



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



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

Taísa Busaranho Franchin

Orientadora: Prof^a Dr^a Rosângela Gonçalves Peccinini

Coorientador: Prof. Dr. Michel Leandro de Campos

Processo FAPESP nº 2016/23229-1

Araraquara-SP

2019



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



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

Taísa Busaranho Franchin

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

Orientadora: Prof^a Dr^a Rosângela Gonçalves Peccinini

Coorientador: Prof. Dr. Michel Leandro de Campos

Araraquara-SP

2019

Ficha Catalográfica

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

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

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

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

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

CAPES: 33004030078P6

DEDICATÓRIA

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

AGRADECIMENTOS

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

A Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP-Araraquara

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

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

EPÍGRAFE

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

Jim Rohn

RESUMO

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

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

ABSTRACT

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

Keywords: Tuberculosis. ADME. Caco2. Microsomes.

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

ADME – Absorção, distribuição, metabolismo e excreção

AIDS - *Acquired immunodeficiency syndrome*

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

BAAR - Bacilos álcool-ácido resistentes

BCG - Bacilo de Calmette e Guérin

Cl – Clearance

CQA – Controle de qualidade alto

CQB – Controle de qualidade baixo

CYP – Citocromo

DMEM - *Dulbecco's Modified Eagle Medium*

DMSO – Dimetilsulfóxido

EMA – Agência Europeia de Medicamentos

EMB – Etambutol

FDA – *Food and drug administration*

GST - Glutathione-S-transferase

HIV – Vírus da imunodeficiência humana

HLM – Human Liver Microsome (Microsoma hepático humano)

INH – Isoniazida

LORA - Low oxygen recovery assay

MIC – Minimum Inhibitory Concentration (Concentração Inibitória Mínima)

MDCK - *Madin-Darby Canine Kidney*

MDR-TB – Tuberculose multirresistente

MgCl₂ – Cloreto de magnésio

NADP/NADPH - Fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina

nm - nanômetro

PAMPA - Parallel Artificial Membrane Permeation Assay

P_{app} – Permeabilidade aparente

PI - Padrão Interno

PBS - *Phosphate Buffered Saline*

PCR - *Polymerase chain reaction*

PZA – Pirazinamida

PZAse – Pirazinamidase

RLM – Rat Liver Microsome (Microsoma hepático de rato)

RMP – Rifampicina

SFB – Soro fetal bovino

SRN – Sistema regenerador de NADPH

SUS – Sistema único de saúde

$t_{1/2}$ – Meia vida de eliminação

TB – Tuberculose

TEER – *Trans epithelial electrical resistance*

UDPGT - UDP-glicuronil transferase

UGT - UDP-glucuronosiltransferases

UHPLC – *Ultra High Performance Liquid Chromatography*

UNIFESP - Universidade Federal de São Paulo

XDR-TB – Tuberculose resistência extensiva

LISTA DE TABELAS

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

LISTA DE FIGURAS

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

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

SUMÁRIO

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

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

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

1 INTRODUÇÃO

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

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

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

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

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

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

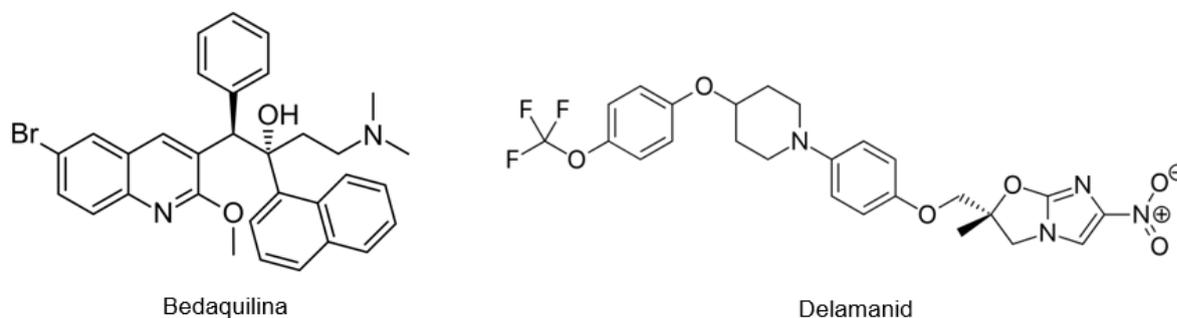


Figura 1. Estruturas dos novos fármacos para tratamento de TB resistente.

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

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

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

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

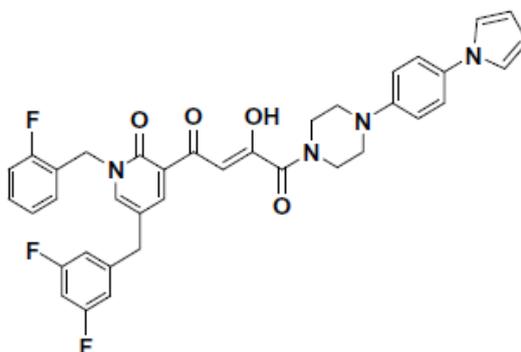


Figura 2. Estrutura do composto sintetizado por Nair e colaboradores, com possibilidade de ação no tratamento da MDR-TB.

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

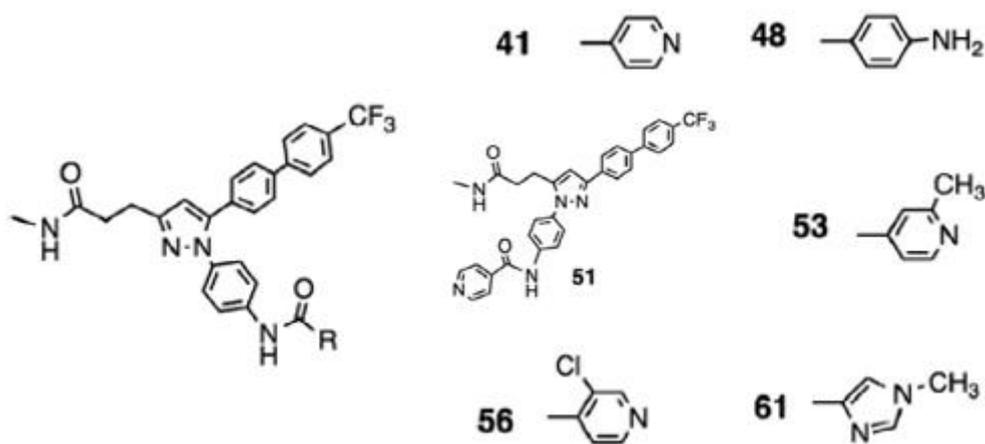


Figura 3. Estrutura dos compostos mais promissores sintetizados por Salunke e colaboradores.

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

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

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

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

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

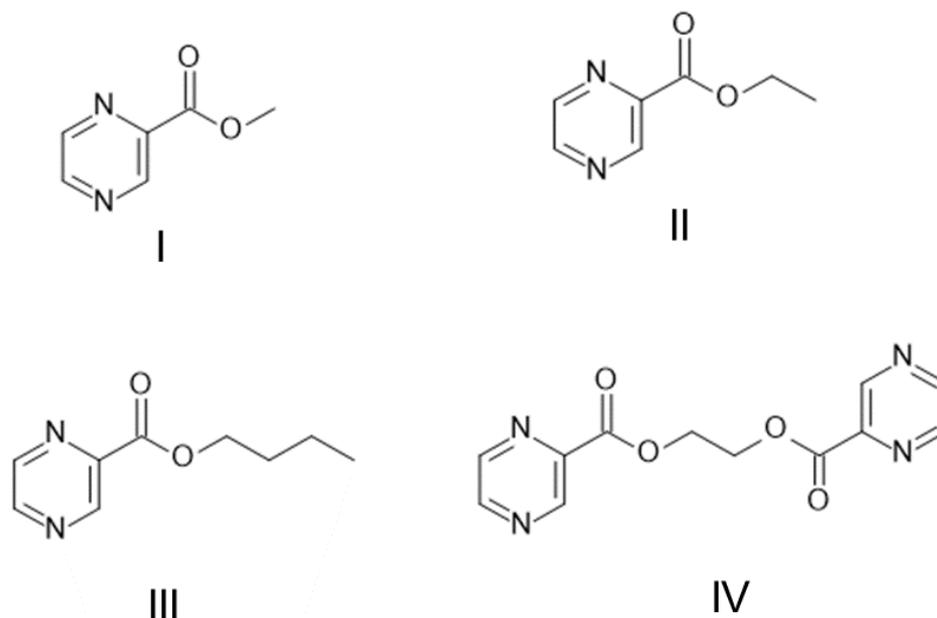


Figura 4. Estruturas dos novos compostos derivados do ácido pirazinóico

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

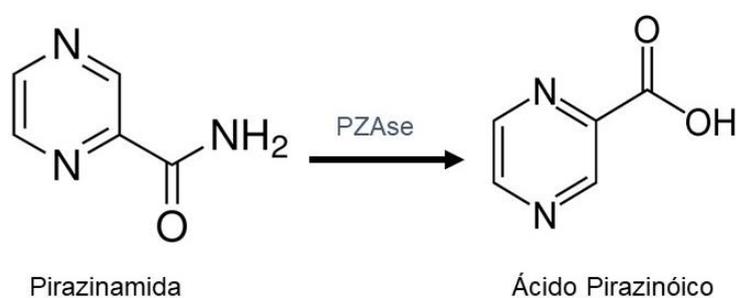


Figura 5. Conversão da pirazinamida a ácido pirazinóico pela ação da pirazinamidase. Adaptado de Segretti et al., 2016.

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

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

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

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

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

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

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 História da Tuberculose

As informações existentes sobre TB são relativamente novas, porém o histórico dessa doença, que já foi denominada uma praga, é antigo. Estudos recentes de DNA em múmias do antigo Egito, datadas de 2400 AC, comprovaram a existência de *M. tuberculosis* nos esqueletos. A palavra hebraica *schachepheheth* é usada em dois livros da Bíblia para se referir à TB. Na Grécia antiga, Hipócrates a definiu como Tísica, descrevendo corretamente os sintomas e até as lesões pulmonares. Nos séculos 18 e 19, após o declínio do Império Romano, a doença se espalhou pela Europa, sendo responsável por 900 mortes a cada 100.000 habitantes (BARBERIS et al., 2017).

Apenas em 1679 a anatomia e patologia exatas foram descritas, incluindo os tubérculos, sua progressão a abscessos, cavidades e empiema (acúmulo de pus em uma cavidade) e vinte anos depois, houve a primeira referência oficial ao caráter infeccioso da TB. O ambiente industrial cercado de precárias condições de trabalho, com pouca ventilação, superpopulosos, sem acesso sanitário, má-nutrição, dentre outros fatores de risco auxiliaram na propagação dos casos. A característica extremamente pálida dos infectados a tornou conhecida como “praga branca” (DANIEL, 2006; BARBERIS et al., 2017).

Em 1810 um médico francês reconheceu a TB como uma doença que não afeta apenas os pulmões, mas uma doença infecciosa generalizada, clinicamente definida por tosses, dificuldade em respirar, febre e expectoração purulenta. Nove anos depois, os tubérculos foram reconhecidos como sinais característicos da primeira fase da doença, que progridem para um aspecto caseoso até formar cavidades (DANIEL, 2006).

Então, em março de 1882, o marco histórico da luta contra a TB foi definido quando Robert Koch apresentou seus resultados na Sociedade Fisiológica de Berlim. Ele foi capaz de identificar, isolar e cultivar o bacilo da TB, inclusive inoculando-o em animais de laboratório, e a elucidação da etiologia da TB lhe rendeu um prêmio Nobel em 1905 (BARBERIS et al, 2017).

Em 1936, um brasileiro teve uma importante contribuição na história da TB, o pneumologista Manoel de Abreu criou a abreugrafia, uma técnica que combinava radiologia e fotografia para diagnóstico da doença. A máquina emitia feixe de raios X, que sensibilizava uma tela, gerando uma imagem visível a olho nu, capturada por uma

câmera. O método era sensível, relativamente específico, de baixo custo e permitia a realização de vários exames em pouco tempo. O exame se difundiu mundialmente e somente na Alemanha, em menos de dois anos de uso, 500 mil exames foram realizados. Em 1974, a OMS recomendou que o exame não fosse mais realizado, devido a exposição desnecessária da população a altas doses de radiação (FIORAVANTI, 2015; RUBENS, 2016).

A criação da vacina BCG (Bacilo de Calmette e Guérin) e a descoberta de fármacos contra TB auxiliariam em uma significativa retração do número de casos da doença mundialmente, porém, as epidemias ainda existem e estão concentradas nos países em desenvolvimento.

2.2 A bactéria

O gênero *Mycobacterium* possui mais de 100 espécies, sendo 30 destas capazes de causar doenças. Eles são microrganismos aeróbios estritos, possuem formato de bastão, não possuem flagelo nem cápsula e tampouco produzem toxinas. As colônias podem ter crescimento rápido, em menos de sete dias, ou crescimento lento, se acima desse tempo. Estudos inclusive verificaram que a taxa de crescimento está relacionada a patogenicidade das micobactérias (TRABULSI; ALTERTHUM, 2008; LIMA et al., 2011).

Algumas micobactérias patogênicas são *M. avium*, responsável por doenças broncopulmonares, linfadenopatias e infecções ósseas; *M. leprae*, causadora da hanseníase e *M. fortuitum* responsável por infecções ósseas, pele e tecidos moles. Dentre as doenças causadas por micobactérias, a mais conhecida é a tuberculose, que pode ser devido a infecção por *M. africanum*, *M. canettii*, *M. bovis* e principalmente pelo *M. tuberculosis* (LIMA et al., 2011).

O *M. tuberculosis* (Figura 6) possui tempo de crescimento maior que o da maioria das outras bactérias, sendo necessário aproximadamente 24 horas para geração, suas colônias têm superfície seca e rugosa e é necessário um tempo de três a quatro semanas para visualização em placa (TRABULSI; ALTERTHUM, 2008).



Figura 6. *Mycobacterium tuberculosis*. Fonte: Harvard

As micobactérias possuem parede celular composta de ácido micólico, ácidos graxos de cadeia longa ramificados, além de possuírem ácido N-glicolilmurâmico no lugar de ácido N-acetilmurâmico, mais comum no restante das bactérias. Essa composição diferenciada os torna bacilos álcool-ácido resistentes (BAAR), sendo necessário o uso da coloração de Ziehl-Neelsen, para diferenciar BAAR positivos de negativos, se corando em vermelho. A grande quantidade de lipídios também auxilia na resistência a estresses ambientais, como o ressecamento e até a desinfetantes químicos (TRABULSI; ALTERTHUM, 2008; TORTORA et al., 2010).

Sua parede celular diferenciada a torna um alvo comum nos medicamentos antituberculose, uma vez que é o mecanismo de ação da INH e de vários novos candidatos a fármaco. Outros alvos consistem na inibição da atividade da RNA polimerase, inibição da ATP sintase e inibição de síntese proteica (SILVA et al., 2018).

2.3 Patogênese

A tuberculose é uma doença infectocontagiosa cuja transmissão se dá pelas partículas infectantes expelidas através da tosse, espirro ou mesmo gotículas de saliva, se caracterizando como altamente contagiosa, portanto. Esses microrganismos podem permanecer em suspensão por algumas horas e a presença de 1 a 10 bacilos em uma suspensão já é suficiente para causar a infecção (TRABULSI; ALTERTHUM, 2008; TORTORA et al., 2010).

O *M. tuberculosis* é um patógeno intracelular de macrófagos, cujas atividades são reguladas por atuação do sistema imune do hospedeiro, e a infecção se estabelece principalmente no tecido pulmonar. Uma vez inalados, os bacilos são fagocitados por macrófagos alveolares e na maioria da população saudável a infecção não progride, por atuação do sistema imune (TRABULSI; ALTERTHUM, 2008).

O ácido micólico da parede é um grande estimulante ao sistema imune, a

ativação do macrófago ocorre a partir de citocinas pró-inflamatórias, como as interleucinas IL-6, IL-12, fator de necrose tumoral e interferon-gama. Porém, se a defesa do organismo não for capaz de eliminar os bacilos, eles são isolados em uma lesão fechada, o tubérculo. Esses tubérculos se multiplicam nos macrófagos, atraindo mais macrófagos e outras células de defesa para a área, essas células formam uma barreira ao redor dos bacilos e apesar de dificilmente conseguirem destruir a bactéria, há a liberação de enzimas e citocinas, responsáveis por formar uma lesão pulmonar inflamatória. Se a doença for interrompida nesse estágio, essas lesões se tornam calcificadas (TORTORA et al., 2010).

A morte de macrófagos libera os bacilos dos tubérculos, formando um centro caseoso na lesão, alguns destes podem permanecer dormentes, originando um grande reservatório bacteriano, que pode servir de base para reativação futura da doença (TB latente). A progressão da doença ocorre conforme o centro caseoso vai aumentando, causando destruição tecidual, no processo de liquefação, a cavidade tuberculosa possibilita que os bacilos aeróbios se multipliquem fora dos macrófagos. A liquefação continua até que o tubérculo se rompa e libere os bacilos nos bronquíolos, o que permite a disseminação destes pelas vias aéreas. A presença de bacilos no sistema circulatório e linfático, infectando vários tecidos no organismo, caracteriza a TB miliar (TRABULSI; ALTERTHUM, 2008; TORTORA et al., 2010).

A maioria dos sintomas apresentados é resultado da ação da resposta imune do hospedeiro contra o bacilo do que ações da virulência bacteriana em si. Todo esse processo leva ao enfraquecimento, febre, emagrecimento, insuficiência respiratória, dor no peito e tosse por longos períodos (acompanhada ou não de escarro ou sangue) (TRABULSI; ALTERTHUM, 2008; TORTORA et al., 2010).

2.4 Diagnóstico

O diagnóstico da TB se dá pelo teste cutâneo da tuberculina, sendo o mais preciso dentre este, o teste de *Mantoux*, que consiste na aplicação intradérmica de 0,1mL de tuberculina, uma proteína purificada derivada do *M. tuberculosis*. Após 48h da injeção, é observada se há a ocorrência de uma área endurecida, resultado da reação de hipersensibilidade devido a reação das células T previamente sensibilizadas à proteína (TRABULSI; ALTERTHUM, 2008; TORTORA et al., 2010). Se o tamanho da área endurecida for entre 0 e 4 mm, o indivíduo é classificado como

não-reator; valores entre 5 e 9 mm classificam como reator fraco, já um diâmetro de 10 mm ou superior é classificado como reator forte (CAMPOS et al., 2006).

O teste pode ser capaz de detectar infecções antigas ou recentes, além de ser a única maneira de detectar uma infecção latente, porém, deve-se atentar ao fato de que crianças imunizadas pela vacina BCG também reagem a tuberculina, sendo necessários testes adicionais para verificar a existência da infecção (TRABULSI; ALTERTHUM, 2008).

A realização de raio-X pode ser útil, uma vez que na maioria os casos, a imagem obtida é bem característica, porém ela pode variar e esse método não é específico para o diagnóstico de TB, podendo inclusive apresentar resultado normal, mesmo na presença da doença (RYU, 2015).

Uma maneira simples e de baixo custo para diagnóstico é o esfregaço de escarro, que utilizando a técnica corante adequada permite detectar a presença de bacilos por microscopia, porém esse método não possui a sensibilidade necessária (RYU, 2015). A comprovação pelo isolamento da bactéria em cultura é altamente sensível, porém se torna dificultosa, dado o crescimento lento da bactéria, que pode levar de 2 a 6 semanas (RYU, 2015), assim, técnicas de amplificação *in vitro* do genoma, como PCR (*polymerase chain reaction*), além da maior sensibilidade e especificidade garantem a obtenção de um resultado muito mais rápido (TRABULSI; ALTERTHUM, 2008; TORTORA et al., 2010).

No Brasil, o diagnóstico é oferecido de maneira gratuita no Sistema Único de Saúde (SUS), sendo a baciloscopia direta a principal técnica empregada no país, juntamente com a cultura bacteriana e radiografia de tórax (SESA, 2018). Na tentativa de ampliar a cobertura dos casos de TB, em 2018, o governo brasileiro forneceu mais equipamentos de Teste rápido molecular para TB, o exame que já é ofertado desde 2014 permite verificar a TB ativa, em apenas 2 horas, identificando o DNA do bacilo, além de detectar resistência deste à RMP. Os cartuchos para realização do teste são pré-carregados com todos os reagentes para processamento da amostra, extração e amplificação de DNA e detecção do gene de resistência a RMP (RYU, 2015). Assim, considerando a disponibilidade e custo benefício, o teste da tuberculina continua sendo o teste mais empregado na detecção da TB latente no Brasil (BRASIL, 2018).

2.5 Epidemiologia no Mundo e no Brasil

Apesar de antiga, a TB ainda é um grave problema de saúde, sendo a nona causa de mortes no mundo e a primeira causa de morte dentre infecções por um único agente, ultrapassando até mesmo o HIV/AIDS. Em 2017 ela foi responsável pela morte de 1,3 milhões de pessoas além de mais 300 mil mortes entre pessoas com HIV (WHO, 2018).

A incidência da TB continua preocupante, com aproximadamente 10 milhões de novos casos apenas em 2017, destes, 90% são adultos, 65% homens e 9% pessoas com HIV. A maioria dos novos casos ocorreram no Sudeste Asiático e 56% destes ocorreram em 5 países, sendo eles Índia, Indonésia, China, Filipinas e Paquistão (WHO, 2017; 2018).

Mesmo com os declínios das taxas de mortalidade e incidência (3 e 2% ao ano, respectivamente) são necessários decaimentos de 4-5% até 2020 para que o primeiro marco da Estratégia para o fim da TB seja atendido. A proporção de pessoas que desenvolveram TB e morreram pela doença (taxa de caso fatalidade) foi de 16%, sendo necessário um valor de 10% para atingir o marco.

No Brasil, em 2017, foram mais de 90 mil novos casos, aproximadamente 4 mil e 7 mil casos a mais quando comparado a 2016 e 2015, respectivamente, demonstrando que apesar dos investimentos realizados no combate a TB, que foi de 57 milhões de dólares apenas em 2017, os números de novos casos continuam a crescer. Apesar do aumento da incidência, os índices de mortalidade decresceram de 7,7 mil mortes em 2015, para 7 mil mortes em 2018 e outro indicador com boas perspectivas é a notificação dos casos que teve aumento crescente nos últimos 3 anos (81, 83 e 89 mil nos anos de 2015, 2016 e 2017, respectivamente) (WHO, 2016; 2017; 2018).

2.6 Tratamento

Os primeiros tratamentos efetivos foram implantados em 1940 (WHO, 2017), sendo a estreptomicina o primeiro fármaco utilizado e apesar da alta taxa de cura, não demorou muito a algumas cepas demonstrarem resistência (KESHAVJEE; FARMER, 2012). Em 1951 a INH foi testada e, devido a sua alta taxa de melhora clínica, foi rapidamente implantada, já que se mostrou efetiva, de baixa toxicidade e com custo reduzido. Logo em seguida foram desenvolvidos outros fármacos, como PZA, EMB e

RMP, tendo esta última sido considerada um marco no tratamento, devido a sua potente atividade bactericida, principalmente quando associada à INH. Entretanto, juntamente com a efetividade dos novos fármacos, a resistência bacteriana também estava presente, foi então notado que o uso combinado de mais de um fármaco diminuía os casos de resistência, sendo implantando o regime de múltiplos fármacos, utilizado até os dias de hoje (SOUZA; VASCONCELOS, 2005; HIJJAR et al., 2007).

Na década de 70 o Brasil foi o primeiro país a padronizar esquemas terapêuticos de seis meses de duração, com todos os fármacos por via oral, sendo essa decisão baseada em estudos nacionais e internacionais. Em 2009 foram introduzidos os comprimidos de dose fixa combinada, além da adição do EMB ao esquema terapêutico, assim o tratamento para todas as formas da doença em pacientes acima de 10 anos, atualmente se dá por uma fase intensiva de 2 meses fazendo uso de RMP, INH, PZA e EMB, seguido de 4 meses de fase de manutenção fazendo uso apenas de RMP e INH. Cada comprimido contém 150 mg de RMP, 75 mg de INH, 400 mg de PZA e 275 mg de EMB (BRASIL, 2001; RABAHI et al., 2017).

Os efeitos adversos mais comuns ao tratamento são mudança da coloração da urina, intolerância gástrica e alterações cutâneas, que normalmente não são graves o suficiente para causar a interrupção do tratamento.

Apesar da eficácia do tratamento ser de 95%, a média nacional da efetividade deste é de 70%, devido ao uso incorreto ou irregular dos medicamentos e até mesmo abandono do tratamento. Assim, na tentativa de aumentar a adesão ao tratamento, a OMS recomenda a adoção da estratégia Tratamento Diretamente Observado de Curta Duração (DOTS), que inclui elementos como compromisso político, identificação dos casos por baciloscopia, garantia de fornecimento regular dos medicamentos, um sistema de notificação e avaliação dos resultados e o Tratamento Diretamente Observado (TDO) (BRASIL, 2011).

O TDO consiste em um profissional treinado para observar a tomada da medicação pelo paciente, desde o início do tratamento, até a cura (BRASIL, 2011; RABAHI et al., 2017). As tomadas podem ser realizadas tanto em domicílio, quanto na unidade de saúde e essa supervisão tem como objetivo aumentar os casos de cura, diminuir o abandono e a resistência aos medicamentos, além de prevenir novas infecções e evitar maiores gastos (BRASIL, 2011)

2.7 Tuberculose resistente

O fenômeno da resistência bacilar ocorre por mecanismos de mutação genética do *Mycobacterium tuberculosis*, no seu processo de multiplicação, podendo ser classificado em resistência natural, advinda de mutações durante a multiplicação; resistência primária, em que pacientes nunca tratados se contaminam por bacilos previamente resistentes e resistência secundária, em que pacientes inicialmente sensíveis se tornam resistentes após exposição ao medicamento, geralmente devido a tratamento inadequado ou irregular (BRASIL, 2011).

A classificação também pode ocorrer pelo resultado da resistência a partir do teste de sensibilidade (BRASIL, 2011), sendo:

- Monorresistência: resistência a um fármaco antituberculose de primeira linha.
- Polirresistência: resistência a dois ou mais fármacos antituberculose, com exceção da associação RMP e INH.
- Multiresistência (MDR-TB): resistência a pelo menos RMP e INH.
- Resistência extensiva (XDR-TB): resistência à rifampicina e isoniazida, a uma fluoroquinolona e a um injetável de segunda linha (amicacina, canamicina ou capreomicina).

O tratamento dos casos de tuberculose resistente requer a inclusão de medicamento de segunda linha, troca de medicamentos, aumento do tempo (18 a 24 meses) e do custo do tratamento, além da diminuição da efetividade, aumentando a chance de recidiva.

Somente em 2016, 490 mil novos casos de MDR-TB foram contabilizados, além de 110 mil casos susceptíveis a INH, mas resistentes a RMP, totalizando 600 mil novos casos de resistência, demonstrando, um aumento, uma vez que em 2015 foram 580 mil casos no total. No Brasil, também houve aumento dos casos de resistência passando de 812 em 2012 para 1027 em 2015 (BRASIL, 2016; WHO, 2017).

2.8 O desenvolvimento de novos fármacos: estudos ADME e a farmacocinética

A indústria farmacêutica surgiu após a segunda guerra mundial e foi quando se definiu o conceito moderno empregado na descoberta e desenvolvimento de novos fármacos, se baseando na descoberta de alvos terapêuticos, desenho e seleção da molécula líder, otimização, desenvolvimento do candidato e enfim, a descoberta do medicamento. Com o intuito de agilizar todo esse processo, a indústria investiu em química combinatória e *high throughput screening* e essa estratégia realmente reduziu o tempo de descoberta, porém encareceu expressivamente os custos do desenvolvimento, uma vez a necessidade de equipamento com tecnologia inovadora, o que apesar da alta taxa de sucesso, dificulta o investimento por países menos desenvolvidos (CALIXTO; SIQUEIRA JÚNIOR, 2008; DIMASI et al., 2016).

O estudo do *Tufts Center for the Study of Drug Development*, de 2016 avaliou em mais de 2,6 bilhões de dólares o custo médio para o desenvolvimento de um novo fármaco, além de um tempo de mais de 10 anos para que o medicamento chegue ao mercado. Esses números são facilmente inteligíveis ao considerarmos que apesar das altas tecnologias empregadas, há uma limitação na descoberta de novos alvos, levando a um cenário onde de 30 mil moléculas sintetizadas, apenas 9 (0,027%) são aprovadas pelas agências regulatórias e apenas 1 (0,003%) irá trazer o retorno esperado à indústria (CALIXTO; SIQUEIRA JÚNIOR, 2008; DIMASI et al., 2016).

Por volta dos anos 80 a química medicinal possuía foco na seletividade e especificidade dos ligantes e questões como LogP, ADME e solubilidade eram deixadas de lado. *Screening in vitro* que avaliavam a especificidade do alvo, geralmente resultavam em compostos que eram excelentes ligantes, porém não eram bons candidatos ao desenvolvimento, pois eram compostos de alto peso molecular, com elevada lipofilicidade, o que pode dificultar a absorção e tornar o método contraditório por selecionar moléculas com propriedades desfavoráveis (VENKATESH; LIPPER, 2000).

As principais causas de falha no processo de desenvolvimento são propriedades farmacocinéticas inadequadas (39%), falta de eficiência (30%), toxicidade (11%), e razões relacionadas ao marketing (5%) (WATERBEEMD et al., 2007). Dentro das propriedades farmacocinéticas inadequadas, normalmente estão a baixa estabilidade química no estômago, baixa solubilidade, baixa permeabilidade e perfil metabólico indesejável (VENKATESH; LIPPER, 2000).

A farmacocinética pode ser definida como o estudo do curso temporal do fármaco no organismo, incorporando os processos de absorção, distribuição, metabolismo e excreção (SMITH et al., 2001). Se considerarmos que quase metade das falhas no processo de desenvolvimento de novos fármacos se dá devido a propriedades farmacocinéticas inadequadas, fica evidente a importância de uma avaliação precoce da farmacocinética. Estudos farmacocinéticos necessitam ser realizados em organismos vivos, pois somente nessa condição os processos ocorrem simultaneamente, porém testes em animais ou em humanos demandam tempo, altos custos, além da aprovação por comitês de ética em pesquisa, o que torna mais difícil a avaliação cinética de todas as moléculas candidatas a novo fármaco.

Uma maneira de investigar as propriedades farmacocinéticas de forma precoce é a realização de estudos de ADME, onde serão realizados diferentes ensaios, sendo estes específicos para cada processo.

2.9 Screening físico-químico e estudos de ADME

Os estudos de ADME irão avaliar cada processo separadamente, permitindo assim a triagem do grande número de compostos desenvolvidos para os candidatos com características mais promissoras, fazendo com que o tempo e dinheiro investido não sejam desperdiçados.

Esses estudos podem ser obtidos através de modelos *in silico* (avaliações computacionais), que envolvem a modelagem de dados ou de moléculas; ensaios *in vitro* ou ainda modelos preditivos que podem combinar diversas informações como log D, solubilidade, permeabilidade, metabolismo pelo CYP, substrato da P-gp para prever absorção oral (WATERBEEMD et al., 2007).

Os ensaios *in vitro* compreendem desde a determinação de propriedades físico-químicas como logP e estabilidade química, até determinação da permeabilidade e estabilidade metabólica (Figura 7). Ainda, por necessitarem de pequenas quantidades de amostra, não sofrerem interferência da variabilidade intra-indivíduo, e permitir várias análises simultâneas (VENKATESH; LIPPER, 2000), eles se tornam adequados para a investigação inicial das propriedades farmacocinéticas dos candidatos.

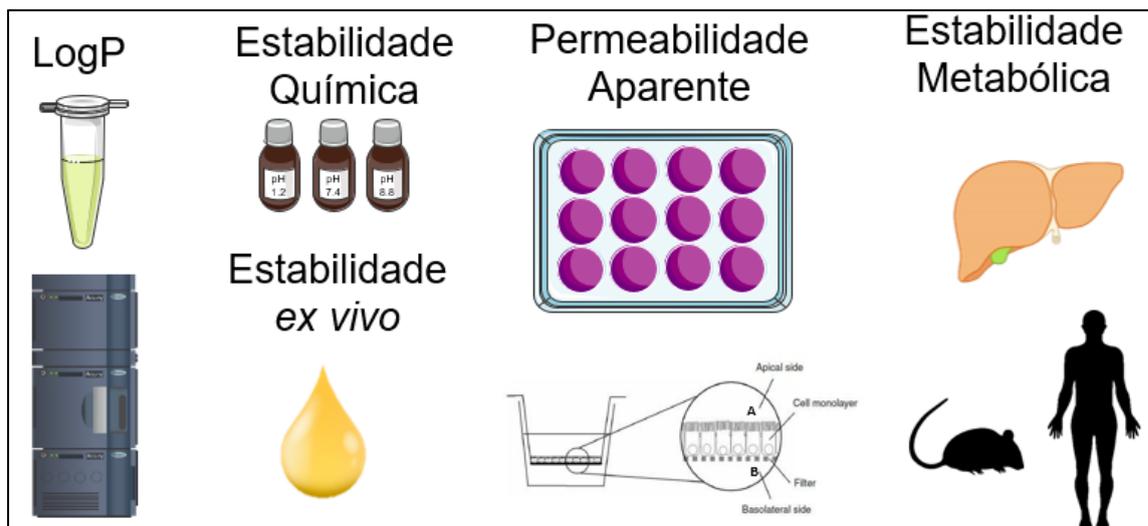


Figura 7. Alguns dos estudos *in vitro* que auxiliam na determinação precoce das propriedades farmacocinéticas

2.9.1 Coeficiente de Partição

Lipofilicidade é a tendência de um composto se particionar em uma matriz lipídica não polar, ao invés de em uma matriz aquosa (DI; KERNS, 2016), ou seja, indica a uma maior afinidade da molécula por lipídeos. A medida da lipofilicidade é usualmente descrita pelo logaritmo do coeficiente de partição ($\log P$), e este é definido como a razão entre as concentrações de equilíbrio de uma substância dissolvida em um sistema de duas fases imiscíveis (OECD, 1995). Essa partição é dependente do estado de ionização e, portanto, do pH do meio (CHEN et al., 2006).

É válido ressaltar a diferença entre $\log P$ e $\log D$, em que $\log P$ é o \log_{10} do coeficiente de partição de um composto entre uma fase orgânica e uma fase aquosa em um sistema onde o pH não é controlado; já o $\log D$ é \log_{10} do coeficiente de partição de um composto entre uma fase orgânica e uma fase aquosa em um pH específico, então uma fração das moléculas pode estar na forma iônica e outra fração na forma neutra (DI; KERNS, 2016).

O $\log P$ pode ser estimado por *softwares* com base na estrutura química ou determinado experimentalmente, sendo o *Shake-Flask* e o cromatográfico os métodos mais comuns para sua determinação (VALKÓ, 2004; CHEN et al., 2006).

O *Shake-flask* é indicado para medidas no intervalo de -2 a 5 (OECD, 1995) e é um método simples, suficientemente preciso, aplicável a compostos não-ionizáveis e possui relação direta ao fenômeno da partição. Por outro lado, é um método cujo procedimento requer maior tempo de execução, e usualmente emprega grandes

quantidades de amostra e solvente (WATERBEEEMD et al., 2007; TAKÁCS-NOVÁK, 2012).

O método cromatográfico é uma técnica de medição indireta, onde o parâmetro medido tem uma relação linear com o LogP e este é calculado usando equações de calibração (TAKÁCS-NOVÁK, 2012). O composto se particiona entre a fase móvel e a fase estacionária apolar e essa partição é medida pela retenção do analito. Moléculas mais lipofílicas tem maior afinidade pela fase estacionária, resultando em tempo de retenção maior (KERNS, 2001). São selecionados compostos com LogP conhecido como padrões, para a partir do tempo de retenção destes determinar o fator de capacidade (k) e construir a curva de Log k versus LogP, possibilitando o cálculo do LogP dos compostos teste. É indicado para medidas no intervalo de 0 a 6, é rápido e permite a determinação de vários compostos em um único experimento.

Propriedades físico-químicas, metabólicas e de toxicidade são afetadas pela lipofilicidade. Por exemplo, um aumento na lipofilicidade diminui a solubilidade na água, aumenta a permeabilidade por transporte passivo, pode levar a maior ligação a proteínas plasmáticas, o que diminui a distribuição tissular, causa bioacúmulo e aumenta o metabolismo pelo CYP450 (DI; KERNS, 2016; KERNS, 2011). Essa influência do LogP na disposição de um fármaco no organismo após sua administração enteral é tão significativa que quando Lipinski propôs a “regra dos 5”, uma das características apontadas para a perspectiva favorável de absorção oral é LogP inferior a 5, e até hoje, 90% dos fármacos no mercado apresentam LogP entre 0 e 5 (TAKÁCS-NOVÁK, 2012).

Um LogP positivo significa que há mais moléculas no octanol do que na água, indicando a lipofilicidade da molécula, já um valor negativo indica a hidrofilicidade, portanto, compostos hidrofílicos apresentam LogP menor que 0, com lipofilicidade moderada entre 0 e 3 e altamente lipofílicos acima de 5, estes últimos são mais propensos a um clearance (Cl) hepático aumentado além de absorção oral errática (TSAIOUN; KATES, 2011). Assim, um composto ideal apresentaria boa solubilidade em água, mas também uma certa lipofilicidade, o que permitiria a sua passagem tanto por ambientes aquosos, quanto lipídicos.

2.9.2 Estabilidade química

A avaliação da estabilidade química é um ensaio antigo, utilizado a mais de 100 anos e possui um papel crítico em selecionar os melhores candidatos dentre inúmeras moléculas produzidas, uma vez que a instabilidade reduz a quantidade de fármaco entregue ao alvo terapêutico, além de que os produtos formados podem causar efeitos tóxicos. Assim, os resultados dos testes com compostos em diferentes situações informam o grupo de pesquisa desenvolvedor que podem ser necessárias modificações para aumento da estabilidade, ajuda a determinar a capacidade de desenvolvimento do composto além de fornecer informações que guiem nas estratégias de estabilização. A descoberta tardia da instabilidade atrasa a introdução do produto, sendo, portanto, importante determinar a existência da instabilidade o mais precocemente possível (CHEN et al., 2006; KERNS; DI, 2007; DI; KERNS, 2009).

Os fatores que determinam a estabilidade de um composto incluem fatores intrínsecos, como a estrutura molecular e fatores ambientais, como temperatura, pH, força iônica, luz, oxigênio, dentre outros (YOSHIOKA; STELLA, 2002)

Os estudos de estabilidade podem ser realizados tanto na fase de descoberta, quanto na fase de desenvolvimento de um fármaco, com algumas diferenças de foco, por exemplo, na descoberta, é interessante avaliar a estabilidade do insumo farmacêutico ativo sozinho, principalmente em solução e por um curto período de tempo como horas ou dias, já no desenvolvimento, tanto a estabilidade do insumo, quanto da formulação são avaliadas, principalmente na forma sólida e por um longo período de tempo como meses ou anos (DI; KERNS, 2009).

Assim, as aplicações do estudo de estabilidade no descobrimento são determinar os compostos mais promissores, guiar modificações estruturais e até auxiliar na elucidação do mecanismo de ação, enquanto no desenvolvimento esses estudos permitem verificar a compatibilidade do excipiente e prever a vida de prateleira (DI; KERNS, 2009).

Um dos métodos de avaliação mede a concentração do composto em diferentes tempos, durante a incubação em determinada condição e auxiliam na comparação da estabilidade entre análogos, assim como na seleção dos compostos e determinação da cinética de decomposição (KERNS; DI, 2007).

A estabilidade em tampões de diferentes pHs é relevante na escolha dos melhores candidatos, uma vez que para a maioria das moléculas, há pretensão de

administração oral e o pH do trato gastrointestinal varia de um pH ácido no estômago (pH 1,2) para um pH básico no intestino (pH 8), portanto, uma instabilidade nesse intervalo de pH pode prejudicar a sua biodisponibilidade oral, além do pH 7,4, correspondente aos fluídos corporais e tampões neutros. Assim, a determinação da estabilidade de compostos nessa faixa de pH é comumente usada nos estágios iniciais de descobrimento por cobrir os pHs das principais situações que os fármacos serão submetidos no organismo (KERNS; DI, 2007; DI; KERNS, 2009).

2.9.3 Estabilidade *ex vivo*

A estabilidade *ex vivo* é uma avaliação da estabilidade dos compostos em material biológico no ambiente externo ao modelo animal. Ou seja, é uma avaliação da estabilidade em plasma, sangue, urina, ou qualquer material biológico em situação de bancada. Para tal, faz-se a coleta do material biológico do modelo animal e adiciona-se quantidades conhecidas do composto para avaliação periódica de sua permanência.

A avaliação da estabilidade *ex vivo* se torna crucial, ao considerarmos que, independente da forma de administração, a maioria dos fármacos será distribuído até o alvo através do sistema circulatório. O plasma sanguíneo contém hidrolases que podem agir sobre os compostos, levando à degradação antes de atingir o sítio alvo, caracterizando um perfil farmacocinético inadequado. Outro aspecto relevante acerca da estabilidade *ex vivo* é a dificuldade analítica para a realização dos estudos em farmacocinética pois a degradação do composto continua mesmo após a coleta da amostra. Essa instabilidade, entretanto, pode ser utilizada como estratégia em pró-fármacos (DI et al., 2005; DI; KERNS, 2016).

O plasma contém várias enzimas hidrolíticas, como colinesterase, aldolase, lipase, fosfatase, dentre outras. A concentração de cada uma delas se diferencia dependendo da espécie, gênero, idade, raça e estado da doença. Os grupos funcionais mais susceptíveis a ação das enzimas são ésteres, amida, carbamato, sulfonamida e lactona (HARTMAN, 2002; DI; KERNS, 2016).

A albumina sérica possui atividade para alguns compostos como a aspirina e ésteres do ácido nicotínico. Sua atividade se apresenta inclusive em condições não favoráveis a outras esterases típicas, porém seu *turnover* não é tão alto quanto das outras, o que a classifica como uma proteína com atividade semelhante a esterase, e

não como uma esterase (HARTMAN, 2002).

É necessária grande atenção no quesito estabilidade, uma vez que durante os testes iniciais, também são realizados testes de estabilidade em microsossoma, porém as enzimas microsossomais são diferentes das plasmáticas e estabilidade frente microsossomas não implica estabilidade plasmática. Para alguns compostos a taxa de degradação por proteínas plasmáticas é tão grande, que resulta em alto clearance, curta meia-vida e baixa área sob a curva, resultando em fraco desempenho *in vivo* (DI et al., 2005; DI; KERNS, 2016).

A determinação precoce da estabilidade plasmática permite a priorização de compostos para estudos *in vivo*, além de expor os compostos que precisem de modificações estruturais.

2.9.4 Permeabilidade

A via de administração oral, por ser menos invasiva, mais simples e de melhor adesão é a principal via almejada durante o desenvolvimento de novos fármacos, sendo necessária a avaliação precoce da absorção dos novos candidatos a fármaco.

A absorção de substâncias ocorre principalmente no intestino delgado, sendo os enterócitos as células mais comuns e responsáveis pela maior parte da absorção de nutrientes e fármacos. São células polarizadas que possuem membrana apical e basolateral separadas por junções intercelulares (BALIMANE; CHONG, 2005).

O transporte de substâncias pela membrana intestinal é um processo complexo e dinâmico e existem diferentes tipos de transporte. O principal mecanismo é a difusão passiva, que se dá por gradiente de concentração, e pode ocorrer entre as junções celulares (transporte paracelular) ou pelo citoplasma (transporte transcelular). O transporte paracelular é mais comum para moléculas mais hidrofílicas, enquanto o transcelular é mais comum para moléculas lipofílicas. Outras substâncias, como aminoácidos são transportados a partir de transportadores específicos, que requerem gasto de energia (transporte ativo) e ainda há um mecanismo que faz com que algumas moléculas que entram no citoplasma sejam transportadas de volta ao lúmen intestinal, sendo a glicoproteína P responsável por esse efluxo (LI, 2001).

Considerando os vários tipos de transporte, a estimativa da absorção com base apenas em propriedades físico-químicas, como lipofilicidade, solubilidade e pKa, pode ser significativamente distante da realidade e a realização dos estudos de

permeabilidade em modelos *in vitro* da mucosa intestinal permite boa predição da absorção *in vivo*. Alguns desses modelos são PAMPA (*Parallel Artificial Membrane Permeation Assay*), MDCK (*Madin-Darby Canine Kidney*), Câmara de Ussing e Caco-2.

O modelo PAMPA consiste em um filtro hidrofóbico onde é aplicado um lipídio (lecitina de ovo ou outro fosfolipídio) e um solvente orgânico inerte, esse sistema com membrana forma 2 compartimentos, onde em um destes será colocado o composto teste e no outro um tampão aquoso, permitindo a avaliação da migração do composto através da concentração no compartimento receptor. Esse método é capaz de mimetizar o epitélio intestinal apenas em relação à absorção passiva e paracelular, subestimando a absorção de compostos que sofrem transporte ativo (KANSY et al., 1998).

As células MDCK se diferenciam em células epiteliais colunares e formam junções intercelulares, porém são derivadas do fígado de cães e, portanto, há uma grande chance de que os transportadores expressos sejam diferentes dos expressos em humanos. Seu tempo de cultivo é curto (apenas 3 dias), porém ainda são necessários mais estudos para confirmar a correlação da permeabilidade com a absorção em humanos (BALIMANE; CHONG, 2005).

A câmara de Ussing consiste em uma técnica que emprega uma câmara de difusão horizontal, em que o tecido intestinal da espécie a ser estudada (rato, coelho, cachorro, macaco e até mesmo humano) é disposto entre câmaras e mantido em meio líquido. Essa técnica, por utilizar o tecido, permite uma melhor representação da morfologia *in vivo*, possibilitando a avaliação dos vários processos envolvidos. Porém não é possível a análise de vários compostos de uma única vez, além de que o tecido se mantém viável por apenas 2 horas, tempo que pode não ser suficiente para avaliar a permeabilidade de alguns compostos (SJÖBERG et al., 2013; WESTERHOUT et al., 2015).

O modelo *in vitro* mais bem estabelecido utiliza células Caco-2, que são células imortalizadas de adenocarcinoma colo retal humano que se diferenciam em enterócitos quando cultivadas. Elas formam uma monocamada (Figura 8), apresentam morfologia polarizada (polo apical com microvilosidades e polo basolateral), junções celulares e expressam transportadores e enzimas, possuindo várias similaridades funcionais e fisiológicas aos enterócitos normais (ARTURSSON; KARLSSON, 1991; SAMBUY et al., 2005).

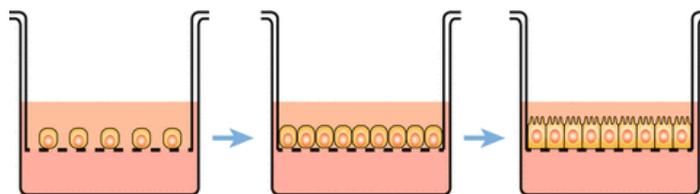


Figura 8. Esquema de diferenciação das células Caco-2 em enterócitos. Fonte: LEA, 2015.

A integridade e maturidade da monocamada pode ser avaliada através da medição da resistência elétrica trans epitelial (TEER – *trans epithelial electrical resistance*), que é feita utilizando um voltímetro cujos eletrodos ficam nas câmaras apical e basolateral do inserto (SHAH et al., 2006). A TEER costuma aumentar conforme o tempo de cultura, atingindo o máximo aproximadamente no 15º dia, porém a expressão dos transportadores só ocorre próximo ao 21º dia (ANDERLE et al., 1998; SOUZA et al., 2003; BRAVO et al., 2004). Os valores da TEER dependem da área dos insertos, do número de células semeada, das condições de cultura e do número de passagem, havendo relatos de valores de 150 a 1600 Ω/cm^2 , bem superiores aos valores do íleo humano, que variam entre 40-50 Ω/cm^2 (SOUZA et al., 2003; LEGEN et al., 2005).

Fármacos que apresentam alta permeabilidade são rápida e completamente absorvidos através das vilosidades, já fármacos de baixa permeabilidade acabam ficando mais tempo no lúmen intestinal antes de serem absorvidos, e podem, portanto, se difundir mais abaixo das vilosidades, o que não só aumenta a superfície de absorção, mas também permite que uma fração da absorção ocorra através da via paracelular na região da cripta. Assim, a superfície de absorção no jejuno humano se estenderia até a área da cripta, enquanto na monocamada de Caco-2, ela se restringe apenas a monocamada, fazendo com que fármacos de baixa permeabilidade apresentem maior permeação *in vivo* do que na cultura celular (SHAH et al., 2006).

Outros fatores que podem reduzir a permeabilidade de fármacos nas células Caco-2 quando comparado ao epitélio intestinal são a ausência de fluxo sanguíneo sistêmico, de células caliciformes e a mobilidade reduzida (SHAH et al., 2006).

Apesar de suas limitações, o ensaio utilizando células Caco-2 possui alta correlação com absorção *in vivo* (YEE, 1997; BIGANZOLI et al., 1999; YANG et al., 2017), sendo aceito e indicado pelo FDA para predição desta (LE FERREC et al., 2001).

2.9.5 Estabilidade Metabólica

Após a absorção oral, o fármaco é transportado até o fígado, onde é submetido ao metabolismo hepático, seguido da eliminação pela bile ou pelos rins. O objetivo do metabolismo é eliminar os xenobióticos do corpo, e para isso, os metabólitos tendem a ser mais polares e solúveis que o fármaco inicial, facilitando a eliminação. Para tornar os metabólitos mais polares, os compostos podem passar por duas fases de metabolização, sendo as reações de fase I e as reações de fase II. Na fase I as moléculas sofrem processos oxidativos e redutores por enzimas do citocromo P450, sendo CYP1A2, CYP2A6, CYP2C9, CYP2D6 e CYP3A4 as principais enzimas envolvidas na metabolização. Na fase II ocorre a conjugação e a hidrólise de grupos polares (glicose, sulfato, metionina, cisteína ou glutatona) diretamente no fármaco ou em um produto da reação de fase I, sendo a UDP-glicuronil transferase (UDPGT) e a glutatona-S-transferase (GST) as principais enzimas envolvidas nessas reações (LI, 2001; WHITE, 2001; TANIGUCHI; GUENGERICH, 2009; DA COSTA NUNES, 2015).

O metabolismo de fármacos é determinante para várias propriedades, como interação entre fármacos (a coadministração pode interferir no metabolismo de um dos fármacos), toxicidade (um composto pode se tornar mais ou menos tóxico a partir do metabolismo) (WHITE, 2001; TANIGUCHI; GUENGERICH, 2009) e estabilidade metabólica, que será o foco deste tópico.

A estabilidade metabólica é definida como a susceptibilidade do composto passar por biotransformação (DA COSTA NUNES, 2015) então, compostos que sejam rapidamente metabolizados, ou seja, possuem baixa estabilidade metabólica, irão requerer múltiplas doses diárias para manutenção dos níveis plasmáticos na faixa adequada. Já compostos com alta estabilidade metabólica, que não são prontamente metabolizados e eliminados podem ter uma longa meia-vida, o que influencia na segurança destes (LI, 2001).

A taxa de metabolismo permite a determinação da biodisponibilidade, clearance, meia-vida de um composto e, juntos, esses parâmetros irão definir a dose e frequência de administração (SINZ, 2011). Assim, ensaios *in vitro* para determinação da estabilidade metabólica de novos compostos são empregados durante o processo de seu desenvolvimento. Os ensaios podem ser realizados com porções de tecido hepático, hepatócitos (em suspensão ou plaqueáveis), fração S9 e microssomas (COE; KOUDRIAKOVA, 2014).

Porções de tecido hepático representam o maior nível de integridade estrutural, pois contém todos os tipos celulares e ligações celulares. Elas mantêm a função metabólica por até 96 horas se em condições apropriadas de cultura e as conexões intercelulares entre diferentes tipos celulares promovem um alto nível de comunicação e função celular. Uma de suas vantagens é a habilidade de reproduzir processos metabólicos complexos, onde mais de uma reação ocorre na molécula (fase I seguida de fase II), porém eles não permitem a criopreservação e os experimentos devem ser realizados em órgãos recém isolados e fatiados, o que torna difícil o seu uso rotineiro, principalmente quando se pretendem utilizar outras espécies além de ratos (FASINU et al., 2012; COE; KOUDRIAKOVA, 2014).

Os hepatócitos podem ser utilizados em suspensão ou em cultura. Quando em suspensão eles representam uma unidade completamente funcional, contendo concentrações normais de enzimas e cofatores, com a habilidade de realizar reações metabólicas complexas e de vários passos, porém por não estarem ligados a uma matriz extracelular a viabilidade das células começa a declinar por volta de 2 a 3 horas, limitando a extensão da incubação. Hepatócitos em cultura conseguem sobreviver por dias ou até mesmo semanas devido ao ambiente artificial criado na cultura celular, eles são utilizados mais para avaliação de indução enzimática ou interações entre fármacos. Entretanto, mesmo em cultura, eles começam a se diferenciar e as propriedades fenotípicas das células podem mudar. O fato de depender de tecido hepático fresco também impossibilita a repetição dos estudos com o mesmo doador (COE; KOUDRIAKOVA, 2014).

As frações subcelulares são obtidas após várias centrifugações do fígado e podem ser armazenadas a -80°C por vários anos. O modelo mais popular e mais usado para avaliação do metabolismo de fármacos são os microssomas, uma fração subcelular ativa metabolicamente do retículo endoplasmático que existe originalmente em vesículas. Eles são utilizados para avaliação da ação das enzimas de fase I sobre os compostos, uma vez que expressam em abundância as enzimas do CYP450 e UDP-glucuronosiltransferases (UGT) (FASINU et al., 2012). Os microssomas são o modelo de escolha devido a ser um sistema de baixo custo, robusto, de fácil uso para análises *high throughput*, pouca variação entre lotes devido a origem de múltiplos doadores e ampla disponibilidade de fornecedores comercialmente conceituados (COE; KOUDRIAKOVA, 2014).

O ensaio com microssomas necessita da adição de cofatores, podendo ser NADPH (Fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina) ou sistema regenerador de NADPH (SRN) para fornecer a energia que suporta o ciclo catalítico das enzimas. Um fator importante a se considerar ao utilizar os microssomas é que o contato direto e disponibilidade do composto e seus metabólitos às enzimas não refletem a situação *in vivo*, além de que é preciso conhecimento da fração de fármaco que se liga as proteínas (FASINU et al., 2012), uma vez que apenas a fração livre estará disponível para metabolização e a não consideração desse fator pode superestimar a instabilidade dos compostos expostos aos sistemas enzimáticos.

Os estudos *in vitro* das propriedades físico químicas e propriedades ADME permitem a obtenção de informações que auxiliam na predição de processos que ocorrerão nos estudos *in vivo*. No entanto conhecer as limitações desses estudos *in vitro* e considerar a sua menor complexidade quando comparados aos modelos *in vivo* é fundamental para que realmente estas informações obtidas sejam úteis no planejamento de estudos futuros e na interpretação dos resultados obtidos nos modelos *in vivo*.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Realizar estudos in vitro das propriedades físico químicas e ADME dos compostos I, II, III e IV com potencial atividade antimicrobacteriana para, com base nas informações obtidas, selecionar os mais promissores para a condução dos estudos de farmacocinética.

3.2 Objetivos Específicos

- Desenvolver os métodos analíticos e bioanalíticos para quantificação dos compostos I, II, III e IV através da cromatografia líquida de ultra eficiência (UHPLC) acoplado ao detector UV-visível;
- Avaliar as propriedades físico-químicas dos compostos I, II, III e IV.
- Avaliar a permeabilidade dos compostos I, II, III e IV através da utilização de células Caco-2;
- Avaliar a estabilidade metabólica dos compostos I, II, III e IV em meio microsomal hepático de ratos e de humanos.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Determinação da absorvidade dos compostos I, II, III e IV por análise espectrofotométrica

A determinação da absorvidade foi realizada para auxiliar no desenvolvimento do método analítico e bioanalítico dos compostos testes. Soluções a 100 µg/mL em metanol dos quatro compostos foram preparadas para a realização da varredura. A determinação da absorvidade foi realizada com leitor de placa Power Wave HT – Biotek®.

4.2 Desenvolvimento e validação dos métodos analítico e bioanalítico para a determinação dos compostos I, II, III e IV em UHPLC

O desenvolvimento e validação dos métodos foi baseado nos guias da ANVISA (RDC 27/2012 para métodos analíticos e 166/2017 para métodos bioanalíticos).

4.2.1 Limites de Confiança

Para que o método analítico ou bioanalítico possa ser utilizado nos estudos, é preciso que ele cumpra alguns requisitos, sendo eles:

Seletividade

A seletividade é a capacidade do método de identificar o analito em questão, diferenciando-o de outros compostos que possam estar presentes, como produtos de degradação, impurezas e componentes da matriz. Para sua determinação, a matriz pura foi analisada e comparada a matriz adicionada de composto e padrão interno. A não existência de picos interferentes nos tempos de retenção dos compostos e do padrão interno indicam a seletividade do método.

Linearidade

A linearidade do método é definida como sua capacidade de obtenção de respostas proporcionais à concentração do analito. Sua determinação é realizada a partir da construção de curva de calibração, em triplicata e com no mínimo cinco pontos para métodos analíticos e no mínimo seis pontos para métodos bioanalíticos. As curvas de calibração foram construídas projetando-se no eixo das ordenadas a razão entre a área de cada composto e a área do PI (áreas obtidas através da média das replicatas injetadas) e no eixo das abcissas as concentrações nominais de cada

composto ($\mu\text{g/mL}$). Para aceitação da curva o coeficiente de correlação (r) deve ser maior que 0,99 para métodos analíticos e maior que 0,98 para métodos bioanalíticos (RDC 166/2017 e 27/2012).

Precisão e Exatidão

A precisão de um método avalia a proximidade entre as medidas obtidas, demonstrando a reprodutibilidade deste. A exatidão avalia a proximidade das medidas obtidas, quando comparadas com o valor nominal da amostra. A avaliação da precisão e da exatidão foi realizada intracorrida, em triplicata para todos os pontos das curvas. Segundo a RDC 166/2017 para métodos analíticos os critérios de aceitação devem ser definidos e justificados de acordo com alguns aspectos, dentre eles o objetivo do método e a variabilidade intrínseca deste. A RDC 27/2012 preconiza variação igual ou menor que 15% nos valores de precisão e exatidão para aceitação do método.

Limite Inferior de Quantificação

O limite inferior de quantificação (LIQ) é a menor concentração do analito que pode ser quantificada com precisão e exatidão adequadas. Ele deve apresentar uma resposta no mínimo cinco vezes superior a qualquer ruído da amostra branco no tempo de retenção do fármaco, deve ser expresso por no mínimo cinco replicatas, e pode apresentar valores de precisão de 80-120% e exatidão de 0-20%.

4.2.2 Sistema cromatográfico

Foi utilizado um sistema de cromatografia líquida de ultra eficiência UPLC H-Class®, Waters equipado com detector UV-Visível em 230 nm para I, II, III e IV, utilizando coluna HSS C18 SB 1.8 μm 2.1 x 100 mm Waters® com coluna de guarda HSS C18 SB 1.8 μm 2.1 x 5 mm Waters®, que foi mantida a 30°C.

A fase móvel foi composta de metanol e água (40:60, v/v), modo isocrático, com vazão de 0,4 ml/min, volume de injeção de 2 μl , tempo de corrida de 5 minutos e as amostras mantidas a 10°C.

4.2.3 Método analítico

Uma solução concentrada (100 $\mu\text{g/mL}$) dos compostos foi diluída em metanol para a construção das curvas, que para os compostos I, II e IV compreenderam os

pontos 0,078; 0,156; 0,3125; 0,625; 1,25; 2,5; 5 e 10 µg/mL, já para o composto III, por este apresentar resposta menor, não foi possível quantificar a concentração mais baixa e o intervalo foi de 0,156 a 10 µg/mL.

4.2.4 Método bioanalítico

Os microsomas e o plasma são amostras biológicas e possuem proteínas, sendo necessária a realização de procedimentos de extração do analito de interesse da amostra biológica para análise por UHPLC. Por esta razão, para a realização dos estudos de estabilidade *ex vivo* (em plasma) e estabilidade metabólica, foram desenvolvidos e validados os métodos bioanalíticos.

4.2.4.1 Microsoma de rato e humano

Para a construção das curvas de calibração, o microsoma branco na concentração de 0,5 mg/mL de proteína, foi adicionado o fármaco e foram realizadas diluições seriadas dos compostos, originando os níveis de concentração de 0,156; 0,3125; 0,625; 1,25; 2,5 e 5 µg/mL. Benzocaína (50 µg/mL) foi empregada como padrão interno (PI), evitando desvio de resultados em decorrência de perdas durante o processamento ou por alterações no processo de análise. A cada amostra de microsoma (100 µL) foram adicionados 100 µL de PI em metanol mantido a 4°C para precipitação das proteínas, em seguida a mistura foi homogeneizada em vórtex por 1 minuto e centrifugadas a 10000 x g por 15 minutos. 100 µL do sobrenadante foram filtrados em filtro PTFE 0,22µm e acondicionados em vials *Max Recovery* para análise.

4.2.4.2 Plasma de rato

As curvas de calibração foram construídas após a adição de compostos plasma branco. Diluições seriadas foram realizadas, originando os níveis de concentração de 1,25; 2,5; 5; 10; 20 e 30 µg/mL para os compostos I e IV; 1,25; 2,5; 5; 10; 15 e 20 µg/mL para o composto II e 5; 10; 15; 20; 25 e 30 µg/mL para o composto III. A cada amostra de plasma (100 µL) foram adicionados 200 µL de PI em metanol mantido a 4°C para precipitação das proteínas, em seguida a mistura foi homogeneizada em vórtex por 1 minuto e centrifugadas a 12000 x g por 20 minutos. 200 µL do sobrenadante foram filtrados em filtro PTFE 0,22µm e acondicionados em vials *Max*

Recovery para análise.

4.3 Determinação do Log P dos compostos I, II, III e IV.

4.3.1 Determinação *in silico*

A determinação do LogP *in silico* dos compostos foi feita em dois softwares, sendo ChemDraw® 12.0 e Marvin Sketch® 16.7.18.

4.3.2 Método Cromatográfico

A determinação do LogP pelo método cromatográfico consiste na construção de uma curva de calibração do LogP de alguns padrões versus o Log k destes, originando uma equação que permite o cálculo para os compostos teste. O ensaio e os padrões foram determinados com base no Guideline 117 da OECD/2004 (Organization for Economic Co-operation and Development).

O método cromatográfico foi realizado em UHPLC Acquity H-Class®, Waters com detector UV-Vis, sendo a separação realizada em coluna BEH C18 2,1x50mm, 1,7µm com coluna de guarda BEH C18 2,1x5 mm, 1,7 µm, mantida a 30° C. A fase móvel foi composta de metanol:ácido fórmico 0,1% (70:30) e vazão de 0,4 mL/min. Os compostos foram solubilizados em metanol ou acetonitrila e então diluídos para concentrações de 50 µg/mL, o comprimento de onda utilizado variou conforme o melhor comprimento de onda de cada composto analisado.

Tabela 1. Substâncias utilizadas para a determinação do Log P.

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

Para obtenção do fator de capacidade (k) a equação abaixo é utilizada:

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

Onde t_r é o tempo de retenção do composto e t_0 o tempo morto, que é definido como o tempo de um composto não retido na coluna.

Assim, utilizando o tempo de retenção obtido pelo método cromatográfico, o log k das substâncias testes e dos padrões foi determinado e interpolado na curva de linearidade de log k versus log P, possibilitando a obtenção do log P de cada candidato a fármaco (OECD, 1995).

4.4 Ensaio de estabilidade química dos I, II, III e IV nos pHs 1,2, 9,0 e tampão Hanks

Devido a intenção da administração oral dos compostos testes, é necessária a determinação da sua estabilidade química nos pHs 1,2, correspondente ao pH do suco gástrico (1,5 a 2) e pH 8,8, correspondente ao pH do intestino delgado (8,0 a 9,0).

O tampão Clark-Lubs (pH 1,2) foi preparado com uma solução de cloreto de potássio a 0,2 M seguido da adição de ácido clorídrico 0,2 M até que a solução atingisse pH de 1,2. Para a estabilidade em meio básico, foi utilizado o tampão Tris, que foi preparado a partir da dissolução de Tris em água e ajuste de pH com solução de hidróxido de sódio a 2 M, resultando em pH 8,8.

Devido ao ensaio da Caco-2 empregar o tampão Hank's, foi necessária a determinação da estabilidade neste, sendo sua preparação realizada a partir da dissolução do sal em água MiliQ®, adição de bicarbonato de sódio e ajuste do pH com ácido clorídrico 1 N até obtenção do pH 7,4.

Foram utilizadas os Controles de Qualidade Baixo e Alto (CQB e CQA) de cada composto (CQB = 0,156 µg/mL e CQA=8 µg/mL para I, II e IV e CQB = 0,3125 µg/mL e CQA=8 µg/mL para III), as soluções foram mantidas em incubadora, com agitação constante de 100 rpm e temperatura de $37 \pm 2^\circ\text{C}$, sendo as coletas em triplicatas nos tempos de 0; 5'; 15'; 30'; 45'; 60'; 90', 2h, 4h, 6h, 8h, 10h, 12h e 24h. As amostras foram analisadas logo após a coleta pelo método cromatográfico previamente desenvolvido.

A área nos tempos de coleta foi comparada com a área inicial, ou seja, obtida no tempo zero, e foi realizado teste Friedman (não paramétrico para medidas

repetidas) com pós teste de Dunn's com nível de significância de 0,05 para verificar a estabilidade dos compostos.

4.5 Avaliação da permeabilidade dos compostos I, II, III e IV através da utilização de células Caco-2

4.5.1 Cultura de células Caco-2

A linhagem celular de adenocarcinoma de cólon humano, Caco-2 (ATCC® HTB-37™) foi cultivada sob condições padronizadas de cultivo celular (37°C, 5% de CO₂ e 95% de umidade). O meio de cultura celular utilizado foi o *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM) com 4,5 g/l de D-glicose (Sigma-Aldrich®), suplementado com 20% soro fetal bovino (SFB) (Gibco®) e acrescido de 1% de aminoácidos não essenciais, 100 U/mL penicilina, 100 µg/mL estreptomicina e 25 µg/mL de anfotericina B. As células foram inicialmente cultivadas em garrafas de 25 cm² e ao atingirem confluência adequada, foram transferidas para garrafas de 75 cm² a partir da adição de tripsina 0,25% / EDTA 2,4 mM (Gibco®).

4.5.2 Ensaio de citotoxicidade pelo teste da Resazurina

Muitos ensaios de citotoxicidade envolvem a utilização de compostos radioativos ou tóxicos às células, por isso, desde a proposição do uso do Alamar Blue para verificar viabilidade celular em 1993 por Fields e Lancaster, esse ensaio passou a ser amplamente utilizado, uma vez que o reagente é estável, solúvel em água, é minimamente tóxico, permitindo inclusive o monitoramento contínuo das células, tornando o procedimento mais simples e aplicável. O Alamar Blue utiliza a resazurina como indicador redox do crescimento celular, permitindo verificar a viabilidade celular. A resazurina é a forma oxidada e apresenta coloração azul escura, que emite pouca fluorescência, já sua forma reduzida (resorufina), possui coloração rosa forte que é altamente fluorescente. A redução de resazurina a resorufina se dá por ação de enzimas mitocondriais, ou seja, a presença de células viáveis é essencial para esta redução. Portanto, após a adição da resazurina e tempo de incubação, a permanência da coloração azulada indica morte celular (não há células viáveis), já a coloração rosa indica presença de células viáveis (AHMED et al., 1994; NAKAYAMA et al., 1997; O'BRIEN et al., 2000; AL-NASIRY et al., 2007; BONNIER et al., 2015).

O teste consiste em 3 etapas, sendo a primeira a semeadura das células nas placas de 96 poços, a segunda consiste na adição dos compostos testes e a terceira etapa se dá pela adição e leitura da resazurina.

1º Dia: Semeadura das células

Após a cultura de células atingir confluência, foi retirado o meio das garrafas, realizada a lavagem com PBS, retirando assim as células mortas, adicionando 4 mL de tripsina e incubando por 5 minutos, permitindo que as células se soltem da garrafa. Em seguida a tripsina foi inativada com volume igual de meio de cultivo (DMEM) e recolhido em tubo falcon® para centrifugação. Após centrifugação por 5 minutos a 1500 rpm, o sobrenadante foi vertido em descarte, restando apenas o *pellet* de células, quando foram adicionados 6 mL de meio e realizada a ressuspensão do *pellet* por agitação manual e mecânica. Seguiu-se então a contagem das células em Câmara de Neubauer. Após a contagem, foram realizados os cálculos para determinar o volume de célula e de meio a serem utilizados, sabendo que uma placa de 96 poços requer 150×10^4 células e 20 mL de meio. O meio e as células foram adicionados em um reservatório, homogeneizados e transferidos com uma pipeta multicanal para a placa, sendo incubada por 24h.

2º Dia: Adição dos compostos testes

Inicialmente foram realizadas as diluições dos compostos testes. Foi pesada a quantidade necessária para que a solução mãe estivesse na concentração de 50 mM após diluição em dimetilsulfóxido (DMSO). Em uma placa de 96 poços sem presença de células, denominada placa espelho, foram adicionados 245 µL de meio e 5 µL da solução mãe de cada composto no primeiro poço de cada coluna, sendo nas fileiras seguintes adicionados 110 µl do meio e prosseguiu-se a diluição seriada com pipeta multicanal, ficando a placa disposta da seguinte maneira:

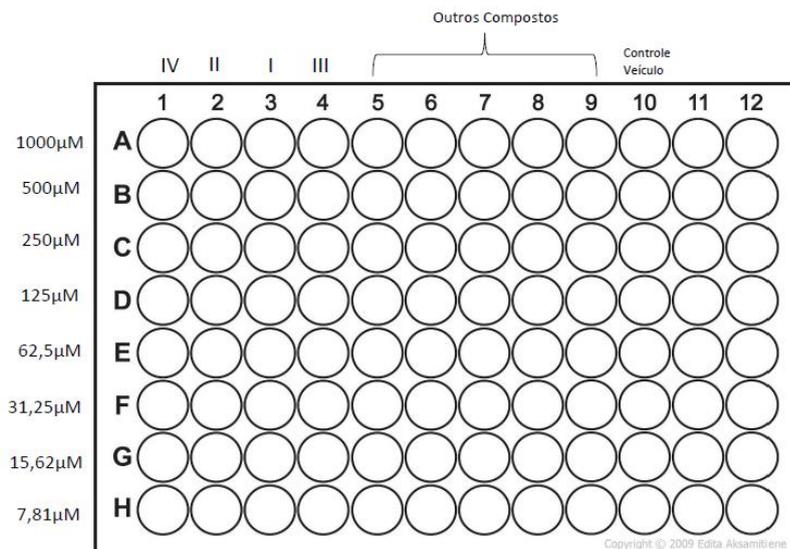


Figura 9. Disposição dos compostos e controles na placa espelho

A placa com células teve o meio retirado e 100 µL de meio novo foram adicionados em todos os poços, exceto na coluna 11, correspondente ao Controle Positivo, em seguida, foram adicionados 100 µL da placa espelho, para cada poço correspondente desta placa, fazendo com que as concentrações caiam pela metade, ficando com a seguinte disposição:

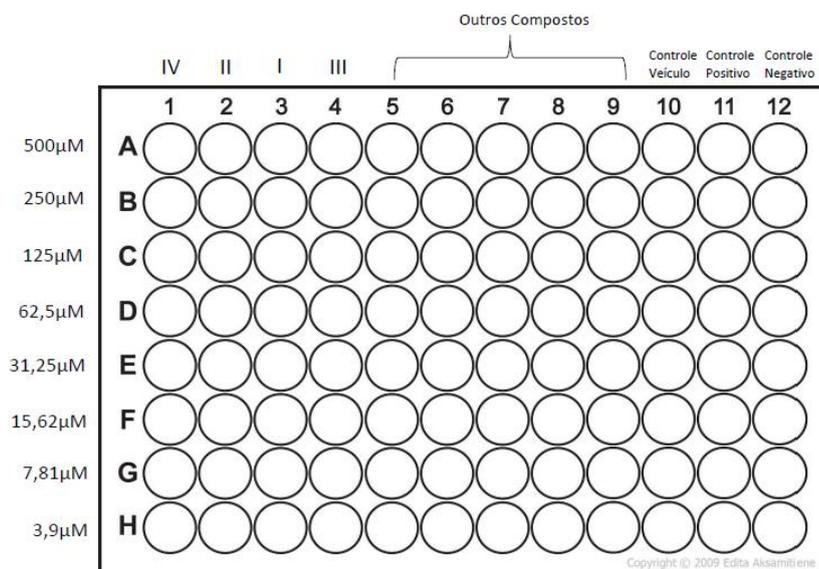


Figura 10. Disposição dos compostos e controles na placa com células

O Controle Positivo foi preparado com meio de cultura e DMSO (1:1, v:v), e adicionados 200 µl em cada poço de sua fileira correspondente. O Controle Veículo continha a mesma quantidade de DMSO presente nos poços com fármacos, uma vez

que foram adicionados 5 μL de DMSO em 245 μL de meio e procedido diluição seriada. O Controle Negativo continha apenas células e meio de cultura. Com a placa completa, as células foram incubadas por mais 24h.

3ª Dia: Adição da resazurina e revelação

No dia seguinte da adição dos fármacos, o meio foi retirado e 50 μL de resazurina foram adicionados, assim a concentração final desta foi de 0,1%, em cada poço. As placas foram incubadas novamente até que ocorresse a mudança de cor da resazurina, indicando que houve metabolização desta pelos compostos. Essa revelação tem duração variável, sendo de aproximadamente 2 horas e meia para a Caco-2.

O Controle Veículo possibilita verificar a influência do DMSO na mortalidade celular. O Controle Positivo deve provocar a morte celular, sendo utilizado DMSO a 50%, já o Controle Negativo possibilita verificar o crescimento celular sem interferentes.

A leitura das placas foi feita em leitor de fluorescência Synergy H1 (BioTek®) com filtros de excitação e emissão nos comprimentos de onda de 530 e 590 nm, respectivamente.

Como o controle veículo possui a mesma concentração de DMSO ao utilizado nos fármacos, ele foi considerado como 100% quanto a viabilidade celular, sendo assim o valor de cada poço foi comparado a ele para determinar a porcentagem de viabilidade celular.

O teste estatístico empregado na comparação foi ANOVA One-Way com pós teste de Tukey, com nível de significância de 0,05.

4.5.3 Ensaios de permeabilidade *in vitro*

A linhagem celular Caco-2, após atingir confluência adequada foi transferida para insertos adaptados às placas de 12 cavidades ThinCerts™ (Greiner Bio-One - área de 0,6 cm^2 , com poro de 0,4 μm) sendo seu crescimento necessário por 21 dias para atingir confluência e diferenciação até a densidade de 5×10^4 células/ cm^2 . Após esses 21 dias de diferenciação, a integridade da monocamada foi avaliada através da mensuração da TEER utilizando um voltímetro epitelial EVOM2® (World Precision Instruments, Sarasota, FL). Apenas as monocamadas que apresentaram TEER acima de 300 Ω/cm^2 foram utilizadas nos ensaios.

Os controles utilizados no experimento foram verapamil e fluoresceína, sendo controle de alta permeabilidade e baixa permeabilidade, respectivamente. Foram preparadas soluções dos compostos teste e controles em tampão Hank's, para concentração final de 100 μM e 40 μM , respectivamente.

Antes do experimento, o meio de cultura foi retirado e adicionado o tampão Hank's (0,5 mL no compartimento apical e 1,5 mL no basal), que permaneceu por 20 minutos para equilíbrio das células. Foram retirados 5 μL do compartimento apical e adicionado volume igual da solução do composto teste, sendo o experimento conduzido a 37°C sob agitação, por 3 horas. As amostras (100 μL) foram coletadas no compartimento basolateral nos tempos 0, 15, 30, 60, 120 e 180 minutos, sendo feita a reposição do volume com tampão Hanks. As amostras dos compostos testes foram analisadas em UHPLC por método previamente desenvolvido, conforme item 3.2. A análise do verapamil foi realizada em UHPLC[®], com detecção por fluorescência (λ_{ex} 204 nm, λ_{em} 314 nm) equipado com coluna CSH C18 1.8 μm 2.1 x 100 mm Waters[®] com coluna de guarda CSH C18 1.8 μm 2.1 x 5mm Waters[®] a 35°C, a fase móvel foi composta de acetonitrila e ácido fórmico 0,1% (70:30, v/v), modo isocrático, com vazão de 0,4ml/min, volume de injeção de 2 μl e tempo de corrida de 4 minutos. A análise da fluoresceína se deu em condições bem similares às do verapamil, mudando apenas o comprimento de onda utilizado (λ_{ex} 494 nm, λ_{em} 521 nm).

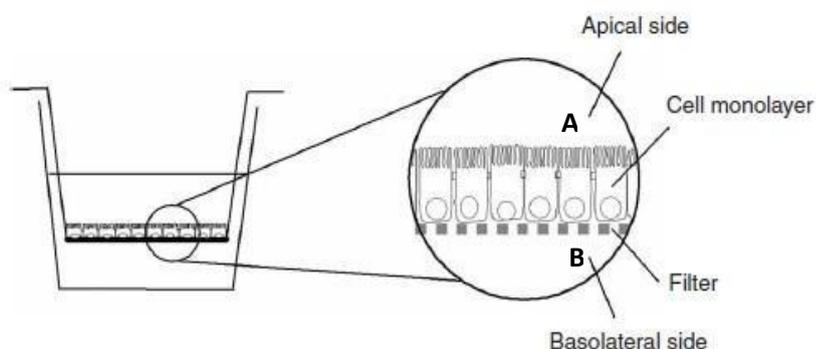


Figura 11. Diagrama de uma monocamada Caco-2 cultivada num suporte de filtro permeável.

Fonte: Hubatsch *et al.*, 2007

A permeabilidade aparente (P_{app} , cm/s) foi estimada de acordo com a equação (ARENA *et al.*, 2003):

$$P_{app} = \left(\frac{V_A}{A \cdot t} \right) \cdot \left(\frac{[f\acute{a}rmaco]_{acceptor}}{[f\acute{a}rmaco]_{inicial\ doador}} \right)$$

sendo

V_A = volume do compartimento acceptor (cm^3)

A = \u00e1rea da superf\u00edcie da monocamada de c\u00e9lulas ou da membrana (cm^2)

t = tempo correspondente \u00e0 concentra\u00e7\u00e3o utilizada (s)

$[f\acute{a}rmaco]_{acceptor}$ = Concentra\u00e7\u00e3o final no compartimento acceptor

$[f\acute{a}rmaco]_{inicial\ doador}$ = Concentra\u00e7\u00e3o inicial no compartimento doador

4.6 Ensaio in vitro de metabolismo dos I, II, III e IV em modelo microsomal

Microsomas humanos (HLM) e de ratos (RLM) foram obtidos comercialmente (GibcoTM), armazenados sob congelamento a -80°C e descongelados no gelo no dia do experimento. Ambos os microsomas foram dilu\u00eddos para 1 mg/mL de prote\u00edna em PBS 0,1 M e mantidos a 37°C . O SRN fornece energia para atua\u00e7\u00e3o das enzimas, e foi preparado em PBS 0,1 M contendo glicose-6-fosfato a 3,3 mM; glicose-6-fosfato desidrogenase a 0,4 U/mL; NADP a 1,3 mM e MgCl_2 a 3,3 mM (ACKLEY et al., 2004), tamb\u00e9m mantido a 37°C .

\u00c9 preconizado a realiza\u00e7\u00e3o de testes preliminares em diferentes concentra\u00e7\u00f5es do substrato para avaliar o efeito das concentra\u00e7\u00f5es e evitar a satura\u00e7\u00e3o e inibi\u00e7\u00e3o da enzimas metabolizadoras devido \u00e0 alta concentra\u00e7\u00e3o do substrato, sendo preferido sempre o uso de baixas concentra\u00e7\u00f5es do composto (DI et al., 2003; LU et al., 2006; WANG et al., 2016). Considerando a similaridade entre as estruturas dos compostos, o composto II foi selecionado e avaliado em tr\u00eas concentra\u00e7\u00f5es diferentes (2, 5 e 10 μM) permitindo assim a verifica\u00e7\u00e3o da ocorr\u00eancia de satura\u00e7\u00e3o e determina\u00e7\u00e3o da melhor concentra\u00e7\u00e3o a ser utilizada para os ensaios de estabilidade metab\u00f3lica.

Para controle do experimento e do funcionamento do SRN, foi empregado o diclofenaco, devido a exist\u00eancia de extensa literatura sobre sua estabilidade metab\u00f3lica (CARLILE et al., 1999; OBACH, 1999; KUMAR et al., 2002; DRAGOVIC et al., 2013; DEN BRAVER et al., 2016).

Cada experimento contou com a determina\u00e7\u00e3o da estabilidade do composto

no tampão em uso (PBS 0,1 M), que consistiu apenas em tampão e fármaco; estabilidade sem adição do SRN, composto de tampão PBS, fármaco e microsossoma e estabilidade com adição do SRN, composto do SRN, fármaco e microsossoma.

As incubações foram realizadas em triplicata em placas de 12 poços, a concentração final dos microsossomas foi de 0,5 mg/mL. Inicialmente foram adicionados tampão ou SRN e fármaco que foram mantidos a 37°C com agitação de 100 rpm por 5 minutos. Em seguida adicionou-se o tampão ou microsossoma, iniciando a reação enzimática e foram coletadas alíquotas (100 µL) nos tempos 0, 5, 15, 30, 45, 60, 90 e 120 minutos. As amostras em tampão foram coletadas diretamente nos vials, já as amostras com microsossoma passaram pelo processo de extração mencionado no item 4.2.

Para análise do diclofenaco foi utilizado um cromatógrafo líquido de alta eficiência Perkin Elmer (Shelton, EUA) acoplado a um espectrômetro de massas (Perkin Elmer, Flexar SQ 300 MS).

A coluna empregada foi Poroshell 120 EC-C18 (4,6x100 mm, 2,7 µm) com pré-coluna Poroshell 120 EC-C18 (4,6x5 mm, 2,7 µm) (Agilent Technologies, Santa Clara, USA) e a fase móvel era constituída de acetonitrila/ácido fórmico 0,1% (60/40, v/v). Foi utilizada a vazão de 0,5 mL/min, em modo isocrático e o volume da injeção foi de 20 µL.

A análise por espectrometria de massas foi realizada no modo electrospray positivo. A voltagem do capilar na ionização por electrospray foi de 6,0 kV, com temperatura de dessolvatação mantida a 350° C, como gás de nebulização foi utilizado nitrogênio na vazão de 12 L/min. A relação massa/carga (m/z) para detecção do diclofenaco foi de 296.

Após a quantificação das amostras é possível a determinação da meia-vida *in vitro* de cada composto pela regressão do gráfico de decaimento das concentrações em função do tempo. Em seguida, é feito o cálculo do Clearance intrínseco a partir da equação:

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

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 pode ser extrapolado para um fígado como um todo, a partir da equação:

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

Onde foi considerado 45 mg de microsomo por 1 g de fígado e 45 g de fígado para 1 kg de peso corporal para ratos (PANG; ROWLAND, 1977; LU et al., 2006; OBACH, 2011; HUANG et al., 2015).

4.7 Ensaio de estabilidade ex vivo dos compostos I, II, III e IV

O ensaio de estabilidade ex vivo visa avaliar a estabilidade dos compostos testes frente as enzimas plasmáticas. As concentrações utilizadas foram baseadas nos valores de MIC₉₀ presentes no estudo de Segretti e colaboradores (2016). Foram empregadas as concentrações de 20 µg/mL para os compostos I, III e IV, e a concentração de 10 µg/mL para o composto II.

As soluções mães (2 mg/mL) foram solubilizadas em DMSO e então diluídas em plasma de rato para obtenção das concentrações analisadas, garantindo no máximo 1% de solvente no sistema. O ensaio foi realizado em triplicata, que foram mantidas em incubadora, com agitação constante de 100 rpm e temperatura de 37 ± 2°C durante todo o experimento. Alíquotas foram coletadas nos intervalos de tempo 0; 5'; 15'; 30'; 45'; 60'; 90', 2h, 4h, 6h e 8h e extraídas a partir da metodologia descrita no item 4.2.4.

As áreas obtidas foram comparadas com a área inicial (tempo 0) e foi realizado teste Friedman (não paramétrico para medidas repetidas) com pós teste de Dunn's com nível de significância de 0,05 para verificar a estabilidade dos compostos.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Determinação da absortividade dos compostos I, II, III e IV por análise espectrofotométrica

A varredura dos compostos forneceu os seguintes gráficos:

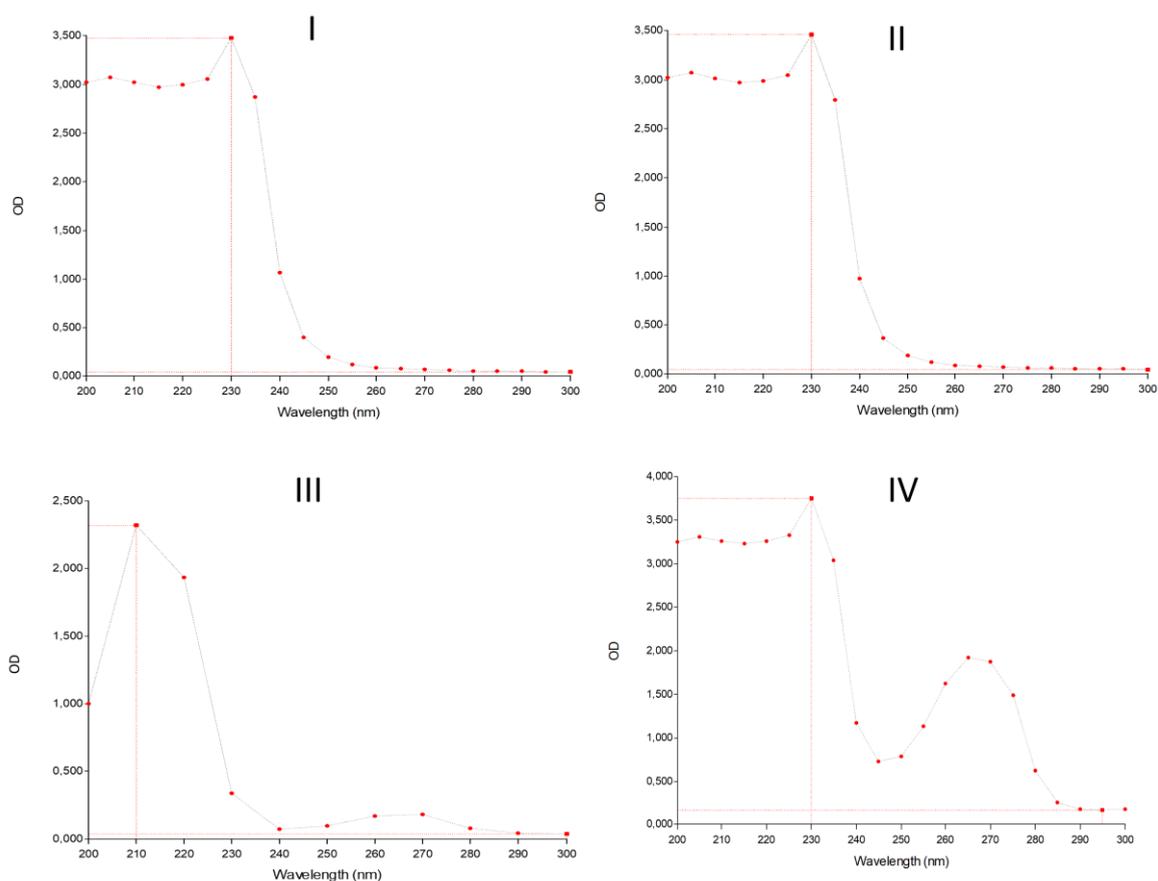


Figura 12. Gráficos indicando o comprimento de onda de maior absorvância dos compostos após diluição em DMSO, após varredura em espectrofotômetro.

Os compostos foram inicialmente dissolvidos em DMSO, diluídos em metanol para concentração de 100 µg/mL e então foi realizada a varredura, originando pico de absorção no comprimento de 230 nm para os compostos I, II e IV, e no comprimento de 210 nm para III. Porém foi verificado que o DMSO puro também tem pico de absorção no comprimento de 230 nm. Assim, os compostos foram dissolvidos em metanol e foi realizada nova varredura, que indicou o pico de absorção em 270 nm (Figura 13).

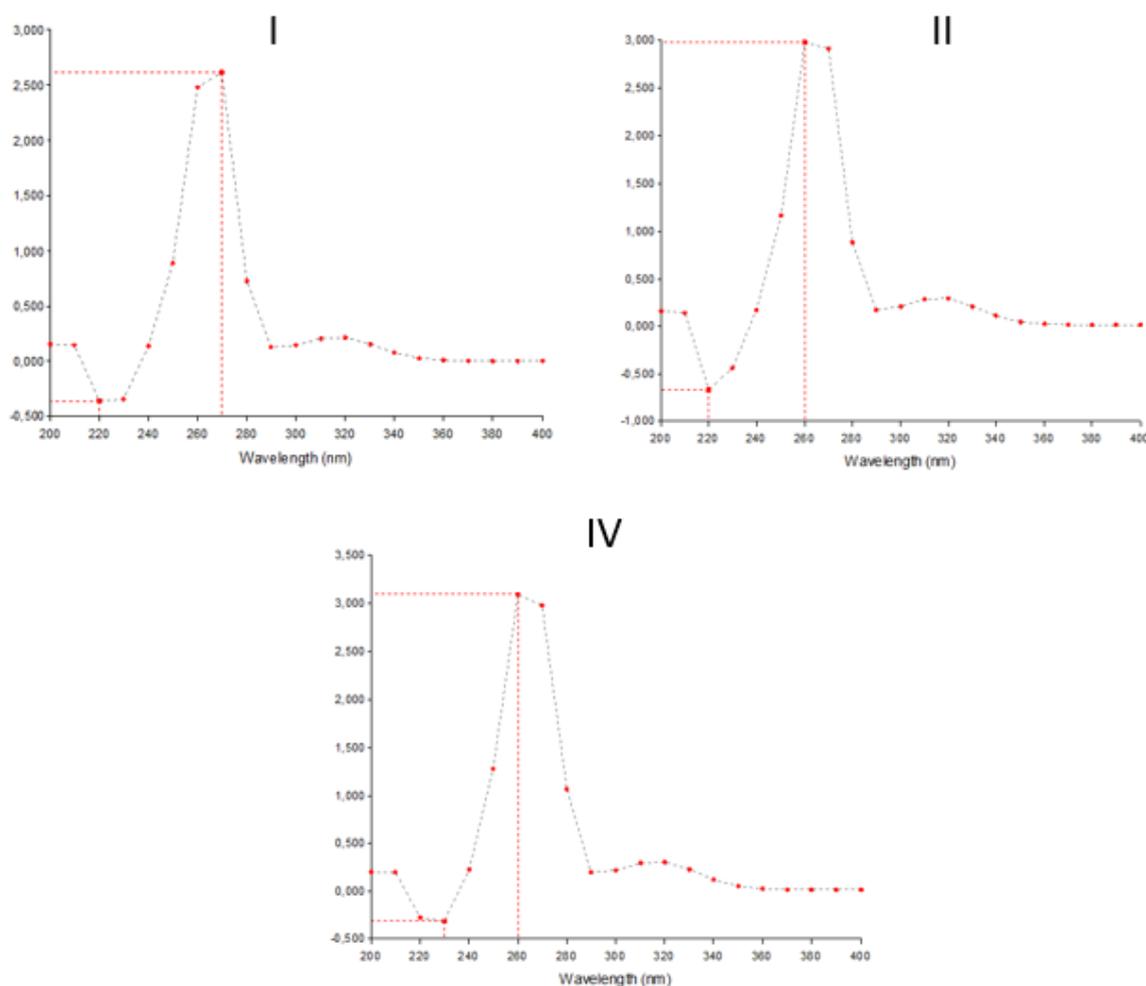


Figura 13. Gráficos indicando o comprimento de onda de maior absorvância dos compostos após diluição em metanol, após varredura em espectrofotômetro.

Os compostos foram analisados no sistema cromatográfico com o comprimento de onda de 230 e 270 nm, diluídos em DMSO e em metanol, porém os picos obtidos com a diluição em metanol e no comprimento de onda de 270 nm não se mostraram adequados para quantificação, assim, foi optado pelas análises em 230nm, uma vez que apesar do DMSO apresentar leitura no mesmo comprimento de onda, o sistema cromatográfico possui capacidade de separação por afinidade, garantindo que os picos encontrados eram dos analitos em questão.

Deve-se ressaltar que os comprimentos de onda encontrados se tratam de comprimentos de onda baixos, pouco seletivos e, portanto, mais sujeitos a interferentes, o que pode tornar a análise mais trabalhosa. Sendo assim, o comprimento de 230 nm também foi utilizado nas análises de III, evitando mais interferentes durante as análises.

5.2 Desenvolvimento e validação dos métodos analítico e bioanalítico para a determinação dos compostos I, II, III e IV em UHPLC

Os cromatogramas mostrados abaixo se referem aos compostos em solução.

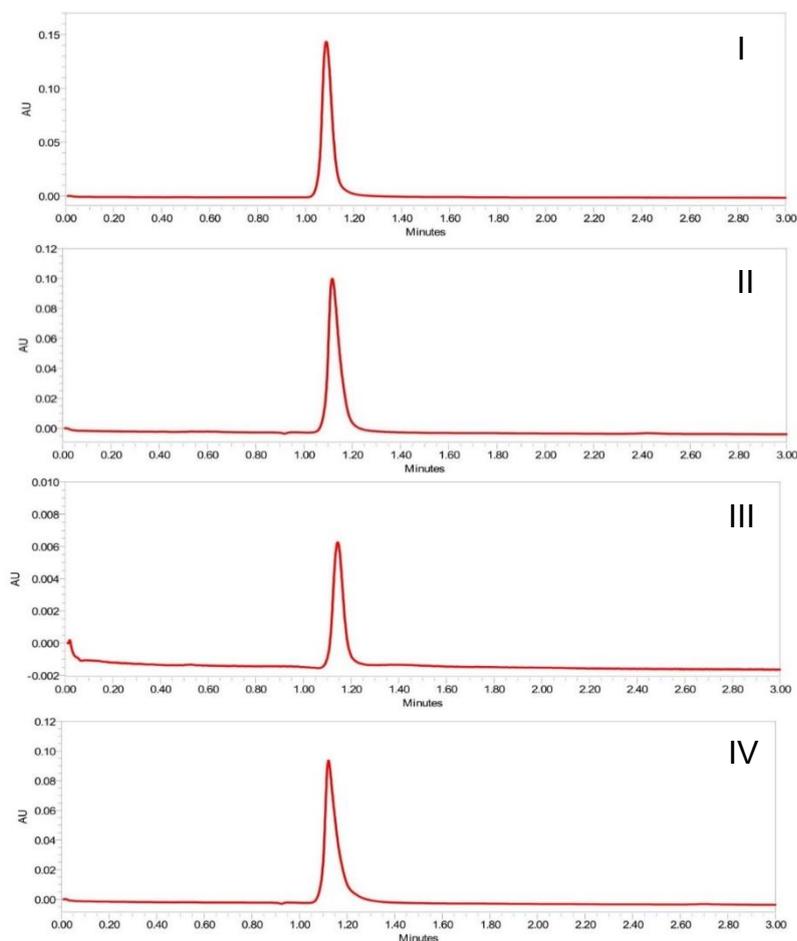


Figura 14. Cromatograma dos compostos em metanol na concentração de 10 µg/mL.

O tempo de retenção foi de 1,10 minutos para II e IV, 1,15 e 1,08 minutos para III e I, respectivamente, o que inviabiliza a utilização do sistema proposto para a análise simultânea dos compostos.

5.2.1 Método analítico

A curva analítica foi construída ao se plotar a área contra a concentração de cada composto. Foi empregada a ponderação $1/y^2$, que ao dar peso igual a todos os pontos, normaliza a tendência da reta. Na tabela 3 se encontram os intervalos, equação da reta, coeficiente de correlação (r), exatidão e precisão para a curva de cada composto.

Tabela 2. Curvas analíticas com regressão linear, exatidão e precisão.

Composto	Intervalo (ug/mL)	Equação	r	Exatidão (%) n=5	Precisão (%) n=5
I	0,078-10	$y=31137x-691,5$	0,9972	100,06	12,64
II	0,078-10	$y=52285x-1202$	0,9942	99,92	7,82
III	0,156-10	$y=7173x-183,4$	0,9972	100,01	6,01
IV	0,078-10	$y=35590x-514,4$	0,9986	100,00	6,11

Tabela 3. Precisão e exatidão do LIQ de cada composto.

Composto	LIQ (µg/mL)	Concentração experimental (µg/mL)	Precisão (%) n=5	Exatidão (%) n=5
I	0,078	0,084	17,49	107,53
II	0,078	0,074	6,18	94,80
III	0,156	0,159	12,86	101,82
IV	0,078	0,079	10,51	101,36

Os valores de r foram superiores a 0,99, indicando a linearidade das curvas. Considerando que os métodos foram desenvolvidos com o objetivo de quantificar os compostos nos variados testes dentro do *screening* realizado, ainda de maneira preliminar e que o equipamento utilizado apresenta uma certa variabilidade, os resultados obtidos são adequados a finalidade analítica do método.

5.2.2 Método bioanalítico

5.2.2.1 *Microsoma de rato*

A figura 15 demonstra os cromatogramas obtidos após a extração do microsoma de rato e na Tabela 4 encontram-se as equações da reta, valores de exatidão e precisão para cada composto.

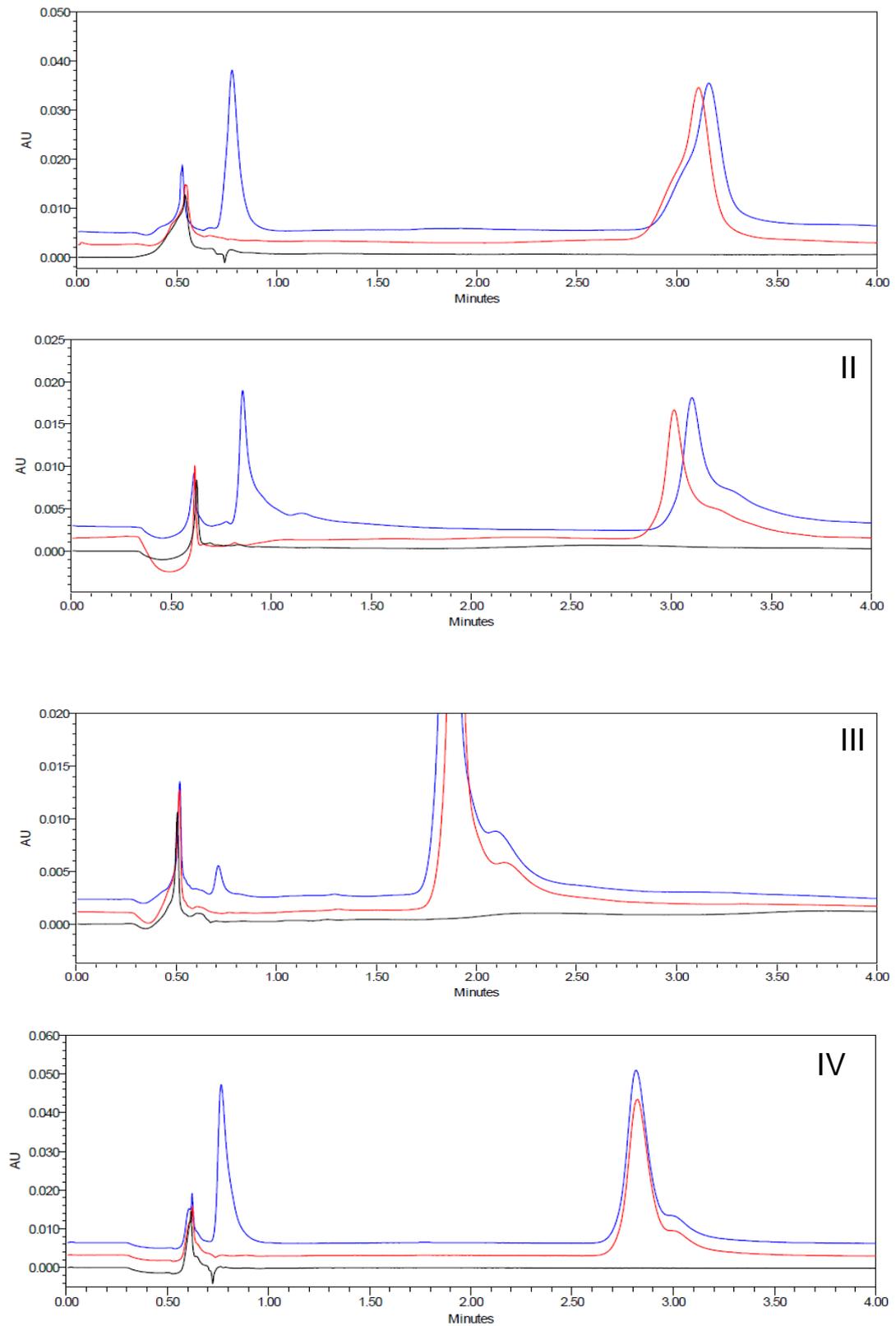


Figura 15. Cromatogramas dos compostos a 2,5 µg/mL em microsoma de rato.

Legenda: Linha preta: Branco; Linha vermelha: Zero e Linha Azul: Composto a 2,5 µg/mL.

Tabela 4. Curvas bioanalíticas em microsossoma de rato com regressão linear, exatidão e precisão.

Composto	Intervalo (ug/mL)	Equação	r	Exatidão (%) n=3	Precisão (%) n=3
<i>I</i>	0,156-5	$y=0,1643x-0,014$	0,9998	102,93	8,62
<i>II</i>	0,156-5	$y=0,2236x-0,01715$	0,9994	100,01	6,48
<i>III</i>	0,312-10	$y=0,006296x-0,0009315$	0,9922	100,31	8,32
<i>IV</i>	0,156-5	$y=0,1728x-0,0053$	0,9997	99,87	7,37

5.2.2.2 *Microsossoma Humano*

A figura 16 demonstra os cromatogramas obtidos após a extração do microsossoma humano e na Tabela 5 encontram-se as equações da reta, valores de exatidão e precisão para cada composto. Foi utilizada a ponderação $1/y^2$ para todos os compostos.

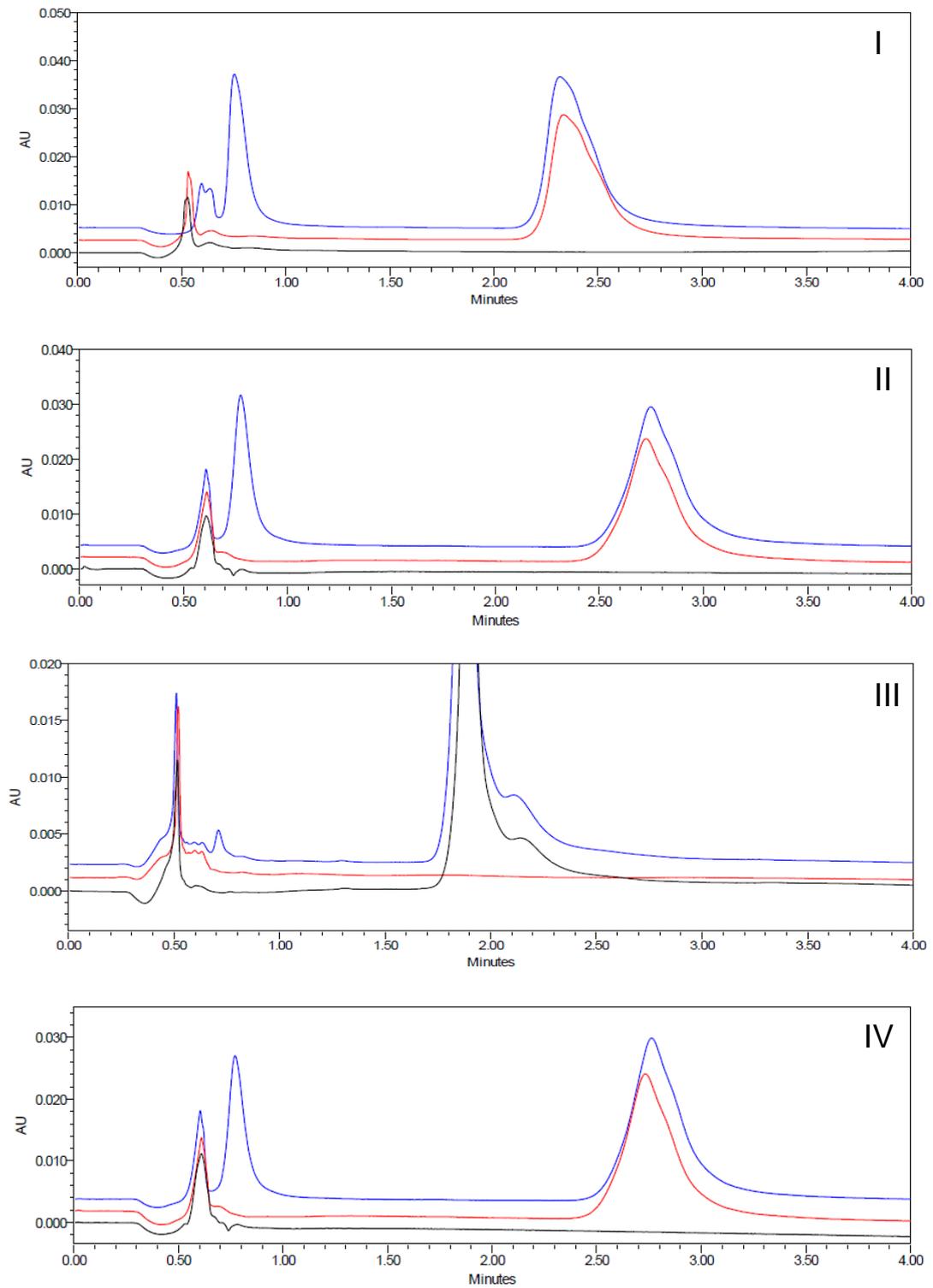


Figura 16. Cromatogramas dos compostos a 2,5 µg/mL em microsossoma humano.

Legenda: Linha preta: Branco; Linha vermelha: Zero e Linha Azul: Composto a 2,5 µg/mL.

Tabela 5. Curvas bioanalíticas em microssoma de humano com regressão linear, exatidão e precisão.

Composto	Intervalo (ug/mL)	Equação	r	Exatidão (%) n=3	Precisão (%) n=3
<i>I</i>	0,156-5	$y=0,1455x-0,01319$	0,9996	100,08	9,54
<i>II</i>	0,156-5	$y=0,1396x-0,01529$	0,9990	99,96	10,63
<i>III</i>	0,312-10	$y=0,004401x-0,0009812$	0,9928	100,89	10,14
<i>IV</i>	0,156-5	$y=0,1143x-0,01263$	0,9996	99,98	8,72

5.2.2.3 Plasma de rato

Na figura 17 estão representados os cromatogramas obtidos após a extração de plasma de rato e na Tabela 6 encontram-se as equações da reta, valores de exatidão e precisão para cada composto. Foi utilizada a ponderação $1/y^2$ para todos os compostos.

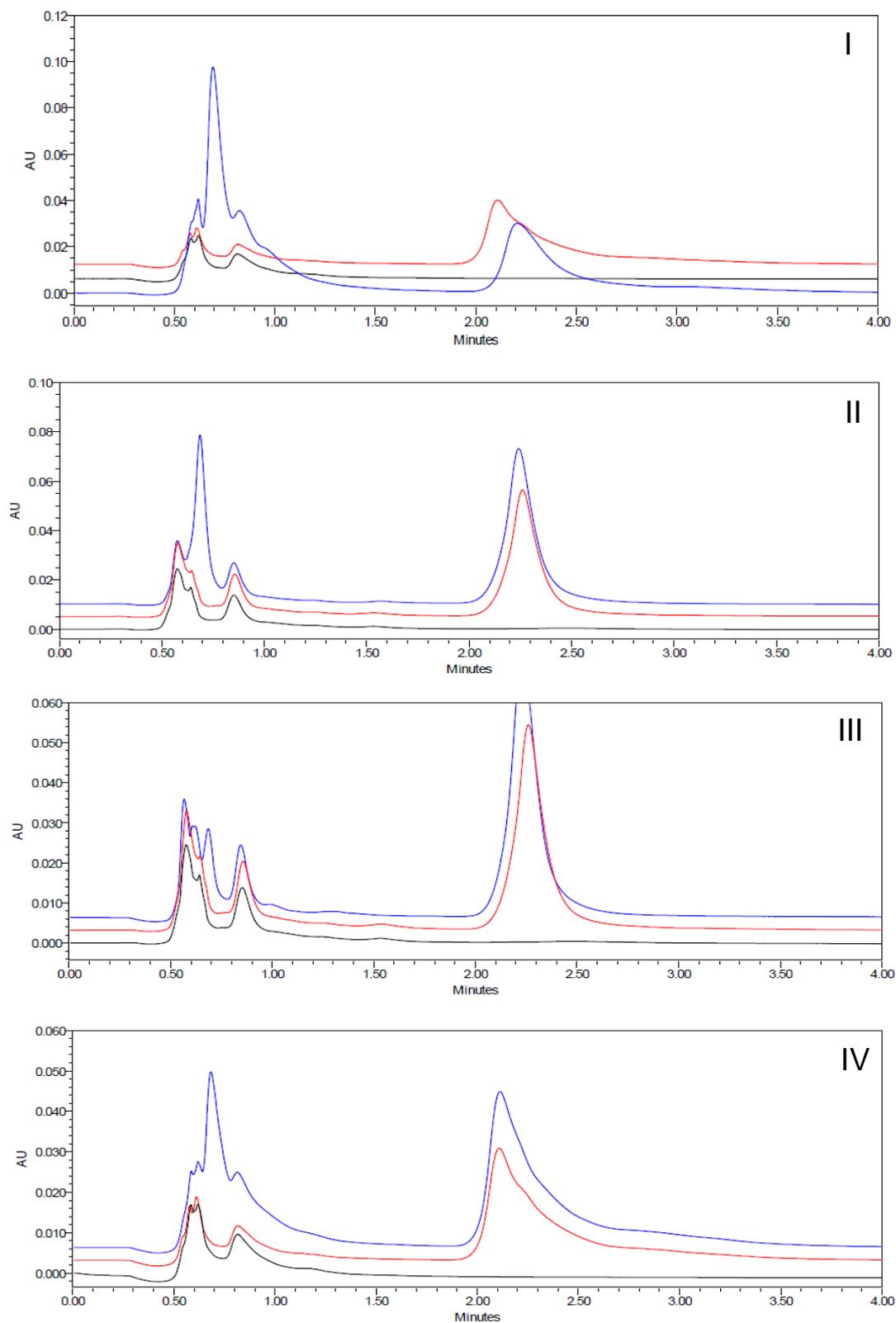


Figura 17. Cromatogramas dos compostos a 10 µg/mL em plasma de rato.

Legenda: Linha preta: Branco; Linha vermelha: Zero e Linha Azul: Composto a 10 µg/mL.

Tabela 6. Curvas bioanalíticas em plasma de rato com regressão linear, exatidão e precisão.

Composto	Intervalo (ug/mL)	Equação	r	Exatidão (%) n=3	Precisão (%) n=3
I	1,25-30	$y=0,01990x-0,009506$	0,9992	100,05	4,99
II	1,25-20	$y=0,02360x-0,02487$	0,9966	100,63	9,80
III	5-30	$y=0,001496x-0,003679$	0,9923	100,09	4,10
IV	1,25-30	$y=0,01758x-0,01924$	0,9961	100,95	8,47

As curvas bioanalíticas foram construídas ao se plotar a razão entre área do composto e área do PI contra a concentração. Como pode ser visto nas tabelas anteriores, a linearidade se mostrou adequada, com coeficiente de correlação acima de 0,98 em todas as curvas e os valores de precisão e exatidão apresentaram variação menor que 15% e entre 85-115%, indicando assim a aplicabilidade do método.

5.3 Determinação do Log P dos compostos I, II, III e IV.

5.3.1 Determinação *in silico*

O grupo da UNIFESP, que desenvolveu as moléculas, utilizou o programa Marvin Sketch 16.7.18 e obteve os valores de LogP de -0,27; 0,08; 1,05 e -0,72 para I, II, III e IV, respectivamente. O LogP determinado a partir do programa ChemDraw 12.0 resultou nos valores -0,4; -0,06; 0,85 e -1,04 para os compostos I, II, III e IV, respectivamente.

5.3.2 Método Cromatográfico

A curva de linearidade log P *versus* log k obtida no método cromatográfico forneceu a equação $y = 0,2912x - 0,3581$, com coeficiente de correlação de 0,9774 (figura 18). Os valores obtidos foram 0,70; 0,46; 1,59 e 0,37 para I, II, III e IV, respectivamente.

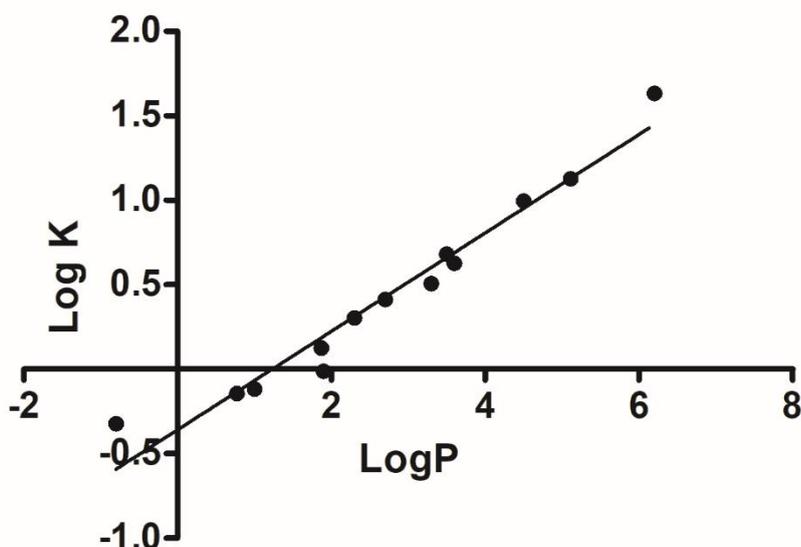


Figura 18. Gráfico de Log k versus Log P dos padrões.

Tabela 7. Valores de Log P obtidos para cada composto.

	<i>In silico</i>		Método
	Marvin Sketch	ChemDraw	Cromatográfico
I	-0,27	-0,4	0,70
II	0,08	-0,06	0,46
III	1,05	0,85	1,59
IV	-0,72	-1,04	0,37

Com os resultados obtidos, pode-se observar divergências tanto entre os métodos, como intra método. O estudo de Vranka e colaboradores (2017) analisou justamente a disparidade de resultados entre diferentes métodos e pôde verificar que há uma baixa correlação entre os valores de LogP dos diferentes métodos, afirmando não ser possível compará-los.

Uma questão interessante de se comparar, é a relação entre as estruturas dos compostos e seus valores de logP, o composto IV apresenta duas unidades de POA, o que a caracterizaria como a mais hidrofílica dentre os compostos, dada a alta hidrofiliabilidade desta unidade, e a partir dos resultados, foi verificado o menor valor de logP (0,37), assim como para o composto III, que por possuir uma cadeia maior, e portanto maior número de carbonos dentre os compostos, era esperado uma maior lipofiliabilidade, sendo exatamente este o resultado encontrado no ensaio (1,59).

É importante ressaltar que apesar das diferenças entre os métodos, todos indicaram a hidrofiliabilidade das moléculas, o que significa uma solubilidade em água suficiente para maior susceptibilidade ao clearance renal, uma vez que os sítios ativos

lipofílicos que permitem a ação das enzimas do CYP450 estão ausentes (TSAIOUN; KATES, 2011; ANDRÉS et al., 2015). Como podemos ver na tabela 8, a maioria dos substratos das isoenzimas mais comuns na metabolização de fármacos possuem logP mais elevado.

Tabela 8. Valores de LogP dos substratos das principais enzimas metabolizadoras. Adaptado Dowty 2010

CYP	Intervalo LogP dos Substratos	Média LogP dos Substratos
1A2	0,08-3,61	2,01
2A6	0,07-2,79	1,44
2B6	0,23-4,89	2,54
2C8	0,06-6,98	3,38
2C9	0,89-5,18	3,20
2C19	1,49-4,42	2,56
2D6	0,75-5,04	3,08
2E1	-1,35-6,36	2,07
3A4	0,97-7,54	3,10

Porém os valores extremos requerem atenção, uma vez que compostos altamente hidrofílicos tendem a apresentar absorção dificultada, além da baixa ligação a proteínas plasmáticas e baixo metabolismo.

5.4 Ensaio de estabilidade química dos compostos I, II, III e IV nos pHs 1,2, 8,8 e tampão Hanks

A quantificação dos compostos pelo método desenvolvido permitiu a construção dos gráficos de estabilidade a seguir:

5.4.1 Estabilidade no pH 1,2

Os resultados do estudo de estabilidade química dos compostos em pH 1,2 estão representados na figura 19. O pH de 1,2 é equivalente ao pH estomacal, sendo essencial a determinação da estabilidade dos compostos nessas condições, uma vez que a via de administração oral é a via de pretensão e caso haja instabilidade, seriam

necessárias modificações estruturais nas moléculas ou na formulação para impedir a degradação do composto logo no estômago. Os compostos não apresentaram diferença estatística em qualquer dos tempos analisados, tanto para CQB, quanto para CQA, indicando a estabilidade de todos os compostos no pH ácido. Assim, como não houve a degradação das moléculas nas condições analisadas, não são necessárias modificações estruturais e não há a necessidade da utilização de recursos farmacotécnicos para proteção do composto em uma formulação de uso oral.

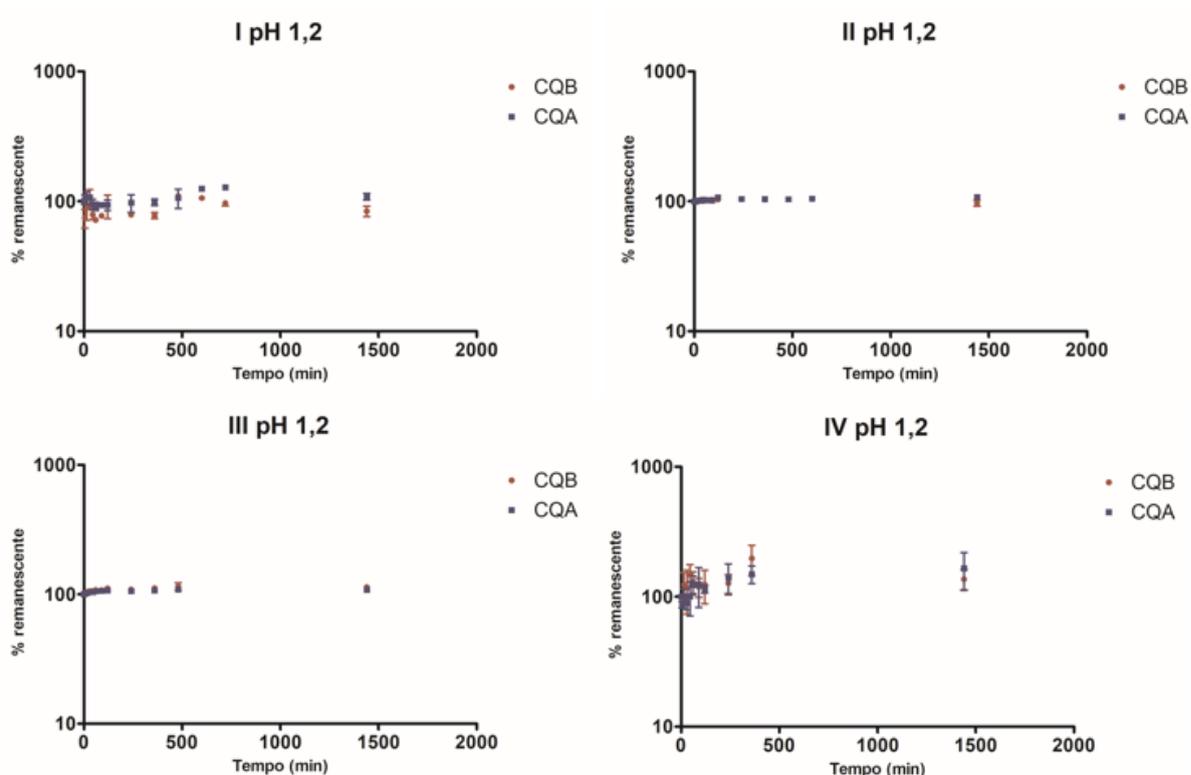


Figura 19. Estabilidade dos compostos em tampão Clark-Lubs (pH 1,2).

5.4.2 Estabilidade no pH 7,4

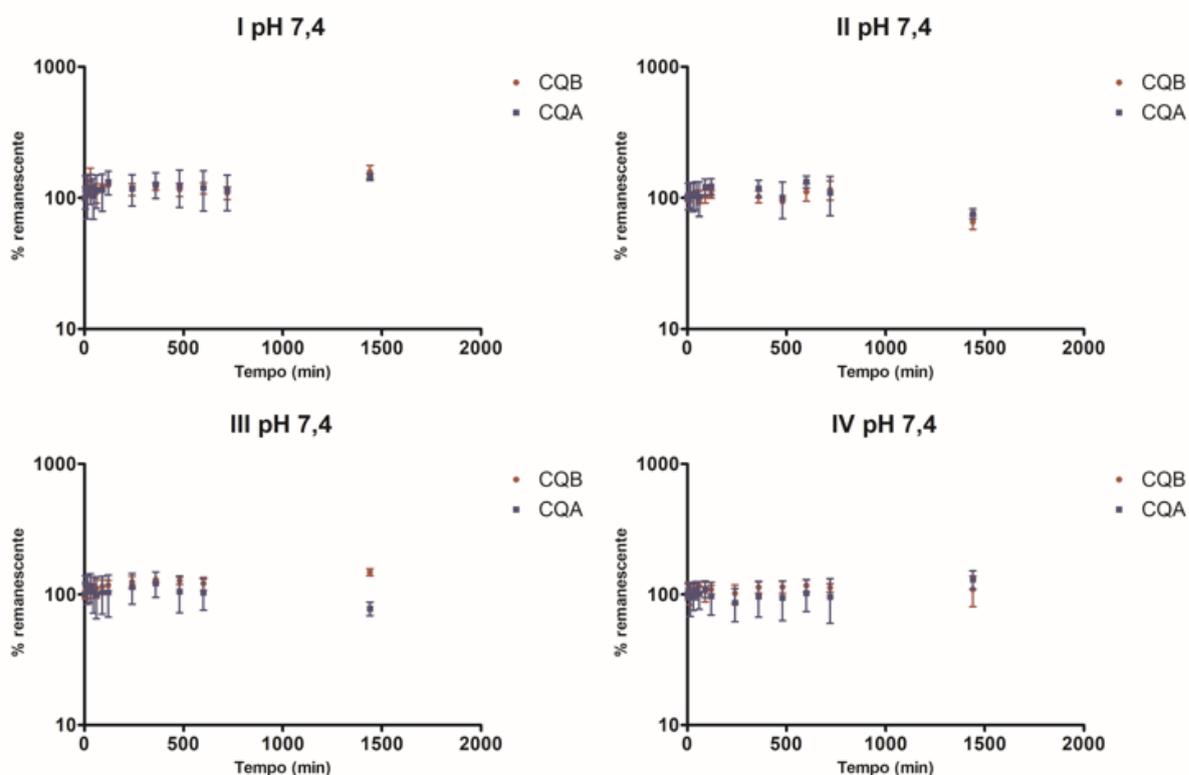


Figura 20. Estabilidade dos compostos em tampão Hank's (pH 7,4).

O tampão Hank's foi utilizado no ensaio de permeabilidade e por possuir pH de 7,4 mimetiza o pH sanguíneo, prevendo a estabilidade dos compostos no sangue. Os resultados do estudo de estabilidade em pH 7,4 são vistos na figura 20. Os compostos não apresentaram diferença estatística significativa para nenhum dos tempos analisados, tanto para CQB, quanto para CQA, indicando a estabilidade deste no pH em questão, demonstrando a estabilidade destes.

Os resultados indicam, portanto, que não haverá problemas durante a realização do ensaio de permeabilidade, uma vez que não houve decaimento significativo nas condições de estudo empregadas.

5.4.3 Estabilidade no pH 8,8

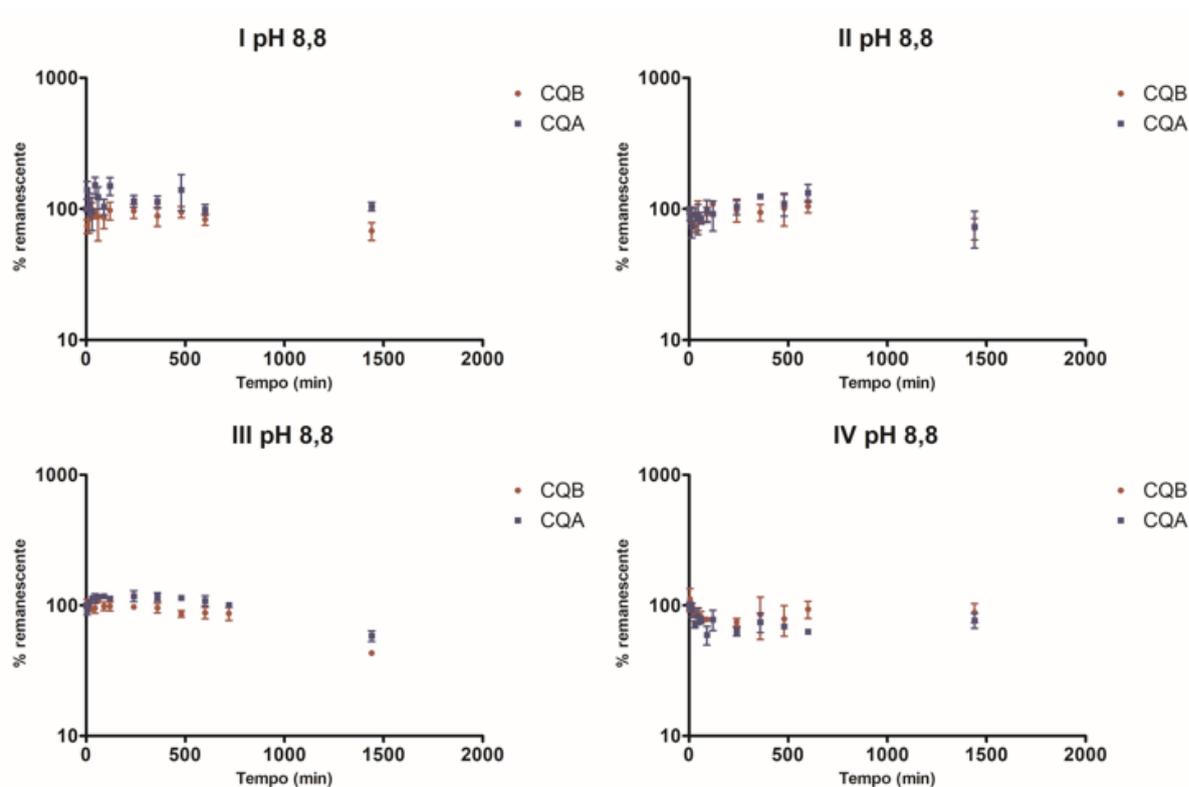


Figura 21. Estabilidade dos compostos em tampão Tris (pH 8,8).

Os resultados do estudo de estabilidade no pH 8,8 se encontram na figura 21. O pH de 8,8 mimetiza o pH do intestino delgado, principal local de absorção dos fármacos, sendo assim de alta importância a determinação da estabilidade nesse pH, uma vez que a degradação dos compostos nessas condições influencia significativamente na quantidade de fármaco que será absorvido, podendo levar a concentrações subterapêuticas. Os compostos não apresentaram diferença estatística significativa em nenhum dos tempos analisados, para CQB e para CQA, indicando a estabilidade de todas as moléculas frente ao pH básico.

Apesar de nos gráficos visualizarmos decaimentos em alguns pontos, a análise estatística não indicou diferença significativa e as variações encontradas são analíticas e operacionais, possibilitando assim a afirmação de que todos os compostos se demonstraram estáveis, tanto nas concentrações altas quanto nas baixas, em todas as condições avaliadas.

Os estudos de estabilidade química realizados demonstraram que nos pHs avaliados os compostos apresentaram estabilidade, o que permitirá o planejamento de estudos *in vivo* com a administração destes compostos pela via oral sem o risco de

degradação ao longo do trato digestório decorrente do pH do meio. A estabilidade química observada nos diferentes pHs também traz expectativas de que é possível utilizar mudanças de pH nos meios biológicos para realizar procedimentos de extração sem que ocorram perdas significativas dos compostos.

5.5 Avaliação da permeabilidade dos compostos I, II, III e IV através da utilização de células Caco-2

5.5.1 Cultura de Células Caco-2

Os procedimentos realizados em todas as etapas com as células adquiridas no mercado culminaram com a obtenção de uma cultura de Caco-2 viáveis e adequadas aos estudos de permeabilidade, uma vez que foi possível verificar a diferenciação destas em enterócitos, como pode ser observado na figura 22, inicialmente as células se apresentavam mais afastadas e ao passar dos dias, formaram a monocamada, apresentando a morfologia adequada.

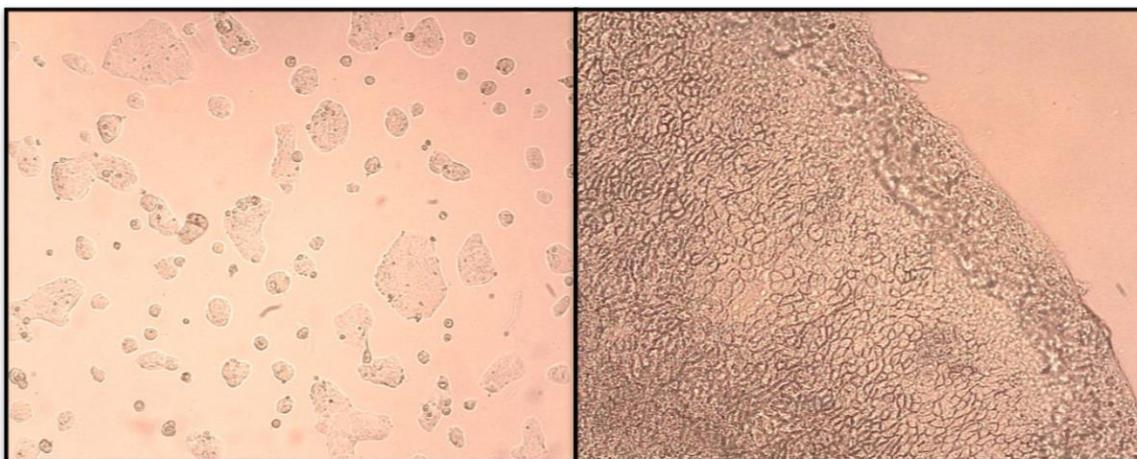


Figura 22. Células Caco-2 em cultura. Na figura da esquerda, as células no início do cultivo, ainda isoladas e na figura da direita, após 21 dias de cultivo, formando uma monocamada. Autoria Própria.

5.5.2 Ensaio de Viabilidade Celular pelo teste da Resazurina

Na figura 23 e tabela 9 podem ser observados os resultados do ensaio de viabilidade celular realizado pelo teste da resazurina.



Figura 23. Resultado do ensaio de viabilidade celular por resazurina. Autoria Própria.

Os controles funcionaram como o esperado, tendo o controle negativo (apenas células) e o controle veículo apresentado coloração rosa, indicando a metabolização do composto e o controle positivo (concentração tóxica de DMSO) apresentado coloração azul, demonstrando a ausência de metabolização, indicando morte celular.

Tabela 9. Viabilidade celular em cada concentração usada para cada composto no teste de resazurina expresso em porcentagem.

Composto	Concentração (μM)							
	3,9	7,81	16,62	31,25	62,5	125	250	500
	Viabilidade Celular %							
I	82,79	78,53	72,98	76,21	76,08	78,05	76,42	79,69
II	81,54	76,84	74,81	80,56	77,37	76,06	78,35	77,72
III	79,69	75,54	72,26	77,09	75,23	75,57	77,79	81,19
IV	80,30	78,35	77,14	77,81	76,66	78,28	74,88	70,25

A análise dos resultados indicou diferença estatística significativa entre todas as concentrações avaliadas dos quatro compostos quando comparadas com o Controle de Veículo, entretanto, as concentrações não apresentaram diferença estatística entre si. Considerando que o trabalho de Fernandes e colaboradores (2012) determinou uma viabilidade de 70% como *cut-off* para seleção da concentração utilizada e que os resultados obtidos para os compostos em estudo não demonstraram viabilidade menor que 70% (Tabela 9), todas as concentrações podem ser utilizadas no ensaio da permeabilidade, sem expectativa de efeito tóxico sobre as células.

Ainda assim, o ensaio de viabilidade celular foi realizado novamente, agora com tempo menor de incubação e intervalo menor de concentrações. Os fármacos foram incubados por 4 horas, que é um tempo próximo da duração do ensaio de permeabilidade e nas concentrações de 100, 50, 10 e 1 μM . O resultado deste novo ensaio está demonstrado na tabela 10.

Tabela 10. Viabilidade celular nas novas concentrações usada para cada composto no teste de resazurina expresso em porcentagem.

Concentração (μM)	Viabilidade Celular %			
	I	II	III	IV
1	100,00	89,27	100,00	84,58
10	100,00	96,98	100,00	91,04
50	100,00	100,00	100,00	99,06
100	96,62	100,00	100,00	100,00

O novo experimento indicou que não houve diferença estatística para nenhum dos compostos entre as concentrações utilizadas quando comparados ao Controle do Veículo, nem entre as concentrações, além de ter apresentado resultados de 100%, garantindo assim que não haverá toxicidade para as células durante a realização do ensaio de permeabilidade.

Assim, a concentração de 100 μM foi selecionada para realização dos ensaios de permeabilidade, considerando ausência de toxicidade celular e segurança de quantificação pelo método analítico disponível.

5.5.3 Ensaios de permeabilidade *in vitro*

Os resultados obtidos nos ensaios de permeabilidade *in vitro* se encontram na figura 24.

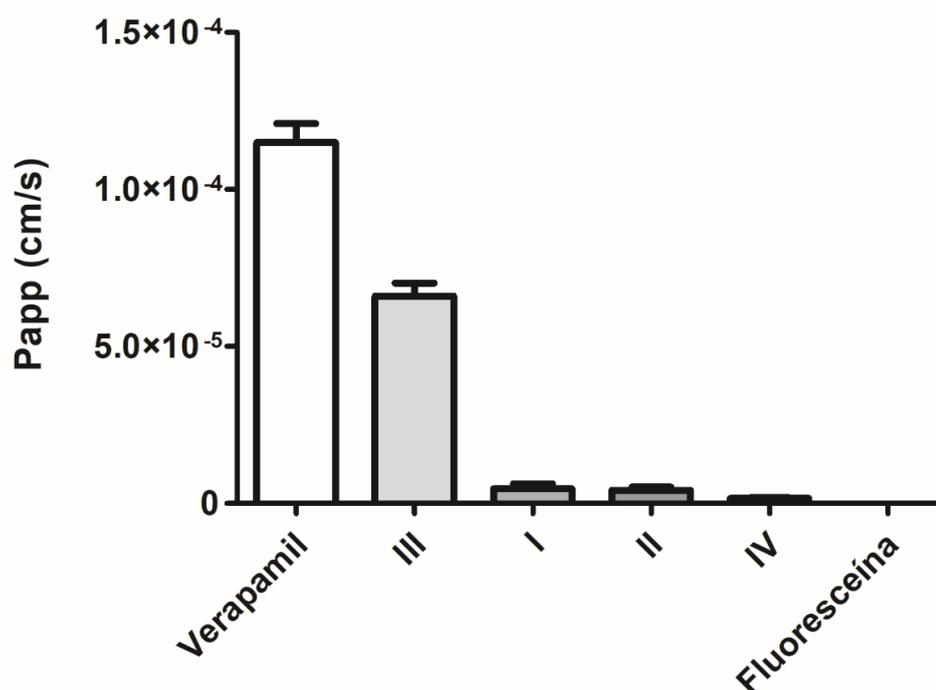


Figura 24. Permeabilidade aparente dos compostos testes e controles.

O verapamil (controle positivo) apresentou concentrações gradativamente crescentes no compartimento basolateral em que foram realizadas as coletas de alíquotas do tampão para análise dos compostos, resultando em uma Papp de 115×10^{-6} cm/s, enquanto a fluoresceína não apresentou concentrações quantificáveis em nenhum dos tempos analisados, assim, os controles comprovaram a integridade da monocamada formada, uma vez que o comprometimento desta resultaria no aparecimento da fluoresceína no compartimento basolateral.

Foram encontradas áreas quantificáveis dos quatro compostos testes, que se mostraram gradativamente crescentes no compartimento basolateral e permitiram o cálculo da Papp, sendo os valores $4,66 \times 10^{-6}$; $4,14 \times 10^{-6}$; 66×10^{-6} e $1,61 \times 10^{-6}$ cm/s para I, II, III e IV, respectivamente.

O estudo de Yee (1997) verificou se os resultados obtidos a partir do experimento com Caco-2 poderiam prever a absorção no homem, seus resultados demonstraram que essa previsão é possível e ainda propôs três classificações de expectativa de absorção de acordo com os valores de Papp obtidos nos ensaios *in vitro*, sendo estas: pouco absorvidos (0-20%), se apresentam Papp $< 1 \times 10^{-6}$, moderadamente absorvidos (20-70%), se Papp 1 a 10×10^{-6} e bem absorvidos (70-100%) se Papp $> 10 \times 10^{-6}$.

Os resultados obtidos indicam que os compostos I, II e IV tem expectativa de absorção oral intermediária, enquanto o composto III tem expectativa de absorção oral total.

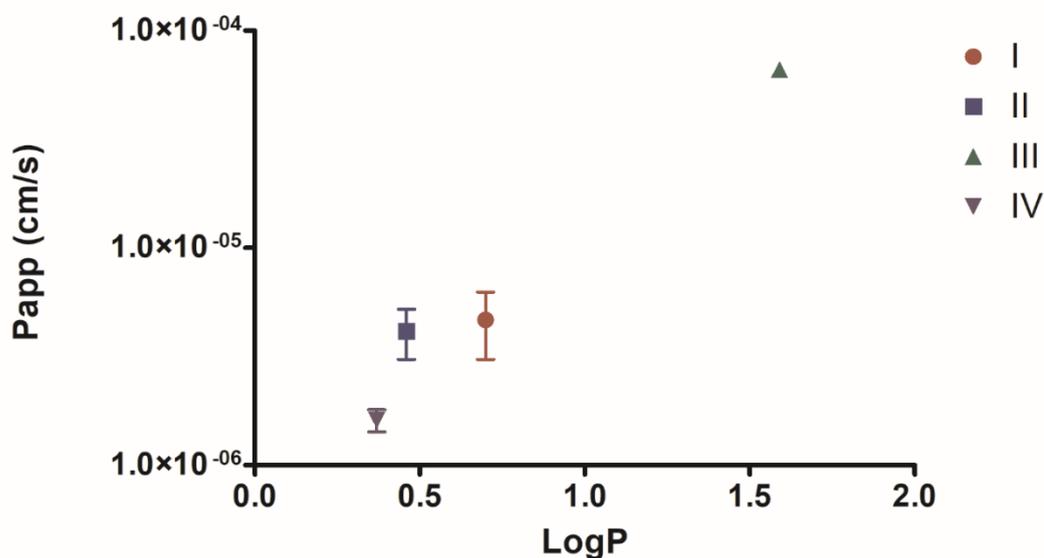


Figura 25. Gráfico demonstrando a relação entre LogP e Papp dos compostos testes.

Como pode ser observado na Figura 25, no gráfico que interpola o valor de LogP obtido pelo método cromatográfico com os valores de Permeabilidade Aparente, é possível verificar que os compostos com LogP mais hidrofílico, apresentaram os menores valores de Papp, e o composto mais lipofílico (III) dentre os avaliados, foi o que apresentou maior Papp, comprovando que compostos lipofílicos tem a absorção intestinal facilitada, enquanto compostos hidrofílicos tem mais dificuldade em transpor a membrana celular intestinal. Também, a partir do gráfico foi possível a determinação do coeficiente de correlação (r), de valor de 0,9256, indicando assim a alta correlação entre os valores de logP e Papp, e, portanto, a previsão da absorção.

O comportamento de absorção de um composto é determinado por fatores fisiológicos e físico-químicos. Nos fatores fisiológicos temos o tempo de trânsito, pH luminal, condições de jejum e alimentado, assim como expressão de transportadores e enzimas e capacidades das diferentes regiões do trato gastrointestinal que podem afetar a taxa e extensão da absorção. Compostos substratos de transportadores apresentam maior variabilidade devido a concentração e disposição dos transportadores, assim como a possibilidade de saturação destes (FREDLUND et al., 2017).

Considerando que em relação a moléculas absorvidas através da difusão passiva, as células Caco-2 possuem uma correlação maior do que para moléculas transportadas ativamente, uma vez que os níveis de transportadores variam de acordo com a cultura celular, e que as moléculas apresentam caráter mais hidrofílico, pode-se prever que há boa expectativa de absorção oral dos novos candidatos a fármaco e que essa absorção ocorre por transporte paracelular.

5.6 Ensaio *in vitro* de metabolismo dos compostos I, II, III e IV em modelo microssomal

O composto II foi testado inicialmente em três concentrações diferentes (2, 5 e 10 μM), nas três condições de estudo (tampão PBS, sem SRN e com SRN) para determinação da concentração ideal a ser utilizada, uma vez que é necessária a verificação da ocorrência de saturação enzimática. Os resultados obtidos estão demonstrados na figura 26, 27 e 28.

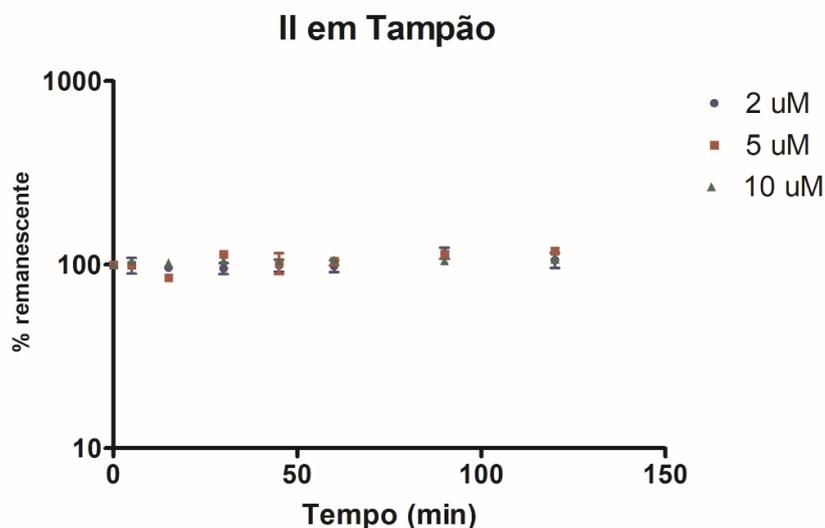


Figura 26. Estabilidade metabólica do composto II em três concentrações em Tampão PBS

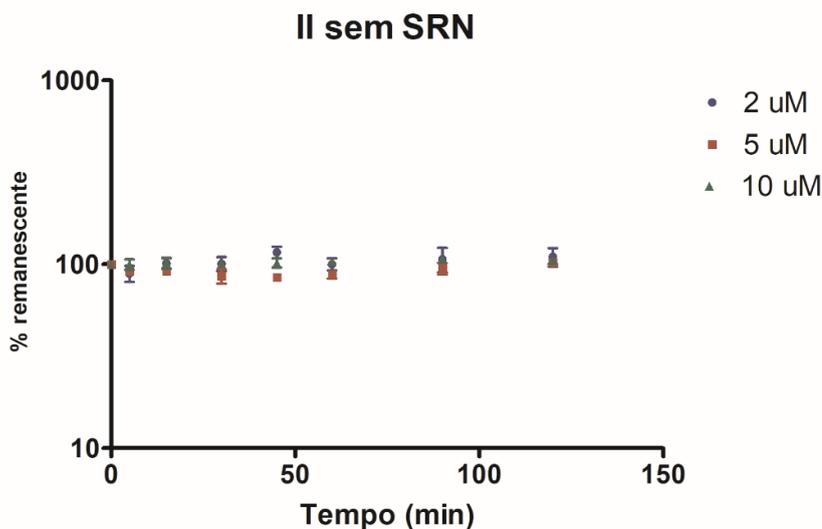


Figura 27. Estabilidade metabólica do composto II em três concentrações sem SRN

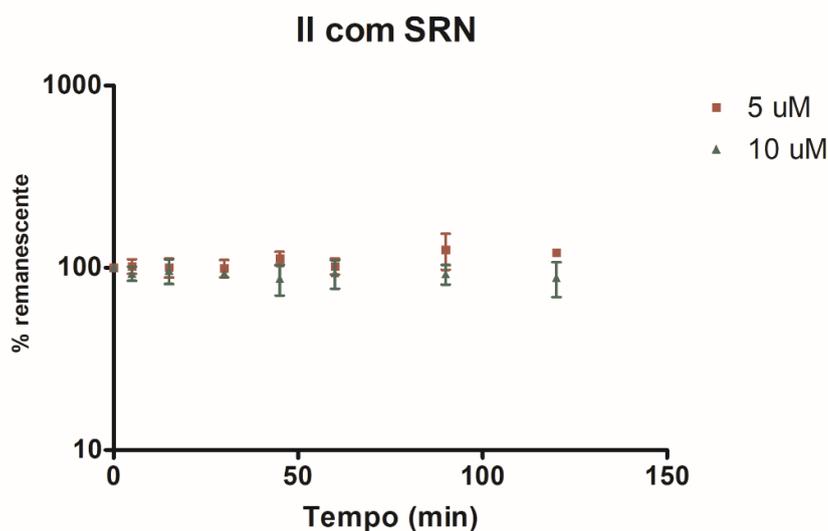


Figura 28. Estabilidade metabólica do composto II em duas concentrações com SRN

A partir das figuras acima podemos verificar que as três concentrações demonstraram estabilidade frente ao tampão, assim como frente ao sistema sem SRN, indicando assim, que se houvesse degradação quando na presença das enzimas, essa se deveria exclusivamente a metabolização pelas enzimas, e não à instabilidade frente ao sistema. Quando submetido ao sistema com SRN, não foi possível a quantificação da concentração mais baixa, de 2 µM, devido à falta de sensibilidade do método. Considerando o comportamento semelhante das concentrações frente aos três sistemas, a concentração de 5 µM foi selecionada para a continuidade dos ensaios.

5.6.1 Microssoma de rato

Nas figuras 29 a 31 é possível verificar os resultados do ensaio de estabilidade metabólica dos compostos I, II, III e IV em microssoma de rato.

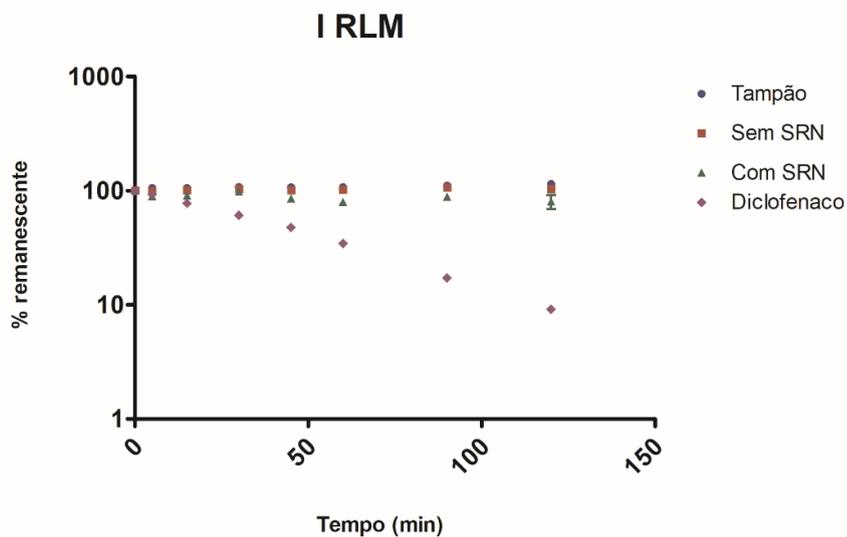


Figura 29. Estabilidade metabólica do composto I em microssoma de rato.

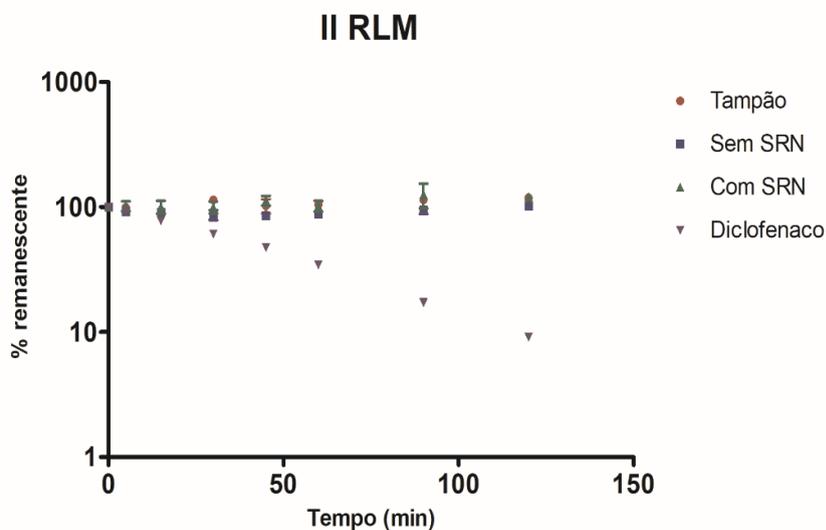


Figura 30. Estabilidade metabólica do composto II em microssoma de rato.

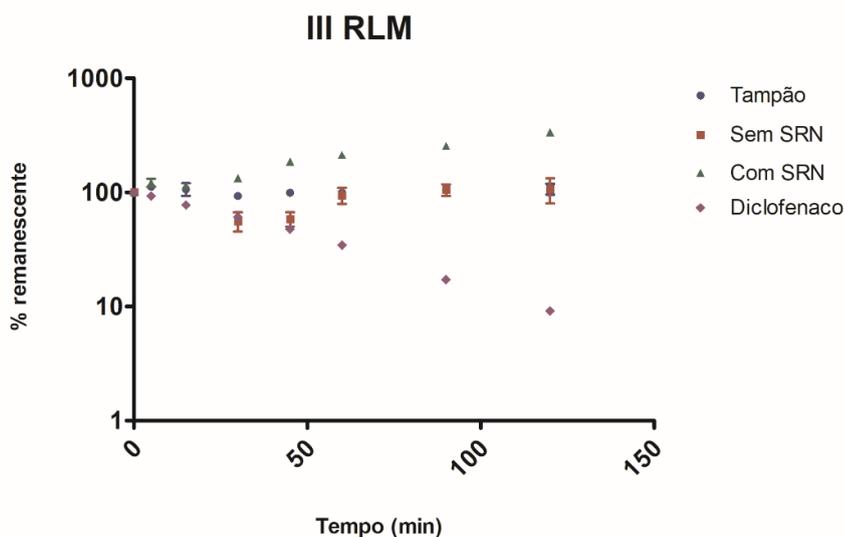


Figura 31. Estabilidade metabólica do composto III em microssoma de rato.

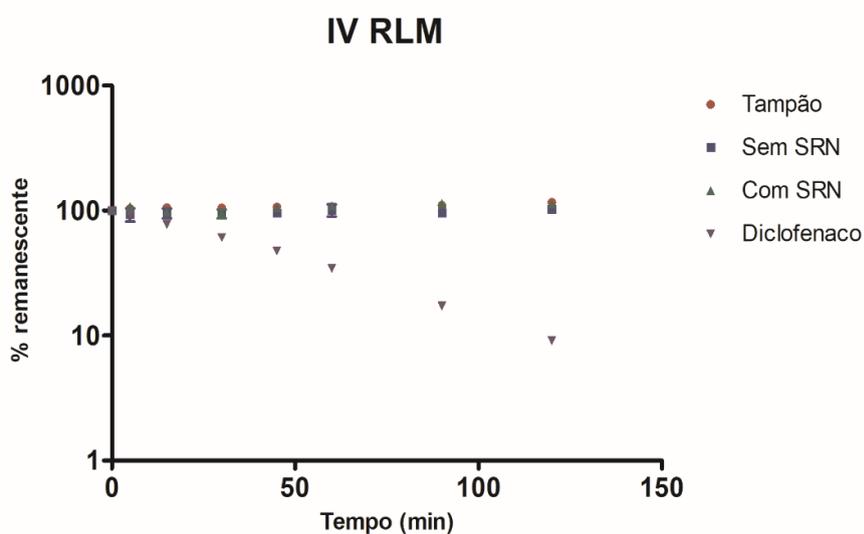


Figura 32. Estabilidade metabólica do composto IV em microssoma de rato.

Como pode ser observado na figura 29, o composto I apresentou perfil bem similar nas três condições analisadas e em nenhuma delas houve diferença estatística significativa, indicando a estabilidade do composto em todas as condições. O mesmo resultado pode ser verificado para II (Figura 30) e IV (Figura 31).

A metodologia empregada pode ser a responsável pelos valores acima de 100% apresentados pelo composto III, uma vez que a mistura é submetida a aquecimento, o que pode causar precipitação e assim, a concentração do composto.

Os fármacos I, II e IV se apresentaram estáveis frente aos três sistemas submetidos, não havendo decaimento das concentrações nem quando submetido às

enzimas microssomais, indicando assim, que esses compostos não são metabolizados por elas. O composto III possivelmente é metabolizado, porém não foi possível a visualização do decaimento. A ausência de decaimento impossibilitou o cálculo da meia vida intrínseca dos compostos testes.

5.6.2 Microssoma humano

Nas figuras 33 a 36 estão representados os resultados do ensaio de estabilidade metabólica dos compostos I a IV em microssoma humano.

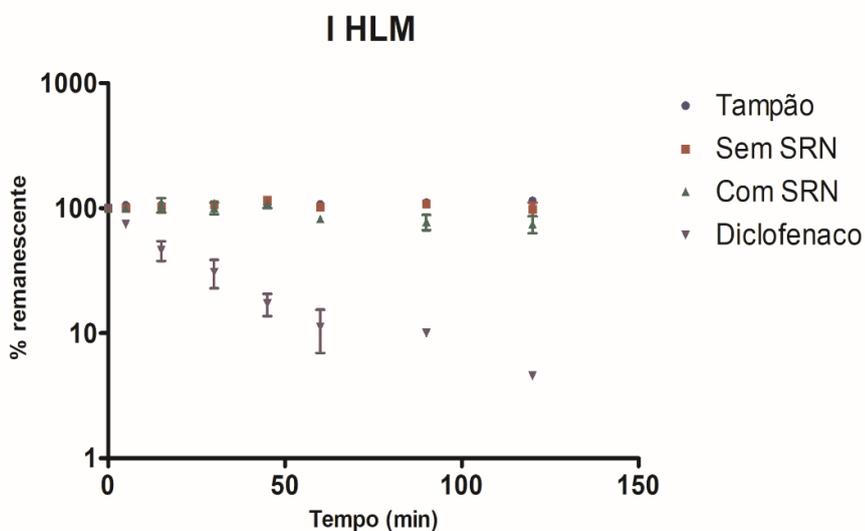


Figura 33. Estabilidade metabólica do composto I em microssoma humano.

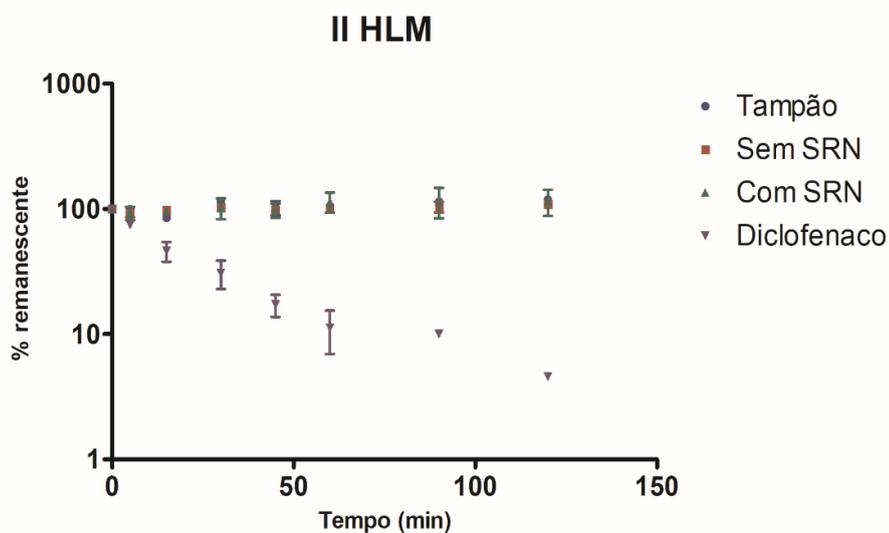


Figura 34. Estabilidade metabólica do composto II em microssoma humano.

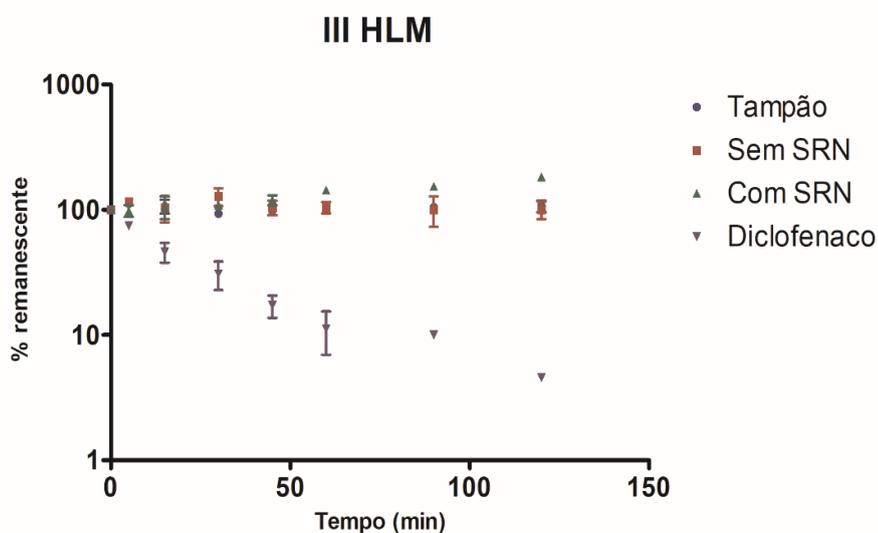


Figura 35. Estabilidade metabólica do composto III em microsossoma humano.

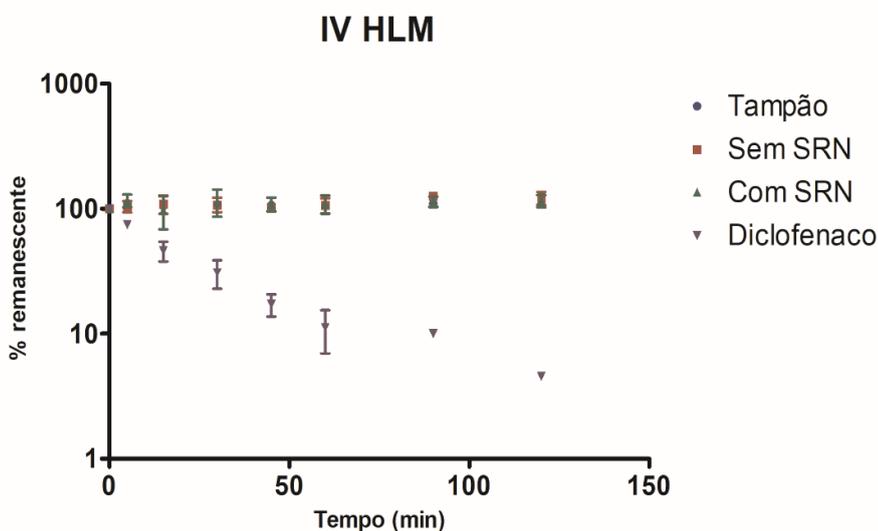


Figura 36. Estabilidade metabólica do composto IV em microsossoma humano.

Os compostos I, II e IV se apresentaram estáveis frente as enzimas microsossomais humanas, uma vez que os perfis obtidos foram similares nas três condições avaliadas. O composto III novamente apresentou porcentagem remanescente acima de 100%, assim como frente as enzimas microsossomais de rato. A não obtenção do decaimento, impossibilitou o cálculo da meia vida intrínseca.

É de conhecimento geral que há diferenças no metabolismo de fármacos entre as espécies, sendo essas diferenças relacionadas as isoformas das enzimas, regulação gênica, expressão de proteínas e atividade catalítica das enzimas. As consequências dessa diversidade podem alterar a biodisponibilidade, meia-vida, ativação de pró-fármacos e formação de metabólitos (DEKEYSER; SHOU, 2012).

Ao compararmos os aminoácidos componentes de algumas isoformas do CYP450 em ratos e humanos, encontramos valores de aproximadamente 70% de semelhança. E, de maneira geral, quanto mais o composto é metabolizado, menos preciso é o escalonamento alométrico para prever a farmacocinética em humanos (DEKEYSER; SHOU, 2012).

Assim, os resultados semelhantes obtidos no estudo em questão ao comparar a metabolização em microssoma de ratos e humanos comprova que apesar das diferenças interespecies, compostos que são pouco metabolizados tem a predição da farmacocinética em humanos mais precisa a partir de outras espécies.

Como controle do experimento foi utilizado o diclofenaco, uma vez que ele já foi utilizado previamente como composto modelo para avaliar a predição do clearance *in vivo* em humanos a partir de microssomas (CARLILE et al., 1999; OBACH, 1999; KUMAR et al., 2002). Seu uso comum se dá, pois, seu metabolismo oxidativo parece ser predominante em humanos, sendo apenas de 10 a 20% da dose total excretada na forma de acil glicuronídeo, e a avaliação do metabolismo conjugativo é dificultado nos microssomas (KUMAR et al, 2002).

O diclofenaco, como esperado, apresentou decaimento, demonstrando a funcionalidade do sistema. A meia vida apresentada foi de 33 minutos para microssoma de ratos e 36 minutos para microssoma humano. A partir da inclinação foi calculado o Clearance intrínseco *in vitro*, resultando em 0,042 mL/min/mg proteína que extrapolado, resultou em um Cl'_{int} de 85,05 mL/min*kg para microssoma de ratos. Para microssoma humano, o Clearance intrínseco *in vitro* foi de 0,038 mL/min/mg proteína e Cl'_{int} de 76,95 mL/min*kg. O trabalho de Uno e colaboradores (2008) avaliou o clearance intrínseco *in vitro* do diclofenaco e encontrou um valor de 0,05 mL/min/mg de proteína, bem próximo ao encontrado no presente trabalho.

Um fator a ser analisado nos cálculos é a taxa de ligação proteica dos compostos, uma vez que se presume que fármacos que possuem alta ligação a proteínas estarão indisponíveis para interação direta com as enzimas metabolizadoras, sendo necessário primeiro a dissociação destes das proteínas, para então sofrerem ação das enzimas.

Obach (1999) no entanto afirma que fármacos básicos se ligam fortemente a proteínas plasmáticas, mas também as proteínas teciduais e, neste caso considerar a taxa de ligação proteica em plasma para o cálculo é desnecessário. O diclofenaco apresenta alta ligação a proteínas e é um composto de caráter ácido com baixa ligação

a proteína microsomal e alta ligação a proteína plasmática, o que torna a taxa de ligação a proteína plasmática um importante fator a ser considerado no cálculo do CI.

Considerando a hidrofobicidade dos compostos teste, e que os substratos das enzimas do CYP apresentam logP mais elevado (Tabela 9), condizente com moléculas mais lipofílicas, e que os compostos se demonstraram estáveis frente as enzimas microsomais, há expectativa de que a excreção renal seja importante no CI. Este resultado aponta que no planejamento dos ensaios *in vivo* é interessante realizar a coleta de urina dos animais, através da sua manutenção em gaiolas metabólicas, e a realização da análise dessas amostras de urina para calcular o CI renal dos compostos e a fração excretada inalterada na urina.

Compostos que apresentam altos valores de excreção na forma inalterada na urina e elevado CI renal, se chegarem na etapa de estudos clínicos, devem receber atenção especial em populações que apresentam insuficiência renal pois ajustes de dose serão necessários.

5.7 Ensaio de estabilidade *ex vivo* dos compostos I, II, III e IV

O trabalho de Di e colaboradores (2005) avaliou algumas das variáveis que podiam alterar os resultados do ensaio de estabilidade em plasma, como a concentração do composto testes, concentração de DMSO e atividade enzimática sob incubação. A concentração do substrato variou em até vinte vezes e não houve diferença na porcentagem remanescente, indicando que o plasma não é sensível a concentração do fármaco, diferente das enzimas microsomais, que são facilmente saturáveis em altas concentrações. O estudo de Nomeir e colaboradores (1998) verificou saturação das enzimas plasmáticas em concentrações de 100 µg/mL, assim, os valores utilizados no presente trabalho foram adequados e não causaram saturação enzimática.

A porcentagem de DMSO avaliada por Di e colaboradores (2005) variou de 0,5 a 20% e não houve diferença significativa até 2,5%, outro ponto diferente da avaliação da estabilidade metabólica em microsoma, que preconiza valores de até 1% de solvente orgânico. As porcentagens acima de 2,5% de DMSO acusaram porcentagem remanescente maior do que em concentrações menores, provavelmente devido a desnaturação das enzimas plasmáticas, resultando em diminuição da atividade enzimática.

O tempo de incubação avaliado variou de 0 a 22h, não havendo diferença estatística significativa mesmo após 22h de incubação a 37°C, outro ponto contrastante com as enzimas CYP450, que permitem um tempo bem menor de incubação. Todos esses testes demonstram a robustez das enzimas plasmáticas, além de indicar a alta capacidade catalítica destas (DI et al., 2005).

As figuras a seguir representam os resultados do ensaio de estabilidade dos compostos I a IV em plasma de rato.

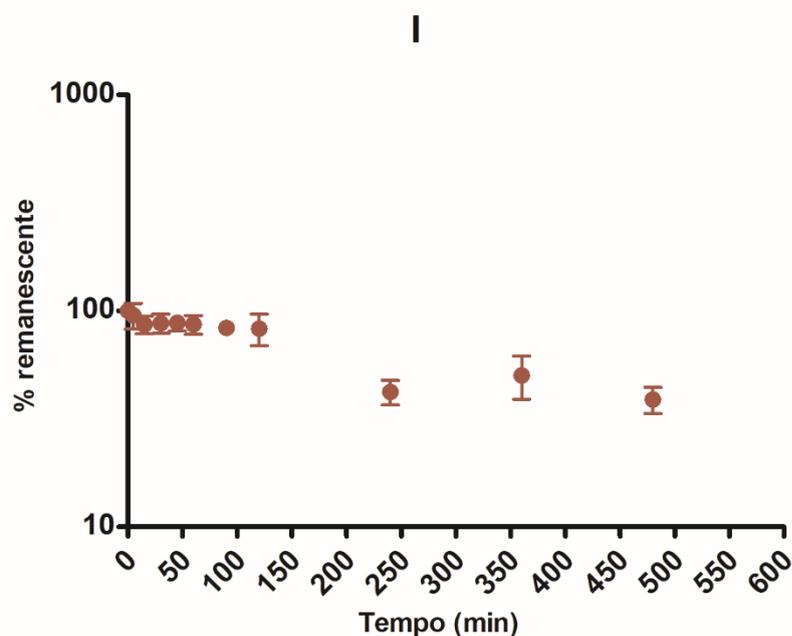


Figura 37. Estabilidade do composto I em plasma de rato.

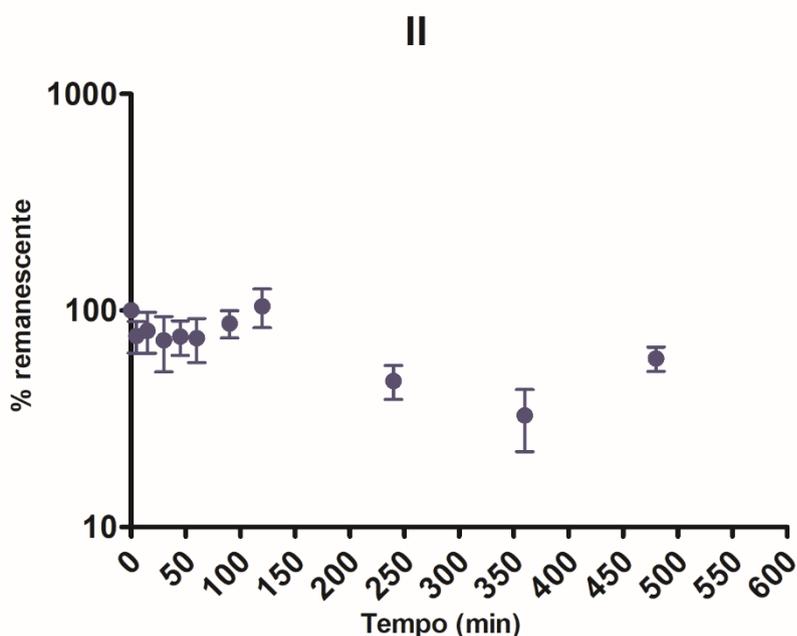


Figura 38. Estabilidade do composto II em plasma de rato.

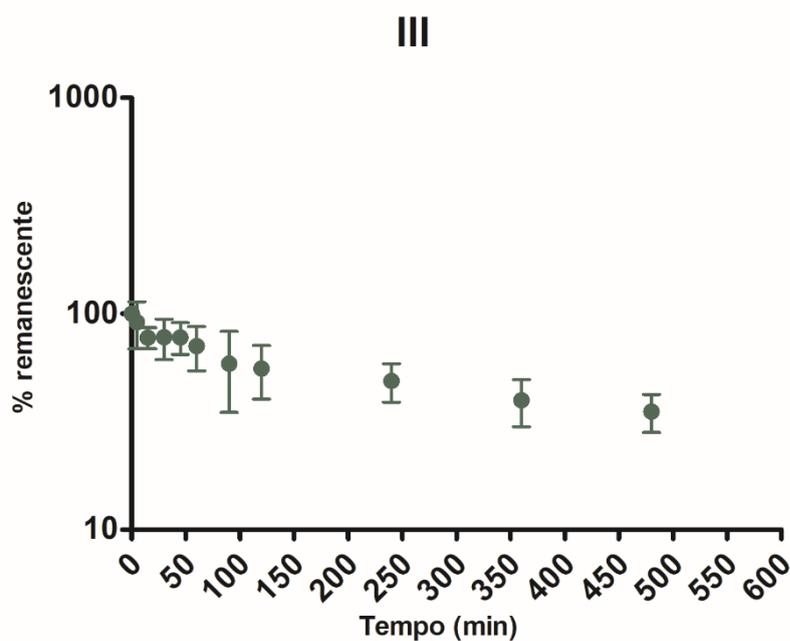


Figura 39. Estabilidade do composto III em plasma de rato.

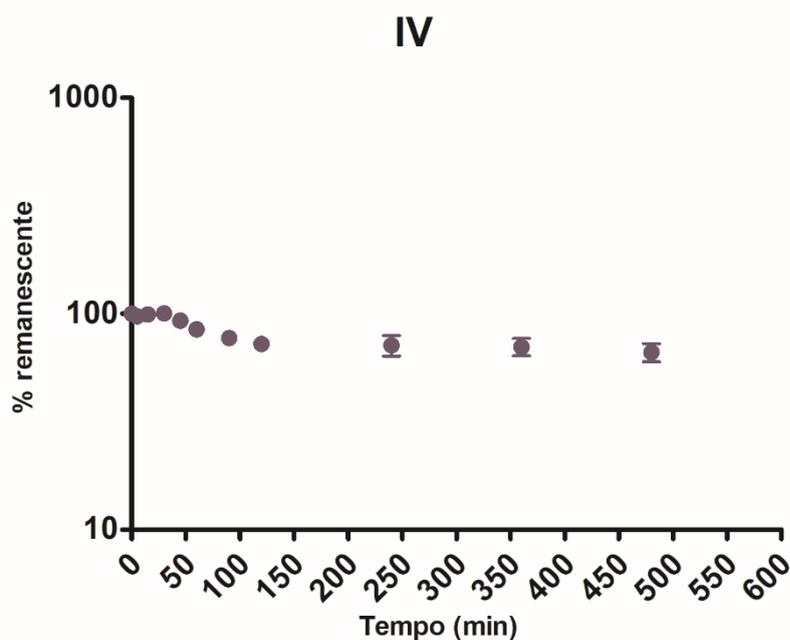


Figura 40. Estabilidade do composto IV em plasma de rato.

A partir da análise estatística, verificou-se que os compostos I e IV se apresentaram instáveis no tempo de 8 horas, enquanto II e III, se apresentaram instáveis no tempo de 6 horas.

Por se tratarem de ésteres, que são substratos das esterases plasmáticas, era esperada uma rápida degradação dos compostos, que dependendo de quão rápida, poderia significar a inviabilidade do prosseguimento do desenvolvimento das

moléculas. O fato de que há decaimento contínuo e diferença estatística apenas nos tempos de 6 e 8 horas, indicam que a degradação não é fator crítico ao desenvolvimento.

6 CONCLUSÕES

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

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

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

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

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

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

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

REFERÊNCIAS

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

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

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

ANDERLE, P., *et al.* P-glycoprotein (P-gp) mediated efflux in Caco-2 cell monolayers: The influence of culturing conditions and drug exposure on P-gp expression levels. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 87, n. 6, p. 757-762, 1998.

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

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

ARTURSSON, P.; KARLSSON, J. Correlation between oral drug absorption in humans and apparent drug permeability coefficients in human intestinal epithelial (Caco-2) cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 175, n. 3, p. 880-885, 1991.

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

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

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

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

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

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

BRASIL. Ministério da Saúde. Teste Rápido Molecular para tuberculose amplia rede de diagnóstico. Disponível em: <<http://portalms.saude.gov.br/noticias/agencia-saude/42872-teste-rapido-molecular-para-tuberculose-amplia-rede-de-diagnostico>>. Acesso em 10 de setembro de 2018.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

KANSY, M.; SENNER, F.; GUBERNATOR, K. Physicochemical high throughput screening: parallel artificial membrane permeation assay in the description of passive absorption processes. **Journal of medicinal chemistry**, v. 41, n. 7, p. 1007-1010, 1998.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

TRABULSI, L.R.; ALTERTHUM, F. **Microbiologia**. 5^a ed. São Paulo: Atheneu, 2008.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

WORLD HEALTH ORGANIZATION-WHO. Global Tuberculosis Report 2015. Geneva: World Health Organization; 2015. ISBN 978 92 4 156505 9. Disponível em: <https://www.who.int/tb/publications/global_report/gtbr15_main_text.pdf>.

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

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

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

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

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

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

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