



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Câmpus de Araraquara
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas



Estudo de ADME de candidatos a fármacos para o tratamento da leishmaniose visceral e tripanosomíase americana

Bruna Cristina Ulian Silva

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

Araraquara – SP

2019



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Câmpus de Araraquara
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas



Estudo de ADME de candidatos a fármacos para o tratamento da leishmaniose visceral e tripanossomíase americana

Bruna Cristina Ulian Silva

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

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

Araraquara – SP
2019

Ficha Catalográfica

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

S586e Silva, Bruna Cristina Ulian.
Estudo de ADME de candidatos a fármacos para o tratamento da
leishmaniose visceral e tripanossomíase americana / Bruna Cristina Ulian Silva. –
Araraquara, 2019.
101 f. : il.

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

Orientadora: Rosângela Gonçalves Peccinini.

1. Leishmaniose. 2. Tripanossomíase. 3. ADME. 4. Caco-2. 5. Microsossomos. I. Peccinini, Rosângela Gonçalves, orient. II. Título.

CAPES: 33004030078P6

Dedico este trabalho aos meus pais, Teresa e Marcos (*in memoriam*), a minha avó Alzira (*in memoriam*) e a todos os meus familiares que me incentivaram nos meus estudos.

AGRADECIMENTOS

Apresento os meus sinceros agradecimentos:

A Deus, por me conceder todas as condições necessárias para que eu conquiste os meus objetivos.

À minha mãe Teresa, por todo o seu cuidado, amor e dedicação para que nunca me faltasse nada. Sempre foi um exemplo de esforço e conquista, além de sempre me incentivar e apoiar, não medindo esforços para me garantir um ótimo estudo.

Às minhas tias Elza e Isabel, por todo amor e por sempre me ajudarem nos momentos de dificuldade e a toda a minha família, incluindo primas, tios e tias que sempre demonstraram amor e preocupação.

Ao meu namorado Matheus, por estar sempre me ouvindo e apoiando, além de toda a paciência, incentivo e amor.

À minha orientadora Rosângela, por ter me aceitado em seu grupo de pesquisa e por me ensinar tanto sempre que preciso. Admiro muito o seu nível de conhecimento, além da sua capacidade de transmitir com leveza conhecimentos complexos.

Ao Professor Fernandes, por ter concedido gentilmente os compostos para que eu desenvolvesse o meu trabalho.

Aos meus amigos de laboratório Evelin, Jonata, Taísa, Carol e Natália por serem tão solícitos, por me ajudarem todas as vezes que preciso e por toda a amizade todos esses anos. Vocês são o exemplo do verdadeiro trabalho em equipe, obrigada por me ensinarem tanto.

Ao Marcão e Kelly, por ajudar sempre que preciso.

A todos os colegas que colaboraram de alguma forma com o meu trabalho.

A Faculdade de Ciências Farmacêuticas UNESP – Araraquara, por toda a formação e oportunidade.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de mestrado.

À minha amiga Naiara, por todos os conselhos e amizade.

Aos meus amigos Bárbara, Flávio, Aline e Samanta por toda a amizade e carinho.

*"Em cada medicamento que alivia as dores da
humanidade está a ciência do farmacêutico."*

(Autor desconhecido)

RESUMO

Estudos precoces de ADME podem agilizar o processo de desenvolvimento de novos fármacos, selecionando os mais promissores para futuros estudos farmacocinéticos. Nesse sentido, e considerando a necessidade de novos tratamentos para a leishmaniose visceral e para a tripanossomíase americana, as moléculas LINS03006, LINS03011 e LINS03013 com ação sobre o *Trypanosoma cruzi* e a *Leishmania infantum* foram desenvolvidas por pesquisadores da UNIFESP/Diadema. O presente trabalho teve como objetivo realizar estudos físico-químicos e de ADME para a seleção das moléculas LINS mais promissoras para futuros estudos *in vivo*. Métodos analíticos e bioanalíticos por UHPLC/UV foram desenvolvidos para a quantificação dos compostos nos ensaios realizados. Foram realizados estudos de estabilidade química em diferentes pHs (1,2; 7,4 e 8,8), estabilidade metabólica em microssomos de rato e humano, estabilidade *ex vivo*, coeficientes de partição (log P) e permeabilidade em células Caco-2. Os compostos apresentaram estabilidade de até 24 horas em todos os pHs avaliados, levando à expectativa de que na administração oral não ocorrerá degradação decorrente do pH estomacal, sanguíneo e duodenal. O estudo em plasma de rato resultou, para todos os compostos, estabilidade em tempo suficiente – ao menos 6 horas – com expectativa de que ocorra efeito *in vivo*. Nos estudos de logP, os compostos apresentam características lipofílicas, favorecendo a permeabilidade e o clearance hepático. No ensaio de permeabilidade, os compostos LINS apresentaram $P_{app} > 5,0 \times 10^{-6}$ cm/s, podendo ser classificados como de média ou alta permeabilidade, dessa forma, há expectativa de absorção através do epitélio intestinal. Na estabilidade metabólica em microssomos de ratos, os compostos LINS03006 e LINS03013 demonstraram ser substratos das enzimas do citocromo P450, diferente do LINS03011. Em microssomos humano nenhum dos compostos LINS apresentaram degradação, evidenciando que o clearance hepático não é a principal via de eliminação em humanos. Os resultados obtidos demonstram que as moléculas apresentam características adequadas à continuidade do desenvolvimento.

Palavras-chave: Leishmaniose; Tripanossomíase; ADME; Caco-2, Microssomos.

ABSTRACT

Early studies of ADME can speed up the development of new drugs, selecting the most promising for future pharmacokinetic studies. In this sense, and considering the need for new treatments for visceral leishmaniasis and american trypanosomiasis, the molecules LINS03006, LINS03011 and LINS03013 with action on *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania infantum* were developed by researchers from UNIFESP/Diadema. The present work aimed to perform physical-chemical and ADME studies to select the most promising LINS molecules for future in vivo studies. Analytical and bioanalytical methods by UHPLC/UV were developed for the quantification of compounds in the assays performed. Chemical stability studies were performed at different pHs (1.2, 7.4 and 8.8), metabolic stability in rat and human microsomes, ex vivo stability, partition coefficients (log P) and permeability in Caco-2 cells. The compounds exhibited stability of up to 24 hours in all evaluated pHs, leading to the expectation that oral degradation will not occur due to stomach, blood and duodenal pH. The study in rat plasma resulted, for all compounds, stability in sufficient time - at least 6 hours - with the expectation that in vivo effect would occur. In logP studies, the compounds presented lipophilic characteristics, favoring permeability and hepatic clearance. In the permeability assay, the LINS compounds presented $P_{app} > 5.0 \times 10^{-6}$ cm/s, which can be classified as medium or high permeability, thus, there is an expectation of absorption through the intestinal epithelium. In the metabolic stability in microsomes of rats, compounds LINS03006 and LINS03013 were shown to be substrates of cytochrome P450 enzymes, different from LINS03011. In human microsomes none of the LINS compounds showed degradation, evidencing that hepatic clearance is not the main route of elimination in humans. The results obtained demonstrate that the molecules present characteristics suitable for the continuity of development.

Keywords: Leishmaniasis; Trypanosomiasis; ADME; Caco-2, Microsomes.

LISTA DE ABREVIATURAS

ADME – absorção, distribuição, metabolismo e excreção

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

A/O – Água/óleo

Caco-2 - linhagem celular de adenocarcinoma de cólon humano

CP - Controle positivo

CQA – Controle de qualidade alto

CQB – Controle de qualidade baixo

CCM – Controle de qualidade médio

CN - Controle negativo

CS - Controle solvente

CYP450 citocromo P-450

DMSO - Dimetilsulfóxido

L. infantum – *Leishmania infantum*

Min – Minutos

OMS - Organização Mundial da Saúde

Papp - Permeabilidade aparente

PCR – Reação em cadeia da polimerase

PMHCh - Controle da Doença de Chagas

RET - resistência elétrica transepitelial

SRN – Sistema regenerador

SUS – Sistema Único de Saúde

T. cruzi - *Trypanosoma cruzi*

UHPLC – Cromatografia de ultra eficiência

μM - micromolar

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Ação dos compostos derivados da molécula 5-nitrofurano	32
Tabela 2: Atividade antiparasitária dos compostos LINS contra a <i>L.(L) infantum</i> e o <i>T.cruzi</i>	41
Tabela 3: Log P dos padrões de calibração	49
Tabela 4. Curvas analíticas com regressão linear, precisão e exatidão dos compostos LINS em acetonitrila	62
Tabela 5. Curvas analíticas com regressão linear, precisão e exatidão dos compostos LINS em tampão Hank's	62
Tabela 6. Precisão e exatidão do LIQ dos compostos LINS em acetonitrila.....	63
Tabela 7. Precisão e exatidão do LIQ dos compostos LINS em tampão Hank's.....	63
Tabela 8. Curvas analíticas com regressão linear, precisão e exatidão dos compostos LINS em plasma de rato.....	65
Tabela 9. Curvas analíticas com regressão linear, precisão e exatidão dos compostos LINS em microssomos de rato.....	66
Tabela 10. Curvas analíticas com regressão linear, precisão e exatidão dos compostos LINS em microssomos de humano.....	66
Tabela 11. Precisão e exatidão do LIQ dos compostos LINS em plasma de rato.....	67
Tabela 12. Precisão e exatidão do LIQ dos compostos LINS em microssomos de rato.....	67
Tabela 13. Precisão e exatidão do LIQ dos compostos LINS em microssomos de humano.....	67
Tabela 14. Estabilidade química dos compostos LINS03006, LINS03011 e LINS03013 em pH 1,2.....	71
Tabela 15. Estabilidade química dos compostos LINS em pH 7,4	74
Tabela 16. Estabilidade química dos compostos LINS em pH 8,8.....	76
Tabela 17. Cálculo <i>in silico</i> do Log P para os compostos LINS.....	78
Tabela 18. Viabilidade celular dos compostos LINS.....	81
Tabela 19. Estimativa para ratos do clearance intrínseco <i>in vivo</i> (Clint), meia vida de eliminação ($t_{1/2}$) e constante de eliminação (Kel) dos compostos LINS03006 e LINS03013.....	87

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Monocamadas de células Caco-2.....	21
Figura 2. Permeação transcelular e paracelular na monocamada de células Caco-2 (enteócitos)	22
Figura 3. Forma tripomastigota do <i>T. cruzi</i> em esfregaço de sangue.....	27
Figura 4. Forma amastigota do <i>T. cruzi</i> em tecido cardíaco.....	27
Figura 5. Forma amastigota de <i>Leishmania sp.</i> em biópsia de tecido da pele.....	33
Figura 6. Forma promastigota da <i>Leishmania sp</i> em cultura celular.....	34
Figura 7. Estruturas dos novos compostos derivados do giblilimbol A e B.....	40
Figura 8. Ensaio de citotoxicidade por redução da resazurina.....	53
Figura 9. Cultivo de células Caco-2 em placas com sistemas.....	55
Figura 10. Monocamada de células Caco-2.....	56
Figura 11. Varredura do comprimento de onda.....	60
Figura 12. Cromatograma dos compostos LINS em tampão Hank's na concentração de 2,5 µg/mL.....	64
Figura 13. Cromatograma dos compostos LINS em microsossomos de rato na concentração de 2,5 µg/mL.....	68
Figura 14. Cromatograma dos compostos LINS em microsossomos de humano na concentração de 2,5 µg/mL.....	69
Figura 15. Gráfico de estabilidade química dos compostos LINS em pH 1,2.....	70
Figura16. Gráfico de estabilidade química dos compostos LINS em pH 7,4	72
Figura 17. Gráfico de estabilidade química dos compostos LINS em pH 8,8.....	75
Figura 18. Gráfico de estabilidade em plasma de rato.....	77
Figura 19. Gráfico de logk vs logP dos padrões e dos compostos LINS.....	79
Figura 20. Gráfico da permeabilidade aparente dos compostos LINS.....	82
Figura 21. Gráfico do comportamento dos compostos LINS em microsossomos de rato	84
Figura 22. Gráfico do comportamento dos compostos LINS em microsossomos de humano.....	85

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	10
2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	14
2.1 PROPRIEDADES FARMACOCINÉTICAS E O DESENVOLVIMENTO DE FÁRMACOS ..	14
2.2 ESTUDOS <i>IN VITRO</i>	15
2.2.1 Avaliação <i>in vitro</i> de propriedades físico-químicas	15
A) Coeficiente de partição (Log P)	15
B) Estabilidade Química em diferentes pHs	16
C) Estabilidade <i>ex vivo</i>	19
2.2.2 Estudos de ADME	20
A) Permeabilidade	21
B) Metabolismo	23
2.3 TRIPANOSSOMÍASE AMERICANA	26
2.3.1 Manifestação clínica	28
2.3.2 Tratamentos	30
2.3.3 Estudos de novas moléculas para o tratamento da Tripanossomíase Americana	31
2.4 LEISHMANIOSE VISCERAL AMERICANA	33
2.4.1 Manifestação clínica	34
2.4.2 Tratamento	35
2.4.3 Estudos de novas moléculas para o tratamento da leishmaniose visceral	38
2.5 COMPOSTOS ANÁLOGOS DERIVADOS DO GIBILIMBOL, UMA NOVA PERSPECTIVA PARA O TRATAMENTO DA DOENÇA DE CHAGAS E DA LEISHMANIOSE VISCERAL	39
3. OBJETIVOS	42
3.1 OBJETIVO GERAL	42
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	42
4. MATERIAL E MÉTODOS	43
4.1. DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DOS MÉTODOS ANALÍTICO E BIOANALÍTICO PARA A DETERMINAÇÃO DOS COMPOSTOS LINS03006, LINS03011 E LINS03013 POR UHPLC	43
4.1.1 Método analítico	45
A) Em acetonitrila	45
B) Em tampão Hank's	46
4.1.2 Método bioanalítico	46
A) Microsossomos hepáticos de rato	47
B) Microsossomos hepáticos de humano	47
C) Em plasma de rato	47

4.2 ESTUDOS <i>IN VITRO</i>	48
4.2.1 Determinação do log P dos compostos LINS03006, LINS03011 e LINS03013	48
4.2.2 Ensaio de estabilidade química dos compostos LINS03006, LINS03011 e LINS03013 nos pHs 1,2 ; 7,4 e 8,8	50
4.2.3 Estabilidade <i>ex vivo</i>	51
4.2.4 Ensaio de citotoxicidade pelo teste da Resazurina em células Caco-2	52
4.2.5 Cultivo de células Caco-2.....	54
4.2.6 Cultivo das células Caco-2 em placas com sistemas de insertos ThinCert™ (Greiner Bio-One).....	55
4.2.7 Ensaio de permeabilidade utilizando as células Caco-2.....	56
4.2.8 Ensaio de metabolismo	57
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	60
5.1 DESENVOLVIMENTO DOS MÉTODOS ANALÍTICO E BIOANALÍTICO PARA A DETERMINAÇÃO DOS COMPOSTOS LINS03006, LINS03011 E LINS03013 EM UHPLC	60
5.1.1 Validação parcial do método analítico	61
5.1.2 Validação parcial do método bioanalítico.....	65
5.2 ENSAIO DE ESTABILIDADE QUÍMICA DOS COMPOSTOS LINS EM PHs 1,2; 7,4 E 8,8.....	70
5.2.1 Estabilidade química em pH 1,2	70
5.2.2 Estabilidade química em pH 7,4	72
5.2.3 Estabilidade química em pH 8,8	74
5.3 ESTABILIDADE <i>EX VIVO</i>	76
5.4 DETERMINAÇÃO DO LOG P DOS COMPOSTOS LINS03006, LINS03011 E LINS03013.....	78
5.5 ENSAIO DE CITOTOXICIDADE PELO TESTE DA RESAZURINA EM CÉLULAS CACO-2	80
5.6 ENSAIO DE METABOLISMO EM MICROSSOMOS DE RATO E HUMANO.....	83
6. CONCLUSÃO	89
REFERÊNCIA	91

1. INTRODUÇÃO

A leishmaniose e a tripanossomíase americana, doenças de expressão significativa na população rural, tem sido cada vez mais frequentes no ambiente urbano, acometendo milhares de pessoas todos os anos. Apesar dessas doenças se tornarem um crescente problema de saúde pública não só no Brasil, mas também em diversas regiões do continente americano, continuam sendo negligenciadas (MSF, 2018; PORTAL DA SAÚDE, 2018)

Nos últimos anos, no Brasil, foram registrados anualmente mais de 3 mil casos de pessoas infectadas pela leishmaniose e mais de 200 óbitos (PORTAL DA SAÚDE, 2018). Quando o parasita infectante é a *Leishmania (L.) infantum*, responsável pela leishmaniose visceral, o quadro pode evoluir para óbito em mais de 90% dos casos quando a doença não é tratada (ARTACHO, 2009).

Apesar do supramencionado, só existem três medicamentos para o tratamento disponibilizados no mercado em nosso país: o antimoniato de meglumina, a anfotericina B lipossomal e o desoxicolato de anfotericina B, sendo que o primeiro está disponível no mercado desde a década de 40 (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014). Esses fármacos atuam contra a forma amastigota da *Leishmania (L.) infantum*, ou seja, atuam na fase inicial e avançada da doença, no entanto, são altamente tóxicos e de uso injetável, sendo necessária a administração por um profissional da saúde e em ambiente hospitalar, o que dificulta a adesão e continuidade do tratamento pelos pacientes, resultando em alta desistência (DEMICHELI; FRÉZARD, 2005; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014).

Os antimoniais, além de elevada toxicidade que pode culminar em complicações cardíacas, renais e hepáticas, tem apresentado menor eficácia no tratamento da leishmaniose em decorrência do surgimento de resistência dos parasitas (MINISTÉRIO

DA SAÚDE, 2014). Assim como os fármacos antimoniais a anfotericina B lipossomal e o desoxicolato de anfotericina B, também apresentam elevada toxicidade, podendo acarretar lesão renal aguda (DEMICHELI E FRÉZARD, 2005; EBSERH, 2016).

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), estima-se que no Brasil há mais de um milhão de pessoas acometidas pela tripanossomíase - causada pelo *Trypanosoma cruzi* – levando à morte de aproximadamente 16 mil pessoas por ano (BEZERRA et al. 2012; DIAS et al. 2016).

Apesar da gravidade da tripanossomíase, o benzonidazol é o único fármaco disponibilizado para o tratamento no nosso país. Este fármaco apresenta resultados efetivos somente contra a forma tripomastigota do *T. cruzi*, ou seja, é eficaz somente na fase aguda da doença, sendo ineficaz na fase crônica que apresenta unicamente a forma amastigota. Dentre os efeitos adversos causados pelo benzonidazol destacam-se as alterações cutâneas, intolerância gástrica e neurite. Os efeitos adversos aparecem em cerca de 50% dos pacientes, muitas vezes resultando na suspensão do tratamento (IANNI, 1998; AMBR, 2014; MSF, 2018).

Apesar de toda a gravidade apresentada pela leishmaniose e pela tripanossomíase americana, além das complicações para o tratamento, essas doenças continuam sendo negligenciadas pelos setores privados da economia, restando aos setores públicos a responsabilidade de desenvolver novos medicamentos (GONTIJO; MELO, 2004; DEMICHELI; FRÉZARD, 2005).

Diante deste panorama, instituições públicas tem se empenhado em descobrir novos fármacos para o tratamento da leishmaniose e da tripanossomíase, como o grupo de pesquisa do Instituto de Ciências Ambientais, Químicas e Farmacêuticas da Universidade Federal de São Paulo (Unifesp), sob a coordenação do Prof. Dr. João Paulo dos Santos Fernandes. Este grupo de pesquisa sintetizou novos compostos a

partir de alquilfenóis (gibbilimbol A e B) isolados das folhas de *Piper malacophyllum* (*Piperaceae*) que apresentam atividade antiparasitária - sobre o *Trypanosoma cruzi* e sobre a *Leishmania infantum* (VARELA et al. 2016). Para melhorar a especificidade pelo parasita e a ação antiparasitária, o grupo de pesquisa sintetizou análogos dessas moléculas. Entre os derivados sintetizados, se destacaram, em termos de atividade, os compostos LINS03006, LINS03011 e LINS03013 (VARELA et al. 2016).

Cerca de 50% do insucesso da introdução de novos fármacos e medicamentos no mercado estão relacionados à elevada toxicidade e características farmacocinéticas inadequadas, com grande impacto sobre o custo do desenvolvimento de novos produtos. Assim se tornaram necessários, o mais cedo possível, estudos sobre a farmacocinética e toxicidade dos candidatos a fármacos, para a seleção daqueles mais promissores nas fases mais precoces do desenvolvimento (ROBERTS, 2001; WATERBEEMD; GIFFORD, 2003; VAN BREEMEN; LI, 2005).

Como consequência, muitos laboratórios e indústrias farmacêuticas tem adotado métodos *in vitro* para os testes de ADME (Absorção, Distribuição, Metabolismo e Excreção), como, por exemplo, o uso da linhagem celular de adenocarcinoma de cólon humano (Caco-2) e de microssomas de fígado de rato e de humanos, que apresentam validade preditiva quanto à permeabilidade e o metabolismo de novos fármacos, respectivamente (VAN BREEMEN; LI, 2005; HUBATSCH et al. 2007; SILVA, 2016).

Quando se encontram em meio de cultura, as células Caco-2 mimetizam a parede do intestino delgado humano apresentando várias características semelhantes à barreira física desse epitélio, o que permite medir a permeabilidade para a caracterização da absorção e, conseqüentemente, da biodisponibilidade de novos fármacos quando administrados pela via oral. Entretanto, além da permeabilidade, os efeitos do metabolismo também influenciam crucialmente na biodisponibilidade de uma

substância e, portanto, é essencial conhecer a sua estabilidade metabólica para o sucesso terapêutico esperado (SAMBUY et al. 2005; SEVIN et al. 2013; SILVA, 2016)

Ainda, as características físico-químicas de um composto - que podem ser determinadas em ensaios *in vitro* - apresentam relação direta com a sua disposição cinética. A lipofilicidade, que pode ser representada pelo coeficiente de partição por exemplo, influencia diretamente nos processos farmacocinéticos, como a absorção oral, na permeabilidade, na ligação as proteínas plasmáticas, no volume de distribuição e no metabolismo. Dessa forma o logP pode ser considerado um importante parâmetro para prever características disposicionais de um novo fármaco, e se estas características o tornam promissor para a continuidade do desenvolvimento do produto farmacêutico (WATERBEEMD; GIFFORD, 2003).

O presente trabalho teve como objetivo realizar ensaios físico-químicos e caracterizar a permeabilidade e metabolismo *in vitro* utilizando o modelo de monocamadas Caco-2 e o modelo microssomal hepático de ratos e de humanos, para selecionar dentre os compostos planejados pelo grupo da UNIFESP aqueles com características mais apropriadas para a continuidade de estudos pré-clínicos e clínicos, cujo objetivo é o desenvolvimento de produtos para o tratamento da Leishmaniose e Tripanossomíase.

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 Propriedades farmacocinéticas e o desenvolvimento de fármacos

Dentre todas as indústrias do mundo, a indústria farmacêutica é o setor que mais investe em pesquisa e desenvolvimento, destinando cerca de 20% de seus lucros para essa área. A pesquisa e o desenvolvimento de novos medicamentos é um processo longo e desafiador que pode durar até 15 anos. Considera-se que dos 10.000 novos compostos estudados inicialmente, 250 atingem a fase pré-clínica de estudos e, destes, apenas 5 chegam na fase clínica. Dentre as moléculas aprovadas pelos órgãos regulatórios apenas uma é inserida na terapêutica (LIMA et al. 2003; CALIXTO; SIQUEIRA; JÚNIOR, 2008).

Durante o processo de desenvolvimento de novos medicamentos, cerca de 50% das moléculas deixam de ser estudadas devido a elevada toxicidade e por apresentarem um perfil farmacocinético inadequado como, por exemplo, alto clearance, o que prejudica a biodisponibilidade do fármaco no organismo comprometendo a ação terapêutica. Esses impasses, resultam em altas despesas para as indústrias farmacêuticas, que justificam os bilhões de dólares gastos em pesquisa e desenvolvimento como um dos motivos pelo alto custo dos medicamentos no mercado (WATERBEEMD; GIFFORD, 2003; LEXCHIN, 2018).

O estudo da farmacocinética completa é realizado em animais na fase pré-clínica do desenvolvimento, o que demanda muito tempo e eleva os gastos. Dessa forma, com o intuito de reduzir os gastos e otimizar o tempo do desenvolvimento, as indústrias farmacêuticas tem aderido a ensaios de *screening in vitro* que incluem estudos físico-químicos e de ADME (absorção, distribuição, metabolismo e excreção). Esses estudos precedem os estudos farmacocinéticos para a seleção dos compostos mais promissores para futuros estudos *in vivo* (WATERBEEMD; GIFFORD, 2003; VAN

BREEMEN; LI, 2005; LIU et al. 2008).

2.2 Estudos *in vitro*

2.2.1 Avaliação *in vitro* de propriedades físico-químicas

As propriedades físico-químicas das moléculas influenciam diretamente nas atividades biológicas que essas moléculas irão desempenhar. Dessa forma, para auxiliar na caracterização físico-química, são realizados ensaios de determinação de Log P, estabilidade química em diferentes tampões e estabilidade química *ex vivo*.

A) Coeficiente de partição (Log P)

O coeficiente de partição de uma substância pode ser definido como a razão entre a concentração da substância na fase octanol e fase aquosa, sendo determinado a fim de elucidar se a substância apresenta características hidrofílicas ou lipofílicas. Segundo Lipinski e a regra dos 5, o valor de log P recomendado para administração através da via oral é <5 . Isso porque valores altos de log P comprometem a biodisponibilidade em decorrência da baixa solubilidade em água. Além disso, compostos com log P alto tem maior afinidade pelos tecidos adiposos e podem ficar retidos nesses tecidos, dificultando a sua eliminação e, em alguns casos, levando ao aparecimento de efeitos nocivos. Outro fator a ser considerado é que o valor ideal do log P, para que ocorra melhor absorção, dependerá do local onde o composto será absorvido. Por exemplo, para atravessar a barreira hematoencefálica, o log P ideal é cerca de 2, já para a via sub-lingual o ideal seria $\log P > 5$, e para a via oral e intestinal o mais indicado é o log P com valores entre 1,35 e 1,8 (HANSCH; BJÖRKROT; LEO, 1987)

Os métodos mais utilizados para a determinação do log P são o método cromatográfico, indicado para compostos com características mais lipofílicas (log P

entre 0 e 6) e o *Shake Flask*, que é indicado para compostos com características mais hidrofílicas ($\log P$ entre -2 e 4). O método cromatográfico é realizado a partir da introdução de substâncias com $\log P$ conhecido num sistema cromatográfico padrão, de forma a permitir a construção de uma relação linear entre o tempo de retenção da substância no sistema com o $\log P$. Assim, a equação de calibração permite o cálculo do $\log P$ da substância teste. Já o método do Shake Flask é realizado com a mistura de dois líquidos imiscíveis, sendo uma fase orgânica e a outra inorgânica, geralmente octanol e água (OECD, 1995; VRAKA et al. 2017).

A lipofilicidade está diretamente ligada aos processos de absorção, distribuição, metabolismo e excreção (ADME), dessa forma, a determinação do coeficiente de partição ($\log P$) permite prever o comportamento do composto por transporte passivo transcelular, o que é um parâmetro essencial a ser descrito de compostos candidatos a fármacos, devendo ser realizada em fases precoces do desenvolvimento para o direcionamento de futuros estudos (BALIMANE; CHONG; MORRISON, 2000; LEWGOWD et al. 2007; MARTEL et al. 2016; CARON; VALLARO; ERMONDI, 2018).

B) Estabilidade Química em diferentes pHs

Considerando que os compostos com potencial terapêutico são planejados para determinada ação a partir da estrutura molecular original, reações químicas que possam afetar a estabilidade da molécula podem inativar o composto e até mesmo promover a formação de compostos de significativa e inaceitável toxicidade. As principais reações que potencialmente alteram a estrutura molecular de um fármaco são a oxidação e a hidrólise, sendo esta última de maior ocorrência no sistema

biológico (SNAPE; ASTLES; DAVIES, 2010).

No organismo humano existem diferentes valores de pH, sendo ácido no estômago, neutro no sangue e mais básico no intestino delgado. Dessa forma, a avaliação da estabilidade de um candidato a fármaco em diferentes pHs é fundamental para garantir a sua integridade quando for submetido aos diferentes meios no sistema biológico, particularmente se há intenção de administração pela via oral.

O pH do meio influencia o equilíbrio entre as formas molecular e ionizada em que o composto se encontra - dependendo do pK do composto - e a forma molecular é mais lipofílica, enquanto que a forma ionizada é mais hidrofílica. Assim, o pH do meio afeta diretamente a capacidade de permeação dos compostos nas membranas biológicas, sua distribuição tecidual e a sua eliminação (STORPIRTIS et al. 2011; TSAIOUN; KATES, 2011).

No intestino delgado ocorre a maior parte da absorção de fármacos. O suco pancreático e a bile basificam o quimo vindo do estômago devido aos íons bicarbonato presentes na composição desses dois fluidos e, dessa forma, o pH no intestino delgado pode variar de 4,0 até 9,5 (MORENO et al. 2006). Considerando que o pK dos compostos LINS03006, LINS03011 e LINS03013 é 9,59; 9,64 e neutro (~7,0), respectivamente, o pH no intestino delgado pode favorecer a forma molecular e facilitar a sua permeação nos enterócitos.

A avaliação da estabilidade química está prevista em guias para o registro de novos fármacos e medicamentos com o objetivo de garantir que o fármaco mantenha suas características farmacológicas de acordo com as especificações do medicamento proposto e dentro do prazo de validade previsto pelo fabricante. Neste caso, os estudos de estabilidade para os produtos acabados envolvem situações de exposição ambiental passíveis de ocorrência e ensaios de “estresse” do produto para verificar os riscos nas

situações adversas extremas de armazenamento ou transporte. A ocorrência de desvios de qualidade deve ser declarada na documentação, estabelecendo critérios de tolerabilidade desses desvios (BENSLEY, 2008).

Na fase inicial do desenvolvimento de fármacos é importante a realização de estudos de estabilidade química para garantir a integridade do produto terapêutico e o seu seguimento na linha de desenvolvimento. Neste sentido, são realizados diferentes estudos de estabilidade química como: estabilidade em diferentes pHs, luminosidade, temperatura e umidade (BERGLUND; BYSTROM; PERSSON, 1990).

A estabilidade química em luz é indicada em casos de suspeitas de instabilidade devido a luz e em situações em que a estrutura análoga à molécula de estudo apresente histórico de instabilidade. Quanto a estabilidade química ao calor, o FDA recomenda testes em altas temperaturas que aceleram a degradação do fármaco na forma sólida e para a realização de testes de estabilidade química à umidade, o FDA recomenda que compostos sólidos fiquem totalmente expostos ao ar (KERNS; DI, 2007).

Estudos de estabilidade química em diferentes pHs são importantes na fase inicial de desenvolvimento, uma vez que ajudam na identificação de possíveis problemas de degradação que poderão ocorrer decorrentes em diferentes valores de pHs encontrados no organismo. Dessa forma, podem ser tomadas medidas que evitem a interferência do pH no composto previamente aos estudos pré-clínicos (KERNS; DI, 2007).

C) Estabilidade *ex vivo*

Os estudos de estabilidade química *ex vivo* são necessários para determinar o comportamento do composto químico em uma matriz biológica, como, por exemplo, o plasma.

Na matriz biológica, a estabilidade do composto irá depender não só das suas características físico-químicas, mas também das propriedades da matriz, por exemplo, a presença de enzimas esterases contidas no plasma e a susceptibilidade do composto à ação destas enzimas (KOITKA et al, 2010).

As esterases estão presentes no plasma de humano e de animal. Estudos que compararam a atividade dessas enzimas no plasma de rato e de humano mostraram maior atividade das esterases em plasma de rato (LIEDERER; BORCHARDT, 2005).

As principais esterases são a acetilcolinesterase (AChE), butirilcolinesterase (BChE), carboxilesterase (CE) e paraoxonase (PON). Dentre essas, são consideradas as mais relevantes, em termos de metabolização de fármacos no plasma, as BChE, CE e PON. As esterases agem metabolizando substâncias que contêm um grupo éster em sua estrutura através de reações de hidrólise, resultando na diminuição da biodisponibilidade, uma vez que aumentam o clearance e diminuem a meia-vida de eliminação (KOITKA et al, 2010).

Para identificar se as esterases agem degradando o composto de estudo são realizados experimentos de incubação do composto em plasma de humano ou animal e então é realizada a análise das amostras através de métodos cromatográficos, a fim de quantificar o composto. Esses estudos são essenciais na fase inicial de desenvolvimento de fármacos para a identificação prévia de metabolismo por essa via. Caso a instabilidade em plasma seja detectada, a degradação pode ser evitada pelo pesquisador em futuros estudos *in vivo*, prevenindo comprometimento da

biodisponibilidade do composto (KERNES; DI, 2007).

2.2.2 Estudos de ADME

O desenvolvimento de novos fármacos envolve a aplicação de métodos *in situ*, *in vitro* e *in vivo* que buscam elucidar características farmacológicas e toxicológicas relevantes à decisão sobre a continuidade dos investimentos em determinadas moléculas com potencial terapêutico.

As abordagens *in situ* e *in vitro*, direcionadas à investigação de características físico-químicas, farmacodinâmicas e farmacocinéticas dos candidatos a fármacos permitem o planejamento racional dos ensaios *in vivo*. Este planejamento racional traz perspectivas de diminuição do tempo despendido para a condução dos complexos e diversificados estudos necessários à caracterização dos compostos que permitem evidenciar sua adequabilidade (ou não) ao uso terapêutico (FESTING; WILKINSON, 2007).

Estudos prévios de absorção, distribuição, metabolismo, excreção (ADME) e toxicidade, são possíveis através de métodos *in vitro*, uma vez que mimetizam sistemas biológicos, contribuindo para a diminuição dos custos do desenvolvimento de novos produtos e redução do uso do número de animais, além da sua menor complexidade, o que permite a análise de maior quantidade de compostos em menor tempo (WATERBEEMD; GIFFORD, 2003; BREEMEN; LI, 2005).

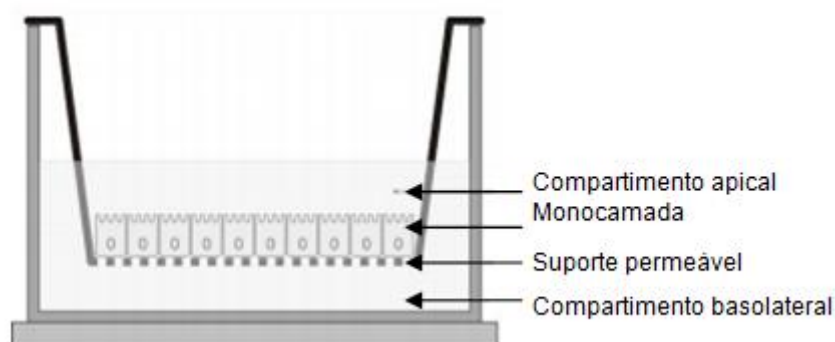
Devido às vantagens dos ensaios *in vitro*, como ressaltado anteriormente, indústrias farmacêuticas e laboratórios de pesquisa tem adotado diferentes técnicas para os ensaios de permeabilidade e metabolismo (SILVA, 2016).

A) Permeabilidade

Os ensaios de permeabilidade *in vitro* são úteis para a predição da absorção do composto químico de interesse no epitélio intestinal humano. Existem diferentes sistemas que são utilizados para o ensaio de permeabilidade, sendo esses: permeação em membrana artificial paralela (PAMPA) e o uso linhagens celulares como Caco-2, TC-7; 2/4/A1; MDCK e MDCK-MDR1, sendo a linhagem Caco-2 o modelo mais utilizado (RUELL; AVDEEF, 2004; SOUZA; FREITAS; STORPIRTIS, 2007).

A linhagem celular Caco-2 consiste em células de adenocarcinoma de cólon humano que, quando cultivadas, se diferenciam em enterócitos formando monocamadas (Figura 1) que servem como modelo para ensaio de permeação de compostos, mimetizando o epitélio intestinal humano e se tornando referência para ensaios *in vitro* de permeação (BREEMEN; LI, 2005).

Figura 1. Monocamadas de células Caco-2. Fonte: Adaptado de STORPIRTIS, S. 2013.



Normalmente as células do intestino apresentam alta expressão da isoenzima CYP3A4 responsáveis pelo metabolismo de fase I, o que não ocorre com a Caco-2, que tem baixa expressão das isoenzimas do citocromo P450 (SAMBUY et al. 2005). No

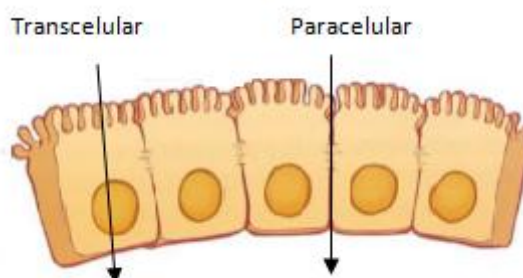
entanto, a CYP3A4 pode ser induzida na linhagem Caco-2 através de tratamento com vitamina D3 (HUBATSCH; RAGNARSSON; ARTURSSON, 2007).

Outra característica da célula Caco-2 é que essa linhagem auxilia o esclarecimento de mecanismos de transporte dos fármacos, uma vez que essas células expressam vários tipos de transportadores, como o transportador de peptídeo (PEPT1), transportador de carboxilatos (MCT) e de efluxo como, por exemplo, a glicoproteína-P (P-gp) (FUJIKAWA et al. 2005). A P-gp pode interferir na absorção de um composto caso este seja seu substrato específico (JÄHNE et al. 2016).

A permeação de compostos na monocamada de células Caco-2 ocorre por transporte passivo, podendo ser pelo interior da célula (transcelular) ou através das junções entre as células (paracelular) (Figura 2) (BALIMANE; CHONG; MORRISON, 2000).

Além disso, na borda em escova da célula Caco-2 são encontradas enzimas como a dipeptidil peptidase IV (CD26), que é uma hidrolase capaz de converter certos compostos não permeáveis e inativos em estruturas permeáveis e ativas como, por exemplo, a conversão de pró-fármacos (HUBATSCH; RAGNARSSON; ARTURSSON, 2007).

Figura 2. Permeação transcelular e paracelular na monocamada de células Caco-2 (enterócitos).
Fonte: Adaptado de STEVENS, 2014.



Nos ensaios de permeabilidade *in vitro* com Caco-2 é utilizado um sistema de placas com *inserts* em que a permeabilidade aparente (P_{app}) é medida na monocamada da direção apical para a basolateral ($P_{app(A-B)}$) podendo também ser medida na direção inversa ($P_{app(B-A)}$), quando o interesse é estudar as bombas de efluxo (GU et al. 2016). Dessa forma, a permeabilidade aparente pode ser calculada fornecendo indícios da expectativa de absorção *in vivo*.

B) Metabolismo

Os ensaios de metabolismo – ou estabilidade metabólica - são úteis para esclarecer se a principal rota de eliminação do composto é através do clearance renal ou hepático.

Alguns sistemas são utilizados para o ensaio de metabolismo *in vitro* como, por exemplo: microssomos, frações de S9 retiradas do fígado, hepatócitos e modelo biomimétrico (microorganismos). Ensaio com microssomos e hepatócitos são mais comuns, no entanto, os microssomos apresentam maior facilidade para estudos de biotransformação oxidativa, além de serem mais acessíveis financeiramente e possuírem maior prazo de armazenamento (RILEY; GRIME, 2004; BAUERMEISTER et al. 2016; ZVEREVA et al. 2016).

Os microssomos são frações subcelulares metabolicamente ativos e se encontram na forma de vesículas no retículo endoplasmático das células do fígado de humanos e de animais, apresentando uma grande quantidade do citocromo P-450 que é uma superfamília de enzimas. Os ensaios *in vitro* utilizando microssomos permitem a determinação do metabolismo de compostos através das enzimas do citocromo P-450, que são responsáveis pela biotransformação oxidativa da maioria dos fármacos e a formação de possíveis metabólitos. (MAZUR et al. 2009; BAUERMEISTER et al. 2016;

ZVEREVA et al. 2016).

O metabolismo *in vivo* pode ser estimado através dos valores do clearance intrínseco (Cl_{int}), que é determinado nos ensaios *in vitro*. Os valores de Cl_{int} de candidatos a fármacos ajudam a estimar se o metabolismo é a principal via de depuração quando comparado com a depuração total *in vivo*, dessa forma, ajudam a selecionar os candidatos a fármacos mais promissores, de acordo com a sua estabilidade metabólica. A medida do clearance é através de um sistema dinâmico, de entrada e saída do composto na célula, por difusão e metabolismo (RILEY; GRIME, 2004; LU et al. 2006).

Os ensaios de metabolismo são realizados *in vitro* utilizando-se microsossomos hepáticos, em que é montado um sistema de incubação que mimetiza um organismo, com agitação e temperatura controlada. Nesse sistema, o composto de estudo é incubado com os microsossomos e, a partir das amostras analisadas, é possível calcular o clearance intrínseco que direcionará os futuros estudos *in vivo*.

O *Clearance* intrínseco pode ser calculado a partir da equação 1 (OBACH 2011; LU et al., 2006):

Equação 1.

$$Cl'_{int\ in\ vitro} = \frac{kV}{mg\ de\ proteína}$$

Onde, “k” é a inclinação da regressão do gráfico de decaimento das concentrações em função do tempo e “V” é o volume de incubação.

Esse *clearance* intrínseco poder ser extrapolado para um fígado como um todo (humano ou de rato) a partir da equação 2:

Equação 2.

$$Cl'_{int} = Cl'_{int \text{ in vitro}} \times \frac{\text{mg de microsomo}}{\text{g de fígado}} \times \frac{\text{g de fígado}}{\text{peso em kg}}$$

Em que se considera 45 mg de microsomo por 1 g de fígado e 45 g de fígado para 1 kg de peso corporal para ratos (OBACH, 2011).

O clearance hepático *in vivo* é calculado aplicando-se a equação 3, que considera a taxa de ligação às proteínas plasmáticas. (OBACH, 2011):

Equação 3.

$$CL_h = \frac{Q_h \cdot f_u \cdot CL'_{int}}{Q_h + f_u \cdot CL'_{int}}$$

Em que Q_h é o fluxo sanguíneo hepático que varia com a espécie (para o homem 21 ml/min/kg; para rato 70 ml/min/kg); f_u é a fração livre de ligação proteica do composto e Cl_{int} é o *clearance* intrínseco obtido de acordo com a equação 2 anteriormente citada.

No sangue, o composto pode se encontrar em fração livre ou ligado às proteínas plasmáticas. Está disponível para sofrer metabolização, somente a fração livre do composto, portanto, a quantidade que está ligada às proteínas plasmáticas não é metabolizada e eliminada. Dessa forma, é importante considerar a taxa de ligação a essas proteínas, uma vez que, influenciam diretamente no valor do *clearance* e na meia vida de eliminação (TOUTAIN; BOUSQUET-MÉLOU, 2004).

2.3 Tripanossomíase Americana

A tripanossomíase americana ou Doença de Chagas é causada pelo agente etiológico o protozoário flagelado *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*) que parasita mamíferos. O *T. cruzi* pode ser transmitido ao homem através da via vetorial (insetos triatomíneos conhecidos popularmente como barbeiro, chupões ou bicudo), oral, amamentação, transfusão sanguínea, transmissão congênita, coito e transplantes. A transmissão oral é atualmente a principal via de contaminação, podendo ocorrer através da ingestão de alimentos contaminados com as fezes e urinas do triatomíneo, com destaque para o açaí e o caldo de cana (PESSÔA; MARTINS, 1988; NEVES et al. 2011; COURA; JUNQUEIRA, 2012; BARBOSA et al. 2015).

A forma evolutiva do *T. cruzi* é complexa e o parasito adota diferentes formas, sendo no sangue circulante do hospedeiro vertebrado a tripomastigota (Figura 3), enquanto que a forma amastigota (Figura 4) é encontrada nos tecidos (REY, 2011).

O parasito apresenta populações heterogêneas com alta variação polimórfica, parasítica, na atuação em relação a diferentes hospedeiros, adaptação às diversas espécies de vetores, sensibilidade ao sistema imunológico etc. O polimorfismo resulta em diferentes cepas (tripomastigotas delgados, intermediários ou largos) que apresentam características comportamentais diferentes no decorrer da infecção (CIMERMAN, 2010; NEVES, 2011).

Figura 3. Forma tripomastigota do *T. cruzi* em esfregaço de sangue. Fonte: Adaptado de CDC, 2017.

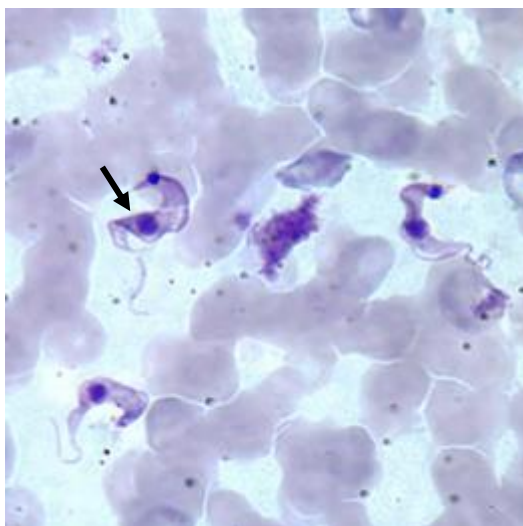
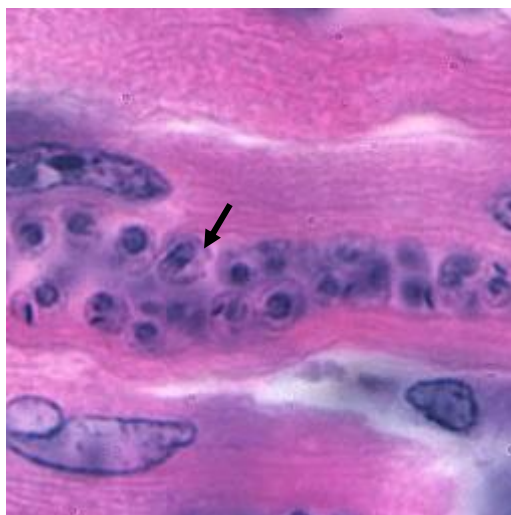


Figura 4. Forma amastigota do *T. cruzi* em tecido cardíaco. Fonte: Adaptado de CDC, 2017.



A doença de Chagas acomete a população de praticamente todo o continente Americano, apresentando uma mudança no perfil das áreas afetadas por essa doença

devido a industrialização e urbanização, passando da característica de doença comum da zona rural para um contexto urbano (DIAS et al. 2015; CDC, 2017).

Apesar de ser considerada negligenciada, merece atenção dos órgãos responsáveis pelo controle da saúde pública, uma vez que, a doença de Chagas apresenta áreas endêmicas em 21 países latino Americanos, e o resultado disso são mais de 6 milhões de pessoas infectadas pelo *T. cruzi*. Além disso, a doença também tem alcançado países não endêmicos (DIAS et al. 2015; WHO, 2018).

Só no Brasil, existe mais de 1 milhão de pessoas infectadas pelo parasito, sendo que 95% dos casos de tripanossomíase americana se concentram na região norte do país, inserindo a doença de Chagas no ranking das quatro doenças que mais matam por motivos infecciosos e parasitários em nosso país (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2018).

2.3.1 Manifestação clínica

O estágio inicial, ou fase aguda da doença de Chagas, é geralmente assintomática, sendo os sinais mais característicos dessa fase o “sinal de Romanã” os “chagomas” na pele. Outra característica dessa fase é a grande quantidade de tripomastigotas circulantes e de células sendo parasitadas. Quando o sistema imunológico produz anticorpos específicos para a doença, a carga parasitária na corrente sanguínea é combatida e o *T. cruzi*, para se proteger, tende a parasitar as células, dando início a fase crônica (ANVISA, 2008; CIMERMAN, 2010; FIOCRUZ, 2018).

Após a fase aguda, cerca de 40% dos indivíduos infectados pelo *T. cruzi* evoluirão para a fase crônica sintomática, o restante não apresentará quadro clínico da doença, evoluindo para uma forma crônica indeterminada ou de latência (FIOCRUZ, 2018; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2018).

A fase indeterminada é considerada a forma clínica mais comum da doença, os pacientes são assintomáticos, podendo evoluir para a cardiopatia devido a fatores ligados a cepa de *T. cruzi*, ao sistema imunológico do paciente, sexo, idade, nutrição, entre outros, irão influenciar na progressão e na gravidade da doença (REY, 2011; FIOCRUZ, 2018; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2018).

Estudos recentes mostram quais pacientes assintomáticos são mais susceptíveis a progredir para a cardiopatia. Guedes et al. (2012), realizaram um estudo que relaciona a atividade supressora das células T reguladoras com a gravidade da miocardite em pacientes chagásicos. Nos pacientes assintomáticos ou com baixo grau de miocardite, as células T reguladoras se apresentaram mais supressoras do que nos pacientes com miocardite moderada e grave. Nestes últimos, ocorre uma deficiência na atividade supressora das células T reguladoras e o sistema imunológico é conduzido a produzir maior quantidade de citocinas pró-inflamatórias (IFN-gama e TNF-alfa), danificando as células do tecido cardíaco. Com essas observações da relação da atividade das células T reguladoras e o grau de miocardite seria possível prever quais pacientes assintomáticos são mais predispostos a progredir para a cardiopatia.

Na fase crônica ocorre a forma clínica mais crítica da doença de Chagas. Nesta fase, as formas amastigotas do *T. cruzi* se alojam nos tecidos cardíacos, gerando sérias lesões no tecido, comprometendo as funções cardíacas, como o bombeamento do sangue e o ritmo cardíaco, além da cardiomegalia. Outros sintomas são hepatomegalia, episódios de tromboembolismo e comprometimento do sistema digestivo (CIMERMAN, 2010; REY, 2011; MSF, 2018).

2.3.2 Tratamentos

Apesar da doença de Chagas ser antiga e acometer milhares de pessoas, ainda não existe uma terapêutica que seja de fato efetiva contra o *T. cruzi* (NEVES et al. 2011).

São poucas as opções de medicamentos, sendo indicado o uso do benzonidazol e do nifurtimox, que apresentam sucesso na terapêutica de até 70% durante a fase aguda. É indicado o uso de nifurtimox por 90 dias e de benzonidazol por 60 dias para que se alcance este nível de sucesso no tratamento (CIMERMAN, 2010; NEVES et al. 2011; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2018).

O nifurtimox é administrado pela via oral, na dose de 8 a 12 mg/kg por dia, agindo contra as formas tripomastigotas e parcialmente contra as formas amastigotas, sendo mais eficaz na fase aguda da doença de Chagas, além de ser considerado de alta toxicidade, sendo proibida a sua comercialização no Brasil (CIMERMAN, 2010; NEVES et al. 2011; USP, 2014). Em ensaios clínicos realizados por CANÇADO (1985), 68% dos pacientes tiveram que interromper o tratamento devido às reações adversas, que também foram observadas por outros autores (RASSI; FERREIRA, 1971; PRATA et al. 1975). Os efeitos adversos mais comuns do nifurtimox são náuseas, anorexia, vômitos, dores abdominais, alergia, polineuropatia, insônia e distúrbios comportamentais (CIMERMAN, 2010; NEVES et al. 2011).

O benzonidazol é administrado pela via oral, indicado na dose de 5 a 8 mg/kg por dia, demonstrando significativa ação antiparasitária somente contra as formas tripomastigotas do *T. cruzi*. Os efeitos adversos observados são perda de peso, vertigens, cefaleia, dermatopatia urticariforme, sonolência e dores abdominais (CIMERMAN, 2010; NEVES et al. 2011; MSF, 2018).

O benzonidazol é produzido pela LAFEPE (Laboratório Farmacêutico de

Pernambuco) e distribuído gratuitamente à população brasileira através do Sistema Único de Saúde (SUS), além de ser exportado para outros países endêmicos (LAFEPE, 2016; BRASIL, 2011).

Como critério de cura são indicados exames laboratoriais como: os parasitológicos (xenodiagnóstico, PCR e hemocultura) e os sorológicos (ELISA, RIFI, entre outros). São considerados curados os pacientes que apresentam os exames parasitológicos e sorológicos negativos (NEVES et al. 2016).

Na tentativa de erradicar o vetor, o governo brasileiro tem entrado com medidas para o controle dos triatomíneos através da melhoria das condições habitacionais. Para isso, em 2013, elaborou o Projeto de Melhoria Habitacional para o Controle da Doença de Chagas (PMHCh), para construção de novas casas (FUNASA, 2017).

A educação da população em relação à higiene pessoal, caseira, cuidados com a alimentação e a capacitação de profissionais da saúde em relação aos cuidados na realização de transfusões e coletas de sangue, são essenciais para o controle da doença (FIOCRUZ, 2018).

2.3.3 Estudos de novas moléculas para o tratamento da Tripanossomíase Americana

Devido a necessidade de novos medicamentos para o tratamento da doença de Chagas, a sociedade científica tem investido na pesquisa de novas moléculas com potencial ação contra o *T. cruzi*.

Em 2010-2011, o *Drugs for Neglected Diseases initiative* (DNDi) realizou estudos clínicos de fase I em humanos para avaliar a segurança e a farmacocinética do fexinidazol, antiparasitário de ação contra o *T. cruzi*, obtendo resultados positivos. Dessa forma, foram iniciados estudos clínicos de fase II que devem ser concluídos no

final de 2019 (CLINICALTRIALS, 2018).

O fexinidazol é um pró-fármaco da classe nitroimidazol que, no organismo, é oxidado gerando os metabólitos sulfóxido e sulfona dotados de ação terapêutica. O mecanismo de ação ainda não foi elucidado, porém, acredita-se que esse composto torna-se ativo através da metabolização das enzimas nitroredutases. Em estudos pré-clínicos, realizados em ratos na fase aguda da doença de Chagas, o fexinidazol agiu contra cepas que são resistentes ao benzonidazol e na fase crônica foi capaz de reduzir a miocardite dos animais tratados (TORRELE, et al. 2010; BAHIA, et al. 2012).

Novos compostos derivados da molécula 5-nitrofurano foram estudados, apresentando atividade anti *T. cruzi*. Os compostos BSF-37, BSF-38, BSF-39 e BSF-40 apresentaram maior atividade e seletividade, contra a forma amastigota da cepa Y de *T. cruzi*, do que o benzonidazol. Foram sugeridos estudos *in vitro* de ADME, para esses compostos (PALACE-BERL, 2016). O IC₅₀ e CC₅₀ dos compostos estão apresentados na Tabela 1:

Tabela 1. Ação dos compostos derivados da molécula 5-nitrofurano. Adaptado de PALACE-BERL, 2016.

	Forma amastigota cepa Y IC ₅₀ (μM) Média ± DP	CC ₅₀ (μM) Média ± DP
BSF-37	1,66 ± 0,62	19,68 ± 9,13
BSF-38	0,96 ± 0,1	42,53 ± 2,05
BSF-39	0,82 ± 0,12	nd
BSF-40	0,88 ± 0,3	22,53 ± 12,49

nd: não declarado

2.4 Leishmaniose Visceral Americana

A leishmaniose visceral americana ou calazar americano é uma doença sistêmica que tem como agente etiológico o parasito *L. (L.) infantum chagasi*. A principal via de contaminação é vetorial, através da picada do flebotomíneo fêmea da espécie *Lutzomyia longipalpis* popularmente conhecido como “mosquito-palha” ou “birigui”, a transmissão também pode ser através da forma congênita e venérea (PESSÔA; MARTINS, 1988; NEVES, 2016).

O parasito possui as formas amastigota (Figura 5) e promastigota (Figura 6), sendo que a amastigota é parasita intracelular no hospedeiro vertebrado, invadindo as células do sistema mononuclear fagocitário, tendo como maior alvo os macrófagos. No hospedeiro invertebrado, a forma amastigota se transforma para promastigota, que migra para o tubo digestivo do inseto (CIMERMAN, 2010; NEVES et al. 2011).

Figura 5. Forma amastigota de *Leishmania* sp. em biópsia de tecido da pele. Fonte: Adaptado de CDC, 2017.

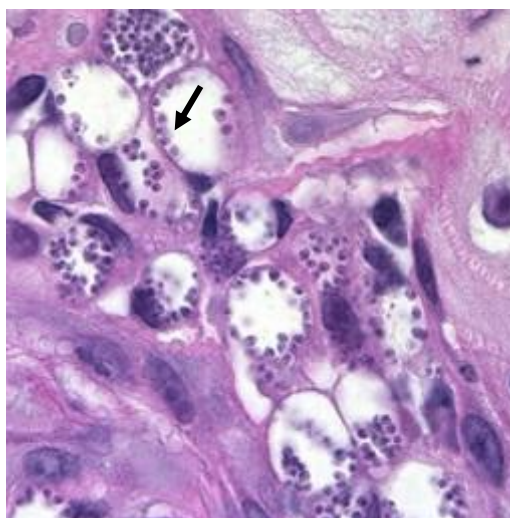
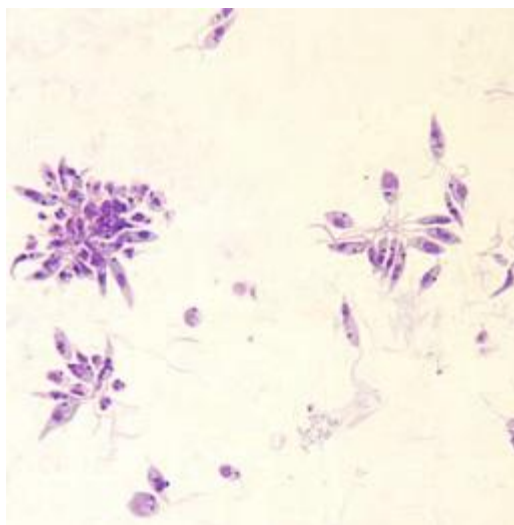


Figura 6. Forma promastigota da *Leishmania sp* em cultura celular. Fonte: Adaptado de CDC, 2017.



Está entre as doenças tropicais negligenciadas que mais matam, podendo evoluir para o óbito em mais de 90% dos casos, quando não tratada (MSF, 2018).

É uma doença endêmica em mais de 60 países, sendo mais de 200 mil novos casos por ano em todo o mundo (MSF, 2018). Isso porque existem diferentes espécies do gênero *Leishmania* espalhadas por vários continentes responsáveis por causar a leishmaniose visceral. Na América Latina, 90% dos casos ocorrem no Brasil, sendo mais de 3 mil registros todos os anos em nosso país (CDC, 2013; SBI, 2018).

2.4.1 Manifestação clínica

O quadro clínico da leishmaniose visceral, pode ser dividida em assintomática e sintomática (FIOCRUZ, 2018).

Nos casos assintomáticos, não ocorre manifestações clínicas da infecção e a doença só é detectada através de exames sorológicos. Já os casos clínicos sintomáticos da leishmaniose visceral são divididos em duas fases: a aguda e a crônica

(NETO et al. 2008).

Na fase aguda, ou período inicial da doença, o indivíduo pode demorar até 8 meses para a manifestação dos sintomas, podendo apresentar febre prolongada, perda de peso, fraqueza, anemia, fadiga muscular, tosse, diarreia, discreto aumento do fígado e do baço (NEVES et al. 2016; MSF, 2018).

A fase crônica, ou período de estado, é marcada principalmente pela hepatoesplenomegalia acentuada e a demora no diagnóstico e no tratamento pode resultar no óbito do paciente (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014).

2.4.2 Tratamento

Os compostos antimoniais pentavalentes (Sb^{5+}) são utilizados no tratamento da leishmaniose desde 1940. Devido à escassez de opção terapêutica para o tratamento da leishmaniose visceral, esses compostos antimoniais ainda são utilizados como medicamentos de primeira escolha na maioria dos países, sendo estes: o antimoniato de meglumina (Glucantime[®]) e estibogluconato sódico (Pentostam[®]) (NEVES et al. 2016; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2018) .

No Brasil, é utilizado como fármaco de primeira escolha o Glucantime[®], distribuído gratuitamente pelo SUS. Como segunda escolha é indicado o uso de anfotericina B lipossomal (Ambisome[®]), anfotericina B em dispersão coloidal (Amphotec[®]) e anfotericina B em complexo lipídico (Abelcet[®]). Essas formulações lipídicas de anfotericina B tem como objetivo diminuir os efeitos adversos causados pelo fármaco e aumentar a eficácia terapêutica (BRASIL, 2017; NEVES et al. 2016).

O antimoniato de N-metil glucamina é produzido e comercializado pela Sanofi[®]. Segundo orientações do produtor, a administração é realizada por via parenteral,

podendo ser intravenosa ou intramuscular, na dose de 20 mg/kg/dia de antimônio pentavalente (Sb^{+5}) durante 20 dias seguidos. Cerca de 80% da dose é eliminada na forma inalterada através da urina em um período de 24 horas. Apresenta duas fases de eliminação, na primeira a meia-vida é de 2 horas e na segunda a meia vida é de 76 horas (ANVISA, 2015).

O mecanismo de ação dos antimoniais é inibir as enzimas da via glicolítica e da oxidação de ácidos graxos do parasito. Como efeitos adversos, apresentam elevada toxicidade cardíaca (tornando necessário o monitoramento dos batimentos cardíacos), além de dano renal, hepático, pancreático e gastrointestinal, gerando náuseas, dores abdominais e anorexia (NETO et al. 2008; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014).

Em alguns casos, as formulações lipídicas de anfotericina B são indicadas como medicação de primeira escolha como é o caso de gestantes, crianças menores que 1 ano, insuficiência hepática e cardíaca, portadores de HIV, falha na terapêutica com o antimoniato de N-metil glucamina, entre outros (NEVES et al. 2016).

A anfotericina B é um antibiótico muito utilizado para o tratamento de fungos e o mecanismo de ação é o mesmo para a *Leishmania*. A anfotericina B age alterando a permeabilidade da membrana plasmática do parasito, através da ligação com esteroides presentes na membrana, resultando na lise celular. Os efeitos adversos observados na administração deste fármaco são febre, cefaleia, dores nos músculos e nas articulações, vômitos e astenia (NETO et al. 2008; ANVISA).

A cura é admitida com a erradicação dos sintomas clínicos, como o desaparecimento da febre, redução do fígado e baço que ocorre dentro de poucas semanas de tratamento, sendo visível a melhora geral do paciente. Mesmo desaparecendo os sintomas, o paciente deve ser acompanhado por mais 12 meses, caso o seu estado esteja estável nesse período, então é considerado curado. As

provas sorológicas demoram para se negativar, por isso não são aconselhadas (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014).

Os antimoniais indicados podem resultar no desaparecimento dos sintomas clínicos, no entanto, o parasito demora para ser eliminado completamente. O homem não tem relevância como reservatório do parasito, ao passo que, os cães servem como fonte de infecção para os flebotomíneos, trazendo riscos para a saúde pública. O Ministério da Saúde recomenda, sob sua supervisão, a eutanásia dos animais infectados pelo parasito (BRASIL, 2017; DANTAS-TORRE, 2007).

No Brasil, o Ministério da Saúde adotou uma série de medidas para o controle da leishmaniose que estão centradas na eliminação dos reservatórios, tratamento dos portadores, conscientização da população, redução dos vetores e eliminação dos reservatórios. O cão é o principal reservatório doméstico e, caso esteja infectado com a *Leishmania*, deverá ser eutanasiado. O destino dos cadáveres dos animais eutanasiados ou que morreram devido a leishmaniose serão de responsabilidade da ANVISA. Outro problema que merece atenção pelos órgãos responsáveis pela saúde pública da doença, é que profissionais da saúde responsáveis pelo manejo dos casos suspeitos, não estão sabendo identificar as manifestações clínicas da leishmaniose visceral, sendo necessário melhor capacitação e monitoramento desses profissionais. (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014; ROMERO, 2016).

Trabalhos recentes mostram que essas medidas não estão sendo suficientes, uma vez que a doença tem se espalhado cada vez mais pelo Brasil e a notificação dos casos de leishmaniose visceral tem aumentado. Sevá *et al.* (2017), utilizaram um modelo inovador espaço-temporal Bayesiano para prever futuras progressões geográficas da epidemia, identificando áreas estratégicas de intervenções para o controle da propagação do vetor e disseminação do parasito. Essas informações

podem ajudar no controle da leishmaniose pelas autoridades brasileiras de saúde pública.

Os medicamentos utilizados no tratamento da leishmaniose são de baixa adesão pelos pacientes devido a via de administração ser parenteral, além de apresentarem alta toxicidade. Resumidamente, no Brasil, é utilizado como fármaco de primeira escolha o Glucantime[®] e como segunda escolha é indicado o uso de anfotericina B, que também é administrado pela via parenteral e apresenta efeitos tóxicos. (NETO et al. 2008).

2.4.3 Estudos de novas moléculas para o tratamento da leishmaniose visceral

Mowbray et al. (2015) realizaram um estudo e demonstraram que uréias sintetizadas a partir de moléculas intermediárias do aminopirazol apresentam alta atividade contra a *leishmania infantum* e *leishmania donovani*, ambas responsáveis por causar a leishmaniose visceral. Os compostos apresentaram alta atividade contra a forma amastigota da *L. infantum* e boa estabilidade metabólica nos ensaios com microsomas de rato. Nos estudos *in vivo*, um desses compostos apresentou alta eficácia (92,7% de redução dos parasitas no fígado), sem apresentar toxicidade, além de demonstrar um bom perfil farmacocinético. Nos estudos *in vitro*, para o mesmo composto, o IC₅₀ foi 2,37 µM e o CC₅₀ foi > 57 (MOWBRAY et al. 2015).

Em 2016, foi realizado um estudo com o linalol e o eugenol, componentes extraídos de óleo essencial, que apresentaram atividade contra a *L. infantum chagasi*. Esses compostos apresentaram LD₅₀ de 220 µg/mL para o eugenol e 550 µg/mL para o linalol, contra as formas amastigotas do parasito. Nesse estudo, também constatou-se que o eugenol e o linalol promovem o aumento das atividades das proteínas quinases

PKC e PKA da *L. infantum chagasi*, que provavelmente está relacionada à resistência do parasito ao estresse oxidativo, fortalecendo a ideia de que o eugenol mata os parasitos reduzindo a resistência de espécies reativas de oxigênio (DUTRA et al. 2016).

2.5 Compostos análogos derivados do gibilimbol, uma nova perspectiva para o tratamento da doença de Chagas e da Leishmaniose Visceral

Considerando as limitações para o tratamento da doença de Chagas e da leishmaniose visceral e tendo em vista a gravidade dessas doenças, o grupo de pesquisa da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP) reportou a atividade antiparasitária do gibilimbol (A e B), um derivado de alquifenol isolado do óleo essencial das folhas de *Piper malacophyllum* (Piperaceae) com ação antiparasitária contra as formas amastigota e tripomastigota do *T. cruzi* e contra as formas amastigota e promastigota da *Leishmania (L.) infantum* (OLIVEIRA et al. 2012).

O gibilimbol B age interferindo na permeabilidade da membrana plasmática da *L. i. chagasi* apresentando ação semelhante à anfotericina B, essa ação poderia ser resultado de uma similaridade com os fosfolipídeos da membrana, sendo o grupo hidroxila a parte polar e a cadeia alquílica a parte lipofílica. Outra característica do gibilimbol A e B é que apresentam toxicidade significativa sobre as células de mamíferos (VARELA et al. 2018) e essa baixa seletividade para a toxicidade celular representa desvantagem para sua aplicação terapêutica direta.

Dessa forma, foram sintetizados análogos dessas moléculas que se apresentaram mais seletivos do que o gibilimbol, resultando em maior atividade contra os parasitos e menor toxicidade em células de mamíferos. Entre os derivados sintetizados se destacaram, em termos de atividade, os compostos LINS03006,

LINS03011 e LINS03013 (Figura 7) (VARELA et al. 2016; VARELA et al. 2017).

O composto LINS03011 foi o que apresentou melhor atividade contra as formas do *T. cruzi* (tripomastigota e amastigota) e da *L. (L.) infantum* (promastigota e amastigota), enquanto o composto LINS03013 apresentou boa atividade contra a forma amastigota do *T. cruzi* e o composto LINS03006 apresentou alta atividade contra a forma promastigota da *L. (L.) infantum*, como pode ser observado na Tabela 2. Os estudos sugerem que o nitrogênio na posição C-2 da cadeia lateral dos derivados fenólicos aumentou significativamente a atividade contra a *L. i. chagasi* promastigota (VARELA et al. 2016; VARELA et al. 2017).

Figura 7. Estruturas dos novos compostos derivados do gibilimbol A e B. Adaptado de VARELA et al. 2016, VARELA et al. 2017.

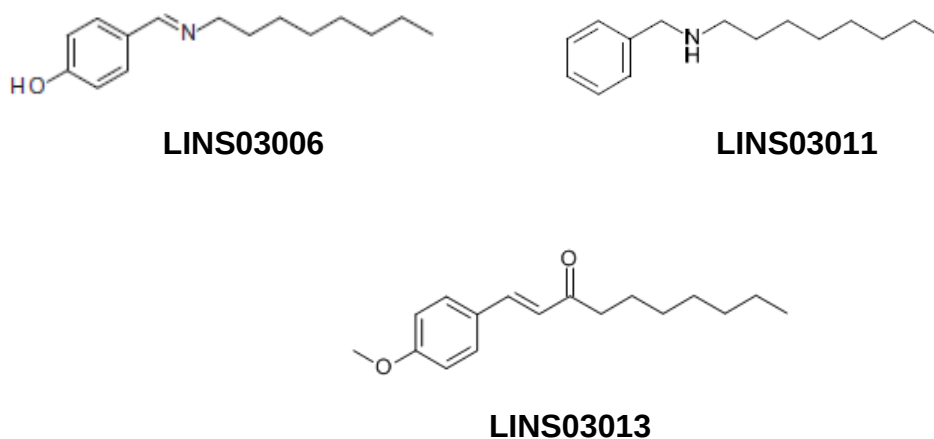


Tabela 2: Atividade antiparasitária dos compostos LINS contra a *L.(L) infantum* e o *T.cruzi*. Adaptado de VARELA et al. 2016, VARELA et al. 2017.

Compostos	<i>L.(L) infantum</i>		<i>T. cruzi</i>	
	Amastigota IC ₅₀ (μM)	Promastigota IC ₅₀ (μM)	Amastigota IC ₅₀ (μM)	Tripomastigota IC ₅₀ (μM)
LINS03006	-	19,9	-	-
LINS03011	16,7	3,0	13,3	20,7
LINS03013	-	-	26,2	-

IC₅₀: 50% da concentração inibitória mínima

(-) não se dispõe da informação

Considerando os resultados promissores de atividade *in vitro* desses compostos, realizar a avaliação das propriedades físico químicas e de ADME precocemente deve agilizar o desenvolvimento com planejamento fundamentado dos estudos *in vivo*, tanto para a obtenção do perfil farmacocinético como para a avaliação da atividade.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Realizar estudos *in vitro* para avaliar propriedades físico químicas e de ADME dos compostos derivados do gibilimbol LINS03006, LINS03011 e LINS03013 e obter informações para fundamentar a seleção dos compostos mais promissores para a condução dos estudos de farmacocinética e para planejar os estudos *in vivo*.

3.2 Objetivos específicos

- Desenvolver os métodos analíticos e bioanalíticos para quantificação dos compostos LINS03006, LINS03011 e LINS03013 através da cromatografia líquida de ultra eficiência (UHPLC) acoplado ao detector UV-visível;
- Determinar o log P dos compostos LINS03006, LINS03011 e LINS03013;
- Realizar o ensaio de estabilidade química dos compostos LINS03006, LINS03011 e LINS03013 nos pHs 1,2; 7,4 e 8,8;
- Realizar ensaio de estabilidade química *ex vivo* dos compostos LINS03006, LINS03011 e LINS03013 em plasma de rato;
- Realizar ensaio de permeabilidade dos compostos LINS03006, LINS03011 e LINS03013 através das células Caco-2;
- Realizar estabilidade metabólica dos compostos LINS03006, LINS03011 e LINS03013 em meio microssomal hepático de ratos e de humanos.

4. MATERIAL E MÉTODOS

Os compostos LINS03006, LINS03011 e LINS03013 foram sintetizados pelo grupo de pesquisa do Instituto de Ciências Ambientais, Químicas e Farmacêuticas da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP), sob orientações do Prof. Dr. João Paulo dos Santos Fernandes. Esses compostos foram gentilmente cedidos para a realização dos estudos desses candidatos a fármacos.

4.1. Desenvolvimento e validação dos métodos analítico e bioanalítico para a determinação dos compostos LINS03006, LINS03011 e LINS03013 por UHPLC

Foi desenvolvido o método analítico e bioanalítico para a quantificação desses compostos através da cromatografia líquida de ultra eficiência UHPLC Waters® equipado com detector UV-Visível. Inicialmente foi determinado o comprimento de onda dos compostos através de varredura realizada no espectrofotômetro Biotek®, sendo encontrada a maior absorvidade para LINS03006 e LINS03013 no comprimento de onda de 230 nm, e para LINS03011, no 200 nm. No entanto, para LINS03011 também foi realizada a leitura em 230 nm, devido a maior seletividade quando comparada ao comprimento de onda de 200 nm. Os métodos desenvolvidos foram os mesmos para todos os compostos, sendo a fase móvel na proporção de 70% acetonitrila (J. T. Backer) e 30% água, em modo isocrático e fluxo de 0,4 mL/min, utilizando-se coluna HSS C18 SB 1,8 µm 2,1 x 100 mm Waters®, coluna de guarda HSS C18 SB 1,8 µm 2,1 x 5 mm Waters®.

Para que os métodos analíticos e bioanalíticos pudessem ser utilizados, foram determinados os seus limites de confiança utilizando-se como base a RDC 166/2017 e

a RDC 27/2012 da ANVISA - validação parcial - avaliando-se os parâmetros precisão, exatidão, seletividade, linearidade e limite de quantificação.

Precisão e Exatidão

A precisão foi demonstrada através do cálculo do desvio padrão relativo (DPR) de acordo com a fórmula “ $DPR = DP / CMD \times 100$ ”, sendo DP o desvio padrão e CMD, a concentração média determinada. As amostras foram avaliadas em uma única corrida analítica, mantendo a mesma instrumentação, mesmo analista e as mesmas condições de operação.

A exatidão foi calculada para todos os pontos da curva analítica dividindo-se a concentração média experimental pela concentração teórica e multiplicando por 100. Para os métodos analíticos, o critério de aceitação foram aqueles de acordo com a RDC 166/2017, levando em consideração o objetivo do método, a sua variabilidade intrínseca, a concentração de trabalho e a concentração do analito na amostra. Já para os métodos bioanalíticos a variabilidade aceitável na precisão foi de 0 - 15% e para a exatidão de 85 - 115% (RDC 27/2012).

Seletividade

O método apresenta seletividade quando é capaz de identificar ou quantificar o analito de interesse em uma matriz na presença ou não de impurezas. Em métodos cromatográficos deve ser comprovada a pureza do sinal do analito.

A seletividade foi comprovada através da comparação do cromatograma do branco e do composto em questão, não sendo encontrado nenhum interferente no tempo de retenção do composto de interesse.

Linearidade

A linearidade é a capacidade do sistema analítico adotado apresentar respostas proporcionais ao valor do analito de interesse na amostra. Para os métodos analíticos e bioanalíticos, a linearidade foi determinada com a construção de curvas analíticas e foram consideradas lineares as curvas que apresentaram coeficiente de correlação (R) > 0,99 (RDC 166/2017 e RDC 27/2012). A curva de calibração foi construída a partir da razão da área do pico do analito (eixo y) (áreas obtidas através da média das triplicatas) sob a concentração teórica do analito (eixo x). Para algumas curvas foi utilizada a ponderação $1/y^2$, que distribui o peso nos pontos, normalizando a tendência da reta.

Limite Inferior de Quantificação

É a menor quantidade do analito que pode ser quantificada em uma amostra com precisão e exatidão adequadas à finalidade analítica. O sinal do sistema analítico, no limite de quantificação, deve apresentar uma resposta de no mínimo 5 vezes superior a qualquer ruído que apareça no tempo de retenção do composto de interesse. A precisão pode variar de 0 – 20% e a exatidão de 80 – 120%.

4.1.1 Método analítico

A) Em acetonitrila

Foi necessária a construção da curva analítica em acetonitrila para a realização da validação parcial do método analítico, garantindo a confiabilidade do método.

A curva analítica foi construída a partir de uma diluição seriada em acetonitrila, partindo de uma solução de 100 µg/mL. As concentrações utilizadas foram de 0,039;

0,078; 0,156; 0,312; 0,625; 1,25; 2,5; 5 e 10 µg/mL para os compostos LINS03006, LINS03011 e LINS03013, com triplicata de cada ponto. A ponderação $1/y^2$ foi utilizada para a curva de todos os compostos.

B) Em tampão Hank's

Para a quantificação dos compostos LINS no ensaio de permeação, a curva analítica foi construída em tampão Hank's e em triplicata para cada ponto. Para os compostos LINS03006 e LINS03013 foram utilizadas as concentrações de 0,039; 0,156; 0,625; 2,5; 5,0 e 10 µg/mL e para o composto LINS03011 as concentrações foram de 0,078; 0,156; 0,312; 0,625; 2,5; 5,0 e 10 µg/mL. A ponderação $1/y^2$ foi utilizada para a curva de todos os compostos.

4.1.2 Método bioanalítico

O método bioanalítico foi desenvolvido em plasma de rato, microsossomos de rato e de humano. Para o processamento das amostras, foi utilizado o método de precipitação de proteínas, adicionando-se acetonitrila gelada contendo diazepam (padrão interno - PI) e, posteriormente, as amostras foram levadas ao vórtex e centrífuga a 10000 rpm, a 5°C por 10 minutos. Então, o sobrenadante foi filtrado e analisado em UHPLC/UV.

Foi realizada a validação parcial através da construção das curvas de calibração em cada uma das matrizes:

A) Microsossomos hepáticos de rato

A curva analítica foi construída em microsossomos de rato e em 5 replicatas de cada ponto, para a quantificação dos compostos no ensaio de metabolismo utilizando-se essa matriz. Para o composto LINS03006, LINS03011 e LINS03013 foram utilizadas as concentrações de 0,078; 0,156; 0,312; 0,625; 1,25 e 2,5 µg/mL. A ponderação $1/y^2$ foi utilizada para as curvas dos compostos LINS03006 e LINS03011.

B) Microsossomos hepáticos de humano

A curva analítica foi construída em microsossomos de humano e em 5 replicatas de cada ponto, para a quantificação dos compostos no ensaio de metabolismo utilizando-se essa matriz. Foram utilizadas as concentrações de 0,078; 0,156; 0,312; 0,625; 1,25 e 2,5 µg/mL para os compostos LINS03006 e LINS03013 e 0,039; 0,078; 0,156; 0,312; 0,625 e 1,25 µg/mL para LINS03011. A ponderação $1/y^2$ foi utilizada para todos os compostos.

C) Em plasma de rato

A curva analítica foi construída em plasma de rato e em 5 replicatas de cada ponto, para a validação parcial do método bioanalítico nessa matriz, devido ao ensaio de estabilidade *ex vivo*. Foram utilizadas as concentrações de 0,624; 1,25; 2,5; 5,0; 10 e 20 µg/mL para todos os compostos LINS. A ponderação $1/y^2$ foi utilizada para a curva dos compostos LINS03011 e LINS03013.

4.2 Estudos *in vitro*

4.2.1 Determinação do log P dos compostos LINS03006, LINS03011 e LINS03013

Determinação *in silico*

Foram utilizados os programas Marvin Sketch[®] 16.7.18 e ChemDraw[®] para a determinação do log P *in silico* dos compostos.

Método cromatográfico

Os compostos apresentaram características apolares através do método *in silico* e, dessa forma, foi escolhido o método cromatográfico para a determinação experimental do log P, uma vez que é o mais apropriado para compostos com log P entre 0 e 6.

O coeficiente de partição (log P) dos compostos foi determinado através do método cromatográfico de acordo com o guia da OECD/2004 (*Organization for Economic Co-operation and Development*). Foi plotada uma curva de calibração de log P por Log K (fator de capacidade) para o cálculo do valor do log P das substâncias de interesse e a curva foi construída com substâncias de log P conhecido recomendadas pelo guia, além dos compostos GQ11, GQ177 e GQ19, tiazolidinodionas para os quais o grupo de pesquisa já determinou os valores de LogP. O log P das substâncias utilizadas compreendeu o intervalo entre 0,77 a 6,2 (Tabela 3).

O sistema cromatográfico utilizado foi UHPLC/UV Waters[®] com fase móvel metanol:água com ácido fórmico 0,1% na proporção 70:30 e fluxo de 0,4 mL/min. Para a separação das moléculas foi utilizada a coluna BEH 2,1 x 50 mm, 1,7 µm com pré-coluna BEH 2,1 x 5 mm, 1,7 µm, mantida a 30°C.

Tabela 3: Log P dos padrões de calibração

Substância	Log P
Acetanilida	1,0
Ác Benzóico	1,9
GQ19	1,87
Probenecida	2,3
Diazepam	2,7
Naftaleno	3,6
Timol	3,3
GQ177	3,5
Fenantreno	4,5
GQ11	5,11
DDT	6,2
Benzonidazol	0,77
Isoniazida	- 0,8

Para a construção da curva de log k versus log P, o fator de capacidade (k) foi calculado para cada padrão de acordo com a fórmula:

$$k = \frac{t_r - t_0}{t_0}$$

Em que, t_r é o tempo de retenção da substância e t_0 é o tempo morto, que é definido como o tempo em que não ocorre retenção de um composto na coluna. Para o cálculo do tempo morto, foi considerado as dimensões da coluna cromatográfica.

A partir da curva da reta conseguida, foi calculado o $\log P$ dos compostos LINS.

4.2.2 Ensaio de estabilidade química dos compostos LINS03006, LINS03011 e LINS03013 nos pHs 1,2 ; 7,4 e 8,8

Os compostos foram submetidos às condições de pH 1,2 (tampão Clark-Lubs, cloreto de potássio e ácido clorídrico ambos a 0,2M) e de pH 8,8 (tampão tris-HCl, NaOH 2M) (CAMPOS *et al.* 2016). Também foi determinada a estabilidade dos compostos em tampão Hanks de pH 7,4, utilizado no ensaio de permeabilidade por Caco-2. O tampão Hanks Sigma® foi preparado segundo as instruções do fabricante, adicionando-se bicarbonato de sódio a 7,5% e o pH ajustado com HCl 1N.

O procedimento de preparação das amostras e de execução do ensaio de estabilidade foi o mesmo para os três tampões. Dessa forma, foram preparadas em tampão e em triplicata as soluções de controle de qualidade baixo (CQB) de 1,25 $\mu\text{g/mL}$ para LINS03011 e 0,078 $\mu\text{g/mL}$ para LINS03006 e LINS03013, além do controle de qualidade alto (CQA) que foi de 8,0 $\mu\text{g/mL}$ para todos os compostos. Essas soluções foram mantidas constantemente sob agitação a 100 rpm e temperatura de 37°C por 24 horas em incubadora 430 Ethik®. As coletas foram realizadas em triplicatas, em intervalos de 0', 5', 15', 30', 45', 60', 90', 2h, 4h, 6h, 8h, 10h, 12h e 24h. Então, as amostras foram injetadas no UHPLC/UV Waters®, utilizando-se o método analítico previamente desenvolvido.

As áreas dos picos dos compostos foram transcritas para o Excel onde foi calculada a quantidade remanescente dos compostos no ensaio com cada tampão,

sendo realizada a análise de distribuição normal dos dados no programa Minitab18 e a partir deste teste, foi decidida a análise de variância (ANOVA) a utilizar para a avaliação estatística através do Prism5 GraphPad®.

4.2.3 Estabilidade *ex vivo*

O ensaio de estabilidade química *ex vivo* foi realizado em plasma de rato para avaliar o grau de degradação dos compostos LINS03006, LINS03011 e LINS03013 frente às enzimas presentes nessa matriz biológica.

As concentrações utilizadas nesse estudo foram baseadas no IC₅₀ dos compostos LINS no estudo de Varela (2016) e Varela (2017). Dessa forma, as concentrações utilizadas foram de 20 µM para LINS03006, 20,7 µM para LINS03011 e 26,2 µM para LINS03013. Para atingir essas concentrações, as amostras foram diluídas em plasma a partir de uma solução inicial na concentração de 10 µg/mL diluída em acetonitrila, sendo preparada a triplicata para cada um dos compostos LINS. Essas soluções foram mantidas constantemente sob agitação a 100 rpm e temperatura de 37°C por 24 horas em incubadora 430 Ethik®. As coletas foram realizadas nos intervalos de 0', 30', 1h, 2h, 4h, 6h, 8h, 10h, 12h e 24h. As amostras foram processadas através do método de precipitação de proteínas (descrito no item 4.1.1.2) e analisadas em UHPLC/UV.

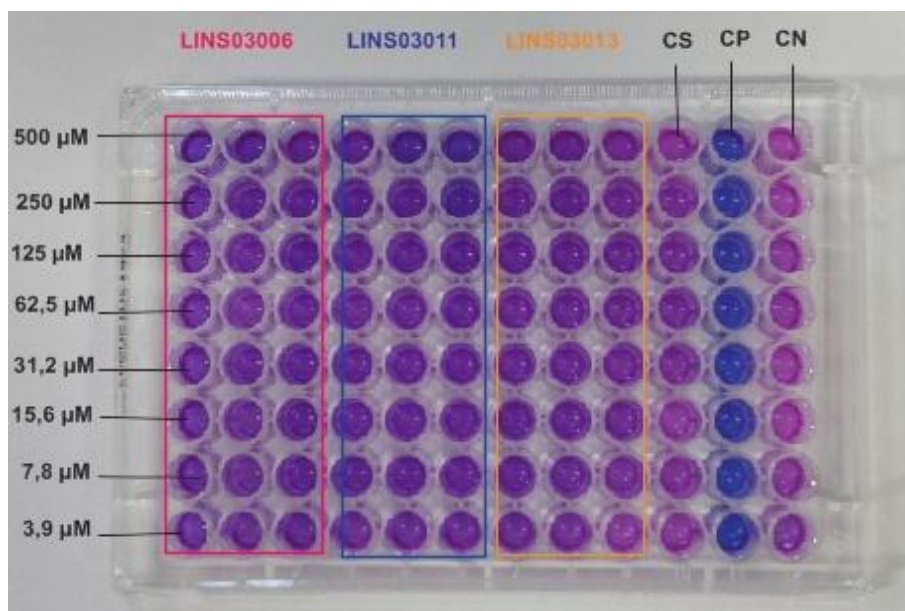
As áreas dos picos dos compostos foram transcritas para o Excel onde foi calculada a quantidade remanescente dos compostos, sendo realizada a análise de distribuição normal dos dados no programa Minitab18 e a partir deste teste, foi decidido qual ANOVA utilizar para a análise estatística através do Prism5 GraphPad®.

4.2.4 Ensaio de citotoxicidade pelo teste da Resazurina em células Caco-2

O ensaio da resazurina proposto por NAKAYAMA et al. (1997), consiste na determinação da citotoxicidade através da ação de enzimas mitocondriais que reduzem o corante óxido-redutor resazurina em resorufina. A resazurina é reduzida no citoplasma celular e excretada para o meio.

As células Caco-2 foram cultivadas por alguns dias até que a cultura atingisse alta confluência. Então, as células foram retiradas da garrafa de cultivo utilizando-se tripsina, foram centrifugadas em tubos falcon e contadas em câmara de Neubauer, sendo necessária uma concentração de 150×10^4 células em 200 μ L. Posteriormente, as células foram plaqueadas em 3 placas de 96 poços e incubadas por 24h em estufa de CO₂. Em outra placa sem células, foi realizada uma diluição seriada, nas concentrações de 1000, 500, 250; 125; 62,5; 31,2; 15,6; 7,8 e 3,9 μ M. Então, a placa contendo as células teve o meio de cultura trocado e foram adicionados 100 μ L de meio de cultura novo, posteriormente, 100 μ L das concentrações dos compostos preparadas anteriormente, foram adicionadas nas placas, como esquematizado na Figura 8.

Figura 8. Ensaio de citotoxicidade por redução da resazurina. Autoria própria.



CS - Controle solvente
 CP - Controle positivo
 CN - Controle negativo

Para o preparo dos controles, como a solução inicial dos compostos foi preparada em DMSO, foi realizado um controle solvente (CS) contendo 0,4% de DMSO, que corresponde à concentração final desse solvente nos poços com os compostos. Para o controle positivo (CP), foi utilizado 50% de DMSO diluído em meio e para o controle negativo (CN) foi utilizado somente meio de cultura. Todos os controles foram feitos em triplicata. Por fim, a placa foi incubada por 24h em estufa de CO₂. No dia seguinte, o meio contendo os compostos foi descartado e foi adicionada uma solução de resazurina na concentração de 398 µM em cada poço. A placa foi novamente incubada na estufa por 2 h e 30 min. Posteriormente, foi realizada a leitura da placa a 570 nm no espectrofotômetro Biotek®, com detector de fluorescência. O resultado da viabilidade foi obtido em porcentagem através do cálculo no Excel, em que a fluorescência de cada poço foi dividida pela fluorescência do CS (para eliminar

qualquer tipo de interferência que o solvente possa ter causado) e o resultado foi multiplicado por 100.

A resazurina, de coloração azul, foi reduzida a resorufina, de coloração rosa, nos poços em que as células se apresentaram viáveis. Assim, onde as concentrações avaliadas foram citotóxicas, ocorreu a diminuição do número de células, com consequente diminuição da bioconversão da resazurina (NAKAYAMA et al. 1997).

O ensaio de citotoxicidade foi necessário para a determinação das concentrações dos compostos a serem utilizados, posteriormente, nos ensaios de permeabilidade com as células Caco-2. Foram selecionadas para o ensaio de permeação as concentrações dos compostos que apresentaram 70% de viabilidade celular (FERNANDES, 2012).

4.2.5 Cultivo de células Caco-2

A linhagem celular de adenocarcinoma de cólon humano, Caco-2 (ATCC[®] HTB-37[™]) foi obtida do Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ). O cultivo foi realizado em Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) com 4500 mg/L D-glicose (Sigma-Aldrich), L-glutamina (584 mg/L), acrescido de 1% de aminoácidos não essenciais (MEM) e suplementado com 20% de soro fetal bovino (SFB) (Gibco[®]), mantidas em estufa com 5% de CO₂ a 37° C. As passagens celulares foram realizadas com tripsina 0,25% / EDTA 2,4 mM Gibco[®], quando as células atingiam 80-90% de confluência.

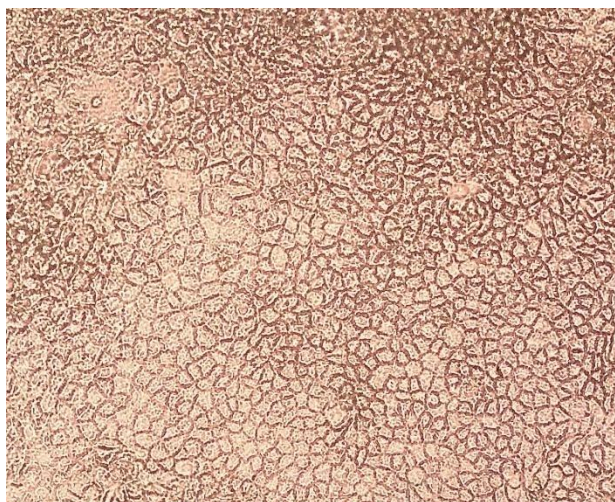
4.2.6 Cultivo das células Caco-2 em placas com sistemas de insertos ThinCert™ (Greiner Bio-One)

As células foram transferidas para as placas de 12 poços com o sistema de insertos ThinCert™, numa densidade de 5×10^4 cel/cm², para os futuros ensaios de permeação (Figura 9). A Figura 10 é uma foto das células tirada antes de serem transferidas para os insertes. Essa transferência foi realizada na 8ª passagem celular e foram mantidas nos insertos por 21 dias, somente com a troca do meio de cultura, sendo as condições de incubação as mesmas descritas anteriormente. Para garantir a formação da monocamada, foi medida a resistência elétrica transepitelial ($\Omega \times \text{cm}^2$) (RET) com o voltímetro (WPI®) no 10º, 15º e 21º dia de cultivo (YU; HUANG, 2011; GRANDIS, 2016).

Figura 9. Cultivo de células Caco-2 em placas com sistemas. Autoria própria.



Figura 10. Monocamada de células Caco-2. Autoria própria.



4.2.7 Ensaio de permeabilidade utilizando as células Caco-2

O ensaio de permeabilidade foi realizado no 21º dia de cultivo das células nos insertos. Previamente ao ensaio, as células foram lavadas com tampão Hank's (Sigma®) (pH 7,4) e mantidas neste tampão por 20 minutos a 37°C. A resistividade elétrica das membranas foi medida, sendo considerada ideal para o estudo aquelas que apresentaram RET (resistência elétrica transepitelial) acima de $200 \Omega \text{ cm}^2$ (HUBATSCH; RAGNARSSON; ARTURSSON, 2007). As soluções estoques dos compostos LINS03006, LINS03011 e LINS03013 foram preparadas em DMSO nas concentrações de 12,5 mM. Como controles de permeabilidade e integridade da monocamada, foram utilizados o verapamil e a fluoresceína ambos na concentração de 40 μM .

O experimento teve início com a adição de 5 μL das soluções estoques no compartimento apical contendo 500 μL de tampão Hank's, atingindo as concentrações finais de 125 μM . As placas foram mantidas em estufa agitadora à 37°C e 25 rpm.

Alíquotas de 200 μL foram coletadas na fase basolateral, contendo 1,5 ml de

tampão Hank's, nos tempos de 0, 15, 30, 60, 120 e 180 minutos. Após cada coleta, 200 µL de tampão Hank's foram repostos no compartimento basolateral. As amostras foram injetadas no equipamento UHPLC/UV Waters®.

Os dados obtidos foram utilizados para o cálculo da permeabilidade aparente (P_{app}) através da fórmula abaixo:

$$P_{app} = \left(\frac{V_A}{\text{Área} \times \text{Tempo}} \right) \times \left(\frac{[\text{composto}]_{\text{basolateral}}}{[\text{composto}]_{\text{apical, inicial}}} \right)$$

V_A = Volume no compartimento basolateral, em mL.

Área = área do inserto de cultivo, em cm².

Tempo = tempo transcorrido até a última coleta, em segundos.

[composto] basolateral = concentração do composto na última coleta.

[composto] apical = concentração inicial do composto no compartimento apical (PICHARDO, et al. 2017).

4.2.8 Ensaio de metabolismo

O estudo de metabolismo utilizando microssomos hepáticos de rato e humano (Gibco®) foi realizado para os compostos LINS03006, LINS03011 e LINS03013 em triplicata, nas concentrações de 2 µM (LINS03006 e LINS03013) e 5 µM (LINS03011). Foi utilizado o tampão fosfato salino (PBS) (Sigma®) a 0,1M, (pH 7,4) e sistema regenerador de NADPH (SRN) composto por NADP (2,89 mM), G6PD (0,89 U/mL), G6P (7,34 mM) e MgCl₂ (7,34 mM), responsável pela reposição de energia durante o experimento. Como controle positivo foi utilizado o diclofenaco a 2 µM. O sistema regenerador de NADPH tem a função de repor a energia para o meio, não permitindo o esgotamento desta, desta forma, garante o funcionamento das enzimas durante o

experimento (KUMAR et al. 2002; YAN; CALDWELL, 2004; LU et al. 2006).

Em placa de 12 poços, foram preparados 4 sistemas em triplicata: 1º) tampão e composto, 2º) microssomos, SRN e diclofenaco, 3º) microssomos, SRN e composto, 4º) microssomos, tampão e composto. Inicialmente, foi realizada uma pré-incubação dos compostos com tampão PBS (0,1M) ou SRN por 5 min em estufa a 37°C e agitação de 100 rpm, o mesmo foi feito para o controle. Após esse tempo, o experimento foi iniciado adicionando-se os microssomos (concentração final de 0,5 mg/mL) sendo o volume final de 1,5 mL. O controle da degradação espontânea dos compostos foi realizado em poços em que houve adição do composto e tampão sem a presença de microssomos. Alíquotas de 100 µL foram coletadas nos tempos 0, 5, 10, 20, 40, 60 e 120 minutos. A reação foi interrompida adicionando-se 100 µL de acetonitrila contendo diazepam, utilizado como padrão interno (YAN; CALDWELL 2004; LU et al. 2006). As amostras foram agitadas em vórtex por 70 segundos, centrifugadas a 5°C e 10000 rpm por 15 minutos, os sobrenadantes foram filtrados e injetados no UHPLC/UV.

Para a extração do diclofenaco (controle positivo) foi utilizado 1 mL de éter-metil-tert-butílico, agitação por 15 minutos em mesa agitadora e centrifugação a 10000 rpm e 5°C por 15 minutos. Os sobrenadantes foram separados e evaporados no evaporador a vácuo por 50 minutos a 45°C. Posteriormente, as amostras foram ressuspensas com 90 µL de solução de água e acetonitrila nas proporções de 40:60, respectivamente.

As amostras do diclofenaco foram injetadas em HPLC/MS (Perkin Elmer) e analisadas segundo o método: coluna Poroshell 120 EC-C18 (4,6x100mm, 2,7 µm), pré-coluna Poroshell 120 EC-C18 (4,6x5mm, 2,7 µm) (Agilent Technologies, Santa Clara, USA), fase móvel: acetonitrila/ácido fórmico 0,1% (60/40, v/v), vazão de 0,5

mL/min, em modo isocrático e o volume da injeção foi de 20 µL.

Os cálculos do clearance intrínseco foram realizados de acordo com Obach 2011, através das fórmulas abaixo:

$$Cl'_{intinvitro} = \frac{kV}{\text{mg de proteínas}}$$

$$Cl'_{int} = Cl'_{intinvitro} \times \frac{\text{mg microsossomos}}{\text{g de fígado}} \times \frac{\text{g fígado}}{\text{peso do animal em kg}}$$

$Cl_{intinvitro}$ – Clearance intrínseco *in vitro*

K ou Kel – constante de eliminação

V- volume total adicionado no poço para a incubação

Mg de proteína – volume de microsossomo adicionado na incubação

Cl_{int} – Clearance intrínseco do fígado de rato

Foram considerados 45 mg de microsossomos para 1 g de fígado de rato e 40 g de fígado por kg de peso corporal de rato.

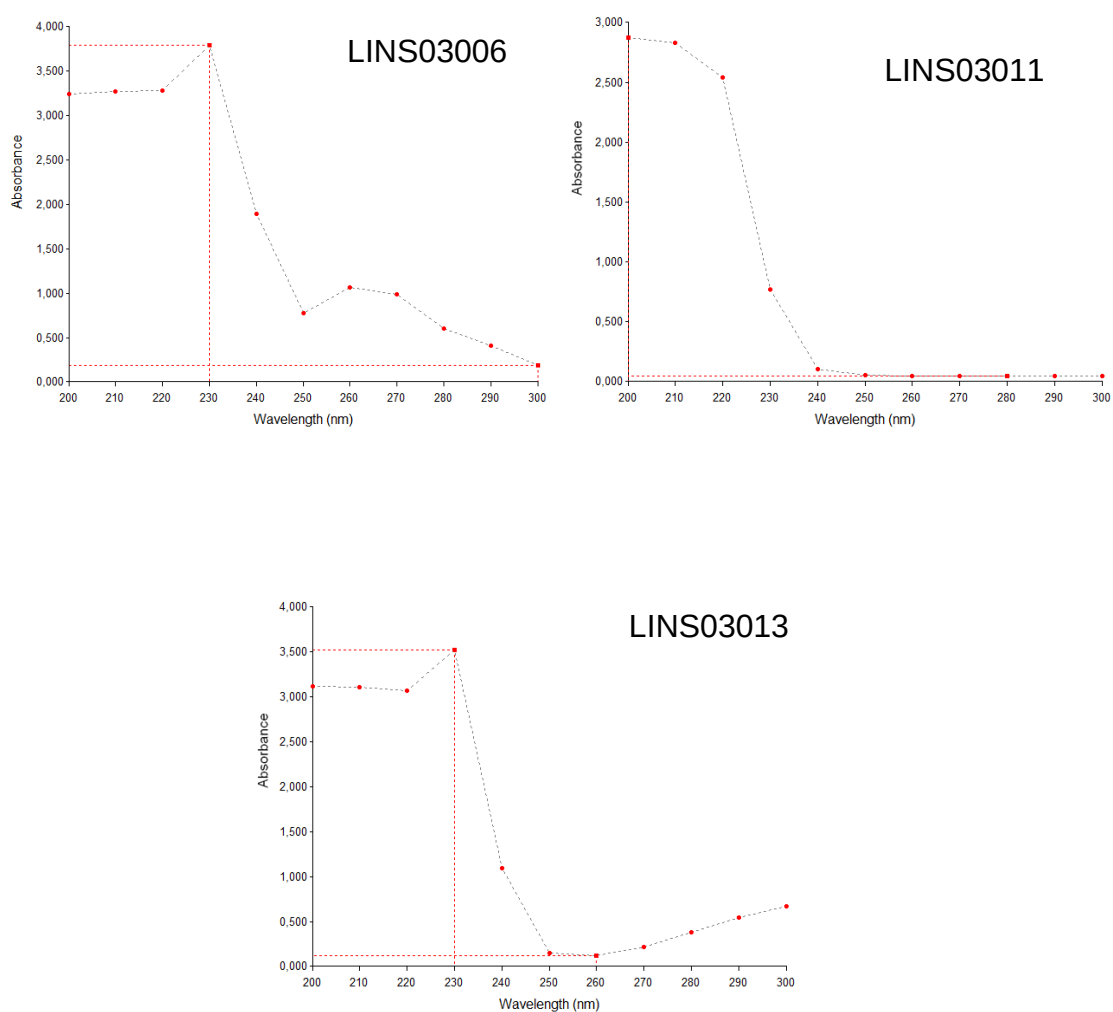
O K é a inclinação da regressão do gráfico de decaimento das concentrações em função do tempo e é utilizado para o cálculo da meia vida de eliminação através da fórmula $0,693/K$ [min].

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Desenvolvimento dos métodos analítico e bioanalítico para a determinação dos compostos LINS03006, LINS03011 e LINS03013 em UHPLC

A varredura realizada determinou o comprimento de onda em que há maior absorvidade para a leitura dos compostos, sendo definido para o LINS03006, o LINS03013 230 nm e 200 nm para o LINS03011, como mostra a Figura 11.

Figura 11. Varredura do comprimento de onda.



Para a realização da varredura, os compostos foram inicialmente dissolvidos em DMSO e, posteriormente, diluídos em metanol para a concentração de 100 µg/mL. Para os compostos LINS03006 e LINS03013O pico de absorção foi originado em 230 nm e para LINS03011 foi em 200 nm. No entanto, o DMSO puro também apresentou pico de absorção em 230 nm, desta forma, os compostos foram dissolvidos somente em metanol e foi realizada uma nova varredura, que apresentou pico de absorção em 380, 260 e 320 nm para LINS03006, LINS03011 e LINS03013, respectivamente. Então, os compostos foram analisados nesses comprimentos de onda e em 230 nm, diluídos somente em DMSO ou em metanol. Porém, quando os compostos foram analisados no sistema de UHPLC nos comprimentos de onda de 380, 260 e 320 nm, e diluídos somente em metanol, os picos apareceram de baixa intensidade, não demonstrando serem adequados para quantificação. Por isso, optou-se pela dissolução em DMSO e no comprimento de onda de 230 nm, uma vez que, apesar de o DMSO apresentar o mesmo comprimento de onda, ele não interfere na quantificação dos compostos pelo método cromatográfico, que garante a veracidade dos picos dos analitos por possuir capacidade de separação por afinidade (cromatogramas em apêndices).

Devido ao comprimento de onda de 200 nm ser baixo e mais sujeito a interferentes, o que o torna pouco seletivo, o composto LINS03011 também foi analisado no comprimento de onda de 230 nm.

5.1.1 Validação parcial do método analítico

A precisão, exatidão e linearidade (Tabelas 4 e 5) foram calculadas através da construção das curvas de calibração em acetonitrila e em tampão Hank's para os compostos LINS03006, LINS03011 e LINS03013.

A média dos valores de precisão, exatidão e linearidade $R > 0,99$ se

encontraram dentro do preconizado pela RDC 166/2017.

Tabela 4. Curvas analíticas com regressão linear, precisão e exatidão dos compostos LINS em acetonitrila.

Composto	Solvente	Intervalo µg/mL	Equação da reta	R	Média Precisão(%) n=3	Média Exatidão(%) n=3
LINS03006	ACN	0,039 - 10	$y=193817x - 71,58$	0,9995	1,95	99,8
LINS03011	ACN	0,039 - 10	$y=85486x - 60,74$	0,9997	3,30	99,8
LINS03013	ACN	0,039 - 10	$y=139504x +119,5$	0,9986	2,65	100

Tabela 5. Curvas analíticas com regressão linear, precisão e exatidão dos compostos LINS em tampão Hank's.

Composto	Diluyente	Intervalo µg/mL	Equação da reta	R	Média Precisão(%) n=3	Média Exatidão(%) n=3
LINS03006	Hank's	0,039 – 10	$y = 360993x - 3618$	0,997	1,38	99,9
LINS03011	Hank's	0,078 – 10	$y = 258112x - 3755$	0,999	1,76	100
LINS03013	Hank's	0,039 – 10	$y=304204x - 7902,4$	0,999	2,04	98,3

O limite inferior de quantificação nas soluções de acetonitrila e tampão Hank's, também se apresentou dentro do preconizado para todos os compostos, com precisão entre 0 – 20% e exatidão entre 80 – 120%, como apresentado nas Tabelas 6 e 7, respectivamente.

Tabela 6. Precisão e exatidão do LIQ dos compostos LINS em acetonitrila.

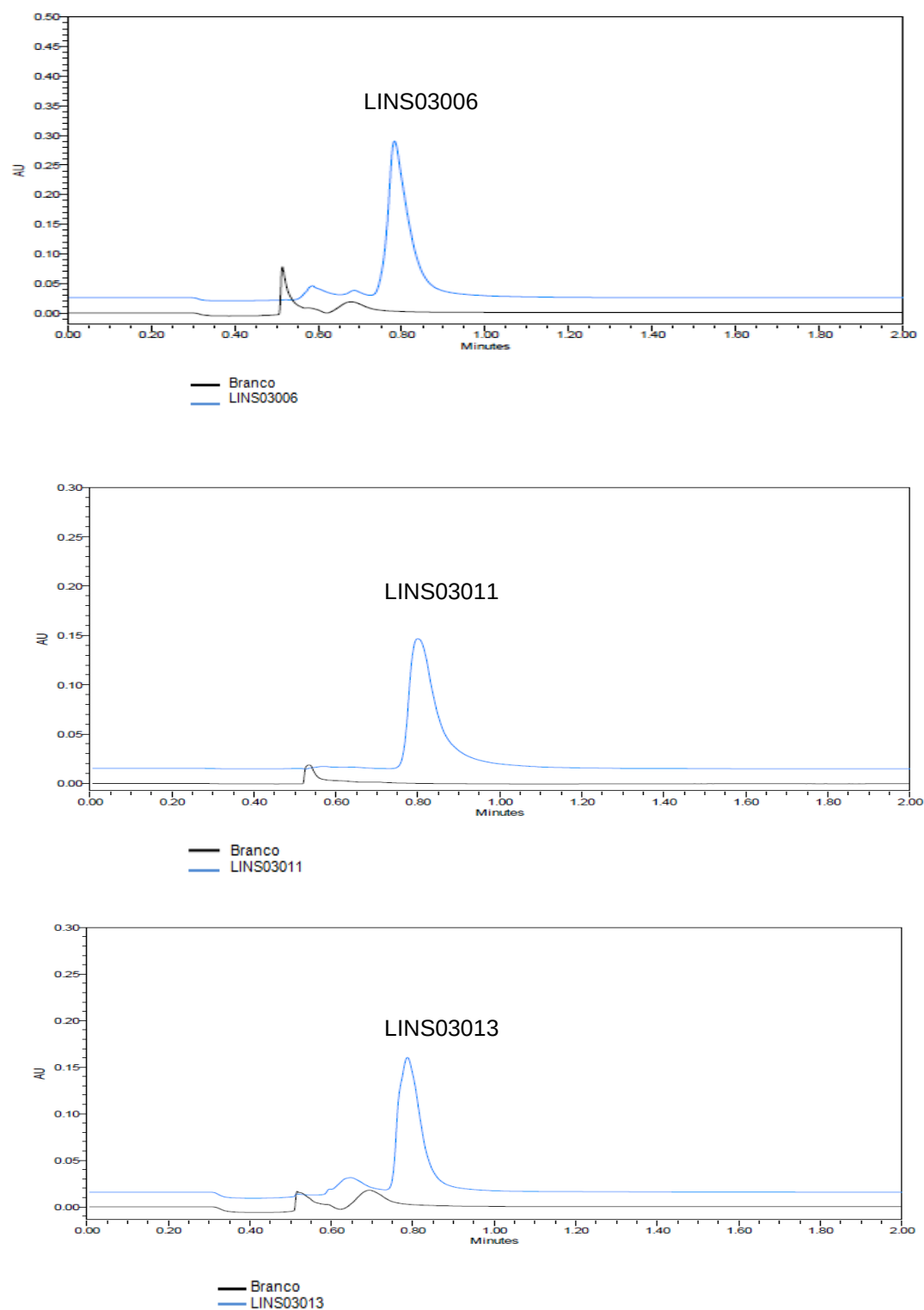
Composto	LIQ ($\mu\text{g/mL}$)	Concentração experimental ($\mu\text{g/mL}$)	Precisão (%) n=3	Exatidão (%) n=3
LINS03006	0,039	0,038	0,9	97,1
LINS03011	0,039	0,038	4,27	97,4
LINS03013	0,039	0,039	1,93	100

Tabela 7. Precisão e exatidão do LIQ dos compostos LINS em tampão Hank's.

Composto	LIQ ($\mu\text{g/mL}$)	Concentração experimental ($\mu\text{g/mL}$)	Precisão (%) n=3	Exatidão (%) n=3
LINS03006	0,039	0,038	1,85	99,9
LINS03011	0,078	0,079	0,95	101
LINS03013	0,039	0,037	4,36	96,6

O método analítico demonstrou ser seletivo, não apresentando interferente no tempo de retenção dos compostos, como pode ser observado na Figura 12.

Figura 12. Cromatograma dos compostos LINS em tampão Hank's na concentração de 2,5 µg/mL.



5.1.2 Validação parcial do método bioanalítico

A precisão, exatidão e linearidade (Tabelas 8, 9 e 10) foram calculadas através da construção das curvas de calibração para os compostos LINS em plasma de rato, microsossomos de rato e humano.

A média dos valores da precisão (0 – 15%), da exatidão (85 – 115%) e linearidade $R > 0,99$ se encontraram dentro da faixa de valores como preconizado pela RDC 27/2012.

Tabela 8. Curvas analíticas com regressão linear, precisão e exatidão dos compostos LINS em plasma de rato.

Composto	Matriz	Intervalo µg/mL	Equação da reta	R	Média Precisão(%) n=5	Média Exatidão(%) n=5
LINS03006	Plasma rato	0,0624 – 20	$y = 0,0274x - 0,0019$	0,999	4,69	102
LINS03011	Plasma rato	0,0624 – 20	$y = 0,03216x + 0,002787$	0,999	6,20	100
LINS03013	Plasma rato	0,0624 – 20	$y = 0,02961x - 0,00708$	0,997	4,57	99,9

Tabela 9. Curvas analíticas com regressão linear, precisão e exatidão dos compostos LINS em microsossomos de rato.

Composto	Matriz	Intervalo µg/mL	Equação da reta	R	Média Precisão(%) n=5	Média Exatidão(%) n=5
LINS03006	Microsossomo rato	0,078 – 2,5	$y = 0,02752 + 1,443e-005$	0,998	2,60	99,9
LINS03011	Microsossomo rato	0,078 – 2,5	$y = 0,4339x - 0,018$	0,999	4,24	100
LINS03013	Microsossomo rato	0,078 – 2,5	$y = 0,0373x - 0,0011$	0,999	7,20	101

Tabela 10. Curvas analíticas com regressão linear, precisão e exatidão dos compostos LINS em microsossomos de humano.

Composto	Matriz	Intervalo µg/mL	Equação da reta	R	Média Precisão(%) n=5	Média Exatidão(%) n=5
LINS03006	Microsossomo Humano	0,078 – 2,5	$y = 0,05578x + 4,794e-005$	0,997	4,30	99,9
LINS03011	Microsossomo Humano	0,039 – 1,25	$y = 0,3454x - 0,005784$	0,999	3,57	100
LINS03013	Microsossomo Humano	0,078 – 2,5	$y = 0,0468x - 0,0008$	0,999	6,30	97,9

O limite inferior de quantificação, também se apresentou dentro do preconizado para todos os compostos em todas as matrizes biológicas, com precisão entre 0 – 20% e exatidão entre 80 – 120%, como apresentado nas Tabelas 11, 12 e 13.

Tabela 11. Precisão e exatidão do LIQ dos compostos LINS em plasma de rato.

Composto	LIQ (µg/mL)	Concentração experimental (µg/mL)	Precisão (%) n=5	Exatidão (%) n=5
LINS03006	0,624	0,70	2,30	112
LINS03011	0,624	0,617	14,2	98,9
LINS03013	0,624	0,615	9,81	98,6

Tabela 12. Precisão e exatidão do LIQ dos compostos LINS em microsossomos de rato.

Composto	LIQ (µg/mL)	Concentração experimental (µg/mL)	Precisão (%) n=5	Exatidão (%) n=5
LINS03006	0,078	0,074	3,51	95,3
LINS03011	0,078	0,08	13,8	102
LINS03013	0,078	0,08	9,18	113

Tabela 13. Precisão e exatidão do LIQ dos compostos LINS em microsossomos de humano.

Composto	LIQ (µg/mL)	Concentração experimental (µg/mL)	Precisão (%) n=5	Exatidão (%) n=5
LINS03006	0,078	0,075	2,14	96,3
LINS03011	0,039	0,04	4,80	104
LINS03013	0,078	0,074	7,99	95,5

Os métodos bioanalíticos demonstraram ser seletivos, não apresentando interferente no tempo de retenção dos compostos, como pode ser observado nas Figuras 13 e 14.

Figura 13. Cromatograma dos compostos LINS em microsossomos de rato na concentração de 2,5 µg/mL.

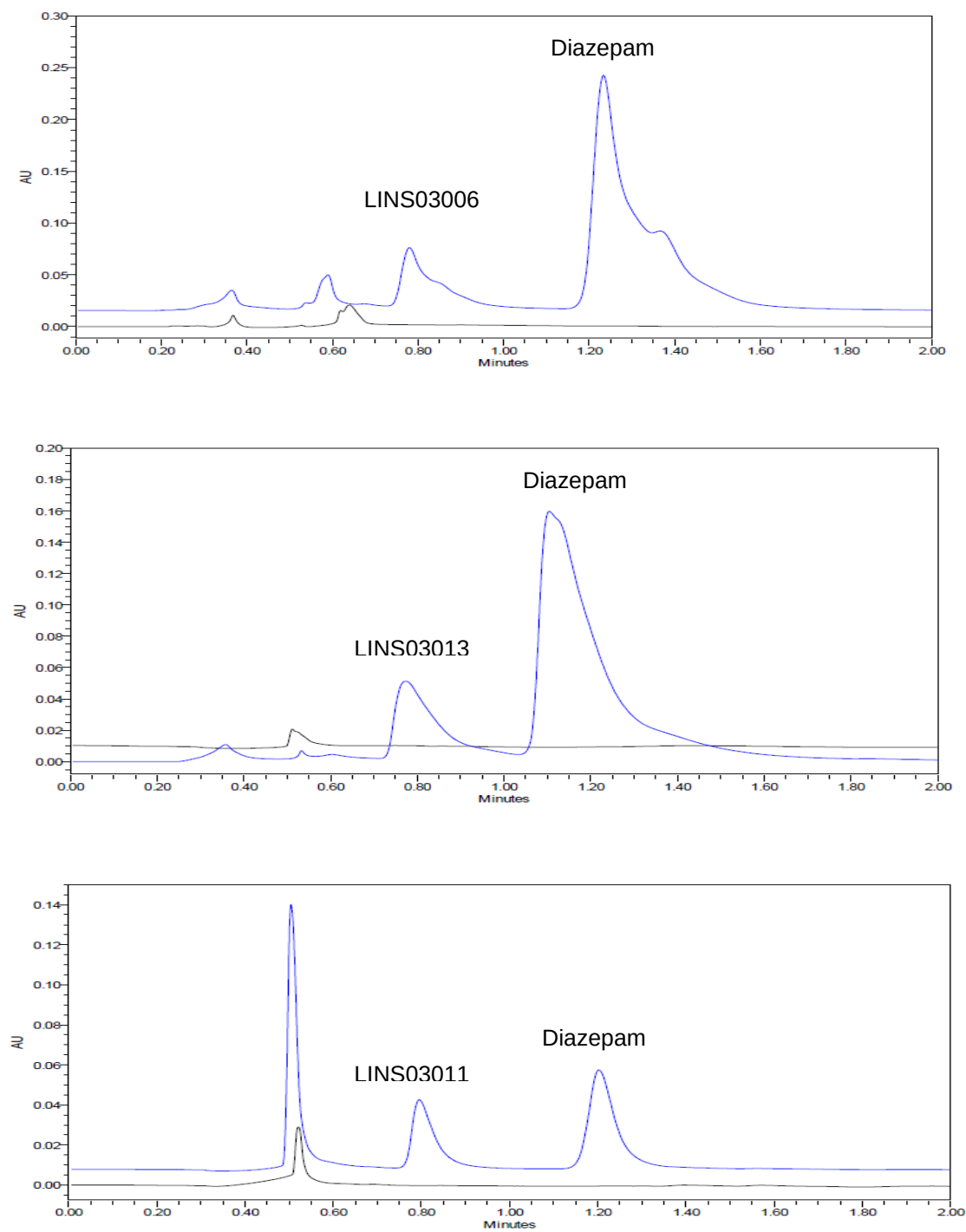
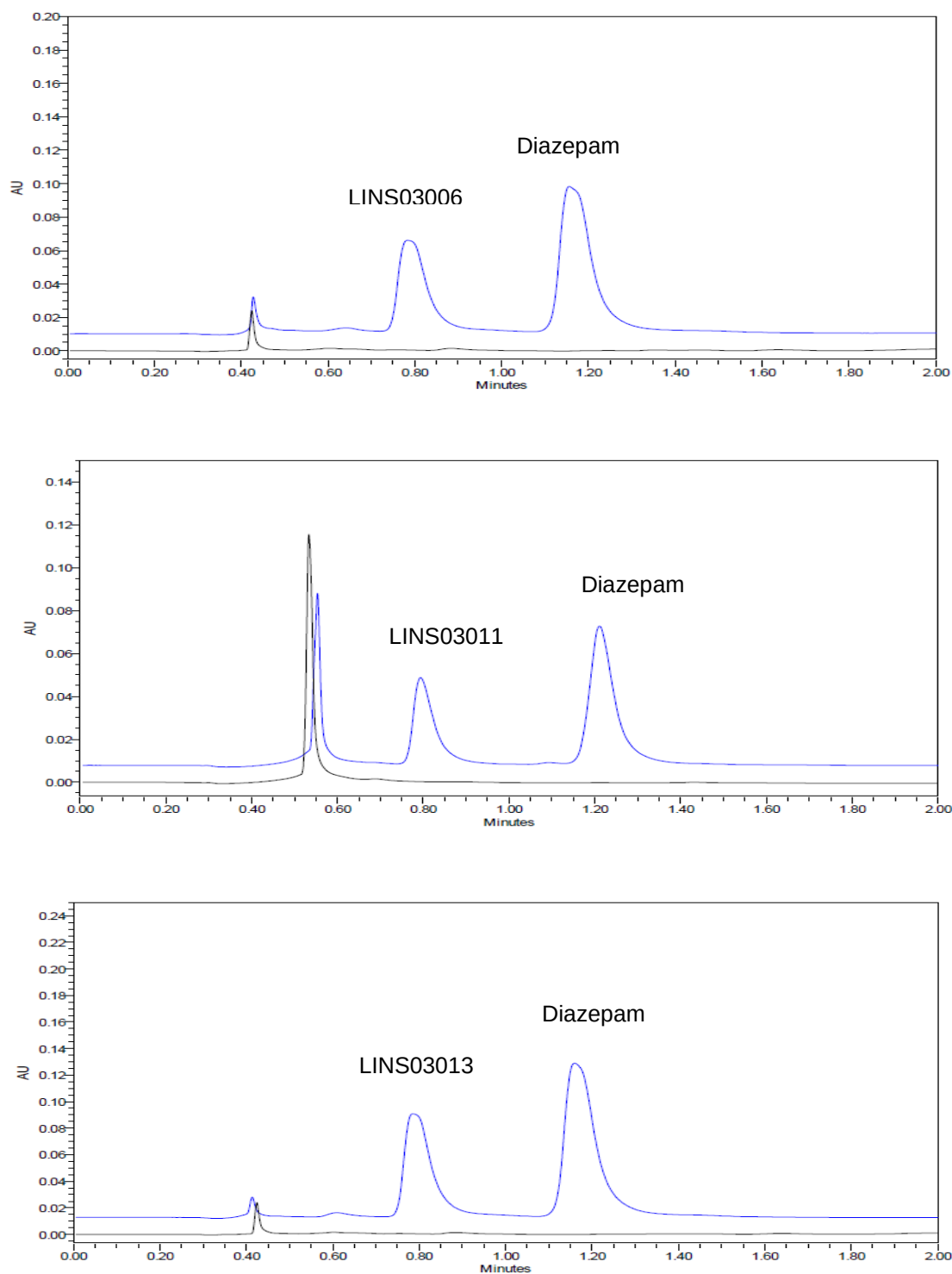


Figura 14. Cromatograma dos compostos LINS em microsossomos de humano na concentração de 2,5 $\mu\text{g/mL}$ para LINS03006 e LINS03013 e 1,25 $\mu\text{g/mL}$ para LINS03011.



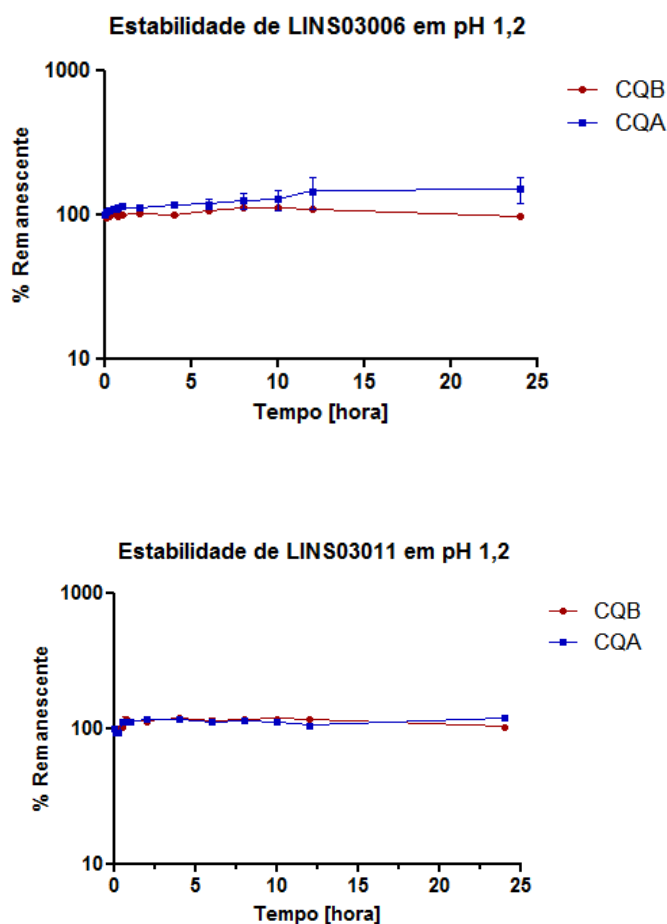
5.2 Ensaio de estabilidade química dos compostos LINS em pHs 1,2; 7,4 e 8,8

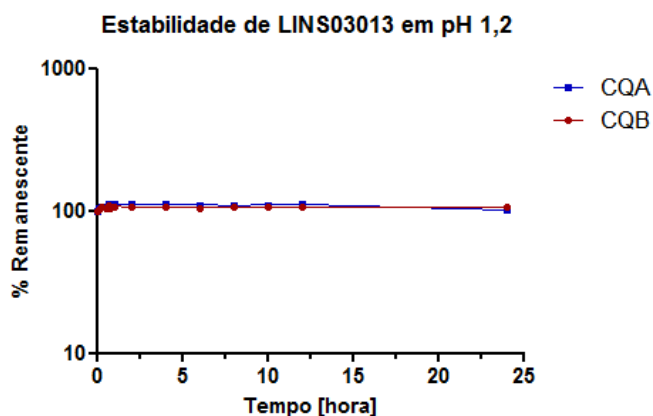
5.2.1 Estabilidade química em pH 1,2

Para a avaliação do tempo de estabilidade dos compostos LINS03006, LINS03011 e LINS03013, foi realizado o teste estatístico ANOVA (teste de Friedman), com pós-teste de Dunn's.

A Figura 15 representa o comportamento do CQB e CQA dos compostos LINS em tampão de pH 1,2.

Figura 15. Gráfico de estabilidade química dos compostos LINS em pH 1,2.





Os tempos de estabilidade do CQA e do CQB de cada composto, estão representados na tabela Tabela 14.

Tabela 14. Estabilidade química dos compostos LINS03006, LINS03011 e LINS03013 em pH 1,2.

Tempo de estabilidade química em pH 1,2			
	CQB (N=3)		CQA (N=3)
	0,078 µg/mL	1,25 µg/mL	8,0 µg/mL
LINS03006	24 h	...	24 h
LINS03011	...	24h	24 h
LINS03013	24 h	...	24 h

(...) Não se dispõe da informação.

Os resultados obtidos nos permitem inferir que a estabilidade dos compostos em

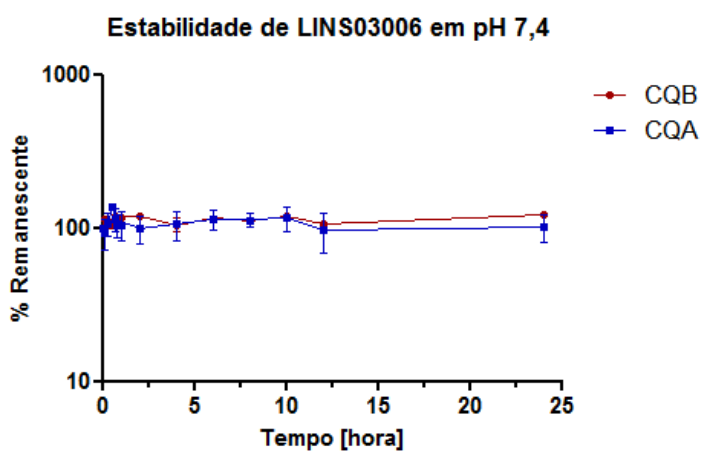
pH 1,2 é adequada, permitindo a sua administração oral sem risco de degradação química.

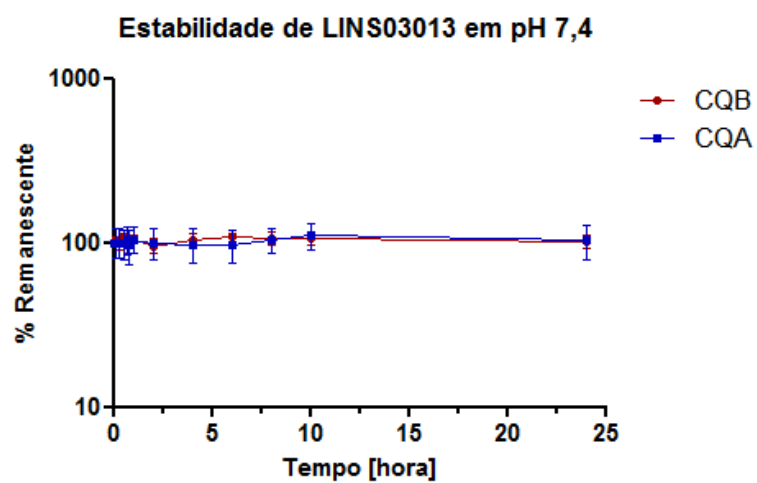
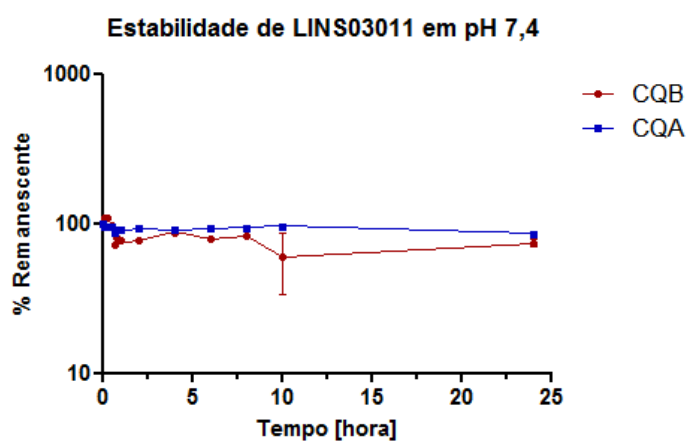
5.2.2 Estabilidade química em pH 7,4

Para a avaliação do tempo de estabilidade dos compostos LINS03006, LINS03011 e LINS03013, foi realizado o teste estatístico ANOVA (teste de Friedman), com pós-teste de Dunn's.

A Figura 16 representa o comportamento do CQB e CQA dos compostos LINS em tampão de pH 7,4.

Figura16. Gráfico de estabilidade química dos compostos LINS em pH 7,4.





Os tempos de estabilidade do CQA e do CQB de cada composto estão representados na tabela Tabela 15.

Tabela 15. Estabilidade química dos compostos LINS03006, LINS03011 e LINS03013 em pH 7,4.

Tempo de estabilidade química em pH 7,4			
	CQB (N=3)		CQA (N=3)
	0,078 µg/mL	1,25 µg/mL	8,0 µg/mL
LINS03006	24 h	...	24 h
LINS03011	...	24h	24 h
LINS03013	24 h	...	24 h

(...) Não se dispõe da informação.

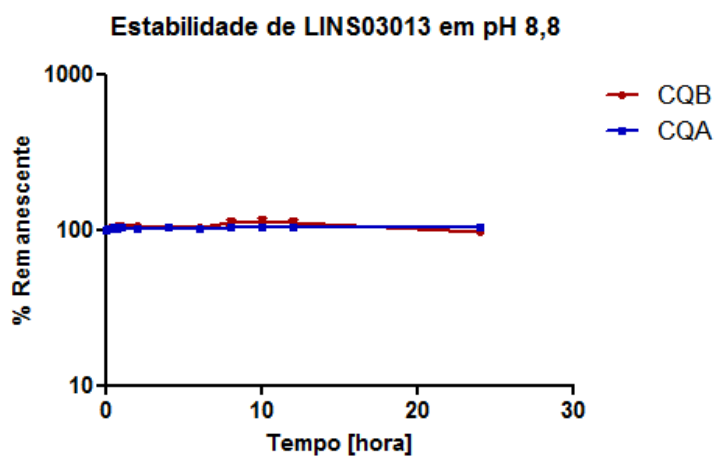
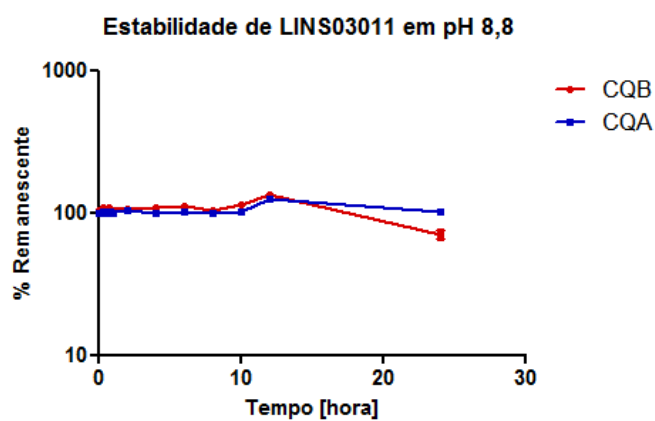
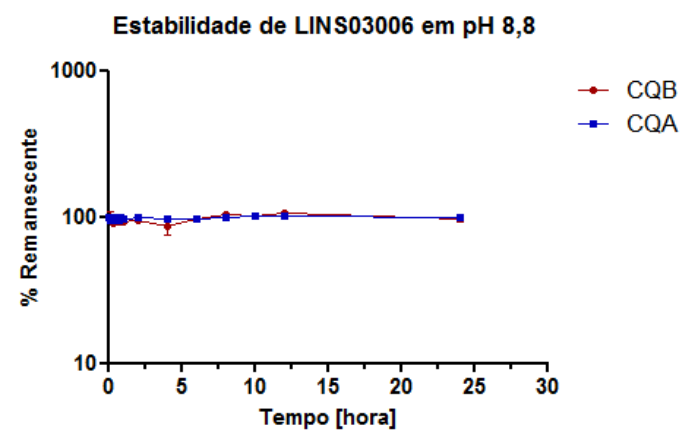
Os resultados obtidos nos permitem inferir que os compostos são estáveis em período de tempo suficiente frente ao pH 7,4 para que a disposição cinética ocorra sem risco de degradação.

5.2.3 Estabilidade química em pH 8,8

Para a avaliação do tempo de estabilidade dos compostos LINS03006, LINS03011 e LINS03013, foi realizado o teste estatístico ANOVA (teste de Friedman), com pós-teste de Dunn's.

A Figura 17 representa o comportamento do CQB e CQA dos compostos LINS em tampão de pH 8,8.

Figura 17. Gráfico de estabilidade química dos compostos LINS em pH 8,8



Os tempos de estabilidade química do CQA e do CQB de cada composto, estão representados na tabela Tabela 16.

Tabela 16. Estabilidade química dos compostos LINS em pH 8,8.

Tempo de estabilidade química em pH 8,8			
	CQB (N=3)		CQA (N=3)
	0,078 µg/mL	1,25 µg/mL	8,0 µg/mL
LINS03006	24 h	...	24 h
LINS03011	...	24 h	24 h
LINS03013	24 h	...	24 h

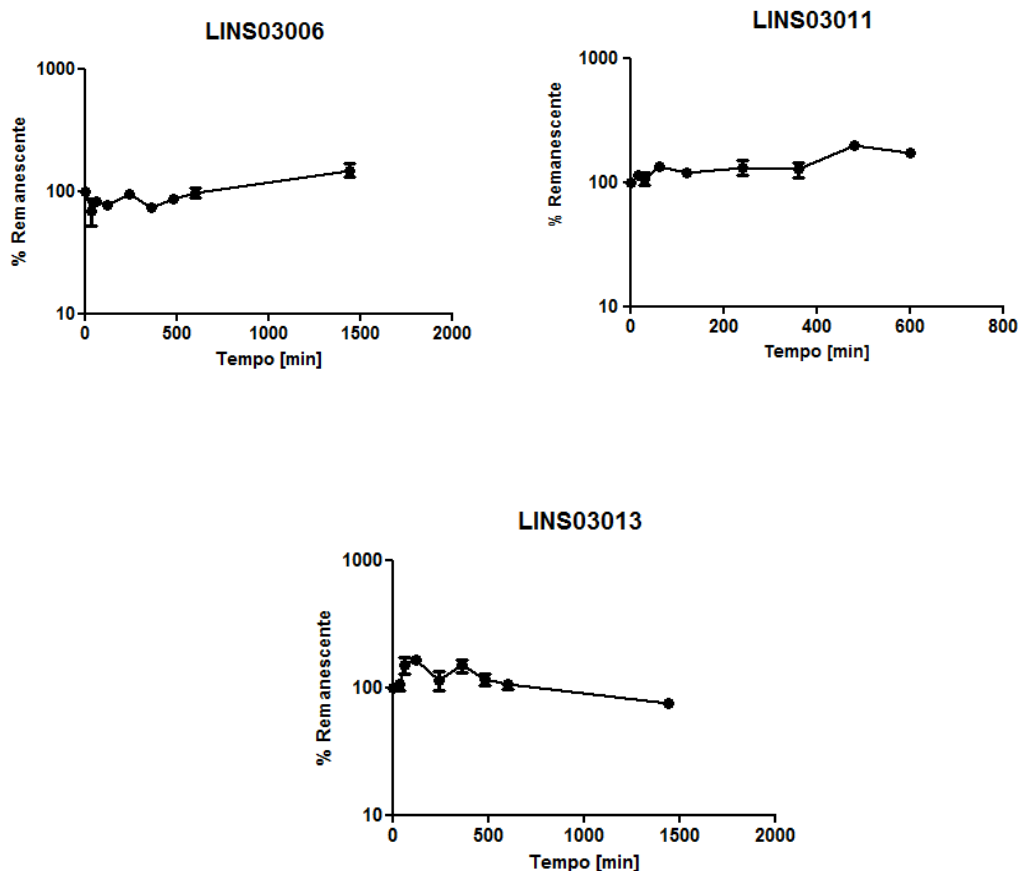
(...) Não se dispõe da informação.

Diante dos resultados apresentados, podemos concluir que os compostos LINS apresentaram 24 horas de estabilidade nos pHs que mimetizam os meios estomacal, sanguíneo e duodenal, demonstrando-se favoráveis a administração enteral.

5.3 Estabilidade *ex vivo*

A estabilidade química *ex vivo* foi avaliada em plasma de rato e, para todos os compostos LINS, foi utilizado como teste estatístico ANOVA (Teste de Friedman) com pós-teste de Dunn's, sendo considerado $p < 0,05$. Os gráficos obtidos podem ser observados na Figura 18.

Figura 18. Gráfico de estabilidade em plasma de rato.



O composto LINS03011 apresentou estabilidade por 6 horas e os compostos LINS03006 e LINS03013 por 24 horas.

O plasma é constituído por esterases responsáveis pela degradação de compostos químicos que possuem ésteres em suas estruturas, como não é o caso dos compostos LINS, dessa forma, a degradação ocorrida na molécula LINS03011, provavelmente foi devida a reações de hidrólise ou oxidação, sendo consideradas as reações de degradação mais comuns em fármacos (KERNES; DI, 2007; KOITKA et al. 2009).

Para manter a eficácia dos estudos *in vitro* de estabilidade em plasma, é

recomendado que o plasma utilizado nos estudos *in vitro* sejam da mesma espécie que será utilizada nos estudos *in vivo*, isso porque o plasma de diferentes espécies podem apresentar variações nas taxas das reações de hidrólise (KERNS; DI, 2007).

5.4 Determinação do Log P dos compostos LINS03006, LINS03011 e LINS03013

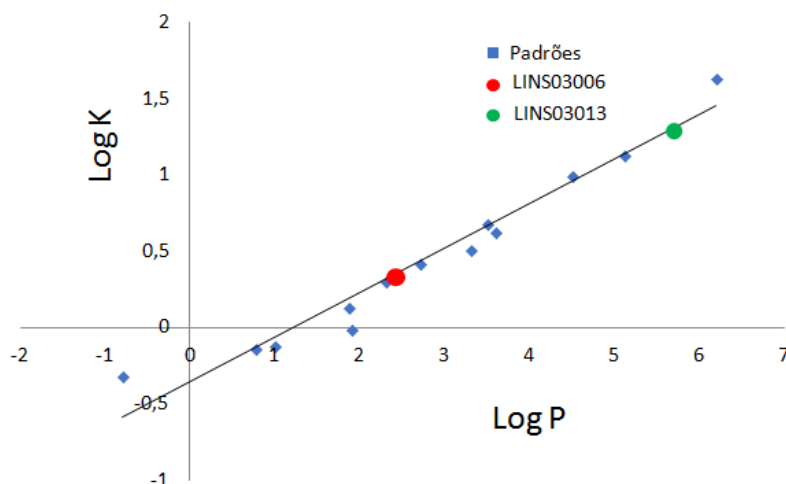
O Log P dos compostos LINS foi calculado através do método *in silico*, utilizando-se dois programas, como apresentado na Tabela 17.

Tabela 17. Cálculo *in silico* do Log P para os compostos LINS.

	Marvin Sketch 16.7.18	ChemDraw®
LINS03006	4,72	4,76
LINS03011	4,63	4,51
LINS03013	5,23	4,4

Para a realização do método cromatográfico, os compostos LINS03006 e LINS03013 foram diluídos em metanol até a concentração de 50 µg/ml. O composto LINS03011 foi diluído em acetonitrila a partir de uma solução concentrada diluída em DMSO, sendo 0,5% a concentração final de DMSO na amostra. A curva log K vs log P (Fig.19) foi construída através do protocolo apresentado no item 4.1.2, dessa forma, foi possível calcular o log P para os compostos LINS03006 e LINS03013.

Figura 19. Gráfico de logk vs logP dos padrões e dos compostos LINS.



A equação da reta obtida foi $y = 0,2912x - 0,3581$ e o $R^2 = 0,9554$. Através da equação foi possível obter os valores de log P das substâncias de interesse, sendo log P de 2,36 para LINS03006 e 5,7 para LINS03013. Não foi possível obter o log P para o composto LINS03011, pois o composto não foi detectado no sistema cromatográfico; acredita-se que, mesmo em baixa concentração, a presença de DMSO na amostra tenha influenciado.

Observa-se que os valores de logP obtidos experimentalmente foram condizentes com os valores obtidos no método *in silico*, podendo-se concluir que os compostos LINS03006 e LINS03013 apresentam características apolares.

Compostos lipofílicos possuem afinidade pela fase oleosa, dessa forma, apresentam tendência a baixa solubilidade em água, o que favorece a permeabilidade no trato gastrointestinal, e com maior expectativa de serem metabolizados. A principal via de eliminação de compostos apolares é através do fígado, sendo mais suscetíveis ao clearance hepático (LEWIS; JACOBS; DICKINS, 2004; TSAIOUN; KATES, 2011; BENET; BROCCATELLI; OPREA, 2011).

Outra característica de compostos lipofílicos é a capacidade de atravessar a

barreira hematoencefálica, alta afinidade pelas bombas de efluxo e alta ligação às proteínas plasmáticas, esta última afeta diretamente no clearance e na meia vida de eliminação (WINIWARTER; RIDDERSTRO; UNGELL, 2007).

Os valores de log P são utilizados em conjunto com a permeabilidade aparente de ensaios *in vitro*, para estimar o nível de permeabilidade dos compostos através do trato gastrointestinal. Takagi et al. (2006), utilizou os valores de log P e de permeação do metoprolol como referência para classificar vários compostos como pouco permeáveis ou muito permeáveis, mostrando que compostos com valores de log P e permeabilidade aparente maiores do que os apresentados pelo metoprolol são classificados como muito permeáveis

5.5 Ensaio de citotoxicidade pelo teste da Resazurina em células Caco-2

Das concentrações utilizadas no ensaio da resazurina, foi selecionada para o ensaio de permeação aquela que apresentou 70% de viabilidade celular. Os resultados obtidos estão na Tabela 18:

Tabela 18. Porcentagem de células Caco-2 viáveis frente aos compostos LINS.

Conc (μM)	LINS03006 (%)	LINS03011 (%)	LINS03013 (%)
500	59,8	73,9	45,9
250	70,9	74,4	57,3
125	72,1	79,2	71,3
62,5	75,4	79,2	74,1
31,25	76,5	78,8	75,9
15,62	73,5	80,1	77,0
7,81	79,1	83,4	80,0
3,9	83,7	86,3	84,6

Fernandes e colaboradores (2012) afirmam que a redução de mais de 30% da viabilidade celular das células Caco-2 é considerada citotóxica, portanto, podem ser utilizadas para o ensaio de permeabilidade concentrações que permitam viabilidade celular de pelo menos 70%. Dessa forma, os compostos LINS03006, LINS03011 e LINS03013 na concentração de 125 μ M não foram citotóxicos para as células Caco-2, sendo essa concentração utilizada para o ensaio de permeabilidade.

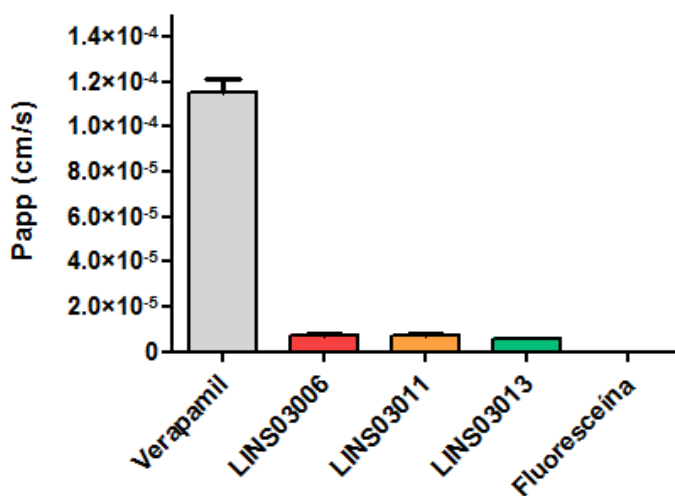
É importante a determinação da toxicidade dos compostos utilizados no ensaio de permeação para aumentar a confiabilidade do ensaio, uma vez que, a alta toxicidade gera morte celular com conseqüente interferência na integridade da monocamada (BLANCHFIELD, et al. 2003).

5.5 Ensaio de permeabilidade com células Caco-2

O cálculo da permeabilidade aparente (P_{app}) foi realizado como mencionado anteriormente, sendo obtidos para os compostos LINS03006, LINS03011 e LINS03013 os valores de $6,9 \times 10^{-06}$, $7,25 \times 10^{-06}$ e $5,58 \times 10^{-06}$ cm/s, respectivamente.

Foi utilizado como controle de alta permeabilidade o verapamil e de baixa permeabilidade a fluoresceína, podendo ser observado na Figura 20. Isso significa que os compostos LINS03006, LINS03011 e LINS03013 permeiam a monocamada de células Caco-2 na velocidade de $6,9 \times 10^{-06}$, $7,25 \times 10^{-06}$ e $5,58 \times 10^{-06}$ cm/s, respectivamente.

Figura 20. Gráfico da permeabilidade aparente dos compostos LINS.



Segundo a classificação de YEE (1997), compostos com baixa permeabilidade apresentam valores de $P_{app} < 1 \times 10^{-6}$ cm/s (entre 0 a 20% de absorção), P_{app} entre $1,0 - 10 \times 10^{-6}$ cm/s como de moderada permeabilidade (entre 20 e 70% de absorção) e $P_{app} > 10 \times 10^{-6}$ cm/s de como alta permeabilidade (entre 70 e 100% de absorção). Portanto, de acordo com essa classificação, os compostos LINS apresentaram moderada permeabilidade, podendo apresentar uma absorção de 20 até 70% através

do epitélio intestinal.

No entanto, existe ainda a classificação de Biganzoli (1999) que considera com baixa permeabilidade valores de $P_{app} < 0,2 \times 10^{-6}$ cm/s (menos de 1% de absorção), P_{app} entre $0,2 \times 10^{-6}$ e 2×10^{-6} cm/s (entre 1 e 90% de absorção) como de moderada permeabilidade e $P_{app} > 2 \times 10^{-6}$ cm/s (absorção maior que 90%) como de alta permeabilidade. Neste caso, os compostos LINS seriam classificados como de alta permeabilidade, apresentando mais de 90% de absorção.

A permeabilidade aparente está diretamente ligada ao valor do log P do composto, sendo considerado que os compostos que apresentarem características mais lipofílicas, também devam apresentar maior permeabilidade, que é o caso dos compostos LINS (TAKAGI et al. 2006)

A permeação dos compostos LINS pode ter ocorrido através da vias transcelular ou paracelular (entre as junções celulares). Na via paracelular ocorre somente o transporte passivo e na transcelular ocorre o passivo e o ativo, sendo este último através de transportadores (ARTURSSON; KARLSSON, 1991; PICHARDO et al. 2017).

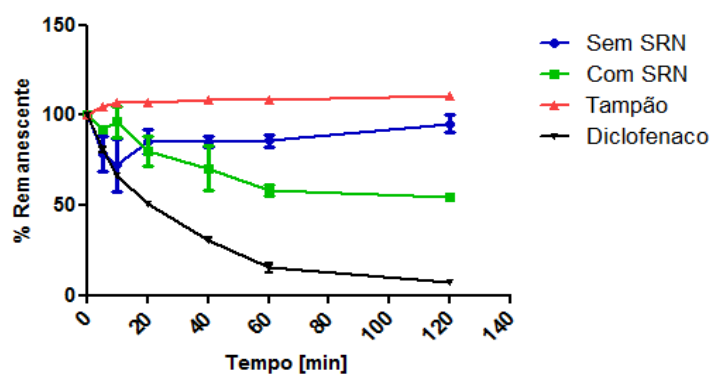
5.6 Ensaio de metabolismo em microsossomos de rato e humano

Para a quantificação do ensaio de metabolismo foi realizada curva de calibração em microsossomo de rato e humano como demonstrado no item 5.1.1.

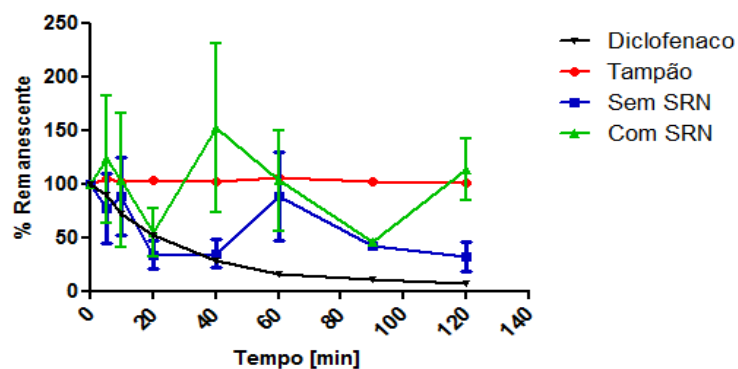
Foram construídos os gráficos de decaimento dos compostos LINS03006, LINS03011 e LINS03013 em tampão PBS (0,1 M), microsossomos sem o SRN e microsossomos com o SRN. O diclofenaco foi utilizado como controle positivo para comprovar o funcionamento do SRN. Os gráficos foram construídos a partir da porcentagem remanescente versus o tempo, como demonstrado nas Figuras 21 e 22:

Figura 21. Comportamento dos compostos LINS em microsossomos de rato.

LINS03006



LINS03011



LINS03013

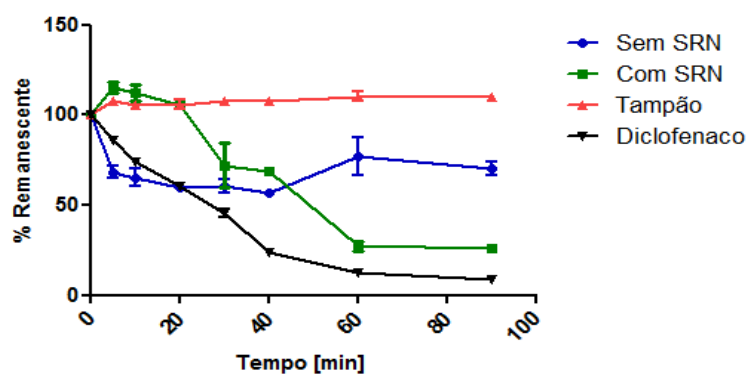
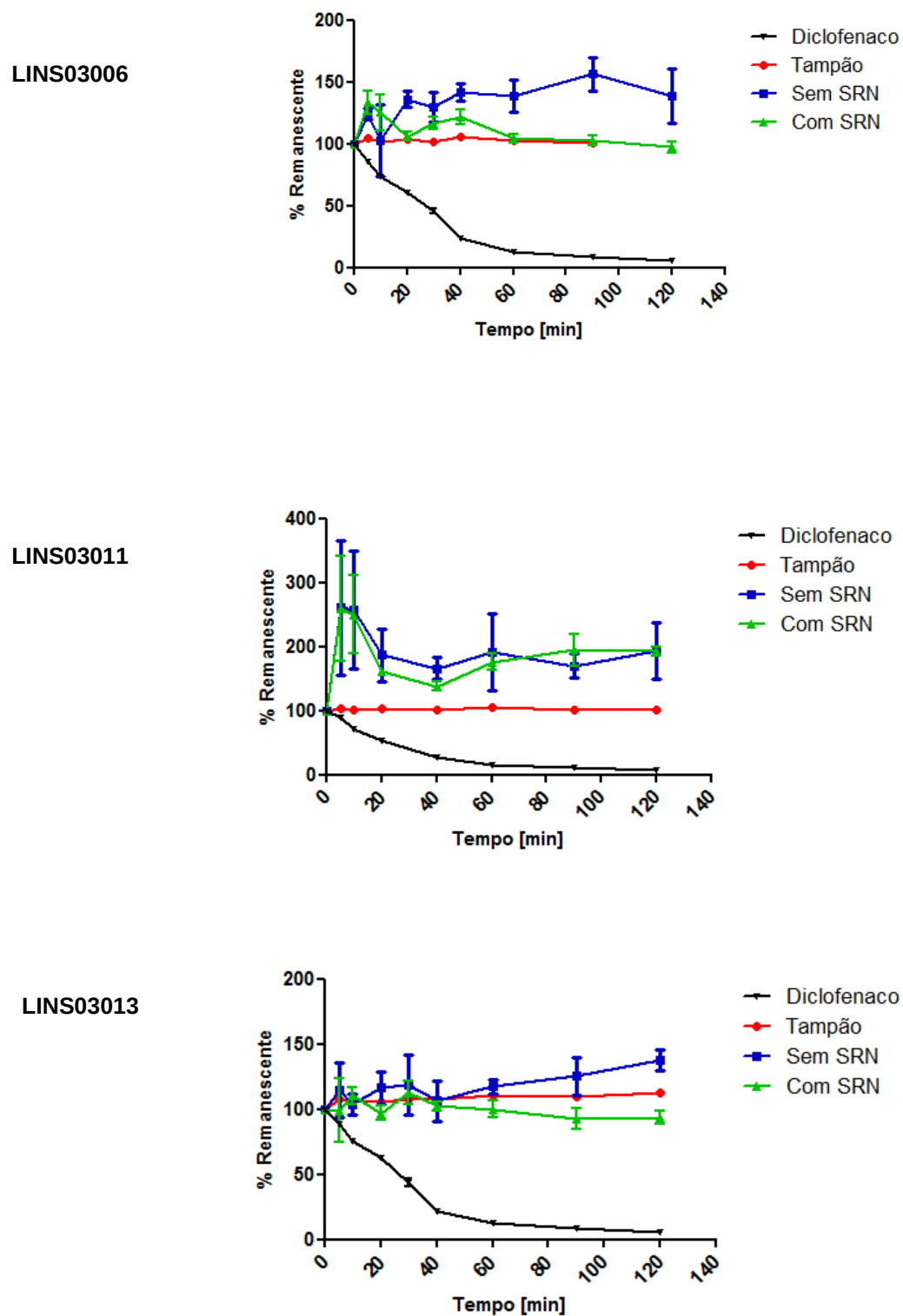


Figura 22. Comportamento dos compostos LINS em microsossomos de humano.



Em microsossomos de rato, a Figura 21 mostrou o comportamento dos compostos LINS03006, LINS03011 e LINS03013 sendo praticamente constantes em tampão, já na solução com microsossomos sem o SRN, não foi mantido o decaimento dos compostos e na solução com microsossomos com o SRN o decaimento é constante para LINS03006 e LINS03013. Dessa forma, podemos concluir que LINS03006 e LINS03013 sofrem metabolização através das enzimas do citocromo P-450 em ratos, o composto LINS03011, não demonstrou ser substrato dessas enzimas (STORPIRTIS et al. 2011).

Em microsossomos de humano, a Figura 22 mostrou que não houve metabolização de nenhum dos compostos LINS através das enzimas do citocromo P-450.

A estabilidade metabólica pode ocorrer em ensaios com diferentes espécies e esse fenômeno pode ser explicado pela diferença da expressão das enzimas e também pela variação da atividade de oxidação. No rato, por exemplo, as enzimas do citocromo P450 apresentam maior atividade de hidroxilação e demetilação de algumas substâncias quando comparada ao humano. Por exemplo, no caso da etilmorfina, a demetilação em rato é de 3370 pmol/min/mg proteína e em humano é 423 pmol/min/mg proteína (ZWART, 1999).

As diferenças obtidas nos ensaios *in vitro* com matrizes das duas espécies para os compostos LINS – excetuando-se o composto LINS03011 - indicam que nos ensaios pré-clínicos *in vivo*, a utilização do rato como modelo animal deve levar a um perfil farmacocinético significativamente distinto do esperado em humanos, com uma expectativa de menor meia vida de eliminação e maior CI hepático em ratos.

O clearance intrínseco *in vivo* (Cl_{int}), a meia vida de eliminação ($T_{1/2}$) e a constante de eliminação (Kel) foram estimados para LINS03006 e LINS03013 a partir do clearance intrínseco *in vitro*, sendo esses parâmetros extrapolados para ratos, como

pode ser observado na Tabela 19:

Tabela 19. Estimativa para ratos do clearance intrínseco in vivo (Cl_{int}), meia vida de eliminação ($t_{1/2}$) e constante de eliminação (Kel) dos compostos LINS03006 e LINS03013.

	LINS03006	LINS03013
$t_{1/2}$ (min)	138,6	53,3
Cl_{int} (mL/min/kg)	18,0	46,8
Kel (min^{-1})	0,005	0,013

Os compostos apresentaram Cl_{int} de 18 mL/min/kg para LINS03006 e 46,8 mL/min/kg para LINS03013. Considerando o rato com peso de 250 g, significaria que 4,5 mL de sangue ficaria livre do composto LINS03006 a cada minuto e para o composto LINS03013 significaria dizer que 11,7 mL de sangue fica livre desse composto a cada minuto. Esses valores de clearance foram calculados desconsiderando a taxa de ligação às proteínas plasmáticas, ou seja, consideram que toda a quantidade de composto está na sua forma livre.

Quando a taxa de ligação às proteínas plasmáticas é considerada, parte do composto não se encontra na sua forma livre, dessa forma, a quantidade que está ligada às proteínas plasmáticas não sofre a metabolização. Para melhor compreensão do quanto a taxa de ligação às proteínas plasmáticas pode influenciar no valor do clearance, em uma situação hipotética em que 10% do composto está livre (90% está ligado às proteínas plasmáticas) e considerando o débito cardíaco do rato sendo 61 mL/min (TOUTAIN; BOUSQUET-MÉLOU, 2004), utilizando a fórmula de clearance

hepático (Cl_H), segundo Obach (2011), que considera a taxa de ligação de composto livre, obtemos um Cl_H de 1,75 mL/min/kg para LINS03006 e Cl_H de 4,34 mL/min/kg para LINS03013. Considerando o peso do rato como 250 g, o Cl_H para os compostos LINS03006 e LINS03013 seria de 0,44 mL/min e 1,0 mL/min, respectivamente. Supondo agora 90% de composto livre (somente 10% de ligação) e já considerando o peso, o Cl_H seria de 3,2 mL/min para LINS03006 e 6,25 mL/min para LINS03013.

A meia vida de eliminação estimada para os compostos LINS03006 e LINS03013 foi de 138,6 e 53,3 minutos, respectivamente. No entanto, esses valores podem ser aumentados ou diminuídos dependendo das condições do organismo em que os compostos se encontram. Segundo Olson (2002), enzimas do citocromo P450 podem ser induzidas por alguns alimentos ou mesmo fármacos que aumentam a atividade de biotransformação de compostos que são substratos dessas enzimas, dessa forma, diminui a meia vida de eliminação dos compostos em questão, podendo interferir no efeito terapêutico desses compostos. Da mesma forma, LINS03006 e LINS03013 podem ficar mais concentrados no organismo quando administrados concomitantemente com fármacos que inibem a ação de enzimas que pertencem ao complexo do citocromo P-450, aumentando a meia vida de eliminação dos compostos, como é o caso dos antifúngicos azólicos que inibem a CYP3A4 (MCDONNELL; DANG, 2013). Outros fatores também alteram o metabolismo dessas enzimas, como o peso, idade, sexo, espécie, enfermidades e fatores genéticos (GIBALDI; PERRIER, 1982).

As enzimas do citocromo P-450 são responsáveis pelo metabolismo de primeira passagem e a maior parte dessas enzimas se encontram no fígado, sendo encontradas também em outros órgãos como pulmões, rins, epitélio intestinal e no plasma (STORPIRTIS et al. 2011; MCDONNELL; DANG, 2013). Portanto, para evitar o comprometimento da biodisponibilidade dos compostos LINS03006 e LINS03013 em

possíveis ensaios pré-clínicos, não é recomendado o modelo animal rato para esses estudos (PEREIRA, 2007).

6. CONCLUSÃO

As características de estabilidade química e *ex vivo* observadas nos ensaios realizados são favoráveis à administração oral dos compostos.

Os valores de logP obtidos para os compostos LINS03006 e LINS03013 indicam maior lipofilicidade do que hidrofiliicidade. Conforme Lipinski, para que a biodisponibilidade não seja comprometida, é adequado para a absorção enteral que os compostos apresentem $\log P < 5$, como é o caso do LINS03006. Já para compostos que apresentam $\log P > 5$, a administração sublingual é mais adequada, como é o caso do LINS03013 (HANSCH; BJÖRKROT; LEO, 1987).

A permeabilidade aparente observada nos ensaios em Caco-2 para os compostos LINS03006, LINS03011 e LINS03013 leva à expectativa de efetiva absorção enteral.

A instabilidade metabólica observada para LINS03006 e LINS03013 em microsomas de rato aponta que a realização de estudos de farmacocinética em ratos devem trazer resultados de eliminação superiores ao esperado em humanos. Ainda, a instabilidade metabólica desses compostos sugere que na administração oral, embora haja a expectativa de boa absorção enteral, há também expectativa de metabolismo pré-sistêmico, com possível baixa biodisponibilidade oral. Ainda, a instabilidade metabólica é esperada para compostos que apresentam lipofilicidade, conforme foi observado nos valores de LogP obtidos.

Os resultados obtidos neste trabalho permitem o planejamento dos futuros

estudos de farmacocinética em modelo animal, que devem incluir não somente a administração intravenosa mas também oral dos compostos, para a determinação dos parâmetros farmacocinéticos que serão úteis à construção de outros protocolos para os estudos de atividade farmacológica *in vivo*, e estudos farmacocinéticos em outros modelos animais.

REFERÊNCIA

- AMBR. Associação Médica do Brasil. 2014. Disponível em: <<http://www.ambr.org.br/recentes-avancos-no-tratamento-da-doenca-de-chagas/>> Acesso dia 02/11/2016.
- ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **GLUCANTIME® (antimoniato de meglumina)** Sanofi-Aventis Farmacêutica Ltda. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/datavisa/fila_bula/frmVisualizarBula.asp?pNuTransacao=991282015&pIdAnexo=2435258>. Acesso em: 24 jan. 2019.
- ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Informe técnico nº 35, de 19 de junho de 2008. **Gerenciamento do Risco Sanitário na Transmissão de Doença de Chagas Aguda por Alimentos**. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br>>. Acesso em: 20 jun. 2018.
- ARTACHO, N. S. **A Leishmaniose no Brasil e o Conflito Ideológico: Eutanásia ou Tratamento?** Trabalho de Conclusão de Curso para o Título de Médica Veterinária - Centro Universitário das Faculdades Metropolitanas Unidas – UniFMU, São Paulo, 2009.
- BAHIA, M. T. et al. 2012. **Fexinidazole: A Potential New Drug Candidate for Chagas Disease**. PLOS Neglected Tropical Diseases, v. 6.
- BALIMANE, P. V.; CHONG, S.; MORRISON, R. A. 2000. **Current methodologies used for evaluation of intestinal permeability and absorption**. Journal of Pharmacological and Toxicological Methods. v. 44. Princeton, USA.
- BARBOSA, M. G. V. et al. **Chagas disease in the State of Amazonas: history, epidemiological evolution, risks of endemicity and future perspectives**. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical 48(Suppl I):27-33, 2015. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/rsbmt/v48s1/0037-8682-rsbmt-48-s1-00027.pdf>>. Acesso em: 22 jun. 2018.
- BAUERMEISTER, A. et al. **In Vitro Metabolism Evaluation of the Ergot Alkaloid Dihydroergotamine: Application of Microsomal and Biomimetic Oxidative Model**. Planta Med. Ribeirão Preto, Brazil, 2016.
- BENET, L. Z.; BROCCATELLI, F.; OPREA, T. I. **BDDCS Applied to over 900 Drugs**. The AAPS Journal., v. 13,p. 519-547, 2011.
- BENSLEY D. M. 2008. **Guidance for Industry Drug Stability Guidelines**. Food and Drug Administration (FDA).
- BERGLUND, M.; BYSTROM, K.; PERSSON B. 1990. **Screening chemical and physical stability of drug substances**. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. v.8, p. 639-643.

BEZERRA, W. S.; MENEGUETTI, D. U. O.; CAMARGO, L. M. A. **A Busca de fármacos para tratamento da Tripanossomíase Americana: 103 anos de negligência.** Saúde (Santa Maria), v.38, n.1, p. 920, Brasil, 2012.

BILLAT, P. A., ROGER, E., FAURE, S., LAGARCE, F. 2017. **Models for drug absorption from the small intestine: where are we and where are we going?** *Drug Discovery Today*. <http://dx.doi.org/10.1016/j.drudis.2017.01.007>.

BLANCHFIELD, J. T. *et al.* 2003. **Synthesis, Structure Elucidation, in Vitro Biological Activity, Toxicity, and Caco-2 Cell Permeability of Lipophilic Analogues of r-Conotoxin MII.** *J. Med. Chem.* v. 46, p. 1266-1272. Austrália.

BRASIL, 2017. **SUS oferece diagnóstico e tratamento gratuitos contra a leishmaniose.** Disponível em: <<http://www.brasil.gov.br>>. Acesso em 17 ago 2018.

BRASIL, 2011. **Brasil dobrará produção de remédios contra mal de Chagas para atender outros países.** Disponível em: <<http://www.brasil.gov.br>>. Acesso em 17 ago 2018.

BREEMEN, R. B. V.; Li, Y. **Caco-2 cell permeability assays to measure drug absorption.** *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.*, v.1, p. 175-185, Chicago, USA, 2005.

CALIXTO, J. B.; SIQUEIRA JÚNIOR, J. M. **Desenvolvimento de medicamentos no Brasil: desafios.** *Gazeta Médica da Bahia*. Bahia, v.78, suplemento 1, p.98-106, 2008.

CANÇADO, J. R. **Terapêutica específica**, p. 323. Livro: Clínica e terapêutica da doença de chagas: uma abordagem prática para o clínico geral, autores: DIAS, JCP., COURA, JR. Ed. FIOCRUZ, 1997.

CASTRO, J. A.; DIAZ DE TORANZO, E. G. **Toxic effects of nifurtimox and benznidazole, two drugs used against American trypanosomiasis (Chagas'disease).** *Biomed Environ Sci*, v. 1, n. 1, p. 19-33, 1988.

CARON, G.; VALLARO, M. e ERMONTI G. **Log P as a tool in intramolecular hydrogen bond considerations.** *Drug Discovery Today: Technologies*, v. xxx, n. xx (2018). Torino, Italy.

CDC. CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. **American Trypanosomiasis**, 2017. Disponível em: <<https://www.cdc.gov/dpdx/trypanosomiasisAmerican/index.html>> Acesso em: 12 ago 2018.

CDC. CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. **Leishmaniasis, Epidemiology & Risk Factors**, 2013. Disponível em: <<https://www.cdc.gov/parasites/leishmaniasis/epi.html>> Acesso em: 13 ago 2018.

CEVS. Centro Estadual de Vigilância em Saúde RS. **Leishmaniose Visceral Humana.** Disponível em: < <http://www.cevs.rs.gov.br>>. Acesso em 15 ago 2018.

CIMATTI, Helen M. Baldan. **Farmacocinética pré-clínica e avaliação toxicológica do novo composto α_2 -adrenérgico 3-(2-cloro-6-fluorobenzil)-imidazolidina-2,4-diona - PT-31 GIRSUPAN. 2013.** Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas). Faculdade de Ciências Farmacêuticas UNESP, Araraquara.

CIMERMAN, B.; CIMERMAN S. **Parasitologia Humana e Seus Fundamentos Gerais.** 2ª ed. p. 81-110 e p. 39-78. São Paulo: Editora Atheneu, 2010.

CLINICALTRIALS. Disponível em: < <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03587766>>. Acesso em: 07 dez 2018.

COURA, J. R. & JUNQUEIRA, A. C. V. **Risks of endemicity, morbidity and perspectives regarding the control of Chagas disease in the Amazon Region.** Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Vol. 107(2): 145-154, 2012. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/mioc/v107n2/01.pdf>>. Acesso em: 22 jun. 2018.

DANTAS-TORRES, F. **The role of dogs as reservoirs of Leishmania parasites, with emphasis on Leishmania (Leishmania) infantum and Leishmania (Viannia) braziliensis.** Veterinary Parasitology, Amsterdam, v.149, p.139-146, 2007.

DEMICHELI, C. & FRÉZARDI, F. **Novas embalagens para medicamentos à base de antimônio usados no tratamento de Leishmaniose e Esquistossomose.** 2005. Disponível em: <http://qnesc.sbq.org.br/online/cadernos/06/a07.pdf>. Acesso: 26/10/2016.

DIAS, J. C. P *et al.* **II Consenso Brasileiro em Doença de Chagas**, 2015. Epidemiol. Serv. Saúde, v.7, n. 25, p. 7-86, Brasília, 2016. Disponível em: <<http://scielo.iec.pa.gov.br/pdf/ess/v25nesp/2237-9622-ess-25-esp-00007.pdf>> Acesso dia 10/11/2016.

DUTRA, F. L. *et al.* 2016. **Effects of linalool and eugenol on the survival of Leishmania (L.) infantum chagasi within macrophages.** Acta Tropica, v. 164, p. 69-76. Rio de Janeiro, Brasil.

EBSERSH. Empresa Brasileira de Serviços Hospitalares, 2016. Disponível em: <http://ebserh.gov.br/documents/16692/149422/Informe+anfotericina.pdf/bbef4af4-9dd8-46b5-841d-30596116a074>. Acesso: 26/10/2016.

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

FESTING S.; WILKINSON R. **The ethics of animal research.** European Molecular Biology Organization (EMBO reports), v.8, n. 6, London, UK, 2007.

FIOCRUZ. Doença de Chagas. Disponível em: <http://www.cpqrr.fiocruz.br/informacao_em_saude/CICT/Doenca_de_chagas.htm>. Acesso em: 20 jun. 2018.

FIOCRUZ. **Leishmaniose Visceral Americana.** Disponível em:

<http://www.cpqrr.fiocruz.br/informacao_em_saude/CICT/Leishmaniose_viscerale.htm>. Acesso em 17 ago 2018.

FUJIKAWA *et al.* 2005. **Relationships between structure and high-throughput screening permeability of diverse drugs with artificial membranes: Application to prediction of Caco-2 cell permeability.** *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, v.13, p. 4721–4732, Osaka, Japão.

FUNASA. Fundação Nacional de Saúde. **Elaboração de Projeto de Melhoria Habitacional para o Controle da Doença de Chagas**, 2017. Disponível em: <<http://www.funasa.gov.br>>. Acesso em 15 ago 2018.

GIBALDI, M.; PERRIER, D. **Pharmacokinetics**. 2ª Ed, New York: Marcel Dekker, 1982.

GONTIJO, C. M. F.; MELO, M. N. **Leishmaniose Visceral no Brasil: quadro atual, desafios e perspectivas.** *Rev. Bras. Epidemiol*, v. 7, n. 3, Belo Horizonte, Brasil, 2004.

GRANDIS, R. A. 2016. **Avaliação toxicogenética e atividade antitumoral *in vitro* de complexos heterolépticos de Rutênio(II): Atividades citotóxicas, genotóxicas e interação com biomoléculas.** Dissertação (Mestrado em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia). Faculdade de Ciências Farmacêuticas UNESP, Araraquara.

GU, C. *et al.* 2016. **Modulating the strength of hydrogen bond acceptors to achieve low Caco2 efflux for oral bioavailability of PARP inhibitors blocking centrosome clustering.** *Journal: Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. v. 26 Waltham, USA.

GUEDES, P. M. M. *et al.* 2012. **Deficient Regulatory T Cell Activity and Low Frequency of IL-17-Producing T Cells Correlate with the Extent of Cardiomyopathy in Human Chagas' Disease.** *PLoS Negl Trop Dis*, v.6. doi:10.1371/journal.pntd.0001630. University of Massachusetts Medical School, United States of America.

HANSCH, C.; BJÖRKROT, J. P.; LEO, A. 1987. *Journal Pharm. Sci.*, v.76, p.663.

HUBATSCH, I.; RAGNARSSON, E. G. E.; ARTURSSON, P. **Determination of drug permeability and prediction of drug absorption in Caco-2 monolayers.** *Nature*, Uppsala, Suécia, 2007.

IANNI, B. M.; MADY, C. **Terapêutica da Forma Crônica da Doença de Chagas. É Eficaz o Tratamento Etiológico?** *Arq. Bras. Cardiol.*, v. 70, n.1, São Paulo, Brasil, 1998.

JÄHNE, E. *et al.* 2016. **Caco-2 Permeability Studies and In Vitro hERG Liability Assessment of Tryptanthrin and Indolinone.** *Planta Med.* DOI <http://dx.doi.org/10.1055/s-0042-110323>. Verlag KG Stuttgart · New York.

KERNS, E. H.; DI, L. 2007. **Chemical Stability**. Elsevier. Princeton, NJ, USA.

KILKENNY, C. *et al.* **Survey of the Quality of Experimental Design, Statistical**

- Analysis and Reporting of Research Using Animals.** 2009. Journals Plos, v.30. Disponível em: <<http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0007824>>. Acesso em 22 jul. 2018.
- KOITKA, M. et al. 2010. **Improving the ex vivo stability of drug ester compounds in rat and dog serum: Inhibition of the specific esterases and implications on their identity.** Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, v.51, p. 664–678. Berlin, Alemanha.
- KORINTH, G.; WELLNER, T.; SCHALLER, K.; DREXLER, H. **Potential of the octanol-water partition coefficient (logP) to predict the dermal penetration behavior of amphiphilic compounds in aqueous solutions.** Toxicology Letters, v. 215, p. 49 – 53, 2012.
- KUMAR, S. *et al.* 2002. **Extrapolation of diclofenac clearance from in vitro microsomal metabolism data: Role of acyl glucuronidation and sequential oxidative metabolism of the acyl glucuronide.** Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, v. 303, n. 3, p. 969-978. ISSN 0022-3565. Disponível em: <Go to ISI>://WOS:000179290500011 >.
- LAFEPE. Laboratório Farmacêutico de Pernambuco. **Benznidazol.** Disponível em <<http://www.lafepe.pe.gov.br/category/benznidazol>>. Acesso em 16 ago 2018.
- LEXCHIN, J. 2018. Journal of Pharmaceutical Policy and Practice. <https://doi.org/10.1186/s40545-018-0132-3>. Toronto, Canadá.
- LEWGOWD, W. et al. 2007. **Determination of Lipophilicity and Pka Measurement of some 4-imino-1,4-dihydrocinnoline-3-carboxylic acid and 4-oxo-1,4-dihydrocinnoline-3-carboxylic acid derivatives -isosteric analogues of quinolones.** Acta Poloniae Pharmaceutica n Drug Research, v. 64, n. 3, p. 195 - 200. Łódź, Poland.
- LEWIS, D. F. V.; JACOBS, M. N.; DICKINS, M. 2004. **Compound lipophilicity for substrate binding to human P450s in drug metabolism.** Drug Discovery Today Vol 9.
- LIMA, J. S. et al. 2003. **Pesquisa clínica: fundamentos, aspectos éticos e perspectivas.** Revista da Sociedade de Cardiologia do Estado do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro, v.16, n.4, p.225-233.
- LIEDERER, B.M; BORCHARDT, R.T. 2005. **Stability of oxymethyl-modified coumarinic acid cyclic prodrugs of diastereomeric opioid peptides in biological media from various animal species including human,** J. Pharm. Sci, v. 94, p. 2198–2206.
- LU, C. et al. 2006. **Comparison of Intrinsic Clearance in Liver Microsomes and Hepatocytes from Rats and Humans: Evaluation of Free Fraction and Uptake in Hepatocytes.** DRUG METABOLISM AND DISPOSITION. v. 34, n. 9, Cambridge,

Massachusetts, EUA.

MARTEL, S. et al. 2016. **Limits of rapid log P determination methods for highly lipophilic and flexible compounds.** *Analytica Chimica Acta*, p. 90 e 101. Geneva, Switzerland.

MARCILI, A. et al. 2014. **Phylogenetic relationships of Leishmania species based on trypanosomatid barcode (SSU rDNA) and gGAPDH genes: Taxonomic revision of Leishmania (L.) infantum chagasi in South America.** *Journal: Infection, Genetics and Evolution*, v.25, p. 44–51.

MAZUR, C. S. et al. 2009. **Contrasting Influence of NADPH and a NADPH-Regenerating System on the Metabolism of Carbonyl-Containing Compounds in Hepatic Microsomes.** *Journal: DRUG METABOLISM AND DISPOSITION*, v. 37, n. 9. USA.

MCDONNELL, A. M.; DANG, C. H. 2013. **Basic Review of the Cytochrome P450 System.** *Journal Adv Pract Oncol*, v. 4, p. 263–268. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4093435/> > . Acesso dia 19 de setembro de 2018.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Doença de Chagas situação epidemiológica.** Disponível em:< <http://portalms.saude.gov.br/saude-de-a-z/doenca-de-chagas/situacao-epidemiologica>>. Acesso em: 19 jun. 2018.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Leishmaniose visceral.** Disponível em:< <http://portalms.saude.gov.br/saude-de-a-z/leishmaniose-visceral>>. Acesso em: 26 jun. 2018.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral.** Brasília: Ministério da Saúde, 2014.

MIYNSKA, M. S.; BUSZEWSKI, B. 2016. **Study of in-vitro metabolism of selected antibiotic drugs in human liver microsomes by liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry.** Springer, Torun, Polônia,

MORENO, M. P. C. et al. 2006. **Characterization of fasted-state human intestinal fluids collected from duodenum and jejunum.** *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. DOI 10.1211/jpp.58.8.0009 ISSN 0022-3573.

MOWBRAY, C. E. et al. 2015. **Novel Amino-pyrazole Ureas with Potent In Vitro and In Vivo Antileishmanial Activity.** *Journal of Medicinal Chemistry*. Washington, USA. DOI: 10.1021/acs.jmedchem.5b01456.

MSF. MÉDICOS SEM FRONTEIRAS. **Doença de Chagas.** Disponível em: <<https://www.msf.org.br>>. Acesso em: 26 jun. 2018.

MSF. MÉDICOS SEM FRONTEIRAS. **Leishmaniose.** Disponível em: <<https://www.msf.org.br/o-que-fazemos/atividades-medicas/leishmaniose>>. Acesso em:

26 jun. 2018.

NEVES, D. P. et al. **Parasitologia Humana**. 12^a ed. p.89-103 e 49-67. São Paulo: Editora Atheneu, 2011.

NEVES, D. P. et al. **Parasitologia Humana**. 13^a ed. p.69-89. São Paulo: Editora Atheneu, 2016.

NETO, A. V. et al. **Parasitologia uma abordagem clínica**. Editora Elsevier. Rio de Janeiro, p. 118-126, 2008.

OBACH, R. S. 2011. **Predicting Clearance in Humans from *In Vitro* Data**. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, v. 11, p. 334-339. Groton (USA).

OECD. Guideline for the testing of chemicals. **Partition Coefficient (n-octanol/water): Shake Flask Method**. 1995.

OLIVEIRA, A.; MESQUITA, J. T.; TEMPONE, A. G.; LAGO, J. H. G.; GUIMARÃES, E. F.; KATO, M. J. *Exp. Parasitol.* p. 132-383. 2012.

OLSON, J. **Farmacologia clínica fácil**. Rio de Janeiro: Revinter, 2002.

PALACE-BERL, F. 2016. **Planejamento de fármacos anti-T. cruzi: Síntese de compostos nitrofurânicos, avaliação da atividade biológica in vitro e estudos de relações estrutura-atividade**. Tese (Doutorado em Tecnologia Químico-Farmacêutica) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016. doi:10.11606/T.9.2017.tde-21122016-115223. Acesso em: 09 dez 2018.

PEREIRA, D. G. 2007. **Importância do Metabolismo no Planejamento de Fármacos**. *Quim. Nova*, v. 30, n. 1, p.171-177. Campinas (SP), Brasil.

PESSÔA, S.B., MARTINS A. V. Pessoa. **Parasitologia Médica**. 11^a ed. p. 105-124. Rio de Janeiro Editora Guanabara Koogan S.A., 1988.

PICHARDO, S. et al. 2017. **Intestinal transport of Cyldrospermopsin using the Caco-2 cell line**. *Journal Toxicology in vitro*, v.38, p. 142–149.

PORTALSAUDE, 2018. Disponível em: <http://portalsaude.saude.gov.br>. Acesso em: 26 jul. 2018.

REY, L. 2011. **Parasitologia**. 4^a ed. p. 295-324 e p. 359-396. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan S.A.

ROMERO, G. A. S. **O controle de leishmaniose visceral no Brasil: transformar é preciso**. *Rev. Cad. Saúde Pública*, v.32, n.6, Rio de Janeiro, 2016.

RUELL, J.A.; AVDEEF, A. 2004. **Absorption Screening Using the PAMPA Approach**. In: Yan Z., Caldwell G.W. (eds) *Optimization in Drug Discovery Methods*

in Pharmacology and Toxicology. Humana Press.

SANOFI. Sanofi-Aventis Farmacêutica Ltda. **Bula GLUCANTIME® antimonio de meglumina**. Farm. Resp.: Silvia Regina Brollo, CRF - SP nº 9.815. Rua Conde Domingos Papaiz, n. 413, Suzano (SP), Brasil.

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

SBI. SOCIEDADE BRASILEIRA DE INFECTOLOGIA. **Leishmaniose visceral**. Disponível em:< <https://www.infectologia.org.br/pg/969/leishmaniose-visceral>>. Acesso em: 26 jun. 2018.

SCHWARZENBACH, P. M. et al. **The octanol-water partition constant: know**. Environmental Organic Chemistry, 2ª Ed. R.P. 2004.

SEVÁ, A. P. et al. **Risk analysis and prediction of visceral leishmaniasis dispersion in São Paulo State, Brazil**. 2017. Rev. PLoS Negl Trop Dis 11(2). São Paulo, Brasil. doi:10.1371/journal.pntd.0005353.

SEVIN E. et al. **Accelerated Caco-2 cell permeability model for drug Discovery**. Journal of Pharmacological and Toxicological Methods, v. 68, p. 334–339, Lens, France, 2013.

SILVA, R. M. **Caracterização in vitro do metabolismo e da absorção intestinal da casearina X**. 2016. p. 1-91. Tese de Doutorado – Universidade de São Paulo. Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto. 2016.

SILVA, J. L. **Desbravamento, agricultura e doença: a doença de Chagas no Estado de São Paulo**. Tese de doutorado. Rev. Cadernos de Saúde Pública, v.2, p. 124-140, 1986.

SILVEIRA, F. T. e CORBETT, C. E. P. **Leishmania chagasi Cunha & Chagas, 1937: nativa ou introduzida? Uma breve revisão**. Rev Pan-Amaz Saude, v. 1(2), p.143-147, 2010.

SNAPE, T. J.; ASTLES, A. M.; DAVIES, J. 2010. **Understanding the chemical basis of drug stability and degradation**. The Pharmaceutical Journal.

SOUZA, J.; FREITAS, Z. M. F.; STORPIRTIS, S. 2007. **Modelos in vitro para determinação da absorção de fármacos e previsão da relação dissolução/absorção**. Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas. v. 43. Brasil.

STEVENS, A. 2014. **Why am I Doing a Detox? Part 2 Intestinal Integrity**. Disponível em: <http://mamababydoctor.com/detox-part-2-intestinal-integrity/>. Acesso em 21 ago 2018.

STORPIRTIS, S. et al. **Farmacocinética Básica e Aplicada**. Ed. Guanabara Koogan,

Rio de Janeiro.

STORPIRTIS, S. 2013. **Métodos *In Vitro* para Avaliação da Permeabilidade de Fármacos**. V Congresso da Associação Ibero-Americana das Academias de Farmácia. Universidade de São Paulo (USP). São Paulo (SP), Brasil.

TAKAGI, T. et al. 2006. **A Provisional Biopharmaceutical Classification of the Top 200**. Oral Drug Products in the United States, Great Britain, Spain, and Japan. MOLECULAR PHARMACEUTICS , v. 3, n. 6, p.631-643.

TORREELE, E. et al. 2010. **Fexinidazole – A New Oral Nitroimidazole Drug Candidate Entering Clinical Development for the Treatment of Sleeping Sickness**. PLOS Neglected Tropical Diseases, v. 4.

TSAIOUN, K.; KATES, S.A. **ADMET for Medicinal Chemists, A Pratical Guide**. John Wiley & Sons Publication. Hoboken, New Jersey, 2011. p. 46-51.

UNIÃO QUÍMICA FARMACÊUTICA NACIONAL. **Bula UNIANF® anfotericina B**. Farm. Resp: Florentino Jesus Krencas, CRF-SP nº 49136. Rua Cel. Luiz Tenório de Brito, n.90, Embu-Guaçu, SP.

URBINA, J. A. 2002. **Chemotherapy of Chagas disease**. Curr Pharm Des, v. 8, n. 4, p.287–295.

USP. Universidade de São Paulo. **Molécula inibe crescimento de parasita da Doença de Chagas**. Disponível em: <<http://www.usp.br/agen/?p=179334>>. Acesso em 16 ago 2018.

VARELA, M. T. et. al. 2016. **Gibbilimbol analogues as antiparasitic agents - Synthesis and biological activity against *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania (L.) infantum***. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, v. 26, p. 1180 –1183, São Paulo, Brasil.

VARELA, M. T. et. al. 2017. **New alkenyl derivative from *Piper malacophyllum* and analogues: Antiparasitic activity against *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania infantum***. Chemical Biology and Drug Design. DOI: 10.1111/cbdd.12986.

VARELA, M. T. et al. 2018. **Antiparasitic activity of new gibbilimbol analogues and SAR analysis through efficiency and statistical methods**. European Journal of Pharmaceutical Sciences v. 122, p.31–41.

VRAKA, C. et al. 2017. **LogP, a yesterday's value?**. Nuclear Medicine and Biology v. 50, p.1–10, Vienna, Austria.

YAN, Z. e CALDWELL, G. W. 2004. **Optimization in Drug Discovery – In Vitro Methods**. Humana Press Inc, Totowa, New Jersey. p. 157.

YEE S. 1997. **In vitro permeability across Caco-2 cells (Colonic) can predict in vivo (small intestine) absorption in man: fact or myth**. Pharm Res: 1997; 14:763–6.

YU, H.; HUANG, Q. 2011. **Investigation of the absorption mechanism of WHO. WORLD HEALTH ORGANIZATION. Chagas disease (American trypanosomiasis).** Disponível em: <[http://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-\(american-trypanosomiasis\)](http://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-(american-trypanosomiasis))>. Acesso em: 20 jun. 2018.

WATERBEEMD H. V., GIFFORD E. **Admet in silico modelling: towards prediction paradise?**. Nat Rev Drug Discov. v. 2, n. 3, p. 192-204, Michigan, Estados Unidos, 2003.

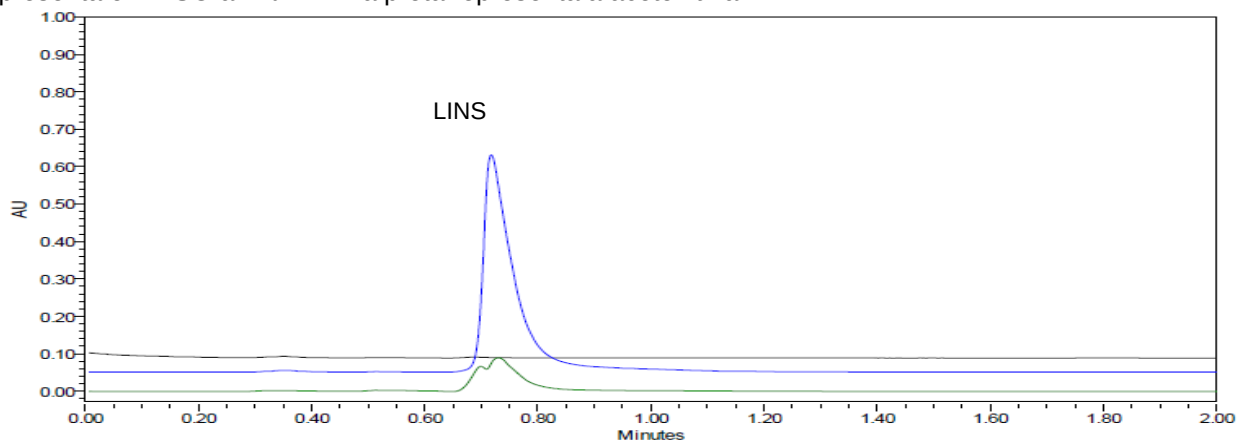
WHO. WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Chagas disease (American trypanosomiasis).** Disponível em: <[http://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-\(american-trypanosomiasis\)](http://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-(american-trypanosomiasis))>. Acesso em: 20 jun. 2018.

WINIWARTER, S.; RIDDERSTRO, M.; UNGELL, A-L. 2007. **Use of Molecular Descriptors for Absorption, Distribution, Metabolism, and Excretion Predictions.** Elsevier. AstraZeneca R&D Mölndal, Sweden.

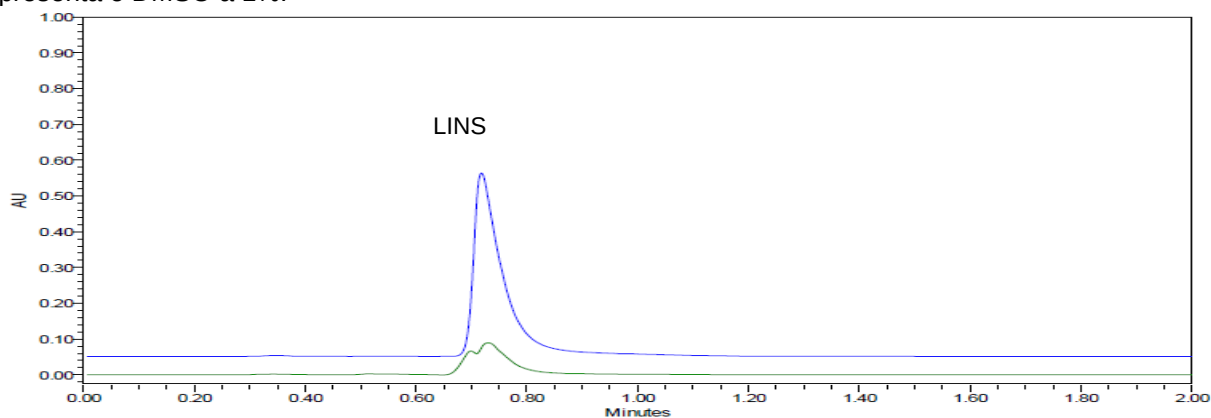
ZVEREVA, I.; EKATERINA, S.; GRIGORY, K. e GIGORY R. 2016. **Comparison of various in vitro model systems of the metabolism of synthetic doping peptides: proteolytic enzymes, human blood serum, liver and kidney microsomes and liver S9 fraction.** *Journal of Proteomics*. doi: 10.1016/j.jprot.2016.08.016. Moscou, Rússia.

ZWART, L. L.; ROMPELBERG, C. J. M.; SIPS, A. J. A. M.; WELINK, J.; VAN ENGELN, J. G. M. 1999. **Anatomical and physiological differences between various species used in studies on the pharmacokinetics and toxicology of xenobiotics.** RIIVM research for man and environment.

Apêndice1. Composto LINS03006 na concentração de 10 µg/mL, representado pela linha azul. A linha verde representa o DMSO a 1%. A linha preta representa a acetonitrila.



Apêndice 2. Composto LINS03011 na concentração de 10 µg/mL, representado pela linha azul. A linha verde representa o DMSO a 1%.



Apêndice 3. Composto LINS03013 na concentração de 10 µg/mL, representado pela linha azul. A linha verde representa o DMSO a 1%. A linha preta representa a acetonitrila.

