UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Disposição cinética do 2,5-bis(2-metoxifenil)tiofeno um
análogo sintético da grandisina**

Ariane Manzoni Bocamino

**Ribeirão Preto
2017**

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Disposição cinética do 2,5-bis(2-metoxifenil)tiofeno um
análogo sintético da grandisina**

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Toxicologia
para obtenção do Título de Mestre em
Ciências

Área de Concentração: Toxicologia.

Orientada: Ariane Manzoni Bocamino

Orientador: Prof. Dr. Norberto Peporine Lopes

Versão corrigida da dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Toxicologia em 02/10/2017. A versão original encontra-se na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP.

**Ribeirão Preto
2017**

RESUMO

BOCAMINO, A.M. **Disposição cinética do 2,5-bis(2-metoxifenil)tiofeno um análogo sintético da grandisina**. 2017. 85 f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2017.

É notório o potencial farmacológico de lignanas, metabólitos secundários extraídos de produtos naturais, na sua maioria com baixos rendimentos. Usando a natureza como fonte de inspiração, foram propostas rotas sintéticas de compostos análogos, obtendo-se o 2,5-bis(2-metoxifenil)tiofeno, um análogo químico da lignana grandisina. De acordo com o potencial leishmanicida preliminarmente identificado, associado à reduzida citotoxicidade do análogo, despertou-se o interesse para o desenvolvimento de nova terapia medicamentosa para as leishmanioses em substituição aos tratamentos rotineiros e tóxicos utilizados. Entretanto, não há na literatura informações sobre os processos que abrangem a farmacocinética - absorção, distribuição, metabolismo e excreção (ADME) do composto. Portanto, o presente estudo objetivou a avaliação pré-clínica da disposição cinética do 2,5-bis(2-metoxifenil)tiofeno. Inicialmente foi desenvolvido um método analítico por cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada a espectrometria de massas (CLUE-EM/EM) para quantificação do analito extraído da matriz de plasma, através de precipitação de proteínas com acetonitrila acidificada. O método foi validado de acordo com guias oficiais da Agência Nacional de Vigilância Sanitária e da *Food and Drug Administration*, mostrando-se sensível, exato, preciso e linear na faixa de 4 a 1000 ng.mL⁻¹. A partir da administração intravenosa do 2,5-bis(2-metoxifenil)tiofeno em ratos foi possível obter curvas de decaimento plasmático *versus* tempo, observando-se que os dados adequaram-se ao modelo bicompartimental. O perfil farmacocinético do 2,5-bis(2-metoxifenil)tiofeno indicou rápida distribuição ($t_{1/2\alpha}$ de 10,66 ± 2,37 min) e eliminação ($t_{1/2\beta}$ de 71,68 ± 13,84 min), não provocando acúmulo plasmático.

Palavras-chave: lignana, 2,5-bis(2-metoxifenil)tiofeno, farmacocinética

ABSTRACT

BOCAMINO, A.M. **Kinetic disposition of 2,5-bis(2-methoxyphenyl)thiophene a synthetic analogue of grandisine.** 2017. 85 f. Dissertation (Master). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2017.

It is notorious the pharmacological potential of lignans, secondary metabolites extracted from natural products, mostly with low yields. Applying nature as a source of inspiration, synthetic routes of analogous compounds have been proposed getting 2,5-bis(2-methoxyphenyl)thiophene, a chemical analogue of lignan grandisine. According to the leishmanicide potential preliminarily identified, associated with the reduced cytotoxicity of the analogue, interest was aroused for the development of new drug therapy for leishmaniasis, replacing the typical and toxic treatments used. However, there is no information about the pharmacokinetics processes - absorption, distribution, metabolism and excretion (ADME) of the compound in the literature. Therefore, the present study aimed to evaluate the kinetic disposition of 2,5-bis (2-methoxyphenyl) thiophene. An analytical method was developed by ultra performance liquid chromatography coupled to mass spectrometry (UPLC-MS/MS) for quantification of the analyte extracted from the plasma matrix through precipitation of proteins with acidified acetonitrile. The method was validated in according to *Agência Nacional de Vigilância Sanitária* and Food and Drug Administration guidelines, showing to be sensitive, accurate, precise and linear over the concentration range of 4 to 1000 ng.mL⁻¹. From the intravenous administration of 2,5-bis(2-methoxyphenyl)thiophene in rats it was possible to obtain the mean plasma concentration versus time profile, and the concentration data was best fitted to a two-compartment model. The pharmacokinetic profile of 2,5-bis (2-methoxyphenyl) thiophene indicated rapid distribution ($t_{1/2\alpha}$ of 10.66 ± 2.37 min) and elimination ($t_{1/2\beta}$ of 71.68 ± 13.84 min), without plasma accumulation.

Keywords: lignan, 2,5-bis(2-methoxyphenyl)thiophene, pharmacokinetics

1. INTRODUÇÃO

1.1. Doenças negligenciadas, o problema das leishmanioses

As leishmanioses cutânea (LC) e visceral (LV) são problemas de saúde pública mundial, atingindo 89 países e colocando em risco cerca de 350 milhões de pessoas por todo o mundo, segundo estimativas da Organização Mundial de Saúde (OMS) (WHO, 2015). A mais de 10 anos o Brasil foi reportado como um dos cinco países com maior incidência de infectados por leishmaniose e permanece neste patamar até os dias atuais (DESJEUX, 2004; WHO, 2015).

O Brasil apresenta um cenário crítico em relação às doenças com números crescentes de casos, sendo notificados um total de aproximadamente 19 mil casos de LC e cerca de 3.500 casos de LV, a forma mais grave da doença (BRASIL, 2017a; BRASIL, 2017b).

São doenças de caráter endêmico, porém em crescente expansão geográfica pelo Brasil. A região Nordeste registra as maiores ocorrências, refletindo os problemas socioeconômicos do país, uma vez que atingem principalmente o estrato social mais carente, enquadrando-se entre as doenças negligenciadas (BRASIL, 2014; BRASIL, 2017c).

A leishmaniose é causada por diversas espécies de protozoários do gênero *Leishmania* (L.), sendo *L. amazonensis* e *L. infantum* os agentes etiológicos mais amplamente distribuídos pelo Brasil, responsáveis pela leishmaniose cutânea e visceral respectivamente. São parasitas intracelulares que afetam preferencialmente células do sistema mononuclear fagocitário, acometendo pele, mucosas e órgãos internos e, acarretando em um quadro de imunossupressão grave nos pacientes. (SANTOS-OLIVEIRA; DA-CRUZ, 2012; BRASIL, 2014; BRASIL, 2017c).

No Brasil são crescentes os relatos da coinfecção entre leishmaniose e AIDS, uma combinação que preocupa os órgãos públicos de saúde, visto que indivíduos imunodeprimidos apresentam agravamento do quadro clínico, junto a índices elevados de morbidade e mortalidade (BARBOSA et al., 2013; BRASIL, 2015). Dados da OMS relatam que o número de casos notificados de AIDS/LV mais do que dobrou no período de 2005 a 2011, passando de 2,5% a 6,6 % (WHO, 2015).

O caráter oportunista da doença está também relacionado à progressão da LC causada por *L. amazonensis* para sua forma difusa (LCD), assim como, está associada à disseminação da visceralização da leishmaniose tegumentar, um processo no qual há acometimento de órgãos raramente atingidos por esta forma da doença (BRASIL, 2015).

O vínculo das leishmanioses com a pobreza reflete um reduzido investimento em pesquisas e produção de novos fármacos, além de um insuficiente controle e estabelecimento de medidas preventivas por ações governamentais, intensificando o panorama das doenças em países endêmicos, como o Brasil (ENNES-VIDAL et al., 2016; OLLIARO et al., 2017).

Outro agravante do perfil das leishmanioses está relacionado à elevada incidência da doença em cães, os quais são o reservatório doméstico do parasita. Os animais sintomáticos, na maioria das vezes, são tratados com os antimoniais pentavalentes ou são submetidos à eutanásia. Tais estratégias mostram-se ineficazes, pois contribuem com o surgimento de parasitas resistentes, provocam grande comoção social, e permitem a permanência de animais assintomáticos infectantes capazes de manter a infecção circulante (COSTA, 2012). Portanto, mais uma vez identifica-se a necessidade de boas políticas governamentais de vigilância para as leishmanioses.

Poucos são os medicamentos disponíveis para tratar as doenças. No Brasil, os principais tratamentos fornecidos para todos os tipos de leishmaniose são a anfotericina B lipossomal e os antimoniais pentavalentes (antimoniato de N-metil-glucamina) administrados via parenteral (DE OLIVEIRA et al., 2017). Porém, os altos custos dos medicamentos e da sua administração ambulatorial, causam um grande impacto financeiro no sistema público de saúde do país, esclarecendo, parcialmente, a falta de interesse governamental em reverter a situação (MISTRO et al., 2016).

Ambos medicamentos provocam inúmeros efeitos colaterais, justificando em muitos casos a descontinuidade ao tratamento e gerando, conseqüentemente, falhas na terapia, recidivas e complicações, além de ser um fator adicional que colabora com a seleção de parasitas resistentes (MALTEZOU, 2010; MOHAPATRA, 2014).

Observa-se que os medicamentos disponíveis hoje no mercado mundial estão longe de serem ideais, com diversas limitações incluindo baixa eficácia, resistência

parasitária, toxicidade e altos custos (WILKINSON; KELLY, 2009; SINGH; SUNDAR, 2012).

Diante da análise do cenário da leishmaniose apresentado, somado ao fato de que o manejo das doenças são extremamente dependente do tratamento medicamentoso, nota-se a importância da investigação e desenvolvimento de novas opções terapêuticas acessíveis à população mais carente, e que não estejam relacionados à resistência parasitária, toxicidade e baixa eficiência, reduzindo assim, os riscos à população.

1.2. O potencial farmacológico dos compostos lignóides

Os lignóides são provenientes do metabolismo secundário de produtos naturais, e os frequentes relatos na literatura da atividade leishmanicida *in vitro* destes compostos despertam o interesse na busca de novos tratamentos para as leishmanioses.

O extenso potencial de lignanas e neolignanas contra as formas amastigotas e promastigotas de diversas espécies de *Leishmania* spp foi revisado na literatura por Schmidt e colaboradores (2012) e dentre os exemplos relacionados destaca-se a difilina, derivada da justicidina B e isolada de *Haplophyllum bucharicum* (Rutaceae) fortemente ativa contra as formas amastigotas intracelulares ($IC_{50} = 0,2 \mu M$), uma atividade ligada à modulação fagocitária dos macrófagos. Outros lignóides como a surinamensina e o 3,4,5-trimetoxi-8-[2',6'-dimetoxi-4'-(E)propenilfenoxi]-fenilpropano, isolados do gênero *Virola*, também apresentaram atividade, e foram seletivos contra as formas amastigotas e promastigotas da *L. Infantum*. Ainda nesta revisão, foram ressaltadas alterações morfológicas celulares em promastigotas de *Leishmania* spp, provocando morte por apoptose, após incubação do parasita com a lignana iangambina, isolada de *Ocotea duckei* (Lauraceae).

Ensaio empregando a neolignana licarina A demonstraram seu potencial leishmanicida contra formas amastigotas intracelulares de *Leishmania major*, mostrando-se mais efetivo do que o medicamento referência antimoniatado de N-metil-glucamina, associando este efeito à atividade imunomodulatória do composto (NÉRIS et al., 2013). O mecanismo por modulação da resposta imune também foi

observado em estudo com a lignana nirantina, revelando seu potencial leishmanicida (CHOWDHURY et al., 2012).

Reforçando o potencial dos lignóides como um candidato à fármaco, em publicação de Pilon e colaboradores (2017) foi indicado preliminarmente que as lignanas enquadraram-se como uma classe promissora em relação à biodisponibilidade oral, característica desejável em um fármaco. Este estudo foi desenvolvido a partir de tratamentos estatísticos cruzando as informações de sua base de dados com algumas características moleculares baseadas nas regras de Lipinsky et al. (1997) e Veber et al. (2002), como flexibilidade molecular reduzida, baixa área de superfície polar, peso molecular menor que 500 Da, log P abaixo de 5, e outras, possibilitando predizer o perfil de biodisponibilidade das lignanas.

Como a quantidade isolada das substâncias ativas dos produtos naturais é relativamente baixa, em certos casos, pesquisadores direcionam seus esforços na descoberta de rotas sintéticas destas moléculas. Entretanto, a complexidade estrutural dos produtos naturais acabam alavancando a síntese de compostos análogos, mantendo-se os grupos farmacofóricos e fazendo alterações moleculares que podem melhorar a eficiência do fármaco e/ou diminuir sua toxicidade (DEWICK, 2009; CRAGG; NEWMAN, 2013; DE OLIVEIRA et al., 2017).

Seguindo esta linha de pesquisa foram sintetizados compostos inspirados na estrutura da lignana grandisina. Entre as moléculas sintetizadas o 2,5-bis(2-metoxifenil)tiofeno (2,5-MFT) foi selecionado com maior potencial terapêutico contra as formas promastigota do *L. amazonenses*, efeito associado à presença de grupamentos metoxila na molécula. Além disso, o MFT demonstrou baixa citotoxicidade, provocando mínima morte celular dos macrófagos nas doses de 37 a 369 µM. Efeitos tóxicos são comumente associados ao fármaco padronizado para o tratamento da doença, a anfotericina B (AMARAL et al., 2014). Os resultados encontrados por Amaral et al. (2014) sugeriram que a atividade leishmanicida dos compostos estudados está associada à estrutura 2,5-difenil tiofeno.

Uma patente com o escopo de proteção para uma formulação tópica e para o uso das substâncias sintetizadas no tratamento da leishmaniose cutânea foi elaborada, revelando o avanço da pesquisa, com projeções para o desenvolvimento de uma nova terapia medicamentosa (Processo: BR 10 2017 009057 4 - "COMPOSIÇÕES FARMACÊUTICAS TÓPICAS E USO DAS MESMAS").

Os resultados satisfatórios das substâncias de estudos contra leishmaniose cutânea despertaram, portanto, o interesse para aplicação dos lignóides como um tratamento por via oral contra as diversas espécies de *Leishmaniose*. Experimentos preliminares *in vitro* de citotoxicidade e da atividade biológica do 2,5-bis(2-metoxifenil)tiofeno contra *L. infantum* estão apresentando resultados promissores.

Entretanto, a identificação de compostos com atividades biológicas é somente o início de uma longa etapa até o desenvolvimento de um produto final (GUIDO; ANDRICOPULO; OLIVA, 2010). Vale lembrar, que a produção de um novo medicamento é um processo de alto custo e com grandes índices de insucesso, devido principalmente ao conhecimento insuficiente das propriedades farmacocinéticas (BASAVARAJ; BETAGERI, 2014).

Diante da urgente necessidade de inovações para o tratamento das leishmanioses, o estudo farmacocinético deve ser um dos principais aspectos a ser considerado no *screening* de substâncias ativas, logo no início do desenvolvimento de medicamentos. A obtenção dos parâmetros farmacocinéticos dos candidatos aos ensaios clínicos geram resultados de grande impacto, que certificam, de forma racional, a viabilidade da molécula como agente farmacológico em menor tempo e a custos minimizados, garantido sua segurança e auxiliando na otimização de formulações, regime posológico e dose (SCHELLACK, 2005).

1.3. Estudo do perfil farmacocinético

As pesquisas para o desenvolvimento de novos fármacos dependem inicialmente das propriedades farmacológicas dos compostos, entretanto, a eficiência e segurança de um fármaco estão intimamente relacionadas à capacidade do mesmo em alcançar os sítios específicos em concentrações adequadas e durante um período de tempo apropriado (ROGGE; TAFT, 2010).

A farmacocinética pode auxiliar no esclarecimento da exposição do organismo ao fármaco e verificar se o mesmo atende às características desejadas para garantir o efeito farmacológico, como alcançar rapidamente o sítio ativo, não ser metabolizado com muita rapidez e não apresentar citotoxicidade. O estudo farmacocinético fornecerá informações sobre os processos de absorção, distribuição, metabolismo e excreção (ADME) a que o composto é submetido após

sua administração no organismo, e também possibilitará estabelecer uma relação entre a dose administrada de uma substância e a exposição do organismo a ela (GOMES, 2011).

A compreensão das propriedades de ADME de um candidato a fármaco direcionam as pesquisas para a investigação de soluções que intensifiquem o resultado terapêutico, através da construção de regimes posológicos, da seleção da melhor via de administração, do desenvolvimento de formulações que ampliem a biodisponibilidade ou que permitam controlar o tempo de permanência e de ação do fármaco no tecido alvo e, ao mesmo tempo, reduzir a probabilidade de ocorrência de efeitos tóxicos. Por fim, a investigação detalhada do perfil farmacocinético certificará que as falhas observadas nos estudos clínicos em humanos não estejam atreladas aos processos de ADME (SINGH, 2013).

Os processos de absorção, distribuição e eliminação de uma substância são determinados por meio de modelos matemáticos que descrevem as variações da concentração plasmática do fármaco no organismo ao longo do tempo. Estes modelos matemáticos idealizam que o organismo é constituído por compartimentos (modelos compartimentais), possibilitando a identificação dos caminhos percorridos pelo fármaco no organismo e, auxiliando nos cálculos de parâmetros farmacocinéticos (SHARGEL et al., 2005; STORPITIS et al, 2011).

1.4. Técnicas hifenadas para a quantificação de lignanas

Diferentes técnicas têm sido utilizadas na quantificação de lignanas, destacando-se as técnicas hifenadas de separação e detecção como cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM), cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas (CLAE-EM), cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por arranjo de diodos (CLAE-DAD).

A seleção das técnicas mais adequadas depende além da acessibilidade, dos objetivos, da sensibilidade e seletividade requeridos.

Sistemas como CG-EM são eficientes e muitas vezes empregados (KOULMAN et al., 2001) na quantificação de lignanas apesar da sua limitada aplicação a compostos voláteis, de baixa polaridade e termoestáveis. A ionização por impacto de elétrons (EI) é frequentemente acoplada a CG-EM, gerando muitos

fragmentos, e, portanto, grande informação estrutural. A técnica permite fácil identificação do analito de estudo pela comparação do padrão de fragmentação com espectros disponíveis na sua biblioteca. O problema encontra-se entre substâncias com padrão de fragmentação muito semelhante, como no caso de isômeros, onde a identificação através da biblioteca não será tão exata (VÉKEY, 2001).

Na literatura observa-se que a técnica mais frequentemente empregada para a identificação e quantificação de lignanas é a técnica de CLAE com diferentes tipos de detectores como UV e EM.

A CLAE-UV é a técnica mais barata e é amplamente utilizada (WANG; SUN; LEE, 2004; JEON et al., 2013), entretanto é aplicada apenas à detecção de compostos que apresentam grupos cromóforos (WOLFENDER, 2009). Para detecção de lignanas, a técnica também aponta outro fator limitante relacionado ao fato destes compostos absorverem em comprimentos de onda curtos, podendo sua detecção ser ocultada pelos solventes comumente usados em CLAE, os quais absorvem em comprimentos de onda muito próximos aos desta classe de compostos. Quando comparado com MS a técnica de UV apresenta desvantagens, pois não permite a diferenciação de compostos que coeluem, nem alcançam limites de quantificação tão baixos (WOLFENDER, 2009).

A espectrometria de massas destaca-se entre as técnicas pois fornece informações valiosas de um dado composto na presença de misturas e matrizes complexas, com alta sensibilidade e seletividade, em análises extremamente rápidas (HOFFMANN; STROOBANT, 2007; GATES et al., 2006). O acoplamento de CLAE e MS é a principal ferramenta para análise quantitativa de lignanas, sendo diversos os métodos desenvolvidos e reportados na literatura (ZHAO et al., 2013; BARTH et al., 2015; YANG et al., 2015; BHATT et al., 2017).

CLAE/MS é uma técnica que aplica as vantagens de separação cromatográfica como concentração da amostra na coluna com os benefícios da espectrometria de massas, promovendo um ganho de seletividade e sensibilidade, resolução dos compostos, com consequente redução de efeito matriz, entretanto com corridas cromatográficas relativamente longas (MALDANER; JARDIM, 2009; GUILLARME et al., 2010).

Na busca da otimização deste sistema foi desenvolvido a CLUE, que são sistemas que aplicam os mesmos princípios da CLAE, porém utilizando colunas com

partículas menores e bombas mais potentes, oferecendo maior eficiência na transferência de massa e reduzindo significativamente o tempo de análise (CIELECKA-PIONTEK et al., 2013).

A hifenação entre CLAE e espectrometria de massas foi possível após o desenvolvimento de ionizadores como *electrospray*, uma técnica pela qual a ionização ocorre sob pressão atmosférica onde um campo elétrico dispersa uma amostra líquida em um gás, na forma de um fino *spray* de gotas carregadas, que ao serem evaporadas liberam íons na fase gasosa. O *electrospray* portanto solucionou a incompatibilidade entre o alto fluxo de eluente do CLAE com o alto vácuo requerido pelo EM, consolidando, assim, as técnicas como ferramentas essenciais na química analítica (CROTTI et al., 2006; WOLFENDER, 2009).

Pela técnica de *electrospray*, a ionização ocorre principalmente por reações ácido-base de Bronsted-Lowry, pela protonação ou desprotonação de moléculas. Este método é considerado brando, e pouca energia residual é retida pelo analito após a ionização, normalmente acarretando baixa fragmentação e consequentemente gerando pouca informação espectral (VESSECCHI et al., 2007; KRUIVE et al., 2015a).

A espectrometria de massas em modo sequencial (EM/EM) surgiu para contornar este problema, aumentando a quantidade de informação estrutural que se pode obter. Analisadores do tipo triplo quadrupolo (Q) operam em modo sequencial e são amplamente utilizados na quantificação de compostos orgânicos pois isolam e pré-concentram os íons precursores, em um primeiro estágio (Q1), transferindo-os para uma célula de colisão (q2), onde são gerados fragmentos (íons filhos). No segundo estágio (Q3), os íons resultantes são filtrados e identificados, possibilitando assim, estabelecer uma relação com o íon precursor e prever a estrutura do composto (HARRIS, 2005). Um método frequentemente utilizado em ensaios de quantificação para o monitoramento de íons precursores e seus fragmentos correspondentes é conhecido por monitoramento de reações múltiplas (MRM). Este modo de aquisição de dados é amplamente empregado na quantificação de compostos presentes em matrizes complexas em baixas concentrações, uma vez que possibilita um aumento na sensibilidade e reduz a interferência espectral de substâncias provenientes da matriz que coeluem no sistema cromatográfico (CHIARADIA; COLLINS; JARDIM, 2008).

1.5. Validação de métodos analíticos

Um método analítico desenvolvido, ou mesmo um método conhecido validado e adaptado deve ser submetido a um processo de avaliação que comprove seu desempenho na atividade a que se propõe analisar. Este processo é denominado validação, a qual possibilita alcançar os resultados esperados com confiança e reprodutibilidade (ANVISA, 2010; BRITO et al., 2003).

Para assegurar a aplicabilidade de um método, garantindo que os resultados gerados sejam confiáveis e interpretáveis, é necessário estabelecer limites de confiança (GONÇALVES; ALVES; MARTINS, 2011). Diversos são os procedimentos para validação, dependendo da finalidade do método e do órgão regulamentador seguido.

Agências reguladoras como *United States Food and Drug Administration* (US-FDA), *European Medicines Evaluation Agency* (EMA), Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) fornecem guias e resoluções, os quais descrevem definições, procedimentos, parâmetros e estratégias de validação. Tais órgãos divergem em alguns critérios exigidos, porém, preconizam, de um modo geral, a avaliação dos parâmetros seletividade, efeito residual, linearidade, precisão, exatidão, limite de quantificação, recuperação e estabilidade. Estudos que empregam matrizes biológicas em suas análises devem, também, definir o efeito de matriz, garantindo a eficiência dos métodos bioanalíticos.

No entanto, a observação da ausência de uma norma universal estabelecida, junto ao caráter sugestivo dos guias disponíveis, nos possibilita variadas interpretações. Por isso, a estratégia de validação pode ser adaptada de maneira específica e adequada à finalidade do estudo, sendo determinada de acordo com o procedimento analítico definido, com a natureza e concentração do composto de interesse e com o tipo de matriz disponível (BARNETT; HARRINGTON; GRAUL, 2013; INMETRO, 2011).

2. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A caracterização do 2,5-bis(2-metoxifenil)tiofeno mostrou-se eficiente para confirmar a identidade do composto de estudo, garantindo confiança na sua utilização para o estudo farmacocinético de dose única em ratos.

O método analítico desenvolvido por CLUE-EM/EM e validado seguindo normas da ANVISA e FDA para a quantificação do 2,5-bis(2-metoxifenil)tiofeno em plasma de ratos foi satisfatoriamente empregado ao estudo de disposição cinética de dose única intravenosa em ratos.

A análise do perfil de decaimento plasmático do 2,5-bis(2-metoxifenil)tiofeno *versus* o tempo apontou ajuste adequado dos dados ao modelo bicompartimental. Os parâmetros farmacocinéticos de distribuição determinados como meia-vida de distribuição ($t_{1/2\alpha}$, $10,7 \pm 2,4$) e volume de distribuição (V_d , $23,5 \pm 8,1$) indicaram que o composto é distribuído rapidamente para os tecidos. Os parâmetros farmacocinéticos como *clearance* (Cl, $0,23 \pm 0,07$) e meia-vida de eliminação ($t_{1/2\beta}$, $71,7 \pm 13,8$) apontam que não há acúmulo plasmático em função da rápida eliminação do composto do organismo.

Os estudos pré-clínicos de farmacocinética poderão auxiliar na investigação de formulações compatíveis com os dados de atividade farmacológica e ausência de toxicidade e que permitirão a construção de regimes posológicos e seleção da via de administração adequados ao desenvolvimento de um novo medicamento.

Portanto, espera-se que os resultados até então obtidos possam gerar novas perspectivas acerca do composto em questão, produzindo subsídios para estudos subsequentes.

Vale lembrar que para complementar a compreensão do perfil farmacocinético do 2,5-bis(2-metoxifenil)tiofeno no organismo serão necessários estudos da administração oral do composto visando a determinação da sua biodisponibilidade oral. Também será fundamental a investigação da contribuição da excreção renal e hepática para a eliminação do composto, identificar os possíveis metabólitos gerados e calcular a ligação do 2,5-MFT às proteínas plasmáticas.

3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMARAL, M. F. Z. J. et al. Application of the Negishi Reaction in the Synthesis of Thiophene-Based Lignans Analogues with Leishmanicidal Effects. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 25, n. 10, p. 1907–1913, 2014.

ANVISA. Boas Práticas de Fabricação de Medicamentos. **RDC nº 17, de 16 de abril de 2010**, p. 1–65, 2010.

ANVISA. Resolução Nº 27 , De 17 De Maio. **Anvisa**, v. 75, p. 14, 2012.

BARBOSA, I. R. et al. ASPECTOS DA COINFECÇÃO LEISHMANIOSE VISCERAL E HIV NO NORDESTE DO BRASIL. **Revista Baiana de Saúde Pública**, v. 37, n. 3, p. 672–687, 2013.

BARNETT, K. L.; HARRINGTON, B.; GRAUL, T. W. Validation of Liquid Chromatographic Methods. In: **Liquid Chromatography: Applications**. [s.l: s.n.]. p. 57–73.

BARTH, T. et al. *In vitro* metabolism of the lignan (–)-grandisin, an anticancer drug candidate, by human liver microsomes. **Drug Testing and Analysis**, v. 7, p.780-786, 2015.

BASAVARAJ, S.; BETAGERI, G. V. Can formulation and drug delivery reduce attrition during drug discovery and development—review of feasibility, benefits and challenges. **Acta Pharmaceutica Sinica B**, v. 4, n. 1, p. 3–17, 2014.

BENET, L. Z. Clearance (née Rowland) concepts: A downdate and an update. **Journal of Pharmacokinetics and Pharmacodynamics**, v. 37, n. 6, p. 529–539, 2010.

BHATT, V. et al. Simultaneous quantification and identification of flavonoids, lignans, coumarin and amides in leaves of *Zanthoxylum armatum* using UPLC-DAD-ESI-QTOF–MS/MS. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.132, p.46-55, 2017.

BJORNSSON, T. D. Practical uses of individual pharmacokinetic parameters in drug development and clinical practice: examples and simulations. **European journal of drug metabolism and pharmacokinetics**, v. 22, n. 1, p. 1–14, 1997.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE, SECRETÁRIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE, DEPARTAMENTO DE VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA. **Manual de Vigilância e controle da Leishmaniose Visceral**. – 1ª ed. – Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 2014.

BRASIL. Manual de recomendações para diagnóstico, tratamento e acompanhamento de pacientes com a coinfeção *Leishmania*-HIV. **Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis**, p. 1–109, 2015.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Casos confirmados de Leishmaniose Tegumentar Americana, Brasil, Grandes Regiões e Unidades Federadas, 1990 a 2015**. Disponível em: <<http://portalarquivos.saude.gov.br/images/pdf/2016/novembro/07/LT-Casos.pdf>>, 2017a.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Casos confirmados de Leishmaniose Visceral, Brasil, Grandes Regiões e Unidades Federadas, 1990 a 2015**. Disponível em: < <http://portalarquivos.saude.gov.br/images/pdf/2017/marco/03/LV-Casos.pdf> >, 2017b.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. **MANUAL DE VIGILÂNCIA DA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR**. 1. ed. Brasília-DF: MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017c.

BRITO, N. M. et al. Validação De Métodos Analíticos: Estratégia E Discussão. **Pesticidas: R.Ecotoxicol. e Meio Ambiente**, v. 13, p. 129–146, 2003.

BUGGINS, T. R.; DICKINSON, P. A.; TAYLOR, G. The effects of pharmaceutical excipients on drug disposition. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 59, n. 15, p. 1482–1503, 2007.

BUXTON, I.L.O; BENET, L.Z. **Pharmacokinetics: The Dynamics of Drug Absorption, Distribution, Metabolism, and Elimination**. In: BRUNTON, L.; CHABNER, B.; KNOLLMAN, B. GOODMAN & GILMAN: The Pharmacological basis of therapeutics. 12th edition, McGraw-Hill, 2011.

CHIARADIA, M. C.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F. O estado da arte da cromatografia associada à espectrometria de massas acoplada à espectrometria de massas na análise de compostos tóxicos em alimentos. **Química Nova**, v. 31, n. 3, p. 623–636, 2008.

CHOWDHURY, S. et al. The lignan niranthin poisons *Leishmania donovani* topoisomerase IB and favours a Th1 immune response in mice. **EMBO Molecular Medicine**, v. 4, n. 10, p. 1126–1143, 2012.

CIELECKA-PIONTEK, J. et al. UHPLC: The greening face of liquid chromatography. **Chromatographia**, v. 76, n. 21–22, p. 1429–1437, 2013.

COSTA, D. N. C. Avaliação da eliminação canina como estratégia de controle de Leishmaniose Visceral Canina a partir de modelos teóricos de dinâmica de transmissão. **FIOCRUZ**, 2012.

CRAGG, G. M.; NEWMAN, D. J. Natural products: A continuing source of novel drug leads. **Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects**, v. 1830, n. 6, p. 3670–3695, 2013.

CROTTI, A. E. M. et al. Espectrometria de massas com ionização por “*Electrospray*”: Processos químicos envolvidos na formação de íons de substâncias orgânicas de baixo peso molecular. **Química Nova**, v. 29, n. 2, p. 287–292, 2006.

DE LUCIA, R. et al. **Farmacologia Integrada: uso racional de medicamentos**. Clube de Autores, São Paulo, v. 2, 2014.

DE OLIVEIRA, L. F. G. et al. Natural products and phytotherapy: an innovative perspective in leishmaniasis treatment. **Phytochemistry Reviews**, v. 16, n. 2, p. 219–233, 2017.

DESJEUX, P. Leishmaniasis: Current situation and new perspectives. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, v. 27, n. 5, p. 305–318, 2004.

DEWICK, P. M. **Medicinal Natural Products: A Biosynthetic Approach: Third Edition**. 3. ed. United Kingdom: Wiley, 2009.

DIEHL, K. H. et al. A good practice guide to the administration of substances and removal of blood, including routes and volumes. **Journal of Applied Toxicology**, v. 21, n. 1, p. 15–23, 2001.

ENNES-VIDAL, V. et al. Why calpain inhibitors are interesting leading compounds to search for new therapeutic options to treat leishmaniasis? **Parasitology**, p. 1–7,

2016.

FABREGAT-CABELLO et al. Comparison of approaches to deal with matrix effects in LC-MS/MS based determinations of mycotoxins in food and feed. *World Mycotoxin Journal*, 9 (2) – p. 149 – 161, 2015.

FAN, J.; DE LANNOY, I. A. M. Pharmacokinetics. **Biochemical Pharmacology**, v. 87, n. 1, p. 93–120, 2014.

FDA. Analytical Procedures and Methods Validation for Drugs and Biologics. **Guidance for Industry**, n. July, p. 1–15, 2015.

FERREIRA, L.S. **Metabolismo e parâmetros farmacocinéticos da lignana grandisina**. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2013.

FUREY, A. et al. Ion suppression; A critical review on causes, evaluation, prevention and applications. **Talanta**, v. 115, p. 104–122, 2013.

GATES, P. J. et al. **Mass spectrometry ionisation techniques and applications for the analysis of organic compounds**. In: TAFT, C. A.; Silva, C. H. T. P. (Org.). *Current Methods in Medicinal Chemistry and Biological*. Kerala: Research Signpost, 2007, v. 1, p. 187-206.

GONÇALVES, E. B.; ALVES, A. P. G.; MARTINS, P. A. Questões críticas em validação de métodos analíticos. **Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária Departamento de Pesquisa e Desenvolvimento Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**, p. 80, 2011.

GOSETTI, F. et al. Signal suppression/enhancement in high-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1217, n. 25, p. 3929–3937, 2010.

GUIDO, R. V. C.; ANDRICOPULO, A. D.; OLIVA, G. Planejamento de fármacos, biotecnologia e química medicinal: aplicações em doenças infecciosas. **Estudos Avançados**, v. 24, n. 70, p. 81–98, 2010.

GUILLARME, D. et al. Coupling ultra-high-pressure liquid chromatography with mass spectrometry. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 29, n. 1, p. 15–27, 2010.

HARRIS, D.C. **Análise Química Quantitativa**. Sexta Edição. Rio de Janeiro: LTC, 2005.

HOFFMANN, E. DE; STROOBANT, V. **Mass Spectrometry Principles and Applications**. 3. ed. England: Wiley, 2007.

HU, Y.-L. et al. Generalized multiple internal standard method for quantitative liquid chromatography mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1445, p. 112–117, 2016.

HUGHES, N. C. et al. Determination of carryover and contamination for mass spectrometry-based chromatographic assays. **The AAPS journal**, v. 9, n. 3, p. E353–60, 2007.

INMETRO. COMISSÃO TÉCNICA DE QUÍMICA (CT-05). Orientação sobre validação de métodos analíticos. **Inmetro**, n. revisão 04, p. 20, 2011.

ISAGUIRRE, A. C. et al. Development of solid phase extraction strategies to minimize the effect of human urine matrix effect on the response of carnitine by UPLC–MS/MS. **Microchemical Journal**, v. 129, p. 362–367, 2016.

JEON, H. et al. Discrimination of origin of sesame oils using fatty acid and lignan profiles in combination with canonical discriminant analysis. **JAOCs, Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 90, n. 3, p. 337–347, 2013.

KOULMAN, A. et al. A fast and simple GC MS method for lignan profiling in *Anthriscus sylvestris* and biosynthetically related plant species. **Planta Medica**, v. 67, n. 9, p. 858–862, 2001.

KRUBE, A. et al. Tutorial review on validation of liquid chromatography-mass spectrometry methods: Part I. **Analytica Chimica Acta**, v. 870, n. 1, p. 29–44, 2015a.

KRUBE, A. et al. Tutorial review on validation of liquid chromatography–mass spectrometry methods: Part II. **Analytica Chimica Acta**, v. 870, p. 29–44, 2015b.

LIPINSKI, C.A.; LOMBARDO, F.; DOMINY, B.W.; FEENEY, P. J. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development setting. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 23, p. 3–25, 1997.

MALDANER, L.; JARDIM, I. C. S. F. O estado da arte da cromatografia líquida de ultra eficiência. **Química Nova**, v. 32, n. 1, p. 214–222, 2009.

MALTEZOU, H. C. Drug resistance in visceral leishmaniasis. **Journal of biomedicine & biotechnology**, v. 2010, n. 11, p. 617521, 2010.

MISTRO, S. et al. Liposomal Amphotericin B drug access for the treatment of leishmaniasis in Brazil. **Tropical Medicine and International Health**, v. 21, n. 6, p. 692–693, 2016.

MOHAPATRA, S. Drug resistance in leishmaniasis: Newer developments. **Tropical parasitology**, v. 4, n. 1, p. 4–9, 2014.

NEERVANNAN, S. Preclinical formulations for discovery and toxicology: physicochemical challenges. **Expert opinion on drug metabolism & toxicology**, v. 2, n. 5, p. 715–31, 2006.

NELSON; COX. **Principles of Biochemistry**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2014.

NÉRIS, P. L. N. et al. Neolignan Licarin A presents effect against *Leishmania (Leishmania) major* associated with immunomodulation in vitro. **Experimental Parasitology**, v. 135, n. 2, p. 307–313, 2013.

OGA, S; CAMARGO, M. M. A.; BATISTUZZO, J. A. O. **Fundamentos de Toxicologia**. 4ª ed., São Paulo: Atheneu, 2014.

OLLIARO, P. L. et al. Investments in Research and Surveillance Are Needed to Go Beyond Elimination and Stop Transmission of *Leishmania* in the Indian Subcontinent. **PLoS Negl Trop Dis** 11(1): e0005190, 2017.

PILON, A. C. et al. NuBBEdb: an updated database to uncover chemical and biological information from Brazilian biodiversity. **Scientific Reports**, 2012.

RAPOSO, F. Evaluation of analytical calibration based on least-squares linear regression for instrumental techniques: A tutorial review. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, v. 77, p. 167–185, 2016.

ROGGE, M. C.; TAFT, D. R. Preclinical Drug Development. (Drugs and the Pharmaceutical Sciences), **Informa Healthcare**, Second Edition: 187, 2010.

ROZET, E. et al. Advances in validation, risk and uncertainty assessment of bioanalytical methods. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 55,

n. 4, p. 848–858, 2011.

SANTOS-OLIVEIRA, J. R.; DA-CRUZ, A. M. Lipopolysaccharide-induced cellular activation may participate in the immunopathogenesis of visceral leishmaniasis alone or in HIV coinfection. **International Journal of Microbiology**, 2012.

SCHELLACK, G. **Farmacologia. Uma abordagem didática**. São Paulo: Fundamento Educacional, 2005.

SCHMIDT, T. J. et al. The potential of secondary metabolites from plants as drugs or leads against protozoan neglected diseases—part II. **Curr Med Chem**, v. 19, p. 2176–2228, 2012.

SHARGEL, L.; WU-PONG, S.; YU, A. B. C. **Applied biopharmaceutics & pharmacokinetics**. 5^a ed., New Baskerville: McGraw Hill, 2005.

SHITARA, Y.; HORIE, T.; SUGIYAMA, Y. Transporters as a determinant of drug clearance and tissue distribution. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 27, n. 5, p. 425–446, 2006.

SINGH, B.; SUNDAR, S. Leishmaniasis: Vaccine candidates and perspectives. **Vaccine**, v. 30, n. 26, p. 3834–3842, 2012.

STAHNKE, H. et al. Reduction of matrix effects in liquid chromatography-electrospray ionization-mass spectrometry by dilution of the sample extracts: How much dilution is needed? **Analytical Chemistry**, v. 84, n. 3, p. 1474–1482, 2012.

TAMURA, M. et al. Minimization of carryover for high-throughput liquid chromatography with tandem mass spectrometry analysis of 14 mycotoxins in corn grits. **Journal of Separation Science**, v. 37, n. 13, p. 1552–1560, 2014.

TOUTAIN, P. L.; BOUSQUET-MÉLOU, A. Volumes of distribution. **Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics**, v. 27, p. 415–425, 2004.

VALENTINI, S. R.; SOMMER, W. A.; MATIOLI, G. Validação De Métodos Analíticos. **Arquivos do Museu Dinâmico Interdisciplinar**, v. 11, n. 2, p. 26–31, 2013.

VEBER, D. F. et al. Molecular properties that influence the oral bioavailability of drug candidates. **J Med Chem**, v. 45, n. 12, p. 2615–2623, 2002.

VÉKEY, K. Mass spectrometry and mass-selective detection in chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 921, n. 2, p. 227–236, 2001.

VESSECCHI, R. et al. Radical Ion Generation Processes of Organic Compounds in Electrospray Ionization Mass Spectrometry. **Mini-Reviews in Organic Chemistry**, v. 4, p. 75–87, 2007.

WANG, C. Y.; SUN, S. W.; LEE, S. S. Pharmacokinetic and metabolic studies of retrojusticidin B, a potential anti-viral lignan, in rats. **Planta Medica**, v. 70, n. 12, p. 1161–1165, 2004.

WHO. Investing to overcome the global impact of neglected tropical diseases: third WHO report on neglected diseases 2015. **Investing to overcome the global impact of neglected tropical diseases: third WHO report on neglected diseases**, p. 191, 2015.

WILKINSON, S. R.; KELLY, J. M. Trypanocidal drugs: mechanisms, resistance and new targets. **Expert reviews in molecular medicine**, v. 11, n. October 2009, p. e31, 2009.

WOLFENDER, J.-L. HPLC in Natural Product Analysis: The Detection Issue. **Planta Medica**, v. 75, n. 7, p. 719–734, 2009.

WU, J. et al. Study on the matrix effect in the determination of selected pharmaceutical residues in seawater by solid-phase extraction and ultra-high-performance liquid chromatography-electrospray ionization low-energy collision-induced dissociation tandem mass spectr. **Journal of Chromatography A**, v. 1217, n. 9, p. 1471–1475, 2010.

ZHAO, C. et al. Simultaneous determination of three major lignans in rat plasma by LC-MS/MS and its application to a pharmacokinetic study after oral administration of *Diphylleia sinensis* extract. **Biomedical Chromatography**, v.28, p.463-467, 2014.