



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”**

*Faculdade de Ciências Farmacêuticas- Campus de Araraquara
Curso de Graduação em Farmácia-Bioquímica*

**Determinação da estabilidade química e *ex-vivo* de compostos da série LINS01
e derivados do levetiracetam com potencial aplicação nos Transtornos
Centrais**

Regina Helena Munhoz Domingues

Araraquara, SP

2021

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“Júlio de Mesquita Filho”

Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Campus de Araraquara

Regina Helena Munhoz Domingues

Determinação da estabilidade química e *ex-vivo* de compostos da série LINS01 e derivados do levetiracetam com potencial aplicação nos Transtornos Centrais

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Graduação em Farmácia-Bioquímica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara, da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, para obtenção do grau de Farmacêutica-Bioquímica.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Rosângela Gonçalves Peccinini

Co-orientador: Prof. Dr. Jonata Augusto de Oliveira

Araraquara, SP

2021

D671d Domingues, Regina Helena Munhoz.
Determinação da estabilidade química e *ex-vivo* de compostos da série LINS01 e derivados do levetiracetam com potencial aplicação nos Transtornos Centrais / Regina Helena Munhoz Domingues. – Araraquara: [S.n.], 2021.
82 f. : il.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação – Farmácia Bioquímica) – Universidade Estadual Paulista. “Júlio de Mesquita Filho”. Faculdade de Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Rosângela Gonçalves Peccinini.
Coorientador: Jonata Augusto de Oliveira.

1. Estabilidade. 2. HPLC-MS. 3. Transtornos centrais. 4. Nootrópicos. I. Peccinini, Rosângela Gonçalves, orient. II. Oliveira, Jonata Augusto de, coorient. III. Título.

Dedico esse trabalho a meus pais, Rejane e Roberto, cujo empenho e apoio diário permitiram a conclusão do presente estudo.

Agradecimentos

Primeiramente agradeço a Deus, por ser a luz que me guia nessa jornada, e por ser a força e determinação para vencer os muitos desafios. Agradeço a todas as bênçãos derramadas em minha vida e sua constante presença em todos os momentos.

A meus pais, Rejane e Roberto, meus maiores exemplos de vida, que com o esforço diário me proporcionaram a melhor educação. Muito obrigada por todo o amor incondicional, paciência e apoio nessa etapa tão importante da minha vida. Se hoje estou onde estou, devo tudo a vocês. Eu amo vocês demais!

Agradeço também a toda minha família, em especial a meus avós, Elza e Orlando, por sempre me apoiarem e orarem por mim.

A minha orientadora, Prof.^a Dr.^a Rosângela Gonçalves Peccinini que tornou esse projeto possível. Obrigada pela oportunidade, pela confiança e paciência, e por todo suporte e orientação no decorrer de toda a minha iniciação científica.

Agradeço aos meus amigos do Laboratório de Toxicologia. A Bruna e a Taísa que me receberam no laboratório e me iniciaram no treinamento. A Evelin, pela oportunidade de acompanhá-la em alguns experimentos que tanto me ajudaram e também pelo suporte ao longo de minha iniciação científica. E, principalmente, ao Jonata, meu co-orientador e amigo, por toda sua paciência, amizade, e pelos inúmeros ensinamentos e suporte durante esse estudo.

Aos funcionários do Laboratório de Bioequivalência, Kelly e Marcos, pelo suporte durante a pesquisa.

A Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP (FCFAR).

E a todos os professores e amigos que direta ou indiretamente fizeram parte desse processo e contribuíram de alguma forma para a conclusão deste trabalho.

“Alis Grave Nil”

(Nada é pesado quando se tem asas)

- Autor desconhecido

RESUMO

O processo de envelhecimento populacional está associado ao desenvolvimento de transtornos do sistema nervoso central que acometem processos cognitivos e também doenças neurodegenerativas como Alzheimer e Parkinson, cujos tratamentos consistem na terapia com fármacos nootrópicos. À vista disso, os pesquisadores da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP) e do grupo de pesquisa *Milagre Research Group* (IQ/UNESP) sintetizaram compostos com potencial nootrópico, com diferentes abordagens farmacológicas, denominados compostos da série LINS01 (diidrobenzofuranil-piperazinas e diidroindol-piperazinas) e derivados do levetiracetam, respectivamente. Contudo, a avaliação da eficácia e segurança de um candidato a fármaco engloba uma série de estudos de investigação farmacológica para fundamentar a seleção dos compostos mais promissores para a continuidade do desenvolvimento do produto farmacêutico, como por exemplo os estudos de estabilidade. O presente trabalho teve como objetivo realizar estudos de estabilidade química e em plasma dos compostos LINS01 e derivados do levetiracetam. A determinação da estabilidade química e *ex vivo* fornece informações que permitem verificar o período de tempo na qual um composto se mantém estável e também em quais condições é provável que ocorra a geração de metabólitos tóxicos devido ao comprometimento da estrutura, que por sua vez podem influenciar parâmetros farmacocinéticos, fornecendo assim subsídios para a seleção da via de administração mais adequada à finalidade e também para a tomada de decisões ao longo do processo de desenvolvimento. Os compostos foram então submetidos a três diferentes pHs (1,2; 7,4 e 8,8) e plasma de rato por 720 minutos, sob aquecimento a 37°C e agitação constante, e avaliou-se a estabilidade dos compostos através de métodos analítico e bioanalítico, previamente desenvolvidos e validados no presente estudo. Os métodos analítico e bioanalítico forneceram reprodutibilidade e efetividade, de forma a quantificar os compostos com precisão e exatidão e os resultados dos estudos de estabilidade proporcionaram resultados satisfatórios para os compostos, classificando-os como aptos a prosseguir para os estudos pré-clínico e clínico.

Palavras chaves: estabilidade; HPLC-MS; transtornos centrais; nootrópicos.

ABSTRACT

The ageing population process is associated with the development of central nervous system disorders that affect cognitive processes and also neurodegenerative diseases such as Alzheimer's and Parkinson's, whose treatments consist of therapy with nootropic drugs. For this reason, researchers from the Federal University of São Paulo (UNIFESP) and from the *Miracle Research Group* (IQ / UNESP) synthesized compounds with nootropic potential, with different pharmacological approaches, called LINS01 series compounds (dihydrobenzofuranyl-piperazines and dihydroindole-piperazines) and levetiracetam derivatives, respectively. However, the evaluation of the efficacy and safety of a drug candidate includes a series of pharmacological investigation studies to support the selection of the most promising compounds to continue the development of the pharmaceutical product, for example stability studies. This present study aimed realize chemical and plasma (*ex vivo*) stability studies of LINS01 compounds and levetiracetam derivatives. The determination of chemical and *ex vivo* stability provides important informations that allows to verify the period of time in which a compound remains stable and also under which conditions is likely to occur the generation of toxic metabolites, due to the compromised structure, which can influence pharmacokinetic parameters, thus providing support for the selection of the most adequate administration routes for the purpose and also for decision-making throughout the development process. So, the compounds were subjected to three different pHs (1,2; 7,4 and 8,8) and rat plasma for 720 minutes, under heating at 37°C and constant agitation, and the stability of the compounds was evaluated through analytical and bioanalytical methods, previously developed and validated, in the present study. The analytical and bioanalytical methods provided reproducibility and effectiveness, in order to quantify the compounds with precision and accuracy, and the results of the stability studies provided satisfactory results for the compounds, classifying them as suitable for proceeding to pre-clinical and clinical studies.

Keywords: stability; HPLC-MS; central disorders; nootropics.

LISTA DE ABREVIATURAS

ACN – Acetonitrila

ADME- Absorção, distribuição, metabolismo e excreção

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

CQA – Controle de Qualidade Alto

CQB – Controle de Qualidade Baixo

CQM – Controle de Qualidade Médio

GABA- Ácido amino-butírico

HPLC-MS– Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplado a espectrofotômetro de massas

IBGE- Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

INCA- Instituto Nacional do Câncer

LIQ- Limite Inferior de Quantificação

MMQ- Método dos quadrados mínimos

MMQQ- Método dos mínimos quadrados ordinários

MMQP- Método dos mínimos quadrados ponderados

PI- Padrão Interno

PVDF- Filtro fluoreto de polivinilideno hidrofóbico

RJ- Teste de Ryan- Joyner

SNC- Sistema Nervoso Central

TCA - Ácido Tricloroacético

TGI- Trato Gastrointestinal

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.a. Compostos 5B, PPA, e LEV.....	5
Figura 1.b. Compostos LINS1003 e LINS1015.....	7
Figura 2. Cromatograma dos compostos LINS1003, LINS1005, 5B, PPA e LEV na concentração de 10 µg/mL.....	20
Figura 3. Curvas analíticas dos compostos: LINS1003, LINS1015, 5B, PPA e LEV.....	22
Figura 4. Resultado da análise gráfica dos resíduos.....	29
Figura 5. Cromatograma dos compostos em matriz biológica plasma na concentração de 1 µg/mL e P.I (diazepam 2,5 µg/mL).....	34
Figura 6. Curvas bioanalíticas em plasma dos compostos LINS1003, LINS1015, 5B, PPA e LEV.....	35
Figura 7. Estabilidade dos compostos LINS1003, LINS1015, 5B, PPA e LEV em tampão Clark-Lubs (pH 1,2).....	46
Figura 8. Estabilidade dos compostos LINS1003, LINS1015, 5B, PPA e LEV em tampão Hank's (pH 7,4).....	49
Figura 9. Estabilidade dos compostos LINS1003, LINS1015, 5B, PPA e LEV em tampão Tris-HCl (pH 8,8).....	52
Figura 10. Estabilidade dos compostos LINS1003, LINS1015, 5B, PPA e LEV em plasma (n=3 ± DP).....	55

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Condições cromatográficas para a determinação dos compostos por modo gradiente utilizando análises HPLC-massas.....	11
Tabela 2. Resultado das equações das retas dos compostos: LINS1003, LINS1015, 5B, PPA e LEV.....	23
Tabela 3. Resultado do teste de Cochran para os compostos: LINS1003, LINS1015, 5B, PPA e LEV.....	25
Tabela 4. Equações da reta geradas pelo programa GraphPad Prism® após teste de Cochran.....	25
Tabela 5. Resultado do teste F ANOVA para avaliação do coeficiente angular.....	27
Tabela 6. Resultado do teste t-Student para avaliação do coeficiente linear.....	28
Tabela 7. Resultado do teste de Ryan Joyner.....	30
Tabela 8. Resultado do teste de Grubbs.....	30
Tabela 9. Resultados da precisão e exatidão dos controles de qualidade LIQ, CQB, CQM e CQA para o método analítico dos compostos LINS1003, LINS1015, 5B, PPA E LEV (intra-dia: n=5; inter-dia: n=15).....	32
Tabela 10. Parâmetros estatísticos avaliados para a linearidade da curva de calibração dos compostos: LINS1003, LINS1015, 5B, PPA e LEV em plasma.....	36
Tabela 11. Dados de precisão e exatidão dos controles de qualidade LIQ, CQB, CQM e CQA para o método bioanalítico em plasma.....	37
Tabela 12. Estabilidade dos compostos LINS1003, LINS1015, 5B, PPA e LEV em tampão Clark-Lubs (pH 1,2).....	45
Tabela 13. Estabilidade dos compostos LINS1003, LINS1015, 5B, PPA e LEV em tampão Hank's (pH 7,4).....	48

Tabela 14. Estabilidade dos compostos LINS1003, LINS1015, 5B, PPA e LEV em tampão Tris-HCl (pH 8,8).....51

Tabela 15. Estabilidade dos compostos LINS1003, LINS1015, 5B, PPA e LEV em plasma.....56

ÍNDICE

1. Introdução	1
2. Objetivos	7
2.1. Objetivos gerais.....	7
2.2. Objetivos específicos.....	7
3. Equipamentos e materiais	8
3.1. Compostos.....	8
3.2. Soluções padrões, reagentes e solvente.....	8
3.3. Equipamentos.....	8
3.4. Materiais.....	9
3.5. Software.....	9
4. Métodos	9
4.1. Desenvolvimento dos métodos analítico e bioanalítico para a determinação dos compostos.....	9
4.1.1. Sistema cromatográfico.....	10
4.1.2. Processamento das amostras.....	13
4.2. Validação do método analítico e bioanalítico.....	14
4.2.1. Método analítico.....	14
4.2.2. Método bioanalítico.....	14
4.2.3. Linearidade.....	14
4.2.4. Seletividade.....	15
4.2.5. Sensibilidade analítica.....	16
4.2.6. Precisão e Exatidão.....	16
4.3. Estudo de Estabilidade Química.....	17
4.4. Estudo de Estabilidade em Plasma.....	18
5. Resultados e discussão	19
5.1. Sistema cromatográfico.....	19
5.2. Validação do método analítico.....	20
5.2.1. Seletividade.....	21
5.2.2. Linearidade.....	21
5.2.3. Precisão e Exatidão.....	31

5.3.	Validação do método bioanalítico.....	33
5.3.1.	Seletividade.....	33
5.3.2.	Linearidade.....	34
5.3.3.	Precisão e exatidão.....	37
5.4.	Estabilidade Química.....	38
5.4.1.	Estabilidade em pH 1,2.....	44
5.4.2.	Estabilidade em pH 7,4.....	47
5.4.3.	Estabilidade em pH 8,8.....	50
5.5.	Estabilidade em Plasma.....	54
6.	Conclusão	57
7.	Referências Bibliográficas	58

1. Introdução

O interesse na descoberta de formas de tratamentos para erradicar doenças e também aumentar a qualidade de vida de seres humanos data dos tempos mais remotos da sociedade (CALIXTO; SIQUEIRA, 2018). Ao longo da história, a evolução expressiva da química e biologia, permitiu a ampliação do conhecimento a respeito de vias bioquímicas, alvos moleculares e também mecanismos associados ao aparecimento de patologias, e tornaram possível o desenvolvimento de diversos medicamentos atualmente disponíveis na clínica (NASCIUTTI, 2012).

No entanto, introduzir um novo medicamento que seja inovador no mercado é um processo complexo, longo e oneroso (NASCIUTTI, 2012). A inovação tecnológica, ou seja, a introdução de um novo produto farmacêutico no mercado, representa um peso na lucratividade de instituições como indústrias farmacêuticas, sendo um fator de sobrevivência para empresas no contexto mundial (VIEIRA; OHAYON, 2006).

Diversas estratégias podem ser utilizadas visando a promoção da inovação farmacêutica, como por exemplo a inovação radical, na qual é desenvolvido um novo medicamento; ou incremental, em que são realizadas modificações na estrutura química de compostos já conhecidos visando melhorias de propriedades farmacocinéticas e farmacodinâmicas (VIEIRA; OHAYON, 2006; BARREIRA; FRAGA, 2015).

A inovação mais relevante é aquela que procura atender as necessidades do mercado, como por exemplo a busca por um aumento de eficácia, segurança de uso e redução de efeitos adversos (VIEIRA; OHAYON, 2006). E através dela, os novos medicamentos gerados podem trazer inúmeros benefícios para usuários de medicamentos, como melhoria da qualidade de vida, menor tempo de internação hospitalar e, por consequência, aumento da expectativa de vida (OLIVEIRA, 2021).

Contudo, é um processo que requer aporte financeiro e tempo, além de ser um processo arriscado do ponto de vista de investimentos devido a possibilidade dos resultados não serem compatíveis com o grau de investimento (VIEIRA; OHAYON,

2006. Segundo o Instituto Nacional de Câncer (INCA), o processo de desenvolvimento de um novo fármaco dura em média dez anos, e a cada 10.000 moléculas avaliadas, apenas uma chegará ao mercado, o que corresponde a uma probabilidade de 12% de acerto (INCA, 2021).

Apesar do advento da tecnologia computacional, através de modelos matemáticos e softwares, que auxiliam nos primeiros passos do processo de delineamento de um novo fármaco, indicando as alterações estruturais com maior probabilidade de sucesso em relação a um determinado objetivo, muitas vezes nas fases posteriores do processo de desenvolvimento, os compostos demonstram falhas nas propriedades farmacocinéticas (NETO, 2019).

Os processos farmacocinéticos são complexos e multifatoriais, envolvem diferentes tipos de interações - como interações iônicas, polares, hidrofóbicas- com estruturas do organismo tais como membranas, proteínas e ambientes intracelulares ou extracelulares que influem diretamente em parâmetros farmacocinéticos (SCHOENWALD, 2006). Assim, se torna necessário o conhecimento das propriedades das moléculas candidatas a fármaco, como por exemplo através de ensaios *in silico* tais como a estabilidade química e em plasma a fim de determinar a susceptibilidade estrutural frente a determinadas condições experimentais, visando direcionar a seleção dos modelos animais utilizados nas fases pré-clínica e clínica nas fases posteriores de desenvolvimento, escolha da via de administração mais adequada, e também auxiliar na tomada de decisões ao longo do delineamento de novos fármacos e sustentar e nortear a interpretação dos resultados obtidos nos estudos *in vivo* (VENKATAKRISHNAN *et al.*, 2003; SCHOENWALD, 2006; ZHANG *et al.*, 2012; AULTON; TAYLOR, 2016).

O avanço tecnológico mundial promovido pelo advento de softwares computacionais e também os estudos *in silico*, que otimizam a obtenção de muitas informações físico-químicas a respeito de novas moléculas, revolucionaram o delineamento de produtos farmacêuticos, e, por sua vez, está diretamente associado ao aumento de expectativa de vida populacional mundial, devido novas terapias introduzidas na medicina clínica (RITCHIE; ROSER, 2018). Segundo o relatório internacional *World Population Ageing*, estima-se que em 2050, o número global de

idosos será maior que 1,5 bilhões (NAÇÕES UNIDAS, 2020). O que também é observado nacionalmente. No Brasil, em 2018, segundo o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), a média de vida da população era de 76 anos, sendo 79 anos para mulheres e 72 anos para homens.

Atrelado ao aumento da expectativa de vida populacional, tem-se o envelhecimento populacional (KEMPURAJ *et al.*, 2017). O processo de envelhecimento está vinculado a alterações neuronais relacionadas ao aparecimento de uma série de transtornos do sistema nervoso central (SNC) que acometem processos cognitivos, tais como memória, atenção, raciocínio, linguagem e compreensão (SERRAO, 2015). E também está associado ao aumento da incidência e prevalência de doenças crônicas, muitas delas relacionadas ao estresse ocasionado pelo estilo de vida, como maus hábitos de sono, alta carga laboral, ambiente social e virtual, trânsito, violência, entre outros (KEMPURAJ *et al.*, 2017; VILLELA, 2019). O estresse gerado leva a quadros de neuroinflamação (KEMPURAJ *et al.*, 2017).

A neuroinflamação é promovida pela ativação de mastócitos que induzem a ativação de células gliais, ocasionando a ruptura da barreira hematoencefálica, e desse modo, permitindo a entrada de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias, gerando um desequilíbrio que, por sua vez, compromete a sinalização neuronal e evolui para neurodegeneração (KEMPURAJ *et al.*, 2017). Alterações na substância branca dão origem a algumas situações patológicas, como a demência referente à doença de Alzheimer (que acomete 35,6 milhões de pessoas no mundo, sendo 1,2 milhões de pessoas no Brasil anualmente) e Parkinson (que atualmente atinge mais de 10 milhões de pessoas no mundo, sendo a segunda doença neurodegenerativa mais comum, atrás somente da doença de Alzheimer); e também outras situações como por exemplo esquizofrenia, depressão, epilepsia, transtornos de ansiedade, entre outras (FROESTL; MUHS; PFEIFER, 2012; KEMPURAJ *et al.*, 2017).

Porém, muitas das doenças relacionadas ao sistema nervoso central ainda não possuem cura definitiva disponíveis na clínica, apenas terapias paliativas, que retardam a evolução do quadro clínico. Isso se reflete em uma tendência observada em grandes indústrias farmacêuticas nos últimos anos, na qual grande porcentagem

de investimento é destinada para o estudo e desenvolvimento de novos candidatos a fármaco visando o tratamento de doenças associadas ao SNC, com destaque para as neurodegenerativas, conforme aponta o Guia de 2019 da Interfarma.

Dentre as teorias iniciais a respeito de terapias para desordens do SNC, envolvendo a modulação da atividade neuronal, tem-se a atuação nos receptores histamínicos, muscarínicos e nicotínicos (CORRÊA *et al.*, 2017). A histamina é um importante mediador para uma série de processos fisiopatológicos, como por exemplo, processos alérgicos e inflamatórios; e também, possui atividade em neurotransmissores no SNC (CORRÊA *et al.*, 2017). Sua atuação se dá a partir sua interação com seus respectivos receptores histaminérgicos acoplados a proteína G, que são de quatro subtipos: H₁R, H₂R, H₃R e H₄R, de forma a ativá-los (GOLAN *et al.*, 2014). O receptor H₃R é expresso principalmente no SNC e nas terminações nervosas do trato gastrointestinal e do coração, e controla a liberação de vários neurotransmissores como noradrenalina, acetilcolina, serotonina, ácido aminobutírico (GABA), glutamato e a histamina, funcionando como receptor pré-sináptico (auto e heteroreceptor) (GOLAN *et al.*, 2014;. CORREA *et al.*, 2017). E por ser um receptor acoplado a proteína G_{i/o}, sua ativação a redução da concentração intracelular de AMPc, a inibição de canais de Ca²⁺ por voltagem dependente, ativação de fosfolipase A2 e consequente liberação ácido araquidônio; inibe a troca de íons Na⁺/H⁺, além de ativar a via MAP quinase e proteína B quinase (Akt), sendo, portanto, um componente da regulação de diversos processos celulares tais como a expressão gênica, metabolismo de glicose, sobrevivência celular e apoptose, podendo estar diretamente associado a distúrbios neurológicos, como cognitivo (por exemplo as doenças de Alzheimer e Parkinson), convulsivos, sono vigília, e também a obesidade (RAMOS-JIMÉNEZ *et al.*, 2009). Desse modo, antagonistas de H₃R podem ser utilizados para tratamento de distúrbios neurológicos, demências, psicoses, entre outros (CORREA *et al.*, 2017).

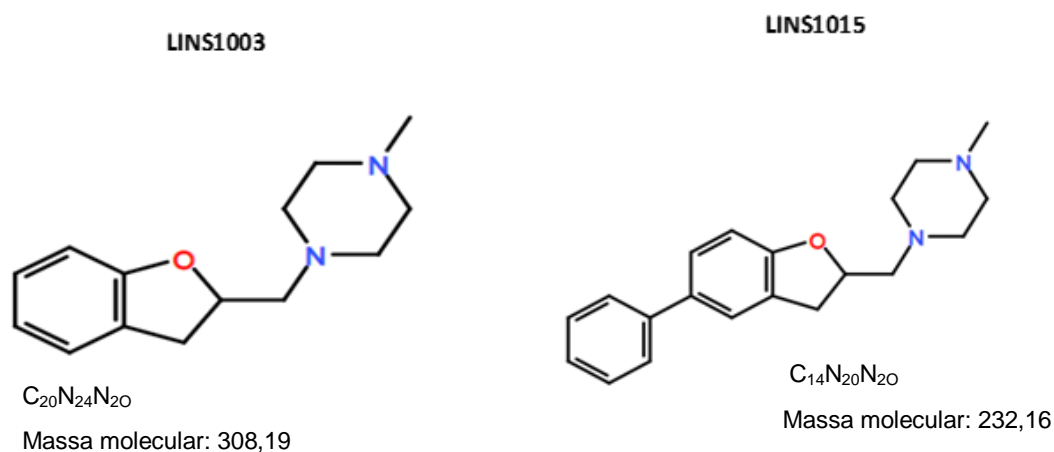
Já a resposta nos receptores muscarínicos (M1, M2, M3, M4 e M5) e nicotínicos cerebrais (α 2-10 e β 2-4) é modulada pelo neurotransmissor acetilcolina (VENTURA *et al.*, 2010). E conhecidamente, fármacos com atividade estimulatória colinérgica podem potencializar o desempenho em alterações neuropsiquiátricas, além de

doenças como Alzheimer, esquizofrenia e outras doenças que acometem o SNC (VENTURA *et al.*, 2010).

À vista disso, pesquisadores da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP) desenvolveram os compostos LINS1003 e LINS1015 (diidrobenzofuranil-piperazinas e diidroindol-piperazinas, respectivamente), que possuem a capacidade de se ligar aos receptores histaminérgicos com afinidade de moderada a boa (pK_I 6 a 7,2) por H_3R com seletividade e atividade antagonista considerável (CORRÉA *et al.*, 2017). Não foram observadas afinidades pelos receptores H_1R e H_2R (CORRÉA *et al.*, 2018); alguns compostos da série LINS001 apresentam moderada afinidade por H_4R , tendo demonstrado inclusive atividade anti-inflamatória em modelos murinos de asma (CORRÉA *et al.*, 2017).

As estruturas da série LINS001 estão apresentadas na figura 1.a., construídas com auxílio da ferramenta Sigmaldrich do site da Merck®.

Figura 1.a. Compostos LINS1003 e LINS1015.



1-[(2,3-dihidro-1-benflurano-2-yl)metil]-4- metilpiperazina

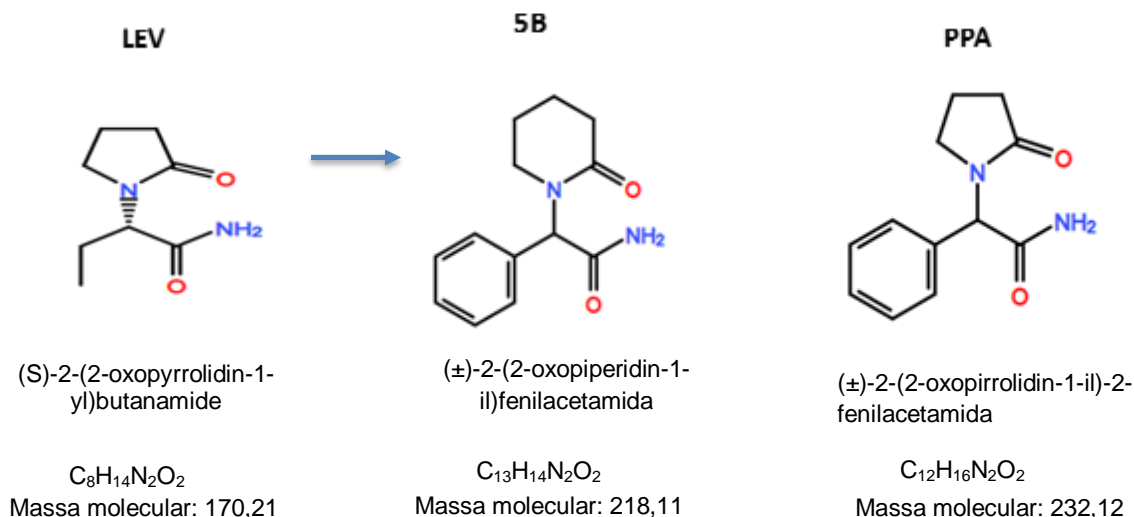
O tratamento de déficits cognitivos também pode-se dar através da aplicação de fármacos nootrópicos, que são frequentemente utilizados em terapias farmacológicas de transtornos centrais, e como adjuvantes, como é o caso de epilepsias (PFEIFER, 2012).

O termo nootrópico, também conhecido como estimulante cerebral ou psicoestimulante, se refere a substâncias químicas com atividade no SNC, que são capazes de alterar ou aumentar o desempenho cognitivo por meio de estimulação ou inibição de suprimentos neuroquímicos (hormônios, enzimas e neurotransmissores) (TOLEDO, 2016; CORDEIRO, 2017; LENZI, 2017).

Um exemplo de fármaco nootrópico é o levetiracetam, derivado do piracetam, utilizado no tratamento de crises mioclônicas, crises tônico-clônicas generalizadas, como terapia adjuntiva de crises focais que evoluem ou não para crises convulsivas e em monoterapia em pacientes a partir de 16 anos (PFEIFER, 2012). Em relação a outros fármacos antiepilépticos, como por exemplo o topiramato, demonstra a vantagem de causar menos prejuízos cognitivos, tendo demonstrado em alguns casos a melhora de desempenho motor, memória e capacidade de concentração (EDDY *et al.*, 2001).

Devido à grande demanda de fármacos para o tratamento de doenças que acometem SNC, e também considerando a extensa aplicação terapêutica do levetiracetam, os pesquisadores do *Milagre Research Group* do Instituto de Química da UNESP/ Araraquara sintetizaram compostos derivados do levetiracetam, nomeando-os 5B, PPA e LEV, com potencial atividade nootrópica e anticonvulsivante, cuja suas características de estabilidade serão avaliadas no presente estudo. As estruturas estão apresentadas na figura 1.b., construídas com auxílio da ferramenta Sigmaldrich do site da Merck®.

Figura 1.b. Compostos 5B, PPA, e LEV.



Diante do exposto, propôs-se a avaliação da estabilidade química, em diferentes pHs e em plasma, dos compostos da série LINS01 e derivados do levetiracetam, de forma a fornecer relevantes informações que fundamentarão o planejamento e auxiliarão o entendimento de resultados dos futuros ensaios *in vivo*.

2. Objetivos

2.1 Objetivos gerais

Avaliação da estabilidade química e *ex vivo* (em plasma) de compostos planejados por pesquisadores parceiros com potencial aplicação na terapêutica de transtornos centrais.

2.2. Objetivos específicos

- Desenvolvimento e validação dos métodos analítico e bioanalítico dos compostos derivados do LEV (PPA e 5B) e também os compostos da série LINS01: LINS1003 e LINS1015;
- Avaliar a estabilidade química dos compostos: LINS1003, LINS1015, LEV, PPA e 5B nos pHs: 1,2 (tampão Clark Lub), 7,4 (tampão Hanks ou PBS) e 8,8 (tampão Tris- HCl);

- Avaliar a estabilidade dos compostos LINS1003, LINS1015, LEV, PPA e 5B em plasma (*ex vivo*) de rato.

3. Equipamentos e materiais

3.1. Compostos

Os compostos da série LINS01 (diidrobenzofuranil-piperazinas e diidroindol-piperazinas) foram desenvolvidos e cedidos pelos pesquisadores da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP): LINS1003 e LINS1015. Os derivados do levetiracetam, os compostos PPA, 5B e LEV, foram sintetizados pelo Milagre Research Group (IQ-UNESP).

3.2. Soluções padrões, reagentes e solventes

Todos os compostos foram solubilizados em metanol para o preparo das soluções estoque na concentração de 100 µg/mL. E as soluções estoques do padrão interno (PI), diazepam, foram disponibilizados pela Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP) e foram preparadas com acetonitrila como solvente para a concentração final de 100 µg/mL. Outros reagentes também utilizados foram:

- Água deionizada em sistema Mili Q com condutividade 18,2 µS. cm⁻¹;
- Acetonitrila grau HPLC, J. T. Baker- México;
- Ácido fórmico 98%, Schariab, S. L.- Espanha;
- Metanol grau HPLC, J. T. Baker- México;
- Éter- metil terc- butílico (Merck KGaA) Alemanha;
- Solução tampão PBS pH 7,4 (Phosphate-buffered saline) 0,1 M, Sigma Aldrich.

3.3. Equipamentos

- Agitador magnético com aquecimento, Ethiktechnology®;
- HPCL, Waters e2695, Alliance;
- Detector de massas: Acquity QDa, Waters;
- Banho ultrassônico, Ultrasonic Cleaner 2840DA, odontobrás;

- Vortex AP56, Phoenix;
- Centrífuga Sorval Biofuge, Thermo scientific;
- Mini-centrífuga, Gilson;
- Balança digital analítica e semi-analítica, Shimadzu ®;
- Incubadora 430 Ethnik®;
- Centrífuga 5810 R, Eppendorf ®;
- Ultracentrífuga Beckman Coulter® Optima L-100 XP;
- Sistema MiliQ®;

3.4. Materiais

- Coluna cromatográfica SunFire C18 de 4,6 x 250 mm e 5 µm de tamanho de partícula, protegida por coluna de guarda equivalente;
- Filtros descartáveis para seringas, porosidade 0, 22 µm, Analítica®;
- Seringas descartáveis, B D®;
- Pipetas automáticas;
- Ponteiras;
- Microtubos;

3.5. Softwares

- Empower® 3, Waters;
- Excel 2016, Microsoft Office;
- Minitab Statistical, 19® Statistical Software;
- Prism 5, GraphPad;
- Graphpad InStat® 3.0;
- PreADMET 2.0;
- ChemDraw Ultra® 12.0.

4. Métodos

4.1. Desenvolvimento dos métodos analítico e bioanalítico para a determinação dos compostos

O desenvolvimento do método analítico e bioanalítico envolve a otimização de etapas, desde a preparação da amostra até o desenvolvimento do sistema cromatográfico para a identificação e quantificação de compostos (VELLOSO *et al.*, 2009). Para isso, parâmetros como a fase móvel utilizada, a vazão, fluxo, a coluna cromatográfica e a razão massa/carga devem ser pré-estabelecidos com critério (VELLOSO *et al.*, 2009).

4.1.1. Sistema Cromatógráfico

Para a determinação dos compostos analisados, foi desenvolvido um método original por análise exploratória, utilizando um sistema de cromatografia líquida de alta eficiência Waters Alliance e2695 acoplado a um espectrômetro de massas (MS) do tipo quadrupolo equipado com fonte de ionização por eletrospray. A separação dos compostos ocorreu por meio de coluna SunFire* C-18 μm 4.6X250 mm e coluna guarda com as mesmas características.

A escolha da fase móvel foi baseada em diferentes proporções dos eluentes: metanol, acetonitrila, água deionizada/MiliQ e ácido fórmico 0,1% em modo gradiente, conforme as características físico-químicas das interações dos compostos com a coluna utilizada. Até o momento da injeção, as amostras em análise foram mantidas sob temperatura de 10°C e a coluna, a 35°C. O volume de injeção utilizado foi de 20 μL .

A quantificação dos compostos ocorreu com base no monitoramento da razão massa/carga (m/Z) para cada um dos compostos, apresentando fonte em modo positivo, voltagem capilar igual 0,8 kV, voltagem do cone de 15V; temperatura da fonte em 12°C, temperatura de dessolvatação correspondente a 200°C e gás de dessolvatação (nitrogênio) a 800 L/h. Para a análise cromatográfica foi utilizada uma coluna analítica SunFire® C18 5 μm 4.6x 250mm.

As características de análises utilizadas na determinação de cada composto estão resumidas na tabela abaixo, a tabela 1:

Tabela 1. Condições cromatográficas para a determinação dos compostos por modo gradiente utilizando análises HPLC-MS. Fase móvel: A - álcool (metanol), B- água deionizada; C- acetonitrila; D- modificadores de pH (ácido fórmico 0,1%).

Compostos	Fase móvel (gradiente)	Tempo de análise (min)	Massa m/Z
PPA	0 min - 40% (C) e 60% (D) 4 min - 80% (C) e 20% (D) 6 min - 80% (C) e 20 % (D) 6.5 min - 40 (C) e 60% (D) 10 min - 40% (C) e 60% (D)	10	241
5B	0 min - 40% (C) e 60% (D) 4 min - 80% (C) e 20% (D) 6 min - 80% (C) e 20 % (D) 6.5 min - 40 (C) e 60% (D) 10 min - 40% (C) e 60% (D)	10	255
LEV	0 min - 40% (C) e 60% (D) 4 min - 80% (C) e 20% (D) 6 min - 80% (C) e 20 % (D) 6.5 min - 40 (C) e 60% (D) 10 min - 40% (C) e 60% (D)	10	193
LINS1003	0 min - 10% (C) e 90% (D) 4 min - 10% (C) e 90% (D) 4.10 min - 80% (C) e 20% (D) 8 min - 80% (C) e 20 % (D) 11 min - 10 %(C) e 90% (D)	11	233
LINS1015	0 min - 20% (C) e 80% (D) 8 min - 55% (C) e 45% (D)	13	309

9 min - 55% (C) e 45% (D)
9.5 min - 20% (C) e 80 % (D)
13 min - 20%(C) e 80% (D)

Para o desenvolvimento e validação do método, utiliza-se também o padrão interno. O padrão interno (PI) é uma substância diferente, porém, com propriedades semelhantes ao analito, que é adicionada em quantidade adequada a amostra que será submetida a análise (RIBANI *et al.*, 2004). E é utilizado na padronização, pois permite a correção de eventuais desvios que possam ocorrer durante o processo, visto que uma alteração será observada tanto para o PI quanto para o analito de interesse, o que corrigiria a proporção entre ambos. Dessa forma, a curva de calibração é construída a partir da razão entre área/ área PI, gerando dados mais confiáveis.

O P.I utilizado nesse estudo, para todos os compostos, foi o fármaco diazepam, na concentração de 100 µg/mL solubilizado em acetonitrila.

E, somente para o desenvolvimento do método bioanalítico, utiliza-se a amostra branco. O branco é a amostra contendo apenas solvente ou plasma, sem a presença do composto em análise, para avaliação de seus comportamentos no sistema cromatográfico e dessa forma também averiguar se não há interferência desses componentes na análise do composto em estudo.

4.1.2. Processamento das amostras

As amostras biológicas utilizadas na construção das curvas de calibração passavam por um processamento antes de serem injetadas no HPLC-MS para posterior análise.

A extração foi realizada a partir da adição de 200 µL da amostra (candidatos a fármacos em diferentes concentrações + plasma) em um microtubo, seguido pelo acréscimo de 50 µL de diazepam 2,5 µg/mL (padrão interno) solubilizado em acetonitrila, e 100 µL de ácido tricloroacético 10% (TCA) também solubilizado em acetonitrila; em seguida, adicionou-se 200 µL de acetonitrila gelada, para a promoção da precipitação de proteínas presentes no plasma, a fim de evitar a interferência de proteínas contidas no plasma na análise e quantificação dos compostos. O microtubo era então agitado com auxílio de vórtex, garantindo a mistura completa dos componentes adicionados.

Para a separação das fases, após a precipitação das proteínas, as amostras eram então centrifugadas por 15 minutos a 12060 rpm, sob temperatura de 4°C. Posteriormente a centrifugação, retirou-se o sobrenadante, filtrou-se por meio de filtros PVDF (0,22 µm) e então injetou-se no cromatógrafo 20 µL de cada uma das amostras processadas.

4.2. Validação dos métodos analítico e bioanalítico

Após o desenvolvimento de um método, e antes que seja aplicado para análise de amostras de interesse, deve-se realizar a validação do método de forma a assegurar que as condições em que esse será aplicado, vão gerar os resultados esperados (LANÇAS, 2009). A validação, portanto, objetiva a minimização de fatores de variabilidade (como por exemplo contaminação amostral, reagentes inadequados, erros de pipetagem, variações de temperatura, perdas de material de análise, entre outros) que podem levar a imprecisão ou inexatidão de um dado, e proporciona evidências dos requisitos específicos relacionados a finalidade do método, através de ensaios experimentais, de forma a gerar resultados esperados com reprodutibilidade, precisão e exatidão adequados (LANÇAS, 2009; BRASIL, 2017a).

4.2.1. Método analítico

A validação parcial do método analítico avaliou os limites de confiança: linearidade, seletividade, sensibilidade, exatidão e precisão conforme está preconizado na Resolução da ANVISA, RDC nº 16, de 24 de julho de 2017.

4.2.2. Método bioanalítico

A validação parcial do método bioanalítico avaliou a precisão, exatidão, seletividade, e linearidade de acordo com a Resolução da ANVISA, RDC nº 27 de 17 de maio de 2012, e pela *Food and Drug Administration* (FDA) através do *Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation* de 2018.

4.2.3. Linearidade

A linearidade é definida como a capacidade do método em fornecer resultados diretamente proporcionais à concentração da substância em análise, dentro de um determinado intervalo de concentrações (VALDERRAMA *et al.*, 2009).

A sua avaliação ocorre através da construção de uma curva de calibração, realizada em triplicata e com nove níveis de concentrações, e partindo de soluções padrões, foram realizadas diluições seriadas para obter o intervalo de 10- 0,078 µg/mL. As respostas obtidas em função da concentração do analito foram plotados em um gráfico, apresentado no item 5.2.2 (método analítico) e no item 5.3.2. (método bioanalítico), juntamente com o gráfico de dispersão dos resíduos e avaliação estatística e a equação da reta de regressão em y e x, estimada pelo método dos mínimos quadrados. E foi realizada também avaliação da associação linear entre as variáveis por meio dos coeficientes de correlação (r) e de determinação (r) (BRASIL, 2017a; BRASIL, 2017b).

Para a avaliação da significância do coeficiente angular, a homocedasticidade foi avaliada. E o critério de aceitação nos testes estatísticos na qual o nível de significância utilizado foi 5%, foi de que a curva deveria apresentar coeficiente de correlação superior a 0,990, exatidão entre 85 e 115%, e o limite inferior de quantificação podendo variar entre 80 e 120%. Além de coeficiente angular significativamente diferente de zero (BRASIL, 2017a; BRASIL, 2017b).

4.2.4. Seletividade

É a capacidade do método de diferenciar e quantificar o composto de interesse de outros compostos, sejam eles produtos de degradação, impurezas, componentes da matriz ou ainda fármacos de uso concomitante (LANÇAS, 2009; BRASIL, 2017a). Consiste em observar a presença de picos na região do tempo de retenção correspondente ao analito de interesse na matriz pura, e para que o método seja considerado seletivo, não deve haver picos interferentes nos tempos de retenção do fármaco e nem do padrão interno (LANÇAS, 2009).

Além disso, para a demonstração da seletividade, os ensaios devem ser aplicados à substâncias estruturalmente semelhantes ao analito, de forma a obter um resultado negativo, atestando dessa forma a seletividade do método apenas para a molécula

para qual o método fora desenvolvido, visto que para métodos quantitativos, a seletividade é um parâmetro que deve comprovar que a resposta analítica é exclusivamente do analito, sem interferentes como diluente, matriz, impurezas ou produtos de degradação (BRASIL, 2017a).

4.2.5. Sensibilidade analítica

O ensaio de sensibilidade analítica, indica a menor diferença de concentração que pode ser distinguida em uma faixa linear (VALDERRAMA, 2009). Pode ser também definida como a razão entre a inclinação da curva analítica e o desvio padrão de um sinal em uma determinada concentração, considerando o ruído presente nos sinais de resposta (SKOOG *et al.*, 2008).

Através do ensaio de sensibilidade é possível determinar o limite inferior de quantificação (LIQ), tanto para o método analítico quanto para o método bioanalítico. Segundo a RDC nº166/2017, o limite inferior de quantificação pode ser definido como a menor concentração de um analito que pode ser quantificada com precisão de 80-120% e exatidão de 0-20%, adequadas sob condições experimentais pré-estabelecidas. A resposta apresentada deve ser superior no mínimo cinco vezes a qualquer ruído da amostra branco no tempo de retenção do fármaco (BRASIL, 2017a; BRASIL, 2017b).

4.2.6. Precisão e Exatidão

A precisão, expressa o grau de concordância entre os resultados analíticos obtidos a partir de uma série de medidas realizadas para uma mesma amostra em condições determinadas, e o principal objetivo é verificar a proximidade e concordância entre as replicatas analisadas (LANÇAS, 2009, VALDERRAMA, 2009; BRASIL, 2017a). Já a exatidão, expressa o grau de concordância entre o valor obtido e o valor de referência (VALDE VALDERRAMA, 2009; BRASIL, 2017a).

Ambos foram avaliados por meio de análise de amostras em intracorridas e intercorridas. E os ensaios para a sua determinação utilizaram as concentrações do LIQ, controle de qualidade alto (CQA) e controle de qualidade médio (CQM), todos em quintuplicata. Devido à proximidade do valor do controle de qualidade baixo

(CQB), 0,15625 µg/mL, ser muito próxima ao valor do LIQ (0,0781 µg/mL) utilizou-se o controle de qualidade médio para os ensaios de precisão e exatidão, visto que em caso de degradação das amostras em estudos, a análise cromatográfica seria prejudicada, impossibilitando a quantificação dos compostos em análise.

Como critério de aprovação para precisão, os valores deveriam estar entre 0% e 15%, e para exatidão, entre 85 e 115%. Com exceção do LIQ, cujo critério de aprovação para o ensaio de precisão corresponde a faixa entre 0 a 20%, e para o ensaio de exatidão, a faixa entre 80 e 120% (BRASIL, 2017a).

4.3. Estudo de Estabilidade Química

Para determinação da estabilidade química, os compostos foram submetidos a três diferentes soluções tampões que mimetizavam as condições fisiológicas plasmáticas (pH 7,4- Tampão Hank's), estomacais (pH 1,2) e intestinais (pH 8,8), visando reproduzir as condições na qual um fármaco estaria sujeito ao longo do TGI (Trato Gastrointestinal), e foram avaliadas as respostas com base em análises cromatográficas ao longo de um período de 24 horas (720 minutos).

O tampão Clark-Lubs, correspondente ao pH 1,2, foi preparado a partir da adição de ácido clorídrico (HCl) na concentração de 0,2 M na forma de gotejamento a uma solução de cloreto de potássio (KCl) 0,2M, sob agitação, até a obtenção de pH 1,2. Para o tampão PBS (tampão fosfato-salino) ou Hank's, equivalente ao pH de 7,4, acrescentou-se fosfato de sódio (Na_2HPO_4) 0,2M a uma solução de cloreto de sódio (NaCl), e foi-se adicionando aos poucos ácido clorídrico (HCl) 0,2 M até a obtenção de pH 7,4. E para o preparo do tampão Tris (pH 8,8), fez-se a dissolução de Tris em água, e ajustou-se o pH com solução de hidróxido de sódio (NaOH) 2M.

Para a realização do estudo de estabilidade química foram avaliadas então duas concentrações: CQM e CQA (para cada composto). E após a adição dos compostos e tampões, essas substâncias foram mantidas em incubadora, com agitação constante de 100 rpm e temperatura de $37 \pm 2^\circ\text{C}$ e foram realizadas coletas de amostras em tempos pré-determinados: 0, 10, 20, 30, 60, 120, 240, 480, 600, 720 minutos. A análise das amostras coletadas foi avaliada pelo método cromatográfico previamente desenvolvido, na qual encontra-se descrito no item 4.1.1.

Os valores obtidos das áreas referentes aos picos dos compostos de interesse coletadas foram comparados com a área inicial (correspondente ao tempo zero), e avaliadas estatisticamente através do teste ANOVA (paramétrico para medidas repetidas) com pós teste de Tukey, com nível de significância 0,05.

4.4. Estudo de Estabilidade em Plasma

Para a realização do estudo de estabilidade em plasma, utilizou-se plasma de rato proveniente do banco de plasma do laboratório de toxicologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas- FCF/UNESP de Araraquara, a fim de reproduzir as condições fisiológicas nas quais os compostos serão submetidos nas etapas posteriores de seu processo de desenvolvimento, nas etapas pré-clínica e clínica.

Os compostos foram diluídos em plasma, nas concentrações baseadas CQM e CQA, e o estudo foi realizado em triplicata.

As amostras foram mantidas em uma incubadora (430 Ethnik®), sob agitação constante de 120 rpm a uma temperatura de 37°C ± 2°C (temperatura fisiológica normal de um ser humano), e foram sendo coletadas alíquotas nos tempos correspondentes a: 1; 10; 20; 30; 45; 60; 120; 240; 600; 720 minutos. Após coletadas, as alíquotas eram analisadas com o auxílio de um HPLC-MS, através do método previamente desenvolvido e validado, conforme está descrito nos itens 4.1 e 4.2, a fim de avaliar a susceptibilidade dos compostos frente ação de enzimas plasmáticas.

O critério de aceitação para a aprovação ou rejeição da corrida analítica foi de que pelo menos 67% das amostras de controle de qualidade deveriam estar dentro de cerca de 15% dos seus respectivos valores nominais, exceto o LIQ, na qual são permitidos desvios iguais ou menores a 20%.

Para a avaliação estatística dos resultados foi realizado o teste ANOVA (paramétrico para medidas repetidas) com pós teste de Tukey com nível de significância igual a 0,05.

5. Resultados e discussão

5.1. Sistema cromatográfico

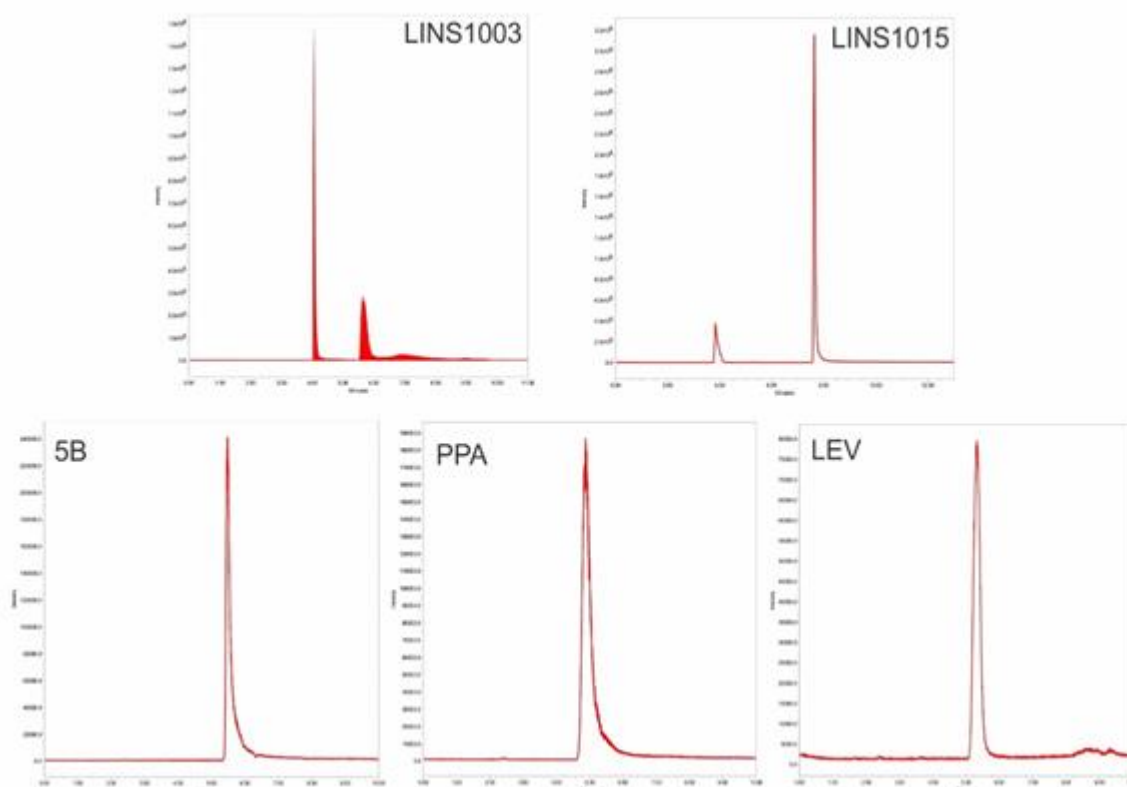
Os resultados obtidos comprovam que o sistema cromatográfico desenvolvido foi capaz de separar os analitos de interesse sem interferência analítica.

Para o desenvolvimento do método cromatográfico foi utilizada uma coluna SunFire®, que de acordo com as informações contidas no site da Waters®, são colunas geralmente utilizadas no desenvolvimento de métodos de uso geral em pH baixo e o ligante C18 é altamente retentivo, principalmente em relação a compostos básicos, sendo ideal para ensaios de purificação e também perfil de impurezas.

Inicialmente, foi realizada a cromatografia exploratória a fim de se determinar as melhores condições cromatográficas, e a alteração para modo gradiente apresentou melhor resposta mediante as condições analíticas predeterminadas, e, portanto, foi escolhida para a realização das análises dos compostos.

O tempo de retenção para os compostos no sistema cromatográfico foram: 4,1 min (LINS1003), 7,7 min (LINS1015), 5,6 min (5B), 5,2 min (PPA) e 5,4 min (LEV), para as corridas analítica e bioanalítica. Em todos os compostos foram obtidas boa separação entre os picos e também boa definição, o que pode ser observado na figura 2, que apresenta o cromatograma obtido do software Empower®3, e nela também está demonstrado a relação entre os tempos de retenção e a intensidade do sinal gerado por cada um dos analitos.

Figura 2. Cromatograma dos compostos LINS1003, LINS1005, 5B, PPA e LEV na concentração de 10 µg/mL, em acetonitrila.



5.2. Validação do método analítico

Após o desenvolvimento do método através da determinação do sistema cromatográfico, é necessário avaliar a influência das diferentes constituições de matrizes sob os analitos em teste, realizando a validação de cada uma das curvas de calibração construídas para cada matriz, a fim de se reduzir possíveis falhas na quantificação dos analitos em estudo.

Um método analítico instrumental é calibrado pela observação das respostas (eixo y) aos diferentes níveis do analito (x). As curvas analíticas são modelos lineares, obtidas por meio da quantidade de medida “y” de amostras de concentração “x” conhecidas, pertencentes a um conjunto de padrões (FARIA *et al.*, 2015).

Para cada um dos compostos em análise foram construídas curvas de calibração em quintuplicata, considerando o intervalo de concentrações de 10 a 0,078 µg/mL.

E para se verificar o grau de proporcionalidade das concentrações dos analitos, deve-se verificar os seguintes parâmetros, que serão discutidos a seguir, conforme preconizado na RDC nº166/2017.

5.2.1. Seletividade

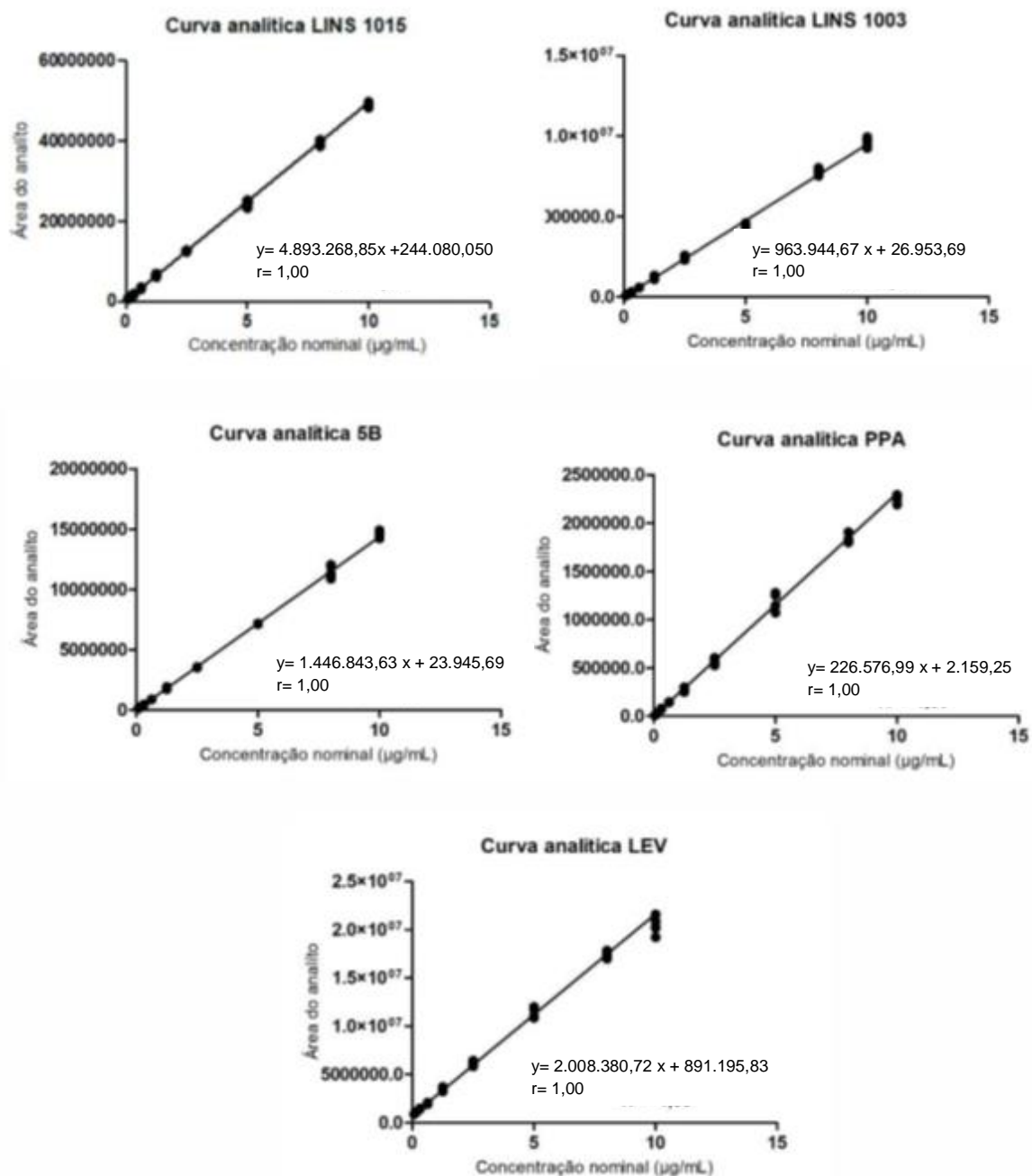
O ensaio de seletividade avaliou a existência de picos interferentes no tempo de retenção de cada um dos compostos em teste. O tempo de retenção para os compostos no sistema cromatográfico foram: 4,1 min (LINS1003), 7,7 min (LINS1015), 5,6 min (5B), 5,2 min (PPA) e 5,4 min (LEV), conforme pode ser visualizado no cromatograma (figura 2), apresentada no item 5.1. desse presente estudo.

Analisando o cromatograma de cada um dos compostos, é possível observar que não há picos interferentes no tempo de retenção de nenhum dos compostos em estudo. Portanto, conclui-se que o método analítico e bioanalítico desenvolvido é seletivo.

5.2.2. Linearidade

A linearidade foi determinada a partir da construção de um gráfico que correlaciona as áreas dos picos cromatográficos dos analitos em pesquisa em função da concentração do analito, estimados pelo método dos mínimos quadrados resultando no coeficiente de correlação (r) e na equação da reta, obtida a partir da construção das curvas analíticas, demonstradas na figura 3 (BRASIL, 2017a).

Figura 3. Curvas analíticas dos compostos: LINS1003, LINS1015, 5B, PPA e LEV.



Os valores de equação da reta e coeficiente de correlação estão agrupados na tabela a seguir:

Tabela 2. Resultado das equações das retas dos compostos: LINS1003, LINS1015, 5B, PPA e LEV.

Compostos	Equação da reta	r
LINS 1003	$y = 963.944,675x + 26.953,69$	1,00
LINS 1015	$y = 4.893.268,85x + 244.080,50$	1,00
5B	$y = 1.447.843,63x + 23.945,69$	1,00
PPA	$y = 226.576,99x + 2.159,25$	1,00
LEV	$y = 2.008.380,72x + 891.195,83$	1,00

Os resultados obtidos, conforme descritos anteriormente, demonstraram uma relação aparentemente linear e os valores de coeficiente de determinação (r) próximos ao valor de 1, indicam que os dados experimentais estão próximos a linha de regressão. No entanto, os erros da regressão linear muitas vezes não apresentam variância constante, por isso, é necessário realizar o teste de hipóteses (ou avaliação das variâncias), para se avaliar a homocedasticidade das variâncias constantes dos erros durante a construção da curva analítica.

Para isso, de acordo com a versão I do Guia nº10/2017 da ANVISA, o método mais indicado para a estimativa da equação da reta é o método dos quadrados mínimos (MMQ), que dependendo da variância dos resultados de y para cada valor de x pode apresentar um fator de ponderação (BRASIL, 2017b).

Se a variância do eixo y for constante (situação caracterizada como homocedasticidade), o mais recomendado é o uso do método MMQO (Método dos Mínimos Quadrados Ordinários), no qual o método é aplicado diretamente, sem a necessidade de um fator de ponderação. Já no caso de heterocedasticidade, ou seja, quando são observadas variações de y, o recomendado é o método MMQP (Método dos Mínimos Quadrados Ponderados), que possui um fator de ponderação a fim de evitar possíveis resultados tendenciosos, que poderiam ser gerados com o emprego do método MMQO (BRASIL, 2017b).

A variância é calculada através da seguinte fórmula:

$$S_{y_i}^2 = \frac{1}{m-1} \sum_{j=1}^m (y_{ij} - \bar{y}_i)^2$$

Fonte: BRASIL, 2017b

Na qual j representa o resultado para um conjunto de réplicas i; m corresponde ao número de medidas (réplicas) para cada resposta analítica de y em cada ponto (ANVISA, 2017).

O método referência para a determinação da homocedasticidade dos dados é o teste de Cochran, partindo de duas hipóteses: H0 (variâncias não são iguais) e H1 (ao menos uma variância é diferente) (ANVISA, 2017). A estatística, então, é testada por meio da fórmula:

$$C = \frac{S_{y_{max}}^2}{\sum_i^n S_{y_i}^2} = \frac{\text{maior variância em y}}{\text{soma de todas as variâncias em y}}$$

Fonte: BRASIL, 2017b

Sendo C a razão entre a maior variância observada para o conjunto de dados de y e a soma das variâncias de y, em todos os níveis de concentração (BRASIL, 2017b).

Os resultados do teste de Cochran estão apresentados na tabela 3. De acordo com a ANVISA, o C calculado deve ser inferior ao valor de C tabelado com nível de significância de 5%, disponível na versão 1 do Guia nº10/2017 (ANVISA, 2017). Contudo, quando o C calculado é superior ao valor determinado pela tabela, a hipótese de igualdade das variâncias é descartada, e conclui-se que o modelo é heterocedástico.

Tabela 3. Resultado do teste de Cochran para os compostos: LINS1003, LINS1015, 5B, PPA e LEV.

Compostos	C		Conclusão
	Tabelado	Calculado	
LINS1003	0,358	0,4545	Heterocedástico
LINS1015	0,358	0,4053	Heterocedástico
5B	0,358	0,7348	Heterocedástico
PPA	0,358	0,5677	Heterocedástico
LEV	0,358	0,5957	Heterocedástico

Visto que os modelos utilizados para os compostos em estudo são heterocedásticos (método MMQP), é necessário, portanto, aplicar o fator de ponderação, de forma a normalizar a tendência da reta em toda sua amplitude, gerando assim coeficientes adequados para as equações. O fator de ponderação utilizado teve como peso $1/y^2$.

Através do programa GraphPad Prism®, após a aplicação do fator de ponderação aos dados, foi gerado uma nova equação da reta e também um novo valor de r.

Tabela 4. Equações da reta geradas pelo programa GraphPad Prism® após teste de Cochran.

Compostos	Equação da reta	r
LINS 1003	$y = 94.867,9x + 6.183$	0,9969
LINS 1015	$y = 494.100,0x + 20.838,9$	0,9992
5B	$y = 143.400.0x + 3.978$	0,9986
PPA	$y = 23.079,2x + 1.611$	0,9973
LEV	$y = 208.900,0x + 74.551,6$	0,9943

Após a obtenção da nova equação da reta, deve-se comprovar a significância dos coeficientes angulares, a fim de demonstrar a linearidade do método por meio do teste F da Anova (BRASIL, 2017b).

A análise de variância (Anova) permite avaliar se a reta de regressão estimada explica a relação entre a concentração e o sinal, através da avaliação das possíveis fontes de variação do sistema como: regressão (variação das respostas analíticas em relação a amplitude do modelo), resíduos (variação das respostas analíticas em função do modelo) e total (soma de variações de regressão e resíduos) (BRASIL, 2017b). Deve-se atentar, ainda, para o fator a ser utilizado nos cálculos, baseado no método utilizado (BRASIL, 2017b).

No teste F para Anova, para se testar a contribuição de um conjunto de n variáveis independentes do modelo deve-se considerar duas hipóteses: H_0 (na qual o coeficiente angular é zero) e H_1 (coeficiente angular é diferente de zero) (BRASIL, 2017b). E a estatística do teste se dá pela fórmula:

$$F = \frac{SQReg/k}{\frac{SQRes}{(n-k-1)}}$$

Fonte: MAIA, 2017.

Sendo $SQReg$ a soma dos quadrados da regressão e $SQRes$ a soma dos quadrados dos resíduos (MAIA, 2017).

O valor obtido pelo cálculo de F é comparado a um valor crítico para se decidir se a hipótese nula será aceita ou rejeitada (BRASIL, 2017b). No caso do F calculado ser superior ao valor crítico tabelado, a hipótese H_0 (hipótese nula) é rejeitada e assume-se, portanto, que y varia e função de x e o método pode então ser considerado linear (BRASIL, 2017b).

Os resultados do teste ANOVA estão descritos na tabela 5 a seguir.

Tabela 5. Resultado do teste F ANOVA para avaliação do coeficiente angular.

Compostos	F Tabelado	F Calculado	P- valor
LINS1003	4,067	15273,96	1,66 x10 ⁻⁵⁶
LINS1015	4,067	62835,73	1,08 x10 ⁻⁶⁹
5B	4,067	32853,67	1,21 x 10 ⁻⁶³
PPA	4,042	21732,91	1,97 x 10 ⁻⁶⁵
LEV	4,067	11029,60	1,78 x 10 ⁻⁵³

De acordo com os resultados obtidos para cada um dos analitos em análise, pode-se observar que os valores de F calculado são maiores que os valores tabelados. Sendo assim, a hipótese H₀ foi rejeitada, o que comprova que os coeficientes angulares são estatisticamente diferentes de zero ao nível de significância de 5%.

Além do coeficiente angular, deve-se considerar também a avaliação do coeficiente linear. Nesse caso, o recomendado é avaliação por meio do teste t de Student, para se determinar se o coeficiente linear é estatisticamente diferente do zero (BRASIL, 2017b). Para a realização do teste t, foram consideradas duas hipóteses: a H₀ (coeficiente linear igual a zero) e H₁ (coeficiente linear diferente de zero) (BRASIL, 2017b).

O esperado é que o coeficiente linear seja estatisticamente igual a zero, e caso contrário, é necessário realizar uma análise para se verificar o impacto do resultado na linearidade do método (BRASIL, 2017b).

Os resultados do teste t- Student estão na tabela 6, a seguir:

Tabela 6. Resultado do teste t-Student para avaliação do coeficiente linear.

Compostos	T Tabelado	T Calculado	P- valor
LINS1003	2,0167	-0,5687	0,5725
LINS1015	2,0167	1,6703	0,1006
5B	2,0167	1,6808	0,1021
PPA	2,0167	0,5522	0,5833
LEV	2,0167	1,6269	0,1111

Os resultados do teste t-Student demonstraram que os coeficientes lineares são iguais a zero, visto que os valores obtidos no teste são inferiores aos valores tabelados e também que os p-valores são superiores a 0,05.

É necessário ainda comprovar que y realmente varia em função de x, e para isso, deve-se demonstrar que a variação relacionada à regressão é maior que a ocasionada aos erros (resíduos) (BRASIL, 2017b). O resíduo quantifica a diferença entre o valor encontrado de y e o valor estimado pela equação, quantificando a distância entre o valor real e o estimado (BRASIL, 2017b).

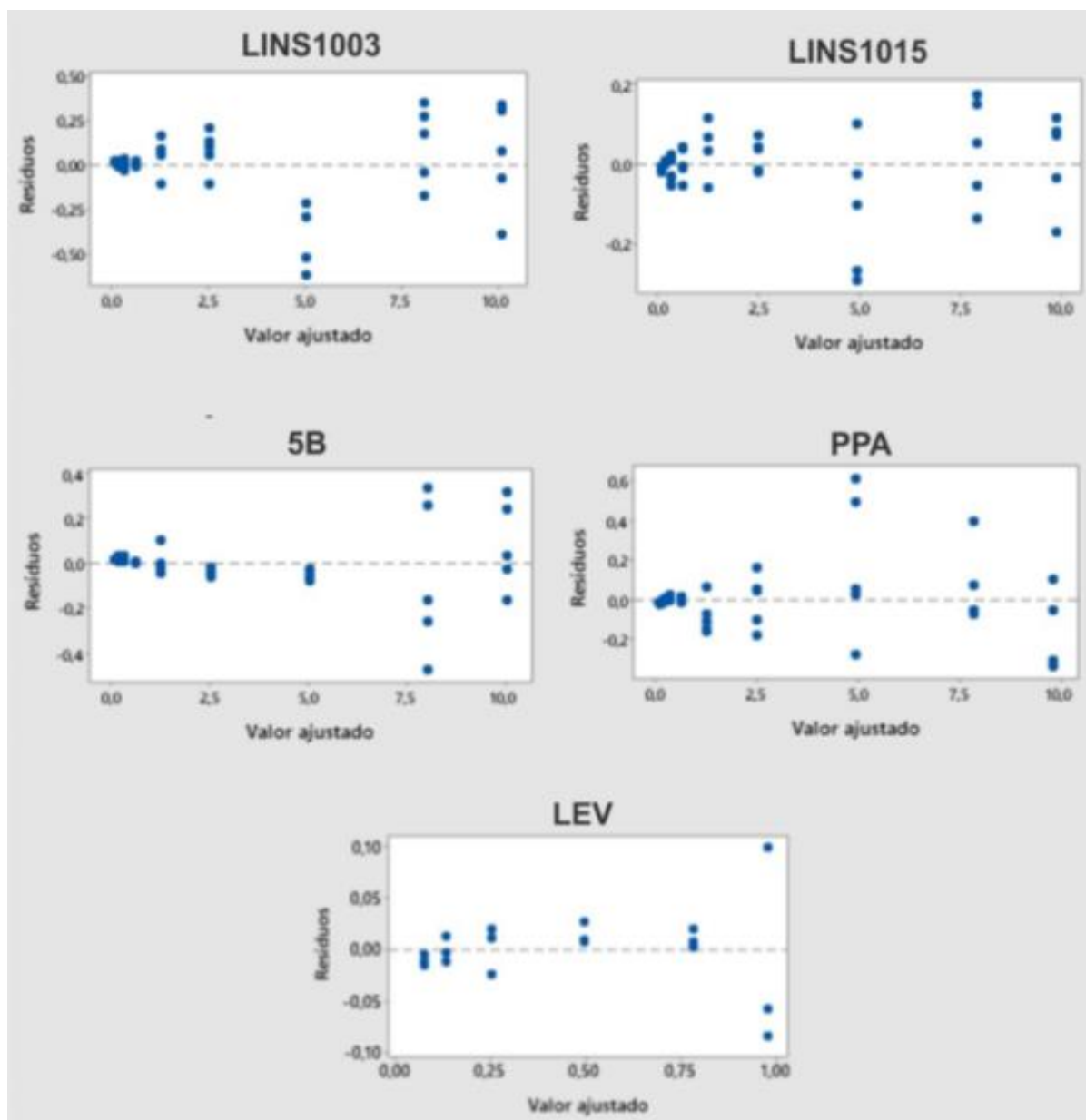
A análise dos resíduos permite detectar alguns problemas no ajuste da curva como: desvios de linearidade, não normalidade dos erros, heterocedasticidade (variância não constante dos erros), correlação dos erros; presença de amostra atípicas (outliers) (RODRIGUES, 2016).

Para avaliar a normalidade dos resíduos, foi realizada a avaliação visual do gráfico. O gráfico para avaliação visual deve conter a distribuição de todos os resíduos em função da concentração e da resposta, preferencialmente com uma linha reta no valor da média, e duas outras linhas limítrofes, delimitando os valores esperados (BRASIL, 2017b). Os valores esperados podem ser estimados por meio de testes como o de Grubbs e o D de Cook, por exemplo (BRASIL, 2017b).

Os valores que estiverem fora da faixa esperada são chamados de outliers ou valores aberrantes. Nesse caso, é necessário avaliar as possíveis causas analíticas

desses valores e se esses ainda são adequados para serem utilizados (BRASIL, 2017b). Os gráficos utilizados para a análise dos resíduos estão contidos na figura 4.

Figura 4. Resultado da análise gráfica dos resíduos.



A investigação da normalidade dos resíduos ocorreu por meio do teste Ryan-Joyner (RJ), cujo objetivo é verificar se os dados são provenientes de uma distribuição normal, partindo das hipóteses: H_0 (distribuição dos resíduos é normal) e H_1 (distribuição não é normal).

Os resultados do teste de Ryan- Joyner estão na tabela a seguir:

Tabela 7. Resultado do teste de Ryan Joyner

Compostos	Estatística RJ	P-valor
LINS1003	0,940	<0,01
LINS1015	0,949	<0,01
5B	0,881	<0,01
PPA	0,870	<0,01
LEV	0,898	<0,01

Analisando a tabela 7, pode-se observar que os p-valores são inferiores a 0,05, assim, pode-se concluir que os compostos não apresentam distribuição normal ao nível de significância de 5%. Dessa forma, é provável que haja a presença de outliers. Por isso, foi realizado o teste de Grubbs para se detectar a presença de outliers no conjunto de dados em estudo, utilizando os valores extremos nas respostas dos resíduos como critérios. Os valores acima dos valores extremos foram considerados outliers.

Tabela 8. Resultado do teste de Grubbs

Compostos	Valor tabelado	Resíduo padronizado
LINS1003	2,92; -2, 92	3,2
LINS1015	2,92; -2, 92	-3,17
5B	2,92; -2, 92	3,68
PPA	2,96; -2, 96	3,84
LEV	2,92; -2, 92	-3,96

Observando os resultados do teste de Grubbs, apresentados na tabela acima, pode-se verificar que há um outlier em cada uma das curvas. Contudo, devido ao uso das replicatas, a independência da variabilidade e a avaliação de amostras consecutivas, tem-se garantias suficientes em relação aos resultados globais,

especialmente por se tratar de estudos preliminares com novos compostos e estudos *in vitro*. Portanto, os métodos analíticos foram aplicados nos estudos propostos.

5.2.3. Precisão e Exatidão

A precisão e a exatidão foram demonstradas por meio da preparação de cinco concentrações, sendo elas: LIQ (0,0781 µg/mL), CQB (0,15625 µg/mL), CQM (1,25 µg/mL) e CQA (8,0 µg/mL). Apenas para o composto PPA foi adotado o valor de LIQ igual a 0,039 µg/mL.

A precisão foi avaliada ao nível de repetibilidade (intra-dia) e precisão intermediária (inter-dia). A precisão ao nível de repetibilidade expressa a precisão diante das mesmas condições de operação do procedimento, o que inclui fatores como o funcionamento do equipamento utilizado no estudo, o analista responsável, os reagentes utilizados, momento do dia e também condições ambientais (BRITO *et al.*, 2003; BRASIL, 2017a; BRASIL, 2017b). A precisão de intermediária expressa as variações ocorridas no laboratório, considerando dias, analistas e equipamentos diferentes, entre outros (BRITO *et al.*, 2003).

Tabela 9. Resultados da precisão e exatidão dos controles de qualidade LIQ, CQB, CQM e CQA para o método analítico dos compostos LINS1003, LINS1015, 5B, PPA E LEV (intra-dia: n=5; inter-dia: n=15).

Controles de Qualidade da Curva de Calibração Analítica			LIQ	CQB	CQM	CQA
LINS1003	Intra-dia (n=5)	Precisão (%)	1,61	7,32	5,79	2,64
		Exatidão (%)	105,82	97,75	105,30	103,16
	Inter- dia (n=15)	Precisão (%)	1,98	5,45	4,77	2,09
		Exatidão (%)	106,85	103,25	111,01	100,91
LINS1015	Intra-dia (n=5)	Precisão (%)	11,51	7,39	5,15	3,45
		Exatidão (%)	96,24	112,48	101,08	104,57
	Inter- dia (n=15)	Precisão (%)	19,97	6,67	2,68	9,71
		Exatidão (%)	99,74	114,36	104,20	112,47
5B	Intra-dia (n=5)	Precisão (%)	7,90	5,81	5,60	8,60
		Exatidão (%)	96,32	103,08	101,77	96,69
	Inter- dia (n=15)	Precisão (%)	9,91	7,90	4,84	7,56
		Exatidão (%)	97,09	99,80	104,03	102,26
PPA	Intra-dia (n=5)	Precisão (%)	4,09	1,96	6,00	6,32
		Exatidão (%)	100,59	113,14	100,31	100,97
	Inter- dia (n=15)	Precisão (%)	1,64	3,29	3,92	2,76
		Exatidão (%)	102,22	113,62	100,53	100,73
LEV	Intra-dia (n=5)	Precisão (%)	9,00	7,16	7,29	8,05
		Exatidão (%)	106,78	94,27	101,92	103,62
	Inter- dia (n=15)	Precisão (%)	10,91	12,05	6,79	8,40
		Exatidão (%)	81,11	87,54	102,05	100,11

Conforme está descrito na legislação vigente, as análises intracorridas foram determinadas através de cinco replicatas do limite inferior de quantificação (LIQ), controle de qualidade baixo (CQB), controle de qualidade médio (CQM), e controle de qualidade alto (CQA), todas realizadas em um único dia. As análises intercorridas foram realizadas em três dias consecutivos. Os resultados de precisão e exatidão

intercorridas foram realizados em três dias consecutivos. Os resultados das análises de precisão e exatidão intra e inter-dia encontram-se na tabela 9.

A legislação vigente considera como critério de aprovação para precisão, os valores entre 0% e 15%, e para exatidão, entre 85 e 115%. Sendo assim, todas as concentrações de cada um dos compostos apresentaram exatidão e precisão dentro dos critérios de aceitação. Portanto, o método cromatográfico utilizado pode ser considerado preciso e exato.

5.3. Validação do método bioanalítico

A validação bioanalítica consiste na avaliação de parâmetros que possibilitem confirmar que um método bioanalítico é adequado para sua finalidade, de forma a originar resultados precisos, exatos, livre de interferentes dentro de uma margem de erro conhecida (BRASIL, 2012; FERNANDES, 2019).

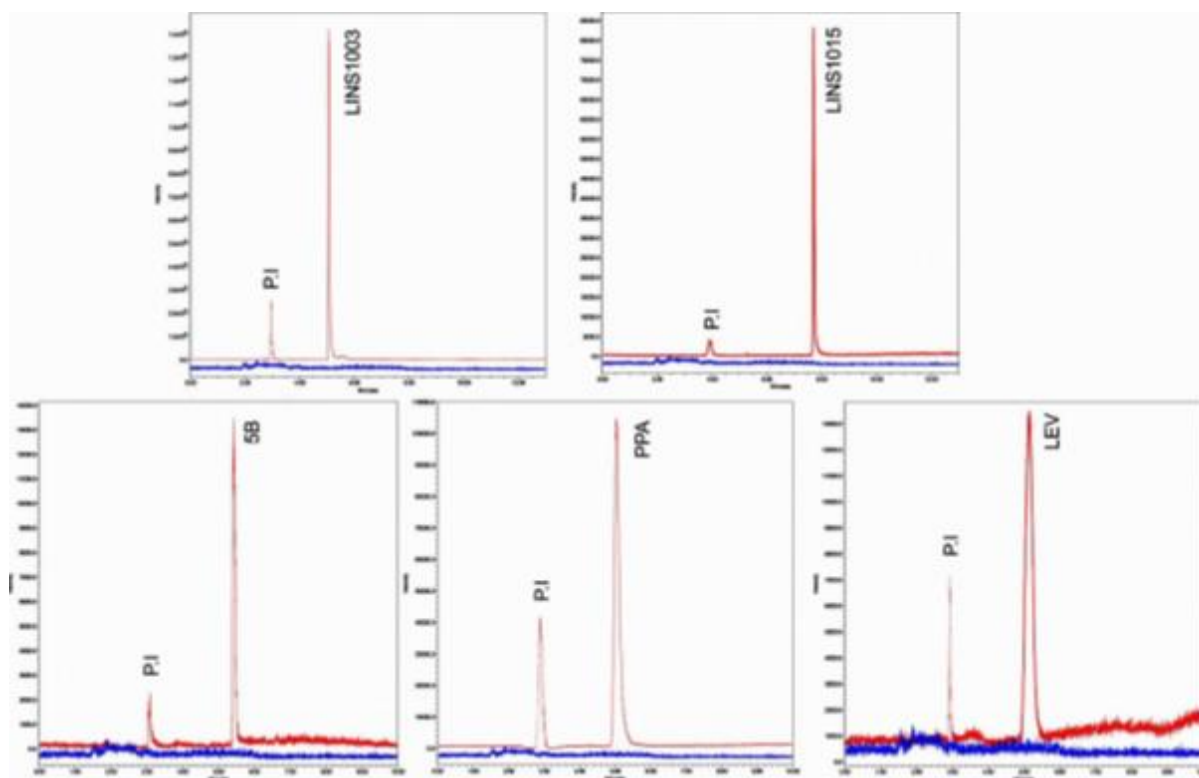
Assim como na validação do método analítico, foram construídas curvas de calibração em quintuplicata, considerando o intervalo de concentrações de 10 a 0,078 µg/ml, para cada um dos compostos em análise.

E para se verificar o grau de proporcionalidade das concentrações dos analitos, foram avaliados os seguintes parâmetros, discutidos a seguir, conforme preconizado na RDC nº 27/ 2012.

5.3.1. Seletividade

Os cronogramas obtidos a partir do software Empower®3 estão apresentados na figura a seguir (Figura 5).

Figura 5. Cromatograma dos compostos em matriz biológica plasma na concentração de 1 µg/mL e P.I (diazepam 2,5 µg/mL).



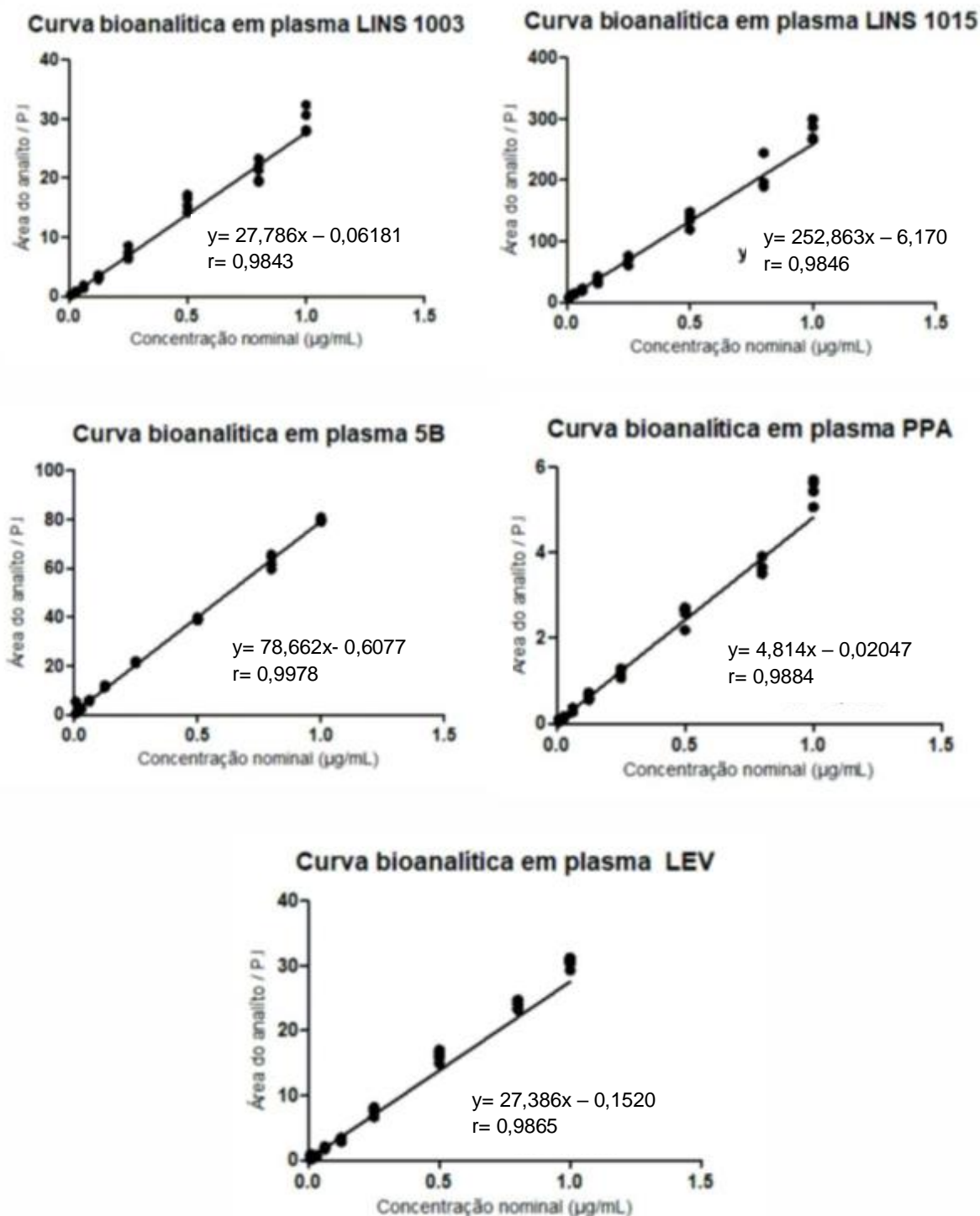
Na figura, é possível visualizar os tempos de retenção e intensidade dos sinais gerados por cada um dos analitos em matriz biológica representados em vermelho e o branco representado em azul. Ao sobrepor os dois cromatogramas, pode-se observar que não houve interferência do P.I. utilizado (diazepam 2,5 µg/mL) e do plasma branco. Sendo assim, pode-se concluir que o método bioanalítico é seletivo, e prosseguiu-se para a etapa de quantificação dos analitos de escolha.

5.3.2. Linearidade

Para a quantificação dos analitos, foi avaliada a linearidade a partir da construção de uma curva bioanalítica, plotando os resultados das áreas de regressão de y em x em um gráfico, estimado pelo método dos mínimos quadrados, obtendo assim uma reta, e também o valor de coeficiente de correlação e a equação da reta.

As curvas bioanalíticas estão representadas na figura a seguir:

Figura 6. Curvas bioanalíticas em plasma dos compostos LINS1003, LINS1015, 5B, PPA e LEV.



Os parâmetros utilizados para a avaliação das curvas de calibração em plasma foram os mesmos utilizados para a validação das curvas analíticas, conforme está descrito anteriormente no item 5.2 do presente estudo. Os resultados estão contidos na tabela a seguir:

Tabela 10. Parâmetros estatísticos avaliados para a linearidade da curva de calibração dos compostos LINS1003, LINS1015, 5B, PPA E LEV em plasma.

Composto	Curva de calibração em plasma	Teste estatístico	Valor tabelado	Valor calculado	P-valor
LINS1003	$y = 27,786x - 0,06181$ $r = 0,9843$	Cochran	0,616	0,503	-
		F Anova	4,49	18275,90	2,68115E-
		Teste T	2,1199	0,5063	21
		Grubss	2,92	2,24	0,3458
		Ryan-Joyner	-	0,975	0,05 0,080
LINS1015	$y = 252,863x - 6,170$ $r = 0,9846$	Cochran	0,616	0,885	-
		F Anova	4,49	11056,23	1,32561E-
		Teste T	2,1199	-0,2892	22
		Grubss	2,92	4,33	0,1175
		Ryan-Joyner	-	0,862	0,05 0,023
5B	$y = 78,662x - 0,6077$ $r = 0,9978$	Cochran	0,616	0,734	-
		F Anova	4,49	32853,66	1,21272E-
		Teste T	2,1199	1,62	63
		Grubss	2,92	3,68	0,7592
		Ryan-Joyner	-	0,881	0,05 <0,010
PPA	$y = 4,814x - 0,02047$ $r = 0,9884$	Cochran	0,616	0,567	-
		F Anova	4,49	21732,91	1,97461E-
		Teste T	2,1199	0,5522	19
		Grubss	2,92	3,84	0,5833
		Ryan-Joyner	-	0,870	0,05 <0,01
LEV	$y = 27,386x - 0,1520$ $r = 0,9865$	Cochran	0,616	0,579	-
		F Anova	4,49	12575,6	1,03178E-
		Teste T	2,1199	0,2367	23
		Grubss	2,92	1,32	0,5832
		Ryan-Joyner	-	0,978	0,05 >0,100

Analisando os resultados obtidos é possível perceber que o teste de Cochran demonstrou que os compostos LINS1015, 5B e LEV são heterocedásticos, indicando a necessidade da aplicação do fator de ponderação $1/y^2$. O teste F da Anova comprovou que os coeficientes angulares de todos os compostos em estudos são estatisticamente diferentes de zero, visto que os resultados obtidos a partir do cálculo foram superiores aos valores tabelados.

Os resultados do teste de t-Student demonstraram que os coeficientes lineares são iguais a zero, pois todos os p-valores obtidos foram maiores que 0,05. Quanto a investigação da normalidade por meio do teste de Ryan-Joyner, apresentou resultados inferiores a 0,05, exceto LINS1003, assim conclui-se que os demais compostos não apresentam distribuição normal, apenas o composto LINS1003.

E em relação aos dados obtidos através do teste de Grubbs, foi possível verificar que há um outlier nas curvas dos compostos LINS1015, 5B e PPA, devido aos valores calculados extrapolarem a faixa de valores tabelada. Porém, devido ao uso de replicatas, avaliação consecutiva das moléculas e independência de variabilidade, os métodos bioanalíticos poderão ser aplicados aos estudos posteriores propostos.

5.3.3. Precisão e exatidão

Os resultados da precisão e exatidão estão apresentados a seguir:

Tabela 11. Dados de precisão e exatidão dos controles de qualidade LIQ, CQB, CQM e CQA para o método bioanalítico em plasma

Controles de Qualidade da Curva de Calibração Analítica						
			LIQ	CQB	CQM	CQA
LINS1003	Intra-dia (n=5)	Precisão (%)	0,95	3,19	0,34	1,69
		Exatidão (%)	104,25	91,18	91,64	109,64
	Inter- dia (n=15)	Precisão (%)	0,79	0,73	1,069	1,71
		Exatidão (%)	105,47	89,28	91,63	109,39
LINS1015	Intra-dia (n=5)	Precisão (%)	8,29	2,88	2,66	0,76
		Exatidão (%)	94,66	111,18	96,83	99,23
	Inter- dia (n=15)	Precisão (%)	3,98	0,77	5,68	0,88
		Exatidão (%)	90,99	112,16	96,55	99,65
5B	Intra-dia (n=5)	Precisão (%)	2,34	1,66	1,15	2,01
		Exatidão (%)	99,29	114,84	98,92	92,93
	Inter- dia (n=15)	Precisão (%)	1,47	2,29	0,98	0,29
		Exatidão (%)	100,61	112,22	98,36	93,64
PPA	Intra-dia (n=5)	Precisão (%)	9,8	2,61	3,11	0,29
		Exatidão (%)	99,01	100,31	101,97	101,52
	Inter- dia (n=15)	Precisão (%)	10,05	1,81	2,88	0,13
		Exatidão (%)	105,22	99,42	102,79	101,58
LEV	Intra-dia (n=5)	Precisão (%)	2,35	1,97	0,32	2,68
		Exatidão (%)	101,63	103,25	96,82	98,32
	Inter- dia (n=15)	Precisão (%)	3,72	3,46	2,89	1,08
		Exatidão (%)	110,66	107,36	106,98	102,78

De acordo com os resultados obtidos, pode-se concluir que todos os resultados estão de acordo com a legislação vigente.

5.4. Estabilidade química

A etapa inicial do delineamento de novos fármacos, objetiva otimizar o processo de transformação de um candidato a fármaco em um produto farmacêutico, através da compreensão das propriedades físico-químicas do fármaco e também de

outros componentes como os excipientes da formulação que darão origem ao produto em sua forma farmacêutica mais adequada a sua finalidade, bem como a interação entre esses (ANSEL *et al.*, 2013; BARREIRO; FRAGA, 2015; AULTON; TAYLOR, 2016).

O principal objetivo do delineamento de fármacos é a obtenção de uma resposta terapêutica que seja previsível em relação a resposta produzida por um fármaco, e que também seja passível de produção em larga escala, com características reproduzíveis a fim de assegurar a segurança, eficácia e a qualidade do produto (ANSEL *et al.*, 2013; BARREIRO; FRAGA, 2015; AULTON; TAYLOR, 2016). No entanto, as propriedades do delineamento do produto farmacêutico são influenciadas pelas propriedades dos fármacos, dos excipientes inclusos e também pela via de administração proposta (ANSEL *et al.*, 2013; AULTON; TAYLOR, 2016).

As formas farmacêuticas são planejadas com base na via de administração para qual se destina, visto que as condições na qual o fármaco será submetido serão diferentes de acordo com a via de administração escolhida, e, portanto, a farmacocinética também será diferente bem como suas propriedades físico-químicas (GOLAN *et al.*, 2014; AULTON; TAYLOR, 2016).

A via de administração oral, a via proposta para o delineamento dos compostos em estudo neste presente projeto, devido aos estudos iniciais de determinação de propriedades ADME (abreviação dos processos farmacocinéticos: absorção, distribuição, metabolismo e excreção), terem demonstrados resultados favoráveis para administração via oral; é a via mais comumente utilizada para a administração de fármacos, visto que comparada as demais vias de administração é a mais simples e prática, já que não é necessário auxílio de nenhum profissional habilitado para a administração, o próprio usuário é capaz de realizá-lo sozinho sem complicações; e também mais segura, além de ser mais aceita pela grande maioria dos usuários de medicamentos, estando relacionada a maior lucratividade no mercado (ANSEL *et al.*, 2013; AULTON; TAYLOR, 2016; LE, 2019). E, por isso, é geralmente a via de administração de primeira escolha pela maioria das empresas farmacêuticas.

As formas farmacêuticas orais são desenvolvidas visando atingir um efeito sistêmico decorrente da absorção do fármaco através do trato gastrointestinal (TGI) e,

portanto, substâncias presentes no TGI podem alterar a absorção do fármaco (ANSEL *et al.*, 2013; GOLAN *et al.*, 2014; AULTON; TAYLOR, 2016). Outros fatores também afetam a absorção, como o tempo de esvaziamento gástrico, que é responsável pela absorção efetiva do fármaco no intestino e no caso de fármacos que são inativados pelas secreções gástricas (instáveis em pH ácido), o esvaziamento lento faz com que o fármaco permaneça por mais tempo em contato com as secreções gástricas, o que pode acarretar na destruição do fármaco, prejudicando sua absorção, levando a doses subterapêuticas e, por consequência, prejudicando o desempenho do fármaco no organismo (ANSEL *et al.*, 2013; GOLAN *et al.*, 2014; AULTON; TAYLOR, 2016).

Além disso, as modificações de pH observados no decorrer do TGI também influenciam a ionização e solubilização do fármaco, sendo fator relevante para o grau de absorção do fármaco e também para a distribuição de equilíbrio das moléculas dos fármacos entre compartimentos aquosos baseado nos gradientes de pH entre eles (ANSEL *et al.*, 2013; AULTON ; TAYLOR, 2016; AMARAL *et al.*, 2017). Sabe-se, por exemplo, que as membranas são mais permeáveis a substâncias na sua forma não ionizada, e também que fármacos na forma de ácidos fracos apresentam melhor absorção estomacal (cujos valores de pH são baixos), enquanto que o intestino delgado (pH próximo a 6,5), apresenta ampla superfície de absorção tanto para fármacos na forma de ácidos fracos como na de bases fracas (ANSEL *et al.*, 2013; AULTON ; TAYLOR, 2016). E antes de serem excretados, os fármacos sofrem ainda biotransformação, cujas reações são divididas em dois tipos principais: reações de oxidação/redução (fase I) e conjugação/hidrólise (fase II) (GOLAN *et al.*, 2014). As reações de oxidação transformam os fármacos em metabólitos mais hidrofílicos através da adição de grupos polares como grupos hidroxila (OH) ou amina (NH₂), enquanto que as reações de conjugação modificam os compostos pelo acréscimo de grupos hidrofílicos, como o ácido glicurônico, gerando conjugados mais polares (GOLAN *et al.*, 2014).

Assim, para o delineamento de um fármaco destinado a via oral, todos esses fatores devem ser considerados, e a avaliação do composto em estudo em relação a variações de pH se torna imprescindível para a verificação de quanto tempo o composto permanece íntegro e estável sob determinadas condições, a fim de escolher a via de administração mais adequada para a realização dos estudos pré-

clínicos e clínicos posteriores, otimizando assim as etapas consecutivas do processo de desenvolvimento de novos fármacos (ANSEL *et al.*, 2013; MEIRELES, 2014; AULTON; TAYLOR, 2016). E também, auxiliam na elucidação dos mecanismos de ação e de degradação dos compostos (AULTON; TAYLOR, 2016).

Portanto, as informações obtidas durante a pré-formulação fornecem subsídios para a tomada de decisões durante o processo de desenvolvimento de um produto farmacêutico, além de evidenciar problemas potenciais da processabilidade, e dessa forma indicar os procedimentos que serão necessários para concretizar o delineamento de um novo candidato a fármaco (ANSEL *et al.*, 2013; AULTON; TAYLOR, 2016).

Além dos fatores biofarmacêuticos, como as características de absorção de um fármaco mediante uma determinada via de administração, o processo de desenvolvimento de um novo fármaco também deve considerar fatores intrínsecos do fármaco, tais como as propriedades físico-químicas (ANSEL *et al.*, 2013; BARREIRO; FRAGA, 2015; AULTON; TAYLOR, 2016).

Um dos princípios do delineamento de um novo composto é a garantia da integridade química durante a vida útil do medicamento e, geralmente, os aspectos químicos de uma formulação estão centrados na estabilidade química do fármaco (MEIRELES, 2014; AULTON; TAYLOR, 2016; BARREIRO; FRAGA, 2015).

A estabilidade química pode ser definida como a capacidade de um composto se manter íntegro estruturalmente, de forma que a concentração permaneça inalterada ou altere-se dentro dos limites quando submetida a determinadas condições em um intervalo de tempo (SILVA *et al.*, 2009; ROSA, 2018). Sendo, portanto, imprescindível para assegurar a qualidade, segurança e eficácia de um medicamento (MEIRELES, 2014; AULTON; TAYLOR, 2016).

Geralmente, as moléculas do fármaco não se submetem a degradação química espontaneamente, porém, apresentam em sua estrutura ligações que quando submetidas a determinadas condições (como calor, luz, oxigênio e umidade) podem ser desfeitas, tornando-se susceptíveis a degradação química, gerando produtos de degradação (metabólitos tóxicos), principalmente quando apresentam em sua

estrutura grupos funcionais que são notoriamente conhecidos pela maior susceptibilidade a transformações tais como grupamentos ésteres, grupos fotossensíveis, grupos que contenham enxofre e grupos propensos a sofrer reações de oxidação- redução (KERRIGAN, 2011; ROSA, 2018; AULTON ; TAYLOR, 2016). Em decorrência da degradação química de substâncias ativas podem ser gerados metabólitos tóxicos, podendo reduzir a concentração de substâncias, o que prejudicaria a eficácia farmacológica (YOSHIOKA, 2002; ROSA, 2018).

Existem diversos mecanismos que podem ocasionar a degradação química de substâncias químicas como por exemplo: desidratação, isomerização, oxidação-redução, racemização, eliminação, fotodegradação, interações com outras substâncias presente no meio, como é o caso de adjuvantes farmacotécnicos de formulações e principalmente por meio de reações de hidrólise (YOSHIOKA, 2002; AULTON; TAYLOR, 2016).

A hidrólise, um exemplo de mecanismo na qual o fármaco irá ser submetido na fase II do processo de biotransformação no interior do organismo e principal mecanismo de degradação química, por exemplo, corresponde ao processo de quebra da ligação da molécula do fármaco por meio de moléculas de água, presentes no meio (ROSA, 2018, AULTON; TAYLOR, 2016). A água é considerada um dos principais catalisadores em reações de degradação e muitos fármacos, que são instáveis nesse meio, requerem intervenções na formulação para assegurar a estabilidade e eficácia da forma farmacêutica (SILVA *et al*, 2009). A maior parte das reações de hidrólise envolve derivados de ácido carboxílicos, como por exemplo ésteres e amidas, que são grupamentos comumente encontrados em moléculas de fármacos (AULTON; TAYLOR, 2016). No entanto, para a avaliação sobre a instabilidade promovida por reações de hidrólise, deve-se considerar o pH do meio, visto que íons hidrogênio e hidroxila atuam como catalisadores do processo de degradação (ANSEL *et al.*, 2013; AULTON; TAYLOR, 2016).

Diante da vulnerabilidade estrutural de compostos frente a fatores como por exemplo alterações de pH, culminando na geração de produtos de degradação, os estudos de estabilidade, conforme preconizado na RE n° 1/2005, devem quantificar os produtos de degradação (impurezas que podem ser originadas por alterações

químicas em processos de fabricação, armazenamento ou devido a influência de fatores ambientais tais como luz, temperatura, umidade, pH, reações com excipientes ou embalagens, propriedades físico-químicas, entre outros), por meio de um método analítico eficiente, que siga o estabelecido pela legislação atual vigente, a RDC nº 166/2017 (BRASIL, 2005; BRASIL, 2017a).

Para a realização do estudo de estabilidade química, os compostos em análise foram submetidos a três diferentes soluções tampões que mimetizavam as condições fisiológicas (pH 7,4), estomacais (pH 1,2) e intestinais (pH 8,8), visando reproduzir as condições na qual um fármaco estaria sujeito ao longo do TGI, e foi-se avaliado as respostas com base em análises cromatográficas ao longo de um período de 24 horas (720 minutos).

A obtenção de respostas desfavoráveis no estudo revela a necessidade de modificações estruturais visando o aprimoramento da estrutura química e consequente formulação, com o intuito de aumentar a estabilidade, fornecendo subsídios para a tomada de decisão (MEIRELES, 2014; OLIVEIRA, 2021). Visto que uma vez detectado que em determinadas condições, o comportamento de um composto é instável, se inicia uma investigação para a identificação da possível causa da instabilidade (MEIRELES, 2014). A instabilidade está principalmente relacionada a aspectos estruturais do composto (ANSEL *et al.*, 2013; MEIRELES, 2014; BARREIRO; FRAGA, 2015; AULTON; TAYLOR, 2016). Como foi dito anteriormente, a presença de determinados grupamentos químicos podem favorecer a susceptibilidade a mecanismos de degradação como a hidrólise. A instabilidade de um composto pode, inclusive, ser argumento para descontinuidade dos estudos com uma determinada molécula.

Diante disso, existem algumas estratégias como adição de grupos funcionais estáveis em sítios vulneráveis da estrutura, como por exemplo o bloqueio de oxidação de posições específicas em anéis aromáticos por meio da introdução de grupos fortemente retiradores de elétrons (tais como $-CF_3$, SO_2NH_2 e SO_3^-), adição de grupamentos N-t-butil para prevenção de N-desalquilação; troca de ligação éster lábil por um grupo amida; blindagem eletrônica do NH_2 ; remoção ou substituição de grupos susceptíveis a reações de degradação; restrição por impedimento estérico para

proteção contra grupos susceptíveis a sofrer hidrólise e também contra ataques nucleofílicos ou enzimáticos, entre outros (PEREIRA, 2007; SILVEIRA, 2021).

A quantificação dos compostos se deu através da construção de curvas analíticas, conforme descritas nos itens 5.2.2., que permitiram a construção dos gráficos de estabilidades, que relaciona a porcentagem remanescentes dos controles de qualidade avaliados em função do tempo, que serão apresentados a seguir.

Para a avaliação estatísticas dos resultados foi realizado o teste ANOVA (paramétrico para medidas repetidas) com pós teste de Tukey com nível de significância igual a 0,05.

O teste de Tukey ou DHS (Diferença Honestamente Significativa) foi utilizado como método complementar à Anova pois o valor de F obtido foi significativo. O teste de Tukey consiste em comparar todos os possíveis pares de médias e se baseia na diferença mínima significativa (DMS), com base nos percentis do grupo e também nos resultados do quadrado médio dos resíduos da Anova e o tamanho amostral, de modo a identificar quais as médias que quando comparadas se diferem significativamente entre si (PARMA, 2017; OLIVEIRA ; FARIA, 2019; OLIVEIRA, 2013).

5.3.1. Estabilidade em pH 1,2

O ensaio em pH 1,2 (Tampão Clark-Lubs) visa mimetizar as condições nas quais uma substância estaria submetida em um ambiente estomacal. Como a via de administração proposta para os compostos em estudo é a via oral, instabilidades observadas frente a esse pH podem ser desfavoráveis para a escolha da via de administração proposta, visto que um fármaco que é instável em pH estomacal é degradado rapidamente, antes mesmo do tempo necessário para assegurar sua absorção gerando respostas terapêuticas ineficazes. Dessa forma, os resultados obtidos a partir dos resultados do estudo de estabilidade em pH 1,2 são cruciais para identificar a necessidade de realização de modificações estruturais nas moléculas em análise.

Os resultados obtidos para o estudo de estabilidade em pH 1,2 estão demonstrados através da figura 8 e tabela 12.

Tabela 12. Estabilidade dos compostos LINS1003, LINS1015, 5B, PPA e LEV em tampão Clark-Lubs (pH 1,2).

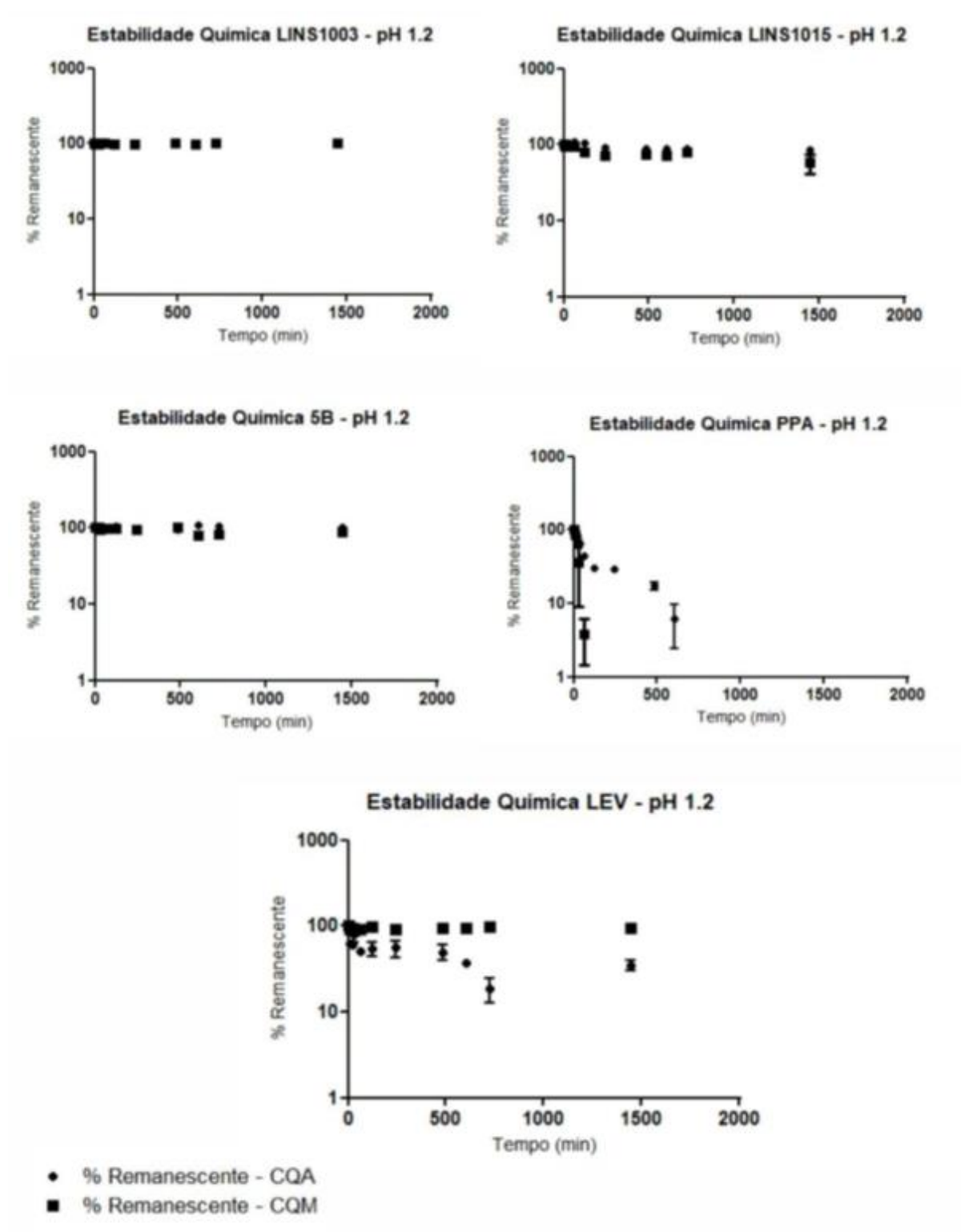
Estabilidade em pH 1,2- CQA										
	LINS1003		LINS1015		5B		PPA		LEV	
Tempos	Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP
0 min	100,00	0,00	100,00	0,00	100,00	0,00	100,00	0,00	100,00	0,00
10 min	97,38	3,40	103,94	4,09	103,33	3,54	97,42	1,07	61,56	3,08
20 min	97,28	3,69	102,91	5,64	98,68	3,63	80,88*	8,94	59,64*	6,45
30 min	98,88	4,45	104,94	2,92	98,93	6,77	65,24	0,99	78,81	19,17
60 min	97,00	1,15	107,32	0,61	99,02	1,52	44,82	4,55	50,17	1,87
2h	97,41	3,30	104,18	3,19	104,05	5,82	29,87	1,05	54,34	14,32
4h	100,53	1,72	90,17	7,71	96,11	6,18	29,34	3,54	55,54	17,17
8h	100,66	3,01	88,02	6,24	94,60	4,54	17,11	2,79	49,43	14,19
10h	97,53	2,39	86,72	7,61	108,19	4,25	5,54	5,91	36,98	1,93
12h	98,56	2,28	87,31	8,13	105,40	8,53	0,24	2,01	18,82	8,67
24h	101,45	2,44	7,19	7,19	99,65	4,22	3,84	0,55	35,08	6,41

Estabilidade em pH 1,2- CQM										
	LINS1003		LINS1015		5B		PPA		LEV	
Tempos	Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP
0 min	100,00	0,00	100,00	0,00	100,00	0,00	100,00	0,00	100,00	0,00
10 min	97,74	3,27	95,68	5,71	101,81	2,91	84,57	6,29	92,28	6,28
20 min	100,19	2,17	93,33	1,27	99,53	2,25	65,55	8,65	94,56	4,60
30 min	97,65	4,96	94,13	3,43	92,97	7,73	36,38*	38,52	87,88	12,82
60 min	99,58	2,06	93,10	2,85	98,85	5,90	0,25	8,01	92,00	6,14
2h	98,61	4,81	80,59	9,84	99,15	3,95	3,05	1,60	96,74	4,37
4h	96,55	0,14	71,17	5,86	95,90	3,56	6,71	5,14	91,64	5,85
8h	100,24	2,85	74,96	3,44	102,17	2,90	3,06	4,02	93,60	9,01
10h	98,56	0,39	72,07	4,29	78,96*	2,38	12,73	3,62	95,70	8,36
12h	100,38	4,38	78,35	0,87	81,73	1,22	1,96	3,50	97,83	8,12
24h	99,85	4,91	57,80*	23,53	87,36	6,45	9,37	4,74	95,71	8,48

Média= porcentual remanescente (%)

(*) = Diferença estatística (ANOVA seguido de Tukey)

Figura 7. Estabilidade dos compostos LINS1003, LINS1015, 5B, PPA e LEV em tampão Clark-Lubs (pH 1,2).



Observando os resultados obtidos para o estudo de estabilidade com CQA, os compostos que apresentaram diferença estatística (destacados em vermelho, com um símbolo asterisco ao lado) foram: PPA e LEV em 20 min; e para CQM: LINS1015 em 24h, 5B em 10h e PPA 30min. Pode-se concluir, portanto, que os compostos PPA e LEV apresentaram instabilidade em pH ácido em um intervalo de tempo curto.

Tanto LEV quanto PPA são compostos que apresentam em sua estrutura grupamento amida livre, que são grupamentos conhecidamente susceptíveis a reações de hidrólise, nas quais o pH atua como importante catalisador (CONSIGLIERI, 2015). O que pode ser um indicativo da razão da instabilidade em pH ácido.

A instabilidade em pH ácido estomacal nesse caso revela a possibilidade de ocorrer precipitação e/ou degradação desses compostos, o que significa que serão necessárias modificações estruturais, a fim de reduzir a susceptibilidade dos compostos, em caso de manutenção da via de administração oral.

Já em relação aos compostos LINS1015 e 5B, as diferenças estatísticas apresentadas não significam grandes preocupações devido ao tempo de corrida na qual ocorreram, visto que o processo de esvaziamento gástrico ocorre em torno de 4h (ou seja, 4h é o tempo médio na qual o fármaco permaneceria no estômago) (FREIRE, 2006), e as instabilidade observadas ocorreram em 24h e 10h, para LINS1015 e 5B, respectivamente, o que provavelmente não apresentaria impacto significativo na prática, visto que os compostos teoricamente seriam absorvidos antes de serem degradados.

5.4.2. Estabilidade em pH 7,4

A determinação da estabilidade em pH 7,4 (tampão Hank's) tinha como objetivo reproduzir as condições plasmáticas do organismo.

Os resultados do estudo de estabilidade em pH 7,4 estão apresentados a seguir na figura 8 e tabela 13.

Tabela 13. Estabilidade dos compostos LINS1003, LINS1015, 5B, PPA e LEV em tampão Hank's (pH 7,4).

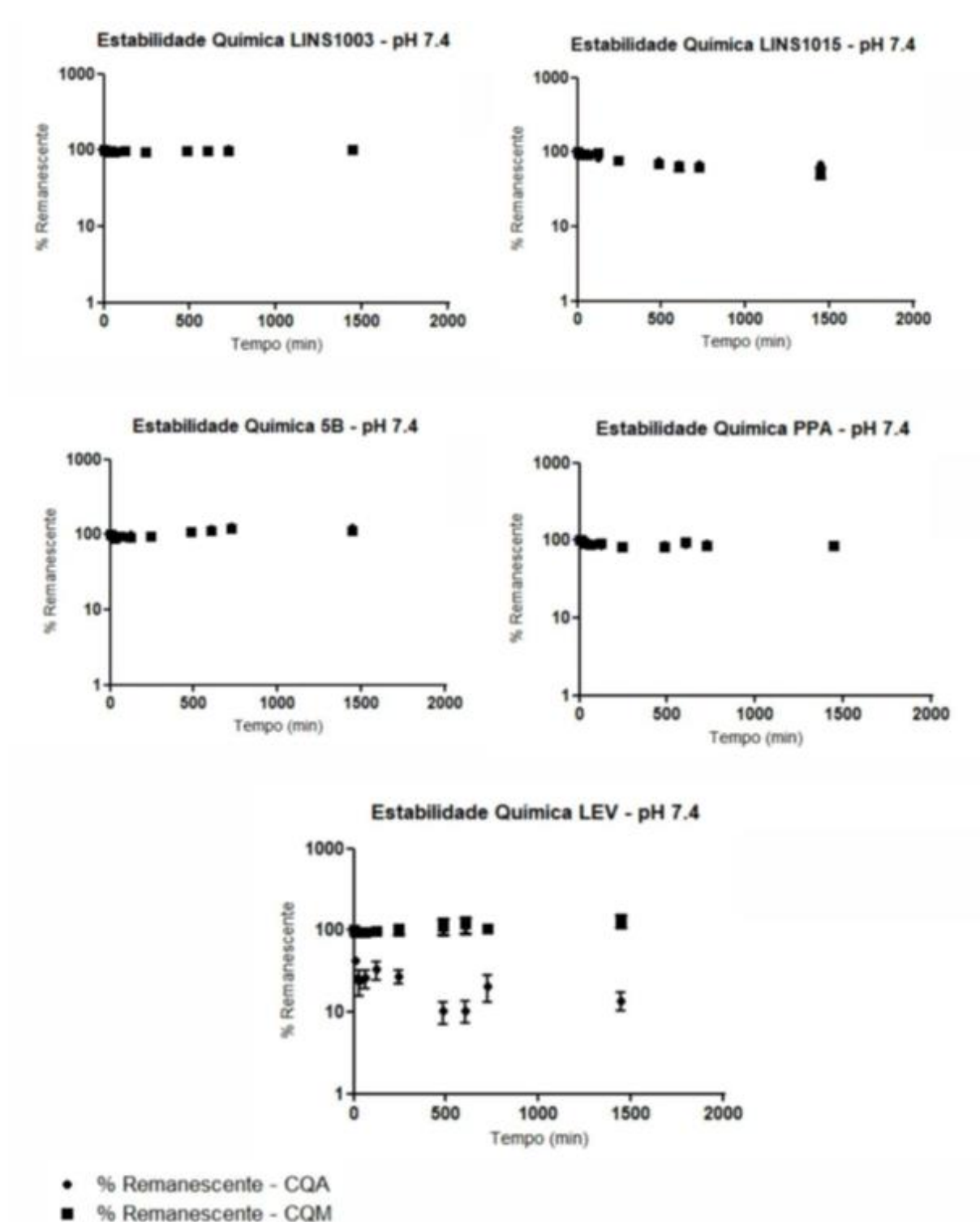
Estabilidade em pH 7,4- CQA										
Tempos	LINS1003		LINS1015		5B		PPA		LEV	
	Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP
0 min	100,00	0,00	100,00	0,00	100,00	0,00	100,00	0,00	100,00	0,00
10 min	97,91	1,03	101,61	6,06	97,19	2,19	90,39	2,51	43,03*	1,39
20 min	94,72	3,34	100,08	1,59	97,24	4,39	89,17*	1,48	25,98	3,20
30 min	99,13	3,32	98,19	1,38	99,85	0,75	88,98	0,59	23,96	11,75
60 min	99,61	2,01	98,20	1,47	92,38	3,97	84,64	5,36	25,96	9,40
2h	96,11	5,70	81,21*	1,08	101,98	4,90	83,87	4,68	33,02	11,61
4h	98,22	6,82	80,62	2,40	99,35	7,94	85,01	4,27	27,40	7,50
8h	101,69	2,34	75,58	3,84	103,33	3,37	88,71	6,67	10,21	4,31
10h	99,27	5,07	70,29	1,60	118,22	17,75	87,86	5,78	10,49	4,32
12h	104,60	0,65	68,95	2,19	129,43*	1,12	92,70	0,98	20,57	10,46
24h	100,25	3,51	68,45	3,61	125,74	6,47	86,61	2,92	13,76	4,74

Estabilidade em pH 7,4- CQM										
Tempos	LINS1003		LINS1015		5B		PPA		LEV	
	Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP
0 min	100,00	0,00	100,00	0,00	100,00	0,00	100,00	0,00	100,00	0,00
10 min	96,46	1,03	93,16	9,40	96,45	2,26	101,18	2,37	94,76	3,99
20 min	96,48	3,33	93,75	11,24	93,99	8,08	95,51	11,16	94,84	2,45
30 min	95,62	2,20	90,43	14,45	88,33	4,52	90,38	14,72	94,83	3,28
60 min	96,05	1,63	91,40	12,12	94,28	3,06	89,51	8,97	93,36	5,44
2h	96,75	1,94	96,86	2,59	92,23	8,72	90,25	3,63	96,48	6,36
4h	96,04	2,17	76,95	11,91	94,77	8,56	83,09	2,44	103,56	20,39
8h	96,78	2,05	68,30*	11,62	107,55	1,23	82,04	1,49	112,27	33,89
10h	96,88	1,62	64,92	12,64	111,32	5,05	94,47	1,45	118,59	37,80
12h	97,29	0,44	62,22	4,05	118,66	7,88	84,20	4,66	104,39	17,63
24h	101,00	2,13	53,39	12,58	114,12	13,99	85,25	5,76	131,08	33,68

Média= porcentual remanescente (%)

(*) = Diferença estatística (ANOVA seguido de Tukey)

Figura 8. Estabilidade dos compostos LINS1003, LINS1015, 5B, PPA e LEV em tampão Hank's (pH 7,4).



A partir dos resultados obtidos pode-se observar que houveram diferenças estatísticas em relação a concentração CQA para os compostos: LINS1015 em 2h,

para 5B em 12h, PPA em 20 min e também LEV em 10 min; em relação a concentração CQM, apenas o composto LINS1015 no tempo de 4h de experimento.

A estabilidade em um pH correspondente ao pH sanguíneo é um fator importante para fatores farmacocinéticos e também farmacodinâmicos, estando diretamente relacionada a resposta farmacológica dado que o fármaco depois de absorvido é distribuído pelo sistema circulatório até seu órgão-alvo, assim, é importante que o fármaco permaneça íntegro pelo tempo necessário para que consiga atingir seu sítio ação e então desempenhar sua ação farmacológica (GOLAN *et al*, 2014). Em casos de instabilidade plasmática, a efetividade é comprometida, assim como a segurança, visto que a degradação dos compostos em sangue culmina na geração de entidades desconhecidas solubilizadas na corrente sanguínea, em circulação.

No entanto, para concluir essa parte do estudo são necessários estudos complementares, tais como o estudo de precipitação de proteínas plasmáticas, realizado pelo Oliveira, 2021 (52).

5.4.3. Estabilidade em pH 8,8

A determinação da estabilidade em pH 8,8 (tampão Tris- HCl) tinha como objetivo simular as condições ambientais encontradas no intestino delgado.

Os resultados do estudo de estabilidade em pH 7,4 estão apresentados a seguir na figura 9 e tabela 16.

Tabela 14. Estabilidade dos compostos LINS1003, LINS1015, 5B, PPA e LEV em tampão Tris-HCl (pH 8,8).

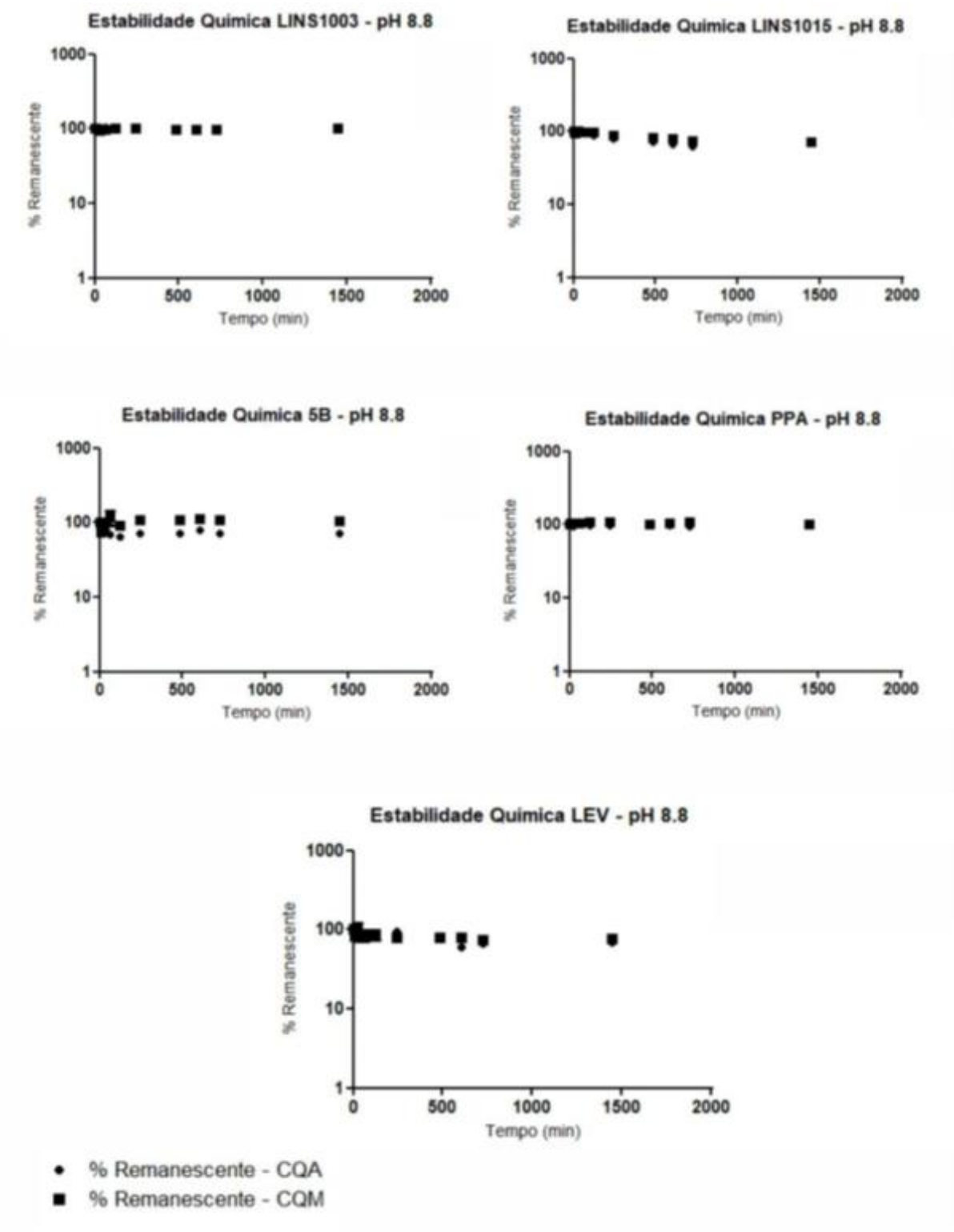
Estabilidade em pH 8,8- CQA										
	LINS1003		LINS1015		5B		PPA		LEV	
Tempos	Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP
0 min	100,00	0,00	100,00	0,00	100,00	0,00	100,00	0,00	100,00	0,00
10 min	101,83	1,70	98,19	5,47	94,48	1,18	96,45	1,19	101,21	3,30
20 min	104,30	7,99	104,42	10,61	87,01	7,52	94,58	0,75	96,11	2,45
30 min	103,94	1,87	103,26	8,98	90,74	6,65	98,53	2,06	96,92	8,69
60 min	106,12	6,04	94,42	4,8	68,26*	5,04	102,39	1,09	91,26	3,42
2h	104,15	2,70	86,77	7,49	64,25	1,23	98,85	4,04	86,49	1,26
4h	102,74	2,97	79,33	9,79	72,56	8,06	98,77	2,13	95,20	1,91
8h	102,04	3,22	70,84*	8,01	70,59	7,03	97,80	1,51	81,54	11,63
10h	101,79	2,68	67,29	3,84	79,50	9,78	96,34	0,57	59,80*	6,58
12h	102,07	2,53	62,27	3,16	72,29	9,05	95,56	2,31	66,23	0,60
24h	104,14	2,19	71,99	11,95	70,50	3,45	99,69	2,27	69,19	5,02

Estabilidade em pH 8,8- CQM										
	LINS1003		LINS1015		5B		PPA		LEV	
Tempos	Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP
0 min	100,00	0,00	100,00	0,00	100,00	0,00	100,00	0,00	100,00	0,00
10 min	97,47	0,60	95,36	1,09	72,89	9,39	103,99	4,58	80,85	12,83
20 min	96,24	4,04	100,49	0,73	79,53	10,41	105,71	4,73	102,42	26,16
30 min	94,32	3,93	102,49	1,87	85,15	0,33	102,97	3,84	85,10	20,25
60 min	99,34	1,18	98,21	1,09	116,62	35,66	104,56	3,02	84,92	19,82
2h	100,41	6,29	99,07	8,00	92,55	8,42	106,84	2,34	86,88	16,41
4h	100,65	2,50	89,58	4,61	109,52	14,24	107,00	1,89	79,99	4,07
8h	98,39	2,12	83,47*	1,77	109,30	13,54	102,13	6,68	79,74	3,42
10h	98,72	2,46	78,88	2,35	113,86	13,49	103,26	1,46	78,53	2,39
12h	99,04	2,14	73,65	5,89	108,04	12,28	103,53	3,88	74,47	6,32
24h	101,06	1,18	70,67	4,69	103,61	4,39	100,73	4,43	77,58	3,50

Média= porcentual remanescente (%)

(*) = Diferença estatística (ANOVA seguido de Tukey)

Figura 9. Estabilidade dos compostos LINS1003, LINS1015, 5B, PPA e LEV em tampão Tris-HCl (pH 8,8).



O intestino delgado, devido a sua ampla área de superfície e membranas mais permeáveis que as membranas estomacais, é o local na qual a maioria dos fármacos são absorvidos (LE, 2019). Formado por três porções, sendo elas duodeno, jejuno e íleo e à medida que se aproxima da porção mais distal do íleo, o pH vai se tornando progressivamente mais alcalino até atingir os valores próximos a 8.

Diversos fatores influenciam o processo de absorção intestinal, como por exemplo a flora bacteriana gastrointestinal, motilidade intestinal, fluxo sanguíneo local e também o tempo de trânsito intestinal (LE, 2019). O tempo de trânsito intestinal é relativamente constante, e corresponde a aproximadamente 3 ± 1 horas (FREIRE, 2006).

A partir do tempo de trânsito intestinal é possível analisar o tempo na qual os analitos podem ser considerados como seguros para prosseguir para as demais fases do processo de desenvolvimento de fármacos.

Analisando os compostos, pôde-se verificar que os compostos que apresentaram diferença estatística significativa para CQA foram LINS1015 em 8h de experimento, 5B em 60 min e LEV em 10h; e para CQM, apenas para LINS1015 em 8h.

Dentre os compostos que apresentaram diferenças estatísticas significativas, ou seja, a média dos valores obtidos durante o estudo são variáveis, o que indica instabilidade, o mais preocupante é o composto 5B que apresentou instabilidade logo aos 60 min iniciais. A instabilidade observada provavelmente está vinculada a presença de um grupamento amida, que na presença de pH básico (pH= 8,8) sofre um processo de hidrólise (SOLOMONS *et al*, 2018).

Os demais compostos apresentaram instabilidade em um período superior de tempo ao tempo de trânsito intestinal, o que permite concluir que no momento que permaneceriam no intestino, estariam íntegros e estáveis, de forma que a sua atividade terapêutica não seria comprometida. Assim, a degradação nesses casos não é considerada um fator crítico.

Para a absorção intestinal é muito importante que os compostos permaneçam por tempo suficiente (pelo menos cerca de 3h que corresponde ao tempo de trânsito intestinal) para garantir a máxima absorção.

Deve se considerar também que para que o composto seja absorvido no intestino delgado, ele deve ser resistente, se mantendo estável mediante ao pH ácido do estômago.

5.5. Estabilidade *ex vivo*

O estudo de estabilidade *ex vivo*, etapa crucial do processo de delineamento de um novo fármaco, consiste em uma avaliação da estabilidade de compostos quando submetidos em materiais biológicos, como por exemplo plasma sanguíneo, em um ambiente externo ao modelo animal (FRANCHIN, 2019).

Independentemente da via de administração utilizada, os fármacos irão ser distribuídos e transportados até seu local de atuação através do sistema de circulação sanguíneo, na qual são encontradas diversas enzimas hidrolíticas no plasma, tais como as enzimas colinesterase, aldolase, lipase e fosfatase que podem ao entrarem em contato com os compostos podem ocasionar a degradação desses, caracterizando assim um perfil farmacocinético indesejável (FRANCHIN, 2019; KERNS, 2016; DI, 2005).

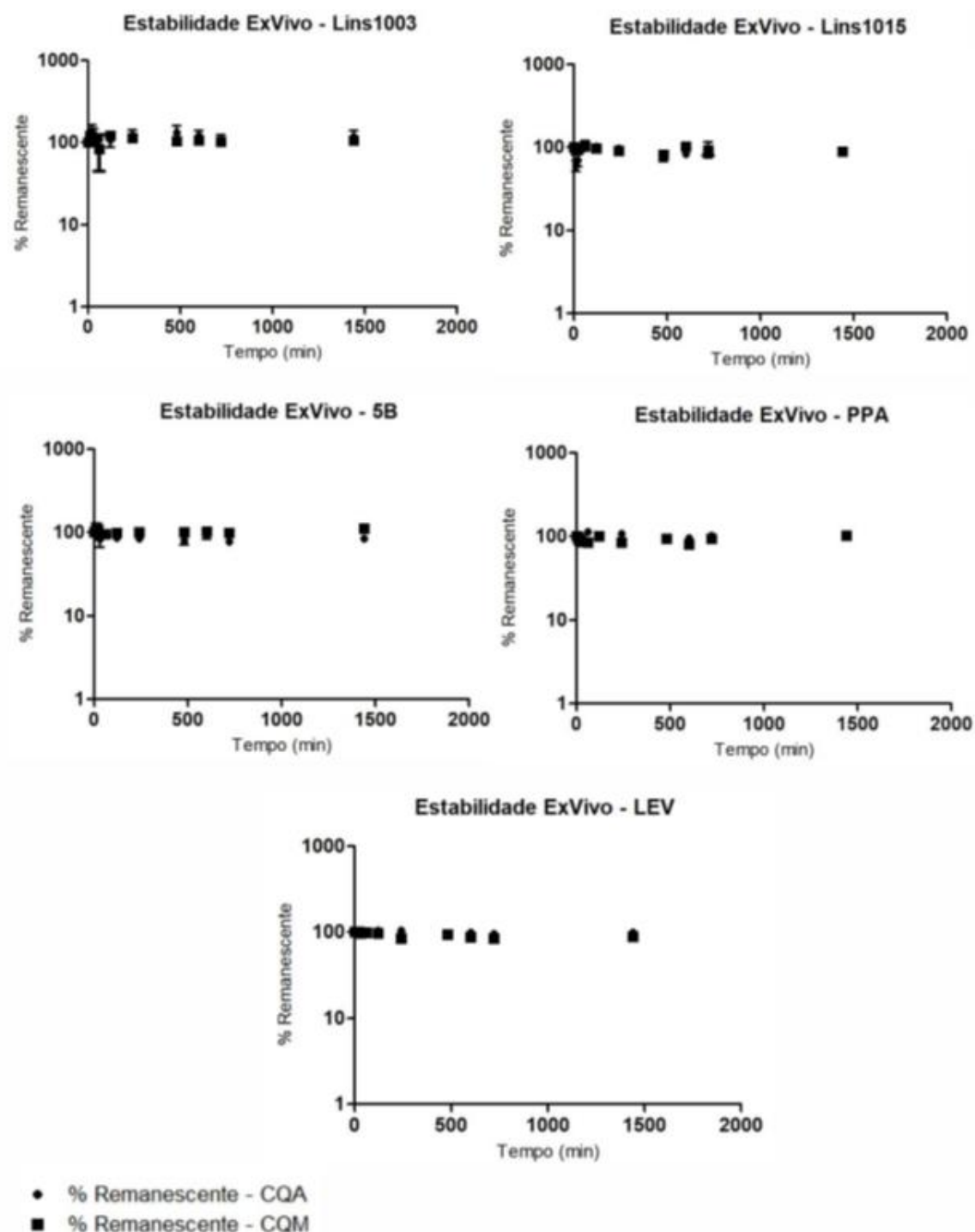
Fármacos que são instáveis em plasma tendem a apresentar depuração rápida, ou seja são eliminados muito rapidamente, não permanecendo no organismo por tempo suficiente para exercer algum efeito terapêutico, além de uma meia-vida curta e desempenho farmacocinético não linear, o que impossibilita a obtenção de uma resposta que seja previsível, desobedecendo assim um dos princípios do delineamento de fármacos (DI, 2005).

Para a quantificação dos compostos, foram construídas curvas bioanalíticas conforme descrito anteriormente nos itens 5.2 e 5.3, de forma a obter os gráficos de estabilidade, conforme pode ser verificado na figura 10 a seguir.

As concentrações utilizadas para a construção das curvas bioanalíticas foram inferiores a 100 µg/mL de modo a evitar a saturação enzimática, pois segundo um

estudo realizado em 1998 por Nomeir e colaboradores, foi observado uma correlação direta entre concentrações de 100 µg/mL e saturação das enzimas enzimáticas (FRANCHIN, 2019).

Figura 10. Estabilidade dos compostos LINS1003, LINS1015, 5B, PPA e LEV em plasma (n=3 ± DP).



Para a avaliação estatística dos resultados foi realizado o teste ANOVA (paramétrico para medidas repetidas) com pós teste de Tukey com nível de significância igual a 0,05. E os resultados obtidos estão demonstrados na tabela 15.

Tabela 15. Estabilidade dos compostos LINS1003, LINS1015, 5B, PPA e LEV em plasma.

Estabilidade em plasma- CQA										
	LINS1003		LINS1015		5B		PPA		LEV	
Tempos	Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP
0 min	100,00	0,00	100,00	0,00	100,00	0,00	100,00	0,00	100,00	0,00
10 min	104,89	13,91	60,17	15,81	103,43	9,66	101,27	13,06	101,55	4,33
20 min	134,11	48,96	70,24	20,13	93,41	20,98	104,44	5,67	101,74	4,38
30 min	128,23	31,66	93,58	10,06	83,38	29,75	94,30	4,11	94,77	1,67
60 min	109,11	14,56	105,95	22,35	95,15	1,31	114,12	9,14	96,94	3,47
2h	109,01	35,80	102,25	5,25	85,84	6,94	97,96	11,89	104,39	6,21
4h	121,62	37,13	97,71	16,73	84,52	5,83	107,41	4,75	105,01	8,83
8h	131,93	49,69	79,50	20,13	80,66	15,37	92,82	7,69	92,46	0,54
10h	121,08	31,27	83,51	13,94	93,71	17,03	96,59	12,04	98,92	8,91
12h	108,68	26,53	95,42	34,08	77,76	6,13	101,83	11,84	96,56	5,76
24h	118,21	36,41	88,79	5,17	84,41	8,58	104,79	12,40	99,39	9,56

Estabilidade em plasma- CQM										
	LINS1003		LINS1015		5B		PPA		LEV	
Tempos	Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP
0 min	100,00	0,00	100,00	0,00	100,00	0,00	100,00	0,00	100,00	0,00
10 min	122,89	13,41	92,40	1,36	115,76	11,59	91,52	7,40	100,18	5,21
20 min	108,61	19,14	96,01	12,03	109,65	4,54	93,03	11,23	100,85	4,35
30 min	103,57	7,33	99,30	4,84	96,48	4,67	85,67	3,26	98,10	14,32
60 min	83,99	68,02	102,42	4,72	95,43	8,09	85,26	11,99	99,40	6,96
2h	121,42	8,10	97,36	5,42	98,60	4,15	100,86	4,00	97,07	11,55
4h	113,97	9,82	91,54	5,52	101,63	10,21	84,75	7,38	84,65	1,64
8h	104,16	6,36	82,22	6,63	101,48	9,00	93,39	11,57	93,96	9,98
10h	106,86	17,45	103,03	13,43	102,18	5,70	81,21	9,86	88,21	9,34
12h	102,25	15,37	91,99	20,43	98,99	13,72	93,48	11,68	94,37	1,78
24h	106,08	14,53	88,88	16,34	112,09	0,49	102,05	13,21	88,77	7,88

Média= porcentual remanescente (%)

(*) = Diferença estatística (ANOVA seguido de Tukey)

Analisando os resultados obtidos, pode-se observar que não houveram diferenças estatísticas significativas durante todo o tempo de incubação (24h) para nenhum dos compostos analisados, o que indica que a degradação em plasma não é um fator crítico ao desenvolvimento, no caso dos compostos em análise no presente estudo.

6. Conclusão

No contexto analítico, os estudos de estabilidade de medicamentos, química e *ex vivo*, fornecem evidências a respeito da qualidade de um composto, quando submetido a diversos fatores, possibilitando melhor entendimento dos mecanismos de degradação, determinação de parâmetros como o tempo máximo de armazenamento de uma substância, e também confere informações de suma importância no processo de delineamento de novos fármacos e formulações, como por exemplo as incompatibilidades fármaco-excipientes da formulação e a via de administração mais adequada (ROSA, 2018; SILVA, *et al*, 2009; MEIRELES, 2014). Sendo, portanto, uma etapa imprescindível para a garantia da qualidade, segurança e eficácia de um medicamento, visto que um dos princípios do delineamento de um fármaco é o de assegurar que o fármaco permaneça quimicamente integral durante o período correspondente a vida útil (MEIRELES, 2014; AULTON, 2005).

Os métodos analítico e bioanalítico desenvolvidos e validados através de HPLC- massas no presente projeto, para a quantificação de produtos de degradação originados no período de avaliação da estabilidade dos compostos forneceram eficácia e segurança, de modo a permitir a quantificação dos compostos com precisão e exatidão nos ensaios físico-químicos e também biológicos que serão realizados ao longo do processo de desenvolvimento dos compostos candidatos a fármacos.

A partir dos resultados obtidos na determinação da estabilidade química dos compostos em estudos, obteve-se que os compostos em pH 1,2 (correspondente ao pH estomacal), tanto nas concentrações CQA e CQM, os compostos LEV e PPA apresentaram instabilidade em um curto período de tempo. Em pH plasmático, alguns compostos apresentaram instabilidade, no entanto, são necessários estudos complementares, tais como o estudo de ligação a proteínas plasmáticas. Em pH 8,8 (que mimetiza as condições intestinais), o composto LEV demonstrou ser instável logo nos primeiros 60 minutos. E em relação aos estudos de estabilidade em plasma,

todos os compostos se demonstraram estáveis, sem apresentar diferenças estatísticas significativas.

Em síntese, os estudos de estabilidade química e plasmática forneceram resultados satisfatórios para todos os compostos, e evidenciaram que as instabilidades das entidades mediante pHs não influenciarão em processos farmacocinéticos e toxicológicos *in vivo*.

Sendo assim, os compostos estão aptos a prosseguir para as demais fases do processo de desenvolvimento de fármacos, passando pela análise de técnicas computacionais de modelagem e simulação (farmacometria), que consiste em um conjunto de modelos matemáticos cujo objetivo é a compreensão de propriedades farmacocinéticas e farmacodinâmicas, essenciais para o prosseguimento do estudo para as fases pré-clínica e clínica.

7. Referências Bibliográficas

1. AMARAL, T.D.; CORREA, L.R.; GOMES, V.F.; MOMESSO, L.S. Verificação da influência do pH e do pKa na ionização do AAS e do paracetamol. UNIFIO, 2017. Disponível em: https://cic.unifio.edu.br/anaisCIC/anais2017/pdf/07_26.pdf. Acesso em 22 de out. 2021.
2. ANSEL, H.C.; POPOVICH, N.G.; ALLEN Jr., L.V. **Formas farmacêuticas e sistemas de liberação de fármacos**. 9. ed. Porto Alegre: artmed Ed., 2013.
3. AULTON, ME. **Pré-formulação farmacêutica: delineamento de formas farmacêuticas**. 2 ed. Porto Alegre: Artmed; 2005. p. 67.
4. AULTON, M.E.; TAYLOR, K.M.G. **Delineamento de formas farmacêuticas**. 4ªed.- Rio de Janeiro, RJ: Elsevier, 2016.p.742-800.
5. AMARANTE Jr., O. P. de; CALDAS, E. P. A.; BRITO, N. M.; SANTOS, T. C. R. dos; VALE, M. L. B. F. **Validação de métodos analíticos: uma breve revisão**. Cad. Pesq., v. 12, p. 116-131, 2001.
6. BARREIRO, E. J.; FRAGA, C. A. M. **Química medicinal : as bases moleculares da ação dos fármacos [recurso eletrônico]**. – 3. ed. – Porto Alegre : Artmed, 2015. P.43-99.

7. BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária.. **Resolução- RE nº1**, de 29 de julho de 2005. Disponível em: https://bvsmms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2005/res0001_29_07_2005.html. Acesso em: 03 mar. 2021.
8. BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução de Diretoria Colegiada- RDC nº 27**, de 17 de maio de 2012. Dispõe sobre os requisitos mínimos para a validação de métodos bioanalíticos empregados em estudos com fins de registro e pós-registro de medicamentos. Disponível em: https://bvsmms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2012/rdc0027_17_05_2012.html. Acesso em: 30 mar.2021.
9. BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução de Diretoria Colegiada- RDC nº 166**, de 24 de julho de 2017a. Dispõe sobre a validação de métodos analíticos e dá outras providências. Disponível em: https://www.in.gov.br/materia/-/asset_publisher/Kujrw0TZC2Mb/content/id/19194581/do1-2017-07-25-resolucao-rdc-n-166-de-24-de-julho-de-2017-19194412. Acesso em: 30 mar. 2017.
10. BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Guia para tratamento estatístico da validação analítica**, nº. 10, v1, de 30 de agosto de 2017b. Disponível em: <https://www.farmaceuticas.com.br/wp-content/uploads/2017/09/Guia-10-v1-Tratamento-estatistico-validacao-analitica.pdf>. Acesso em: 30 mar. 2021.
11. BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução de Diretoria Colegiada- RDC nº318**, de 06 de novembro de 2018, que estabelece os critérios para a realização de Estudos de Estabilidade de insumos farmacêuticos ativos e medicamentos, exceto biológicos, e dá outras providências. Disponível em: <https://www.in.gov.br/en/web/dou/-/resolucao-rdc-n-318-de-6-de-novembro-de-2019-226513805>. Acesso em 03 mar. 2021.
12. BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Guia nº28/2019- Versão 1**. Guia de Estudos de Estabilidade. Disponível em: <http://antigo.anvisa.gov.br/documents/10181/3898778/cp-guia-28-estabilidade-contribui%C3%A7%C3%A3o->

sindusfarma+%281%29.pdf/b5706d87-ad82-4936-87bb-dc9f8fd8f924. Acesso em: 02 jan. 2021.

13. BRITO, Natilene Mesquista *et al.*; Validação de métodos analíticos: estratégia e discussão. **Rev. Pesticidas: R.Ecotoxicol. e Meio Ambiente**, Curitiba, v. 13, p. 129-146, jan./dez. 2003.
14. BUENO, L.M. **Desenvolvimento do método analítico para avaliação de impurezas orgânicas de Ticagrelor**. 2016. Orientadora: Cássia Virgínia Garcia. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas)- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2016.
15. CALIXTO, J.B.; SIQUEIRA JR, J.M. Desenvolvimento de medicamentos no Brasil: Desafios. **Gaz. méd. Bahia** 2008;78 (Suplemento 1):98-106.
16. CONSIGLIERI, V. O. Estabilidade de medicamentos. 56 slides. Disciplina de farmacotécnica- Universidade de São Paulo, 2015. Disponível em: https://edisciplinas.usp.br/pluginfile.php/3015022/mod_resource/content/1/ESTABILIDADE%20DE%20MEDICMANETOS.pdf. Acesso em: 12 de dez. 2020.
17. CORDEIRO, N.; PINTO, R. M.C. Consumption of brain stimulants in health students in Ponta Grossa- PR city, 2017. **Visão Acadêmica**, Curitiba, v.18 n.2, Abr. - Jun./2017 - ISSN 1518-8361.
18. CORRÊA, M. F.; FERNANDES, J. P. dos S. Histamine H4 receptor ligands: future applications and state of art. **Chemical biology ; drug design**, v. 85, n. 4, p. 461-480, 2015.
19. CORRÊA, Michelle F. *et al.* Pharmacological Characterization of 5-Substituted 1-[(2, 3-dihydro-1-benzofuran-2-yl) methyl] piperazines: Novel Antagonists for the Histamine H3 and H4 Receptors with Anti-inflammatory Potential. **Frontiers in Pharmacology**, v. 8, p. 825, 2017.
20. CORREA, Michelle F.; DOS SANTOS, Fernandes; PAULO, Joao. QSAR Modeling of Histamine H3R Antagonists/inverse Agonists as Future Drugs for Neurodegenerative Diseases. **Current neuropharmacology**, v. 16, n. 6, p. 749-757, 2018. (A)
21. CORRÊA, Michelle Fidelis *et al.* 1-[(2, 3-Dihydro-1-benzofuran-2-yl) methyl] piperazines as novel anti-inflammatory compounds: Synthesis and evaluation on H3R/H4R. **Chemical biology ; drug design**, v. 90, n. 2, p. 317-322, 2017. (B)

22. CORRÊA, Michelle Fidelis *et al.* Pharmacological and SAR analysis of the LINS 01 compounds at the human histamine H1, H2, and H3 receptors. **Chemical Biology ; Drug Design**, v. 93, n. 1, p. 89-95, 2019.
23. DI, Li *et al.* **Development and application of high throughput plasma stability assay for drug discovery**. International journal of pharmaceutics, v. 297, n. 1-2, p. 110-119, 2005.
24. EDDY, Clare M.; RICKARDS, Hugh E.; CAVANNA, A.E. The cognitive impact of antiepileptic drugs. **Ther Adv Neurol Disord**. v. 4, p. 385-407, 2011.
25. FARIA, Shirley L. *et al.* **Avaliação metrológica da curva analítica para determinação do teor de enxofre em baixíssimas concentrações em óleo diesel S-10**. **Quim. Nova**, Vol. 38, No. 6, 852-858, 2015. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.5935/0100-4042.20150071>. Acesso em 30 de mar. 2021.
26. FERNANDES, D.N.M **Proposta de guia para validação de métodos bioanalíticos por ensaios de ligação de ligantes para análise de biossimilares**. 2019. Orientador: Geanne Matos de Andrade. Dissertação (Mestrado em Farmacologia Clínica)- Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2019.
27. Food and Drug Administration (FDA). Bioanalytical Method Validation. Guidance for Industry, 2018. Disponível em: <https://www.fda.gov/files/drugs/published/Bioanalytical-Method-Validation-Guidance-for-Industry.pdf>. Acesso em 11 de nov. 2020.
28. FRANCHIN, T. B. **Estudo de ADME de compostos derivados do ácido pirazinóico com atividade antimicobacteriana**. 2019. Orientadora: Rosângela Gonçalves Peccinini. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Araraquara, 2019.
29. FREIRE, Ana Cristina *et al.* Liberação específica de fármacos para administração no cólon por via oral. I- O cólon como local de liberação de fármacos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas/ Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**. vol. 42, n. 3, jul./set., 2006.
30. FROESTL, Wolfgang; MUHS, Andreas; PFEIFER, Andrea. Cognitive enhancers (nootropics). Part 1: drugs interacting with receptors. **Journal of Alzheimer's disease**, v. 32, n. 4, p. 793-887, 2012.

31. GAION, J.P.B.F. Doença de Alzheimer: saiba mais sobre a principal causa de demência no mundo. **INFORMASUS-UFSCAR**, 2020. Disponível em: <https://www.informasus.ufscar.br/doenca-de-alzheimer-saiba-mais-sobre-a-principal-caoa-de-demencia-no-mundo/>. Acesso em 21 mai. 2021.
32. GOODMAN ; GILMAN: **As Bases Farmacológicas da Terapêutica**. 12. ed. Rio de Janeiro, McGraw-Hill, 2012, cap.3.; p.28-45.
33. GOLAN, David E. e col. **Princípios de Farmacologia: a Base Fisiopatológica da Farmacologia**. 3.ed. São Paulo. Editora Guanabara Koogan, 2014.
34. IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Tábua completa de mortalidade para o Brasil em 2018**. Ministério da Economia. Coordenação de População e Indicadores Sociais. Disponibilizado em: <https://biblioteca.ibge.gov.br/index.php/biblioteca-catalogo?view=detalhes;id=73097>. Acesso em: 09 jul. 2020.
35. INTERFARMA. **Guia2019**. Associação da Indústria Farmacêutica de Pesquisa. Disponível em: <https://www.interfarma.org.br/app/uploads/2021/04/guia-interfarma-2019-interfarma2.pdf>. Acesso em: 15 dez. 2021.
36. INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER. **Fases de desenvolvimento de um novo medicamento**, 2021. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/pesquisa/ensaios-clinicos/fases-desenvolvimento-um-novo-medicamento>. Acesso em: 21 mai. 2021.
37. KEMPURAJ, Duraisamy *et al.* **Brain and peripheral atypical inflammatory mediators potentiate neuroinflammation and neurodegeneration**. *Frontiers in cellular neuroscience*, v. 11, p. 216, 2017.
38. KERNS, E. H. **High throughput physicochemical profiling for drug discovery**. *Journal of pharmaceutical sciences*, v. 90, n. 11, p. 1838-1858, 2001.
39. 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.
40. KERRIGAN, S. **Sampling, Storage and Stability**. In: MOFFAT, A.C.; OSSELTON, M. D.; WIDDOP, B. (Ed). *Clarke's Analysis of Drugs and Poisons in pharmaceuticals, body, fluids and post-mortem material*. 4ª ed. Chicago. Pharmaceutical Press, 2011, cap.28., p.445-457.

41. LANÇAS, F.M. **Cromatografia Líquida Moderna HPLC | CLAE**. 2.ed. Campinas. Editora Átomo, 2009.
42. LE, J. Absorção de Fármacos. Manual MSD, 2019- Versão para profissionais de Saúde. Disponível em: <https://www.msmanuals.com/pt-br/profissional/farmacologia-cl%C3%ADnica/farmacocin%C3%A9tica/absor%C3%A7%C3%A3o-de-f%C3%A1rmacos>. Acesso em 21 jul. 2021.
43. LENZI, R.V; MENEZES, A. S. S.; NOMERG, K. O. The use of psychostimulants by academics of a higher education institution of the state of Rondônia, 2017. Disponível em: <http://repositorio.facimed.edu.br/xmlui/bitstream/handle/123456789/35/ARTIGO%2006%20REPOSIT%C3%93RIO.pdf?sequence=1;jsAllowed=y>. Acesso em 13 abr. 2020.
44. LOPES, C.P.G. **Estudo de estabilidade enzimática em fármaco dirigido dendrimérico potencialmente ativo em doenças de Chagas**. Orientadora: Jeanine Giarolla Vargas. Trabalho de Conclusão (Bacharelado em Farmácia-Bioquímica)- Faculdade de Ciências Farmacêutica, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2018.
45. MAIA, A.G. Análise de Variância. Econometria- UNICAMP, 2017. 11 slides. Disponível em: https://www4.eco.unicamp.br/docentes/gori/images/arquivos/Econometria/Econometria_ANOVAREgressaoMultipla.pdf. Acesso em 22 jul. 2021.
46. NETO, J.X. de L. **Estudo em complexos fármaco-receptor utilizando bioquímica quântica**. 2019. Orientador: Eudenilson Lins de Albuquerque. Tese (Doutorado em Bioquímica) – Centro de Biotecnologias, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2019.
47. MEIRELES, L.M.A. **Estabilidade de medicamentos: estado da arte**. Revista Eletrônica de Farmácia. REF–ISSN1808-0804 Vol.XI (4),06–26, 2014.
48. MINITAB. Análise de regressão: como interpretar o R-quadrado e avaliar a qualidade de ajuste?. Blog da Minitab, 2021. Disponível em: <https://blog.minitab.com/pt/analise-de-regressao-como-interpretar-o-r-quadrado-e-avaliar-a-qualidade-de-ajuste>. Acesso em 20 de maio de 2021.

49. MINITAB. Entendendo Análise de Variância (ANOVA) e o teste F. Blog da Minitab, 2021. Disponível em: <https://blog.minitab.com/pt/entendendo-analise-de-variancia-anova-e-o-teste-f>. Acesso em 20 mai.2021.
50. MINITAB. Teste de normalidade. Blog da Minitab, 2021. Disponível em: <https://support.minitab.com/pt-br/minitab/18/help-and-how-to/statistics/basic-statistics/supporting-topics/normality/test-for-normality/>. Acesso em 20 mai.2021.
51. 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.
52. NASCIUTTI, P.R. Desenvolvimento de novos fármacos. Universidade Federal de Goiás, 2012. Disponível em: https://files.cercomp.ufg.br/weby/up/67/o/1%C2%B0_Semin%C3%A1rio_PRI_SCILLA_NASCIUTTI.pdf?1350665635. Acesso em 22 mai. 2021.
53. OLIVEIRA, B.; FARIA, B. Como interpretar uma análise de variância (ANOVA). Operdata, 2017. Disponível em: <https://operdata.com.br/blog/como-interpretar-analise-de-variancia-anova/>. Acesso em 12 set. 2021.
54. OLIVEIRA, F.L. **Estudo das técnicas inferenciais de bioestatística com aplicação a dados de natureza biológica**. Orientador: José Silvio Govone. Trabalho de Conclusão (Bacharelado em Ciências Biológicas) - Universidade Estadual Paulista: “Júlio de Mesquita Filho”, Rio Claro, 2013.
55. OLIVEIRA, J.A. **Avaliação farmacológica de compostos com potencial aplicação nos transtornos centrais**. 2021. Orientadora: Rosângela Gonçalves Peccinini. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Araraquara, 2021.
56. PAMMOLI, F. et al, The productivity crisis in pharmaceutical R&D. **Nature Drug Discovery Reviews**, V.10, p. 428-435, 2011.
57. PARMA, G.C. Teste de ANOVA e TUKEY. Prof. Cremona, 2019. Disponível em: <https://www.profcremona.com/materiais/material-estatistica/metodos-estatisticos/anova-tukey>. Acesso em 12 set.2021.

58. PAULA, E. M. **Avaliação da taxa de ligação a proteínas plasmáticas e estabilidade ex vivo das moléculas GQ-11, GQ-19 e GQ-177, 2017.** Orientadora: Rosângela Gonçalves Peccinini. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Farmácia-Bioquímica) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Araraquara, 2017.
59. PEREIRA, D.G. Importância do metabolismo no planejamento de fármacos. **Quím. Nova** 30 (1) • Fev 2007 • <https://doi.org/10.1590/S0100-40422007000100029>.
60. PFFERI, Fabien et al. Caloric restriction increases lifespan but affects brain integrity in grey mouse lemur primates. **Communications biology**, v. 1, n. 1, p. 1-8, 2018.
61. RAMOS-JIMÉNEZ, Judith; GARDUÑO-TORRES, Belén; ARIAS-MONTAÑO, José Antonio. Histamina y comunicación intercelular: 99 años de historia. **Revista Biomédica**, v. 20, n. 2, p. 100-126, 2009.
62. RIBANI, Marcelo *et al* . Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Quím. Nova**, São Paulo , v. 27, n. 5, p. 771-780, Oct. 2004 . Disponível em:http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext;pid=S0100-40422004000500017;lng=en;nrm=iso. Acesso em 11 nov. 2020.
63. RITCHIE, Hannah; ROSER, Max. Plastic pollution. Our World in Data, 2018.
64. RODRIGUES, E.C. Modelos de regressão linear simples- Análise de resíduos. UFOP, 2016. 48 slides. Disponível em: http://professor.ufop.br/sites/default/files/ericarodrigues/files/regressaolinearsimples_parte4.pdf. Acesso em 19 abr. 2021.
65. ROJAS, Hugo; RITTER, Cristiane; PIZZOL, Felipe Dal. Mecanismos de disfunção da barreira hematoencefálica no paciente criticamente enfermo: ênfase no papel das metaloproteinases de matriz. **Revista Brasileira de Terapia Intensiva**, v. 23, n. 2, p. 222-227, 2011.
66. ROSA, C. **Estudo de estabilidade de drogas de abusos e medicamentos de interesse forense em Dried Blood Spot**, 2018. Orientadora: Marina Franco Maggi Tavares. Dissertação (Mestrado em Ciência) - Instituto de Química da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2018.

67. SCHOENWALD, RD. **Pharmacokinetics in drug Discovery and development**. 1st edition, CRC Press, Florida, 2006.
68. SERRAO, V.T. **Desempenho de uma amostra de indivíduos com comprometimento cognitivo leve, doença de Alzheimer e idosos saudáveis em tarefa de decisão lexical**. 2015. Orientadora: Eliane Correa Miotto. Dissertação (Mestrado em Ciências). Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.
69. SILVA, F. T.; BONJARDIM, L.R. Sistema digestório. Disponível em: <https://inainstituto.com.br/wp-content/uploads/2020/04/1-Artigo-Sistema-Digest%C3%B3rio.pdf>. Acesso em 10 mai. 2021.
70. SILVA, K.E.R.; ALVES, L.D.S.; SOARES, M.F.R.; PASSOS, R.C.S.; FARIM, A.R.; ROLIM NETO, P.J. Modelos de avaliação da estabilidade de fármacos e medicamentos para a indústria farmacêutica. *Revista de Ciência Farmacêutica Básica e Aplicada*. 20(2): 129-135, 2009. Disponível em: <http://files.bvs.br/upload/S/1808-4532/2009/v30n2/a014.pdf>. Acesso em 10 mai. 2021.
71. SILVEIRA, G.P. Optimizando propriedades farmacocinéticas, 67 slides. Disciplina de Introdução a Química Medicinal. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Disponível em: <http://www.iq.ufrgs.br/biolab/images/courses/20-22.pdf>. Acesso em 03 out. 2021.
72. SKOOG, D.A.; WEST, D.M.; CROUCH, S.R. **Fundamentos de Química Analítica**. 8ªed. São Paulo: Cengage Learning, 2008.
73. SOLOMONS, T.W.G.; SYNDER, C.R.; FRYHLE, C.B. **Química orgânica**. 12 ed. Rio de Janeiro, RJ: LTC, 2018. V.1./ 2018.
74. TOLEDO, M. Nootrópicos: Como aumentar sua capacidade mental, 2016. Disponível em: <http://marcelotoledo.com/nootropicos-como-aumentar-sua-capacidade-mental/>. Acesso em 13 abr. 2020.
75. VALDERRAMA, P.; BRAGA J. W. B.; POPPI, R. J. **Estado da arte de figuras de mérito em calibração multivariada**. *Química Nova*, Vol. 32, No. 5, 1278-1287, 2009.
76. VIEIRA, V.M.M.; OHAYON, P. Innovation for pharmaceuticals and drugs: state of the art in Brazil and R;D policies. Disponível em:

<https://www.far.fiocruz.br/wp-content/uploads/2016/09/Inovacao.pdf>. Acesso em 22 mai. 2021.

77. VILLELA, B. Em 2030, mais de 600 mil brasileiros poderão sofrer do Mal de Parkinson. 2019. Publicação online em Associação Beneficente de Assistência Social e Hospitalar. Disponível em: <https://www.prosaude.org.br/noticias/em-2030-mais-de-600-mil-brasileiros-poderao-sofrer-do-mal-de-parkinson/> Acesso em: 09 jul. 2020.
78. VELLOSO, F.T.; FERRAZ, R.S.; LIRA, A. A. M.; SANTANA, D.P.; SANTOS-MAGALHÃES, N.S.S. Desenvolvimento e validação de método analítico em CLAE-UV para a quantificação de ácido retinóico em microcápsulas de alginato e quitosana. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences** vol. 45, n. 1, jan./mar., 2009.
79. 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.
80. VENTURA, Ana LM et al. Sistema colinérgico: revisitando receptores, regulação e a relação com a doença de Alzheimer, esquizofrenia, epilepsia e tabagismo. **Archives of Clinical Psychiatry** (São Paulo), v. 37, n. 2, p. 66-72, 2010.
81. YOSHIOKA, S.; STELLA, V.J. Chemical Stability of Drug Substances In: ___. Stability of Drugs and Dosage Forms. New York: **Kluwer Academic Publishers**. 2002. Cap.2., p 3-135.
82. WATERS. Sun Fire C18 Column, 100 Å, 3.5 µm, 4.6 mm x 150 mm, 1/Pk. Waters, 2022. Disponível em: <https://www.waters.com/nextgen/br/pt/shop/columns/186002554-sunfire-c18-column-100a-35--m-46-mm-x-150-mm-1-pk.html>. Acesso em 02 jan. 2022.
83. WORLD HEALTH ORGANIZATION. Neurological disorders: a public health approach. Disponível em: https://www.who.int/mental_health/neurology/chapter_3_b_neuro_disorders_public_h_challenges.pdf?ua=1. Acesso em 10 nov. 2020.
84. ZHANG, Donglu 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.

85. ZHANG, P. et al. Alcohol abuse, immunosuppression, and pulmonary infection.
Curr Drug Abuse Rev, v. 1, n. 1, p. 56-67, Jan 2008. ISSN 1874-4737.