

# RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 22/02/2021.



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA**  
**“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”**  
Faculdade De Ciências Farmacêuticas  
Campus De Araraquara  
Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas



# **Estudo de ADME de compostos derivados do ácido pirazinóico com atividade antimicobacteriana**

Taísa Busaranho Franchin

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Rosângela Gonçalves Peccinini

Coorientador: Prof. Dr. Michel Leandro de Campos

Processo FAPESP nº 2016/23229-1

**Araraquara-SP**

**2019**



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA**  
**“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”**  
Faculdade De Ciências Farmacêuticas  
Campus De Araraquara  
Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas



## **Estudo de ADME de compostos derivados do ácido pirazinóico com atividade antimicobacteriana**

Taísa Busaranho Franchin

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de Pesquisa e Desenvolvimento de Fármacos e Medicamentos, para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Rosângela Gonçalves Peccinini

Coorientador: Prof. Dr. Michel Leandro de Campos

**Araraquara-SP**

**2019**

**Ficha Catalográfica**

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

**F816e** Franchin, Taísa Busaranho.  
Estudo de ADME de compostos derivados do ácido pirazinóico com atividade antimicobacteriana / Taísa Busaranho Franchin. – Araraquara, 2019.  
102 f. : il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista. “Júlio de Mesquita Filho”. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas. Área de Pesquisa em Desenvolvimento de Fármacos e Medicamentos.

Orientadora: Rosângela Gonçalves Peccinini.  
Coorientador: Michel Leandro de Campos.

1. Tuberculose. 2. ADME. 3. Caco2. 4. Microssomas. I. Peccinini, Rosângela Gonçalves, orient. II. Campos, Michel Leandro, coorient. III. Título.

**CAPES: 33004030078P6**

## DEDICATÓRIA

Dedicado à minha Família, por todo o apoio, seja por meio de palavras de consolo, ou de incentivo, que possibilitaram mais essa conquista.

## AGRADECIMENTOS

A Deus, por me permitir mais essa conquista, me garantindo a saúde, força e perseverança necessárias.

Aos meus pais, Gislaine e Adilson, por me incentivarem e apoiarem em mais essa etapa da minha vida. Pelas palavras de consolo e encorajamento. Sou eternamente grata por todos os ensinamentos e suporte. Amo vocês!

A minha irmã Lara, pela amizade, risadas e conversas. Ainda me esforço para ser um bom exemplo para você. Te amo!

Ao meu namorado, Raul, por ser meu porto seguro, por me escutar em cada reclamação, por aguentar meus surtos da maneira mais fofa possível, por todo o companheirismo e vibração a cada pequena conquista, por me fazer sair da minha zona de conforto e ser fonte das minhas risadas mais verdadeiras. Te amo tanto!!

As amigas Letícia, Maria Júlia e Débora por me acompanharem em mais essa conquista, pelas risadas, horas de conversa jogada fora, pelos conselhos nos momentos cruciais, é um prazer poder dividir todo o nosso amadurecimento com vocês!

A minha orientadora, Prof<sup>a</sup> Rosângela, serei eternamente grata pelo acolhimento em seu grupo de pesquisa. Obrigada pelos ensinamentos, sejam eles na sala de aula, na sua sala, ou na copa e principalmente pelos ensinamentos que nada tinham a ver com a pesquisa, obrigada pelos conselhos e por ser parte de quem eu sou hoje.

Aos amigos de laboratório, que foram cruciais na manutenção da minha sanidade mental:

Bruna, muito obrigada por dividir tão intimamente essa jornada comigo, pelos surtos conjuntos, pelas conversas no sofá antes de trocar o meio das células, pelas teorias mirabolantes, pelas risadas infinitas e nas horas mais estranhas. Com certeza o fardo foi mais leve pela sua presença.

Jonata, esse irmão mais velho que a vida me deu, sou infinitamente grata por te conhecer e pela nossa amizade, pelas risadas escandalosas, pelas madrugadas no laboratório, pelos conselhos e incentivos, por todo o aprendizado conjunto. Que você continue espalhando a LUZ por onde for!

Nataly, uma irmã mais nova que a vida encarregou de me dar, obrigada pela amizade, pelos conselhos, pelas risadas, gordices e confidências.

Evelin, obrigada pela amizade, ensinamentos, risadas e pelas melhores poses de foto.

Carol, muito obrigada por todos os conselhos, sejam na execução dos trabalhos ou na vida pessoal, principalmente os de cabelo e maquiagem!! Obrigada pelas risadas, amizade e ensinamentos.

Berê, obrigada pelas aulas, pelas risadas, conselhos, amizade e por ser um exemplo de professora e de administração de tempo.

Ao meu coorientador, Michel, obrigada pelos ensinamentos desde a época da iniciação científica e por todo o incentivo.

Aos funcionários do Laboratório de Bioequivalência, Kelly e Marcos por todo o suporte durante a pesquisa, pela ajuda nas prestações de contas e compra de insumos, e a técnica Maria pela ajuda fornecida.

Ao Rone, por toda a ajuda nos ensaios de Caco-2, por compartilhar seu conhecimento, nos ensinando desde os passos mais básico e nos aguentando por mais tempo que o esperado.

Ao Prof João Paulo dos Santos Fernandes, pelo fornecimento das moléculas e pela avaliação deste trabalho.

A Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP-Araraquara

À FAPESP, pelo apoio recebido. O presente trabalho foi realizado com apoio da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – Processo nº 2016/23229-1

À CAPES, pelo apoio recebido. O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

## EPIGRAFE

*“Se você não estiver disposto a arriscar o habitual, você terá que se contentar com o comum.”*

*Jim Rohn*



## RESUMO

A tuberculose é uma doença infectocontagiosa provocada pelo *Mycobacterium tuberculosis* que apesar de reconhecida a muitos anos, ainda tem ocorrência frequente na sociedade, assim como os casos de resistência aos medicamentos, que tem apresentado aumento significativo nos últimos anos. Na busca de novas estratégias para o tratamento, pesquisadores da Unifesp-Diadema desenvolveram novos compostos com potencial atividade antimicobacteriana, denominados pirazinoato de metila (I), pirazinoato de etila (II), pirazinoato de butila (III) e 2-(pirazina-2-carboniloxi)etil pirazina-2-carboxilato (IV), derivados do ácido pirazinóico, principal metabólito da pirazinamida. Ensaio *in vitro* como a avaliação de propriedades físico-químicas e ensaios que avaliam a absorção, distribuição, metabolismo e excreção (ADME), auxiliam na predição das características farmacocinéticas em um estágio inicial do desenvolvimento, permitindo a seleção dos melhores candidatos a novos fármacos. O presente estudo teve como objetivo a realização de *screening* físico-químico (determinação do coeficiente de partição e da estabilidade química nos pHs de 1,2; 7,4 e 8,8) e ensaios de ADME (cálculo da permeabilidade aparente em monocamada de células Caco-2, a avaliação da estabilidade metabólica em microsoma de ratos e de humanos e avaliação da estabilidade em plasma de rato). Os compostos apresentaram logP de valor negativo, indicando hidrofobicidade e foi observada estabilidade frente os três pHs avaliados. A permeabilidade aparente calculada para os compostos I, II, III e IV resultou em valores de  $4,66 \times 10^{-6}$ ;  $4,14 \times 10^{-6}$ ;  $66 \times 10^{-6}$  e  $1,61 \times 10^{-6}$  cm/s, e estes valores indicam boa expectativa de absorção, com destaque para III, cujo resultado traz expectativas de absorção completa. Os compostos apresentaram estabilidade metabólica frente as enzimas microsossomais, de humanos e de ratos. Os compostos I e IV apresentaram instabilidade em plasma de rato em 8 horas, e os compostos II e III em 6 horas. Considerando o tempo prolongado para a ocorrência da degradação significativa, não há expectativas de que esta instabilidade comprometa a ação *in vivo* dos compostos. Os resultados obtidos trazem expectativas favoráveis a continuidade do desenvolvimento para as moléculas avaliadas, além de servirem como base para interpretação e planejamento de ensaios *in vivo* futuros.

**Palavras-chave:** Tuberculose. ADME. Caco2. Microsomas.

## ABSTRACT

Tuberculosis is an infectious disease caused by *Mycobacterium tuberculosis* which, although recognized for many years, still occurs frequently in society, as well as cases of drug resistance, which has shown a significant increase in recent years. In the search for new treatment strategies, researchers at Unifesp-Diadema have developed new compounds with potential antimycobacterial activity called methyl pyrazinoate (I), ethyl pyrazinoate (II), butyl pyrazinoate (III) and 2- (pyrazine-2 -carbonyloxy) ethyl] pyrazine-2-carboxylate (IV), derivatives of pyrazinoic acid, pyrazinamide's main metabolite. In vitro assays such as the evaluation of physicochemical properties and assays that evaluate absorption, distribution, metabolism and excretion (ADME), aid in the prediction of pharmacokinetic characteristics at an early stage of development, allowing the selection of the best candidates for new drugs. The objective of the present study was the physical-chemical screening (determination of partition coefficient and chemical stability at pHs of 1.2, 7.4 and 8.8) and ADME tests (calculation of the apparent permeability in monolayer of Caco-2 cells, evaluation of metabolic stability in rat and human microsomes and evaluation of stability in rat plasma). The compounds presented logP negative value, indicating hydrophilicity and stability was observed the three pHs evaluated. The apparent permeability calculated for compounds I, II, III and IV resulted in values of  $4.66 \times 10^{-6}$ ;  $4.14 \times 10^{-6}$ ;  $66 \times 10^{-6}$  and  $1.61 \times 10^{-6}$  cm/s, these values indicate a good expectation of absorption, especially for III, whose result brings expectations of complete absorption. The compounds showed metabolic stability front human and rat microsomal enzymes. Compounds I and IV showed instability in rat plasma at 8 hours, and compounds II and III at 6 hours. Considering the prolonged time for the occurrence of significant degradation, there is no expectation that this instability will compromise the in vivo action of the compounds. The results bring favorable expectations for the continuity of the development of the evaluated molecules, besides serving as a basis for interpretation and planning of future in vivo assays.

**Keywords:** Tuberculosis. ADME. Caco2. Microsomes.

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

ADME – Absorção, distribuição, metabolismo e excreção

AIDS - *Acquired immunodeficiency syndrome*

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

BAAR - Bacilos álcool-ácido resistentes

BCG - Bacilo de Calmette e Guérin

Cl – Clearance

CQA – Controle de qualidade alto

CQB – Controle de qualidade baixo

CYP – Citocromo

DMEM - *Dulbecco's Modified Eagle Medium*

DMSO – Dimetilsulfóxido

EMA – Agência Europeia de Medicamentos

EMB – Etambutol

FDA – *Food and drug administration*

GST - Glutathione-S-transferase

HIV – Vírus da imunodeficiência humana

HLM – Human Liver Microsome (Microsoma hepático humano)

INH – Isoniazida

LORA - Low oxygen recovery assay

MIC – Minimum Inhibitory Concentration (Concentração Inibitória Mínima)

MDCK - *Madin-Darby Canine Kidney*

MDR-TB – Tuberculose multirresistente

MgCl<sub>2</sub> – Cloreto de magnésio

NADP/NADPH - Fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina

nm - nanômetro

PAMPA - Parallel Artificial Membrane Permeation Assay

P<sub>app</sub> – Permeabilidade aparente

PI - Padrão Interno

PBS - *Phosphate Buffered Saline*

PCR - *Polymerase chain reaction*

PZA – Pirazinamida

PZAse – Pirazinamidase

RLM – Rat Liver Microsome (Microsoma hepático de rato)

RMP – Rifampicina

SFB – Soro fetal bovino

SRN – Sistema regenerador de NADPH

SUS – Sistema único de saúde

$t_{1/2}$  – Meia vida de eliminação

TB – Tuberculose

TEER – *Trans epithelial electrical resistance*

UDPGT - UDP-glicuronil transferase

UGT - UDP-glucuronosiltransferases

UHPLC – *Ultra High Performance Liquid Chromatography*

UNIFESP - Universidade Federal de São Paulo

XDR-TB – Tuberculose resistência extensiva

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Substâncias utilizadas para a determinação do Log P. ....	49
Tabela 2. Curvas analíticas com regressão linear, exatidão e precisão.....	62
Tabela 3. Precisão e exatidão do LIQ de cada composto.....	62
Tabela 4. Curvas bioanalíticas em microssoma de rato com regressão linear, exatidão e precisão.....	64
Tabela 5. Curvas bioanalíticas em microssoma de humano com regressão linear, exatidão e precisão.....	66
Tabela 6. Curvas bioanalíticas em plasma de rato com regressão linear, exatidão e precisão.....	68
Tabela 7. Valores de Log P obtidos para cada composto.....	69
Tabela 8. Valores de LogP dos substratos das principais enzimas metabolizadoras.....	70
Tabela 9. Viabilidade celular em cada concentração usada para cada composto no teste de resazurina expresso em porcentagem.....	75
Tabela 10. Viabilidade celular nas novas concentrações usada para cada composto no teste de resazurina expresso em porcentagem.....	76

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estruturas dos novos fármacos para tratamento de TB resistente .....	19
Figura 2. Estrutura do composto sintetizado por Nair e colaboradores, com possibilidade de ação no tratamento da MDR-TB.....	20
Figura 3. Estrutura dos compostos mais promissores sintetizados por Salunke e colaboradores.....	20
Figura 4. Estruturas dos novos compostos derivados do ácido pirazinóico.....	22
Figura 5. Conversão da pirazinamida a ácido pirazinóico pela ação da pirazinamidase.....	22
Figura 6. Mycobacterium tuberculosis.....	27
Figura 7. Alguns dos estudos in vitro que auxiliam na determinação precoce das propriedades farmacocinéticas.....	35
Figura 8. Esquema de diferenciação das células Caco-2 em enterócitos.....	41
Figura 9. Disposição dos compostos e controles na placa espelho.....	53
Figura 10. Disposição dos compostos e controles na placa com células.....	53
Figura 11. Diagrama de uma monocamada Caco-2 cultivada num suporte de filtro permeável.....	55
Figura 12. Gráficos indicando o comprimento de onda de maior absorbância dos compostos após diluição em DMSO, após varredura em espectrofotômetro.....	59
Figura 13. Gráficos indicando o comprimento de onda de maior absorbância dos compostos após diluição em metanol, após varredura em espectrofotômetro.....	60
Figura 14. Cromatograma dos compostos em metanol na concentração de 10 µg/mL.....	61
Figura 15. Cromatogramas dos compostos a 2,5 µg/mL em microsossoma de rato.....	63
Figura 16. Cromatogramas dos compostos a 2,5 µg/mL em microsossoma humano.....	65
Figura 17. Cromatogramas dos compostos a 10 µg/mL em plasma de rato.....	67
Figura 18. Gráfico de Log k versus Log P dos padrões.....	69

Figura 19. Estabilidade dos compostos em tampão Clark-Lubs (pH 1,2) .....	71
Figura 20. Estabilidade dos compostos em tampão Hank's (pH 7,4) .....	72
Figura 21. Estabilidade dos compostos em tampão Tris (pH 8,8) .....	73
Figura 22. Células Caco-2 em cultura. Na figura da esquerda, as células no início do cultivo, ainda isoladas e na figura da direita, após 21 dias de cultivo, formando uma monocamada.....	74
Figura 23. Resultado do ensaio de viabilidade celular por resazurina.....	75
Figura 24. Permeabilidade aparente dos compostos testes e controles.....	77
Figura 25. Gráfico demonstrando a relação entre LogP e Papp dos compostos testes.....	78
Figura 26. Estabilidade metabólica do composto II em três concentrações em Tampão PBS.....	79
Figura 27. Estabilidade metabólica do composto II em três concentrações sem SRN.....	80
Figura 28. Estabilidade metabólica do composto II em duas concentrações com SRN.....	80
Figura 29. Estabilidade metabólica do composto I em microsossoma de rato.....	81
Figura 30. Estabilidade metabólica do composto II em microsossoma de rato.....	81
Figura 31. Estabilidade metabólica do composto III em microsossoma de rato.....	82
Figura 32. Estabilidade metabólica do composto IV em microsossoma de rato.....	82
Figura 33. Estabilidade metabólica do composto I em microsossoma humano.....	83
Figura 34. Estabilidade metabólica do composto II em microsossoma humano.....	83
Figura 35. Estabilidade metabólica do composto III em microsossoma humano.....	84
Figura 36. Estabilidade metabólica do composto IV em microsossoma humano.....	84
Figura 37. Estabilidade do composto I em plasma de rato.....	87
Figura 38. Estabilidade do composto II em plasma de rato.....	87
Figura 39. Estabilidade do composto III em plasma de rato.....	88
Figura 40. Estabilidade do composto IV em plasma de rato.....	88

## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	18
2	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	25
2.1	História da Tuberculose.....	25
2.2	A bactéria.....	26
2.3	Patogênese.....	27
2.4	Diagnóstico.....	28
2.5	Epidemiologia no Mundo e no Brasil.....	30
2.6	Tratamento.....	30
2.7	Tuberculose resistente.....	32
2.8	O desenvolvimento de novos fármacos: estudos ADME e a farmacocinética.....	33
2.9	Screening físico-químico e Estudos de ADME.....	34
2.9.1	Coeficiente de Partição.....	35
2.9.2	Estabilidade química.....	37
2.9.3	Estabilidade <i>ex vivo</i> .....	38
2.9.4	Permeabilidade.....	39
2.9.5	Estabilidade Metabólica.....	42
3	OBJETIVOS.....	45
3.1	Objetivo Geral.....	45
3.2	Objetivos Específicos.....	45
4	MATERIAIS E MÉTODOS.....	46
4.1	Determinação da absorvidade dos compostos I, II, III e IV por análise espectrofotométrica.....	46
4.2	Desenvolvimento e validação dos métodos analítico e bioanalítico para a determinação dos compostos I, II, III e IV em UHPLC.....	46
4.2.1	Limites de Confiança.....	46
4.2.2	Sistema cromatográfico.....	47
4.2.3	Método analítico.....	47



4.2.4 Método bioanalítico .....	48
4.2.4.1    Microsoma de rato e humano .....	48
4.2.4.2    Plasma de rato .....	48
4.3    Determinação do Log P dos compostos I, II, III e IV. ....	49
4.3.1 Determinação <i>in silico</i> .....	49
4.3.2 Método Cromatográfico .....	49
4.4 Ensaio de estabilidade química dos I, II, III e IV nos pHs 1,2, 9,0 e tampão Hanks .....	50
4.5    Avaliação da permeabilidade dos compostos I, II, III e IV através da utilização de células Caco-2 .....	51
4.5.1    Cultura de células Caco-2.....	51
4.5.2    Ensaio de citotoxicidade pelo teste da Resazurina.....	51
4.5.3    Ensaio de permeabilidade <i>in vitro</i> .....	54
4.6    Ensaio <i>in vitro</i> de metabolismo dos I, II, III e IV em modelo microsomal....	56
4.7 Ensaio de estabilidade <i>ex vivo</i> dos compostos I, II, III e IV.....	58
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	58
5.1 Determinação da absorvidade dos compostos I, II, III e IV por análise espectrofotométrica.....	59
5.2 Desenvolvimento e validação dos métodos analítico e bioanalítico para a determinação dos compostos I, II, III e IV em UHPLC .....	61
5.2.1 Método analítico.....	61
5.2.2 Método bioanalítico.....	62
5.3 Determinação do Log P dos compostos I, II, III e IV. ....	68
5.3.1 Determinação <i>in silico</i> .....	68
5.3.2 Método Cromatográfico .....	68
5.4    Ensaio de estabilidade química dos compostos I, II, III e IV nos pHs 1,2, 8,8 e tampão Hanks .....	70
5.4.1    Estabilidade no pH 1,2.....	70

5.4.2 Estabilidade no pH 7,4.....	72
5.4.3 Estabilidade no pH 8,8.....	73
5.5 Avaliação da permeabilidade dos compostos I, II, III e IV através da utilização de células Caco-2 .....	74
5.5.1 Cultura de Células Caco-2.....	74
5.5.2 Ensaio de Viabilidade Celular pelo teste da Resazurina.....	74
5.5.3 Ensaio de permeabilidade in vitro .....	76
5.6 Ensaio in vitro de metabolismo dos compostos I, II, III e IV em modelo microsomal.....	79
5.6.1 Microsoma de rato .....	81
5.6.2 Microsoma humano.....	83
5.7 Ensaio de estabilidade ex vivo dos compostos I, II, III e IV .....	86
6 CONCLUSÕES .....	90
REFERÊNCIAS.....	92

## 1 INTRODUÇÃO

A tuberculose (TB) é uma doença causada principalmente pelo *Mycobacterium tuberculosis*, e seu caráter infectocontagioso se dá devido à forma de transmissão, que ocorre a partir de partículas infectantes presentes no ar que o paciente infectado expele ao tossir, espirrar ou até mesmo falar. Uma vez infectados, a maioria dos sintomas apresentados pelos pacientes é decorrente da resposta imune contra o microrganismo e não da virulência bacteriana em si. Enfraquecimento, febre, perda de peso, dor no peito, insuficiência respiratória e tosse, que pode ou não ser acompanhada de escarro, são os principais sintomas apresentados (TRABULSI; ALTERTHUM, 2008; TORTORA et al., 2010).

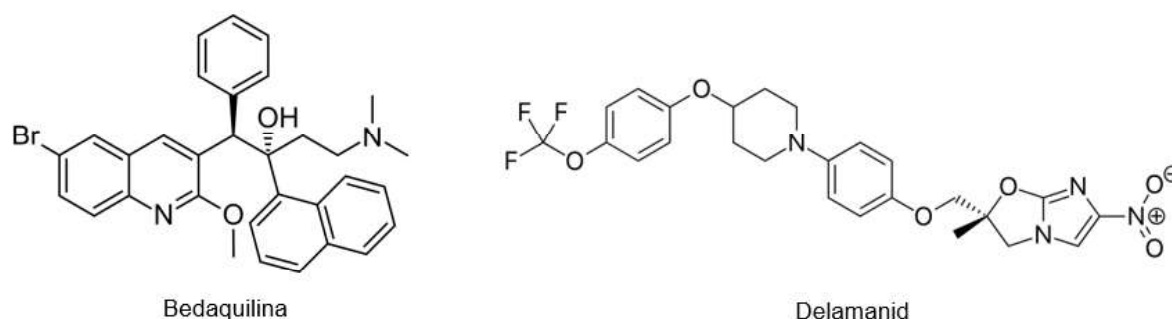
Mesmo com o reconhecimento da TB como emergência global há mais de vinte anos, ela ainda foi responsável por mais de 1,3 milhões de mortes mundialmente apenas em 2017, além dos 10 milhões de novos casos no mesmo ano (WHO, 2018).

Em 1979 o esquema básico de tratamento da TB era constituído de isoniazida (INH), rifampicina (RMP), pirazinamida (PZA). Em 2009, devido ao aumento dos casos de resistência a INH, o Programa Nacional de Controle da Tuberculose revisou esse esquema e adicionou o etambutol (EMB). Assim, o atual esquema básico de tratamento, indicado para novos casos em adultos e adolescentes, é composto por INH, PZA, RMP e EMB por dois meses, seguido de quatro meses do uso de INH e RMP (BRASIL, 2011). No início de 1980 foram reportados os primeiros casos de resistência bacteriana aos fármacos mais efetivos no tratamento da TB, INH e RMP (CRUZ-KNIGHT; BLAKE-GUMBS, 2013). Desde então, os casos de resistência só têm aumentado, com 480.000 novos casos apenas em 2015 (WHO, 2016). Atualmente são encontrados diferentes tipos de resistência: monorresistência, polirresistência, multirresistência (MDR- TB), resistência extensiva (XDR-TB) (BRASIL, 2011).

Os casos de TB multirresistente são de extrema preocupação já que foram responsáveis por aproximadamente 190.000 mortes mundialmente em 2014 (WHO, 2015), além de que seu tratamento se torna mais dispendioso e de maior toxicidade, uma vez que são utilizados cinco medicamentos por um período de, no mínimo, dezoito meses, podendo ser prolongado até que as culturas apresentem resultado

negativo por no mínimo nove meses (KIRIMUHUZYA, 2012). Os casos de XDR-TB requerem um tratamento mais agressivo e por mais tempo que os de MDR-TB, e ainda assim, em ambos os casos, a eficácia não é grande, e as chances de cura são pequenas.

Mesmo com a epidemia de TB resistente, apenas em 2012, cinquenta anos após a utilização dos fármacos de primeira linha, novos medicamentos foram aprovados pelas agências internacionais para uso no tratamento da MDR-TB, em adultos. A bedaquilina e a delamanida (Figura 1) não são indicados para TB extrapulmonar, nem em casos de gravidez (WHO,2015; TIBERI et al., 2018).



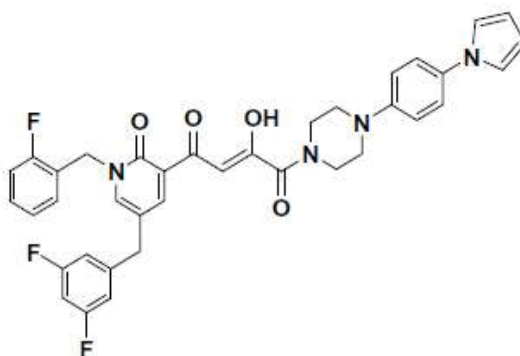
**Figura 1.** Estruturas dos novos fármacos para tratamento de TB resistente.

A bedaquilina possui mecanismo de ação diferenciado de todos os outros fármacos anti-TB, uma vez que ela tem como alvo o metabolismo energético da micobactéria. O composto tem afinidade pelo complexo de ATP sintase, bloqueando-o e impedindo a produção de ATP. Seu mecanismo único a torna ativa contra todos os estados do *M. tuberculosis* sendo ele ativo, dormente, replicante, não replicante, intra e extracelular (LAKSHMANAN; XAVIER, 2013; PARK et al., 2018).

A delamanida é um pró-fármaco, cuja ativação depende da coenzima F420: NADP<sup>+</sup> oxidoreductase, que inibe a síntese do ácido micólico, inibindo a formação da parede celular, facilitando a entrada no fármaco na micobactéria. Ela é ativa nas formas replicante, dormente, intra e extracelular do bacilo e possui o menor valor de concentração inibitória mínima (MIC) dentre todos os fármacos anti-TB (FUJIWARA et al., 2018). A pretomanida, também da classe dos Nitroimidazóis e alvo semelhante ao delamanid aguarda aprovação regulatória (SILVA et al., 2018).

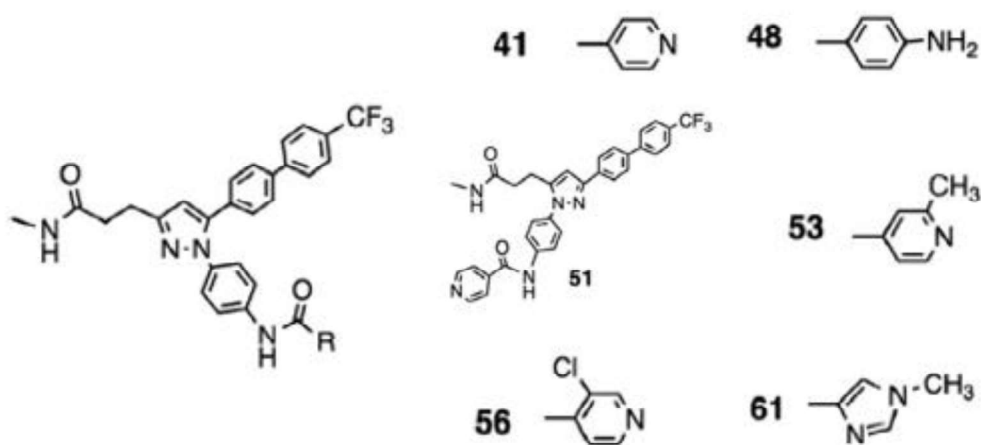
No campo de desenvolvimento de fármacos, Nair e colaboradores (2015) desenvolveram uma molécula (Figura 2) que é um potencial agente para o

tratamento da MDR-TB, uma vez que seu valor de MIC foi de 1,56  $\mu\text{g/mL}$ , o ensaio de viabilidade celular indicou baixa toxicidade a macrófagos não-infectados, o composto apresentou meia-vida de 14,4h após ensaio de metabolismo com microsomas humanos, além de exibir um comportamento sinérgico ao ser combinado com um inibidor da síntese do ácido micólico.



**Figura 2.** Estrutura do composto sintetizado por Nair e colaboradores, com possibilidade de ação no tratamento da MDR-TB.

Salunke e colaboradores (2015) realizaram um *screening* com 64 compostos desenvolvidos a partir do esqueleto do celecoxibe, o ensaio de atividade antimicobacteriana *in vitro* demonstrou que seis compostos (Figura 3) se apresentaram mais promissores, apresentando resultados de  $\text{IC}_{50}$  que variaram de 0,18 a 0,48  $\mu\text{M}$ . Além de que os compostos 41, 51 e 53 foram capazes de inibir o bacilo tão efetivamente quanto a INH e que todos os compostos mostraram atividade frente a cepas multirresistentes.



**Figura 3.** Estrutura dos compostos mais promissores sintetizados por Salunke e colaboradores.

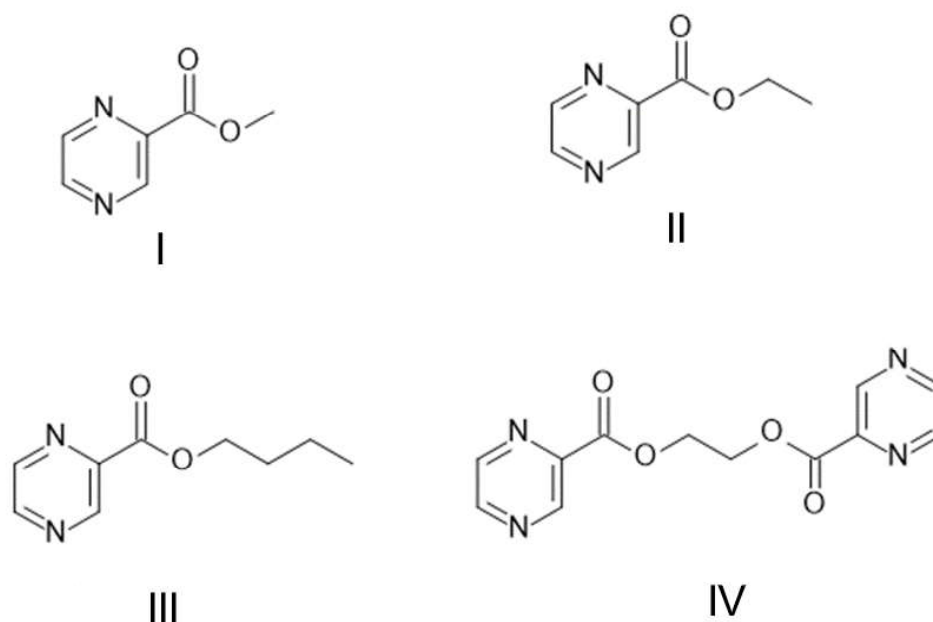
Li e colaboradores (2015) também realizaram um *screening* com avaliação de 45.000 compostos, sendo realizada a síntese de 25 compostos análogos ao azol disubstituído, que se mostraram não citotóxicos. Todos os compostos, exceto 3, se mostraram ativos frente a cepas MDR e XDR-TB, com CIM variando de 1 a 64 mg/L, valor bem menor que o da RMP, que é de 256 mg/L, além de que alguns dos compostos se mostraram seletivos para o bacilo da TB.

Alguns outros compostos, como o Q203 da classe das Imidazopiridina-amidas, que apresenta atividade semelhante à bedaquilina; a sutezolida, da classe das Oxazolidinonas, cujo alvo é a síntese proteica no ribossomo 23s; o SQ109, da classe 1,2-etilenodiaminas que inibem a síntese da parede celular e pode ser sinérgico com a bedaquilina se encontram nas fases iniciais dos ensaios (SILVA et al., 2018).

No Brasil, o grupo de pesquisa do Instituto de Ciências Ambientais, Químicas e Farmacêuticas da Universidade Federal de São Paulo (Unifesp), sob a liderança do Prof. Dr. João Paulo dos Santos Fernandes, desenvolveu novas moléculas com potencial atividade antimicobacteriana. Os compostos tiveram sua atividade testada *in vitro*, a partir dos ensaios de Alamar Blue, utilizando cepa replicante de *M. tuberculosis*, e LORA (Low oxygen recovery assay), com cepas não replicantes, sob condições de hipóxia. Os MICs foram definidos como as concentrações mais baixas que reduziram a fluorescência em 90%, quando comparado aos controles. Os resultados indicaram moderada atividade antimicobacteriana em ambos os ensaios. Os compostos também tiveram a citotoxicidade avaliada, através de ensaio com células mamíferas e se demonstraram não citotóxicas, indicando a seletividade para micobactérias. (SEGRETTI et al., 2016).

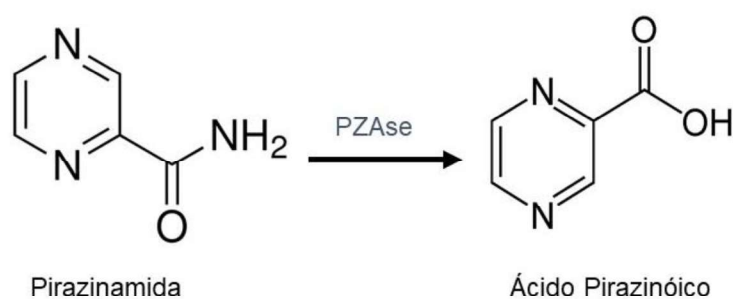
As moléculas denominadas pirazinoato de metila (I), pirazinoato de etila (II), pirazinoato de butila (III) e 2-(pirazina-2-carboniloxi)etil pirazina-2-carboxilato (IV) (figura 4), são ésteres do ácido pirazinóico (POA), principal metabólito da PZA, composto que se acredita ser o responsável pela sua ação. Esse metabólito é obtido através da conversão da PZA pela pirazinamidase (PZAse), enzima presente na micobactéria, sendo altamente hidrofílico e facilmente ionizável em pH fisiológico, o que o impossibilita de atravessar a membrana celular do *Mycobacterium*. Assim, foi aplicada a estratégia de latência por esterificação,

de modo que o grupo carboxílico se tornou não ionizável, aumentando a lipofilicidade molecular, o que possibilita a penetração dos compostos na forma de éster para posterior liberação do POA dentro das micobactérias (SEGRETTI et al., 2016).



**Figura 4.** Estruturas dos novos compostos derivados do ácido pirazinóico

Como mencionado acima, a conversão da PZA a POA se dá pela enzima PZAse (figura 5) e acredita-se que essa conversão está relacionada a atividade do fármaco, uma vez que cepas resistentes ao fármaco não apresentam a enzima. Como os ésteres do POA necessitam apenas da hidrólise a partir de esterases, há maior chance de serem ativos mesmo em cepas resistentes (SEGRETTI et al., 2016).



**Figura 5.** Conversão da pirazinamida a ácido pirazinóico pela ação da pirazinamidase. Adaptado de Segretti et al., 2016.

As propriedades farmacocinéticas, o frequente uso de associações medicamentosas que propicia a ocorrência de interações de fármacos e a toxicidade, são os principais fatores responsáveis por mais da metade dos fracassos da introdução de novos fármacos no mercado (WATERBEEMD; GIFFORD, 2003; GOMEZ-LECHON et al., 2007). De acordo com Singh (2006), compostos que apresentam uma farmacocinética favorável são mais prováveis de serem eficazes e seguros. Portanto, a avaliação pré-clínica precoce da farmacocinética deve garantir redução das falhas no desenvolvimento de produtos em fases posteriores, como na clínica.

Segundo Gomez-Lechon e colaboradores (2007), alguns parâmetros devem ser avaliados logo nos estágios iniciais do desenvolvimento, garantindo a seleção de compostos mais seguros e efetivos. Entre esses parâmetros estão: estabilidade e perfil metabólico; identificação de metabólitos; extrapolação dos resultados *in vitro* para estimativa da farmacocinética *in vivo*; identificação das enzimas do citocromo P450 (CYP450) envolvidas no metabolismo do fármaco; interação fármaco-fármaco devido à indução/inibição enzimática; e a toxicidade associada ao metabolismo do fármaco. Uma maneira de avaliar precocemente alguns destes parâmetros é a realização de ensaios ADME (absorção, distribuição, metabolismo e excreção) que consistem em ensaios separados, específicos para cada parâmetro.

As propriedades físico-químicas da molécula também apresentam grande influência na disposição cinética do fármaco, sendo importante a sua análise como uma maneira de predizer, bem como compreender o comportamento deste no organismo.

As vantagens da utilização dos ensaios *in vitro* são inúmeras, utilizando quantidades mínimas dos compostos, promovendo de maneira simples, conveniente e rápida um modo de avaliar os candidatos e as suas propriedades. (VENKATAKRISHNAN et al., 2003; ZHANG et al., 2012).

No presente estudo avaliamos, através de ensaios *in vitro*, os novos compostos derivados do ácido pirazinóico com atividade antimicobacteriana para obter informações relevantes à continuidade do processo de desenvolvimento e trazer mais agilidade ao processo de planejamento dos ensaios futuros. As informações obtidas nestas avaliações *in vitro* serão úteis tanto na fase biofarmacêutica - para o planejamento e elaboração da forma galênica - quanto para



o planejamento de futuros ensaios *in vivo*, seja na seleção da via de administração, do modelo animal mais apropriado e para auxiliar na interpretação dos resultados obtidos nos estudos de farmacocinética.

## 6 CONCLUSÕES

Os métodos analíticos e bioanalíticos desenvolvidos se mostraram adequados para as avaliações propostas neste trabalho, e podem ser utilizados para a realização das análises necessárias à continuidade do desenvolvimento.

Os valores de LogP obtidos indicam maior característica hidrofílica dos compostos, concordante com as previsões realizadas *in silico*. Essa característica pode trazer consequências negativas sobre o perfil de absorção enteral, no entanto, o processo de absorção está relacionado também a outros fatores além da lipo ou hidrossolubilidade. Estes valores de LogP também apontam para uma expectativa de baixa porcentagem de ligação desses compostos às proteínas plasmáticas. Ainda, esses valores de LogP sugerem baixa susceptibilidade dos compostos ao metabolismo mediado por sistemas enzimáticos hepáticos, o que traz a expectativa de que, no sistema biológico, a eliminação desses compostos pode ser essencialmente renal.

O estudo de estabilidade indicou que todos os compostos, tanto na concentração alta, quanto na baixa, se mostraram estáveis nos três pH avaliados. Esta característica permite o planejamento de estudos *in vivo* com administração dos compostos pela via oral com baixa expectativa de ocorrência de degradação química em razão do pH do meio no trato digestório.

O ensaio de permeabilidade indicou que as moléculas possuem expectativa de boa absorção enteral, tendo uma delas (III) inclusive, apresentado predição de absorção completa. Estes resultados de Papp reforçam que é possível planejar estudos *in vivo* com administração oral.

O ensaio de estabilidade metabólica demonstrou que os compostos são estáveis frente às enzimas microssomais tanto de ratos, quanto de humanos. Considerando a estabilidade metabólica, é possível que a excreção inalterada na urina seja um mecanismo importante de eliminação, indicando que o planejamento dos estudos *in vivo* deve incluir a coleta de urina para análise dos compostos e, assim, a determinação do CI renal e da fração dos compostos eliminada inalterada na urina.

O ensaio de estabilidade em plasma demonstrou que apesar de ocorrer degradação, esta se dá em tempo avançado, o que não compromete a expectativa de atividade dos compostos no sistema biológico.

Considerando todos os resultados obtidos, podemos inferir que os compostos I, II, III e IV apresentam características adequadas para a continuidade do desenvolvimento dessa série de análogos do ácido pirazinóico. O planejamento e a interpretação dos ensaios futuros devem considerar as informações obtidas no presente trabalho, com significativa agilização deste processo de desenvolvimento.

## REFERÊNCIAS

ACKLEY, D. C.; ROCKICH, K. T.; BAKER, T. R. Metabolic stability assessed by liver microsomes and hepatocytes. In: YAN, Z.; CALDWELL, G. W. (editor). **Optimization in drug discovery: In Vitro** methods. Totowa, NJ: Humana Press, 2004. p. 151-162.

AHMED, S. A.; GOGAL JR, R. M.; WALSH, J. E. A new rapid and simple non-radioactive assay to monitor and determine the proliferation of lymphocytes: an alternative to [3H] thymidine incorporation assay. **Journal of Immunological Methods**, v. 170, n. 2, p. 211-224, 1994.

AL-NASIRY, S.; GEUSENS, N.; HANSSENS, M.; LUYTEN, C.; PIJNENBORG, R. The use of Alamar Blue assay for quantitative analysis of viability, migration and invasion of choriocarcinoma cells. **Human Reproduction**, v. 22, n. 5, p. 1304-1309, 2007.

ANDERLE, P., *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. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 87, n. 6, p. 757-762, 1998.

ANDRÉS, A., *et al.* Setup and validation of shake-flask procedures for the determination of partition coefficients (log D) from low drug amounts. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 76, p. 181-191, 2015.

ARENA, A; PHILLIPS, J.; BLANCHARD, M. Drug transport assays in a 96-well system: reproducibility and correlation to human absorption. In: SIGMA-ALDRICH. Millipore Corporation, Life Science Division, Danvers, MA. 2003. Disponível em: <<https://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/protocols/biology/multiscreen-caco-2-assay-system.html>>.

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**, v. 175, n. 3, p. 880-885, 1991.

BALIMANE, P. V.; CHONG, S. Cell culture-based models for intestinal permeability: a critique. **Drug discovery today**, v. 10, n. 5, p. 335-343, 2005.

BARBERIS, I., *et al.* The history of tuberculosis: from the first historical records to the isolation of Koch's bacillus. **Journal of preventive medicine and hygiene**, v. 58, n. 1, p. E9, 2017.

BIGANZOLI, E., *et al.* Use of a Caco-2 cell culture model for the characterization of intestinal absorption of antibiotics. **Il Farmaco**, v. 54, n. 9, p. 594-599, 1999.

BONNIER, F., KEATING, M. E., WROBEL, T. P., MAJZNER, K., BARANSKA, M., GARCIA-MUNOZ, A., & BYRNE, H. J. Cell viability assessment using the Alamar blue assay: a comparison of 2D and 3D cell culture models. **Toxicology in vitro**, 29(1), 124-131, 2015.

BRASIL. Ministério Da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Manual de recomendações para o controle da tuberculose no Brasil**. Brasília: Ministério da Saúde, 2011. 284 p.

BRASIL. Ministério da Saúde. Perspectivas brasileiras para o fim da tuberculose como problema de saúde pública. **Boletim Epidemiológico**. v.47 n.13, p. 1-15, 2016.

BRASIL. Ministério da Saúde. Teste Rápido Molecular para tuberculose amplia rede de diagnóstico. Disponível em: <<http://portalms.saude.gov.br/noticias/agencia-saude/42872-teste-rapido-molecular-para-tuberculose-amplia-rede-de-diagnostico>>.

Acesso em 10 de setembro de 2018.

BRANDON, E. F., *et al.* An update on in vitro test methods in human hepatic drug biotransformation research: pros and cons. **Toxicol Appl Pharmacol**, v. 189, n. 3, p. 233-46, Jun 15 2003. ISSN 0041-008X

BRAVO, S. A., *et al.* In-depth evaluation of Gly-Sar transport parameters as a function of culture time in the Caco-2 cell model. **European journal of pharmaceutical sciences**, v. 21, n. 1, p. 77-86, 2004.

CALIXTO, J. B.; SIQUEIRA JUNIOR, J. M. Desenvolvimento de medicamentos no Brasil: desafios. **Gazeta médica da Bahia**, v. 78, n. 1, 2008.

CAMPOS, H. S. *et al.* Diagnóstico da tuberculose. **Pulmão, RJ**, v. 15, n. 2, p. 92-99, 2006.

CARLILE, D. J. *et al.* Microsomal prediction of in vivo clearance of CYP2C9 substrates in humans. **British journal of clinical pharmacology**, v. 47, n. 6, p. 625-635, 1999

CHEN, X. Q., et al. Discovery pharmaceuticals—challenges and opportunities. **The AAPS journal**, v. 8, n. 2, p. E402-E408, 2006.

COE, K. J.; KOUDRIAKOVA, T. Metabolic stability assessed by liver microsomes and hepatocytes. In: ACKLEY, D.C.; ROCKICH, K. T.; BAKER, T. R. (editor). **Optimization in Drug Discovery**. Totowa, NJ: Humana Press, 2014. p. 87-99.

CRUZ-KNIGHT, W.; L. BLAKE-GUMBS. Tuberculosis: an overview. **Primary Care**, 40, n. 3, p. 743-756, 2013.

DA COSTA NUNES, I. K. A Importância do Estudo do Metabolismo nos Estágios Iniciais de Desenvolvimento de Fármacos. **Revista Virtual de Química**, v. 7, n. 2, p. 649-662, 2015.

DANIEL, T. M. The history of tuberculosis. **Respiratory medicine**, v. 100, n. 11, p. 1862-1870, 2006.

DEKEYSER, J. G.; SHOU, M. Species Differences of Drug-Metabolizing Enzymes. In: Encyclopedia of Drug Metabolism and Interactions. cap 5. 2012

DEN BRAVER, M. W. et al. Characterization of cytochrome P450 isoforms involved in sequential two-step bioactivation of diclofenac to reactive p-benzoquinone imines. **Toxicology letters**, v. 253, p. 46-54, 2016.

DI, L., et al. Optimization of a higher throughput microsomal stability screening assay for profiling drug discovery candidates. **Journal of biomolecular screening**, v. 8, n. 4, p. 453-462, 2003.

DI, L., et al. Development and application of high throughput plasma stability assay for drug discovery. **International journal of pharmaceuticals**, v. 297, n. 1-2, p. 110-119, 2005

DI, L.; KERNS, E. H. Stability challenges in drug discovery. **Chemistry & biodiversity**, v. 6, n. 11, p. 1875-1886, 2009.

DI, L.; KERNS, E. H. Drug-like properties: concepts, structure design and methods from ADME to toxicity optimization. **Academic press**, 2016

DIMASI, J. A.; GRABOWSKI, H. G.; HANSEN, R. W. Innovation in the pharmaceutical industry: new estimates of R&D costs. **Journal of health economics**, v. 47, p. 20-33, 2016.

DOWTY, M. E., et al. ADME. In: TSAIOUN, K.; KATES, S. A. (editor). **ADMET for medicinal chemists**: a practical guide. Hoboken, NJ: Wiley, 2011. p. 145-200.

DRAGOVIC, S., et al. Effect of human glutathione S-transferases on glutathione-dependent inactivation of cytochrome P450-dependent reactive intermediates of diclofenac. **Chemical research in toxicology**, v. 26, n. 11, p. 1632-1641, 2013.

FASINU, P.; J BOUIC, P.; ROSENKRANZ, B. Liver-based in vitro technologies for drug biotransformation studies-a review. **Current drug metabolism**, v. 13, n. 2, p. 215-224, 2012.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION – FDA. Draft Guidance Waiver of In Vivo Bioavailability and Bioequivalence Studies for Immediate-Release Solid Oral Dosage Forms Based on a Biopharmaceutics Classification System. SERVICES, D. O. H. A. H. Rockville: U.S.: Food and Drug Administration (FDA)Center for Drug Evaluation and Research (CDER) 2015. 14 p.

FERNANDES, M. B. et al. Caco-2 cells cytotoxicity of nifuroxazide derivatives with potential activity against Methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA). **Toxicology in Vitro**, v. 26, n. 3, p. 535-540, 2012.

FIELDS, R. D.; LANCASTER, M. V. Dual-attribute continuous monitoring of cell proliferation/cytotoxicity. **American biotechnology laboratory**, v.11, n.4, p. 48-50, 1993.

FIORAVANTI, C. Retratos dos pulmões: A invenção de Manoel de Abreu permitiu a detecção de casos precoces de tuberculose **Revista Pesquisa FAPESP**. n. 228, fev., p. 90-91, 2015. Disponível em: <<http://revistapesquisa.fapesp.br/2015/02/18/retratos-dos-pulmoes/>>. Acesso em: 18 dez 2018.

FREDLUND, L.; WINIWARTER, S.; HILGENDORF, C. In vitro intrinsic permeability: a transporter-independent measure of Caco-2 cell permeability in drug design and development. **Molecular pharmaceutics**, v. 14, n. 5, p. 1601-1609, 2017.

FUJIWARA, M. et al. Mechanisms of resistance to delamanid, a drug for Mycobacterium tuberculosis. **Tuberculosis**, v. 108, p. 186-194, 2018.

GOMEZ-LECHON, M. J.; CASTELL, J. V.; DONATO, M. T. Hepatocytes—the choice to investigate drug metabolism and toxicity in man: in vitro variability as a reflection of in vivo. **Chem Biol Interact**, v. 168, n. 1, p. 30-50, May 20 2007. ISSN 0009-2797.

HARTMAN, D. A. Determination of the stability of drugs in plasma. **Current protocols in pharmacology**, v. 19, n. 1, p. 7.6. 1-7.6. 8, 2002.

HIJJAR, M. A., et al. Retrospecto do controle da tuberculose no Brasil. **Revista de Saúde Pública**, v. 41, p. 50-57, 2007

HUANG, Z., et al. Characterization of preclinical in vitro and in vivo pharmacokinetics properties for KBP-7018, a new tyrosine kinase inhibitor candidate for treatment of idiopathic pulmonary fibrosis. **Drug design, development and therapy**, v. 9, p. 4319, 2015.

HUBATSCH, I.; RAGNARSSON, E. G.; ARTURSSON, P. Determination of drug permeability and prediction of drug absorption in Caco-2 monolayers. **Nat Protoc**, v. 2, n. 9, p. 2111-9, 2007. ISSN 1750-2799.

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**, v. 41, n. 7, p. 1007-1010, 1998.

KERNS, E. H. High throughput physicochemical profiling for drug discovery. **Journal of pharmaceutical sciences**, v. 90, n. 11, p. 1838-1858, 2001.

KERNS, A. H.; DI, L. Chemical Stability. In: TAYLOR, J. B.; TRIGGLE, D. J. **Comprehensive medicinal chemistry II**. New York, NY: Elsevier, 2007. cap 5.20. p.489-507.

KESHAVJEE, S; FARMER, P. E. Tuberculosis, drug resistance, and the history of modern medicine. **New England Journal of Medicine**, v. 367, n. 10, p. 931-936, 2012.

KIRIMUHUZYA, C. Multi-Drug/Extensively Drug Resistant Tuberculosis (Mdr/Xdr-Tb): Renewed Global Battle Against Tuberculosis? In: CARDONA, Pere-Joan. (editor). **Understanding Tuberculosis: new approaches to fighting against drug resistance**, Rijeka, Croatia: INTECHopen science, 2012. ISBN: 978-953-307-948-6.



KUMAR, S., et al. Extrapolation of diclofenac clearance from in vitro microsomal metabolism data: role of acyl glucuronidation and sequential oxidative metabolism of the acyl glucuronide. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 303, n. 3, p. 969-978, 2002.

LAKSHMANAN, M.; XAVIER, A. S. Bedaquiline–The first ATP synthase inhibitor against multi drug resistant tuberculosis. **Journal of Young Pharmacists**, v. 5, n. 4, p. 112-115, 2013.

LE FERREC, E., et al. In vitro models of the intestinal barrier. **Atla**, v. 29, p. 649-668, 2001.

LEGEN, I.; SALOBIR, M.; KERČ, J. Comparison of different intestinal epithelia as models for absorption enhancement studies. **International journal of pharmaceutics**, v. 291, n. 1-2, p. 183-188, 2005.

LI, A. P. Screening for human ADME/Tox drug properties in drug discovery. **Drug discovery today**, v. 6, n. 7, p. 357-366, 2001.

LI, D. et al. Discovery of the disubstituted oxazole analogues as a novel class anti-tuberculosic agents against MDR- and XDR-MTB. **Bioorg Med Chem Lett**, v. 25, n. 22, p. 5178-581, Nov 15, 2015. ISSN 0960-894x.

LIMA, C. H. S.; BISPO, M. L. F; DE SOUZA, M. V. N. Pirazinamida: Um fármaco essencial no tratamento da tuberculose. **Revista Virtual de Química**, v. 3, n. 3, p. 159-180, 2011.

LU, C., et al. Comparison of intrinsic clearance in liver microsomes and hepatocytes from rats and humans-evaluation of free fraction and uptake in hepatocytes. **Drug metabolism and disposition**, v. 34, n. 9, p. 1600-1605, 2006.

NAIR, V. et al. A Novel Molecule with Notable Activity against Multi-Drug Resistant Tuberculosis. **Bioorg Med Chem Lett**, v. 25, n. 6, p. 1269-73, Mar 15, 2015. ISSN 0960-894X.

NAKAYAMA, G. R.; CATON, M. C.; NOVA, M. P.; PARANDOOSH, Z. Assessment of the Alamar Blue assay for cellular growth and viability in vitro. **Journal of immunological methods**, v. 204, n. 2, p. 205-208, 1997.

NOMEIR, A. A. et al. Liquid chromatographic analysis in mouse, dog and human plasma; stability, absorption, metabolism and pharmacokinetics of the anti-HIV agent 2-chloro-5-(2-methyl-5, 6-dihydro-1, 4-oxathiin-3-yl carboxamido) isopropylbenzoate (NSC 615985, UC84). **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis**, v. 17, n. 1, p. 27-38, 1998.

OBACH, R. S. Prediction of human clearance of twenty-nine drugs from hepatic microsomal intrinsic clearance data: an examination of in vitro half-life approach and nonspecific binding to microsomes. **Drug Metabolism and Disposition**, v. 27, n. 11, p. 1350-1359, 1999.

OBACH, R. S. Predicting clearance in humans from in vitro data. **Current topics in medicinal chemistry**, v. 11, n. 4, p. 334-339, 2011.

O'BRIEN, J.; WILSON, I.; ORTON, T.; POGNAN, F. Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. **The FEBS Journal**, v. 267, n. 17, p. 5421-5426, 2000.

ORGANIZATION FOR ECONOMIC COOPERATION AND DEVELOPMENT. OECD Test No. 107: Partition Coefficient (n-octanol/water): Shake Flask Method, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 1, OECD Publishing, Paris, 1995. DOI: <<https://doi.org/10.1787/9789264069626-en>>.

ORGANIZATION FOR ECONOMIC COOPERATION AND DEVELOPMENT. OECD Test No. 117: Partition Coefficient (n-octanol/water), HPLC Method, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 1, OECD Publishing, Paris, 2004. Disponível em: DOI: <<https://doi.org/10.1787/9789264069824-en>>.

PANG, K. S.; ROWLAND, M. Hepatic clearance of drugs. I. Theoretical considerations of a "well-stirred" model and a "parallel tube" model. Influence of hepatic blood flow, plasma and blood cell binding, and the hepatocellular enzymatic activity on hepatic drug clearance. **Journal of Pharmacokinetics and Biopharmaceutics**, v. 5, n. 6, p. 625-653, 1977.

PARK, S. et al. The use of bedaquiline to treat patients with multidrug-resistant tuberculosis and end-stage renal disease: A case report. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 76, p. 88-90, 2018.

RABAHI, M.F., et al. Tratamento da tuberculose. **J Bras Pneumol**. v.43, n.6, p. 472-486, 2017.

RUBENS, T. Abreugrafia: A Contribuição Brasileira Para a Medicina Mundial. 2016. Disponível em: <<http://radiologia.blog.br/diagnostico-por-imagem/abreugrafia-a-contribuicao-brasileira-para-a-medicina-mundial>>. Acesso em: 18 dez 2018.

RYU, Y. J. Diagnosis of pulmonary tuberculosis: recent advances and diagnostic algorithms. **Tuberculosis and Respiratory Diseases**, v. 78, n. 2, p. 64-71, 2015.

SALUNKE, S. B. et al. Design and synthesis of novel anti-tuberculosis agents from the celecoxib pharmacophore. **Bioorg Med Chem**, v. 23, n. 9, p. 1935-43, May 1,2015. ISSN 0968-0896.

SAMBUY, Y. et al. The Caco-2 cell line as a model of the intestinal barrier: influence of cell and culture-related factors on Caco-2 cell functional characteristics. **Cell Biology and Toxicology**, v. 21, n. 1, p. 1-26, 2005.

SEGRETTI, N. D. et al. Antimycobacterial activity of pyrazinoate prodrugs in replicating and non-replicating Mycobacterium tuberculosis. **Tuberculosis** (Edinb), v. 99, p. 11-6, Jul 2016. ISSN 1472-9792.

SESA. Secretaria de Estado do Espírito Santo (ES). Tuberculose. Disponível em: <<http://saude.es.gov.br/neve-tuberculose>>. Acesso em: 11 de setembro de 2018.

SHAH, Pranav et al. Role of Caco-2 cell monolayers in prediction of intestinal drug absorption. **Biotechnology Progress**, v. 22, n. 1, p. 186-198, 2006.

SILVA, D. R., et al. Novos fármacos e fármacos repropostos para o tratamento da tuberculose multirresistente e extensivamente resistente. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 44, n. 2, p. 153-160, 2018.

SINGH, S. S. Preclinical pharmacokinetics: an approach towards safer and efficacious drugs. **Curr Drug Metab**, v. 7, n. 2, p. 165-82, Feb 2006. ISSN 1389-2002.

SINZ, M. A. In vitro and in vivo models of drug metabolism. In: LYUBIMOV, A. V. (editor). **Encyclopedia of Drug Metabolism and Interactions**. John Wiley & Sons, 2012. Cap. 2, p. 1-31. ISBN: 978-0-470-45015-4. Disponível em: <DOI: <http://dx.doi.org/10.1002/9780470921920.edm002>>.

SJÖBERG, Åsa et al. Comprehensive study on regional human intestinal permeability and prediction of fraction absorbed of drugs using the Ussing chamber technique. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 48, n. 1-2, p. 166-180, 2013.

SMITH, D. A.; WATERBEEMD, H. V. D.; WALKER, D. K. **Pharmacokinetics and Metabolism in Drug Design**. Weinheim; New York: Wiley-VCH, 2001. 149 p.

SOUZA, M. V. N; VASCONCELOS, T. R. A. Drugs against tuberculosis: past, present and future. *Química Nova*, v. 28, n. 4, p. 678-682, 2005.

SOUZA, V. M.D., et al. High glucose concentration in isotonic media alters caco-2 cell permeability. *Aaps Pharmsci*, v. 5, n. 3, p. 17, 2003.

TAKÁCS-NOVÁK, K. Physicochemical profiling in drug research and development. In: ZORAN, Mandić, Z. (editor). **Physico-Chemical Methods in Drug Discovery and Development, IAPC Publishing**. Zagreb, Croatia: IAPC, 2012. Cap. 1, p. 1-59. ISBN:978-953-56942-0-5.

TANIGUCHI, C; GUENGERICH, F. P. Metabolismo dos fármacos. In: GOLAN, D. E.; TASHJIAN, A. H. (editor). **Princípios de farmacologia: a base fisiopatológica da farmacoterapia**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2009. Cap. 4, p. 132-155.

TIBERI, S. et al. New drugs and perspectives for new anti-tuberculosis regimens. *Pulmonology Journal*, v. 24, n. 2, p. 86-98, 2018. Disponível em: <<https://dx.doi.org/10.1016/j.rppnen.2017.10.009>>.

TORTORA, G.J.; FUNKE, B.R.; CASE, CL. **Microbiologia**. 10<sup>a</sup> ed. Porto Alegre: Artmed, 2010.

TRABULSI, L.R.; ALTERTHUM, F. **Microbiologia**. 5<sup>a</sup> ed. São Paulo: Atheneu, 2008.

TSAIOUN, K; KATES, S. A. (editor.). **ADMET for medicinal chemists: a practical guide**. Hoboken, New Jersey: John Wiley & Sons, 2011. ISBN: 978-0-470-91509-7.

UNO, S. et al. Prediction of metabolic clearance of diclofenac in adjuvant-induced arthritis rats using a substrate depletion assay. *Xenobiotica*, v. 38, n. 5, p. 482-495, 2008.

VALKÓ, K. Application of high-performance liquid chromatography based measurements of lipophilicity to model biological distribution. **Journal of chromatography A**, v. 1037, n. 1-2, p. 299-310, 2004.

VENKATAKRISHNAN, K. et al. Drug metabolism and drug interactions: application and clinical value of in vitro models. **Curr Drug Metab**, v. 4, n. 5, p. 423-59, Oct 2003. ISSN 1389-2002

VENKATESH, S.; LIPPER, R. A. Role of the development scientist in compound lead selection and optimization. **Journal of pharmaceutical sciences**, v. 89, n. 2, p. 145-154, 2000

VRAKA, C. et al. LogP, a yesterday's value? **Nuclear medicine and biology**, v. 50, p. 1-10, 2017.

WANG, P. et al. Metabolism of dictamnine in liver microsomes from mouse, rat, dog, monkey, and human. **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis**, v. 119, p. 166-174, 2016

WATERBEEMD, H. V. D.; GIFFORD, E. ADMET in silico modelling: towards prediction paradise? **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 2, n. 3, p. 192-204, 2003-03-01 2003. ISSN 1474-1776.

WATERBEEMD, H. V. D.; FOLKERS, G.; GUY, R. (editor.). **Pharmacokinetic optimization in drug research: biological, physicochemical, and computational strategies**. John Wiley & Sons, 2007. ISBN: 978-3-906-39035-2.

WESTERHOUT, J; WORTELBOER, H; VERHOECKX, K. Ussing chamber. In: VERHOECKX, K. et al. (editor). **The Impact of Food Bioactives on Health**. Springer, Cham, 2015. Cap. 24, p. 263-273. ISBN: 978-3-319-16104-4. <[https://link.springer.com/content/pdf/10.1007%2F978-3-319-16104-4\\_24.pdf](https://link.springer.com/content/pdf/10.1007%2F978-3-319-16104-4_24.pdf)>.

WHITE, R. E. Review of Drug Metabolism in Drug Discovery and Development. In: LYUBIMOV, A. V. (editor). **Encyclopedia of Drug Metabolism and Interactions**. John Wiley & Sons, 2012. Cap. 1, p. 1-40. ISBN: 978-0-470-45015-4. <<https://doi.org/10.1002/9780470921920.edm001>>.

WORLD HEALTH ORGANIZATION-WHO. Global Tuberculosis Report 2015. Geneva: World Health Organization; 2015. ISBN 978 92 4 156505 9. Disponível em: <[https://www.who.int/tb/publications/global\\_report/gtbr15\\_main\\_text.pdf](https://www.who.int/tb/publications/global_report/gtbr15_main_text.pdf)>.

WORLD HEALTH ORGANIZATION-WHO. Global Tuberculosis Report 2016. Geneva: World Health Organization, 2016. ISBN 978 92 4 156539 4. Disponível em: <<http://apps.who.int/medicinedocs/documents/s23098en/s23098en.pdf>>.

WORLD HEALTH ORGANIZATION-WHO. Global Tuberculosis Report 2017. Geneva: WHO, 2017. ISBN 978-92-4-156551-6. Disponível em: <<http://apps.who.int/medicinedocs/documents/s23360en/s23360en.pdf>>.

WORLD HEALTH ORGANIZATION-WHO. Global Tuberculosis Report 2018. Geneva: World Health Organization, 2018. ISBN: 978-924156564-6. Disponível em: <[https://www.who.int/tb/publications/global\\_report/en/](https://www.who.int/tb/publications/global_report/en/)>.

YANG, Y.F., et al. Simultaneous assessment of absorption characteristics of coumarins from *Angelicae Pubescentis Radix*: in vitro transport across Caco-2 cell and in vivo pharmacokinetics in rats after oral administration. **Journal of Chromatography B**, v. 1060, p. 308-315, 2017.

YEE, S. In vitro permeability across Caco-2 cells (colonic) can predict in vivo (small intestinal) absorption in man—fact or myth. **Pharmaceutical research**, v. 14, n. 6, p. 763-766, 1997.

YOSHIOKA, S.; STELLA, V. J. Chemical stability of drug substances. **Stability of Drugs and Dosage Forms**. New York: Kluwer Academic Pub., 2002. p. 3-137. Disponível em: <<https://www.springer.com/la/book/9780306464041>>.

ZHANG, D. et al. Preclinical experimental models of drug metabolism and disposition in drug discovery and development. **Acta Pharmaceutica Sinica B**, v. 2, n. 6, p. 549–561, 2012. Disponível em: <<https://dx.doi.org/10.1016/j.apsb.2012.10.004>>.