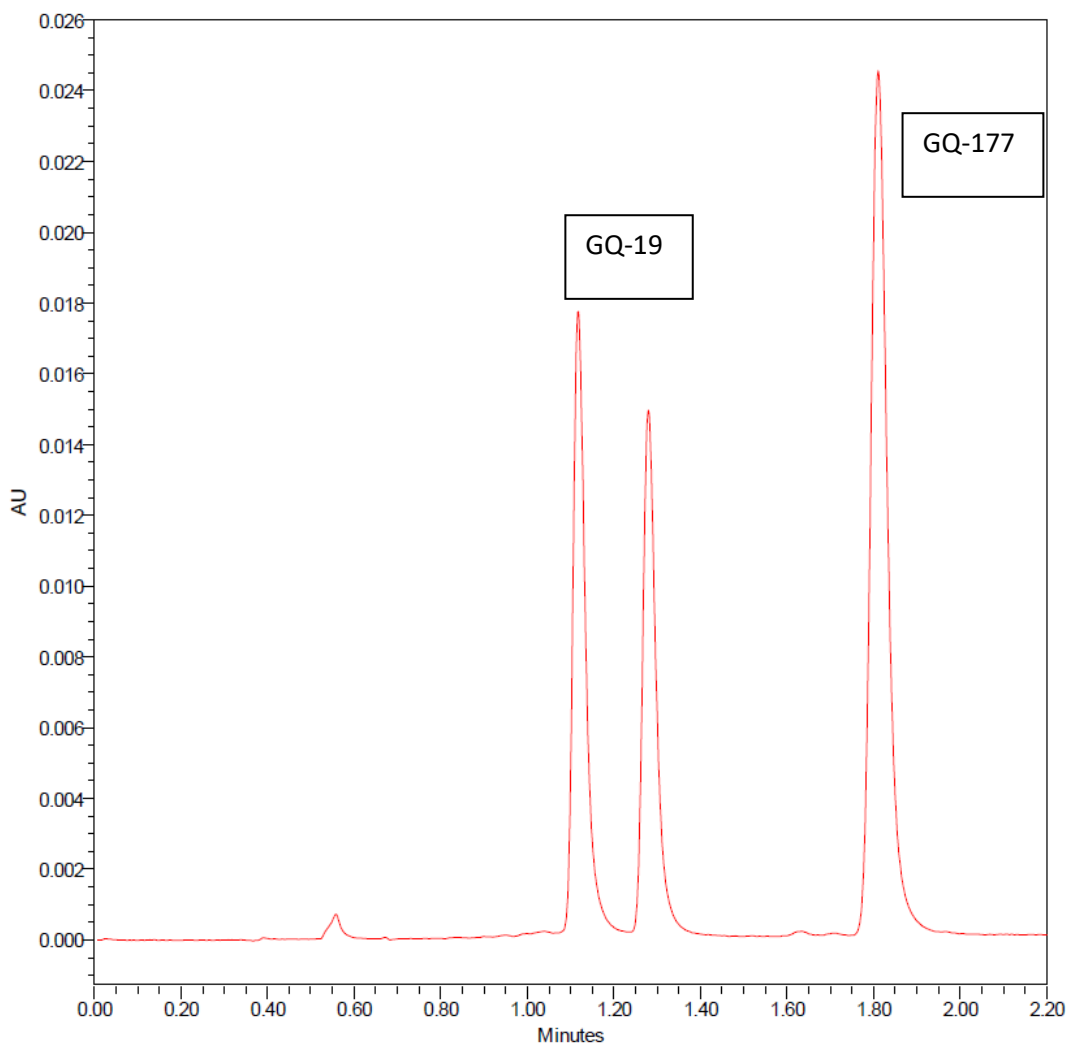


Figura 4 -Cromatograma GQ-19 e GQ-177, concentração de 10 $\mu\text{g/mL}$ em coluna HSS SB 2,1x50mm com fase móvel acetoneitrila:água (65:35) com fluxo de 0,4 $\mu\text{L/min}$

A GQ-19 pôde ser analisada no mesmo cromatograma, como pode ser observado na Figura 4. O tempo de retenção foi em 1,10 e 1,30 minutos, aparentemente, a GQ-19 possui um isômero ou um subproduto da síntese neste lote de material. Os picos da GQ-19 foram facilmente separados e foram proporcionais nas variadas concentrações avaliadas. Através do método desenvolvido para a detecção de GQ-177 e GQ-19, foi possível realizar uma curva analítica.

Curva analítica GQ-177

Foram utilizadas as concentrações de 5, 2,5, 1,25, 0,62 e 0,31, 0,16 e 0,08 $\mu\text{g/mL}$. Foi obtido um r^2 de 1,00 e r 1,00, a equação que descreve a curva obtida foi $y=6703,29x + 71,07$, como pode ser observado na Figura 5. Também foi observada linearidade e seletividade ao método. A exatidão da curva foi de 92,57% a 100,97%.

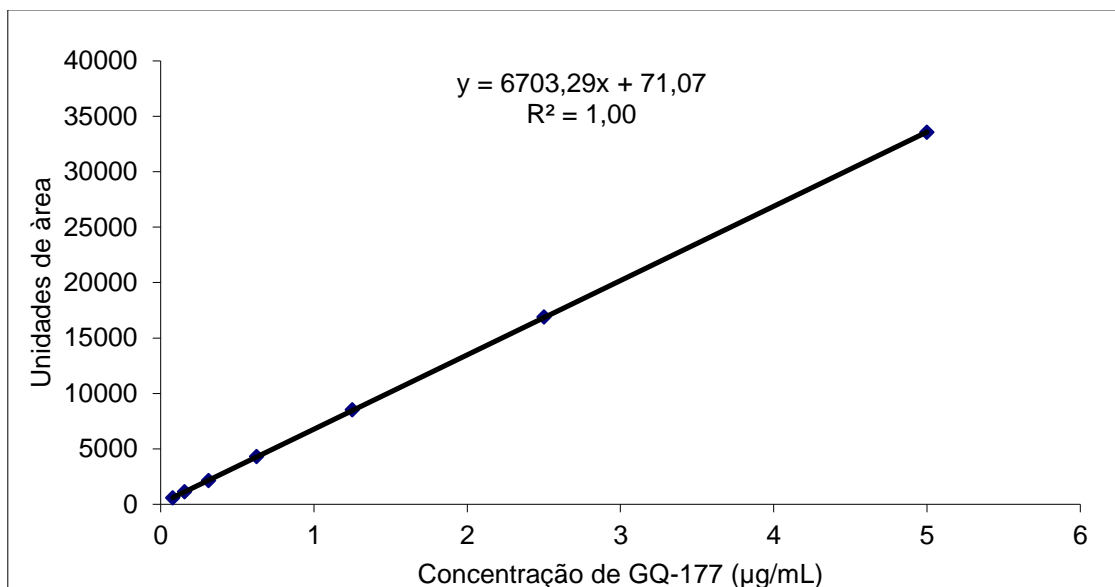


Figura 5 - Curva analítica construída para GQ-177, com equação e r^2 ($n=3$).

Curva analítica GQ-19

Foram utilizadas as concentrações de 10, 5, 2,5, 1,25, 0,62 e 0,31, 0,16 e 0,08, $\mu\text{g/mL}$. Foi obtido um r^2 de 1,00 e r 1,00, a equação que descreve a curva obtida foi $y=5331,29x - 3,00$ como pode ser observado na Figura 6. Também foi observada linearidade e seletividade ao método. A exatidão foi de 98,86% a 112,68%.

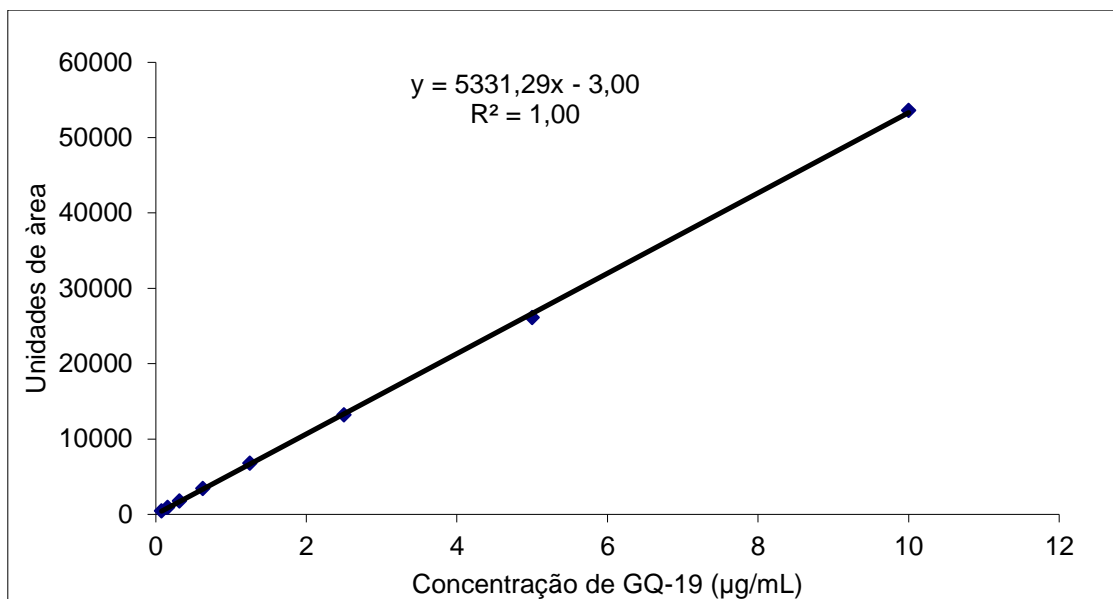


Figura 6 - Curva analítica construída para GQ-19, com equação e r^2 .

3.3. Validação analítica

Os métodos apresentados foram validados de acordo com as normas vigentes, o resultado da validação dos métodos está apresentado na Tabela 3.

Tabela 3 - Precisão e exatidão dos controles de qualidades usados na validação analítica das GQ-11, GQ-177 e GQ-19

		Precisão Interensaios					
Controles		Baixo		Médio		Alto	
	Réplicas	Precisão	Exatidão	Precisão	Exatidão	Precisão	Exatidão
GQ-11	1	5,17	101,53	3,89	103,13	0,62	99,62
	2	5,20	95,81	3,13	104,94	5,96	97,06
	3	1,12	106,00	1,40	105,24	2,68	97,42
GQ-177	1	3,07	103,18	2,25	94,33	2,23	101,13
	2	4,43	98,53	1,76	100,13	1,48	103,32
	3	1,37	105,78	4,46	99,59	1,94	100,52
GQ-19	1	5,81	95,033	2,11	97,66	2,12	99,18
	2	2,56	95,75	1,86	95,62	0,28	101,29
	3	0,82	101,95	3,48	99,97	1,95	99,09

Controle baixo: 0,1 µg/mL; Controle médio: 1 µg/mL; Controle alto: 8 µg/mL.

Os valores de precisão e exatidão intra e interensaios foram considerados dentro dos limites de tolerância (10%) para a validação de métodos analíticos segundo a RDC 899/2003. Portanto o método foi

considerado adequado para a determinação da concentração destas moléculas em solução.

Com base nos limites de confiança observados na validação dos métodos analíticos foi possível aplicá-los nos estudos de estabilidade química para cada composto.

3.4. Estabilidade química das GQ-11, GQ-177 e GQ-19

Estabilidade GQ-11

A representação gráfica dos resultados obtidos no estudo da estabilidade da GQ-11 pode ser observada na Figura 7. A GQ-11 não apresentou diferenças estatísticas em relação ao tempo zero em pH 7,4, embora haja até 25% de decaimento no valor absoluto. Contudo, no pH 1,2, foi observado decaimento do CQA de cerca de 30% nos primeiros 20 minutos com relevância estatística ($p < 0,05$, teste ANOVA pareado paramétrico). Portanto o GQ-11 é estável em pH 7,4 até 8 horas enquanto que em pH 1,2 é instável a partir de 20 minutos. A instabilidade da GQ-11 em pH ácido impossibilitou a observação das concentrações da molécula no CQB, de 0,1 $\mu\text{g/mL}$.

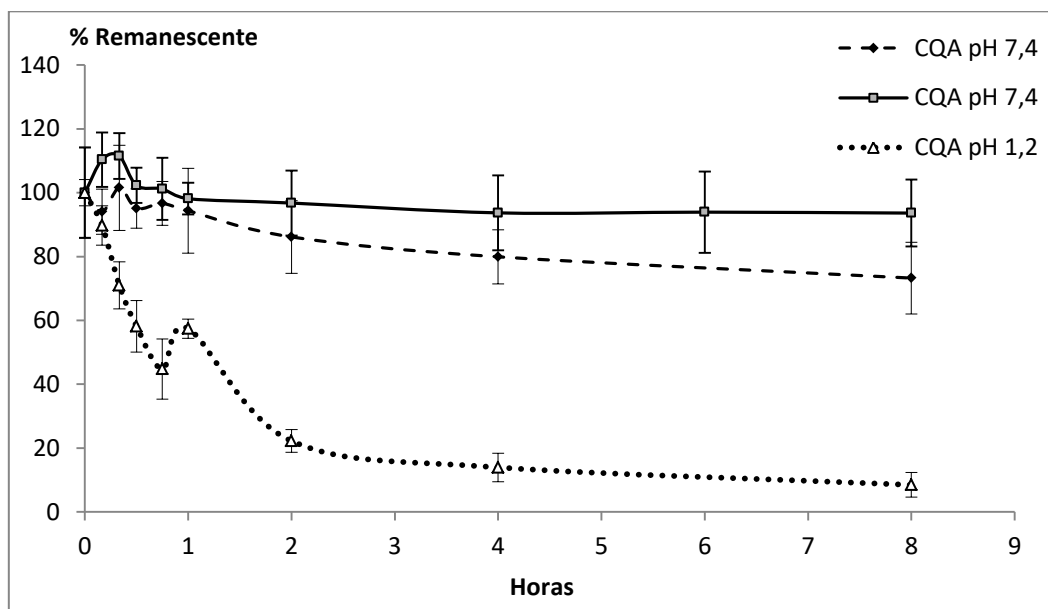


Figura 7 - Estabilidade do GQ-11 em pH 1,2 e 7,4

Os resultados obtidos permitem inferir que GQ-11 é estável em pH 7,4 porém instável em pH 1,2. Estas características apontam para a necessidade de formulação gastrorresistente, caso a absorção seja relativamente lenta em relação ao tempo de estabilidade, para que a molécula não seja degradada na luz estomacal e seja então disponibilizada em quantidade suficiente na região duodenal, na qual há expectativas de absorção efetiva.

Estabilidade GQ-177

Os resultados do estudo de estabilidade química da GQ-177 estão representados na Figura 8. Os resultados apresentaram diferenças estatísticas em ambos os pHs a partir de 20 minutos de experimento, ao mesmo tempo em que as concentrações apresentaram decréscimo de mais de 50%. A degradação da molécula no CQB (0,1 µg/mL) em pH 1,2 foi mais acentuada do que no CQA (8 µg/mL), sendo estatisticamente diferentes ($p < 0,05$) a partir de 2 horas. O CQB (0,1 µg/mL) em pH 7,4 apresentou concentrações abaixo dos limites de quantificação do método, portanto não foi possível determinar nenhuma concentração nesta situação.

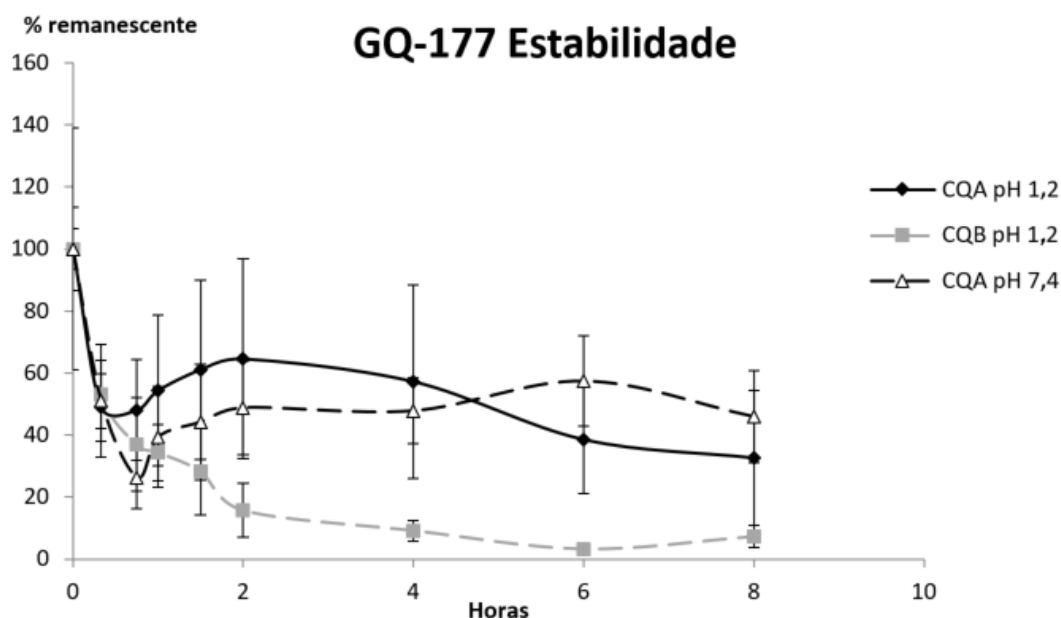


Figura 8 - Estabilidade do GQ-177 em pH 1,2 e 7,4

A instabilidade química da molécula GQ-177 é marcante nos pHs avaliados em um período relativamente curto (20 minutos) para que ocorra a sua absorção, o que torna mais complexa a formulação do composto para viabilizar sua administração oral. Outro aspecto relevante desta instabilidade em pH 7,4 é que há expectativas de elevado CI, tendo em vista a sua instabilidade em pH sanguíneo.

Estabilidade GQ-19

Na Figura 9 estão representados os resultados obtidos no estudo de estabilidade da GQ-19. A degradação do GQ-19 em pH 1,2 foi mínima, decrescendo no máximo à 5% do valor inicial, sem diferenças estatísticas significativas. Contudo no pH 7,4, foram observadas diferenças estatísticas a partir de 20 minutos para ambas as concentrações do estudo ainda, após 45 minutos, o CQB (0,1 µg/mL) em pH 7,4 apresentou áreas abaixo do limite de quantificação do método desenvolvido. Assim a GQ-19 demonstrou estabilidade em pH 1,2 para ambos os controles e instabilidade a partir de 20 minutos em pH 7,4.

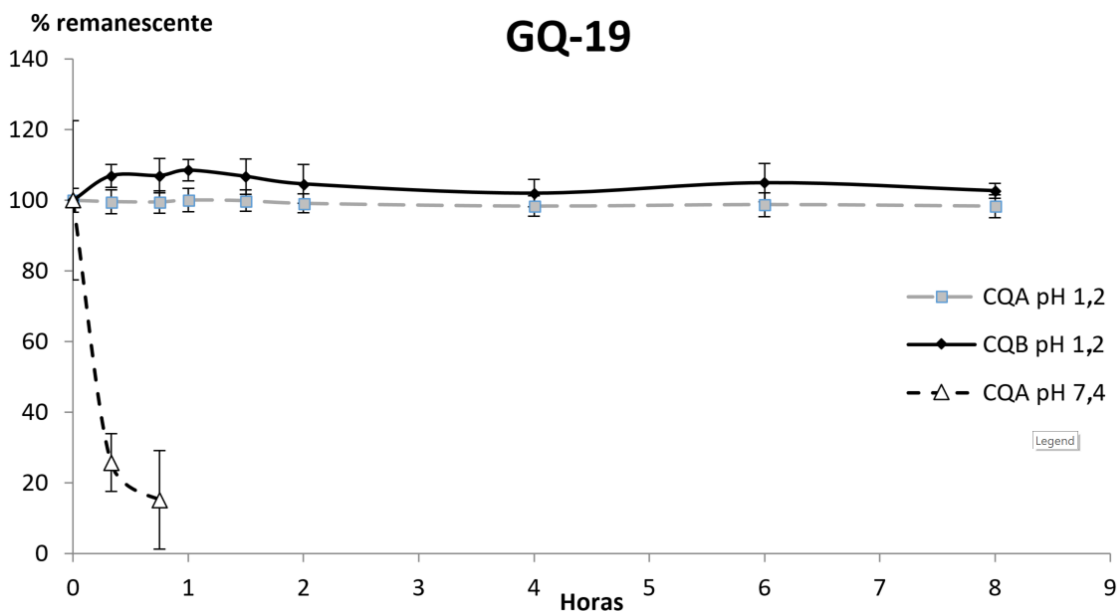


Figura 9 - Estabilidade do GQ-19 em pH 1,2 e 7,4

A molécula GQ-19 é estável em pH 1,2 e instável em pH 7,4, tornando-a promissora para administração oral. No entanto, a instabilidade em pH 7,4 pode significar que na região intestinal, cujo pH é mais básico, pode haver degradação significativa desta molécula, particularmente se a velocidade de absorção for relativamente lenta. Há expectativas, ainda, de elevado CI considerando o pH plasmático de 7,4.

3.5. Log P

De acordo com o protocolo apresentado anteriormente, foi construída a curva de Log k vs Log P_e , assim, possível calcular o Log P dos GQ-2, GQ-11, GQ-19 e GQ-177, como pode ser observado na Figura 10.

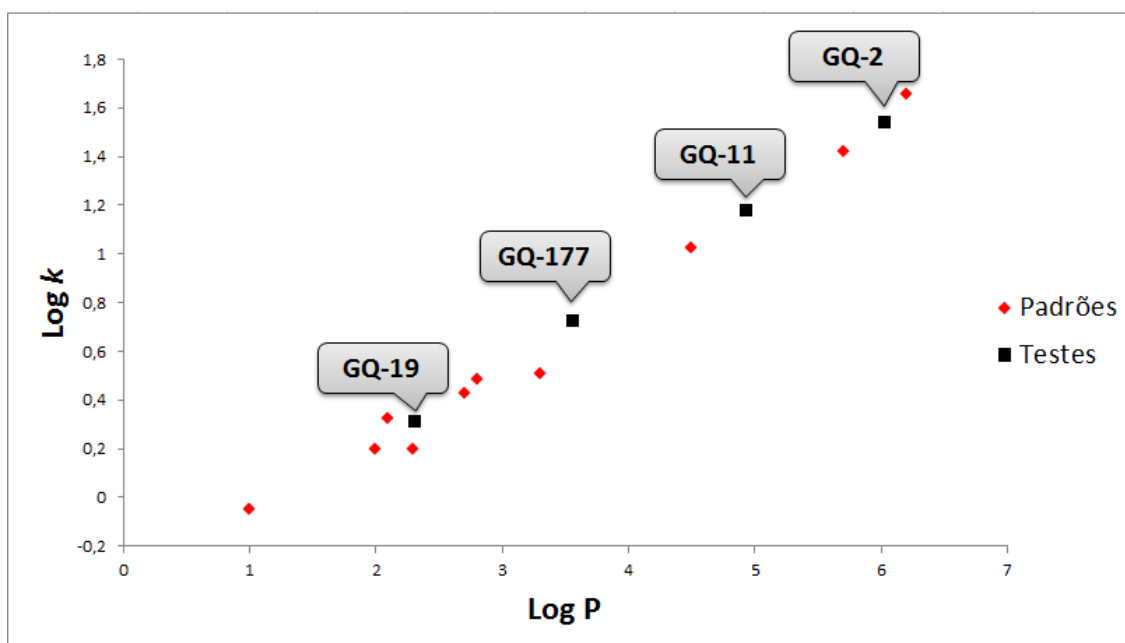


Figura 10 - Gráfico de Log k vs Log P dos padrões juntamente com os fármacos de interesse

A equação da reta obtida foi $y=0,330x - 0,458$ e o coeficiente de correlação, $r = 0,984$. Através da equação foi possível obter os valores de Log P das substâncias de interesse, apresentados na Tabela 4 juntamente com outras características físico-químicas das moléculas.

Tabela 4 - Valores de Log P obtidos e outros parâmetros utilizados na regra dos 5 de Lipinski para cada GQ.

Composto	Log P	Peso molecular	Doador LH	Aceptor LH
GQ-19	2,1	355,07	1	6
GQ-177	3,5	450,95	0	7
GQ-11	5,1	347,09	1	4
GQ-02	6,0	343,04	0	4
Pioglitazona*	2,69	356,44	1	5
Rosiglitazona*	1,86	357,43	1	7

*LH=Ligação de hidrogênio. *=Dados de(28)*

De acordo com os resultados obtidos e considerando a regra de Lipinski em relação ao Log P, podemos concluir que as GQs 19 e 177 são as moléculas com maior probabilidade de absorção.

4. Conclusão

O *screening* físico-químico demonstrou que as moléculas avaliadas são sensíveis a mudanças de pH mesmo na ausência de enzimas e outros catalisadores de hidrólise que podem ser encontrados no trato gastrointestinal e no plasma. A avaliação do Log P apontou para expectativa de absorção principalmente para a GQ-19 e GQ-177, cujos valores estão compatíveis com a regra dos 5 de Lipinski. Os outros parâmetros avaliados, como o número de doadores e aceptores de hidrogênio e peso molecular estão dentro da regra. Mesmo com o Log P violando umas das regras, há expectativa de absorção oral(24).

Contudo, a expectativa de biodisponibilidade da GQ-11 é diminuída pois há alto percentual de degradação desta molécula no pH ácido do estômago, além de um Log P elevado, que pode levar à baixa solubilidade nos

fluidos do trato gastrointestinal e retenção da molécula nos componentes lipofílicos dos enterócitos.

A GQ-177 apesar de apresentar instabilidade nos pHs 1,2 e 7,4, não se degradou completamente em nenhum deles até o final do experimento. Assim, apesar deste resultado trazer baixa perspectiva para a absorção, pode-se interpreta-lo como uma expectativa de biodisponibilidade de aproximadamente 50% da dose administrada, uma vez que a concentração da molécula em ambos os pHs chegou a este valor após 8 horas de teste. Se a molécula permear rapidamente os enterócitos, há possibilidade de uma considerável quantidade de fármaco estar disponível para a absorção. Esta expectativa é corroborada pelo resultado promissor de lipofilicidade representada pelo Log P de 3,5.

A GQ-19, ao contrário da GQ-11, foi estável em pH 1,2 e instável em pH 7,4. Desta forma, possui características interessantes para a biodisponibilidade após administração da molécula pela via oral, contudo há indícios de alto clearance devido à alta instabilidade em pH 7,4. Esta instabilidade também requer cautela nos ensaios *in vitro* utilizando PBS como solvente.

CAPÍTULO 2 – SCREENING IN VITRO

1. Introdução

No Capítulo 1 pôde ser observado que o *screening* físico-químico é um processo que oferece informações contundentes a respeito da expectativa de biodisponibilidade oral de fármacos. Foi também possível observar que o Log P e a estabilidade de alguns fármacos propostos para este estudo não apresentam características desejáveis.

Em testes preditivos da biodisponibilidade, a absorção é um parâmetro determinante que depende principalmente da taxa de dissolução e solubilidade do composto nos fluidos gastrointestinais e da permeabilidade da molécula, que seria a taxa com a qual o fármaco dissolvido atravessa a parede intestinal e chega à veia porta (29) e será o foco deste Capítulo.

A parede intestinal é formada por enterócitos que regulam a absorção de nutrientes e xenobióticos e constitui a principal barreira à absorção de fármacos. Um xenobiótico, ao se solubilizar no lúmen intestinal, pode adotar diferentes vias para atravessar este epitélio. Há a via através do transporte passivo, que geralmente ocorre através da membrana celular dos enterócitos (transporte transcelular), esta é a rota de transporte predominante para compostos hidrofóbicos. Outra rota de transporte passivo é o transporte através das junções intercelulares, entre os enterócitos, o transporte paracelular. Compostos hidrofílicos são principalmente transportados através da via paracelular. Há ainda a possibilidade de absorção através do mecanismo de transporte ativo, através de transportadores proteicos que podem existir tanto na membrana do polo apical - voltada para o lúmen intestinal, quanto na membrana do polo basolateral - voltada para a circulação(30). Ainda, existem transportadores de efluxo na membrana apical que podem contribuir para a limitação das concentrações intracelulares de xenobiótico, que serão discutidos mais adiante (29, 31). Uma representação das vias de absorção através da parede intestinal está representada na Figura 11. A importância de cada via de transporte transepitelial para a absorção de uma determinada substância

depende das propriedades físico-químicas da mesma, como lipofilicidade, tamanho, potencial de realizar ligações de hidrogênio e sua possível afinidade por transportadores proteicos (24, 32).

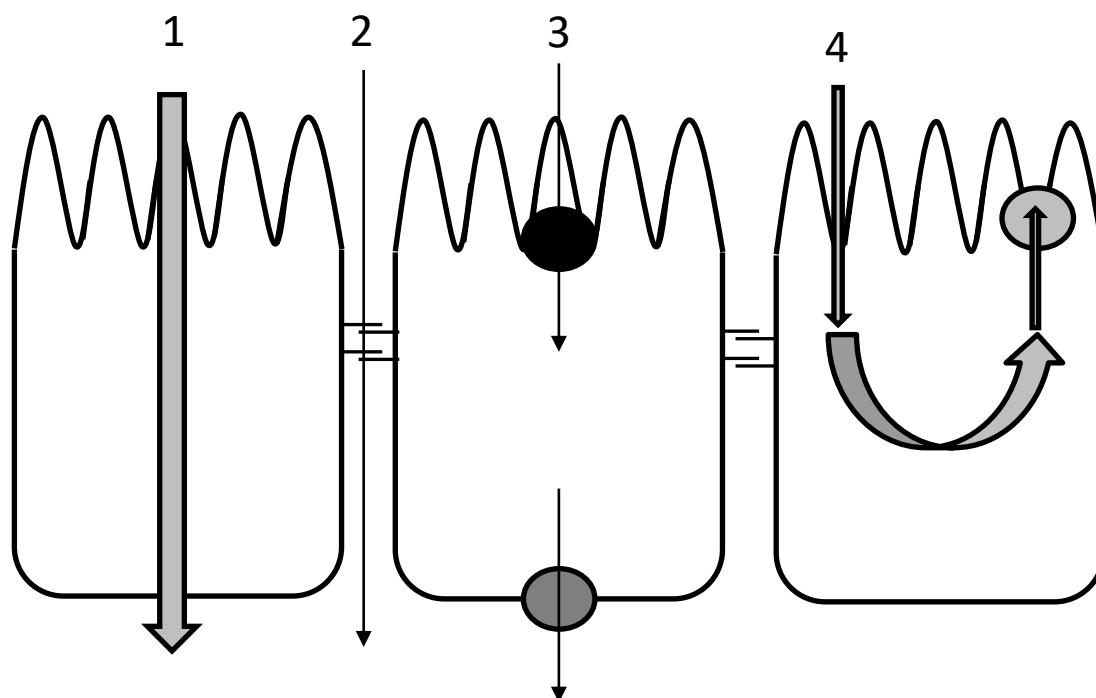


Figura 11 – Possíveis Rotas de absorção de fármacos. 1- Transporte transcelular. 2- Transporte paracelular. 3 – Transporte por transporte ativo da membrana apical e basolateral. 4 – Transportadores de efluxo

Para a predição de absorção de candidatos a fármaco existem diversos ensaios com níveis de complexidades diferentes que podem ser usados. Métodos físico-químicos, onde existem a avaliação de solubilidade e Log P foram discutidos no Capítulo 1, porém também existe o método com membrana lipídica artificial, o PAMPA (*Parallel Artificial Membrane Permeation Assay*) (33). O PAMPA consiste em um filtro hidrofóbico como o filtro de policarbonato, normalmente situado nos poços de uma placa de 96 poços, onde é aplicado um lipídio como a lecitina de ovo ou outro fosfolipídio e um solvente orgânico inerte, como o dodecano. Kansy e colaboradores (33) propuseram a técnica onde a mistura era 10% (m/v) de pó de lecitina de ovo em n-dodecano, o sistema forma uma membrana que separa os poços da placa em 2

compartimentos. Em um compartimento se coloca a solução do composto a ser testado e no outro um tampão aquoso. A migração do fármaco seria determinada através da concentração no compartimento receptor através de um método UV simples. O método é capaz de mimetizar o epitélio intestinal em relação à absorção passiva e paracelular de compostos (33). O método era menos trabalhoso do que cultivar células como a Caco-2, e diversas modificações na composição dos fosfolípidios e medição de candidatos a fármaco em pHs diferentes foram acrescentadas à técnica com o passar do tempo. Embora tenha se tornado bastante popular na indústria farmacêutica (34), o método subestima a absorção de compostos que sejam absorvidos via transporte ativo ou pela via paracelular (29, 35). No entanto, os resultados são robustos, reprodutíveis e possuem boa correlação com métodos mais complexos para a via transcelular.

Existem métodos *in silico* através de modelos computacionais de predição, como o utilizado por Lipinski e colaboradores (24) para a proposição da Regra dos 5. Em geral, modelos *in silico* correlacionam características de relação estrutura-atividade quantitativa (QSAR, *Quantitative Structure-Activity Relationship*) com alguma resposta fisiológica, no caso de absorção, correlacionando resultados de permeabilidade aparente de PAMPA ou de Caco-2 com características QSAR de um grupo de moléculas do grupo treinamento. Depois que o método é desenvolvido, utiliza-se um segundo grupo de moléculas, um grupo teste, onde aplica-se o modelo para sua validação. A utilização destes modelos resulta na construção de ferramentas para prever, por exemplo, a permeabilidade de compostos nestes sistemas (29, 36).

A melhor forma de mimetizar características do epitélio intestinal de mamíferos poderia ser utilizando os próprios modelos animais, uma vez que seria anti-ético, mais trabalhoso e mais custoso coletar tecidos e expor seres humanos a compostos em fase de descoberta. Existem modelos de estudo de permeabilidade com tecidos animais recém-extraídos que são categorizados como experimentos *ex vivo*(31). A Câmara de Ussing é um exemplo de experimento *ex vivo*, neste procedimento um segmento de tecido intestinal de um modelo animal é excisado e este tecido é fixado em uma câmara de difusão de dois compartimentos, a Câmara de Ussing (37). Os compartimentos

normalmente são preenchidos com o tampão de Krebs-Ringer e, para manter o tecido funcional, o tampão é suplementado com nutrientes como glicose, piruvato e glutamato além do fornecimento de equilíbrio gasoso (95%O₂:5%CO₂)(38). Se a viabilidade do tecido for mantida, este experimento é capaz de fornecer informações mais precisas sobre a permeação de candidatos a fármaco através deste tecido além de características de transportadores de influxo ou efluxo e ainda metabolismo da parede intestinal. No experimento de Ungel e colaboradores (39), os pesquisadores estudaram a permeabilidade e influência de características físico-químicas de 19 compostos em diferentes seções do intestino humano. Eles utilizaram a Câmara de Ussing para investigar características de absorção de uma variedade de estruturas em segmentos do jejuno, íleo e cólon humano. Um estudo semelhante foi realizado por Rozehnal e colaboradores (40), porém apenas para fármacos com baixa permeabilidade. Neste trabalho os autores determinaram inclusive a ação da proteína de efluxo glicoproteína P na absorção de fármacos utilizando a Câmara de Ussing com amostras de tecido intestinal humano.

Outro exemplo de experimento *ex vivo* que há na literatura é o procedimento do saco invertido, onde também se pode estudar absorção e metabolismo de parede intestinal de compostos. Nesta metodologia, o intestino do modelo animal é isolado, o lúmen é lavado com um tampão de lavagem e o intestino é invertido com ajuda de um bastão de vidro apropriado. Este “intestino invertido” é preenchido com um tampão oxigenado e segmentos de 2 a 4 cm deste intestino são isolados e submergidos em um meio contendo o composto teste pelo tempo necessário para o experimento. As concentrações de cada molécula são avaliadas no conteúdo interno do saco invertido (31, 41). O modelo também é útil para a avaliação de transportadores e sua maior restrição é quanto ao volume limitado dentro do saco invertido. Desta forma, moléculas de alta permeabilidade podem extrapolar as condições ótimas para o experimento e suas características podem ser subestimadas (31, 42).

Caso haja necessidade de um modelo ainda mais intacto para estudar a absorção e metabolismo de fármacos pela parede intestinal, pode-se fazer um estudo *in situ*. Neste estudo, faz-se a perfusão de fluido contendo um composto através do intestino de um modelo animal ou de um humano. A permeabilidade

efetiva se dá pela diferença de concentração entre o fluxo de entrada e de saída. No estudo de Fagerholm e colaboradores (43), os autores utilizaram a perfusão intestinal para correlacionar a fração absorvida de fármacos pelo jejuno de humanos e ratos. Para isto, ratos Sprage-Dawley foram anestesiados, mantidos aquecidos a 36-37 °C e sua respiração foi assistida por respirador automatizado. Uma incisão na linha medial do animal foi feita e um segmento de 10cm do intestino delgado na região do jejuno foi separada e medida. Em seguida o segmento foi canulado através da inserção de tubos plásticos nas 2 extremidades do segmento separado. O procedimento foi realizado de forma que não houve rompimento do suprimento sanguíneo desta região intestinal. Assim, os pesquisadores, após lavagem do segmento, injetaram os fármacos a 2-3 mL/min pela cânula de entrada durante 100 minutos enquanto coletavam o conteúdo pela cânula de saída na extremidade oposta. O procedimento é interessante pois o fluxo sanguíneo, sistema nervoso e uma boa quantidade de tecido intestinal é mantida. No trabalho utilizado como exemplo, os pesquisadores estabeleceram que a absorção avaliada pela perfusão intestinal de ratos tinha grande correlação com a absorção em humanos.

Contudo, durante o descobrimento e desenvolvimento de fármacos, o uso de modelos animais torna o processo mais caro, demorado e desnecessário num estágio inicial. Neste sentido os modelos *in vitro* com células apresentam um bom custo/benefício no que tange a maior abrangência de mecanismos de absorção.

Visto que culturas primárias de enterócitos não são capazes de formar monocamadas e se diferenciar em polos apical e basolateral em cultura, células imortalizadas são geralmente utilizadas como modelo de células para testes de permeação *in vitro* (31, 44). Um dos modelos de células imortalizadas mais utilizados é o adenocarcinoma de colo retal humano, a Caco-2. Quando estas células são cultivadas em uma placa ou filtro, se diferenciam para formar polos apical e basolateral além de formar junções intercelulares, desta forma pode-se estudar o transporte transcelular através da célula e paracelular, quando o transporte ocorre através das junções intercelulares (Figura 11) (45). Estas culturas são reconhecidas por ter uma variedade considerável de

características funcionais e fisiológicas semelhantes ao enterócitos normais expressando transportadores e enzimas, por exemplo (46). Normalmente, para as Caco-2 formarem a monocamada com a expressão de proteínas de transporte e junções intercelulares é necessário cultivá-las por 21 dias no aparato apropriado. Outro modelo bastante estudado é o de células (MDCK - *Madin-Darby canine kidney*) que tem um tempo de cultivo para atingir a diferenciação, junções intercelulares e expressão de polos celulares de 2 a 5 dias, portanto, muitas vezes o modelo é considerado mais apropriado para alguns estudos devido à velocidade para a realização dos ensaios (47). Contudo, o modelo MDCK é oriundo do túbulo distal de rim canino e sua origem canina faz com que muitos dos seus transportadores não sejam tão semelhantes aos humanos quanto os observados em células Caco-2. Existem adaptações que combinam a característica da facilidade da MDCK e o transportador de interesse para um projeto específico. No estudo de Hill e colaboradores (48), os autores fizeram a transfecção de transportadores de efluxo das famílias ABCB e ABCC para células MDCK para estudar o impacto dos transportadores na absorção e toxicidade de actinomicina D. O modelo foi bem-sucedido, pois os efeitos observados em células MDCK transfectadas foi comprovado em camundongos *knock-out* para estes transportadores.

Desta forma, para um estudo preliminar de absorção, optamos pelo modelo de Caco-2 por considerá-lo mais apropriado, uma vez que retém variabilidade de mecanismos de absorção além de transportadores humanos para avaliar a absorção das TZDs GQ-2, GQ-11, GQ-177 e GQ-19. Este ensaio possui grande correlação com a permeação observada em enterócitos e é um dos métodos mais utilizados e bem estabelecidos com o intuito de avaliar a absorção de novos candidatos a fármacos (14, 35, 49).

A Caco-2 é um modelo bastante utilizado e estudado ao longo dos anos, e a permeabilidade aparente calculada utilizando a Caco-2 possui boa correlação com a permeabilidade aparente calculada utilizando seções de colo retal humano (50). Após o cultivo desta linhagem por aproximadamente 21 dias, há a diferenciação das mesmas em polos e expressão de proteínas de adesão. É possível medir a integridade da monocamada de células Caco-2 utilizando um medidor de resistência elétrica transepitelial (TEER). Quando a

monocamada está formada, a TEER das células Caco-2 é de aproximadamente $234 \Omega\text{cm}^2$, bem maior do que a TEER da parede intestinal, estimada em $25\text{-}40 \Omega\text{cm}^2$. Esta diferença existe pois as Caco-2 expressam junções intercelulares mais justas do que os enterócitos em condições normais. Por este mesmo motivo, o [^{14}C] manitol, um marcador de permeabilidade paracelular, também é utilizado para a caracterização da monocamada em células Caco-2, sua permeabilidade aparente (P_{app}) deve estar em torno de $1,2 \pm 0,5 \times 10^{-7} \text{cm/s}$ com 30 minutos de experimento. Valores de P_{app} para [^{14}C] manitol maiores do que $5 \times 10^{-7} \text{cm/s}$ demonstram que há comprometimento da integridade da monocamada (35, 51). Analogamente, valores de TEER menores do que $165 \Omega\text{cm}^2$ também podem ser considerados como critério de exclusão (51).

A permeabilidade aparente de [^{14}C] manitol através das junções paracelulares das Caco-2 pode ser considerado uma P_{app} baixa, enquanto que P_{app} na faixa de 2 a $6 \times 10^{-6} \text{cm/s}$ pode ser considerada uma P_{app} alta, em que há expectativa de absorção completa do composto (14, 51). A P_{app} (cm/s), quando o experimento de transporte através de monocamada de Caco-2 é realizado em condições ótimas (*sink conditions*), pode ser calculada através da equação:

$$P = \frac{\Delta Q}{\Delta t} \times \frac{1}{AC_0}$$

Onde dQ/dt é o fluxo no estado de equilíbrio (mol/s), A é a área superficial do filtro (cm^2) e C_0 é a concentração inicial no compartimento doador (mol/mL) (51).

Desde o descobrimento da proteína de efluxo glicoproteína P (P-gp) em 1976 (52), a influência de transportadores na farmacocinética de fármacos tem se tornado cada vez mais importante. Tanto proteínas que contribuem para o influxo de moléculas do lúmen intestinal para dentro dos enterócitos e de dentro dos enterócitos para a circulação, até proteínas de efluxo que transportam compostos de dentro dos enterócitos em direção ao lúmen intestinal, tem sido descobertas e vêm impactando o descobrimento e desenvolvimento de fármacos (32). Desta forma a absorção de fármacos pode ser facilitada ou dificultada dependendo da interação da molécula de interesse

com estas proteínas. As maiores famílias de transportadores de influxo são das superfamílias SLC e SLCO (transportadores de soluto) da qual fazem parte as OATPs (polipeptídeo transportador de compostos orgânicos aniônicos) e OCTs (transportadores de cátions orgânicos) (32, 53). E como principal família de transportadores de efluxo existe a MDR (*Multidrug Resistance*), da qual os transportadores ABC (*ATP-Binding Cassette*) fazem parte, a P-gp por exemplo é codificada pela ABCB1 (também conhecida com MDR1). Além da P-gp, pelo menos 11 dos 48 transportadores ABC humanos conhecidos demonstraram ter alguma atividade de resistência à absorção de fármacos (54).

Neste sentido, o fato das Caco-2 expressarem estas proteínas de transporte, torna estas células ferramentas versáteis para a avaliação do potencial de absorção intestinal de um xenobiótico em mamíferos superiores. Contudo, os níveis de alguns transportadores importantes expressos pelas Caco-2 não são tão elevados quanto em enterócitos normais. Por exemplo, os antibióticos de β -lactâmicos como cefalexina e amoxicilina e inibidores da acetilcolinesterase, que são substratos conhecidos de transportadores de dipeptídeos, têm uma permeabilidade baixa através da monocamada de células Caco-2 apesar de serem completamente absorvidos *in vivo* (55).

Neste capítulo estão apresentados os testes para a realização do ensaio em Caco-2, que englobaram a adaptação do método cromatográfico para o veículo PBS, utilizado durante o experimento de transporte; um teste de citotoxicidade pelo ensaio da resazurina, com o intuito de determinar se as concentrações do experimento não causariam dano às células; e o ensaio de transporte em células Caco-2.

2. Materiais e Métodos

2.1. Determinação de GQ-2, GQ-11, GQ-19 e GQ-177 em PBS para estudo de permeação em células Caco-2

Para o experimento de permeação com células Caco-2 exige a quantificação dos analitos em solventes adequados ao teste que, neste caso foi o tampão PBS. Os métodos analíticos desenvolvidos anteriormente descritos (Capítulo 1) foram utilizados para a quantificação das moléculas em PBS e construção de curvas analíticas neste veículo. O método analítico para a

molécula GQ-2 já havia sido desenvolvido em trabalho anterior deste grupo de pesquisa e foi também utilizado para a construção da curva analítica em PBS.

A determinação de GQ-2, GQ-11 e GQ-19 exigiu procedimento prévio de extração líquido-líquido a partir da amostra em PBS com a adição de acetato de etila. O processamento envolveu a adição de 400 µL de acetato de etila a 100 µL das amostras que, após agitação em vórtex por 30 segundos, foi centrifugada por 15 minutos à 15000 rpm (20879 g). O sobrenadante (350 µL) foi separado e evaporado à secura em MiVac por 15 minutos a 40°C. O resíduo foi ressuscitado com 50 µL de acetonitrila e injetado no sistema cromatográfico. O GQ-177 foi injetado no cromatógrafo sem preparação prévia, assim como o benznidazol e anfotericina B, fármacos utilizados como controle positivo e negativo, respectivamente.

2.2.Experimento de citotoxicidade pelo teste da resazurina

A resazurina é um ensaio proposto por Liu (56) para avaliar a citotoxicidade de poluentes. A técnica baseia-se na redução química do corante óxido-redutor resazurina pela desidrogenase bacteriana.

Após a cultura de células Caco-2 atingirem confluência, foram separadas $5,6 \times 10^4$ células por poço de placa de 96 poços em meio de cultura, que foi adicionado de diferentes concentrações das substâncias de interesse. Foram utilizadas as diluições 100, 50, 25, 12,5, 6,25, 3,125, 1,562, 0,078 e 0,039 µg/mL. Após 24 horas de incubação com as substâncias, foi realizada a leitura dos poços em leitor de placas PowerWave Biotek HT no comprimento de onda de 580 nm.

A resazurina (azul) é convertida a resasorfina (rosa) através de sua redução proporcionada pela atividade celular. Desta forma, quando há concentrações tóxicas à Caco-2, ocorre diminuição do número de células e observa-se diminuição da bioconversão da resazurina. O teste foi realizado para determinar as concentrações de fármacos apropriadas para o teste de permeabilidade.

2.3.Experimentos de permeabilidade

Previamente ao estudo de permeabilidade, as células foram lavadas

com tampão de permeabilidade, constituído por tampão Hank's 1x (Gibco) contendo 200 mM de sais de HEPES (Sigma) com pH ajustado para 7,4.

As células foram mantidas neste tampão por 20 minutos a 37°C. A resistência elétrica transepitelial (TEER) foi medida em cada membrana. Foram consideradas aptas para o início do experimento as membranas que apresentaram valor de TEER acima de 200 $\Omega \times \text{cm}^2$.

Os compostos GQ-2, GQ-11, GQ-19, GQ-177, benznidazol e anfotericina B foram solubilizados em tampão de permeabilidade na concentração de 10 $\mu\text{g/mL}$ com no máximo 1% de DMSO. Os experimentos foram iniciados com a adição de 500 μL destas soluções nos compartimentos apicais das placas Transwell[®], sendo que no compartimento basolateral foram adicionados 1,5 mL de tampão de permeabilidade, pH 7,4.

Os fármacos benznidazol e anfotericina B foram utilizados como controles de permeabilidade, positivo e negativo respectivamente. Todas as concentrações, dos compostos e controles foram determinadas em ensaios de citotoxicidade, garantindo a viabilidade na monocamada.

As placas foram mantidas sob agitação em agitador orbital a 37°C (25 rpm). Foram realizadas coletas de 100 μL das amostras a partir do compartimento basolateral aos 15, 30, 60, 90, 120 e 180 minutos. Após cada amostragem, procedeu-se à reposição de 100 μL de tampão de permeabilidade fresco, mantido a 37°C, com a finalidade de manutenção do volume do meio no compartimento.

Em paralelo ao experimento, um controle de degradação foi realizado, adicionando 500 μL das mesmas soluções utilizadas no ensaio em placas de 12 cavidades. Os controles foram mantidos nas mesmas condições de temperatura e agitação das placas testes e foram realizadas coletas nos mesmos intervalos de tempo.

3. Resultados

3.1. Adaptação do método analítico para a determinação das GQ-2, GQ-11, GQ-177, GQ-19, benznidazol e anfotericina B em PBS

Foi construída uma curva de calibração para a determinação da concentração de cada uma das substâncias que seriam submetidas ao ensaio de permeabilidade em células Caco-2, a saber: GQ-2, GQ-11, GQ-177, GQ-19,

benznidazol e anfotericina B, os dois últimos referentes aos controles positivo e negativo respectivamente. O resultado de cada curva e parâmetros pertinentes estão demonstrados na Tabela 5.

Tabela 5 -Métodos analíticos para a determinação das substâncias de interesse em PBS para o ensaio de permeação em células Caco-2 (n=3).

Molécula	Intervalo (µg/mL)	Precisão média (%)	Exatidão média (%)	Equação	R ²
GQ-2	10 - 0,31	6,30	99,67	$y = 158351,10x - 1019,51$	1,000
GQ-11	10 - 0,31	16,14	100,08	$y = 4642,18x - 418,86$	0,998
GQ-177	10 - 0,08	7,58	108,82	$y = 5692,97x - 39,37$	0,999
GQ-19	10 - 0,08	10,91	100,38	$y = 6151,84x + 10,83$	0,999
Benznidazol	10 - 0,08	5,73	101,57	$y = 3285,17x - 44,63$	1,000
Anfotericina B	10 - 0,31	25,53	85,77	$y = 5380,38x - 2056,49$	0,997

Precisão e exatidão médias calculadas como a média do parâmetro entre todos os pontos da curva no intervalo mencionado.

Cada molécula gerou uma curva cuja equação foi utilizada na quantificação das amostras oriundas do teste de permeabilidade. Um ensaio de precisão e exatidão (n=3) foi realizado nas amostras que originaram as curvas presentes na Tabela 5.

3.2.Citotoxicidade pelo teste da Resazurina

A citotoxicidade das substâncias de interesse foi avaliada através do teste da resazurina. A disposição e o resultado do experimento, estão descritos na Tabela 6.

Tabela 6 - Concentrações utilizadas no teste da resazurina e resultado do teste da resazurina em % de inibição

Composto	Concentração (µg/mL)							
	0,391	0,781	1,563	3,125	12,500	25,000	50,000	100,000
% Inibição								
GQ-2	0	0	0	0	0	8	28	28
GQ-11	0	0	0	0	0	4	26	38
GQ-19	0	0	0	0	0	2	58	75
GQ-177	0	0	0	0	0	2	27	36
Benznidazol	0	0	0	0	0	0	29	36
Anfotericina B	0	0	0	0	16	48	98	100
Controle	0	3	2	0	2	9	30	39

Pode-se observar que a abaixo da concentração de 12,5 µg/mL não há mais indícios de toxicidade das substâncias teste. Conclui-se que a

concentração adequada para o teste, ou seja, que não causará dano à monocamada de células Caco-2, deve ser inferior a 12,5 µg/mL.

3.3. Solubilidade dos candidatos a fármaco em solventes necessários ao teste de permeabilidade

Devido aos variados Log P que foram obtidos para as moléculas, foram avaliadas as solubilidades das substâncias de interesse para o teste de permeabilidade em DMSO e posteriormente em PBS. Na Tabela 7 estão demonstrados os valores de solubilidade máxima para cada substância e a porcentagem de DMSO utilizada em cada solução.

Tabela 7 - Solubilidade a partir de DMSO em PBS

Substância	Solubilidade em PBS (µg/mL)	Solubilidade em DMSO
GQ2	12,5	5% (2,5mg/mL)
GQ11	10	1% (1mg/mL)
GQ19	50	5% (1mg/mL)
GQ177	25	0,5% (5mg/ml)
LYSO-7	50	5% (1mg/mL)
Benznidazol	500	5% (10mg/mL)
Anfotericina B	250	5% (5mg/mL)

Pode-se observar que a molécula com menor solubilidade é a GQ-2, com apenas 12,5 µg/mL com auxílio de 5% de DMSO. É importante manter a concentração de DMSO abaixo de 5% para evitar alterações potenciais do veículo sobre as células (57). Para padronizar o teste, foram utilizadas soluções de 1 mg/mL de cada padrão em DMSO para produzir concentrações de 10 µg/mL de cada substância em PBS ou seja, 1% DMSO, dentro da faixa de solubilidade de todas as substâncias e abaixo de concentrações tóxicas, como determinado pelo experimento da resazurina.

3.4. Teste de permeação em Caco-2

Os testes foram realizados de acordo com protocolo descrito no item 2.3 deste Capítulo. E os resultados foram resumidos na Figura 12.

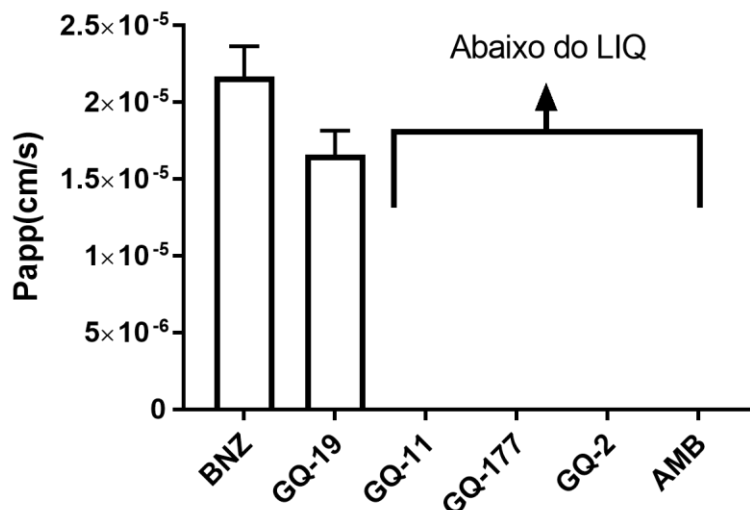


Figura 12 – Resultados de permeabilidade aparente obtidos em monocamadas de células Caco-2. LIQ: Limite Inferior de Quantificação

Controle Positivo - benznidazol

Através dos resultados do controle positivo, foi possível calcular a permeabilidade aparente para o benznidazol e este valor foi de $2,16 \times 10^{-5}$ ($\pm 1,95 \times 10^{-6}$) cm/s. Os resultados obtidos nos permitiu inferir que a monocamada apresentou integridade, tendo em vista que as concentrações de BNZ foram gradativamente crescentes a partir do compartimento basolateral, indicando a viabilidade do método para os ensaios propostos. O BNZ comportou-se como controle positivo para o modelo de monocamadas.

Controle negativo - AMB

Não foram observadas concentrações quantificáveis em nenhum dos tempos como pode ser observado na Figura 12. Tais resultados reforçam a integridade da monocamada e que a AMB comportou-se de fato como controle negativo.

Teste de permeabilidade em Caco-2 - GQ-2

Todas as áreas estavam abaixo do limite de quantificação para a GQ-2, como pôde ser visualizado na Figura 12. Desta forma não foi possível calcular a concentração da molécula em nenhum momento do experimento, por isso a não foi possível calcular a Papp da GQ-2, como demonstrado na Figura 12.

Estes resultados indicam que a molécula GQ-2 não é capaz de permear a monocamada de células e, portanto, a expectativa de absorção oral é baixa.

Teste de permeabilidade em Caco-2 - GQ-11

As áreas encontradas para GQ-11 também foram abaixo do limite de quantificação do método analítico utilizado (Figura 12), portanto não foi possível determinar concentrações de GQ-11 no compartimento basolateral do experimento. Estes resultados indicam que a molécula GQ-11 não é capaz de permear a monocamada de células e, portanto, a expectativa de absorção oral é baixa.

Teste de permeabilidade em Caco-2 - GQ-177

Assim como as moléculas anteriores, a GQ-177 não apresentou áreas mensuráveis através do método analítico desenvolvido (Figura 12). Estes resultados indicam que a molécula GQ-177 não é capaz de permear a monocamada de células e, portanto, a expectativa de absorção oral é baixa.

Teste de permeabilidade em Caco-2 - GQ-19

Apenas a molécula GQ-19 apresentou áreas quantificáveis no compartimento basolateral do experimento de transporte através da monocamada de células Caco-2. Portanto foi a única molécula experimental capaz de permear a monocamada. Através das concentrações encontradas foi possível calcular a permeabilidade aparente para a GQ-19, $1,66 \times 10^{-5}$ ($\pm 1,54 \times 10^{-6}$). Neste caso, há expectativa de absorção oral total(14).

4. Conclusão

Este *screening* demonstrou que apenas a GQ-19 possui expectativa de absorção *in vivo*, embora demonstre instabilidade bastante acentuada durante o teste, conforme observado nos resultados obtidos e descritos no Capítulo 1, em que a GQ-19 foi instável em pH 7,4. Contudo, apesar do alto percentual de degradação no veículo utilizado no ensaio, foi possível observar permeação da molécula através da monocamada de Caco-2.

Pôde ser observada a elevada Papp da GQ-19 e do benznidazol durante este experimento, ambos em ordem de 10^{-5} cm/s, considerada alta e é prevista

absorção completa para estes compostos *in vivo* baseado neste experimento. No caso do benznidazol, o controle positivo, observamos que há correlação entre o ensaio da Caco-2 e sua absorção *in vivo*, próximo de 100% em coelhos albinos (58). Contudo devido à instabilidade da GQ-19, como já citado, é possível que um fator além da solubilidade e permeabilidade seja importante para a previsão da absorção desta molécula, no caso, sua estabilidade química.

Os outros compostos, GQ-2, GQ-11 e GQ-177 não apresentaram concentrações quantificáveis no compartimento receptor para que fosse possível realizar o cálculo de sua Papp. Contudo, visto que existem diversos elementos na literatura que apontam para a atividade destes compostos pela via oral, como exposto na seção introdutória sobre estas moléculas, é possível que um transportador ativo participe da absorção destes compostos *in vivo*. Sabe-se que as Caco-2 não expressam transportadores de influxo e efluxo na mesma proporção que enterócitos *in vivo* (35, 55) e, no caso de envolvimento destes transportadores no processo de absorção, o resultado de Papp pode não refletir o fenômeno *in vivo* de maneira satisfatória. Desta forma, a Caco-2 realizada aqui pode ter resultado num falso negativo para estas moléculas devido à estas características.

Ainda, é possível que haja resistência à absorção das GQ-2, GQ-11 e GQ-177 através de transportadores de efluxo. Diversos estudos já foram realizados com Caco-2 explorando, por exemplo, a sua atividade de P-gp, que apesar de não apresentar níveis de expressão tão acentuados como enterócitos normais, é expressa em níveis consideráveis (59, 60).

Há a possibilidade de metabolismo ocorrer em células Caco-2, este modelo também expressa enzimas do complexo CYP450, esterases, hidrolases e algumas enzimas de fase 2 como a glutationa-S-transferase(29, 31). Contudo, a principal enzima responsável por metabolismo de xenobióticos, a CYP3A4 é sub-expressa nas Caco-2, e modelos com indução da enzima ou clones especializados da linhagem são utilizados quando há interesse de se estudar o metabolismo de parede intestinal *in vitro* (61, 62).

Assim, no Capítulo 3 será avaliada a biodisponibilidade oral dos compostos GQ-2, GQ-11, GQ-19 e GQ-177 *in vivo* num sistema de *screening* farmacocinético.

CAPÍTULO 3 – SCREENING IN VIVO

1. Introdução

A pesquisa em descoberta e desenvolvimento de novos fármacos é um processo complexo que precisa dirigir seus esforços para a finalidade de atender o paciente da maneira mais eficiente possível. Neste sentido, quando se avalia compostos, além do composto oferecer o desafio de ser ativo o suficiente, sinteticamente viável e com toxicidade tolerável, é necessário pensar que o paciente a ser tratado precisa estar confortável com o tratamento e receber o medicamento de forma segura. Neste sentido, planejar os compostos líderes para que sejam adequados para a administração oral é a melhor estratégia(31). No estudo de Liu e colaboradores (63), uma pesquisa sobre a preferência de pacientes com câncer sobre o tipo de tratamento, pela via oral ou intravenosa, dos 103 pacientes questionados, apenas 10 preferiam a via intravenosa.

Contudo, o planejamento de fármacos para a administração pela via oral não é simples. Existem muitos fatores que afetam a biodisponibilidade oral de fármacos, em geral, sua solubilidade em fluidos gastrointestinais, sua permeabilidade a membranas celulares e metabolismo pré-sistêmico (64). Estudando estas variáveis que influenciam a absorção de fármacos pela via enteral, Amidon e colaboradores (65) idealizaram a classificação biofarmacêutica, em que fármacos poderiam ser categorizados de acordo com suas características de permeabilidade e solubilidade. Na categoria 1 estão inseridos os compostos de alta solubilidade e alta permeabilidade, categoria 2 – baixa solubilidade alta permeabilidade, categoria 3 – alta solubilidade, baixa permeabilidade e categoria 4 – baixa solubilidade e baixa permeabilidade. Dependendo da categoria, são esperadas características de absorção diferentes para estes fármacos. A classificação biofarmacêutica ainda é bastante utilizada, apesar de diversas considerações e limitações terem sido apontadas para esta classificação nos últimos anos (66, 67). A utilização do conceito de absorção durante a descoberta de novos fármacos, trazida em grande parte pelo uso da classificação biofarmacêutica, é um importante meio de evitar que candidatos a fármaco falhem por este motivo num momento avançado de sua pesquisa pré-clínica(68).

Desde que a avaliação sistemática de absorção oral foi inserida ao fluxo de trabalho das indústrias farmacêuticas, esta prática foi associada a diversos processos que a indústria aplica a novos candidatos a fármaco para entender características que tornarão a molécula viável no futuro, o processo ficou caracterizado como “*pharmaceutical profiling*” (69). Mais do que uma ferramenta de crivo, em que moléculas com características favoráveis seriam levadas adiante no desenvolvimento, o *pharmaceutical profiling* auxilia no direcionamento da otimização das estruturas com características desfavoráveis para que haja mais candidatos promissores sendo estudados. O *pharmaceutical profiling* consiste na avaliação de características físico-químicas e fisiológicas das moléculas em estágio precoce do desenvolvimento, desde a absorção através de métodos para a avaliação de solubilidade, permeabilidade e pka, até métodos para avaliação de segurança, como a inibição de CYP3A4. O que há de comum entre os diversos parâmetros avaliados é que eles são aplicados num estágio precoce do desenvolvimento, em que há um grande número de compostos para avaliar e geralmente baixa disponibilidade de material sintetizado (29, 69).

Assim, através dos anos, foram desenvolvidos métodos de alto rendimento ou *High throughput screening* (HTS) que lidam com a alta quantidade de compostos aumentando a velocidade de cada processo, utilizando placas de 96 ou até 384 poços para realizar a maior quantidade de ensaios por vez. Para se adequar à pequena quantidade de material no início do desenvolvimento, desenvolveu-se tecnologia ao longo dos anos com capacidade de avaliar quantidades cada vez menores de uma molécula numa amostra. Como exemplo podemos citar o método HTS de inibição do transportador OAPT1B1 por Wagner e colaboradores (70). Eles desenvolveram um método que utiliza o marcador pitavastatina como substrato do transportador OAPT1B1 e um sistema de extração de fase sólida “on-line” acoplado a um espectrômetro de massas, num arranjo SPE-MS-MS. O método foi capaz de fazer as medições em 10,4 segundos por amostra com um limite inferior de detecção de 10 pM, e que foi considerado de suficiente para a finalidade proposta pelos pesquisadores. Este sistema poderia ser utilizado por uma indústria farmacêutica durante o *pharmaceutical profiling* para investigar o

risco de interações medicamentosas por inibição de transportador de forma precoce no desenvolvimento de um novo fármaco, antes que este problema seja identificado num estudo clínico e o desenvolvimento do produto descontinuado.

Desta forma, a existência de métodos de alto rendimento para a caracterização físico-química e fisiológica permitiu que a indústria acelerasse o processo de seleção de novos candidatos a fármacos com o conhecimento de características impactantes na farmacocinética destas moléculas. Contudo todos os métodos *in vitro*, por mais que tenham sido desenvolvidos para mimetizar condições *in vivo* da maneira mais confiável possível tem suas limitações, por exemplo, mesmo modelos de células que expressam transportadores e junções intercelulares como a Caco-2 ou MDCK apresentam suas limitações de seu uso quanto ao transportador P-gp, que está altamente ligado às características disposicionais de fármacos *in vivo* (71). Devido a estas diferenças nos transportadores expressados por estas linhagens celulares, há estudos em que se faz a expressão de transportadores com características mais próximas das fisiológicas para estas células para, assim, obter um resultado confiável quanto à determinada característica de transporte transmembrana (72). Modelos celulares que seriam mais confiáveis do que métodos em membrana sintética podem em breve dar espaço a modelos de organoides e culturas 3D ainda mais semelhantes a um tecido propriamente dito. Eglén e Randle(73) discutem a viabilidade da utilização destes modelos celulares mais complexos em modo HTS no descobrimento de fármacos, visto que seriam modelos ainda mais confiáveis do que as células para mimetizar condições fisiológicas.

Assim, além da utilização de modelos *in vitro* para a predição e quantificação de características do candidato a fármaco quanto a absorção oral, faz-se necessária utilização de modelos animais ainda durante a descoberta e desenvolvimento de fármacos pois, apesar de diversos modelos preditivos *in vitro*, nenhum mimetiza completamente um modelo animal mamífero, o mais adequado para a avaliação do paciente final, o ser humano. Kerns (69) relaciona, entre os métodos utilizados durante o *pharmaceutical profiling* na indústria, um método de *screening* farmacocinético no mesmo

estágio de desenvolvimento que os demais métodos *in vitro* de absorção, metabolismo e segurança. Liu e colaboradores (10) no trabalho que descreve um método de *screening* farmacocinético, a *Snapshot PK*, cita em sua introdução que trazer o modelo *in vivo* para a fase de descoberta de fármacos daria para o time responsável pelo desenvolvimento uma avaliação da realidade, logo nos primeiros passos do processo, que traria maior compreensão de como os químicos medicinais deveriam guiar sua otimização estrutural e como os farmacologistas deveriam interpretar suas avaliações farmacodinâmicas.

Os métodos de *screening* farmacocinético se fazem necessários, pois o estudo convencional de farmacocinética é demorado, necessita da avaliação em diferentes modelos animais, utiliza uma quantidade elevada de animais, e muitas vezes apresenta problemas éticos, principalmente quando o modelo se trata de cão ou macaco (10, 74). Um dos modelos mais antigos e de maior rendimento é o *cassette dosing* (75).

Na *cassette dosing* (CD) mais de um composto (normalmente de 5 a 10) são administrados simultaneamente em um animal, pela via oral ou intravenosa, a técnica também é conhecida como “N-in-One”, onde N compostos são administrados em um animal (74-76). Este recurso foi viabilizado em decorrência dos avanços da técnica de espectrometria de massas, que permite a detecção de diversas moléculas numa amostra com menos recursos, principalmente de tempo. Mesmo fármacos que co-eluem durante a corrida cromatográfica podem ser monitorados por espectrometria de massas dependendo da diferença de massas entre eles e perfil de ionização (74, 75, 77, 78). Com a possibilidade de detecção de diversos fármacos conhecidos numa amostra biológica foi possível que com a administração de um “coquetel” de candidatos a fármacos a um único animal e um único processamento de amostras, adquira-se dados para diversos compostos, aumentando em muito a velocidade de determinação de parâmetros farmacocinéticos durante o descobrimento de novas moléculas. Um protocolo convencional de CD utiliza 3 animais por “coquetel”, que podem ser administrados tanto pela via intravenosa como pela via oral dependendo do objetivo do *screening*.

Berman e colaboradores (75) foram os responsáveis pela proposição do método de *cassette dosing*. Neste trabalho publicaram o uso de apenas 5 fármacos por animal com resultados de farmacocinética comparáveis aos fármacos administrados individualmente. O método foi utilizado por Olah e colaboradores (79) para avaliar 12 fármacos administrados a um cão com resultados satisfatórios, embora considerações tenham sido feitas quanto ao método analítico a ser empregado para obter resultados confiáveis. Em trabalho mais recente, Nagilla e colaboradores (76) avaliaram 116 compostos e compararam o clearance, volume de distribuição, meia vida de eliminação, tempo de residência média e biodisponibilidade oral da administração destes compostos administrados individualmente ou em “coquetel” de 5 compostos por animal. Os parâmetros farmacocinéticos avaliados apresentavam pelo menos 70% de semelhança entre os parâmetros calculados individualmente e os avaliados em associação com os demais compostos utilizando a CD. Contudo, como se pode concluir pela descrição da técnica, existem limitações, principalmente devido à possibilidade de ocorrência de interações dos compostos que podem surgir quando um dos compostos do “coquetel” é inibidor ou indutor de algum processo metabólico que afete os demais compostos. Assim, no CD *screening*, podem ocorrer falsos positivos, em que aparentemente os compostos apresentam características favoráveis, mas na realidade estas características são resultantes da interação de compostos administrados simultaneamente (80).

Manitpisitkul e White (80) pesquisaram entre 25 indústrias farmacêuticas internacionais se elas estariam usando a CD em sua rotina. Das 25 indústrias que responderam à pesquisa, 22 (88%) tinham tentado utilizar a técnica em algum momento, mas apenas 12 (48%) continuavam utilizando até o momento em que o artigo foi publicado. Das empresas que continuaram usando a CD, o protocolo mais popular foi a utilização de apenas 5 fármacos por dosagem, menor número do que se poderia utilizar com a técnica, porém foi onde as indústrias julgaram que poderiam explorar melhor o risco/benefício da técnica. Estas indústrias alegam que os resultados de parâmetros farmacocinéticos obtiveram confiabilidade de 80% embora não especificassem o conceito de confiabilidade em suas respostas. As indústrias que deixaram de utilizar a CD

apontam como o principal motivo da desistência a obtenção de dados a baixa confiabilidade. Outro motivo apontado foi o tempo despendido para o desenvolvimento de métodos analíticos para a determinação das concentrações dos diversos fármacos em uma amostra. Desta forma, apesar dos benefícios evidentes do uso da CD para o *screening* de fármacos, a técnica apresenta problemas claros que devem ser levados em consideração ao implementar o procedimento.

A CD surgiu numa época em que o aumento do rendimento dos estudos de farmacocinética era realizado por *cassette analysis* (CA). Num experimento utilizando a CA, não há mistura de compostos antes da administração aos animais, portanto evitam-se os problemas de interações. No método CA, um grupo de candidatos a fármaco são administrados individualmente a um grupo de animais com tempo de coletas idênticos e, então, as amostras de plasma de tempos e volumes iguais são misturadas para reduzir o tempo de análise. Assim, um número inicial de 600 amostras, analisadas por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas (LC-MS), se tornam 60 amostras, e a execução analítica passa de dias para horas, com maior rapidez na obtenção de resultados (81). Num protocolo convencional de CA, compostos são administrados a grupos de 3 animais e as amostras de mesmo tempo misturadas (82). O método também depende da qualidade do método analítico, característica altamente favorecida com a evolução da cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas. Ressalte-se que além de determinar concentrações de diversos compostos numa única corrida cromatográfica ainda há o fator diluição, pois as amostras coletadas dos animais são diluídas com amostras de outros animais e, portanto, os limites de detecção do método são fatores limitantes para o sucesso da técnica. Outros métodos de *screening* que não utilizavam animais também adotaram a CA para a redução do número de análises e acelerar a obtenção de resultados (83).

Em 2000, Cox e colaboradores (84) propuseram um método de ranqueamento de compostos num sistema de *screening* em relação à suas áreas sob a curva (ASC). O procedimento envolveu a administração de um composto a 2 animais e coletas em intervalos de uma hora por seis horas. Ao final das coletas, as amostras colhidas foram misturadas, em volumes iguais,

para gerar 1 amostra por animal por molécula. Desta forma, o método analítico é bastante simplificado, sem a necessidade de determinação de diversos compostos, e a amostra não é diluída, como ocorre no CD screening, o que é vantajoso em termos de limite de quantificação do método. Depois, com uma análise simples de ASC, pode ser feito o ranqueamento de diversos compostos com base nesta medida. O método, apesar de simplificar e agilizar muito o screening farmacocinético, perde características importantes para a tomada de decisão de um time de desenvolvimento, pois não há descrição do perfil de concentração plasmática por tempo e, assim, não é um método que permite a determinação de parâmetros farmacocinéticos.

Em 2001, Korfmacher e colaboradores(7), adotando parte dos benefícios das últimas técnicas desenvolveram um método de *screening* com um rendimento menor, mas que conservava características importantes da farmacocinética. Ainda, neste trabalho os autores propõem um modelo organizacional onde 6 fármacos poderiam ser analisados numa placa de 96 poços juntamente com suas curvas padrão, este modelo está representado pela Figura 13.

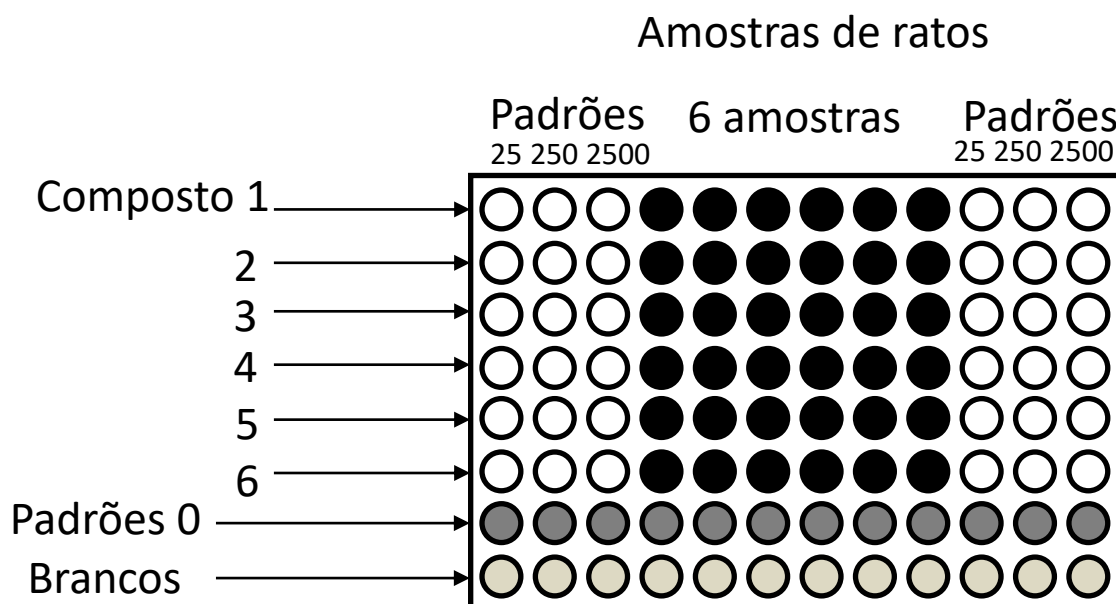


Figura 13—Placa padrão do modelo CARRS adaptado de Korfmacher et al (7)

A técnica consiste na administração de um composto para 2 animais com 6 tempos de coleta ao longo de 6 horas, a saber: 0,5, 1, 2, 3, 4 e 6 horas. As amostras para o mesmo composto em tempos iguais são misturadas para

gerar apenas 6 amostras por fármaco e organizadas de acordo com a Figura 13. Neste trabalho os autores afirmam que é possível para um grupo pequeno de analistas realizar o *screening* farmacocinético de 36 candidatos a fármaco por semana, com métodos analíticos simples e com boa confiabilidade nos parâmetros farmacocinéticos que não estão sujeitos a interações. Utilizando este método, pesquisadores da Schering-Plough realizaram o *screening* de 1600 moléculas durante o ano 2000. Em 2006, a mesma empresa avaliou o desempenho do CARRS em sua rotina após a análise de 5289 moléculas. Durante o período, avaliaram que este método de farmacocinética com coletas de até 6 horas muitas vezes não era representativo da farmacocinética completa dos fármacos, sendo considerado um método de farmacocinética truncado. Assim, os pesquisadores desenvolveram métodos para analisar e filtrar moléculas cujos valores calculados através deste *screening* eram confiáveis(85).

Outra desvantagem do CARRS é a desconsideração da variabilidade inter-animal, uma vez que as amostras de mesmo tempo de animais diferentes são misturadas. Liu e colaboradores (10) desenvolveram a Snapshot PK que abrevia ainda mais o tempo de coleta e número de amostras para aumentar ainda mais o rendimento do *screening* farmacocinético. Na Snapshot PK também são utilizados 2 animais por composto, porém o tempo de coleta é de 5 horas, e o número de coletas é de apenas 4. As amostras de mesmo tempo dos 2 animais serão misturadas para obter apenas 4 amostras por composto. O ganho que a técnica traz é a possibilidade de utilização de camundongos para o *screening* farmacocinético, principalmente devido ao número reduzido de coletas, apenas 4, e a capacidade do sistema apresentado em seu trabalho de, com apenas 50 µL de amostra, realizar a análise por LC-MS. Esta vantagem é considerável visto que os modelos para atividade farmacológica normalmente são camundongos. Arns e colaboradores (86) utilizaram o método Snapshot PK para avaliar candidatos a pró-fármacos derivados do ácido difluorosiálico. Os derivados deste ácido têm potente ação inibitória à neuraminidase viral de algumas variações do vírus influenza, contudo os derivados existentes não apresentavam boa biodisponibilidade pela via oral, e neste trabalho, novos candidatos foram sintetizados e avaliados pelo método Snapshot PK. A

avaliação *in vivo* deste trabalho tornou-se necessária pois a avaliação preliminar dos primeiros derivados apontou uma baixa *correlação in vitro/in vivo* utilizando os modelos para a avaliação de biodisponibilidade pré-existentes. Os fármacos bem-sucedidos durante a Snapshot PK tiveram sua farmacocinética completa avaliada e houve boa correlação entre o sucesso na Snapshot PK e na farmacocinética completa. Desta forma os pesquisadores foram capazes de selecionar dois candidatos com três vezes maior biodisponibilidade que os compostos parentais.

De forma análoga ao estudo de Arns e colaboradores (86), optamos por realizar o *screening* farmacocinético das TZDs GQ-2, GQ-11, GQ-19 e GQ-177, contudo, utilizando um sistema semelhante ao CARRS, utilizando tempo intermediário de análise (6 horas), reduzido número de animais e evitando possíveis interações farmacocinéticas ou limitações no método analítico. O número de coletas é adequado para ratos Wistar e direcionou a seleção do modelo animal.

Para este trabalho, os métodos bioanalíticos foram desenvolvidos de acordo com as legislações brasileiras (RDC 27/2012 e RE 899/2003), uma vez que também seriam utilizados para uma eventual farmacocinética completa para os compostos que passassem pelo *screening*. Ainda, foi preferível não misturar o sangue dos animais por tempo pois, devido ao limitado número de compostos, não havia necessidade.

Apesar de não apresentarem características favoráveis à biodisponibilidade nos *screenings* anteriores, foi realizado o *screening in vivo* das GQ-11, GQ-177 em GQ-19. Sabe-se que o modelo animal é mais complexo do que os modelos utilizados nos ensaios *in vitro*, assim, há de se confirmar se não haverá de fato absorção neste modelo.

Assim, no Capítulo 3 está apresentado o *screening in vivo* baseado no método CARRS dos compostos GQ-11, GQ-19 e GQ-177, assim como os métodos bioanalíticos desenvolvidos e validados para a determinação dos analitos nas amostras biológicas. Há de se ressaltar que a GQ-2 já teve sua farmacocinética completa pelas vias oral, intravenosa e intraperitoneal avaliada anteriormente em Vieira e colaboradores (19). Seu resultado aponta para a

ausência de concentrações quantificáveis do composto na circulação dos animais após de administração oral do mesmo.

2. Materiais e Métodos

2.1. Métodos bioanalíticos para a determinação da GQ-11, GQ-177 e GQ-19 em plasma

Validação do método bioanalítico

Após o desenvolvimento do método bioanalítico, o mesmo foi validado segundo as normas da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), de acordo com a resolução RE- nº899, de 29 de maio de 2003 e RDC 27 de 17 de maio de 2012. Os parâmetros fundamentais determinados foram: limite de quantificação (LQ), precisão e exatidão intra e interensaios, seletividade e estabilidade.

Os métodos foram desenvolvidos em UPLC (R) Waters H-Class. A coluna com a melhor performance para as substâncias foi a HSS SB C18 1,8 μ m, 2,1x50mm com coluna guarda HSS C18 1,7 μ m, 2,1x5mm.

Processamento das amostras de GQ11 em plasma de ratos Wistar

A 50 μ L de plasma branco adicionada de GQ-11 foram adicionados 50 μ L de acetonitrila para desproteínização da amostra biológica com padrão interno (benzonidazol, 100 μ g/mL). A mistura foi agitada em vórtex por 20 segundos e em seguida centrifugada a 15000 rpm (20879 g) por 10 minutos, o sobrenadante foi filtrado em filtro PTFE (politetrafluoroetileno) com poro de 0,22 μ m e 2 μ L foram injetados no cromatógrafo.

Processamento das amostras de GQ177 em plasma de ratos Wistar

À 100 μ L de plasma branco adicionada de GQ-177 foram adicionados 100 μ L de padrão interno (diazepam 10 μ g/mL) em acetonitrila, a mistura foi vortexada por 20 segundos. Após a homogeneização da amostra, foram adicionados 600 μ L de acetato de etila e procedeu-se agitação por vórtex das amostras por mais 30 segundos, em seguida a mistura foi centrifugada a 15000 rpm por 10 minutos, 600 μ L do sobrenadante foram separados e inseridos no evaporador MiVac por 20 minutos à 30°C até a secura. O conteúdo foi

ressuspendido em 100 μ L de acetonitrila, filtrado em membrana PTFE e 2 μ L foram injetados no cromatógrafo.

Processamento das amostras de GQ19 em plasma de ratos Wistar

A extração do GQ-19 foi realizada a partir de 100 μ L de plasma adicionado de GQ-19. Adicionou-se 20 μ L de padrão interno (diazepam 10 μ g/ml) e 20 μ L de TCA 20% para a desproteínização. A mistura foi agitada em vórtex, acrescentada de 500 μ L de acetato de etila e agitada novamente por 30 segundos. Para a separação das fases, a mistura foi centrifugada por 10 minutos a 15000 rpm, o sobrenadante foi levado a secura em MiVac por 20 minutos a 30°C e 1 μ L foi injetado no cromatógrafo.

2.2. Screening Farmacocinético das GQ-2, GQ-11, GQ-177 e GQ-19

Modelo animal

Foram utilizados ratos Wistar machos, com peso aproximado de 250g, provenientes do biotério central de Botucatu da Universidade Estadual Paulista – Unesp. Os animais foram transferidos para o biotério do Departamento de Princípios Ativos Naturais e Toxicologia da Faculdade de Farmácia Bioquímica da Unesp de Araraquara, e 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.

Protocolo experimental para o screening farmacocinético dos candidatos à fármaco por *Cassette accelerated rapid rat screen (CARRS)*

O *screening* dos candidatos à fármaco envolve a administração por via oral à dois ratos por molécula. Para a coleta de sangue, através de procedimento cirúrgico, são implantadas cânulas na artéria femoral. A coleta de sangue foi realizada no período de 6 horas, nos tempos 0,25; 0,5, 1, 3, 4 e 6 h após administração de cada substância. As amostras de sangue foram processadas de acordo com o método bioanalítico desenvolvido para cada molécula (7, 10).

O protocolo foi realizado através da administração da dose de 10mg/kg de cada molécula em suspensão de carboximetilcelulose a 2% em água, e

administrados via gavagem a ratos Wistar em jejum de 12 horas. A dose foi padrão como recomendado por Korfmacher e colaboradores (7). O procedimento foi aprovado pelo comitê de ética da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Protocolo CEUA/FCF/CAr nº 32/2015.

3. Resultados

3.1. Métodos Bioanalíticos

Curva bioanalítica GQ-11

Na Tabela 8 estão apresentados os resultados da curva de calibração bioanalítica para GQ-11.

Tabela 8 - Curva bioanalítica GQ-11, valores com precisão, exatidão e regressão linear.

Concentrações (µg/mL)	Relação (Área/PI)	Precisão (%)	Exatidão (%)
10	6,67	0,98	104,33
5	3,23	1,32	100,69
2,5	1,56	2,92	96,99
1,25	0,81	4,46	100,13
0,62	0,42	7,96	101,49
0,31	0,23	3,97	108,79
0,16	0,12	10,98	101,54
0,08	0,06	4,96	100,25
r^2		0,9995	
equação	$Y=0,663x-0,012$		

Os resultados obtidos apresentam precisão e exatidão dentro dos limites aceitáveis para método bioanalítico e a curva foi considerada adequada para a quantificação de GQ-11 em amostras de plasma.

Curva bioanalítica GQ-177

Na Tabela 9 estão apresentados os resultados da curva de calibração bioanalítica para GQ-177.

Tabela 9 - Curva bioanalítica GQ-11, valores com precisão e exatidão

Concentrações (µg/mL)	Relação (Área/Pi)	Precisão (%)	Exatidão (%)
10	5,64	4,80	100,57
5	2,72	5,39	96,85
2,5	1,44	4,28	102,50
1,25	0,73	1,26	103,65
0,62	0,35	4,17	101,07
0,31	0,17	3,77	98,62
0,16	0,09	3,89	99,01
0,08	0,039	3,75	89,34
r^2		0,9996	
equação	$Y=0,56130x - 0,00022$		

A curva em plasma de GQ-177 também foi construída com êxito, apresentando coeficiente de correlação acima de 0,99 e exatidão em todas as réplicas que compuseram a curva. A curva foi considerada dentro dos critérios para a quantificação das concentrações de GQ-177 em plasma de ratos até o limite de quantificação de 0,078 µg/mL.

Curva analítica de GQ-19 em Plasma

Não foi possível a construção de uma curva bioanalítica para a GQ-19 devido à instabilidade da molécula nesta matriz. Um experimento para avaliar a instabilidade da GQ-19 em plasma foi realizado, fazendo extrações nos tempos 0, 5, 10, 15 e 20 minutos após a adição de GQ-19 ao plasma branco. O procedimento de extração foi citado anteriormente no item 1 deste capítulo. O resultado deste experimento está demonstrado na Figura 14.

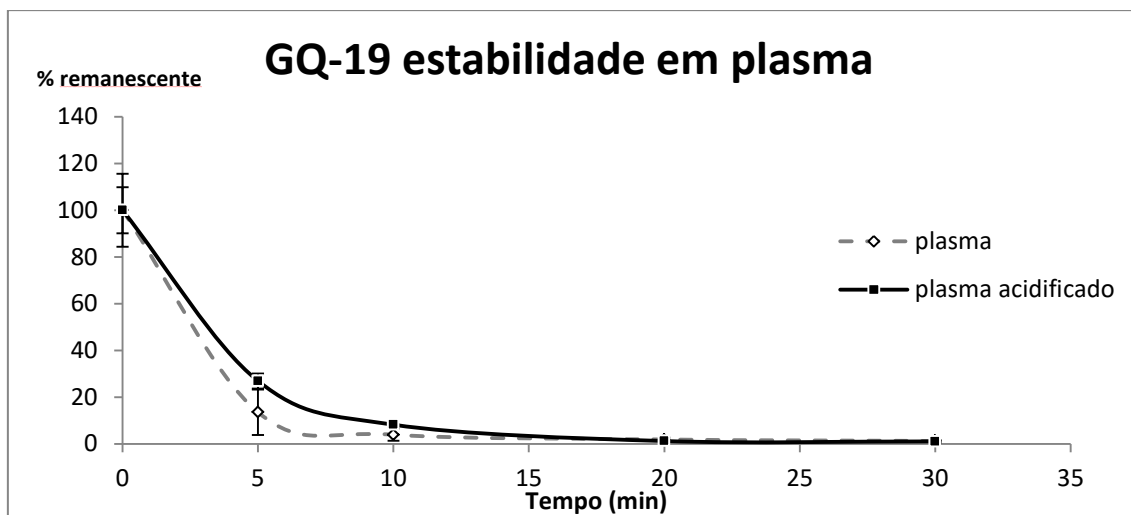


Figura 14 -Estabilidade de GQ-19 em plasma normal e acidificado

Conforme pode ser observado, há decaimento expressivo das concentrações de GQ-19 nos primeiros minutos após adição ao plasma, e aos 30 minutos atingiu concentrações não quantificáveis. Observa-se também que a acidificação do plasma leva a uma tendência à estabilidade da molécula, porém, não o suficiente para que se possam realizar os experimentos de validação do método bioanalítico para sua quantificação em plasma. Estes resultados sugerem a ação de enzimas plasmáticas sobre a molécula, com indicativo de CI elevado.

Validação dos GQ 11 e GQ 177

As curvas bioanalíticas de GQ-11 e GQ-177 possibilitaram a validação do método bioanalítico para a quantificação destas substâncias em plasma de ratos Wistar. Assim, procedeu-se a validação conforme legislação vigente. Os resultados de precisão e exatidão intra e interensaios estão expostos na Tabela 10.

Tabela 10 - Precisão e exatidão interensaios das GQ-11 e GQ-177

	Réplicas	GQ-11		GQ-177	
		Precisão	Exatidão	Precisão	Exatidão
LSQ (10 µg/mL)	1	4,24	114,97	12,79	103,05
	2	7,82	102,39	4,41	104,52
	3	6,29	110,54	10,26	100,82
CQA (8 µg/mL)	1	0,93	103,11	2,06	107,59
	2	10,78	107,02	7,79	94,39
	3	3,36	114,03	8,60	101,82
CQM (1 µg/mL)	1	3,60	95,22	3,75	104,92
	2	3,92	108,77	2,23	97,89
	3	9,89	94,78	6,21	94,79
CQB (0,25 µg/mL)	1	3,27	86,77	5,32	103,89
	2	7,06	87,14	4,28	102,72
	3	5,87	90,88	6,03	105,92
LIQ (0,08 µg/mL)	1	11,34	96,62	15,79	100,10
	2	14,31	117,39	5,93	104,77
	3	11,44	115,41	10,25	86,88

Os controles de qualidade realizados em dias diferentes passaram nos critérios de aceitação para métodos bioanalíticos, a saber precisão com coeficiente de variação <15% e exatidão entre 85 e 115% para todos os pontos sendo que para o LIQ aceita precisão com coeficiente de variação <20% e exatidão entre 80 e 120%.

Estabilidade GQ-11 em plasma

Com os controles de qualidade bem estabelecidos foi possível realizar testes de estabilidade necessários para a validação do método bioanalítico. As estabilidades realizadas para o GQ-11 estão representadas na Figura 15.

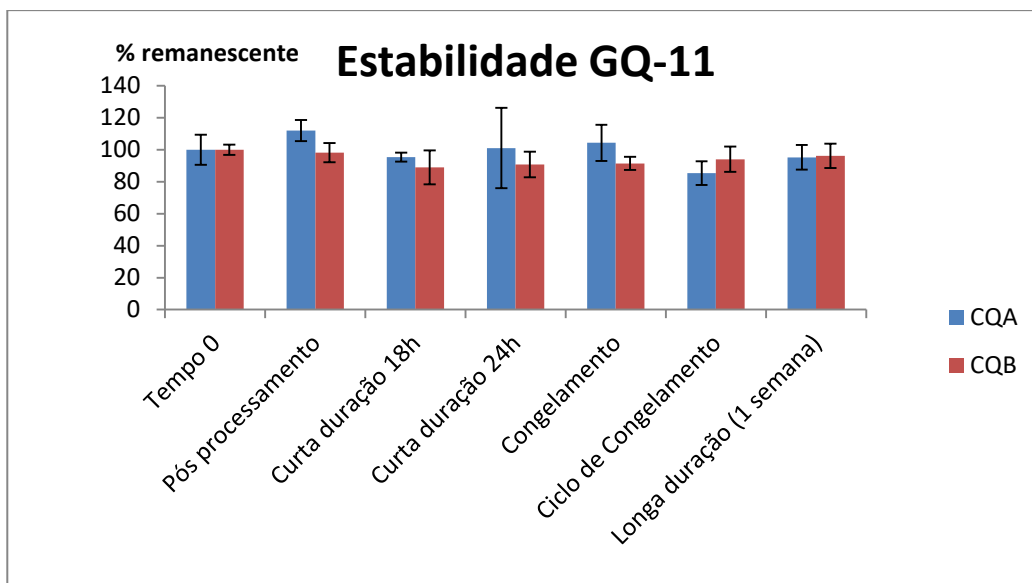


Figura 15 - Ensaio de estabilidade da GQ-11 em plasma.

Os ensaios de estabilidade da GQ-11 em plasma revelam que a molécula não se degrada facilmente nesta matriz, uma vez que não falhou em nenhum critério analisado. Não foram observadas diferenças estatísticas no CQA ou CQB, e a variação absoluta mais representativa foi de 5% no ciclo de congelamento e descongelamento.

Estabilidade GQ-177

Foram realizados os ensaios de estabilidade também para a GQ-177 (Figura 16).

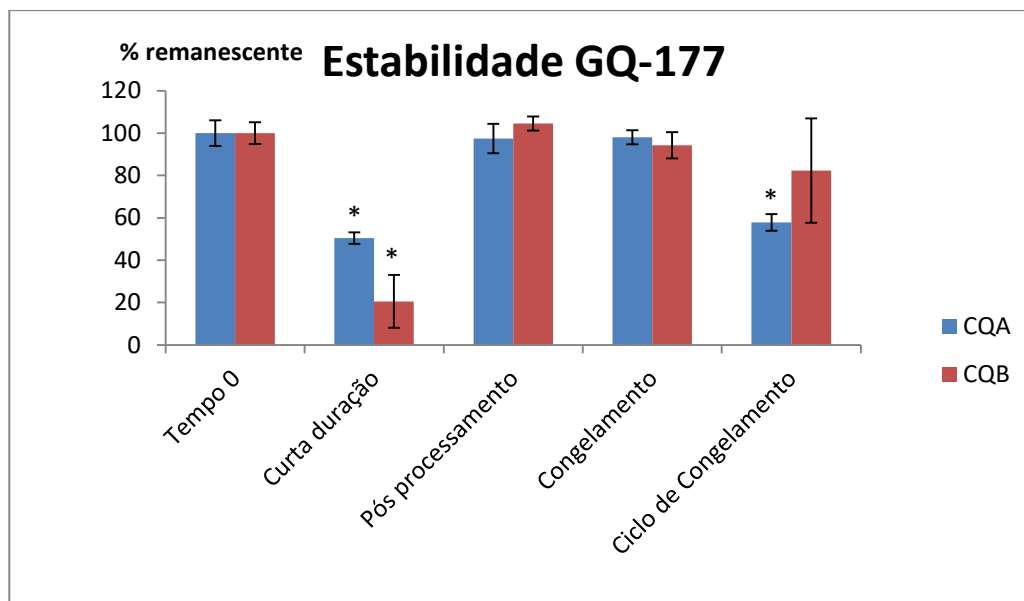


Figura 16 - Ensaios de estabilidade da GQ-177 em plasma. O * representa diferença estatística em relação ao tempo zero.

A GQ-177 apresenta instabilidade na matriz após 24 horas em temperatura de bancada, visto que decai para concentrações abaixo de 50% enquanto mantida nestas condições. Contudo, o processamento da amostra e o congelamento por apenas uma vez mantém a amostra estável por um período maior de tempo. O ciclo de congelamento e descongelamento também tem influência na degradação da GQ-177. Diferenças estatisticamente relevantes foram observadas entre o tempo zero e ambas as concentrações do ensaio de curta duração e do tempo zero contra o CQA no ciclo de congelamento e descongelamento.

3.2. Screening in vivo

GQ-11

A GQ-11 foi administrada a ratos Wistar de acordo com o protocolo experimental descrito no item 2, o processamento das amostras de plasma foi realizado conforme o item 1. As áreas obtidas através da análise de plasma dos animais que receberam o fármaco estão descritas na Tabela 11.

Tabela 11 - Áreas obtidas pós processamentos de amostras de animais administrados de GQ-11

Tempo (h)	Animal 1		Animal 2	
	GQ-11 (UA)	Pi (UA)	GQ-11 (UA)	Pi (UA)
0,25	57	9058	53	8745
0,5	51	10235	60	10348
1	91	9709	63	17842
3	114	10247	54	9715
4	82	10005	66	11632
6	71	11110	41	9470

UA: Unidades de área

Não foi possível quantificar o sinal obtido no tempo de retenção da GQ-11, por isso apenas as áreas da GQ-11 e do Pi estão demonstradas na Tabela 11.

GQ-177

O procedimento de administração da molécula em ratos Wistar foi realizado também para a GQ-177 e os resultados estão descritos na Tabela 12.

Tabela 12 - Áreas obtidas pós processamentos de amostras de animais administrados de GQ-177

Tempo (h)	Animal 1		Animal 2	
	GQ-177 (UA)	Pi (UA)	GQ-177 (UA)	Pi (UA)
0,25	59	15173	244	9789
0,5	385	9189	433	10294
1	53	4421	268	4423
3	119	6267	148	5946
4	129	10782	109	5394
6	217	9905	129	10092

UA: Unidades de área

Também não foi possível, através do método bioanalítico desenvolvido e validado, quantificar GQ-177 no plasma dos animais que foram submetidos aos experimentos.

4. Conclusão

Como esperado, baseado nos resultados dos Capítulos 1 e 2, a GQ-11 e GQ-177 não apresentaram concentrações quantificáveis na circulação dos

animais submetidos ao teste. A GQ-19 que até então apresentava resultados promissores quanto às características físico-químicas e permeabilidade em células Caco-2 demonstrou um alto grau de degradação em plasma, evidenciando uma virtual incompatibilidade com atividade farmacológica da molécula intacta, uma vez que os resultados de estabilidade em plasma sugerem que a molécula é rapidamente degradada assim que em contato com a circulação sistêmica.

III.DISSCUSSÃO E CONCLUSÃO

Os métodos analíticos e bioanalíticos desenvolvidos apresentaram limites de confiança adequados para a aplicação nos estudos *in vitro* e *in vivo* das tiazolidinodionas. A partir dos estudos de estabilidade química foi possível observar resultados mais promissores à molécula GQ-19 em pH ácido e à molécula GQ-11 em pH 7.4. A molécula GQ-19 apresentou, ainda, o valor de Log P favorável à absorção oral e permeação quantificável no estudo com monocamadas de Caco-2.

A instabilidade de GQ-19 em plasma sugere que a molécula sofre ação de enzimas plasmáticas e deve apresentar clearance elevado.

Assim como foi observado no estudo de farmacocinética da GQ-2 anteriormente (19), as GQ-11 e GQ-177 também não apresentaram concentrações quantificáveis no plasma quando administradas pela via oral e, portanto, requerem o desenvolvimento de formulações apropriadas antes de avançar para ensaios pré-clínicos. É importante ressaltar que, assim como a GQ-2, as mesmas possuem atividade pela via oral (6, 16, 17, 21, 87), contudo, as evidências aqui documentadas apontam que a GQ-11 e GQ-177 não são capazes de permear monocamadas de células intestinais do tipo Caco-2 além de não apresentarem concentrações plasmáticas quantificáveis quando administradas pela via oral à ratos Wistar.

No Capítulo 2 foi levantada a hipótese das TZDs avaliadas estarem sujeitas à ação de transportadores de efluxo. É importante ressaltar que a pioglitazona já foi demonstrada como inibidora e substrato de P-gp (88, 89). Assim como no caso da pioglitazona, estes transportadores podem ser responsáveis pela limitada biodisponibilidade das moléculas em animais e a baixa permeabilidade através de monocamadas de células Caco-2. Para prever o comportamento de fármacos em relação à sua interação com transportadores podemos utilizar um desdobramento da Classificação Biofarmacêutica, a *Biopharmaceutics Drug Disposition Classification System* (BDDCS). Esta classificação proposta por Wu e Benet (90) utiliza os parâmetros utilizados para a classificação biofarmacêutica, permeabilidade e solubilidade, e correlaciona

com a afinidade por transportadores e via de eliminação preferencial de cada classe.

Na proposta da BDDCS, fármacos de BCS Classe 1, de alta solubilidade e alta permeabilidade, não seriam muito influenciados pela atividade de transportadores, pois, a solubilização rápida implica que altas concentrações do composto estarão disponíveis no lúmen intestinal, saturando qualquer processo de absorção ativa que possa influenciar na absorção da molécula. Em seguida, devido à alta permeabilidade, o composto atingirá altas concentrações dentro do enterócito, assim, qualquer processo de transporte de efluxo e enzimas metabólicas que possam influenciar a molécula serão saturados, e a molécula poderá chegar a circulação sanguínea também em altas concentrações, e rapidamente. Contudo, compostos de Classe 2, de alta permeabilidade e baixa solubilidade, serão mais afetados por transportadores de efluxo. Isso ocorre pois, devido à baixa solubilidade, haverá concentrações limitadas do composto na luz intestinal que rapidamente permearão a membrana apical dos enterócitos, contudo atingindo concentrações intracelulares baixas. Assim, transportadores de efluxo não serão saturados e podem afetar de forma mais eficaz a biodisponibilidade de compostos de Classe 2. Ainda, ao atingir concentrações intracelulares baixas, outros processos enzimáticos também terão mais influência sobre fármacos desta classe, assim, metabolismo de enterócitos também pode influenciar a biodisponibilidade destas moléculas.

Compostos de Classe 3, de baixa permeabilidade e alta solubilidade serão mais afetados por transportadores de absorção, pois altas concentrações estarão disponíveis no lúmen devido à alta concentração, porém a permeabilidade transcelular será baixa, assim os transportadores de influxo serão impactantes para a biodisponibilidade. Ainda, devido às concentrações intracelulares serem influenciadas por baixa permeabilidade passiva e a atividade de algum transportador ativo, pode-se esperar baixas concentrações intracelulares, assim também é esperado que metabolismo e transportadores de efluxo sejam capazes de influenciar a biodisponibilidade de fármacos de Classe 3. Enquanto os de Classe 4 serão bastante influenciados por ambos os transportadores e metabolismo de parede intestinal.

Se traçarmos uma divisão clara em relação ao Log P das TZDs estudadas aqui, teremos que a GQ-2 e GQ-11 são de alto Log P ou seja, há baixa expectativa de solubilidade e boa expectativa de permeabilidade, embora solubilidade não tenha sido rigorosamente estudada neste trabalho. Enquanto as GQ-19 e GQ-177, devido ao baixo Log P, teriam solubilidade considerável e permeabilidade limitada.

Desta forma, a GQ-2 e GQ-11 seriam consideradas de Classe 2, portanto espera-se que teriam alta influência de transportadores de efluxo, que são expressos por células Caco-2, assim, os resultados observados no teste de permeação podem ter sido resultado deste fenômeno. Transportadores de efluxo também podem ter influenciado os resultados observados *in vivo*. Após administração de uma suspensão à animais pela via oral, é esperado que o fator solubilidade seja importante para a biodisponibilidade destes compostos. Contudo, há de se ressaltar que no teste de permeabilidade em Caco-2, as moléculas foram previamente solubilizadas em tampão, portanto atribuir unicamente à solubilidade os efeitos observados no ensaio é leviano. Na situação na qual os fármacos estão previamente solubilizados no compartimento doador do ensaio em células Caco-2, há alta concentração das moléculas disponíveis para a permeação e mesmo assim não observamos concentrações quantificáveis no compartimento receptor, assim podemos considerar que, mesmo com a expectativa do Log P apontando para uma boa permeabilidade destas moléculas, elas na verdade possuem baixa permeabilidade, se classificando na Classe 4 da Classificação Biofarmacêutica, assim há muitas variáveis influenciando sua biodisponibilidade.

A GQ-19 e GQ-177 por apresentarem Log P menor, há expectativa que tenham melhor solubilidade e permeabilidade limitada. *In vivo*, elas se solubilizariam mais rapidamente no lúmen intestinal e estariam disponíveis para a absorção. No caso específico da GQ-177 que foi administrada pela via oral à ratos Wistar, a ausência de concentrações plasmáticas quantificáveis pode ter sido devido à baixa permeabilidade, assim, transportadores ativos de absorção serão importantes para a absorção desta molécula e metabolismo de parede intestinal, tanto na Caco-2 quanto no modelo animal, podem ter influenciado na sua biodisponibilidade.

No caso da GQ-177 há a influência de um segundo fator. Durante sua farmacocinética pela via intravenosa, não foi possível quantificar este composto no plasma de ratos Wistar (resultados em Anexo I). O método bioanalítico foi validado em plasma de ratos com limite de quantificação em 80 ng/mL, contudo não foi capaz de quantificar a GQ-177 mesmo quando administrada pela via intravenosa. Há a possibilidade desta molécula não se distribuir igualmente entre o sangue e o plasma dos animais, no caso, penetrar nos eritrócitos e ser precipitada durante a centrifugação das amostras. Mesmo que esta hipótese seja verdadeira, alguma partição desta molécula deveria estar presente no plasma para a quantificação. Outra possibilidade é a instabilidade desta molécula em sangue animal, de forma que houve degradação do composto no período entre o procedimento de coleta até a extração da molécula do plasma das amostras. Todo o procedimento da coleta das amostras dos animais até a injeção no sistema cromatográfico foi realizado no mesmo dia, contudo, ainda não foi possível quantificar o composto. É importante ressaltar que durante a validação bioanalítica houve diferenças significativas na estabilidade de curta duração (18 horas) e em ciclo de congelamento de descongelamento em plasma de ratos (Figura 16), revelando que há possibilidade desta molécula apresentar metabolismo plasmático, possibilidade que não afetou a execução do método bioanalítico, como ocorreu com a GQ-19, mas pode ter influenciado a disposição cinética do composto *in vivo*. Assim, ao se interpretar os resultados de absorção oral desta molécula, há possibilidade do método bioanalítico, desenvolvido em plasma e não em sangue total, não ser capaz de quantificar esta molécula na circulação do modelo animal, por motivo de partição sangue/plasma ou por motivo de estabilidade. De qualquer forma, os resultados obtidos durante o teste da Caco-2, sem a participação de sangue ou plasma e com o candidato a fármaco previamente solubilizado, apontam para a baixa absorção da molécula.

Para GQ-19, devido ao seu baixo Log P, há expectativa de boa solubilidade e permeabilidade limitada. Desta forma seria esperado que, *in vivo*, ela dependa de transportadores para ser absorvida. Contudo, no ensaio com Caco-2, observamos uma rápida permeação desta molécula, assim além de uma boa solubilidade, apresentou também uma boa permeabilidade,

caracterizando o composto como Classe 1 na Classificação Biofarmacêutica. Contudo, nossos resultados apontam que a limitação observada na GQ-19 foi a estabilidade química e *ex vivo* deste composto. Baixa estabilidade em plasma e baixa estabilidade em pH 7.4 são os fatores limitantes para o sucesso farmacocinético deste composto.

Este estudo teve como objetivo utilizar métodos de *screening* para selecionar entre as TZDs GQ-2, GQ-11, GQ-19 e GQ-177 aquelas com capacidade de serem absorvidas pela via oral. *Screenings* tem como objetivo facilitar e agilizar a avaliação de candidatos a fármacos para que se possa investir em candidatos mais promissores. Os *screenings* físico-químico e *in vitro* em células Caco-2 foram importantes para auxiliar na interpretação dos resultados obtidos *in vivo*, contudo nenhum dos compostos avaliados passaram para a avaliação da farmacocinética completa. Mesmo assim, foi realizado um estudo para a avaliação dos parâmetros farmacocinéticos pela via intravenosa das GQ-11 e GQ-177 (em Apêndice I). Este experimento foi importante principalmente para observar uma característica peculiar da GQ-177 em relação à sua quantificação *in vivo*. Em geral, as moléculas intactas não foram capazes de serem absorvidas em concentrações quantificáveis, contudo há diversos estudos relatando sua atividade pela via oral. Assim, é possível que metabólitos ou produtos de degradação que podem ser formados devido à baixa estabilidade química destes compostos podem ser os responsáveis pela atividade observada. A pioglitazona apresenta metabólitos ativos, ambos oriundos de oxidação da estrutura primária através do metabolismo microsomal hepático (91), é importante ressaltar que tanto a pioglitazona quanto seus metabólitos são detectados na circulação sistêmica após a administração oral do medicamento (92). O metabolismo de parede intestinal também pode ter sido importante para a GQ-177 e talvez para GQ-11 e GQ-2, de acordo com suas características físico-químicas. Uma conclusão importante deste trabalho foi a importância da avaliação da estabilidade química na triagem de fármacos, esta característica foi importante para a interpretação durante todo o trabalho.

IV. PERSPECTIVAS

Tendo em vista os resultados de *screening* físico-químico, *in vitro* e *in vivo*, não foram observadas concentrações plasmáticas quantificáveis de nenhuma das moléculas. Contudo, devido a atividade evidenciada de todos os candidatos a fármaco em trabalhos anteriores, é necessária a investigação dos metabólitos destas moléculas que podem ser os compostos ativos após administração oral destes compostos. Neste sentido, durante o último ano do Doutorado, realizei um estágio de treinamento no *National Institutes of Health* nos Estados Unidos. O objetivo do estágio foi a capacitação nas técnicas de identificação de metabólitos através de ensaios *in vitro* e uso da espectrometria de massas de alta resolução. O relatório deste estágio pode ser encontrado no Apêndice II.

Ainda, devido aos métodos bioanalíticos desenvolvidos para este trabalho tornou-se possível a administração intravenosa das moléculas. A GQ-11 e GQ-177 foram administradas pela via intravenosa em ratos Wistar e sua farmacocinética foi descrita. Os resultados podem ser encontrados no Apêndice I.

Este projeto compreendeu a execução de protocolos de *screening*, contudo, há evidências terapêuticas que justificam a investigação mais aprofundada destes compostos. Assim, a investigação dos metabólitos destas moléculas, assim como o desenvolvimento de método bioanalítico capaz de quantificar a GQ-177 após administração intravenosa em ratos Wistar, podem elucidar se os efeitos terapêuticos descritos na literatura são oriundos de um metabólito ou produto de degradação destas moléculas.

APÊNDICE I – FARMACOCINÉTICA DA GQ-11 EM RATOS WISTAR

Materiais e Métodos

Modelo animal.

Foram selecionados ratos Wistar pesando aproximadamente 250g. Os animais foram obtidos do biotério central de Botucatu da Universidade Estadual Paulista – Unesp. Os animais foram transferidos para o biotério do Departamento de Princípios Ativos Naturais e Toxicologia da Faculdade de Farmácia Bioquímica da Unesp de Araraquara, e mantidos em condições controladas de temperatura ($23 \pm 1^\circ \text{C}$), 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.

Avaliação Farmacocinética Preliminar de GQ-11, GQ-177 e GQ-19

Administração intravenosa. Os animais ($n = 4$) receberam os compostos (8 mg/kg) por via intravenosa através de cânula previamente implantada na veia femoral. O fármaco foi solubilizado em dimetilsulfóxido (DMSO)(93) para atingir uma concentração de 5 mg/mL. Todas as administrações foram realizadas durante um curto período de tempo, menos de trinta segundos. As amostras de sangue (0,25 mL cada) foram coletadas através de cânula previamente implantada na artéria femoral em 0,08, 0,25, 0,5, 0,75, 1, 1,5, 3, 6, 12 e 24 horas em tubos heparinizados. O sangue foi centrifugado a $13000 \times g$ durante 15 minutos para separar o plasma, que foi armazenado a -20°C até a análise.

Cálculos de parâmetros farmacocinéticos. O perfil de concentração plasmática vs tempo dos compostos após a administração intravenosa foi avaliado segundo o modelo compartimental. A área sob a curva do gráfico de concentração por tempo ($\text{AUC}_{0-\infty}$) foi obtida usando a regra dos trapezoides mais a extrapolação ao infinito, dividindo a última concentração plasmática pela constante de eliminação (β). O parâmetro β foi calculado como a inclinação da regressão log-linear da fase terminal da curva de concentração-tempo. A meia

vida de eliminação ($t_{1/2\beta}$) foi calculada dividindo o logaritmo natural de 2 por β . O parâmetro α foi definido quando o modelo bi-compartimental foi empregado na análise compartimental, foi calculado usando a inclinação da regressão linear da reta residual obtida através do método dos resíduos. Sua meia-vida ($t_{1/2\alpha}$) foi calculada dividindo o logaritmo natural de 2 por α . O clearance (Cl/f) foi calculado dividindo a dose por $AUC_{0-\infty}$, e o volume de distribuição (Vd/f) foi calculado dividindo Cl por β .

Todos os procedimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética da Faculdade de Ciências Farmacêuticas do Protocolo CEUA / FCF / CAr N° 32/2015.

Administração intravenosa de GQ-11

GQ-11 e GQ-177 foram administrados por via intravenosa a ratos Wistar ($n = 4$), no entanto, não foi possível obter concentrações plasmáticas mensuráveis de GQ-177. Portanto, apenas a GQ-11 recuperou concentrações mensuráveis e sua curva de concentração versus tempo é mostrada na Figura A11.

O modelo que melhor descreveu o comportamento do GQ-11 foi o modelo bicompartimental. Os parâmetros farmacocinéticos extraídos da curva de concentração versus tempo são mostrados na Tabela A11.

Em geral, apresentou uma meia-vida curta de 1,7 horas e um alto volume de distribuição de cerca de 6L.

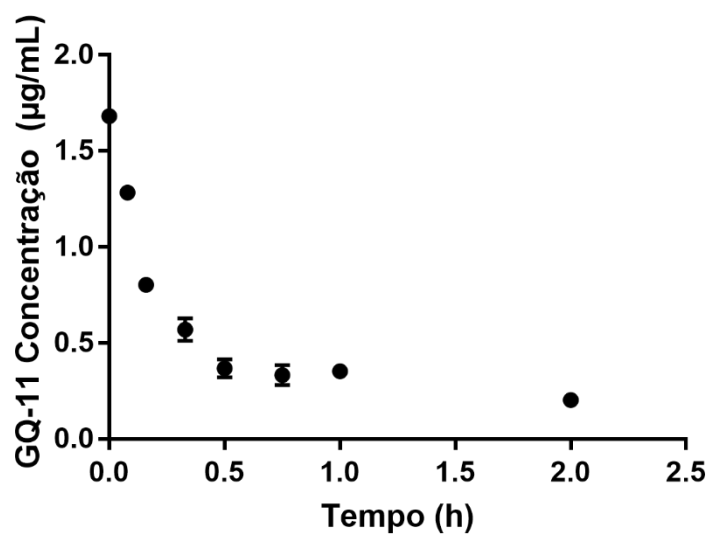


Figura A1 1 -Farmacocinética do GQ-11 pela via intravenosa em ratos Wistar (n=4). Dados apresentados em média +/- desvio padrão.

Tabela AI 1—Parâmetros farmacocinéticos da GQ-11

Parâmetro	Valor
β (h^{-1})	0.402
$t_{1/2\beta}$ (h)	1.724
$t_{1/2\beta}$ (min)	103.433
ASC 0-t ($\mu g \cdot h/ml$)	0.850
ASC $_{0-\infty}$ ($\mu g \cdot h/ml$)	1.355
R%	62.696
Cl (ml/h)	2354.105
Cl (ml/min)	39.235
Vd(ml)	5855.983
A (h^{-1})	6.358
$t_{1/2 \alpha}$ (h)	0.109

β : coeficiente de eliminação t, $t_{1/2\beta}$:meia vida de eliminação, ASC: area sob a curva, Cl: clearance, Vd: volume de distribuição, α : coeficiente de distribuição, $t_{1/2 \alpha}$:meia vida de distribuição

APÊNDICE II – ESTÁGIO DE TREINAMENTO NO NCATS/NIH - INTERNSHIP AT NCATS/NIH

Background

During the last year of my PhD, we sent a project for the funding agency FAPESP to support an internship at the National Centre for Advancing Translational Sciences (NCATS), one of the 27 Institutes from the National Institutes of Health (NIH) in United States of America. The project was related to my findings during this PhD. Since none of the compounds GQ-2, GQ-11, GQ-19 or GQ-177 were successful in being bioavailable intact in quantifiable concentrations and yet all of them retain pharmacological activity, our best hypothesis led us to believe that a metabolite may play a role in the effects observed for these compounds *in vivo*. FAPESP approved the scholarship and I aimed my efforts during this internship to learn metabolite identification of compounds during discovery/development phase.

Fortunately, Dr. Xin Xu and her laboratory exceeded my expectations. They work exactly with the subject that I aimed for. They work close to medicinal chemists to provide ADME properties of drugs on discovery phase as well as *in silico* models to predict ADME properties. Chemists have been incorporating this ADME data to their decision making and that has helped the development of drug candidates for the treatment of rare and neglected diseases.

The following report is an adaptation of a paper originated from the work I performed during this internship. Most of the methods and interpretations were associated with the methods and reports generated by the CRO Frontage Laboratories, with the guidance of Dr. Xin Xu from NCATS and Dr. Abdul Mutlib from this company. The original metabolite identification data from LDN-193189, the former lead compound for the treatment of Fibrodysplasia ossificans progressiva (FOP), was presented by Dr. Xu in a poster in an AAPS meeting (2013). This work, with results generated by Frontage Laboratories, was critical to lead the NCATS chemistry team to optimize the molecule toward more stable and safer candidates to treat the disease.

Introduction

Fibrodysplasia ossificans progressiva (FOP) is a rare congenital disorder of progressive and widespread postnatal ossification of soft tissues (94). Such ossification occurs independently from the normal bone, characterizing a heterotopic bone formation that progresses in a well-defined spatial pattern. It forms ribbons, sheets, and

plates of bone that may fuse the joints of the individual. Besides the joints bone formation, the ectopic calcification may also affect muscles, tendons and ligaments causing severe pain, impairing mobility and may lead to premature mortality. It affects 1 in 2 million individuals (95). Although it is a congenital disorder, it may only manifest itself after a physical trauma, surgery, viral illness or myositis during the first decade of life (94, 96, 97). Bearers hold no ethnic, racial, gender, or geographic predisposition (96). Genetic inheritance may be involved, when observed, genetic transmission is autosomal dominant and can be inherited from either mother or father.

Currently no definitive pharmacological treatment has been developed for FOP, the general cause of the disease is a heterozygous mutation in the R206H position of the ACVR1 gene, which encodes the bone morphogenetic protein (BMP) type I receptor ALK2 (97, 98). Initial study indicated that the R206H mutation disrupts an α -helix in the glycine-serine regulatory domain, rendering ALK2 constitutive activity (97-99). When activated, BMP type I receptors (e.g. ALK2, ALK3 and ALK6) phosphorylate BMP-responsive SMAD (1/5/8), which signals the transcription of genes related to cells' growth and differentiation to form bones. More recent study found that an inflammatory stimulus is necessary to trigger the heterotopic bone formation in FOP. It was found that Activin A released during an inflammation process, which has inhibitory activity to normal ACVR1 individuals, was found to have excitatory activity to ACVR1^{R206H} patients and triggers the development of heterotopic ossification, causing the progression of FOP (100-102).

Addressing the FOP treatment, Yu and coworkers (103) carried out a screening of over 7,500 compounds and found that dorsomorphin perturbs dorsoventral axis formation in zebrafish. The compound was able to inhibit SMAD dependent responses therefore inhibiting the BMP receptor type 1 over-activation. Cuny and coworkers (104) optimized dorsomorphin to the lead compound LDN-193189, shown in **Figure All1**, with moderate pharmacokinetic characteristics (e.g. plasma $t_{1/2}$ = 1.6 h) following intraperitoneal administration in mice. Later, this compound was studied in FOP animal models and demonstrated improvement in the disease conditions (97).

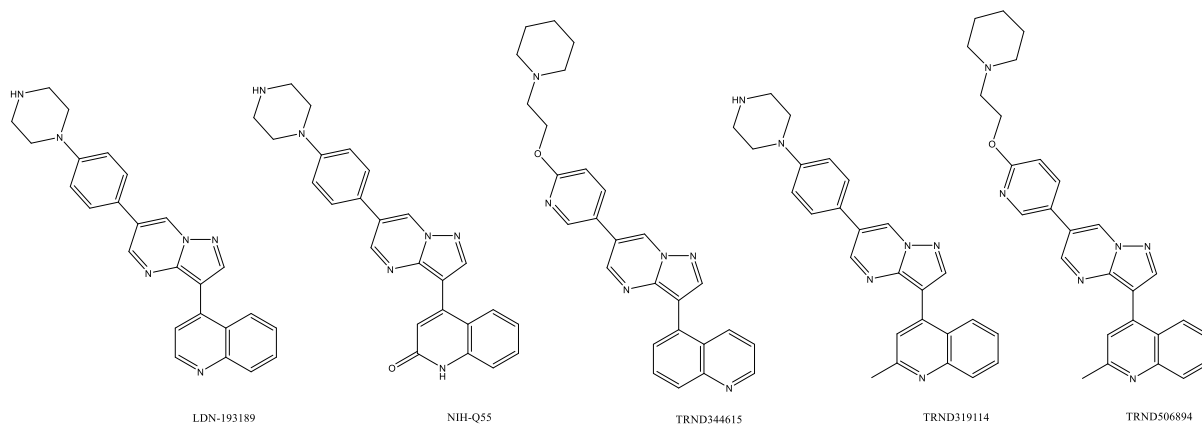


Figure All 1 –Structures of the compounds used in this study

In drug discovery, around 50% of the major causes of failure are poor pharmacokinetics and toxicity (9). A lead compound, before actually ‘leading’ to a drug-like compound, must be subjected to many optimization cycles that include pharmacological, pharmacokinetic and toxicological analyses. The objective of these cycles is to analyze the chemical structure of the lead compound and modify it in order to satisfy the conditions for optimal characteristics before entering the clinical development stage (105, 106). In that matter, the metabolite identification can shed light on the understanding of biotransformation of a lead compound to identify why the molecule is unstable, whether it generates a toxic metabolite(s) and where we can propose a modification on the lead molecule structure to improve undesirable (i.e. nondrug-like) characteristics. Therefore, the metabolite identification is a powerful tool to optimize hit compounds toward a better lead (105, 107).

Although during metabolite identification, the CYP mediated pathways are the main focus of the research, non-CYP mediated pathways are of growing importance in modern drug metabolism studies. One major example is the aldehyde oxidase (AO) enzyme which is responsible for the bioconversion of many xenobiotics (108). AO is a molybdoflavoprotein which is structurally related to the molybdenum cofactor (MoCo)-containing family along with xanthine oxidase (XO), another known non-CYP metabolizing agent. They are cytosol soluble enzymes mainly present in hepatocytes of many mammals (109). Despite its name, AO is involved not only in the oxidation of aldehydes to carboxylic acids but also in the oxidation of nitrogen-containing heterocyclic compounds and the reduction of nitro-aromatic compounds, isoxazole, and isothiazole ring systems. An increasing number of compounds are being discovered to

have some extent of metabolism by AO to the point that metabolism studies cannot ignore this enzyme during the drug discovery process (110-112). Since there are multiple sites potentially susceptible to AO oxidation, for the FOP lead compound LDN-193189 it is necessary to assess the metabolic impact of this enzyme.

Apart from the search of the regular metabolites of new drug candidates it is important to search for reactive metabolites. They are electrophilic intermediates or radicals which are not easily identified without the proper methodology (113, 114). Unidentified reactive metabolites were responsible for many serious unpredicted drug reactions that may lead to the withdrawal of drugs from the market (115-117). Therefore, to avoid drug attrition in future clinical studies, the metabolite identification phase of drug discovery should verify the presence of such chemical species during metabolism studies. The difficulty in identifying reactive metabolites is that they are unstable, formed usually in small amounts, and react rapidly with nucleophiles. Reactive metabolites may be hard electrophiles which react with hard nucleophiles, such as basic groups in DNA and lysine residues in proteins, while soft electrophiles react with soft nucleophiles such as thiol groups of glutathione and cysteine residue in proteins. In either cases, the reaction between reactive metabolite and endogenous components may lead to loss of protein activity or the generation of a compound-protein hapten which the immune system will react against, hence damaging cells or tissues (118, 119). The addition of glutathione to the metabolism experiment is an effective means to trap soft electrophilic reactive metabolites which becomes relatively stable for identification by LC-MS, whereas for hard electrophiles, the addition of KCN to the metabolism experiment will 'trap' these reactive species for further characterization (113, 114).

In a previous study, the metabolite identification of LDN-193189 was performed by Frontage Laboratories. The metabolite profiles of LDN-193189 were obtained following incubations with mouse, rat, dog, rabbit, monkey and human liver microsomal/cytosolic preparations using LC/UV/MS analysis. Metabolite profiles (LC/UV, with λ 310-315 nm) of LDN-193189 obtained in humans showed the major metabolite observed was the M422c. The formation of M422c appeared to be mediated via cytosolic enzyme through oxidation of the α -carbon of quinoline nitrogen, suggesting that it was produced by either aldehyde oxidase (AO) or xanthine oxidase (XO). The identity of M422c was unequivocally established by comparison with synthetic standard, NIH-Q55. Furthermore, a specific inhibitor of AO, menadione, was used to demonstrate the reduction of M422c formation in the presence of human liver cytosol, while the addition of an XO inhibitor, allopurinol, did not result in the change of

the formation of M422c. Thus, the formation of the major metabolite M422c was attributed to the cytosolic enzyme AO. The main findings of this work can be observed in **Figure AII2**.

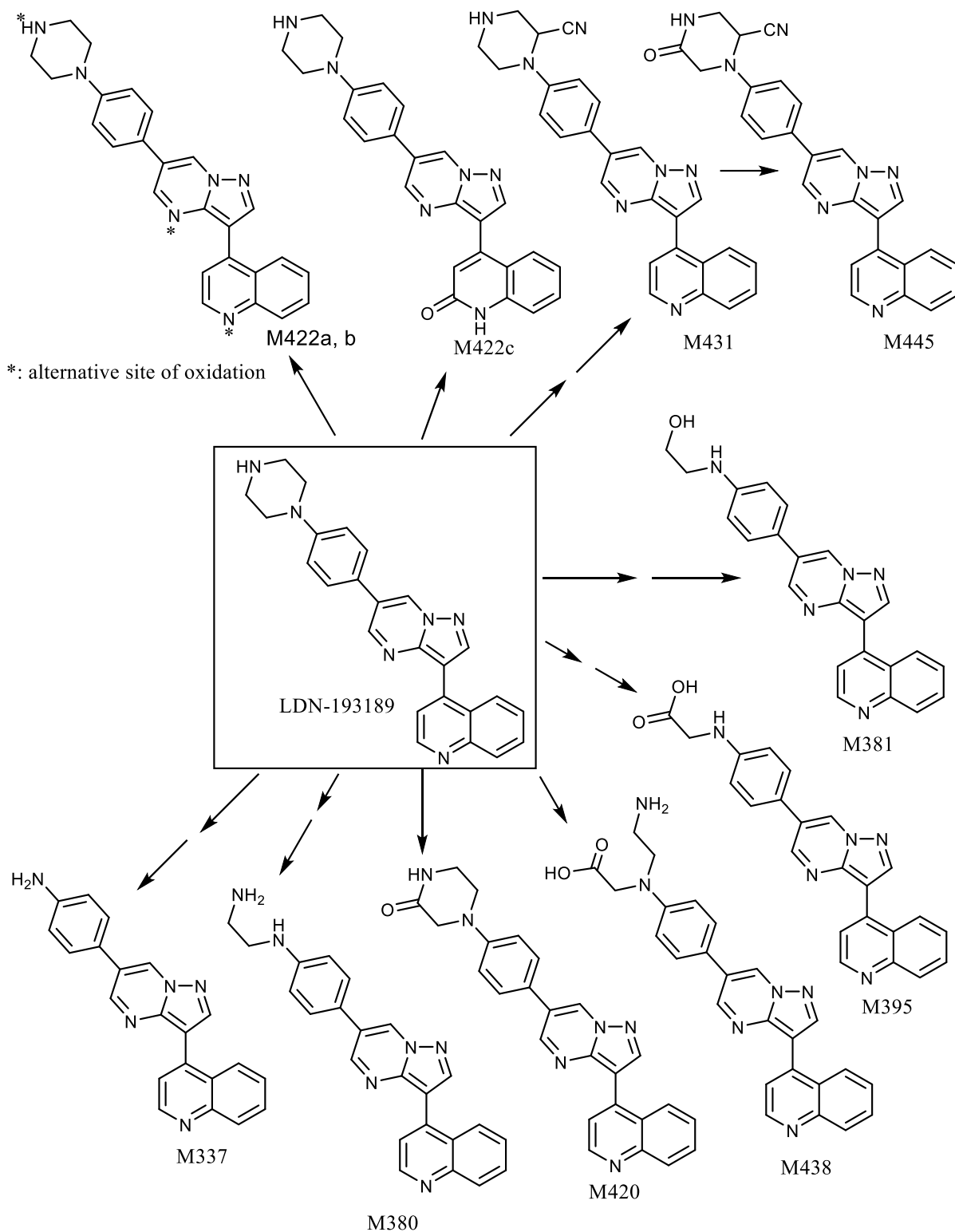


Figure All 2 – Metabolic Pathway of LDN-193189 from Xu and coauthors (2013)

The purpose of this study was to perform metabolite identification of backup drugs synthesized to overcome the liabilities observed in LDN-193189. The

compounds studied were TRND344615, TRND319114 and TRND506894. They were incubated with human or mouse liver microsomes and cytosols to observe if the modifications made were successful in avoiding the LDN-193189's problematic metabolites.

Materials and Methods

Materials. LDN-193189 hydrochloride, NIH-Q55, TRND344615, TRND319114 and TRND506894 were synthesized by the Medicinal Chemistry Group at NCATS, NIH (120). The structures of LDN-193189, NIH-Q55 (synthetic reference standard of M422c), TRND344615, TRND319114 and TRND506894 are shown in **Figure 1**. Pooled liver microsomes and cytosol were obtained from commercial sources (Xenotech, KS), including the liver microsomes and cytosol from CD-1 mice (Lot#0310190 and Lot# 0610024) and humans (Lot#452161 and Lot# 01610370), respectively. The following reagents obtained from Sigma Aldrich (St Louis, MO) were used for in vitro studies: $MgCl_2$, NADPH-regenerating systems (NADP⁺, glucose-6-phosphate, and glucose-6-phosphate dehydrogenase), 0.1 M phosphate buffer (pH 7.4), GSH (glutathione, reduced), KCN, menadione (a specific aldehyde oxidase inhibitor), allopurinol (a xanthine oxidase inhibitor) and UDPGA. Solvents used for chromatographic analysis were HPLC or ACS reagent grade and purchased from EMD Chemicals (Gibbstown, NJ) or other commercial suppliers. All other reagents were analytical or ACS reagent grade.

Incubations with Liver Microsomes and Cytosol. The compounds TRND344615, TRND319114 or TRND506894 were incubated using Tecan automated system. The protocol consisted of incubating the test compounds (10 μ M) with human or mouse microsomes (1 mg/mL) with/without cytosol (2 mg/mL) in the presence of NADPH-regenerating system (Solutions A and B, reference numbers 451220 and 451200 respectively) purchased from Corning. The microsomes incubations were also fortified with KCN (0.1 mM), GSH (5mM) or UGT reaction mix obtained from BD Gentest (Solution A and B, reference numbers 451320 and 451300 respectively), all with 0.1 M phosphate buffer pH 7.4. The Tecan protocol used is capable of running those conditions for both species for 8 drugs in a 60 minutes incubation with agitation at 37 °C assays in a same 96 well plate. Total incubation volume per sample was 1 mL. Propranolol (10 μ M) was used as microsome positive control, troglitazone (10 μ M) and ketoconazole (10 μ M) were used as positive controls for GSH and KCN trapping studies, respectively. Samples were collected from time 0 and time 60 minutes, reactions were stopped at each sampling time point by adding 2 volumes of acetonitrile

containing internal standard (tolbutamide, 100nM). The 96 well plates were centrifuged to separate proteins, 200 μ L of the supernatant was placed in a different plate for analysis. The incubation protocol is described in Table AII1.

Table AII 1 - Incubation of test compounds with liver microsomes and cytosols.

Incubation #	Substrate	NADPH ^a	Microsomes	Cytosol	GSH	KCN	UDPGA
1	√	X	√	X	X	X	X
2	√	√	√	X	X	X	X
3	√	√	√	√	X	X	X
4	√	√	√	X	√	X	X
5	√	√	√	X	X	√	X
6	√	√	√	X	X	X	√

a NADPH-regenerating system

LC/UV/MS Conditions for Metabolite Profiling and Identification.

The system used was a Waters UPLC-I Class (Waters Corporation, Milford, MA) equipped with a sample manager and a PDA detector (200-400 nm) for UV analysis. The LC system was coupled with a Synapt G2-Si QTOF mass spectrometer (Waters Corporation, Milford, MA), equipped with an electrospray ionization (ESI) interface and operated in positive ionization mode. Cone voltage was set to 25V and data was acquired in the MSe mode (m/z 50-1000) using 6 V low collision energy and 15-45 V ramp as high collision energy in the trap collision chamber. Chromatography was performed with a BEH C18 column 2.1 x 100mm, 1.7 μ m particle size (Waters Corporation, Milford, MA). The mobile phase consisted of HPLC grade water:0.1% formic acid (A) and acetonitrile:0.1% formic acid (B), the gradient was set to 98% of A until 0.5 min and 2% of A at 9 minutes in a total runtime of 10 minutes.

Data Analysis. MassLynx/Metabolynx XS were used to acquire and interpret LC/UV/MS data obtained in the Waters systems.

Results

LC/UV overview of metabolite formation of TRND344615, TRND319114 and TRND506894 and in different species

The UV chromatogram of TRND344615 is presented in **Figure All3**.

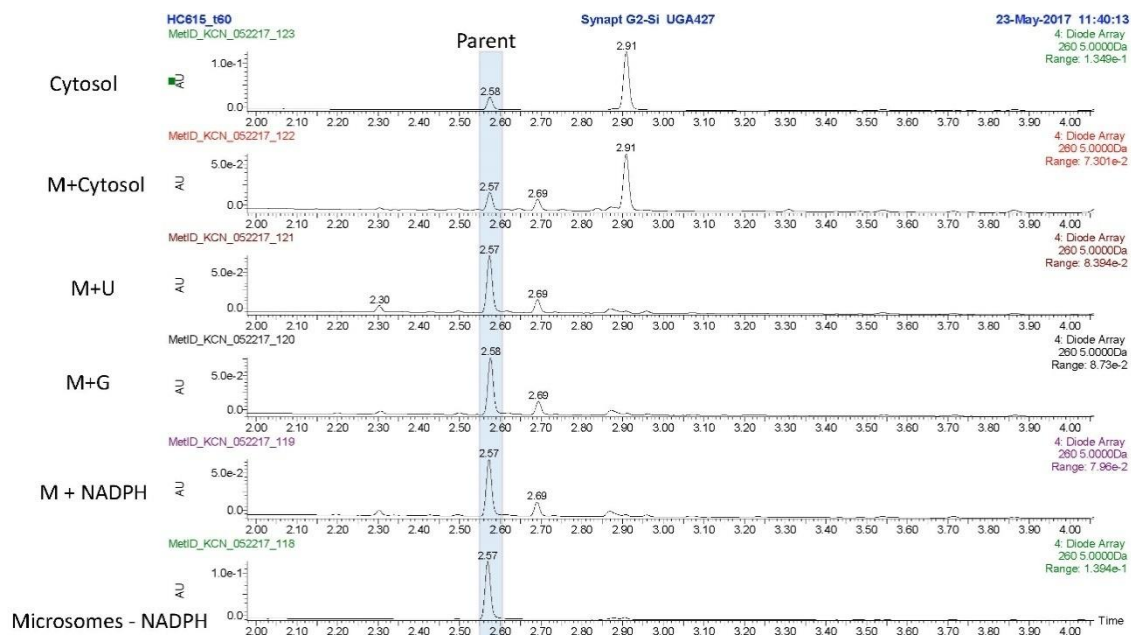


Figure All 3 - UV chromatogram of incubation of TRND319615 in human liver subcellular fractions in different conditions. Cytosol: 2mg/ml of protein. M+cytosol: microsomes (1mg/ml) and cytosol (2mg/ml) with NADPH regenerating system. M+U: microsomes with NADPH regenerating system with UDPGA reaction mix. M+NADPH: microsomes with NADPH regeneration system. Microsomes – NADPH: microsomes without NADPH regenerating system

The metabolism of this molecule was mainly on the piperidine moiety. An oxidative metabolite was observed in the incubation without NADPH, suggesting that AO mediated metabolism took place, most likely on the quinoline moiety to produce M466d. A cyanide adduct, M489, was observed along with other metabolites formed in trace quantities in the presence of NADPH. A UV chromatogram depicting the distribution of each metabolite is shown in **Figure All4**.

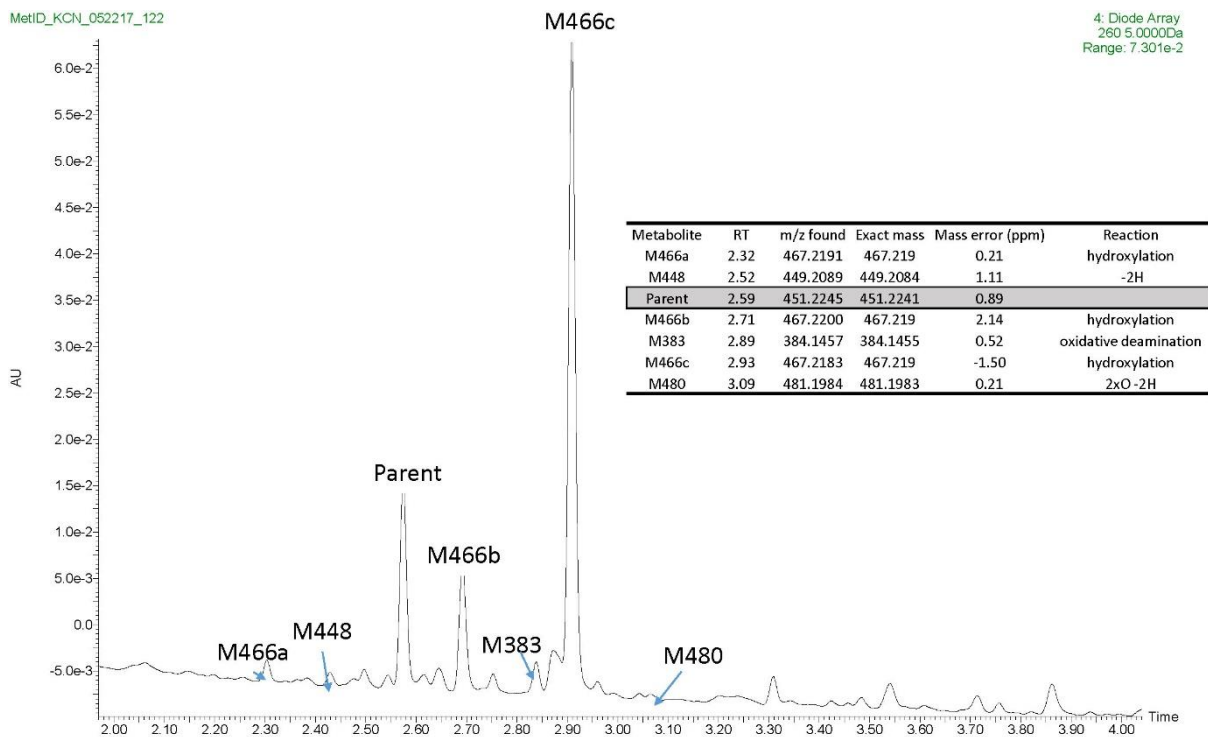


Figure All 4- UV chromatogram with localization of each metabolite of TRND319615.

The UV chromatogram of TRND319114 in different incubation conditions is presented in **Figure All5**. TRND00319114 appeared to be metabolized moderately in human liver microsomes.

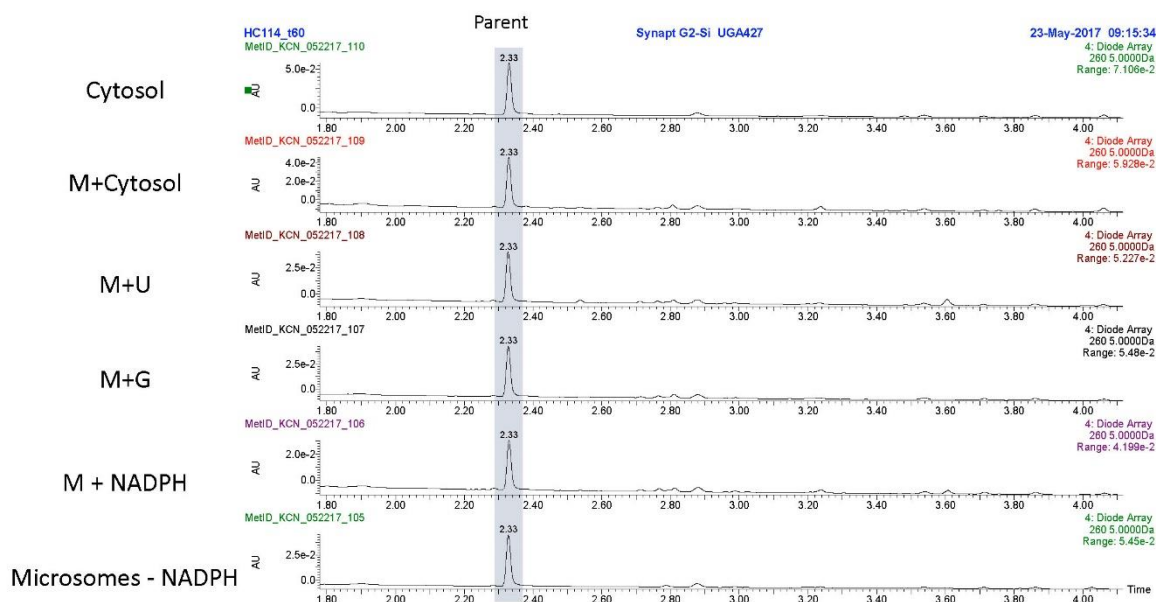


Figure AII 5 – UV chromatogram of incubation of TRND319114 in human liver subcellular fractions in different conditions. Cytosol: 2mg/ml of protein. M+cytosol: microsomes (1mg/ml) and cytosol (2mg/ml) with NADPH regenerating system. M+U: microsomes with NADPH regenerating system with UDPGA reaction mix. M+NADPH: microsomes with NADPH regeneration system. Microsomes – NADPH: microsomes without NADPH regenerating system.

Aliphatic hydroxylation of the piperazine ring to give M436a and M436b and further oxidation to M452 were the metabolic pathways observed. No metabolites were observed in the presence of cytosol, suggesting AO oxidation only occurred at the α -position of quinoline since this position was blocked by a methyl group. No glucuronide conjugates were observed in UDPGA-fortified human liver microsomes. No GSH or cyanide adducts were detected in trapping experiments indicating that reactive intermediates were not formed, the UV chromatogram with the representation of each metabolite is represented in **Figure AII6**.

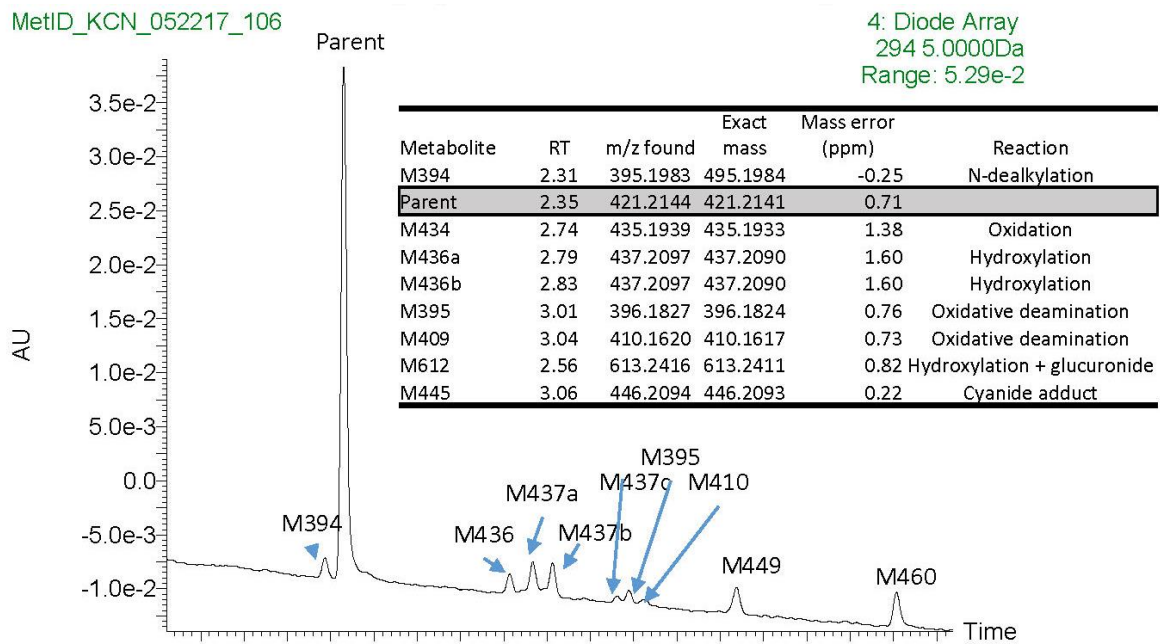


Figure All 6 – UV chromatogram with localization of each metabolite of TRND319114.

The UV chromatogram of TRND506894 is presented in Figure All7.

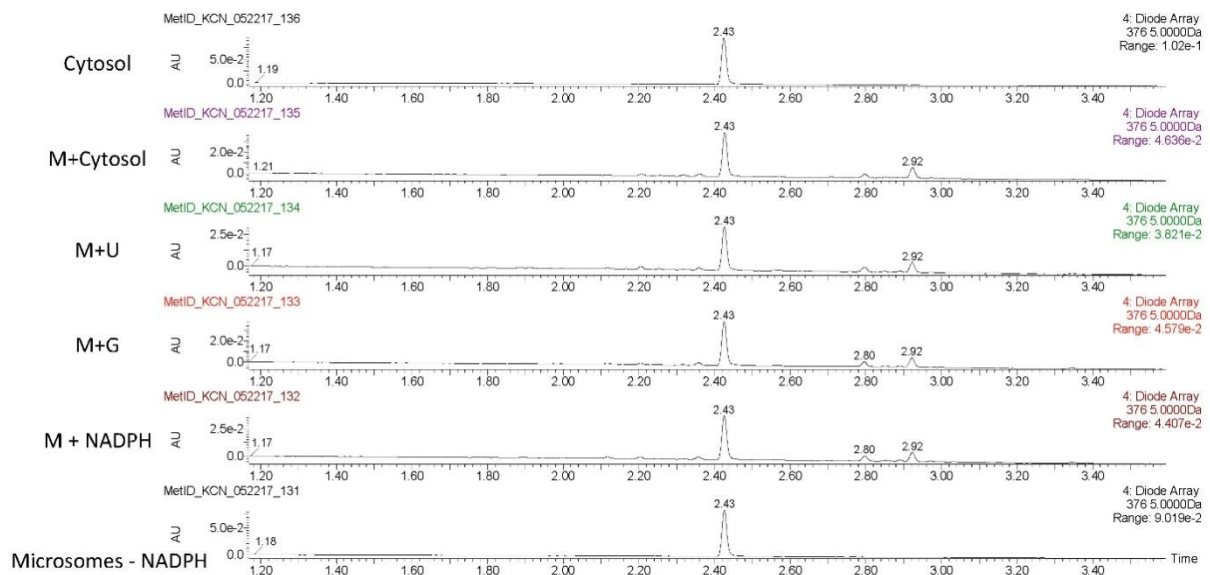


Figure All 7 - UV chromatogram of incubation of TRND506894 in human liver subcellular fractions in different conditions. Cytosol: 2mg/ml of protein. M+cytosol: microsomes (1mg/ml) and cytosol (2mg/ml) with NADPH regenerating system. M+U: microsomes with NADPH regenerating system with UDPGA reaction mix. M+NADPH: microsomes with NADPH regeneration system. Microsomes – NADPH: microsomes without NADPH regenerating system

It was not observed metabolite formation in the cytosol incubation, the main site of metabolism was on the ethoxy-piperidine moiety. However, a cyanide adduct, M503, was observed in small amounts. In Figure 8 a UV chromatogram at 376 nm is shown with the retention time of each metabolite.

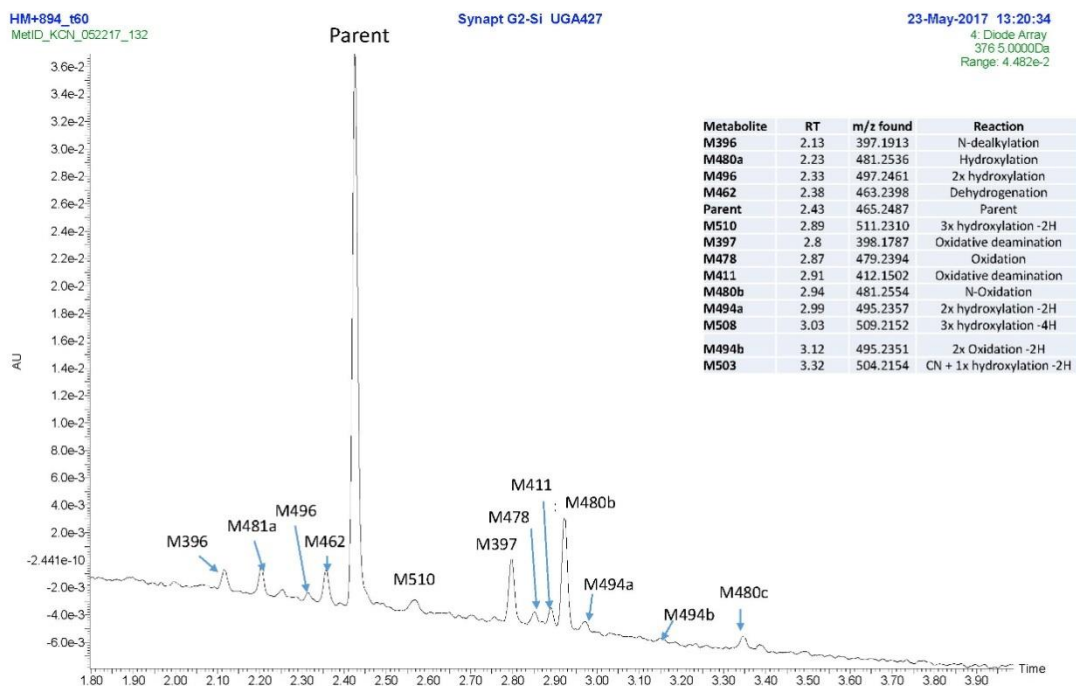


Figure All 8 - UV chromatogram with localization of each metabolite of TRND506894.

Metabolite identification of TRND344615, TRND319114 or TRND506894 by LC/MS

The metabolite identification of LDN-193189 pointed out soft spots in the molecule that would lead to bioactivation into toxic anilines species or would be intensively metabolized by AO leading to short half-life and unpredictable exposure (Xu et al, 2013). Therefore **TRND344615** was designed and synthesized to overcome the aniline formation of the piperazine ring. Its metabolites were identified and are depicted in **Figure All9**. Several metabolites were found from the hydrolysis of the piperidine ring, yet none of them pointed out to the formation of anilines. The metabolite M466d formed by AO as expected due to the maintenance of its active site at the quinolone moiety. CYP mediated oxidation of the (piperidin-1-yl)ethoxy moiety occurred to produce the metabolites M448, M446a, M446b and M446c. Oxidative deamination

occurred to form M383 and M397 and only one cyanide adduct was found in trace quantities, M489.

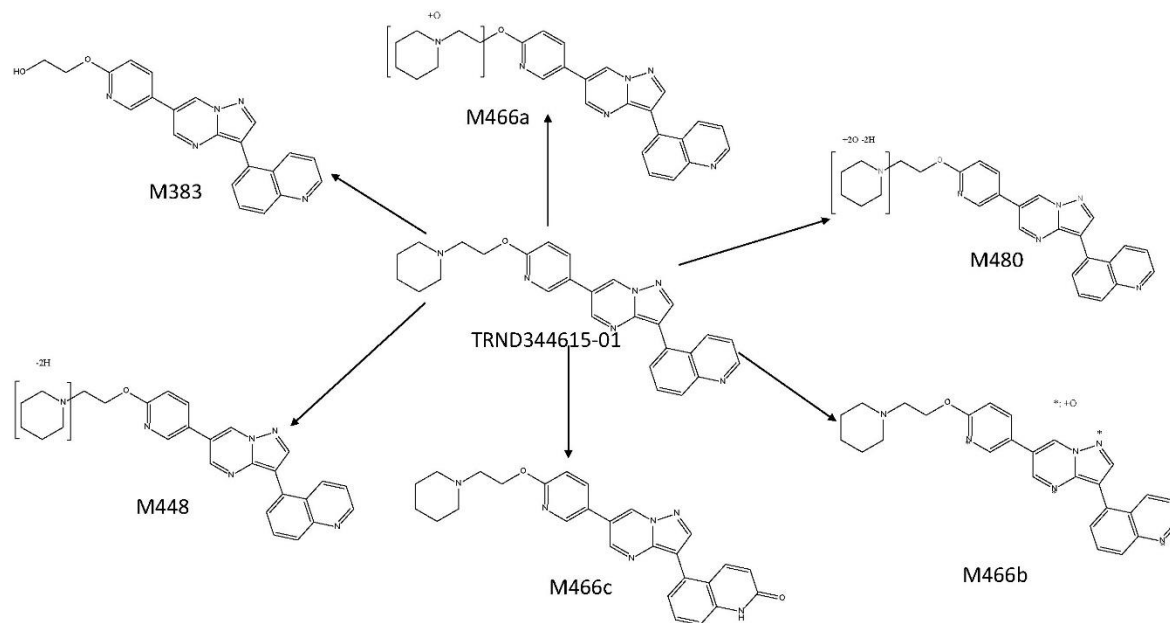


Figure AII 9– Metabolite pathway of TRND319615.

On the other hand, the TRND319114 was metabolized by microsomes exclusively in the piperazine moiety to generate three oxidative derivatives M436a, M436b and M452. As observed in the UV chromatograms, no AO derivatives were observed for this compound. Also, no aniline derivatives were observed. However, in different species, the piperazine moiety may be a sensitive site for bioactivation of the molecule and may generate aniline products since this moiety was not modified. **Figure AII10** depicts the metabolites from **TRND319114**.

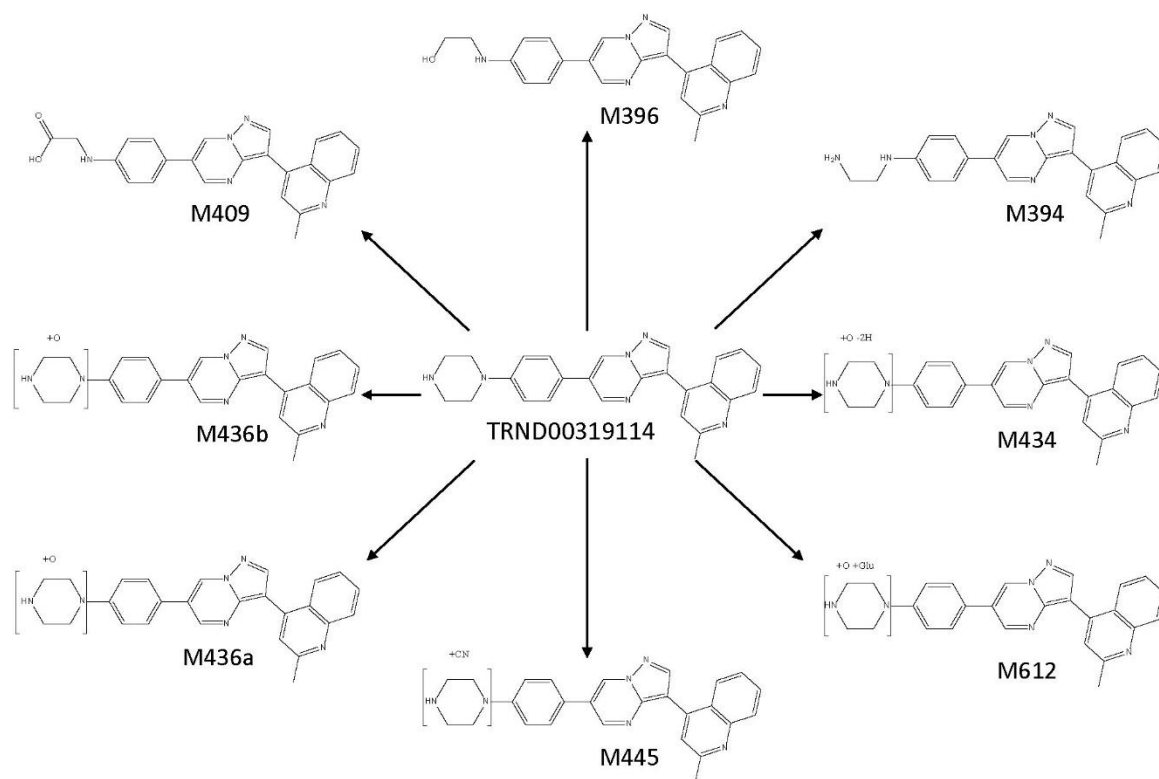


Figure AII 10 – Metabolite pathway of TRND319615.

TRND506894 metabolite identification revealed several oxidation/hydroxylation sites, mainly on the piperidine ring, the metabolites M480a, M496, M510 and M494a are examples. It was not observed aniline formation nor cytosolic metabolism. The piperidine ring opening generated the metabolites M396, M397 and M410. It was identified trace quantities of a cyanide adduct, M503. The metabolite identification of TRND506894 is shown in **Figure AII11**.

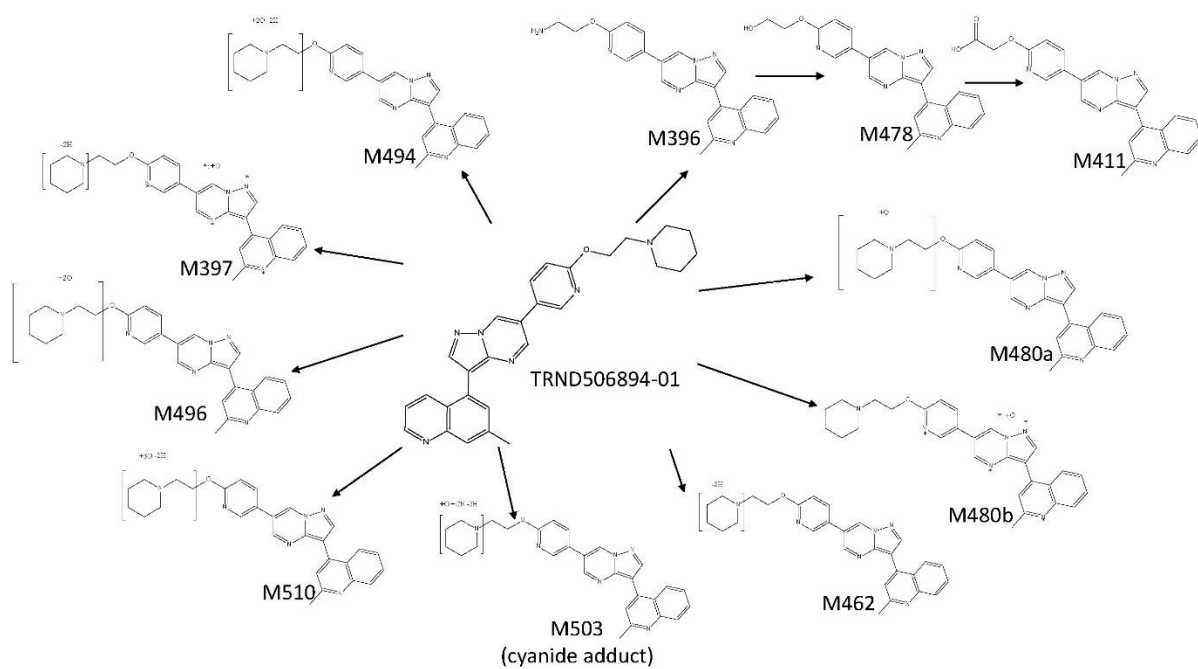


Figure All 11 - Metabolite pathway of TRND506894.

Discussion

In a previous study, the *in vitro* metabolism study results show that LDN-193189 is extensively metabolized by cytosol enzyme aldehyde oxidase (AO) with a minor contribution from NADPH dependent metabolism related to CYP450. The major metabolite identified was M422c in presence of cytosol in the majority of the species studied, except in dog and rat. In the absence of cytosol, a variety of metabolites were identified, mainly from the metabolism at the piperazine moiety by CYP450. The metabolites M431 and M445 were only observable in KCN trapping experiments, therefore these metabolites' precursors are unstable hard electrophiles. An aniline metabolite M337 was also detected, which raised the concern of drug safety as the association of aniline with genotoxicity has been widely reported (121). To address the metabolic liabilities of aniline and reactive metabolite formation as well as the AO-mediated metabolism as the major metabolic pathway for LDN-193189, additional structure optimization effort has been implemented. The newly synthesized compounds, such as TRND344615 and TRND319114, have the reduced isolated metabolic liabilities identified for LDN-193189 and based on their metabolism study, TRND506894 was synthesized through the combination of these isolated successful modifications into a compound that avoided LDN-193189 metabolic liabilities. A summary of this work is presented in Figure AII1.

The AO-mediated formation of the M422c is probably the perpetrator of the low half-life observed by Yu and coworkers in LDN-193189's *in vivo* pharmacokinetic studies (97), which was further confirmed by tracing the NIH-Q55's *in vivo* concentrations in later PK studies (data not shown). Moreover, the metabolite profile obtained from human liver microsomes (HLM) showed a significant dependence on AO for its metabolism as the CYP450 mediated metabolism was minimal (XU et al, 2013). Notwithstanding the short half-life, AO mediated metabolism may represent a threat to a drug's success as observed by Zetterberg and co-authors in the study of VX-509 (decernotinib) (112). In the VX-509 case, preclinical trials did not consider the AO-mediated metabolism. When the molecule reached clinical trials, unforeseen drug-drug interactions were observed and later discovered to be caused by an AO exclusive metabolite. It caused serious restrictions to the use of the novel drug. Also, the AO susceptibility, even when no toxic metabolites are formed, is detrimental to a drug's profile due to unpredictability of the exposure of such compound to the patients because the level of activity of the enzyme may vary up to 17 fold from patient to patient (122).

Another concern about the great contribution of AO to LDN-193189 metabolism is the selection of preclinical animal models for drug safety evaluations. Besides the variability in humans, AO activity is differently expressed throughout mammals (123-125). In Xu and co-authors study (2013), the M422c metabolite was formed in significant quantities in liver microsomes fortified with cytosol from mice, rabbits, monkeys and humans. Dogs, which are known to be deficient or have low activity of AO (123, 126), and rats produced a small amount of this metabolite compared with other species.

Because of these liabilities and the high clearance generated by the AO-mediated metabolism on LDN-193189, new analogs were designed to avoid AO metabolism route and one strategy is to block the 2-position of AO metabolic site. Therefore TRND00319114 was synthesized and Met ID study confirmed this compound would not generate AO oxidation metabolite in the presence of cytosol (**Figure All10**). A methyl group was used to block the labile 2-position on the quinoline ring and was found effective in solving the AO-mediated metabolism.

Bioactivation of LDN-193189 to form a reactive intermediate was demonstrated by the presence of cyanide adducts in liver microsomal extracts from all species. It is proposed that an iminium derivative of the piperazine moiety was produced as a reactive intermediate, which subsequently was trapped by the cyanide. Cyanide conjugate M431 and a further oxidized derivative, M445, were observed in all species when KCN was added to the incubation mixtures (Xu et al, 2013). This suggested that LDN-193189 could be bioactivated, forming a reactive intermediate that could be trapped by a hard nucleophile such as cyanide (113). Based on the mass spectral data, the bioactivation was localized on the piperazine moiety forming an iminium derivative. There is ample precedence in literature that describes the formation of iminium intermediates from alicyclic amines such as nicotine (127, 128). Trapping studies conducted with GSH showed that there were no “soft electrophiles” produced from LDN-193189 in the presence of liver microsomes from all species (113, 114).

Beside from the iminium formation, CYP450 mediated metabolism also formed an aniline derivative, caused by N-dealkylation of the piperazine moiety, present in the metabolite M337. It is well described that aniline is a reactive metabolite that may be originated from piperazine moiety and may cause various adverse effects (129-131). The metabolite identification strategy was also employed by Liu et al (132) to identify reactive metabolites of gefitinib which generated iminium products that possibly

contribute to the adverse effects of the drug. The strategy of cyanide trapping was key to finding gefitinib reactive metabolites.

Piperazine moiety is a structural alert in a molecule due to its liability to be bioactivated into iminium metabolites (131). Further, the piperazine in LDN-193189 also went through N-dealkylation to form the aniline derivative, M337. The aniline toxicity is widely known in literature and is also a structural alert (119, 131, 133, 134). Aniline compounds are bioactivated by CYP enzymes to generate reactive oxygen species (ROS) that may cause cell damage (135). In general, aniline derivatives are oxidized to N-hydroxylamine, which can be further oxidized to the stable nitrobenzene metabolite via the intermediate nitrosoamine, it is a soft electrophile that may react with proteins. Also, phase II metabolism of N-hydroxylamine could lead to further reactive species with potential to cause cell damage and is known to cause mutagenicity (133, 136).

To avoid the bioactivation of piperazine and further dealkylation to aniline, an alkyl substitution α to the N-pyridine may protect the structure against the CYP mediated bioactivation. Also, substitution of the *p*-nitrogen of the piperazine ring would also decrease the reactivity of the structure (131, 137). Moreover, the addition of a metabolic soft spot that would shift the metabolism and circumvent the piperazine ring bioactivation may be used (131). Based on these possibilities, modifications of LDN-193189 were studied to avoid the aniline and iminium formation that the piperazine moiety presented. In the molecule TRND344615, the phenyl piperazine moiety in LDN-193189 was replaced by a 4-(2-(pyridin-2-yloxy)ethyl)piperidine group. This modification added metabolic soft spots to the structure and changed the piperazine ring for a less reactive structure. Altogether, the structure is less likely to produce iminium/aniline related metabolites as observed in **Figure AII6**.

The metabolite identification technique allowed the determination of liabilities in LDN-193189 molecule that oriented the further optimization steps required to obtain a metabolic stable compound without AO susceptibility and in absence of toxic metabolite formation. The metabolite identification is growing as an important tool in drug discovery and optimization of leads in several occasions (132, 138). Presently, metabolism studies cannot ignore the aldehyde oxidase enzyme as an important metabolic pathway that may hinder the success of novel compounds (111, 112, 126). Also, due to AO species specific activities, in vitro studies with S9, microsomes and/or cytosols must consider the use of material from different species, such practice may also guide the selection of a future preclinical animal model (125). Our study also

comprehended the analysis of reactive metabolites such as iminium and aniline, these chemical species must be observed or some unstable metabolites might remain unnoticed (132). Based on our results that considered all these important variables of metabolite identification, we proposed 2 examples of molecules that corrected the liabilities, molecules TRND344615 and TRND319114. As a proof of concept, we synthesized the compound TRND506894, the idea behind it was to avoid both AO and aniline formation strategies used in TRND344615 and TRND319114, respectively. The combination of the strategies was analyzed by the metabolite identification of TRND506894 (**Figure AII11**). It was not observed aniline formation or AO activity on this structure.

Hence, the liabilities presented for LDN-193189, AO metabolism dependence and aniline formation were addressed in this work. It is well known that AO is expressed differently in humans and if the clearance of this compound is dependent upon AO, a significant variability in exposure values will be observed in subjects. We proposed a suitable optimization in molecule TRND319114 which our results show that avoided AO activity. Based on the identity of metabolites found in microsomal extracts, it is proposed that modification of the piperazine moiety was warranted to mitigate the formation of iminium reactive intermediate as well as to abolish the formation of anilines, the presence of which may have toxicological consequences. The TRND344615 molecule presents a viable alternative for modification of the piperazine moiety and avoid those liabilities. Our structure optimization based on metabolite identification culminated in the synthesis of the compound TRND506894, where the strategies to block the site of AO mediated metabolism and avoid aniline formation were combined, and the result is a compound more stable against AO metabolism and theoretically less toxic, perhaps with retention of pharmacological activity. An FOP therapeutic alternative is still being pursued. Novel candidates such as K02288, DMH1 and derivatives from LDN-193189 (LDN-214117, LDN-212854) were recently evaluated (139, 140); new targets to treat FOP, such as inhibitors of ACVR1 gene expression, are being tested as novel targets to treat the disease (141); and palovarotene, a retinoic acid receptor γ (RAR γ) agonist, successfully treated FOP in animal models (142) and is currently in phase II Clinical Trials by Clementia. Aiming to contribute to the FOP therapeutics and to emphasize the role of metabolite identification in the structure optimization of compounds in the drug discovery phase, this work describes the importance of metabolite identification in finding liabilities of LDN-193189 and the use of metabolite identification to evaluate backup drugs synthesized to avoid those liabilities leading to an optimized compound.

APÊNDICE III – MANUSCRITO SUBMETIDO PARA PUBLICAÇÃO NA THE JOURNAL OF PHARMACOLOGY AND EXPERIMENTAL THERAPEUTICS

***In vitro* and *in vivo* methods for Bioavailability screening: application to thiazolidinedione candidates GQ-02, GQ-11, GQ-19 and GQ-177.**

Authors: Elias C. Padilha, Michel L. Campos, Marco A. F. Nogueira Filho, Rone A. De Grandis, Jonata A. de Oliveira, Emiliana M. de Paula, Manuel A. H. Alzate, Marina R. Galdino-Pitta, Eliana A. Varanda, Ivan R. Pitta, Rosangela G. Peccinini

Affiliations:

ECP, MLC, MAFNF, RADG, JAO, EMP, MAHA, EAV, RG: School of Pharmaceutical Sciences, Sao Paulo State University, Araraquara, Brazil.

MRGP, IRP: Nucleus of Research in Therapeutical Innovation Suely Galdino, Bioscience Center, Federal University of Pernambuco, Pernambuco, Brazil.

Running Title Page

Running title: Bioavailability screening of thiazolidinedione candidates

GQ-02, GQ-11, GQ-19 and GQ-177

Corresponding author:

Rosangela Goncalves Peccinini

Department of Natural Active Principles and Toxicology,

Sao Paulo State University, Araraquara, Brazil.

School of Pharmacy/UNESP-Araraquara

Rodovia Araraquara-Jau, km1

Araraquara, SP, Brazil. 14800-903

Email: peccinin@fcar.unesp.br

Phone: +55 (16) 33016988

Number of text pages: 28

Number of tables: 5

Number of figures: 6

Number of references: 39

Number of words in the Abstract: 246

Number of words in the Introduction: 738

Number of words in the Discussion: 1503

Abbreviation: TZD: thiazolidinedione, CARRS: Cassette-accelerated rapid screen, LAFEPE: Laboratório de Planejamento e Síntese de Fármacos from Universidade Federal de Pernambuco, IVIVC: *in vitro/in vivo* correlation

Recommended section assignment: Drug Discovery and Translational Medicine

Abstract

Diabetes is a worldwide growing problem that can be pharmacologically controlled by many drug classes and mechanisms. Among them, the thiazolidinediones (TZDs) class is particularly interesting, however, current marketed drugs from this class present serious adverse effects. Addressing this issue, the researchers from LAFEPE, Brazil, synthesized and selected the compounds GQ-02, GQ-11, GQ-19 and GQ-177. These candidates have shown promising *in vitro* and *in vivo* activity over glycaemia, lipid profile, inflammatory and atherosclerosis formation. This study aimed to evaluate aspects of the bioavailability of the GQ-02, GQ-11, GQ-19 and GQ-177 to select the compound(s) with the appropriate characteristics to proceed to preclinical studies. We evaluated stability in solutions of relevant pH (1.2 and 7.4), the log P, Caco-2 monolayer permeability and used CARRS method to assess *in vivo* bioavailability to confirm *in vitro* studies. Drug concentrations were quantitated by UPLC-UV. The stability assay showed that all candidates were subjected to degradation in at least one condition. The log P revealed suitable values for oral absorption for the compounds GQ-19 (2.1) and GQ-177 (3.5). However, GQ-19 was the only compound permeable through the Caco-2 cell monolayer. After oral administration to Wistar rats, GQ-02, GQ-11 and GQ-177 retrieved no measurable systemic concentration. GQ-19 was not tested due to its instability in plasma. In conclusion, the activities observed in many experiments are probably due to products formed through degradation/metabolism of these molecules before absorption. Studies on metabolite identification are needed to describe metabolites that present the pharmacological activity elsewhere observed.

Introduction

Diabetes is a worldwide growing problem (WHO, apr 2015 Global Report on Diabetes). Among the many drugs that are used to aid the treatment of the syndrome, are the thiazolidinediones (TZDs) class of compounds. These drugs activate the peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs), in particular the gamma isoform (PPAR- γ), which not only improve glycemic control but also improve the lipidic and inflammatory profile of the patient; important factors also altered by the disease and contribute for the diabetes pathogenesis (1, 3).

The only marketed drugs from this class are pioglitazone and rosiglitazone. However, pioglitazone presents adverse effects such as weight gain and risk of bladder cancer (143), while rosiglitazone presents more restrictions due to its pronounced cardiac adverse events and its use is carefully observed. Rivoglitazone, a TZD under development by Daichi Sankyo is continuously advancing in clinical trials (144, 145), revealing the potential of TZDs in controlling Type 2 Diabetes Mellitus (T2DM). Therefore, the therapeutics of diabetes would be improved by a TZD alternative that presents a wide range of beneficial effect over this syndrome.

Addressing this issue, the researchers from Laboratório de Planejamento e Síntese de Fármacos from Universidade Federal de Pernambuco (LAFEPE) synthesized and selected promising TZDs regarding anti-atherosclerosis activity(6). Among them stood out the GQ-02, GQ-11, GQ-19 and GQ-177 (Fig. 1).

These drugs have shown promising *in vitro* and *in vivo* activity over glycaemia, lipid profile, inflammatory signaling and atherosclerosis formation

(da Costa Leite et al., 2007, Mourao et al., 2005, Araujo et al., 2016, Araújo et al., 2011, Soares and Silva et al., 2015). The next step into their discovery process is to evaluate their pharmacokinetics and propose a regimen for preclinical trials. In order to be convenient for the patient, these candidates must be compatible with oral absorption (15).

Stability is essential to predict the pharmacokinetic behavior, particularly in enteral administration (11). Markopoulos *et al.*(25) present a series of tests for the evaluation of gastrointestinal stability of molecules. They propose the use of solutions that mimic the conditions of the digestive tract with different levels of complexity, these tests allow the prediction of degradation scenarios prior to absorption. The assessment of lesser complexity (level 0) is simply the study of stability at different pHs, it can be applied to start *in vitro/in vivo* correlations (IVIVC) and was selected as a suitable method to screen the drug candidates.

Another factor that is predictive for drug absorption is the partition coefficient ($\log P$). It has a direct influence on the events that follow enteral administration of drugs. It is directly related to the solubility of the compound in the stomach and intestinal fluids, and also influences the permeability of compounds through cell membranes involved in absorption process (9).

A method often used to predict the *in vitro* intestinal permeation of drugs is the Caco-2 permeability assay. This test has high correlation with the permeation observed in enterocytes and it is well-established and widely used in order to predict the absorption of new drug candidates (14, 35, 49).

Despite all the tools used to predict oral absorption of new drug candidates, the *in vivo* system is often required for confirmation. In the present study, an adaptation of the Cassette-accelerated rapid rat screen (CARRS) was used. Each compound is administered orally to two rats. The rats are sampled through 6 time points over 6 hours. Differently from the CARRS method, we did not mix the blood samples from the 2 animals for each time point (7, 10). This screening method not only is useful for selecting drug candidates with oral absorption but it also can calculate, with 80% accuracy, the pharmacokinetic parameters of those compounds. It has also been proven useful for filtering, among 5289 compounds, those with desirable pharmacokinetic characteristics for further development in industry (85).

Therefore this study aimed to evaluate aspects of the bioavailability of the GQ-02, GQ-11, GQ-19 and GQ-177 to select the compound(s) with the appropriate characteristics to continue the preclinical studies. In this study, we conducted physicochemical, *in vitro* and *in vivo* assays to determine characteristics that influence the bioavailability of these candidates. Also, the compounds intravenous pharmacokinetic parameters were determined for characterization purposes.

Materials and Methods

Chemical and Reagents. The compounds 5-(4-chlorobenzylidene)-3-(4-methylbenzyl)thiazolidine-2,4-dione (GQ-2), 5-((1H-indol-3-yl)methylene)-3-(4-methylbenzyl)thiazolidine-2,4-dione (GQ-11), 3-(4-methylbenzyl)-5-(4-nitrobenzylidene)thiazolidine-2,4-dione (GQ-19) and 3-(3-bromobenzyl)-5-(4-

(methylsulfonyl)benzylidene)thiazolidine-2,4-dione (GQ-177) were synthesized at the Laboratory of Design and Drug Synthesis (LPSF) of the Federal University of Pernambuco (Recife, Brazil). The thiazolidine derivatives were synthesized by the nucleophilic Michael addition of substituted 3-benzylthiazolidine-diones on substituted cyanoacrylates to obtain the benzylidene-thiazolidine-2,4-diones (GQs) (6, 21).

Acetonitrile (HPLC grade) was purchased from J.T. Baker (Mexico City, Mexico). Purified water was obtained Water in a Milipore system. Dulbecco's modified eagle medium (DMEM), fetal bovine serum (FBS) and Hank's salt solution were purchased from Gibco-Invitrogen (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Resazurin sodium salt (CAS 62758-13-8), benzimidazole (CAS Number 22994-85-0), dimethyl sulfoxide (DMSO, CAS 67-68-5), fluorescein (CAS 2321-07-5) were obtained from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA).

Chromatographic methods. The chromatographic system was the Waters Acquity Ultra High Performance Liquid Chromatography (UHPLC) system equipped with UV-Vis detector and a computer system for data acquisition (Empower®, Waters). Due to the many matrixes evaluated, there were different chromatographic conditions. The analytical conditions are listed on Table 1.

All columns were protected by guard-columns of the same characteristics and kept at 30°C temperature. Due to the different matrixes used in our assays, different validations were necessary. A summary of the analytical/bioanalytical parameters is presented in Table 2.

Physicochemical screening

Chemical Stability. The stability study was performed at pH 1.2 in order to mimic the pH in the gastric environment. The result will help to infer about the stability of substances during its path through the gastric tract. Further, the molecules were evaluated in pH 7.4, the pH of the buffers used in the Caco-2 *in vitro* assay and the pH of the plasma.

Stability Assessment at pHs 1.2 and 7.4. Three replicates of the drug candidates at 2 concentrations, 8 µg/mL and 0.5 µg/mL were used. Samples were subjected to a 6 hours degradation assay in pH 1.2 (Clark-Lubs buffer, KCl/HCl) or pH 7.4 (Na₂HPO₄/HCl) solutions. The mixtures were kept under constant stirring and temperature (37°C). Samples were collected at 0, 0.08, 0.25, 0.5, 1, 2, 4 and 6 hours. The samples were analyzed by the chromatographic method previously shown. The mean concentration values at the various sampling times are presented as percentage of initial concentration, which was set as 100%. Analyte was considered stable while compound concentration at time t is less than 15% different than concentration in time 0.

Log P. To determine log P of the drug candidates, we used the chromatographic method. It was proposed by Veith et al (1973) (VEITH G. D., 1979) and adopted by the OECD (Organization for Economic Co-operation and Development) in the guide of 2004 (146). Log P standards (Table 3) were used to build a log P vs log *k* curve that allowed to interpolate new molecules log *k*.

The chromatographic method used for log P determination was the Acquity® UPLC system with UV-Visible detector. The separation was performed by a BEH 2.1x50mm column, with BEH pre-column (1.7µm 2.1x5mm, 1.7µm)

maintained at 30°C. The mobile phase was methanol:0.1% formic acid (70:30) with a flow rate of 0.4 ml/min. The injection volume was 1 µl.

***In vitro* Screening**

Cell viability studies. In order to determine the optimal drug concentrations for the permeability assay, the alamarBlue (resazurin) cell viability assay was performed. The Caco-2 cell line was obtained from the Rio de Janeiro Cell Bank(no. 0059). Caco-2 cells was cultured in DMEM high glucose containing 20% of FBS, at 37 °C in 5% CO₂ atmosphere.

The alamarBlue assay is based on the chemical reduction of the oxide-reducing (REDOX) dye resazurin that both fluoresces and changes color in response to chemical reduction of growth medium resulting from cell growth.

Caco-2 cells were seeded at 1.5×10^4 cells per well in a 96-well plate and incubated for 24 h. On the next day, the drug candidates in stock solutions (10 mg/mL in DMSO) were added to the wells to reach concentrations ranging from 0.39 to 100 µg/mL; DMSO was used as the vehicle control. Following 24 h of incubation, 50 µL of alamarBlue solution (resazurin at 0.01% w/v) was added to each well and the plates were incubated for 4 h. The fluorescence reading was performed in a microplate Synergy H1 (BioTek®) reader using excitation and emission filters at 560 and 590 nm, respectively. The potency of cell growth inhibition for each candidate was used to determine the maximum concentration that had no effect on Caco-2 cell growth (data not shown).

Permeation across Caco-2 cells. The cells (5×10^4 cells/cm²) were

cultured in 12-well Transwell® insert filters (Corning Incorporated, New York, NY) for 21 days following (51). The transepithelial electrical resistance (TEER) of $200 \Omega \times \text{cm}^2$ was determined to ensure the monolayer integrity. The measurement was performed using an epithelial voltammeter Millicell-ERS® (Millipore Corporation, Bedford, MA). The drug candidates GQ-02, GQ-11, GQ-19 and GQ-177 were dissolved in DMSO and subsequently diluted in Hank's buffer at pH 7.4 to prepare the permeability samples in concentrations previously determined by cell viability studies. The initial concentrations (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) were introduced to the apical compartment of the insert filter. Benznidazole and fluorescein were used as assay controls for paracellular and transcellular flux markers, respectively, also at 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$. The experiment started with the introduction of test compounds (3 replicates), the plates were kept under stirring at 37°C in an orbital shaker (25 rpm). The sampling (100 μL) were carried out from the basolateral compartment at 15, 30, 60, 90, 120 and 180 minutes. After each sampling, the replacement of 100 μL of a fresh permeability buffer, maintained at 37°C, was preceded in order to maintain the volume in the compartment. Stability control for all compounds was carried out, the compounds were incubated with the permeability buffer in the same experimental conditions, without cells.

The apparent permeability coefficients (P_{app} , cm/s) were calculated according to the following equation:

$$P_{\text{app}} = VR / (A \times C_0) \times \Delta C / \Delta t$$

where VR is the volume of the receiver compartment (basolateral), $\Delta C / \Delta t$ is the linear appearance rate of the compound on the receiver chamber (in ng/s), A is

the membrane surface area (cm^2) and C_0 is the initial concentration in the donor compartment (ng/cm^3). This formula requires sink conditions, therefore, only receiver concentrations below 10% of the donor concentration were used for calculation.

***In vivo* screening and Preliminary Pharmacokinetic Assessment**

Animal model. Wistar rats weighing approximately 250g were selected. The animals were obtained from the central vivarium of the Botucatu State University of São Paulo - Unesp. The animals were transferred to the experimental laboratory of the Department of Active Natural Principles and Toxicology of the Faculty of Pharmacy and Biochemistry in Unesp/Araraquara. The animals were kept under controlled temperature (23 ± 1 ° C), humidity ($55 \pm 5\%$) and light (Cycle 12 / 12h, lights on the 07h) and balanced feed and water ad libitum. The experiments were conducted in the light phase.

Experimental Protocol for the pharmacokinetic screening of drug candidates based on the Cassette Accelerated Rapid Rat Screen (CARRS).

The protocol was performed by administering (gavage) 10 mg/kg of each drug candidate in a 2% carboxymethyl cellulose suspension in water. The animals were fasted for 12 hours prior to the experiment.

Two Wistar rats were used for each compound. The blood sampling was performed through a cannula surgically implanted in the rat femoral artery. Blood collection was performed at 0.25, 0.5, 1, 3, 4 and 6 h after administration of each substance. Blood samples were processed according to the bioanalytical method developed for each molecule. The protocol was adapted from the CARRS screening method (Korfmacher et al., 2001).

Preliminary Pharmacokinetic Assessment of GQ-11, GQ-177 and GQ-19

Intravenous administration. The animals (n=4) received the compounds (8 mg/kg) by intravenous route, the drug was solubilized in dimethyl sulfoxide (DMSO) (93) to achieve 5 mg/mL concentration. All administrations were performed over a short period, less than thirty seconds. Blood samples (0.25 mL each) were collected from the catheter previously implanted in the femoral artery at 0.08, 0.25, 0.5, 0.75, 1, 1.5, 3, 6, 12 and 24 hours in heparinized tubes. The blood was centrifuged at 13,000 x g for 15 minutes to separate the plasma, which was stored at -20°C until analysis.

Pharmacokinetic Parameters Calculations. The compounds plasma concentration-time profile after intravenous administration were plotted and fit into compartment models. The area under concentration-time curve ($AUC_{0-\infty}$) was obtained using trapezoidal rule plus the extrapolation to infinity by dividing the last plasma concentration by the elimination rate constant (β). The parameter β was calculated as the slope of the log linear regression of the terminal phase in the concentration-time curve. The elimination half-life ($t_{1/2\beta}$) was calculated by dividing the natural logarithm of 2 by β . The parameter α was defined when the bi-compartmental model was employed in the compartmental analysis, it was calculated using the slope of the residual linear regression line through the residual method. Its half-life ($t_{1/2\alpha}$) was calculated by dividing the natural logarithm of 2 by α . Clearance (Cl/f) was calculated by dividing the dose by $AUC_{0-\infty}$, and volume of distribution (Vd/f) was calculated by dividing Cl by β .

All procedures were approved by the Ethics Committee of the Faculty of Pharmaceutical Sciences of CEUA Protocol/FCF/CAr N° 32/2015.

Results

Stability and log P. The results from physicochemical screening highlighted the instability of the drug candidates in the conditions evaluated. GQ-11 was unstable in stomach pH (1.2), decaying to 50% of initial concentration in the first 20 minutes. GQ-177 decayed to 50% of its initial concentration in both in pH 1.2 and 7.4 conditions in the first 20 minutes. GQ-19 was stable in acidic pH 1.2 while in pH 7.4 it was undetectable after 20 minutes (Fig 2). According to Vieira et al (Vieira et al., 2016), GQ-02 was unstable in pH 1.2, and the statistical disappearance could be seen at 0.5 hours. In the pH 7.4 stability test, GQ-02 was stable until 6 hours, the first time point with statistical disappearance was found at 8 hours. The log P of the GQ-19 and GQ-177 were compatible with drug-like compounds for oral administration, with experimental values of 2.0 and 3.5 respectively; GQ-02 and GQ-11 were above the rule of 5 range for drug-like compounds with log P values of 6 and 5.1 (Fig 3, Table 4). *In vitro*, only the GQ-19 permeated Caco-2 cell monolayer and all molecules ended up degrading during the experiment (Fig 4). *In vivo* rat studies confirmed the lack of absorption of all the candidates probably due to permeation and/or stability issues. GQ-19 exhibited plasma instability (Fig 5).

Stability

Figure 2 – Stability of GQ-11, GQ-19 and GQ-177 in pH 1.2 and 7.4 buffers

Log P

The log P was determined by the chromatographic method. The standards used in the calibration of the experiments yielded the equation obtained by linear regression $y = 0.3305x - 0.4581$ and the correlation coefficient, $r = 0.9842$. Using the equation it was possible to obtain the log P values of the drug candidates, the results are shown in Fig 3. The nominal values of each compound is presented in Table 4 along with Lipinski's rule of 5 parameters.

***In vitro* permeability**

Caco-2 permeability assay presented in Fig. 4 shows that GQ-19 was the only candidate to present any permeability across Caco-2 monolayer. The GQ-11, GQ-177 and GQ-02 were below the lower limit of quantification of chromatographic methods (Table 2 – Material and Methods section). Although it was possible to measure GQ-19 Papp, the control, GQ-19 in buffer in the same experimental conditions, revealed a fast degradation of the compound. Because of the instability of the molecule in the test buffer, we were only able to measure GQ-19's concentrations until 1 hour of experiment, the 2 and 3 hours samples were also below LLOQ. Therefore, the apparent permeability of GQ-19, although observed, is not reliable due to the rapid degradation of the compound.

***In vivo* bioavailability**

During the method validation for the quantification of GQ-11, GQ-177 and GQ-19 in plasma, the GQ-19 presented pronounced instability in rat plasma matrix. The decay presented in Fig. 5 demonstrates that the molecule cannot be

detected after 10 minutes after dilution in rat plasma. Therefore, we were not able to determine the concentrations of GQ-19 in plasma and thus, the protocol of *in vivo* administration of the drug to animals was not performed for GQ-19.

GQ-11 and GQ-177 were administered to Wistar rats via oral route according to protocol described in Material and Methods but the drugs could not be detected in rat plasma, corroborating findings of Caco-2 and stability experiments.

Intravenous administration of GQ-11

GQ-11 and GQ-177 were administered intravenously to Wistar rats (n=3), however, it was not possible to obtain measurable plasma concentrations of GQ-177. Therefore, only GQ-11 retrieved measurable concentrations and its concentration versus time curve is shown in Fig 6.

The model that best described the behavior of GQ-11 was the bicompartamental model. The pharmacokinetics parameters extracted from the concentration versus time curve is shown in Table 5.

Discussion

In our work we evaluated important aspects of bioavailability of the drug candidates GQ-02, GQ-11, GQ19 and GQ-177. The aspects of stability in solutions of relevant pH (1.2 and 7.4) showed that all drugs were subjected to degradation in at least one condition. The compounds GQ-19 and GQ-177 presented suitable log P values for oral absorption, 2.1 and 3.5 respectively, both below 5, as proposed by Lipinski's rule of 5. However, it was not observed permeation across Caco-2 cells for GQ-177 and, although GQ-19 control

presented acute degradation in experimental conditions, GQ-19 was permeable through the Caco-2 cell monolayer. The *in vivo* assessment, in oral administration of compounds to Wistar rats, GQ-11 and GQ-177 retrieved no measurable systemic concentration. GQ-19 was not tested because of its instability in plasma.

The stability tests carried out in this study aimed to observe the ability of each compound to endure the pH of environments in which drugs are required to access during drug absorption process. A pH 1.2 in distilled water or simple buffer solution represent a level 0 assessment (25). Normally this assessment is performed for biopharmaceutical classification purposes in order to determine if the solubility of a compound is faster than the gastric emptying (13). We used the same concept to understand if the drug would be stable enough to present satisfactory bioavailability. The results varied greatly from molecule to molecule, GQ-11 presented great instability in pH 1.2, while GQ-19, at the same pH, was stable in both concentrations evaluated. While at pH 7.4, GQ-19 was unstable, while GQ-11 was the opposite. In a middle ground, GQ-177 degraded in both conditions tested but not as far as undetectable levels, around 50% of GQ-177 remained in both pHs evaluated. As a matter of comparison, rosiglitazone was stable in simulated intestinal fluids (pH 6.8) for 4 hours at 40°C and in simulated gastric juice (pH 1.2) for at least 2 hours at 37°C (147). Pioglitazone at room temperature was tested in various pH conditions by Kulkarni et al for 2 days and, in the worst case scenario, they found 16% degradation at pH 6.8. At pH 7.4, pioglitazone degraded around 7% and at 1.2, only 2% (148).

The impact of the stability assays over the oral absorption are comparable to that of metabolic stability to drug exposure. If the drug is not stable enough in

gastric/enteral environment to be absorbed, it will not reach enough systemic exposure to produce its pharmacological activity. The comparison with metabolic stability is pertinent because it is a more common assay for pharmacokinetic assessment in a preclinical phase and aims to ensure systemic exposure of a drug based on its stability to the metabolic enzymes, mainly from the liver (149). Screening methods employed in early drug discovery stages have evaluated both metabolic stability and stability in simulated gastric fluids for those reasons (150). GQ-19 was the only molecule stable in pH 1.2 assay, GQ-11, GQ-177 and GQ-02 (19) were not stable in pH 1.2, which implies an expectancy of maximum bioavailability through oral route limited by the stability those compounds. However, GQ-19 was very unstable in pH 7.4. The stability in that pH is useful both for evaluating a physiological plasma pH and for evaluating the PBS pH in which cell based *in vitro* assays are conducted. GQ-11 and GQ-02 were stable in that pH for at least 6 hours, therefore cell based *in vitro* assays are reliable for these molecules and these molecules are likely to be stable in the plasma taking into account only its pH.

Also aiming to predict oral absorption of the compounds we assessed their log P through the chromatographic method. The log P of GQ-19, GQ-177, GQ-11 and GQ-02 were 2.1, 3.5, 5.1 and 6 respectively, while log P for pioglitazone is 2.72-3.73 and rosiglitazone is 2.78-3.02 (151). In comparison with pioglitazone and rosiglitazone, only GQ-19 and GQ-177 presented log P in the same range of commercial TZDs. Still, Lipinski rules may also help to understand differences between the drug candidates herein tested and reference rosiglitazone and pioglitazone (24). From Table 4, we can observe that the drug candidates are within Lipinski rules apart from the log P of GQ-11 and GQ-02.

Only one violation of the rule is not critical for the outcome of a drug candidate but the high log P is not favorable for the drug oral absorption.

The cell based assay for permeability was carried out in Caco-2 cells. As a result from the latter screenings, we expected instability of GQ-19 and GQ-177 in the assay buffer, which was Hanks' buffer (pH 7.4). Therefore, we used controls without cells to observe degradation in the experiment conditions. As expected, GQ-19 was rapidly degraded, but unexpectedly permeated through Caco-2 monolayers, as measurable concentrations were observed in the basolateral compartment. GQ-11, GQ-177 and GQ-02 which were relatively stable in pH 7.4, however, did not present measurable concentrations in the basolateral compartment of Caco-2 experiments. Comparing with literature, pioglitazone has a bioavailability of 85% in humans and around 47% in rats (152), while rosiglitazone has approximately 99% of bioavailability in humans (84) and 100% in rats (153). Through this screening, where only GQ-19 was able to permeate biological membranes, added to the low stability in aqueous solutions at pH 1.2 and 7.4 of all compounds and the log P data, in which GQ-19 and GQ-177 were in a drug-like range, led us to expect some bioavailability of GQ-19 in Wistar rats for the next screening step.

However, GQ-19 was not stable in plasma matrix, being degraded in less than 20 minutes (Fig 7). GQ-11 and GQ-177 were administered to Wistar rats and the predictions from physicochemical and cell assessments were confirmed, no measurable concentration was verified in the plasma samples collected after oral administration. A conclusion also observed by Vieira et al (19), where plasma samples collected from Wistar rats also did not show measurable concentrations of the TZD GQ-2, after oral administration. In order to obtain

pharmacokinetic parameters for the compounds, we carried out the intravenous administration of GQ-11 and GQ-177 in Wistar rats (n=3), emphasizing that it was not possible to measure concentrations of GQ-19 in plasma, therefore there was no reason to give GQ-19 intravenously to the animals. Interestingly, GQ-177, even in the 5 minutes sample did not show measurable concentrations. GQ-11, on the other hand, presented a pharmacokinetic profile, the parameters are presented in Table 5. In general, it presented a short half-life of 1.7 hours and a high volume of distribution of near 6L.

Despite all the tests pointing to the negligible bioavailability of the 4 TZDs, the literature reports that those compounds present pharmacological activity when they are administered by the oral route (6, 17, 18, 21, 87). In Silva (20), LDLr^{-/-} mice treated with high fat diet received GQ-02 for 15 days and had a reduction in atherosclerotic and inflammatory parameters. In Araujo and co-workers (18), LDLr^{-/-} mice receiving high fat diet for 12 weeks were orally administered of GQ-02 in the last 4 weeks, the drug candidate reduced fat accumulation in the liver and increased hepatic levels of p-AMPK, FoxO1, ATGL, p-ACC and PPAR α . GQ-177 also presented promising pharmacological activity after oral administration to LDR^{-/-} mice, it also prevented atherosclerotic lesions and acted as insulin sensitizer in diabetic rats (4). Therefore, these compounds are promising to the therapeutics of several diseases related to diabetes and its metabolic syndrome. However, in the study herein conducted, we were not able to find measurable concentrations of those compounds in Wistar rat plasma. Our physicochemical and cell based screenings also corroborate our findings in the animal model. The most accepted hypothesis for this is that those compounds act as prodrugs. The pharmacological agent responsible for the

effects observed throughout many studies is a metabolite of the original molecule which our methods were not prepared to detect.

In this study we aimed to determine the bioavailability of the drug candidates GQ-02, GQ-11, GQ-177 and GQ-19. For that we assessed physicochemical, cell permeability and oral administration of each compound. We found that it was not possible to measure drug concentration of any of the test compounds after oral administration, the problems may reside in the stability of the molecules in the gastrointestinal tract or in the intrinsic capability of each substance to permeate intestinal cell barriers as shown in the experiments herein conducted. We believe that the activities observed in the many experiments are due to products formed through degradation/metabolism of these molecules as presented. Studies on metabolite identification of these drug candidates are needed in order to describe the metabolites that are likely to present the pharmacological activity elsewhere observed.

AUTHORSHIP CONTRIBUTIONS

Participated in research design: Padilha, Peccinini, Campos, Varanda

Conducted experiments: Padilha, Nogueira Filho, Alzate, de Paula, Oliveira, De Grandis

Performed data Analysis: Padilha, Campos, Nogueira Filho, Peccinini, De Grandis

Contributed with synthesis of compounds: Pitta

Wrote manuscript: Padilha wrote the first draft, all authors contributed to and approved the final version.

List of References

(1989) OECD GUIDELINE FOR TESTING OF CHEMICALS. Adopted by the Council on 30th March 1989.

Araujo S, Soares ESA, Gomes F, Ribeiro E, Oliveira W, Oliveira A, Lima I, Lima Mdo C, Pitta I and Peixoto C (2016) Effects of the new thiazolidine derivative LPSF/GQ-02 on hepatic lipid metabolism pathways in non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). *Eur J Pharmacol***788**:306-314.

Araújo TG, Carvalho BM, Martins da Fonseca CS, de Lima MdCA, Galdino SL, da Rocha Pitta I and de Menezes Lima VL (2011) Metabolic effects of benzylidene thiazolidinedione derivatives in high-fat fed mice. *Medicinal Chemistry Research***21**:2408-2414.

Artursson P and Karlsson J (1991) Correlation between oral drug absorption in humans and apparent drug permeability coefficients in human intestinal epithelial (Caco-2) cells. *Biochemical and biophysical research communications***175**:880-885.

Balimane PV and Chong S (2005) Cell culture-based models for intestinal permeability: A critique. *Drug Discovery Today***10**:335-343.

Bolen S, Feldman L, Vassy J, Wilson L, Yeh HC, Marinopoulos S, Wiley C, Selvin E, Wilson R, Bass EB and Brancati FL (2007) Systematic review: comparative effectiveness and safety of oral medications for type 2 diabetes mellitus. *Annals of internal medicine***147**:386-399.

Bolton GC, Keogh JP, East PD, Hollis FJ and Shore AD (1996) The fate of a thiazolidinedione antidiabetic agent in rat and dog. *Xenobiotica; the fate of foreign compounds in biological systems***26**:627-636.

Cox PJ, Ryan DA, Hollis FJ, Harris AM, Miller AK, Vousden M and Cowley H (2000) Absorption, disposition, and metabolism of rosiglitazone, a potent thiazolidinedione insulin sensitizer, in humans. *Drug Metab Dispos***28**:772-780.

da Costa Leite LF, Veras Mourao RH, de Lima Mdo C, Galdino SL, Hernandez MZ, de Assis Rocha Neves F, Vidal S, Barbe J and da Rocha Pitta I (2007) Synthesis, biological evaluation and molecular modeling studies of arylidene-thiazolidinediones

with potential hypoglycemic and hypolipidemic activities. *Eur J Med Chem***42**:1263-1271.

Dormandy J, Bhattacharya M and van Troostenburg de Bruyn AR (2009) Safety and tolerability of pioglitazone in high-risk patients with type 2 diabetes: an overview of data from PROactive. *Drug safety***32**:187-202.

FDA (2015) Waiver of In Vivo Bioavailability and Bioequivalence Studies for Immediate-Release Solid Oral Dosage Forms Based on a Biopharmaceutics Classification System. *Guidance for Industry*.

Ferwana M, Firwana B, Hasan R, Al-Mallah MH, Kim S, Montori VM and Murad MH (2013) Pioglitazone and risk of bladder cancer: a meta-analysis of controlled studies. *Diabet Med***30**:1026-1032.

Gall Z, Vancea S, Szilagyi T, Gall O and Kolcsar M (2015) Dose-dependent pharmacokinetics and brain penetration of rufinamide following intravenous and oral administration to rats. *Eur J Pharm Sci***68**:106-113.

Giaginis C, Theocharis S and Tsantili-Kakoulidou A (2007) Investigation of the lipophilic behaviour of some thiazolidinediones. Relationships with PPAR-gamma activity. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci***857**:181-187.

Hubatsch I, Ragnarsson EG and Artursson P (2007) Determination of drug permeability and prediction of drug absorption in Caco-2 monolayers. *Nat Protoc***2**:2111-2119.

Kong AP, Yamasaki A, Ozaki R, Saito H, Asami T, Ohwada S, Ko GT, Wong CK, Leung GT, Lee KF, Yeung CY and Chan JC (2011) A randomized-controlled trial to investigate the effects of rivoglitazone, a novel PPAR gamma agonist on glucose-lipid control in type 2 diabetes. *Diabetes Obes Metab***13**:806-813.

Kong LT, Wang Q, Xiao BX, Liao YH, He XX, Ye LH, Liu XM and Chang Q (2013) Different pharmacokinetics of the two structurally similar dammarane sapogenins, protopanaxatriol and protopanaxadiol, in rats. *Fitoterapia***86**:48-53.

Korfmacher WA, Cox KA, Ng KJ, Veals J, Hsieh Y, Wainhaus S, Broske L, Prelusky D, Nomeir A and White RE (2001) Cassette-accelerated rapid rat screen: a systematic procedure for the dosing and liquid chromatography/atmospheric pressure ionization

tandem mass spectrometric analysis of new chemical entities as part of new drug discovery. *Rapid communications in mass spectrometry* : **RCM15**:335-340.

Kulkarni AP, Shahnawaz M, Zaheer Z and Dehghan MHG (2012) Development and Validation of a Dissolution Method for Pioglitazone Tablets. *Dissolution Technologies***19**:36-46.

Lipinski CA, Lombardo F, Dominy BW and Feeney PJ (1997) Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Advanced Drug Delivery Reviews***23**:3-25.

Liu B, Chang J, Gordon WP, Isbell J, Zhou Y and Tuntland T (2008) Snapshot PK: a rapid rodent in vivo preclinical screening approach. *Drug Discov Today***13**:360-367.

Markopoulos C, Andreas CJ, Vertzoni M, Dressman J and Reppas C (2015) In-vitro simulation of luminal conditions for evaluation of performance of oral drug products: Choosing the appropriate test media. *Eur J Pharm Biopharm***93**:173-182.

Mei H, Korfmacher W and Morrison R (2006) Rapid in vivo oral screening in rats: reliability, acceptance criteria, and filtering efficiency. *The AAPS journal***8**:E493-500.

Mourao RH, Silva TG, Soares AL, Vieira ES, Santos JN, Lima MC, Lima VL, Galdino SL, Barbe J and Pitta IR (2005) Synthesis and biological activity of novel acridinylidene and benzylidene thiazolidinediones. *Eur J Med Chem***40**:1129-1133.

Pan XM, Li J, Gan R and Hu XN (2015) Preparation and in vitro evaluation of enteric-coated tablets of rosiglitazone sodium. *Saudi Pharm J***23**:581-586.

Petersen AB, Andersen NS, Konotop G, Hanafiah NH, Raab MS, Kramer A and Clausen MH (2017) Synthesis and formulation studies of griseofulvin analogues with improved solubility and metabolic stability. *Eur J Med Chem***130**:240-247.

Silva AK, Gomes FO, Santos Silva BD, Ribeiro EL, Oliveira AC, Araujo SM, de Lima IT, Oliveira AG, Rudnicki M, Abdalla DS, Lima MD, Pitta ID and Peixoto CA (2016a) Chronic LPSF/GQ-02 treatment attenuates inflammation and atherosclerosis development in LDLr^{-/-} mice. *Eur J Pharmacol***791**:622-631.

Silva JC, Cesar FA, de Oliveira EM, Turato WM, Tripodi GL, Castilho G, Machado-Lima A, de Las Heras B, Bosca L, Rabello MM, Hernandez MZ, Pitta MG, Pitta

IR, Passarelli M, Rudnicki M and Abdalla DS (2016b) New PPARgamma partial agonist improves obesity-induced metabolic alterations and atherosclerosis in LDLr(-/-) mice. *Pharmacol Res***104**:49-60.

Soares e Silva AK, de Oliveira Cipriano Torres D, dos Santos Gomes FO, dos Santos Silva B, Lima Ribeiro E, Costa Oliveira A, dos Santos LA, de Lima Mdo C, Pitta Ida R and Peixoto CA (2015) LPSF/GQ-02 inhibits the development of hepatic steatosis and inflammation in a mouse model of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). *PLoS One***10**:e0123787.

Sun H and Pang KS (2008) Permeability, transport, and metabolism of solutes in Caco-2 cell monolayers: a theoretical study. *Drug Metab Dispos***36**:102-123.

Truitt KE, Goldberg RB, Rosenstock J, Chou HS, Merante D, Triscari J and Wang AC (2010) A 26-week, placebo- and pioglitazone-controlled, dose-ranging study of rivoglitazone, a novel thiazolidinedione for the treatment of type 2 diabetes. *Curr Med Res Opin***26**:1321-1331.

Umathe SN, Dixit PV, Kumar V, Bansod KU and Wanjari MM (2008) Quercetin pretreatment increases the bioavailability of pioglitazone in rats: involvement of CYP3A inhibition. *Biochem Pharmacol***75**:1670-1676.

van de Waterbeemd H and Gifford E (2003) ADMET in silico modelling: towards prediction paradise? *Nat Rev Drug Discov***2**:192-204.

Vieira CM, Campos ML, Padilha EC, Pitta M, Pitta ID, de Lima MD and Peccinini RG (2016) UHPLC Quantitation Method for New Thiazolidinedione LPSF/GQ-02 and In Vitro/In Vivo Kinetic Studies. *Drug metabolism letters***10**:206-212.

Wring SA, Randolph R, Park S, Abruzzo G, Chen Q, Flattery A, Garrett G, Peel M, Outcalt R, Powell K, Trucksis M, Angulo D and Borroto-Esoda K (2017) Preclinical Pharmacokinetics and Pharmacodynamic Target of SCY-078, a First-in-Class Orally Active Antifungal Glucan Synthesis Inhibitor, in Murine Models of Disseminated Candidiasis. *Antimicrob Agents Chemother***61**.

Yki-Jarvinen H (2004) Thiazolidinediones. *The New England journal of medicine***351**:1106-1118.

Acknowledgements

The authors thank the NIH/NCATS, where the manuscript was written and edited.

Footnote

The authors thank the Sao Paulo State Research Foundation (FAPESP) for supporting this research process numbers [2016/07381-8], [2014/20833-0] and [2016/04927-0].

Figure Legends

Figure 1

Structures of drug candidates: GQ-2, GQ-11, GQ-19 and GQ-177

Figure 2

Stability of GQ-11, GQ-19 and GQ-177 in pH 1.2 and 7.4 buffers. Compounds concentration at 8 µg/mL. Data presented as mean ± SD (n=3). Data from GQ-2 was obtained from (19)

Figure 3

Log *k* vs log *P* curve of standards with test compounds interpolated

Figure 4

Apparent permeability coefficient (*P*_{app}) of compounds and controls data presented as mean ± SD (n=3). BNZ – benznidazole, FLU - fluorescein.

Figure 5

Plasma stability of GQ-19 at 10 µg/mL initial concentration. Data presented as mean ± SD (n=3)

Figure 6

Concentration versus time curve of GQ-11 following i.v. administration (n=3)

Table 1 - Analytical methods for determining the GQ-02, GQ-11, GQ-19 and GQ-177.

	Column	Flow	Mobile phase (Water:Acetonitrile)	UV detection	Retention time
GQ-02*	BEH 5cm	0.4 mL/min	20:80	330 nm	1.1 min
GQ-11	HSS SB 5cm	0.4 mL/min	25:75	380 nm	0.8 min
GQ-19	HSS SB 5cm	0.4 mL/min	35:65	311 nm	0.62 min
GQ-177	HSS SB 5cm	0.4 mL/min	35:65	311 nm	0.8 min

**Method developed and validated in Vieira et al, 2016(Vieira et al., 2016) methods are described in Table 2.*

Table 2 – Methods for determination of GQ-2, GQ-11, GQ-19 and GQ-177 (n=3).

Molecule	Matrix	Range (µg/mL)	Precision (%)	Accuracy (%)	Analytical curve equation	R ²
GQ-2	Stock	0.08 – 10	1.37	100.00	$y = 132006.45x - 674.21$	0.999
	PBS	0.31 – 10	6.33	99.67	$y = 158351.10x - 1019.51$	0.999
	Plasma	0.08 – 10	4.26	96.91	$y = 5.87x + 0.14$	0.999
GQ-11	Stock	0.31 – 10		99.63	$y = 11669.32x + 172.76$	0.999
	PBS	0.31 – 10	16.14	100.08	$y = 4642.18x - 418.86$	0.998
	Plasma	0.08 – 10	4.69	101.77	$y = 0.66x - 0.01$	0.999
GQ-177	Stock	0.08 – 5		96.77	$y = 6703.29x + 71.07$	0.999
	PBS	0.08 – 10	7.58	108.82	$y = 5692.97x - 39.37$	0.999
	Plasma	0.08 – 10	3.91	98.95	$y = 0.56130x - 0.00022$	0.999
GQ-19	Stock	0.08 – 10		105.77	$y = 5331.29x - 3.00$	0.999
	PBS	0.08 – 10	10.91	100.38	$y = 6151.84x + 10.83$	0.999
	Plasma	-	-	-	-	-

stock – acetonitrile.

Table 3—Substances used in the curve for the determination of log P

Substance	LogP
acetanilide	1
nifedipine	2
benzene	2.1
probenecid	2.3
diazepam	2.7
chlorobenzene	2.8
thymol	3.3
phenanthrene	4.5
triphenylamine	5.7
DDT	6.2

Table 4 –Rule of 5 parameters for the test compounds

Compound	LogP	Mol weight	HB donor	HB acceptor
GQ-19	2.1	355.07	1	6
GQ-177	3.5	450.95	0	7
GQ-11	5.1	347.09	1	4
GQ-02	6.0	343.04	0	4
Pioglitazone*	2.69	356.44	1	5
Rosiglitazone*	1.86	357.43	1	7

*HB = Hydrogen bond. * = Data from (Gimenez et al., 2010)*

Table 5– Pharmacokinetic parameters of GQ-11

Parameter	Value
β (h^{-1})	0.402
$t_{1/2\beta}$ (h)	1.724
$t_{1/2\beta}$ (min)	103.433
ASC 0-t ($\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{ml}$)	0.850
ASC $_{0-\infty}$ ($\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{ml}$)	1.355
R%	62.696
Cl (ml/h)	2354.105
Cl (ml/min)	39.235
Vd(ml)	5855.983
A (h^{-1})	6.358
$t_{1/2 \alpha}$ (h)	0.109

β : elimination coefficient, $t_{1/2}$: elimination half-life, ASC: area under the curve, Cl: clearance, Vd: volume of

distribution, α : distribution coefficient, $t_{1/2 \alpha}$: distribution half-life

Figures

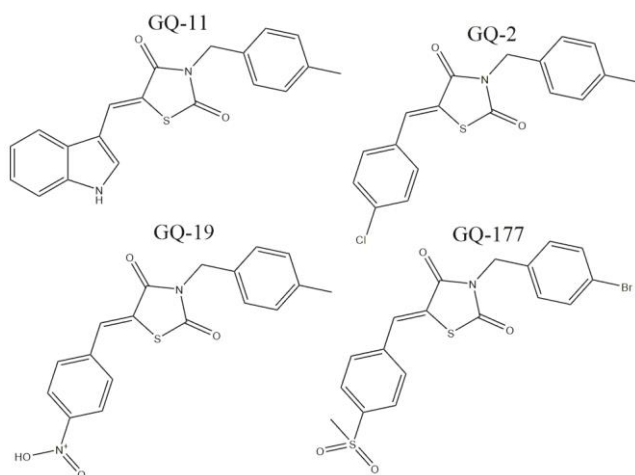


Figure 1

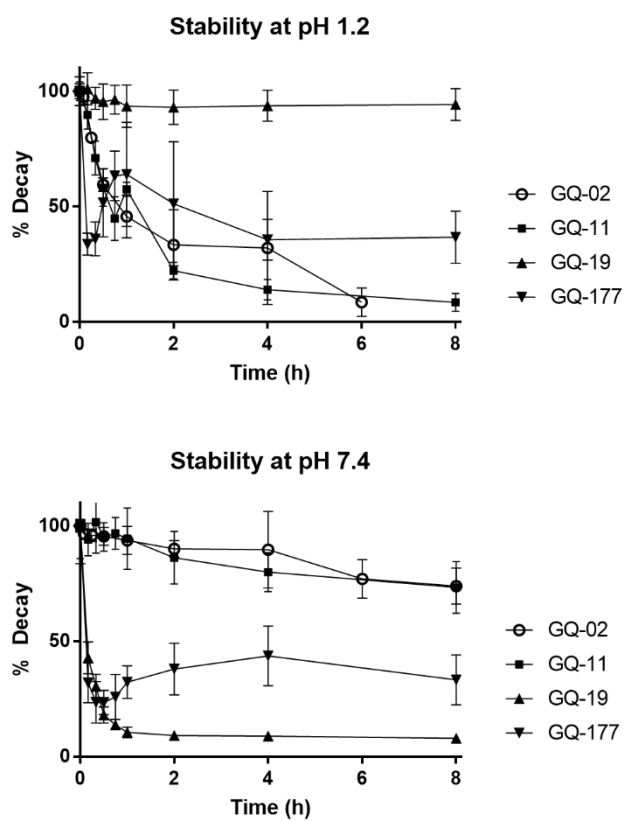


Figure 2

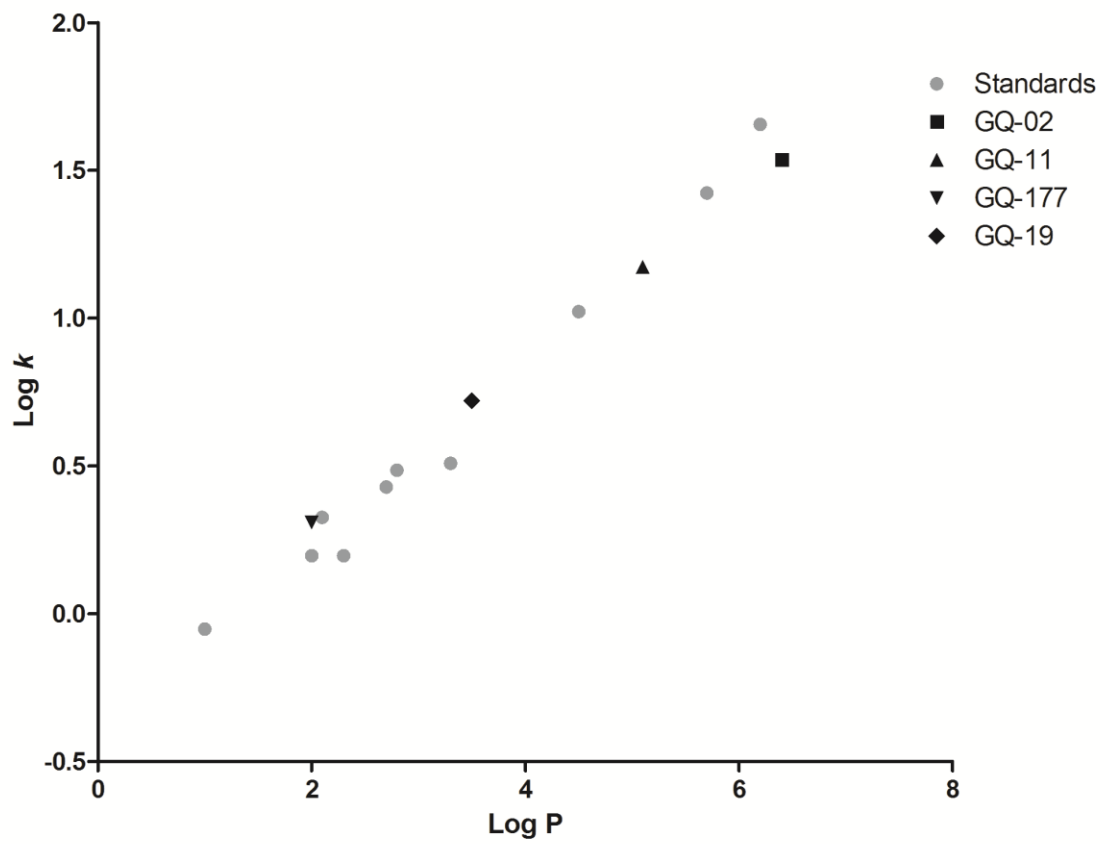


Figure 3

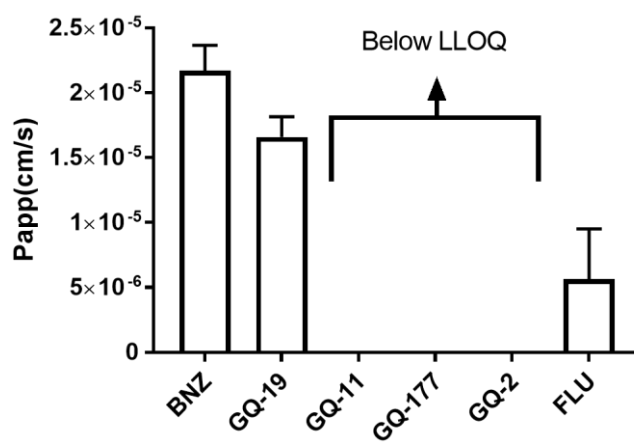


Figure 4

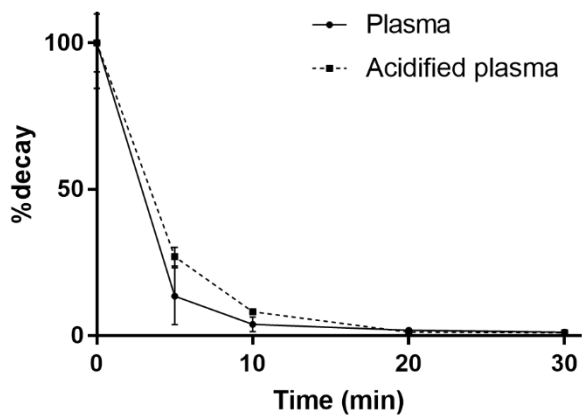


Figure 5

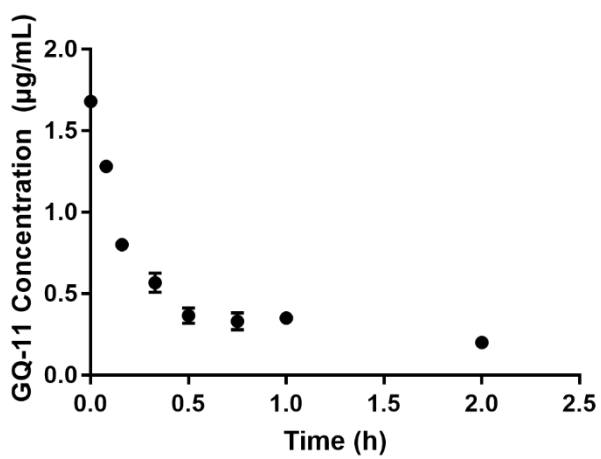


Figure 6

REFERÊNCIAS

1. Yki-Jarvinen H. Thiazolidinediones. *The New England journal of medicine*. 2004;351(11):1106-18.
2. Brasil. Farmacopéia Brasileira – 5ª ed. Brasília: Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA. 2010;1.
3. Ferwana M, Firwana B, Hasan R, Al-Mallah MH, Kim S, Montori VM, et al. Pioglitazone and risk of bladder cancer: a meta-analysis of controlled studies. *Diabet Med*. 2013;30(9):1026-32.
4. Silva JC, Cesar FA, de Oliveira EM, Turato WM, Tripodi GL, Castilho G, et al. New PPARgamma partial agonist improves obesity-induced metabolic alterations and atherosclerosis in LDLr(-/-) mice. *Pharmacol Res*. 2016;104:49-60.
5. Marques MJDP, Oliveira LCL, Galdino SL, Lima MC A, Duarte GIBP. Síntese, Caracterização Estrutural E Avaliação Da Atividade Hipoglicemiante De Um Novo Derivado Tiazolidínico. in: 3º Encontro Brasileiro para Inovação Terapêutica. 2013.
6. Mourao RH, Silva TG, Soares AL, Vieira ES, Santos JN, Lima MC, et al. Synthesis and biological activity of novel acridinylidene and benzylidene thiazolidinediones. *Eur J Med Chem*. 2005;40(11):1129-33.
7. Korfmacher WA, Cox KA, Ng KJ, Veals J, Hsieh Y, Wainhaus S, et al. Cassette-accelerated rapid rat screen: a systematic procedure for the dosing and liquid chromatography/atmospheric pressure ionization tandem mass spectrometric analysis of new chemical entities as part of new drug discovery. *Rapid communications in mass spectrometry : RCM*. 2001;15(5):335-40.
8. van de Waterbeemd H, Smith DA, Jones BC. Lipophilicity in PK design: methyl, ethyl, futile. *Journal of computer-aided molecular design*. 2001;15(3):273-86.
9. van de Waterbeemd H, Gifford E. ADMET in silico modelling: towards prediction paradise? *Nat Rev Drug Discov*. 2003;2(3):192-204.
10. Liu B, Chang J, Gordon WP, Isbell J, Zhou Y, Tuntland T. Snapshot PK: a rapid rodent in vivo preclinical screening approach. *Drug Discov Today*. 2008;13(7-8):360-7.

11. Kong LT, Wang Q, Xiao BX, Liao YH, He XX, Ye LH, et al. Different pharmacokinetics of the two structurally similar dammarane sapogenins, protopanaxatriol and protopanaxadiol, in rats. *Fitoterapia*. 2013;86:48-53.
12. Wan H, Holmen AG. High throughput screening of physicochemical properties and in vitro ADME profiling in drug discovery. *Combinatorial chemistry & high throughput screening*. 2009;12(3):315-29.
13. FDA. Waiver of In Vivo Bioavailability and Bioequivalence Studies for Immediate-Release Solid Oral Dosage Forms Based on a Biopharmaceutics Classification System. Guidance for Industry. 2015.
14. Artursson P, Karlsson J. Correlation between oral drug absorption in humans and apparent drug permeability coefficients in human intestinal epithelial (Caco-2) cells. *Biochemical and biophysical research communications*. 1991;175(3):880-5.
15. Bolen S, Feldman L, Vassy J, Wilson L, Yeh HC, Marinopoulos S, et al. Systematic review: comparative effectiveness and safety of oral medications for type 2 diabetes mellitus. *Annals of internal medicine*. 2007;147(6):386-99.
16. Soares ESAK, de Oliveira Cipriano Torres D, Santos Rocha SW, dos Santos Gomes FO, dos Santos Silva B, Donato MA, et al. Effect of new thiazolidine derivatives LPSF/GQ-02 and LPSF/GQ-16 on atherosclerotic lesions in LDL receptor-deficient mice (LDLR(-/-)). *Cardiovasc Pathol*. 2013;22(1):81-90.
17. Soares e Silva AK, de Oliveira Cipriano Torres D, dos Santos Gomes FO, dos Santos Silva B, Lima Ribeiro E, Costa Oliveira A, et al. LPSF/GQ-02 inhibits the development of hepatic steatosis and inflammation in a mouse model of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). *PLoS One*. 2015;10(4):e0123787.
18. Araujo S, Soares ESA, Gomes F, Ribeiro E, Oliveira W, Oliveira A, et al. Effects of the new thiazolidine derivative LPSF/GQ-02 on hepatic lipid metabolism pathways in non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). *Eur J Pharmacol*. 2016;788:306-14.
19. Vieira CM, Campos ML, Padilha EC, Pitta M, Pitta ID, de Lima MD, et al. UHPLC Quantitation Method for New Thiazolidinedione LPSF/GQ-02 and In Vitro/In Vivo Kinetic Studies. *Drug metabolism letters*. 2016;10(3):206-12.

20. Silva AK, Gomes FO, Santos Silva BD, Ribeiro EL, Oliveira AC, Araujo SM, et al. Chronic LPSF/GQ-02 treatment attenuates inflammation and atherosclerosis development in LDLr^{-/-} mice. *Eur J Pharmacol*. 2016;791:622-31.
21. da Costa Leite LF, Veras Mourao RH, de Lima Mdo C, Galdino SL, Hernandez MZ, de Assis Rocha Neves F, et al. Synthesis, biological evaluation and molecular modeling studies of arylidene-thiazolidinediones with potential hypoglycemic and hypolipidemic activities. *Eur J Med Chem*. 2007;42(10):1263-71.
22. Toutain PL, Bousquet-Melou A. Bioavailability and its assessment. *Journal of veterinary pharmacology and therapeutics*. 2004;27(6):455-66.
23. Taylor JB, Triggle DJ. *Comprehensive Medicinal Chemistry II*. Amsterdam: Elsevier. 2007.
24. Lipinski CA, Lombardo F, Dominy BW, Feeney PJ. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 1997;23(1):3-25.
25. Markopoulos C, Andreas CJ, Vertzoni M, Dressman J, Reppas C. In-vitro simulation of luminal conditions for evaluation of performance of oral drug products: Choosing the appropriate test media. *Eur J Pharm Biopharm*. 2015;93:173-82.
26. Veith GD, Austin NM, Morris RT. A rapid method for estimating log P for organic chemicals. *Water Research*. 1979;13(1):5.
27. Brasil. RE 899, de 29 de maio de 2003. Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. ANVISA Agência nacional de Vigilância Sanitária. 2003.
28. Gimenez BG, Santos MS, Ferrarini M, Fernandes JP. Evaluation of blockbuster drugs under the rule-of-five. *Die Pharmazie*. 2010;65(2):148-52.
29. Bohets H, Annaert P, Mannens G, Van Beijsterveldt L, Anciaux K, Verboven P, et al. Strategies for absorption screening in drug discovery and development. *Current topics in medicinal chemistry*. 2001;1(5):367-83.
30. Artursson P, Palm K, Luthman K. Caco-2 monolayers in experimental and theoretical predictions of drug transport. *Adv Drug Deliv Rev*. 2001;46(1-3):27-43.
31. Alqahtani S, Mohamed LA, Kaddoumi A. Experimental models for predicting drug absorption and metabolism. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*. 2013;9(10):1241-54.

32. Shugarts S, Benet LZ. The role of transporters in the pharmacokinetics of orally administered drugs. *Pharmaceutical research*. 2009;26(9):2039-54.
33. Kansy M, Senner F, Gubernator K. Physicochemical high throughput screening: parallel artificial membrane permeation assay in the description of passive absorption processes. *Journal of medicinal chemistry*. 1998;41(7):1007-10.
34. Avdeef A. The rise of PAMPA. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*. 2005;1(2):325-42.
35. Balimane PV, Chong S. Cell culture-based models for intestinal permeability: A critique. *Drug Discovery Today*. 2005;10(5):335-43.
36. Ekins S, Waller CL, Swaan PW, Cruciani G, Wrighton SA, Wikel JH. Progress in predicting human ADME parameters in silico. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*. 2000;44(1):251-72.
37. Ussing HH, Zerahn K. Active transport of sodium as the source of electric current in the short-circuited isolated frog skin. *Acta physiologica Scandinavica*. 1951;23(2-3):110-27.
38. Sjoberg A, Lutz M, Tannergren C, Wingolf C, Borde A, Ungell AL. Comprehensive study on regional human intestinal permeability and prediction of fraction absorbed of drugs using the Ussing chamber technique. *Eur J Pharm Sci*. 2013;48(1-2):166-80.
39. Ungell AL, Nylander S, Bergstrand S, Sjoberg A, Lennernas H. Membrane transport of drugs in different regions of the intestinal tract of the rat. *J Pharm Sci*. 1998;87(3):360-6.
40. Rozehnal V, Nakai D, Hoepner U, Fischer T, Kamiyama E, Takahashi M, et al. Human small intestinal and colonic tissue mounted in the Ussing chamber as a tool for characterizing the intestinal absorption of drugs. *Eur J Pharm Sci*. 2012;46(5):367-73.
41. Barthe L, Woodley J, Houin G. Gastrointestinal absorption of drugs: methods and studies. *Fundamental & clinical pharmacology*. 1999;13(2):154-68.
42. Perrone MG, Inglese C, Berardi F, Leopoldo M, Perrone R, Colabufo NA. Comparative evaluation of two dye probes in the rat everted gut sac model for unambiguous classification of P-gp substrate and inhibitor. *J Pharmacol Toxicol Methods*. 2013;67(1):5-8.
43. Fagerholm U, Johansson M, Lennernas H. Comparison Between Permeability Coefficients in Rat and Human Jejunum. *Pharmaceutical research*. 1996;13(9):1336-42.

44. Moyer MP. Culture of human gastrointestinal epithelial cells. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine Society for Experimental Biology and Medicine* (New York, NY). 1983;174(1):12-5.
45. Hidalgo IJ, Raub TJ, Borchartd RT. Characterization of the human colon carcinoma cell line (Caco-2) as a model system for intestinal epithelial permeability. *Gastroenterology*. 1989;96(3):736-49.
46. Dressman JB, Thelen K, Jantravid E. Towards quantitative prediction of oral drug absorption. *Clinical pharmacokinetics*. 2008;47(10):655-67.
47. Nigsch F, Klaffke W, Miret S. In vitro models for processes involved in intestinal absorption. *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology*. 2007;3(4):545-56.
48. Hill CR, Jamieson D, Thomas HD, Brown CD, Boddy AV, Veal GJ. Characterisation of the roles of ABCB1, ABCC1, ABCC2 and ABCG2 in the transport and pharmacokinetics of actinomycin D in vitro and in vivo. *Biochem Pharmacol*. 2013;85(1):29-37.
49. Sun H, Pang KS. Permeability, transport, and metabolism of solutes in Caco-2 cell monolayers: a theoretical study. *Drug Metab Dispos*. 2008;36(1):102-23.
50. Rubas W, Cromwell ME, Shahrokh Z, Villagran J, Nguyen TN, Wellton M, et al. Flux measurements across Caco-2 monolayers may predict transport in human large intestinal tissue. *J Pharm Sci*. 1996;85(2):165-9.
51. Hubatsch I, Ragnarsson EG, Artursson P. Determination of drug permeability and prediction of drug absorption in Caco-2 monolayers. *Nat Protoc*. 2007;2(9):2111-9.
52. Juliano RL, Ling V. A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants. *Biochimica et biophysica acta*. 1976;455(1):152-62.
53. Okabe M, Szakacs G, Reimers MA, Suzuki T, Hall MD, Abe T, et al. Profiling SLCO and SLC22 genes in the NCI-60 cancer cell lines to identify drug uptake transporters. *Mol Cancer Ther*. 2008;7(9):3081-91.
54. Szakacs G, Paterson JK, Ludwig JA, Booth-Genthe C, Gottesman MM. Targeting multidrug resistance in cancer. *Nat Rev Drug Discov*. 2006;5(3):219-34.

55. Chong S, Dando SA, Soucek KM, Morrison RA. In vitro permeability through caco-2 cells is not quantitatively predictive of in vivo absorption for peptide-like drugs absorbed via the dipeptide transporter system. *Pharmaceutical research*. 1996;13(1):120-3.
56. Liu D. A rapid biochemical test for measuring chemical toxicity. *Bulletin of environmental contamination and toxicology*. 1981;26(2):145-9.
57. Da Violante G, Zerrouk N, Richard I, Provot G, Chaumeil JC, Arnaud P. Evaluation of the cytotoxicity effect of dimethyl sulfoxide (DMSO) on Caco2/TC7 colon tumor cell cultures. *Biological & pharmaceutical bulletin*. 2002;25(12):1600-3.
58. Davanco MG, Campos ML, Rosa TA, Padilha EC, Alzate AH, Rolim LA, et al. Benznidazole Extended-Release Tablets for Improved Treatment of Chagas Disease: Preclinical Pharmacokinetic Study. *Antimicrob Agents Chemother*. 2016;60(4):2492-8.
59. Anderle P, Niederer E, Rubas W, Hilgendorf C, Spahn-Langguth H, Wunderli-Allenspach H, et al. P-Glycoprotein (P-gp) mediated efflux in Caco-2 cell monolayers: the influence of culturing conditions and drug exposure on P-gp expression levels. *J Pharm Sci*. 1998;87(6):757-62.
60. Han Y, Tan TM, Lim LY. Effects of capsaicin on P-gp function and expression in Caco-2 cells. *Biochem Pharmacol*. 2006;71(12):1727-34.
61. Crespi CL, Fox L, Stocker P, Hu M, Steimel DT. Analysis of drug transport and metabolism in cell monolayer systems that have been modified by cytochrome P4503A4 cDNA-expression. *Eur J Pharm Sci*. 2000;12(1):63-8.
62. Schmiedlin-Ren P, Thummel KE, Fisher JM, Paine MF, Lown KS, Watkins PB. Expression of enzymatically active CYP3A4 by Caco-2 cells grown on extracellular matrix-coated permeable supports in the presence of 1 α ,25-dihydroxyvitamin D₃. *Molecular pharmacology*. 1997;51(5):741-54.
63. Liu G, Franssen E, Fitch MI, Warner E. Patient preferences for oral versus intravenous palliative chemotherapy. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 1997;15(1):110-5.
64. Martinez MN, Amidon GL. A mechanistic approach to understanding the factors affecting drug absorption: a review of fundamentals. *Journal of clinical pharmacology*. 2002;42(6):620-43.

65. Amidon GL, Lennernas H, Shah VP, Crison JR. A theoretical basis for a biopharmaceutical drug classification: the correlation of in vitro drug product dissolution and in vivo bioavailability. *Pharmaceutical research*. 1995;12(3):413-20.
66. Yazdanian M, Briggs K, Jankovsky C, Hawi A. The "high solubility" definition of the current FDA Guidance on Biopharmaceutical Classification System may be too strict for acidic drugs. *Pharmaceutical research*. 2004;21(2):293-9.
67. Benet LZ. The role of BCS (biopharmaceutics classification system) and BDDCS (biopharmaceutics drug disposition classification system) in drug development. *J Pharm Sci*. 2013;102(1):34-42.
68. Ku MS. Use of the Biopharmaceutical Classification System in early drug development. *The AAPS journal*. 2008;10(1):208-12.
69. Kerns EH, Di L. Multivariate pharmaceutical profiling for drug discovery. *Current topics in medicinal chemistry*. 2002;2(1):87-98.
70. Wagner AD, Elkin L, Mosure K, Gallagher L, Stavola LK, Soars MG, et al. Development of a high-throughput mass spectrometry based analytical method to support an in vitro OATP1B1 inhibition screening assay. *Rapid communications in mass spectrometry : RCM*. 2016;30(15):1787-96.
71. da Silva Junior JB, Dezani TM, Dezani AB, dos Reis Serra CH. Evaluating Potential P-gp Substrates: Main Aspects to Choose the Adequate Permeability Model for Assessing Gastrointestinal Drug Absorption. *Mini reviews in medicinal chemistry*. 2015;15(10):858-71.
72. Karlgren M, Simoff I, Backlund M, Wegler C, Keiser M, Handin N, et al. A CRISPR-Cas9 Generated MDCK Cell Line Expressing Human MDR1 Without Endogenous Canine MDR1 (cABCB1): An Improved Tool for Drug Efflux Studies. *J Pharm Sci*. 2017;106(9):2909-13.
73. Eglén RM, Randle DH. Drug Discovery Goes Three-Dimensional: Goodbye to Flat High-Throughput Screening? *Assay Drug Dev Technol*. 2015;13(5):262-5.
74. White RE, Manitpisitkul P. Pharmacokinetic theory of cassette dosing in drug discovery screening. *Drug Metab Dispos*. 2001;29(7):957-66.
75. Berman J, Halm K, Adkison K, Shaffer J. Simultaneous pharmacokinetic screening of a mixture of compounds in the dog using API LC/MS/MS analysis for increased throughput. *Journal of medicinal chemistry*. 1997;40(6):827-9.

76. Nagilla R, Nord M, McAtee JJ, Jolivette LJ. Cassette dosing for pharmacokinetic screening in drug discovery: comparison of clearance, volume of distribution, half-life, mean residence time, and oral bioavailability obtained by cassette and discrete dosing in rats. *J Pharm Sci.* 2011;100(9):3862-74.
77. Lee MS, Kerns EH. LC/MS applications in drug development. *Mass spectrometry reviews.* 1999;18(3-4):187-279.
78. Hsieh Y, Korfmacher WA. Increasing speed and throughput when using HPLC-MS/MS systems for drug metabolism and pharmacokinetic screening. *Current drug metabolism.* 2006;7(5):479-89.
79. Olah TV, McLoughlin DA, Gilbert JD. The simultaneous determination of mixtures of drug candidates by liquid chromatography/atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry as an in vivo drug screening procedure. *Rapid communications in mass spectrometry : RCM.* 1997;11(1):17-23.
80. Manitpisitkul P, White RE. Whatever happened to cassette-dosing pharmacokinetics? *Drug Discovery Today.* 2004;9(15):652-8.
81. Kuo BS, Van Noord T, Feng MR, Wright DS. Sample pooling to expedite bioanalysis and pharmacokinetic research. *J Pharm Biomed Anal.* 1998;16(5):837-46.
82. Bueters T, Dahlstrom J, Kvalvagnaes K, Betner I, Briem S. High-throughput analysis of standardized pharmacokinetic studies in the rat using sample pooling and UPLC-MS/MS. *J Pharm Biomed Anal.* 2011;55(5):1120-6.
83. Cai Z, Sinhababu AK, Harrelson S. Simultaneous quantitative cassette analysis of drugs and detection of their metabolites by high performance liquid chromatography/ion trap mass spectrometry. *Rapid communications in mass spectrometry : RCM.* 2000;14(18):1637-43.
84. Cox PJ, Ryan DA, Hollis FJ, Harris AM, Miller AK, Vousden M, et al. Absorption, disposition, and metabolism of rosiglitazone, a potent thiazolidinedione insulin sensitizer, in humans. *Drug Metab Dispos.* 2000;28(7):772-80.
85. Mei H, Korfmacher W, Morrison R. Rapid in vivo oral screening in rats: reliability, acceptance criteria, and filtering efficiency. *The AAPS journal.* 2006;8(3):E493-500.

86. Arns S, Tan J, Sun S, Galey A, Zisman N, Ross F, et al. Assessing the oral bioavailability of difluorosialic acid prodrugs, potent viral neuraminidase inhibitors, using a snapshot PK screening assay. *Bioorg Med Chem Lett*. 2015;25(12):2505-9.
87. Araújo TG, Carvalho BM, Martins da Fonseca CS, de Lima MdCA, Galdino SL, da Rocha Pitta I, et al. Metabolic effects of benzylidene thiazolidinedione derivatives in high-fat fed mice. *Medicinal Chemistry Research*. 2011;21(9):2408-14.
88. Abbasi MM, Valizadeh H, Hamishehkar H, Zakeri-Milani P. Inhibition of P-glycoprotein expression and function by anti-diabetic drugs gliclazide, metformin, and pioglitazone in vitro and in situ. *Research in pharmaceutical sciences*. 2016;11(3):177-86.
89. Chang KL, Pee HN, Yang S, Ho PC. Influence of drug transporters and stereoselectivity on the brain penetration of pioglitazone as a potential medicine against Alzheimer's disease. *Scientific reports*. 2015;5:9000.
90. Wu C-Y, Benet LZ. Predicting Drug Disposition via Application of BCS: Transport/Absorption/ Elimination Interplay and Development of a Biopharmaceutics Drug Disposition Classification System. *Pharmaceutical research*. 2005;22(1):11-23.
91. Budde K, Neumayer HH, Fritsche L, Sulowicz W, Stompor T, Eckland D. The pharmacokinetics of pioglitazone in patients with impaired renal function. *British journal of clinical pharmacology*. 2003;55(4):368-74.
92. Kawaguchi-Suzuki M, Bril F, Sanchez PP, Cusi K, Frye RF. A validated liquid chromatography tandem mass spectrometry method for simultaneous determination of pioglitazone, hydroxypioglitazone, and ketopioglitazone in human plasma and its application to a clinical study. *Journal of Chromatography B*. 2014;969(Supplement C):219-23.
93. Gall Z, Vancea S, Szilagyi T, Gall O, Kolcsar M. Dose-dependent pharmacokinetics and brain penetration of rufinamide following intravenous and oral administration to rats. *Eur J Pharm Sci*. 2015;68:106-13.
94. Buyse G, Silberstein J, Goemans N, Casaer P. Fibrodysplasia ossificans progressiva: Still turning into wood after 300 years? *European Journal of Pediatrics*. 1995;154(9):694-9.
95. Shore EM, Kaplan FS. Insights from a rare genetic disorder of extra-skeletal bone formation, fibrodysplasia ossificans progressiva (FOP). *Bone*. 2008;43(3):427-33.

96. Pignolo RJ, Shore EM, Kaplan FS. Fibrodysplasia Ossificans Progressiva: Diagnosis, Management, and Therapeutic Horizons. *Pediatric endocrinology reviews : PER*. 2013;10(02):437-48.
97. Yu PB, Deng DY, Lai CS, Hong CC, Cuny GD, Boussein ML, et al. BMP type I receptor inhibition reduces heterotopic [corrected] ossification. *Nat Med*. 2008;14(12):1363-9.
98. Shore EM, Xu M, Feldman GJ, Fenstermacher DA, Cho TJ, Choi IH, et al. A recurrent mutation in the BMP type I receptor ACVR1 causes inherited and sporadic fibrodysplasia ossificans progressiva. *Nat Genet*. 2006;38(5):525-7.
99. Groppe JC, Shore EM, Kaplan FS. Functional modeling of the ACVR1 (R206H) mutation in FOP. *Clin Orthop Relat Res*. 2007;462:87-92.
100. Hatsell SJ, Idone V, Wolken DM, Huang L, Kim HJ, Wang L, et al. ACVR1R206H receptor mutation causes fibrodysplasia ossificans progressiva by imparting responsiveness to activin A. *Science translational medicine*. 2015;7(303):303ra137.
101. Hino K, Ikeya M, Horigome K, Matsumoto Y, Ebise H, Nishio M, et al. Neofunction of ACVR1 in fibrodysplasia ossificans progressiva. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2015;112(50):15438-43.
102. Alessi Wolken DM, Idone V, Hatsell SJ, Yu PB, Economides AN. The obligatory role of Activin A in the formation of heterotopic bone in Fibrodysplasia Ossificans Progressiva. *Bone*. 2017.
103. Yu PB, Hong CC, Sachidanandan C, Babitt JL, Deng DY, Hoyng SA, et al. Dorsomorphin inhibits BMP signals required for embryogenesis and iron metabolism. *Nat Chem Biol*. 2008;4(1):33-41.
104. Cuny GD, Yu PB, Laha JK, Xing X, Liu JF, Lai CS, et al. Structure-activity relationship study of bone morphogenetic protein (BMP) signaling inhibitors. *Bioorg Med Chem Lett*. 2008;18(15):4388-92.
105. Gunaratna C. Drug Metabolism & Pharmacokinetics in Drug Discovery: A Primer for Bioanalytical Chemists, Part I. *Current Separations*. 2001;19(3):5.
106. Hyland R, Jones B, van de Waterbeemd H. Utility of human/human-derived reagents in drug discovery and development: An industrial perspective. *Environmental Toxicology and Pharmacology*. 2006;21(2):179-83.

107. Zhang Z, Zhu M, Tang W. Metabolite identification and profiling in drug design: current practice and future directions. *Current pharmaceutical design*. 2009;15(19):2220-35.
108. Pryde DC, Dalvie D, Hu Q, Jones P, Obach RS, Tran TD. Aldehyde oxidase: an enzyme of emerging importance in drug discovery. *J Med Chem*. 2010;53(24):8441-60.
109. Hutzler JM, Obach RS, Dalvie D, Zientek MA. Strategies for a comprehensive understanding of metabolism by aldehyde oxidase. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*. 2013;9(2):153-68.
110. Obach RS, Huynh P, Allen MC, Beedham C. Human liver aldehyde oxidase: inhibition by 239 drugs. *J Clin Pharmacol*. 2004;44(1):7-19.
111. Garattini E, Terao M. Increasing recognition of the importance of aldehyde oxidase in drug development and discovery. *Drug Metab Rev*. 2011;43(3):374-86.
112. Zetterberg C, Maltais F, Laitinen L, Liao S, Tsao H, Chakilam A, et al. VX-509 (Decernotinib)-Mediated CYP3A Time-Dependent Inhibition: An Aldehyde Oxidase Metabolite as a Perpetrator of Drug-Drug Interactions. *Drug Metab Dispos*. 2016;44(8):1286-95.
113. Rousu T, Pelkonen O, Tolonen A. Rapid detection and characterization of reactive drug metabolites in vitro using several isotope-labeled trapping agents and ultra-performance liquid chromatography/time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom*. 2009;23(6):843-55.
114. Ma S, Subramanian R. Detecting and characterizing reactive metabolites by liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *J Mass Spectrom*. 2006;41(9):1121-39.
115. Olsen J, Li C, Bjørnsdóttir I, Sidenius U, Hansen SH, Benet LZ. In Vitro and in Vivo Studies on Acyl-Coenzyme A-Dependent Bioactivation of Zomepirac in Rats. *Chemical Research in Toxicology*. 2005;18(11):1729-36.
116. Alvarez-Sánchez R, Montavon F, Hartung T, Pähler A. Thiazolidinedione Bioactivation: A Comparison of the Bioactivation Potentials of Troglitazone, Rosiglitazone, and Pioglitazone Using Stable Isotope-Labeled Analogues and Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry. *Chemical Research in Toxicology*. 2006;19(8):1106-16.
117. Kassahun K, Pearson PG, Tang W, McIntosh I, Leung K, Elmore C, et al. Studies on the Metabolism of Troglitazone to Reactive Intermediates in Vitro and in Vivo. Evidence for Novel

Biotransformation Pathways Involving Quinone Methide Formation and Thiazolidinedione Ring Scission. *Chemical Research in Toxicology*. 2001;14(1):62-70.

118. Ju C, Uetrecht JP. Mechanism of Idiosyncratic Drug Reactions: Reactive Metabolites Formation, Protein Binding and the Regulation of the Immune System. *Current Drug Metabolism*. 2002;3(4):367-77.

119. Kalgutkar AS FG, Didiuk MT, Bauman J. Toxicophores reactive metabolites and drug safety when is it a cause for concern? *Expert Review of Clinical Pharmacology*. 2008;1(4):17.

120. Alimardanov A, Cuny GD, Grewal GS, Lee A, Mckew JC, Mohedas AH, et al. Bmp inhibitors and methods of use thereof. *Google Patents*; 2014.

121. Bentzien J HE, Kemper RA, Brewer ML, Dyekjaer JD, East SP, Whittaker M. An in silico method for predicting Ames activities of primary aromatic amines by calculating the stabilities of nitrenium ions. *J Chem Inf Model*. 2010;50(2):23.

122. Hutzler JM, Yang Y-S, Brown C, Heyward S, Moeller T. Aldehyde Oxidase Activity in Donor-Matched Fresh and Cryopreserved Human Hepatocytes and Assessment of Variability in 75 Donors. *Drug Metabolism and Disposition*. 2014;42(6):1090-7.

123. Terao M, Kurosaki M, Barzago MM, Varasano E, Boldetti A, Bastone A, et al. Avian and canine aldehyde oxidases. Novel insights into the biology and evolution of molybdo-flavoenzymes. *J Biol Chem*. 2006;281(28):19748-61.

124. Choughule KV, Barr JT, Jones JP. Evaluation of rhesus monkey and guinea pig hepatic cytosol fractions as models for human aldehyde oxidase. *Drug Metab Dispos*. 2013;41(10):1852-8.

125. Dalvie D, Xiang C, Kang P, Zhou S. Interspecies variation in the metabolism of zoniporide by aldehyde oxidase. *Xenobiotica*. 2013;43(5):399-408.

126. Jensen KG, Jacobsen AM, Bundgaard C, Nilausen DO, Thale Z, Chandrasena G, et al. Lack of exposure in a first-in-man study due to aldehyde oxidase metabolism: Investigated by use of ¹⁴C-microdose, humanized mice, monkey pharmacokinetics and in vitro methods. *Drug Metab Dispos*. 2016.

127. Murphy PJ. Enzymatic Oxidation of Nicotine to Nicotine $\Delta 1'(5')$ Iminium Ion : A Newly Discovered Intermediate in the Metabolism of Nicotine. *Journal of Biological Chemistry*. 1973;248(8):2796-800.

128. Gorrod JW, Aislaintner G. The metabolism of alicyclic amines to reactive iminium ion intermediates. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet* 1994;19(3):9.
129. Harrison JH, Jollow DJ. Role of aniline metabolites in aniline-induced hemolytic anemia. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 1986;238(3):1045.
130. Shinkai Y, Li S, Kikuchi T, Kumagai Y. Participation of metabolic activation of 2,4,6-trinitrotoluene to 4-hydroxylamino-2,6-dinitrotoluene in hematotoxicity. *The Journal of Toxicological Sciences*. 2015;40(5):597-604.
131. Mašič LP. Role of cyclic tertiary amine bioactivation to reactive iminium species: Structure toxicity relationship. *Current Drug Metabolism*. 2011;12(1):16.
132. Zak M, Liederer BM, Sampath D, Yuen PW, Bair KW, Baumeister T, et al. Identification of nicotinamide phosphoribosyltransferase (NAMPT) inhibitors with no evidence of CYP3A4 time-dependent inhibition and improved aqueous solubility. *Bioorg Med Chem Lett*. 2015;25(3):529-41.
133. Kalgutkar AS. Should the incorporation of structural alerts be restricted in drug design? An analysis of structure-toxicity trends with aniline-based drugs. *Current Medicinal Chemistry*. 2015;22:27.
134. Di Girolamo F, Campanella L, Samperi R, Bachi A. Mass spectrometric identification of hemoglobin modifications induced by nitrosobenzene. *Ecotoxicol Environ Saf*. 2009;72(5):1601-8.
135. Wang Y, Gao H, Na XL, Dong SY, Dong HW, Yu J, et al. Aniline Induces Oxidative Stress and Apoptosis of Primary Cultured Hepatocytes. *Int J Environ Res Public Health*. 2016;13(12).
136. Bentzien J, Hickey ER, Kemper RA, Brewer ML, Dyekjaer JD, East SP, et al. An in silico method for predicting Ames activities of primary aromatic amines by calculating the stabilities of nitrenium ions. *Journal of chemical information and modeling*. 2010;50(2):274-97.
137. Mesaros EF, Thieu TV, Wells GJ, Zifcsak CA, Wagner JC, Breslin HJ, et al. Strategies to mitigate the bioactivation of 2-anilino-7-aryl-pyrrolo[2,1-f][1,2,4]triazines: identification of orally bioavailable, efficacious ALK inhibitors. *J Med Chem*. 2012;55(1):115-25.
138. Obach RS, LaChapelle EA, Brodney MA, Vanase-Frawley M, Kauffman GW, Sawant-Basak A. Strategies toward optimization of the metabolism of a series of serotonin-4 partial agonists: investigation of azetidines as piperidine isosteres. *Xenobiotica*. 2016;46(12):1112-21.

139. Mohedas AH, Wang Y, Sanvitale CE, Canning P, Choi S, Xing X, et al. Structure-activity relationship of 3,5-diaryl-2-aminopyridine ALK2 inhibitors reveals unaltered binding affinity for fibrodysplasia ossificans progressiva causing mutants. *J Med Chem*. 2014;57(19):7900-15.
140. Mohedas AH, Xing X, Armstrong KA, Bullock AN, Cuny GD, Yu PB. Development of an ALK2-biased BMP type I receptor kinase inhibitor. *ACS Chem Biol*. 2013;8(6):1291-302.
141. Cappato S, Tonachini L, Giacomelli F, Tirone M, Galiotta LJ, Sormani M, et al. High-throughput screening for modulators of ACVR1 transcription: discovery of potential therapeutics for fibrodysplasia ossificans progressiva. *Dis Model Mech*. 2016;9(6):685-96.
142. Chakkalakal SA, Uchibe K, Convente MR, Zhang D, Economides AN, Kaplan FS, et al. Palovarotene Inhibits Heterotopic Ossification and Maintains Limb Mobility and Growth in Mice With the Human ACVR1(R206H) Fibrodysplasia Ossificans Progressiva (FOP) Mutation. *J Bone Miner Res*. 2016;31(9):1666-75.
143. Dormandy J, Bhattacharya M, van Troostenburg de Bruyn AR. Safety and tolerability of pioglitazone in high-risk patients with type 2 diabetes: an overview of data from PROactive. *Drug safety*. 2009;32(3):187-202.
144. Kong AP, Yamasaki A, Ozaki R, Saito H, Asami T, Ohwada S, et al. A randomized-controlled trial to investigate the effects of rivoglitazone, a novel PPAR gamma agonist on glucose-lipid control in type 2 diabetes. *Diabetes Obes Metab*. 2011;13(9):806-13.
145. Truitt KE, Goldberg RB, Rosenstock J, Chou HS, Merante D, Triscari J, et al. A 26-week, placebo- and pioglitazone-controlled, dose-ranging study of rivoglitazone, a novel thiazolidinedione for the treatment of type 2 diabetes. *Curr Med Res Opin*. 2010;26(6):1321-31.
146. OECD Guideline for Testing of Chemicals. Adopted by the Council on 30th March 1989. 1989.
147. Pan XM, Li J, Gan R, Hu XN. Preparation and in vitro evaluation of enteric-coated tablets of rosiglitazone sodium. *Saudi Pharm J*. 2015;23(5):581-6.
148. Kulkarni AP, Shahnawaz M, Zaheer Z, Dehghan MHG. Development and Validation of a Dissolution Method for Pioglitazone Tablets. *Dissolution Technologies*. 2012;19(4):36-46.
149. Wring SA, Randolph R, Park S, Abruzzo G, Chen Q, Flattery A, et al. Preclinical Pharmacokinetics and Pharmacodynamic Target of SCY-078, a First-in-Class Orally Active

Antifungal Glucan Synthesis Inhibitor, in Murine Models of Disseminated Candidiasis. *Antimicrob Agents Chemother.* 2017;61(4).

150. Petersen AB, Andersen NS, Konotop G, Hanafiah NH, Raab MS, Kramer A, et al. Synthesis and formulation studies of griseofulvin analogues with improved solubility and metabolic stability. *Eur J Med Chem.* 2017;130:240-7.

151. Giaginis C, Theocharis S, Tsantili-Kakoulidou A. Investigation of the lipophilic behaviour of some thiazolidinediones. Relationships with PPAR-gamma activity. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2007;857(2):181-7.

152. Umathe SN, Dixit PV, Kumar V, Bansod KU, Wanjari MM. Quercetin pretreatment increases the bioavailability of pioglitazone in rats: involvement of CYP3A inhibition. *Biochem Pharmacol.* 2008;75(8):1670-6.

153. Bolton GC, Keogh JP, East PD, Hollis FJ, Shore AD. The fate of a thiazolidinedione antidiabetic agent in rat and dog. *Xenobiotica; the fate of foreign compounds in biological systems.* 1996;26(6):627-36.

ANEXO I – APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA PARA A REALIZAÇÃO DO EXPERIMENT EM ANIMAIS

Protocolo CEUA/FCF/CAR nº 32/2015

Interessado: ELIAS CARVALHO PADILHA

Orientadora: Profa. Dra. Rosângela Gonçalves Peccinini

Projeto: Screening farmacocinético, físico-químico e in vitro dos derivados de tiazolidinodionas: GQ-2, GQ-11, GQ-19 e GQ-177 quanto à absorção oral.

Parecer nº 84/2015 – Comissão de Ética no Uso de Animais

A Comissão de Ética no Uso de Animais desta Faculdade, reunida em 16 de setembro de 2015, considerou que o protocolo para uso de animais na pesquisa: "Screening farmacocinético, físico-químico e in vitro dos derivados de tiazolidinodionas: GQ-2, GQ-11, GQ-19 e GQ-177 quanto à absorção oral", apresentado pelo pós-graduando ELIAS CARVALHO PADILHA, sob orientação da Professora Doutora Rosângela Gonçalves Peccinini, do Departamento de Princípios Ativos Naturais e Toxicologia desta Faculdade, está estruturado dentro dos princípios éticos na experimentação animal do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal - CONCEA, manifestando-se FAVORÁVEL à sua execução. O relatório final do protocolo de pesquisa deverá ser entregue em AGOSTO de 2016 em formulário para este fim.

Araraquara, 21 de setembro de 2015.



Prof. Dr. CARLOS CÉSAR CRESTANI
Coordenador da CEUA